



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARIA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

**PREVALENCIA, IDENTIFICACION Y TIPIFICACION MOLECULAR DE LOS
DIFERENTES GENOTIPOS DE AISLAMIENTOS DE *STAPHYLOCOCCUS*
AUREUS Y SU PRESENTACION CLÍNICA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA**

PRESENTA:

DRA. PATRIK ELIANA SARMIENTO WILCHES
MEXICO, D.F. MMXIV



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**PREVALENCIA, IDENTIFICACION Y TIPIFICACION MOLECULAR DE LOS
DIFERENTES GENOTIPOS DE AISLAMIENTOS DE S. AUREUS Y SU
PRESENTACION CLÍNICA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS**

INVESTIGADORES

TESISTA

Dra Patrik Eliana Sarmiento Wilches

Médico Pediatra – Grado a Obtener: Médico Especialista en Infectología

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Dr. Agustín De Colsa Ranero

Médico Adscrito al Departamento de Infectología Pediátrica

Jefe de laboratorio de Biología Molecular

Torre de Investigación Instituto Nacional de Pediatría

Av. Insurgentes Sur No. 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán

INVESTIGADORES ASOCIADOS:

Dra. Alejandra Aquino Andrade

Adscrita Laboratorio de Biología Molecular

Torre de Investigación de Instituto Nacional de Pediatría

Av. Insurgentes Sur No. 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán

Dr. Napoleón González Saldaña

Infectólogo Pediatra/ Jefe de Servicio Infectología Pediátrica

Cuarto piso del Instituto Nacional de Pediatría

Av. Insurgentes Sur No. 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán

Q.F.B. Patricia Arzate Barbosa

Jefe del Laboratorio de Bacteriología Clínica

Torre de Investigación de Instituto Nacional de Pediatría

Av. Insurgentes Sur No. 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán

Q.F.B. Antonino Lara Hernández

Adscrito del Laboratorio de Bacteriología Clínica

Torre de Investigación de Instituto Nacional de Pediatría

Av. Insurgentes Sur No. 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán.

Dra. Luisa Diaz García

Adscrita al Servicio de Investigación Clínica

Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría

Av. Insurgentes Sur No. 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán

INDICE

RESUMEN	6
MARCO TEORICO	5-17
SISTEMA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	
Detección de resistencia a Oxacilina	13
Detección de resistencia a Clindamicina	13
Detección de resistencia a Vancomicina	13-14
Resistencia a Linezolid	14
Resistencia a Daptomicina	14
TIPIFICACION DE FAGOS	14
SEROTIPIFICACION	15
BIOTIPIFICACION	15
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS	15
ANALISIS DE PLASMIDOS DE DNA	15
ANALISIS DE DNA CROMOSÓMICO POR ANÁLISIS DE ESTRICCIÓN DE ENDONUCLEASAS/	15
ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA SOUTHERN RIBOTIPIFICACIÓN/ TIPIFICACIÓN BINARIA	15
ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS (PFGE)	16-17
REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA BASADA EN MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN	17
Reacción en cadena de polimerasa con iniciador arbitrario AP-PCR/ Amplificación polimórfica aleatorizada de DNA	18
Reacción en cadena de polimerasa con polimorfismo de longitud de fragmentos de Restricción (PCR-RFLP)	18
ANÁLISIS SECUENCIAL DE DNA BASADO EN MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN	
Tipificación secuencial multilocus (MLST)	18
Tipificación secuencial unilocus (STST)	

TIPIFICACIÓN DE CASSETTE CROMOSÓMICO mec (SCCmec)	19
TIPIFICACIÓN DEL PERFIL DE GENES DE TOXINAS	19-20
JUSTIFICACIÓN	20-22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22-23
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	23
OBJETIVOS	
Objetivo General	23
Objetivos específicos	24
CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	24
POBLACIÓN DE ESTUDIO	24
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	24
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	24
UBICACIÓN DEL ESTUDIO	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25-27
DEFINICION OPERACIONAL DE LAS VARIABLES	28-31
TAMAÑO DE LA MUESTRA	32
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
CONSIDERACIONES ÉTICAS	32
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	32
FACTIBILIDAD	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34-35
ANEXO 1. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	36

RESUMEN:

Antecedentes: En los años 90`s aparecieron los primeros casos de SAMR en pacientes sin antecedentes de hospitalización, éstas cepas se llamaron CA-SAMR (community-acquired MRSA). Debido a incremento de resistencia de 2-64% en 30 años se teme una diseminación que se convierta en un problema grave de salud pública en éste siglo. La alarma se suscitó al encontrar un mayor número de infecciones graves de piel y tejidos blandos entre niños y adultos jóvenes sin factores de riesgo. **Justificación:** En el Instituto Nacional de pediatría se ha logrado identificar los aislamientos de *S. aureus* en el lapso de 8 años, a partir de Abril de 2006 a Julio de 2014. Se observa con preocupación como el aumento de SAMR se ve reflejado también en nuestro medio. La sensibilidad de *S. aureus* en el segundo semestre de 2013 reporta 59% de sensibilidad a cefalosporinas de primera generación, similar a 61% de sensibilidad a oxacilina y 56% de sensibilidad a clindamicina, sin encontrar por el momento cepas de SAVR (*S. aureus* vancomicino-resistente). El aumento de la meticilinorresistencia si bien ya se puede cuantificar en un 40% aproximadamente, no conocemos los genotipos de resistencia en el INP, así como tampoco sabemos las características de los pacientes con éstas cepas resistentes. **Objetivos:** Describir la presentación clínica y los diferentes genotipos moleculares de *S. aureus* de los aislamientos obtenidos en pacientes pediátricos en el Instituto Nacional de pediatría en el periodo de Abril de 2006 a Julio de 2014. **Materiales y Métodos:** Estudio de cohorte retrospectiva. Observacional, descriptiva y retrolectiva. Se revisarán todos los registros de cultivos de laboratorio de cualquier lugar corporal positivos para *S. aureus* en el lapso de Abril de 2006 a Julio de 2014, así como los expedientes correspondientes a éstos niños de 0-18 años, ingresados en el Instituto Nacional de Pediatría en éstas fechas, incluyendo sólo los pacientes con infección confirmada por dicho microorganismo. En el Laboratorio de Bacteriología del INP se realizará a todas las muestras, la identificación bacteriana a través de cultivos bacteriológicos, pruebas bioquímicas correspondientes así como se realizarán pruebas automatizadas de susceptibilidad antibiótica, mientras que en el Laboratorio de Biología Molecular de la torre de Investigación del INP, se realizará la tipificación de los aislamientos por campos pulsados en gel de agarosa (PFGE). Se obtendrán de los expedientes de los pacientes correspondientes a éstos aislamientos, los datos demográficos como sexo y edad, así como datos con respecto a proceso infeccioso activo: (fecha de ingreso, fecha de cultivo, sitio de infección). **Análisis de Resultados.** La información obtenida se analizará para establecer la prevalencia y distribución de los diferentes genotipos de *S. aureus*, así como las características clínicas y demográficas de los pacientes, analizando frecuencias relativas y absolutas.

MARCO TEORICO:

Históricamente "Staphylococcus" podría explicar la etiología de "incurable boils: forúnculos incurables" descritos en la sexta plaga en Egipto. El termino Staphylococcus proviene de la expresión griega "Staphylos", que significa [racimo de uvas] y "kokkos" [baya ó semilla] a las que se asemeja en su apariencia macroscópica como cocos de un diámetro entre 0.7 y 1,2 micras, con tendencia a formar grupos y no formar esporas^{1,2}. Fue así como fueron vistos y clasificados por primera vez en 1882, por el cirujano escocés Sir Alexander Ogston. Dos décadas más tarde, un médico alemán, Friedrich J. Rosenbach describió 2 colonias pigmentadas y propuso la nomenclatura Staphylococcus albus (del latín: blanco) y Staphylococcus aureus (del latin "aurum"): [oro], del cual se reconoce su importancia clínicopatológica¹.

Si bien es el más frecuente y su potencia patogénica. Se caracteriza por su capacidad coagulante del plasma (S. coagulasa positivo). Puede sobrevivir en condiciones poco favorables. Desde el momento del nacimiento el neonato puede colonizarse por contacto directo persona a persona ó con el ambiente donde se encuentre. El reservorio más frecuente son las fosas nasales anteriores, por el alto contenido de ácido teicoico al que se adhiere. Se puede encontrar en otras superficies mucosas como la perineal, axilas, orofaringe; además en la piel y en el tracto gastrointestinal. Aproximadamente un 60% de la población norteamericana puede estar colonizada, de los cuales 30% son portadores permanentes y 30% portadores transitorios, el 40% restante no se encuentra colonizado².

Estas cifras cambian según la existencia de factores predisponentes para colonización, como son: pertenecer a personal de salud, diabéticos en tratamiento con insulina, pacientes con dermatopatías crónicas, pacientes en hemodiálisis crónica, y/o consumidores de drogas endovenosas².

Dentro de sus mecanismos patogénicos, se encuentran: proteínas de superficie, denominadas MSCRA-MMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), que desempeñan un gran papel en la adherencia bacteriana a tejidos y cuerpos extraños, al reconocer como receptores (fibrinógeno, fibronectina, colágeno). Tras la colonización S. aureus puede crear biopelículas a través de la producción de un polisacárido de adhesión intracelular, para proteger a la bacteria de las defensas del huésped y los antibióticos. Estos mecanismos, junto a la internalización celular de S. aureus pertenecientes a variantes de colonia pequeña, donde los betalactámicos y glucopéptidos no penetran explican la persistencia y recurrencia de las infecciones estafilocócicas².

La evasión de S. aureus frente a los mecanismos defensivos se realiza a través de diferentes factores como: a) la cápsula polisacárida, con características antifagocíticas, b) la proteína A, que se une a anticuerpos, inactiva la acción opsonizante de la IgG y produce consumo de complemento, c) proteínas que inhiben la quimiotaxis y la extravasación de los polimorfonucleares al sitio de

infección y d) citoquinas que destruyen los polimorfonucleares, una de ellas la Leucocidina de Pantón-Valentine². Esta expresa 2 subunidades: lukS-PV y lukF-PV, (ambas derivadas del locus pvl). Se ha comprobado que las cepas comunitarias de *S. aureus* (SAMR-AC) producen dicha citotoxina, mientras que cepas meticilinosensibles (SAMS) y cepas meticiliorresistentes adquiridas de forma hospitalaria (SAMR-AH) no suelen portarla^{2,3}.

El efecto de LPV es formar poros heptaméricos en las membranas leucocitarias, causando su destrucción. Clínicamente las cepas LPV (+) causan infecciones de tejidos blandos, como furunculosis (93%), abscesos cutáneos (50%) e incluso neumonías de rápida progresión, con alto grado de fatalidad. De forma contraria, infecciones como endocarditis, shock tóxico, neumonías con bacteriemia y mediastinitis entre otras, se han asociado con LPV (-)². Se ha encontrado en SAMR-AC genes luk-S y luk-F que codifican para ésta. Existen estudios en animales y seres humanos que proponen un rol importante en la virulencia de SAMR-AC, sin embargo éstas observaciones no están sustentadas aún por estudios clínicos con buen nivel de evidencia. Dentro de la contraparte los estudios no han demostrado peor evolución en cepas con LPV (+) en pacientes con bacteriemias y se registra igual mortalidad en pacientes con neumonía asociada a cuidado de la salud con LPV(+) y LPV (-), por lo que sólo puede concluirse que si se relaciona con virulencia pero no es el principal determinante de ésta en SAMR-AC¹.

En la invasión y destrucción tisular participan un gran número de enzimas, como lipasas, nucleasas, hialuronidasas, fosfolipasa C y elastasas. Las proteínas de adhesión mencionadas y éstas, facilitan la explicación de las metástasis sépticas³. Finalmente *S. aureus* por medio del clumping factor, actúa sobre los factores de coagulación y las plaquetas, generando un estado protrombótico, que puede desencadenar tromboflebitis³.

En las infecciones relacionadas con toxinas, las manifestaciones clínicas se inician tras la respuesta del huésped a las mismas y no es imprescindible la presencia del microorganismo sino productos extracelulares como: exotoxinas como la exfoliatina responsable del síndrome de piel escaldada por disrupción de desmosomas con descamación cutánea superficial y proteínas que se comportan como superantígenos: la toxina SSTT-1 responsable del shock tóxico además de enterotoxinas de la A-E, G e I, aisladas en la mitad de las cepas de *S. aureus*, las cuales se relacionan con los cuadros de intoxicación alimentaria^{2,3}. Las anteriores toxinas, no son procesadas inicialmente por las células presentadoras de antígenos, sino que se unen de forma directa a las células T, activando el 20% del total de éstas, con posterior liberación masiva de citoquinas como interferón gamma, FNT alfa y beta, IL-1 e IL-6 que conducen a una respuesta inflamatoria exagerada³.

La capacidad patogénica del *S. aureus* es regulada por un sistema de pequeñas proteínas mediadoras autoinducidas (quorum sensing), en función de factores ambientales, que activan un gran número de genes, entre los que se destacan: agr (accessory gene regulator) y sar (staphylococcal accessory regulator)³. En el caso de la expresión del locus agr, su expresión aumenta la producción de toxinas y disminuye la expresión de adhesinas de superficie. Su disfunción se ha asociado a disminución de susceptibilidad a vancomicina, persistencia de bacteriemia por SAMR e incremento de mortalidad¹.

Una vez el estafilococo supera la barrera mecánica de la piel y mucosas, tiene gran capacidad de producir tejido necrótico, fibrina y gran número de leucocitos polimorfonucleares. Si los mecanismos de defensa no son eficaces, pasarán a través de los vasos linfáticos al torrente sanguíneo y a través de bacteriemia, generando focos metastásicos múltiples en piel, articulaciones, hueso, endocardio y pulmón, convirtiéndose en una infección sistémica¹. Los pasos en el desarrollo de la infección son entonces: inoculación, colonización, invasión y evasión de la respuesta del huésped^{2,3}.

Otras clasificaciones pueden ser: nosocomiales / comunitarias ó según su localización, en 3 grupos: Infecciones de piel y sus anexos: foliculitis, forúnculos, ántrax, impétigo, mastitis, hidradenitis supurativa y pioderma, Patologías mediadas por toxinas: Síndrome estafilocócico de la piel escaldada (Síndrome de Ritter), Síndrome de Shock tóxico estafilocócico e Intoxicación alimentaria estafilocócica y finalmente Infección sistémica, dada por bacteriemia con diferentes focos: endocarditis, neumonías, empiema, osteomielitis, artritis, pericarditis, piomiositis, bursitis séptica, entre otras^{2,3}.

Se conocen definiciones estandarizadas de las diferentes infecciones causadas por *S. aureus*, basadas en estudios previos y acorde a los conceptos de Infectious Diseases Society of America (IDSA)⁴:

Se define Infección asociada a cuidado de la salud cuando el paciente tenga más de 48 horas de hospitalización al momento en que se obtuvo el aislamiento, según registro de fecha de crecimiento microbiológico sin considerar otros factores de riesgo asociados, exceptuando pacientes que tengan evidencia del mismo proceso infeccioso activo, previo a ingreso a la Institución. También se incluirán en éste concepto pacientes con aislamiento microbiológico en las primeras 48 horas pero con al menos uno de los siguientes factores de riesgo: 1. historia de hospitalización (excluyendo la normal del neonato), con antecedente de cirugías, diálisis ó estancia hospitalaria prolongada: en el último año, 2. Portar catéter intravascular central ó implantable al momento del cultivo^{4,5}.

Se definirá infección adquirida en la comunidad, a la infección cuyo aislamiento se haya realizado durante las primeras 48 horas del ingreso asociado a ausencia de factores de riesgo descritos^{4,5}.

Infección localizada se establece en el caso de infecciones de piel y tejidos blandos, mientras se considerará infección invasiva: Neumonía, neumonía complicada, asociada a ventilador, bacteriemias, osteomielitis, infecciones de sistema nervioso central y cualquier otra infección que se relacione con aislamiento de *S. aureus* en cualquier líquido corporal normalmente estéril. En el caso excepcional de infección urinaria, se considerará localizada, sólo si ésta se relaciona a la presencia de sonda vesical y no hay bacteriemia asociada^{4,5}.

Se definirá neumonía por *S. aureus* al aislamiento de *S. aureus* de sangre, aspirado pulmonar, fluido pleural y/o empiema así como signos y síntomas consistentes con neumonía más hallazgos compatibles en estudios de imágenes pulmonares (radiografías, tomografías torácicas si se tienen). Neumonía complicada se define si presenta: 1. Neumonía necrotizante, 2. Empiema ó 3. Abscesos pulmonares^{4,5}.

Con respecto a la resistencia de *S. aureus* a la penicilina, se conoce a partir de 2 años luego del uso masivo de la penicilina para el tratamiento de infecciones bacterianas en 1940, cuando aparecen las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de penicilinasas, de tal modo que desde 1960 prácticamente el 100% de las cepas son resistentes a penicilina. Esta resistencia por penicilinasas, está codificada en el gen *BlaZ*, sujeto a una estrecha regulación por los genes *blaI* y *blaR*. Estos genes se encuentran a nivel cromosómico ó a nivel de transposones, que permiten transferencia horizontal⁶.

A finales de los años 50's surge la meticilina, diseñada para infecciones por *S. aureus* penicilinoresistente, pero en 1961 ya se reporta el primer caso de *S. aureus* resistente a ésta, en Inglaterra. Aparecen entonces otras isoxacilpenicilinas (Dicloxacilina, Oxacilina, entre otras) que remplazan la meticilina, dada su nefrotoxicidad. La resistencia a meticilina se considera un referente nominal clínico y de laboratorio, pues no se usa en éstos ámbitos para definir resistencia a la misma⁶.

Se documenta y define que *S. aureus* meticilinoresistente (SAMR) indica que no hay sensibilidad de éste a ningún betalactámico con actividad antiestafilocócica (penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos) y se asocia a resistencia a múltiples antimicrobianos no relacionados estructuralmente como son: tetraciclinas, macrólidos, quinolonas y aminoglucósidos⁶.

Normalmente los betalactámicos se unen a las proteínas de unión a penicilina (PBP) nativas que están en la pared estafilocócica, inhibiendo la biosíntesis del peptidoglucano. La resistencia está generada por producción de proteínas PBP de baja afinidad a éstos, llamadas PBP2a, codificadas por el gen *mecA*, de 2,1 kb de longitud, localizado en la isla genómica móvil (cassette cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), el cual contiene otros genes reguladores y

secuencias de inserción. Son 11 tipos de SCCmec identificados, de los cuales es importante diferenciar los SCCmec I,II y III, que se encuentran en cepas hospitalarias (SAMR-AH) que no tienen leucocidina de Pantón Valentine (LPV-), son cassettes cromosómicos relativamente grandes, que permiten alojar un gran número de genes de resistencia para otros antimicrobianos, por lo que se infiere que las cepas hospitalarias tienen mayor co-resistencia, con un patrón de multidrogo-resistentes (MDR) y requieren glucopéptidos para su tratamiento⁶.

Los tipos de SCCmec IV y V a la inversa, tienen leucocidina de Phanton Valentine positiva (LPV+) y pertenecen a cepas adquiridas en la comunidad : SAMR-AC, que se relacionan con infecciones cutáneas y pulmonares necrosantes. Son cassettes más pequeños, que alojan menos genes, lo que infiere menos corresponsabilidad, por lo que éstas infecciones pueden tratarse con antibióticos como clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclinas y clindamicina entre otros. Lo anterior demuestra la importancia de conocer si la cepa de SAMR es comunitaria ú hospitalaria, dado que tiene implicaciones de resistencia y definirá la elección antibiótica más idónea^{2,3,6}.

Con respecto a la resistencia a vancomicina, se documentó en Japón desde 1997, la susceptibilidad reducida a vancomicina y en el 2002, apareció la primera cepa de *S. aureus* resistente a vancomicina (SARV) en E.U.A. EL SARV se define por CIM ≥ 16 mcg/ml. Hasta la fecha se ha documentado 9 cepas SARV: 7 en Michigan y 2 provenientes de Irán e India. La resistencia a vancomicina, es adquirida de los *Enterococcus* spp por un plásmido de conjugación que porta un transposón (Tn 1546) que contiene el operón VanA, que alteran la configuración de los dipéptidos terminales de los precursores de peptidoglucano: (d-Ala-d-Ala) a (d-Ala-d-Lac), lo que disminuye la afinidad de los glucopéptidos, interfiriendo en su sitio de acción. VanA confiere resistencia a Vancomicina y Teicoplanina⁶.

Más frecuente que SAVR es el *S. aureus* con susceptibilidad intermedia a vancomicina (VISA), que presenta MICs entre 4-8 mcg/ml y poblaciones heterogéneas de éstas (hVISA) con CIM de 1-2 mcg/ ml. El mecanismo de resistencia de éstos, se da por engrosamiento de la pared bacteriana de forma progresiva, hasta dificultar el paso de glucopéptido por la misma además se ha documentado una disminución en la degradación autolítica. La prevalencia de (hVISA) es muy variable, de 0-74%, la mayoría de reportes: de 5-15%. Su detección se realiza por E-test, cuando la zona de inhibición de crecimiento es > 8 mcg/ ml para vancomicina y teicoplanina ó ≥ 12 mcg/ml solamente para teicoplanina. La sensibilización para su diagnóstico radica en la necesidad de

otros esquemas antibióticos como: linezolid, Quinupristin/ Dalfopristin, Trimetoprim-Sulfametoazol y Daptomicina⁶.

Con respecto a *S. aureus* meticilinorresistente adquirido en la comunidad, su incidencia ha aumentado en las últimas décadas, a partir de 1990, incluyendo población previamente sana, como causa de infecciones no sólo localizadas a nivel de piel, sino también infecciones sistémicas que requieren manejos agresivos. De ésta manera, también se ha sensibilizado su reporte en la población pediátrica, encontrando diferentes publicaciones que hacen referencia a aumento de morbimortalidad: Es así como visualiza una real preocupación cuando el CDC reportó en 1999, los primeros 4 casos de muerte pediátrica en Minnesota y Dakota Norte, entre 1997-1999 asociados a CA-SAMR⁷. Luego en un instituto pediátrico del Norte de Brazil, se reportó en el 2008 que el 4.9% de las cepas de SA-AC eran resistentes a la meticilina: SAMR. De la misma forma un estudio de seguimiento por 3 años en un Hospital pediátrico en Texas, publicado en el 2005, documentó un porcentaje de CA-SAMS (8.2%) con respecto a CA-SAMR (4.4%), en pacientes con infecciones invasivas y un estudio en Hawaii, en niños hospitalizados con neumonía por CA-SA, reveló más complicaciones pulmonares en pacientes infectados con MRSA para el año 2010⁸.

Con respecto a los métodos diagnósticos, hay métodos fenotípicos y genotípicos^{9,10}.

Dentro de los métodos fenotípicos, son más fáciles de realizar e interpretar, costo-efectivos, ampliamente disponibles aunque menos discriminatorios. Agrupa los aislamientos en pequeños grupos y es útil en el tamizaje inicial para la identificación de cepas epidémicas conocidas⁶. Entre ellos se encuentra:

SISTEMA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA: mide la sensibilidad antimicrobiana con respecto a diferentes antibióticos, con puntos de corte de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) según "the Clinical Laboratory Standards Institute: (CLSI)", FDA y "European Committee Antimicrobial susceptibility testing: (EUCAST)" que permiten considerar un microorganismo como susceptible, de resistencia intermedia ó de alta resistencia. Se interpreta como "susceptible" cuando el aislamiento es inhibido por la concentración de antibiótico usual alcanzada cuando se emplea la dosis recomendada para el tratamiento¹⁰.

Los puntos de corte se determinan basados en la distribución de las (CIM), dosis, parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de antimicrobiano. El antibiograma con sus puntos de corte da resultados rápidos pero no debe usarse como único método para identificar SAMR, porque los patrones de resistencia están influenciados por: el entorno, presión antibiótica selectiva, pérdida y adquisición de plásmidos con genes de resistencia y otros mecanismos genéticos. También existen métodos de difusión en disco, caldos de microdilución y test de sensibilidad con escala (Etest), que requieren incubación luego de crecimiento

del *S. aureus* en cultivo puro, cuyos resultados de resistencia deben ser confirmados por métodos alternativos^{9,10}.

Detección de resistencia a oxacilina:

Una característica de resistencia a meticilina es su expresión heterogénea, con la mayoría de células susceptibles a bajas concentraciones de oxacilina y sólo un pequeño grupo de células crecen a una concentración mayor que 50 mcg/ml. Existen diferentes métodos, incluyendo caldos y agares, bajo incubación a temperaturas no mayores a 35°C con lectura luego de 24 horas de incubación. Debe suplementarse los medios de Mueller –Hinton con NaCl al 2% para los test de dilución¹⁰.

Con respecto a las pruebas de difusión de disco (Kirby –Bauer), se ha demostrado que los discos de cefoxitina son equivalentes a los de oxacilina. CLSI ha adoptado éste disco para predecir la resistencia a oxacilina mediada por *mecA*, pero los resultados se reportan para oxacilina y no para cefoxitin. Se requieren métodos alternativos para confirmar los resultados de éstos métodos fenotípicos¹⁰.

Detección de resistencia a Clindamicina: El mecanismo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS) se da por metilación ribosomal, dependiente de gen *erm*, que puede ser inducible ó ^{constitutivo}¹⁰.

Cuando es constitutivo, se tiene resistencia a eritromicina y clindamicina al tiempo. Cuando es inducible, se comprueba con la prueba D (D test), usando un disco de clindamicina de 2 mcg y uno de 15 mcg de eritromicina, distanciados 15-26 mm en agar sangre o de Mueller Hinton con un inóculo estándar. Luego de incubación, cuando se aplana el halo de inhibición de la clindamicina, se considera que eritromicina induce resistencia a clindamicina (resistencia inducible). Esta resistencia cobra importancia para las cepas CA-SAMR que pueden ser sensibles a clindamicina¹⁰.

Otro mecanismo de resistencia son las bombas de eflujo, codificadas por gen *msr* (fenotipo M), con resistencia a eritromicina y sensibilidad a clindamicina¹⁰.

Detección de resistencia a Vancomicina: En el 2006, CLSI disminuyó el punto de corte de ≤ 4 mcg/ml a 2 mcg/ml. Hay diferentes métodos de medición. La microdilución el caldo es el estándar de oro pero tarda tiempo, poco empleado. Se ha reportado aumento de clonas con MIC superiores a 2 mcg/ml en ciertos hospitales¹⁰.

Aislamientos clasificados como hVISA tienen MIC en rango de susceptibilidad cuando se evalúan por los métodos convencionales, pero exhiben células con MIC en rango intermedio cuando se hace análisis poblacional, que es el estándar de

oro, sin embargo se cuenta con agares con 4 ó 6 mcg/ ml de vancomicina ó teicoplanina, macrométodo y el Etest para resistencia a glicopéptido¹⁰.

La prevalencia de hVISA varía de 0-74%, según área geográfica, por la falta de estandarización diagnóstica y la inestabilidad fenotípica, una vez los aislamientos son subcultivados, congelados y almacenados. Debe sospecharse hVISA, VISA y a VRSA ante: tratamientos prolongados con vancomicina, cultivos con crecimiento de *S. aureus* a pesar de tratamiento, morfología atípica de pequeñas colonias, reacción de catalasa débil e incremento de la MIC de daptomicina¹⁰.

No se tiene métodos claramente aceptados para detección de hVISA, es difícil discriminar entre 2-4 mcg/ ml. CLSI establece MIC \geq 8 mcg/ ml para VRSA en caldos de microdilución. Los métodos automatizados para detección de VISA y VRSA tienen sensibilidad variable. Se recomienda Etest para confirmar VRSA ó VISA. Cualquier *S. aureus* con resultados de MIC \geq 8 mcg/ ml debe confirmarse en laboratorios de referencia¹⁰.

Detección de Resistencia a Linezolid: Se cuantifica con puntos de corte para disco de difusión \geq 21 mm y MIC \leq 4 mcg/ml en staphylococcus. Organismos con resistencia por disco de difusión deben confirmarse con MICs¹⁰.

Detección de Resistencia a Daptomicina:

CSLI provee punto de corte de MIC \leq 1mcg/ ml para sensibilidad a daptomicina y confirmación con otro método ante no suceptibilidad. Hay pobre correlación entre métodos automatizados, Etest y métodos de referencia. Los medios necesitan suplencia con calcio. En caso de Etest: 40 mcg/ ml¹⁰.

Dentro de las cefalosporinas de quinta generación, la FDA aprobó la ceftarolina para SAMR, su actividad sobre éste radica en la afinidad a PBP2a y la sensibilidad a ésta se estableció con MIC \leq 1 mcg/ml (FDA). Hay estudios que afirman que el 99,1% de las cepas de SAMR con diferentes SCC mec son inhibidas por ceftarolina mas un nuevo inhibidor de betalactamasas (avibactam) a \leq 2 mcg/ ml¹⁰.

TIPIFICACION DE FAGOS:

Se estandarizó por el Subcomité internacional de tipificación de fagos para Staphylococcus. Se han aceptado 23 fagos internacionales para tipificar cepas humanas de Staph. aureus. Requiere el mantenimiento del fago biológico activo, demandan tiempo y se considera que una alta proporción de SAMR no se tipifica. Es preferida como la técnica inicial de abordaje en investigación epidemiológica^{9,10}.

SEROTIPIFICACION:

Cepas de la misma especie pueden diferir en sus determinantes antigénicos expresados como lipopolisacáridos de superficie, proteínas de membrana y capsulares. Hay diferentes métodos: aglutinación bacteriana, aglutinación en latex, coaglutinación y ensayos enzimáticos. La técnica es reproducible pero tiene pobre discriminación y limitada actividad en el campo epidemiológico. Se han identificado 11 fagos, pero los más frecuentes para SAMR son el tipo 5 y 8⁹.

BIOTIPIFICACION:

Usa patrones de características metabólicas expresadas por el aislamiento, como son: producción de ureasa, hidrólisis en Tween 80 y tolerancia a medios químicos y colorantes. Las técnicas son simples, reproducibles, fáciles de realizar pero no para gran número de muestras. La producción de ureasa es un importante marcador epidemiológico de los clones EMRSA-15 y EMRSA -16⁹.

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS:

Comprende varios métodos: tipificación de proteínas celulares, inmunotransferencia, enzimas multilocus, electroforesis y zimotipificación⁹.

Los métodos genotípicos son costosos, técnicamente demandantes, pero más discriminatorios y con mayor eficacia diagnóstica. Permiten diferenciar cepas epidémicas de cepas endémicas^{9,10}. Entre ellos:

ANALISIS DE PLASMIDOS DE DNA:

Fue la primera técnica molecular usada en investigación. Se caracteriza por diferenciar aislamientos según número y tamaño de plásmidos. Fácil de realizar pero carece de reproductibilidad por la existencia de plásmidos con diferentes formas moleculares, patrones de migración diferente en electroforesis y eliminación ó ganancia de trasposones. Cepas relacionadas pueden tener un perfil de plásmidos diferente. No útil en epidemias. La restricción con endonucleasas (Restriction endonucleasa analysis: REA) ha mejorado su poder de discriminación⁹.

ANALISIS DE DNA CROMOSÓMICO POR ANALISIS DE RESTRICCIÓN DE ENDONUCLEASAS/ ANALISIS DE TRANSFERENCIA SOUTHERN/ RIBOTIPIFICACION/ TIPIFICACION BINARIA

Las endonucleasas cortan el DNA en una secuencia nucleótida específica. El número y tamaño de los fragmentos de restricción generados depende de la secuencia de reconocimiento de la enzima y la composición del DNA. Los fragmentos son separados según tamaño en gel de agarosa por electroforesis. El patrón se tiñe con Bromuro de Etidio y se examina a la luz ultravioleta. Su desventaja es el gran número de bandas generadas, que pueden sobreponerse y dificultar su interpretación^{9,10}.

En el análisis Southern los fragmentos de restricción son transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las variaciones en el número y formas de los fragmentos detectados se refieren como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción⁹.

La ribotipificación se basa en la hibridación southern, pero las enzimas realizan digestión de RNA ribosomal y los fragmentos obtenidos se marcan con radioisótopos o con uracilo. EcoR1 es la enzima que produce mayor número de bandas. Es una técnica reproducible, pero con menor eficiencia con respecto a electroforesis de campos pulsados para identificar cepas SAMR⁹.

La tipificación binaria también es una modificación de la técnica Southern, pero se basa en la detección de presencia ó ausencia de combinación de loci genéticos de PCR. Los productos amplificados se detectan por electroforesis en gel ó PCR en tiempo real. Pueden usarse objetivos binarios de identificación como: genes de toxinas, genes de resistencia antibiótica, loci SCCmec y marcos de lectura derivados de fagos. Su eficacia depende del número de sondas empleadas. Se usa para estudiar relaciones clonales y rutas de transmisión de cepas de SAMR bovino⁹.

ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS (PFGE):

Es una variante de la electroforesis en gel de agarosa convencional, donde la orientación de los campos eléctricos a través del gel cambia periódicamente. Esta modificación facilita la separación de los fragmentos de acuerdo al tamaño, minimizando la sobreposición de éstos, permitiendo obtener menos fragmentos pero de mayor longitud que con la electroforesis de campo constante. La enzima más empleada en investigación de SAMR es la Sma I. Es una técnica de proceso elaborado que requiere equipos y reactivos costosos pero tiene alta reproductibilidad y es el estándar de oro para tipificar SAMR. Es el método más eficaz en estudios epidemiológicos de brotes comunitarios y hospitalarios^{9,10}.

La base de datos nacional de PFGE para SAMR, permite la identificación de la mayoría de linajes de éstos. Sin embargo faltan protocolos estandarizados que permitan comparar con los aislamientos en otros países⁹.

REACCION EN CADENA DE POLIMERASA BASADA EN METODOS DE TIPIFICACION: Dentro de éstas se reconocen

Reacción en cadena de polimerasa con iniciador arbitrario AP-PCR /Amplificación polimórfica aleatorizada de DNA: Usa primers (iniciadores) de secuencias nucleótidas arbitrarias de homología desconocida con una secuencia blanco. La técnica no requiere digestión de los segmentos amplificados. El poder discriminatorio es variable, dependiendo del número de secuencia de primers usada. Tiene poca interreproductibilidad entre laboratorios. Es útil en estudios de epidemias y como prueba de tamizaje rápida⁹.

Reacción en cadena de polimerasa con polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP): Amplifica fragmentos definidos de DNA, con posterior digestión del producto amplificado con la restricción enzimática. Los polimorfismos generados permiten mejor discriminación de las cepas. Se emplea gen coagulasa (coa) y gen spa para la identificación de SAMR⁹.

ANALISIS SECUENCIAL DE DNA BASADO EN METODOS DE TIPIFICACION:

Tipificación secuencial multilocus (MLST): Se basa en el análisis secuencial de múltiples genes constitutivos (housekeeping genes). Los siete genes estudiados: arcC, aroE, glpF, gmk, pta, tpi y yqiL. Las diferentes secuencias de cada gen están asignadas como diferentes alelos y cada SAMR es definido por los alelos de los 7 genes⁹.

Se usa en conjunto con el análisis de PCR del cassette cromosómico estafilocócico mec (SCCmec) como método de referencia para los estudios multicéntricos de SAMR. El subcomité de sociedad microbiológica de tipificación de *S. aureus* ha aceptado una nomenclatura internacional para éstos tipos de clones, por ejemplo un clon epidémico de Inglaterra: EMRSA-15 es referido como MLST22-MRSA SCC mec tipo IV. Existe una base de datos a nivel de la web con respecto a la tipificación MLST: (www.mlst.net) para la comparación de resultados⁹.

Esta técnica ha sido usada para identificar cepas de ganado asociadas a SAMR y su transmisión entre especies humanas y animales. Ha mostrado buen nivel de concordancia con los resultados obtenidos por PFGE y tipificación por Spa⁹.

Tipificación secuencial unilocus (SLST):

Se usa para comparar la variación de la secuencia de de un solo blanco genético. Los genes empleados son usualmente repeticiones de secuencias cortas (SSR). Los genes para la proteína A (spa) de 24 pb y la coagulasa (coa) de 81 pb en las cepas de SAMR tienen secuencias de repeticiones que determinan cada linaje. La tipificación de Spa diferencia entre cepas con fagos identificables vrs no identificables. Esta técnica es útil en vigilancia nacional e internacional así como estudios epidemiológicos locales, sin embargo también se recomienda combinarla con marcadores de genes de resistencia como SCCmec⁹.

TIPIFICACION DE CASSETTE CROMOSÓMICO mec (SCCmec):

El cassette SCCmec es un elemento genético móvil de resistencia, que contiene el complejo genético mecA y el complejo genético ccr con diferentes alotipos. Se conocen principalmente 8 tipos de SCCmec: (I-VIII) entre las diferentes cepas de SAMR. Cada SSCmec codifica para la resistencia a diferentes antibióticos. Los estudios han encontrado relación entre cepas adquiridas en hospital (SAMR-AH) y SCCmec: I, II y III mientras que las cepas de S. aureus adquiridas en la comunidad: (SAMR-AC) contienen los cassettes IV y V. Sin embargo se reportan variantes^{9,10}.

Existen diferentes métodos para el estudio de SCCmec como son: mapeo por PCR de complejo mec, complejo ccr y región j ó la determinación de la secuencia de fragmentos internos de los genes recombinantes⁹.

TIPIFICACION DEL PERFIL DE GENES DE TOXINAS

SAMR tiene diferentes tipos de toxinas. Los genes de las enterotoxinas se encuentran codificados en islas de patogenicidad. Los genes de la leucocidina de Pantón Valentin (LPV) se encuentran en bacteriófagos y se transfieren entre linajes. Estos perfiles genéticos de las toxinas se usan para tipificar cepas de SAMR. Se ha encontrado diferentes perfiles toxigénicos de SAMR según el área geográfica^{9,10}.

También se ha reportado que la mayoría de las cepas de SAMR-AC poseen genes de PVL, que han evolucionado a partir de cepas de SAMS-AC. Clones de SAMR-AC como CC5, CC22 y USA 300 son positivos para LPV, mientras clones de cepas de hospital de Brasil, Irlanda e Iberia asociados a cepas UK-EMRSA, de una serie de EMRSA-1 a EMRSA 17 no tienen genes de LPV. Las cepas UK-EMRSA portan genes de enterotoxinas A-E. Se ha encontrado correlación entre el perfil genético de toxinas y los SCCmec. Se recomienda la PCR múltiple para la detección de toxinas de SAMR. Es una técnica reproducible, fácil de interpretar y

con un alto grado de discriminación, útil para estudiar la diversidad cromosómica y la evolución histórica de SAMR⁹.

JUSTIFICACIÓN

En el Instituto Nacional de pediatría se ha logrado identificar los aislamientos de *S. aureus* en el lapso de 8 años, a partir de Abril de 2006 a Julio de 2014. Se observa con preocupación como el aumento de SAMR se ve reflejado también en nuestro medio. La sensibilidad de *S. aureus* en el segundo semestre de 2013 reporta 59% de sensibilidad a cefalosporinas de primera generación, similar a 61% de sensibilidad a oxacilina y 56% de sensibilidad a clindamicina, sin encontrar por el momento cepas de SAVR (*S. aureus* vancomicino-resistente).

El aumento de la meticilinorresistencia si bien ya se puede cuantificar en un 40% aproximadamente, no conocemos los genotipos de resistencia en el INP, así como tampoco sabemos las características de los pacientes con éstas cepas resistentes.

Inicialmente, en 1961, las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SAMR) se diseminaron pero se mantuvieron como un problema asociado a entorno hospitalario (SAMR-AH: *S. aureus* meticilino-resistente de adquisición hospitalaria)⁸. Inicialmente se reconoció el fago tipo 83 A, que emergió en Europa, pareció tener un ligero descenso, para luego en 1970 adicionarse la resistencia a eritromicina en Europa y Estados Unidos y una cepa multidrogorresistente se convirtió en epidémica en Australia¹. De ésta manera en 1980, SAMR alcanzó una prevalencia de 14% en los Hospitales universitarios de Australia, incrementó de 8 a 22% al final de dicha década en Estados Unidos y una clona epidémica (SAMRE) fue importado de Australia a Inglaterra y pronto a Europa y Estados Unidos¹.

Para los años 90's aparecieron en el Oeste Australiano los primeros casos en pacientes sin antecedentes de hospitalización, denominándose a éstas cepas *S. aureus* meticilino-resistente de adquisición en la comunidad (SAMR-AC). La cual se expandió en años siguientes a Europa, Estados Unidos, Latinoamérica y Asia¹. Se describe entonces un alarmante incremento de la resistencia de *S. aureus* de un 2% a un 64% en 30 años¹¹, lo que hizo real y más cercano el temor a una diseminación eficiente y se ve entonces con preocupación como un problema de salud pública potencial en éste siglo.

Estas cepas generalmente afectaron personas jóvenes, sin contactos infectantes, produciendo infecciones cutáneas y neumonías¹. Como se describió anteriormente éstas cepas se diferenciaron de las de SAMR-AH (principales clones pandémicos). Las cepas de SAMR-AC eran susceptibles a múltiples antibióticos no betalactámicos y portaban el cassette SCCmec tipo IV y menos frecuentemente el

tipo V así como LPV(+). De ésta manera aparecieron nuevas clonas. USA 400 (ST1-SAMR-IV) fue la primera clona en USA, la cual fue desplazada en poco tiempo por USA 300 (ST8-SAMR-IV), que se convirtió en la principal causa de infecciones de tejidos blandos en adultos¹. En Francia de forma paralela emergió la clona ST5 Geraldine, la cual es más prevalente ahora que la clona previa ST80¹.

No pasó mucho tiempo para que SAMR –AC entrara en los hospitales, causando infecciones invasivas y así dando controversia a su rótulo de "adquirido en la comunidad". Actualmente se informa que el 16% de infecciones invasivas por SAMR son debidas al genotipo (USA300), que originalmente apareció en la comunidad¹.

Se ha asociado el un genotipo USA 300 multirresistente con hombres homosexuales, con el fenotipo VISA (S. aureus de resistencia intermedia a vancomicina) y se ha reportado resistencia a vancomicina en pacientes con endocarditis infecciosa causada por ésta clona¹.

En la actualidad en Estados Unidos se ha visto un leve aumento de SAMR en los niños, mientras en América Latina éste aumento es más notable. USA300 es el genotipo más relacionado con los aislamientos de SAMR en ambas poblaciones y ésta diferencia se explica al parecer por una ventaja competitiva de ésta clona en América Latina¹². Se sigue describiendo además que la LPV es un factor patogénico de SAMR: 96% de casos y se sigue relacionando con neumonía necrotizante, pero también predomina en cepas de SAMS: 92% de casos, siendo mayor su prevalencia en casos de neumonía con respecto a infecciones en otras localizaciones: 46% en casos de artritis séptica por SAMS y 25% en los casos de osteomielitis en niños en Estados Unidos¹¹. De la misma forma SAMR y la clona USA300 se sigue viendo más en niños, asociado a neumonía¹³.

Para el año 2005, fallecieron en USA 18650 personas por infecciones graves causadas por SAMR y no se encontró antecedente de atención hospitalaria ó algún factor de riesgo en el hospedero. Esto generó el estudio y caracterización de éstas cepas de SAMR –AC así como la diferenciación con respecto a SAMR-AH con respecto a sus diferentes cassettes cromosómicos SCCmec¹¹.

Dentro de éstos conocimientos se ha podido diferenciar por ejemplo que la clona 300 que circula en países como Colombia y otros países de América del Sur, así como Australia tiene SCCmec tipo IV c y no porta el elemento móvil catabólico de arginina con respecto a las clonas USA300 de Estados Unidos, pero se desconoce las implicaciones clínicas de éstos hallazgos¹².

La importancia de este estudio radica en reconocer que los mecanismos que dieron lugar a la aparición de cepas comunitarias resistentes siguen siendo motivo de controversia, la frecuencia de cepas de S. aureus resistentes a meticilina es elevada (50-85%) y hasta ahora las únicas medida de prevención que han

mostrado ser útiles para disminuir la resistencia son: el uso adecuado de antibióticos, usar guantes para el contacto con lesiones y secreciones de los pacientes con éstas infecciones, la descontaminación de piel y nariz de pacientes colonizados por SAMR previo a cirugía y la implementación del lavado de manos^{1,11}. Se ha visto como éstas medidas han reducido las infecciones por SAMR a un total de 1481 eventos reportados por The National Health Service entre abril de 2010 a marzo de 2011, con una reducción del 50% con respecto a 2008-2009 de la misma forma se ha reducido la mortalidad por SAMR en Inglaterra, la cual se registró en 1652 casos a 488 en el 2010¹.

Ante éste contexto sólo cuantificar el problema a nivel local permitirá generar no sólo el primer paso en el conocimiento de la verdadera resistencia sino generará información con respecto a las características de la población infantil afectada por los diferentes genotipos y suscitará la inquietud con respecto a generar conductas para mejorar el uso indiscriminado de antibióticos y propondrá el estudio dirigido hacia un mejor conocimiento de las características y factores de patogenicidad de los genotipos más frecuentes en el Instituto Nacional de Pediatría.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los datos con respecto a resistencia de *S. aureus* en América Latina son limitados, se describen clonas resistentes desde 1990 en Brasil, Argentina, Chile, Colombia, México y Paraguay con diversos perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos. En México se ha identificado de forma aislada, una mayor frecuencia de la clona Nueva York/ Japón¹¹.

En México no se tiene un registro del número de infecciones graves ni de mortalidad asociada a infecciones por SAMR-AC ni SAMR-AH. La información que se posee proviene de estudios aislados¹¹.

Ammons y cols en el 2010, investigaron SAMR y los elementos génicos de resistencia del SCCmec en adultos en la frontera de México y el sur de Texas, en 57 aislamientos encontrados entre 375 cultivos nasales. Encontraron 6 cepas de SAMR, 5 de ellas con SCCmec tipo IV. También encontraron cassette Spa, correspondiente a clonas USA 300 y USA 600. Se explicó estos hallazgos, por transferencia horizontal de los mecanismos de resistencia, dada la facilidad para cruzar la frontera y adquirir antimicrobianos sin receta médica con selección secundaria de resistencia, así como adquisición de nuevas clonas nasofaríngeas¹¹.

Con respecto a estudios hospitalarios, en el lapso de 1999-2003 en un Hospital de tercer nivel de atención se encontró una clona con Spa tipo 2, SCCmec tipo II y en un Hospital pediátrico en un período de tiempo similar, se detectó una nueva clona, que se denominó "M" de México con un SCCmec IV y la clona

multirresistente Nueva York/ Japón con SCCmec II que la reemplazó pero al final del seguimiento del estudio (7 años) se controló con antimicrobianos¹¹.

Los reportes de infección por SAMR –AC en niños, son aún más escasos y se limitan a series de casos ó estudios de portadores. Se conocen entre éstos, los estudios de Velasquez y cols (2009), que reporta un 10% de colonización por *S. aureus* y un 0.93% de SAMR entre 2345 niños de guarderías del Norte y Sur de México. De las 22 cepas de SAMR que se encontraron, se separaron en 6 clonas por PFGE y dentro de éstas se halló uno de los perfiles con similitud a la clona USA 100, de origen hospitalario, estadounidense. Lo anterior confirma la capacidad de diseminación de la resistencia que se infiere por migración poblacional¹¹.

Si bien en el Instituto Nacional de Pediatría, no contamos con métodos fenotípicos diferentes a la tipificación de sensibilidad manual y con antibiograma automatizado, así como no disponemos de métodos genotípicos basados en reacción de cadena de polimerasa para definir los diferentes cassettes cromosómicos SCCmec, si contamos con los recursos para la realización de identificación molecular por medio de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), la cual se conoce como el estándar de oro para identificación de SAMR por el momento. Al respecto, solo se requiere aprovechar dicho recurso, cuantificado los resultados con respecto a *S. aureus* y sus patrones genotípicos.

La identificación de los diferentes genotipos de los aislamientos de *S. aureus* y la descripción de los datos demográficos y clínicos de los niños afectados, nos permitirá definir no sólo caracterización de éstas clonas en nuestra población pediátrica sino que tendrá implicaciones en modificaciones de tratamiento, que pueden disminuir la selección de resistencia y evitar diseminación de clonas multirresistentes que generen mayor morbimortalidad.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Cuales son las diferentes genotipos de *Staphylococcus aureus* aislados en pacientes del Instituto Nacional de Pediatría a partir de Abril de 2006 hasta Julio de 2014?

OBJETIVOS

Objetivo General:

Describir la presentación clínica y los diferentes genotipos moleculares de *S. aureus* de los aislamientos obtenidos en pacientes pediátricos en el Instituto Nacional de pediatría en el periodo de Abril de 2006 a Julio de 2014.

Objetivos específicos:

Describir las características (edad, sexo y comorbilidades) de los pacientes en los que se obtuvo aislamientos de *S. aureus* según su tipificación molecular.

Conocer la prevalencia y distribución de *S. aureus* de origen comunitario como hospitalario.

Observar la distribución de los diferentes genotipos de *S. aureus* según el tipo de infección: Localizada (no invasiva) ó invasiva.

Describir la distribución de los diferentes genotipos de *S. aureus* aislados según los diferentes sitios corporales de aislamiento de la infección.

Describir los diversos patrones de resistencia a meticilina de los *S. aureus* y patrones sugestivos de co-resistencia obtenidos.

Describir los antibióticos empleados para la infección activadocumentada por *S. aureus*.

CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Estudio de cohorte retrospectiva. Observacional, descriptiva, y retrolectiva.

POBLACIÓN DE ESTUDIO: Son todos expedientes de los pacientes que ingresan al Instituto Nacional de pediatra con un proceso infeccioso activo documentado por *Staphylococcus aureus* con los reportes de cultivos positivos para éste microorganismo obtenidos en el lapso de Abril de 2006 a Julio de 2014.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Todos los expedientes de pacientes entre 0-18 años, que consultaron al INP, con diagnóstico de infección clínicamente confirmada por *S. aureus* y aislamiento microbiológico de éste, sin importar sitio anatómico de infección y que tengan toda la información necesaria para contestar los objetivos de éste estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

Pacientes con más de 2 microorganismos en sus aislamientos.

UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El Instituto Nacional de Pediatría, en Ciudad de México, D.F es el sitio de estudio en el cual se recolectarán los aislamientos de *S. aureus* así como los expedientes respectivos de los pacientes con infección clínica confirmada por éste microorganismo. En el Laboratorio de Bacteriología se realizará la identificación bacteriana a través de cultivos bacteriológicos, pruebas bioquímicas correspondientes así como se realizarán pruebas automatizadas de susceptibilidad antibiótica, mientras que en el Laboratorio de Biología Molecular de la torre de Investigación del mismo INP, se realizará la tipificación de los aislamientos por campos pulsados en gel de agarosa (PFGE).

MATERIALES Y MÉTODOS

En ésta cohorte retrospectiva se revisarán todos los registros de cultivos de laboratorio de cualquier lugar corporal positivos para *S. aureus* en el lapso de Abril de 2006 a Julio de 2014, así como los expedientes correspondientes a éstos niños de 0-18 años, ingresados en el Instituto Nacional de Pediatría, incluyendo sólo los pacientes con infección confirmada por dicho microorganismo.

De los registros de cultivo, se extraerá datos como: fecha de toma de cultivo, líquido ó sitio corporal de muestra, sensibilidad antibiótica de *S. aureus*. Este registro se revisará de forma consecutiva. Se incluirán los aislamientos obtenidos de las siguientes muestras biológicas: sangre, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), secreciones purulentas varias (heridas, infecciones cutáneas-piel y tejidos blandos, infecciones osteoarticulares, líquido pleural, líquido peritoneal), así como aislamientos obtenidos de catéteres intravasculares y cualquier dispositivo de implantación quirúrgica (prótesis cardiacas-articulares-óseas, válvulas de derivación ventricular).

Los aislamientos obtenidos podrán ser de pacientes hospitalizados o bien pacientes ingresados al Instituto en el periodo de estudio, independientemente de su edad, sexo y condición clínica ó epidemiológica.

Se inferirá si pertenece a fenotipo comunitario ú hospitalario según la corresponsión sugerida, teniendo en cuenta clasificación según descripción de las CIM —(concentraciones inhibitorias mínimas) para antibióticos descritos registrado en el reporte de BD Phoenix e interpretadas según guías de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2014¹⁴.

Si hay un patrón con resistencia a oxacilina y clindamicina y sensibilidad a vancomicina: Sugiere corresponsión asociada a cassette cromosómico hospitalario.

Si hay un patrón de sensibilidad a oxacilina ó resistencia a oxacilina pero sensibilidad a clindamicina, TMT-SMX sugiere patrón de corresponsencia asociada a cassette cromosómicos comunitarios.

De los expedientes se obtendrá los datos demográficos de los pacientes como son: edad, sexo, así como otros datos relacionados al evento clínico, como son: comorbilidades, fecha de ingreso, días de hospitalización al momento de aislamiento bacteriológico, lugar anatómico de la infección, antibióticos administrados por infección actual, tiempo de estancia hospitalaria, ingreso a unidad de cuidados intensivos y mortalidad entre otros.

Teniendo en cuenta las definiciones de estudios previos y de Infectious Diseases Society of America (IDSA)⁴ establecidas, se definirá si los pacientes presentan una infección por *S. aureus* y se clasificará según los criterios ya descritos en el marco teórico, si se trata de una Infección asociada al cuidado de la salud ó una infección adquirida en la comunidad. Así mismo se definirá si las infecciones son localizadas ó invasivas y se clasificarán según su localización.

Se registrará la información consignada en el registro de laboratorio de Bacteriología Clínica del Instituto Nacional de Pediatría, donde se realizarán pruebas fenotípicas para *S. aureus*, como son: evaluación morfológica macroscópica en medios con agar sangre, con la definición del tipo de hemólisis del medio, evaluación microscópica por tinción de gram y se realizarán pruebas bioquímicas como: test de coagulasa (*S. aureus* es un microorganismo positivo para la reacción de coagulasa). Luego se identificará el microorganismo y se hará pruebas de sensibilidad para los diferentes antibióticos por medio de sistema microbiológico automatizado BD PhoenixTM ¹⁵, con interpretaciones de las sensibilidades antibióticas basado en las guías de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2014)¹⁴.

La prueba de resistencia inducible a clindamicina será realizada a las cepas resistentes a macrólidos. Se llevará a cabo con la prueba de (Zona D ó D test) con doble disco de difusión: disco de eritromicina y de clindamicina^{5,14}.

El método molecular que se empleará para la tipificación genotípica de *S. aureus* será la electroforesis de campos pulsados en gel de agarosa¹⁵. La cual se llevará a cabo en el laboratorio de biología molecular en la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría.

La técnica de electroforesis de campos pulsados en gel de agarosa se llevará a cabo por medio de los pasos siguientes¹⁶.

- Inoculación de una única colonia de *S. aureus* en agar BHI . Se incuban los cultivos a 35-37 C.

- Preparar agarosa Seaken Gold 1.8% en TE buffer. Poner en baño caliente 65 C
- Ajustar la suspensión de BHI a la lectura de Microscan 1,1 a 1,3
- Transferir 200 UL de la suspensión celular al tubo de microcentrífuga
- Centrifugar a 13000 for 35 minutos.
- Aspirar el sobrenadante
- Resuspender en 300 UL de buffer TE y equilibrar tubes en 37 C de baño caliente por lo menos por 15 minutos.
- Adicionar 4 UL de lisostatina a la suspensión celular. Se vorteece la solución
- Adicionar 300 UL de agarose al 1.8% a la suspensión y mezclar con pipeta
- Disponer en los pozos
- Refrigerar por 10 minutos
- Remover los moldes y poner en tubos que contengan 3 ml de EC buffer lisis
- Incubar 3 37 C por 4 horas en horas de la noche
- Vaciar y remplazar con 4 ml de buffer TE . Poner en rotador por 30 minutos.
- Lavar el pozo 3 veces más con buffer TE
- Reservar el pozo a 4 C en buffer TE.

RESTRICCIÓN SMA Y CORRIMIENTO DE ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSADOS EN GEL¹⁶.

- Cortar los pozos de S. aureus de acuerdo a instrucciones y poner el fragment en 150 uL de buffer apropiado (Buffer J: Promega, NEB 4: Biolabs New England)
- Adicionar 3 UL de Sma I al fragment de pozo.
- Incubar a RT por 4 horas en la noche si usa Promega y por 15-30 minutos si usa enzima New England Biolabs
- Cortar los pozos para Salmonella y poner fragmentos en 150 ul de Buffer apropiado (Buffer D : promega; NEB2: New England Biolabs)

DEFINICION OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

CODIGO	DEFINICION OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICION	VALOR
GENOTIPO DE S. AUREUS	Aislados genéticamente relacionados indistinguibles por pruebas fenotípicas y con patrón PFGE con similitud >95%.	Cualitativa ordinal	Descripción abierta de los patrones
CODIGO	DEFINICION OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICION	VALOR
Edad del paciente	Edad del paciente, en base a la fecha de nacimiento, registrada en el expediente clínico.	Cuantitativa Discreta	Meses
Sexo del paciente	Clasificación biológica sexual del paciente, registrado en el expediente clínico	Cualitativa Nominal	Masculino: 1 Femenino: 0
Fecha de ingreso	Fecha calendario en la que el paciente es ingresado al hospital	Cuantitativa Discreta	Día/mes/ año
Fecha de aislamiento	Fecha en el que se realiza la toma del cultivo	Cuantitativa Discreta	Día/ mes / año
Días desde ingreso a los que se obtuvo aislamiento	Días después del internamiento en que se aisló el microorganismo	Cuantitativa Continua	Número de días
Comorbilidad	Enfermedades previas con relevancia para predisponer a infecciones por S. aureus según datos de expediente	Cualitativa nominal	Enfermedad renal (ER):0 Enfermedades cutáneas (EC):1 Inmunodeficiencia (IMD):2

Esquema antibiótico	Antibióticos utilizados para tratamiento de infección actual	Cualitativa nominal	Descripción abierta de los esquemas
Adquisición	Si la infección se adquirió en la comunidad o en el centro hospitalario, registrado en el expediente clínico.	Cualitativa nominal	Comunitaria (C):0 Hospitalaria (H):1
Expresión de co-resistencia	<p>Clasificación inferida según interpretación clínica de la CIM para antibióticos descritos registrado en el reporte de BD Phoenix.</p> <p>Si hay un patrón con resistencia a oxacilina y clindamicina y sensibilidad a vancomicina: Se infiere co-resistencia asociada a cassette cromosómico hospitalario.</p> <p>Si hay un patrón de sensibilidad a oxacilina ó resistencia a oxacilina pero sensibilidad a clindamicina, TMT-SMX se confiere patrón de co-resistencia asociada a cassette cromosómicos comunitarios.</p>	Cualitativa ordinal	<p>Co-resistencia patrón comunitario (CoRx- C):0</p> <p>Co-resistencia patrón hospitalario (CoRx-H):1</p>
Identificación del aislamiento	Nombre del género y especie del microorganismo aislado con base al patrón bioquímico que permite la identificación de la especie bacteriana, con pruebas de sensibilidad realizadas con disco de Oxacilina ó cefoxitin y pruebas de sensibilidad automatizadas,	Cualitativa nominal	<p>S.aureus meticilinosensible (SAMS):0</p> <p>S.aureus meticilinoresistente (SAMR):1</p>

	Información registrada en las bitácoras del Laboratorio de Bacteriología Clínica		
Muestra biológica	Muestra biológica de la cual se realiza el aislamiento y que se encuentra registrado en las bitácoras del laboratorio de Bacteriología Clínica del INP	Cualitativa nominal	Hemocultivo (S) Urocultivo (U) Muestra Respiratoria (R) Líquido cefaloraquídeo(LCR) Catéter Vascular (CV) Secreción Piel/Tej. blandos (PTB) Herida quirúrgica (HX) Empiema Pleural (E) Líquido Peritoneal (P) Secreción Osteoarticular(OA) Otros (O)
Tipo de infección	El diagnóstico clínico de la infección con la que cuenta el paciente según limitación de proceso infeccioso a órgano-espacio específico ó diseminación sistémica, registrado en el expediente clínico.	Cualitativa nominal	***Localizada, no invasiva (N.I): 0 Infección urinaria (IVU) Neumonía (N) Neumonía complicada (NC) Neumonía asoc.ventilador (NAV) Herida quirúrgica (HX) Infección de piel y tejidos blandos (PTB) ***Invasiva (I): 1 Bacteriemia (B) Catéter (CAT) Peritonitis (P) Osteomielitis (OS) Infección de Sist. Nervioso central (SNC)
Susceptibilidad a Oxacilina (OXA)	Interpretación clínica de la CIM registrado en el reporte de BD Phoenix.	Cualitativa ordinal	Sensible: S Intermedio: I Resistente: R
Susceptibilidad a Trimetoprim Sulfametoxazol (TMT)	Interpretación clínica de la CIM registrado en el reporte de BD Phoenix.	Cualitativa ordinal	Sensible: S Intermedio: I Resistente: R
Susceptibilidad a Clindamicina (CLD)	Interpretación clínica de la CIM registrado en el	Cualitativa ordinal	Sensible: S Intermedio: I

	reporte de BD Phoenix.		Resistente: R
Susceptibilidad a Rifampicina (RIF)	Interpretación clínica de la CIM registrado en el reporte de BD Phoenix.	Cualitativa ordinal	Sensible: S Intermedio: I Resistente: R
Susceptibilidad a Ciprofloxacina (CPF)	Interpretación clínica de la CIM registrado en el reporte de BD Phoenix.	Cualitativa ordinal	Sensible: S Intermedio: I Resistente: R
Susceptibilidad a Amikacina (AMK)	Interpretación clínica de la CIM registrado en el reporte de BD Phoenix.	Cualitativa ordinal	Sensible: S Intermedio: I Resistente: R
Susceptibilidad a Tigeciclina (TIG)	Interpretación clínica de la CIM registrado en el reporte de BD Phoenix.	Cualitativa ordinal	Sensible: S Intermedio: I Resistente: R
Susceptibilidad a Vancomicina (VAN)	Interpretación clínica de la CIM registrado en el reporte de BD Phoenix.	Cualitativa ordinal	Sensible: S Intermedio: I Resistente: R
Servicios	Servicio en el que se localizará el paciente en el momento de la toma de muestra para cultivo, registrado en el expediente clínico.	Cualitativa nominal	Neonatología (NEO) Neurología (NR) Neumología (NM) Nefrología (NF) Neurocirugía (NQx) Ortopedia (OT) Otorrinolaringología (ORL) Oncología (ONC) Hematología (HEM) Inmunología (INM) Cirugía (QX) Gastronutrición(GN) Infectología(INF) Medicina interna (MI) Unidad de Cuidados Intensivos (UTI) Urgencias (URG)

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Dada la naturaleza del estudio y por las características de la enfermedad y la clasificación del estudio, será a conveniencia, revisando todos los expedientes que cumplan los criterios de inclusión.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizará estadística descriptiva, las variables categóricas se reportarán en porcentajes y/o proporciones, las variables continuas se reportarán por medio de medidas de resumen (media, mediana) y de dispersión (Desviación estándar, intervalos de confianza, o distribución percentilar).

CONSIDERACIONES ETICAS

Conforme a lo que marca la ley general de salud en su artículo número 17 en materia de investigación en seres humanos, este estudio se clasifica en la categoría número I: investigación sin riesgo, ya que por las características del estudio solo se requiere de la consulta en expedientes de los datos y no se requiere solicitar consentimiento bajo información.

El grupo investigador se compromete a salvaguardar la confidencialidad de los datos solo para fines exclusivos de esta investigación.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

	Enero- Febrero	Marzo-Abril	Mayo-Junio	Julio – Agosto	Sept- Octubre	Noviembre- Diciembre
Busqueda Bibliográfica						
Diseño del protocolo						
Presentación para revisión y aprobación por comité académico						
Captación y registro de datos						
Analisis de resultados / Entrega						

*Las fechas son modificables, posterior a la aprobación del comité de investigación.

FACTIBILIDAD

El estudio es factible dado que se cuenta con los recursos materiales para su realización, como son los registros escritos de los laboratorios de bacteriología y de biología molecular del Instituto Nacional de Pediatría, donde se tiene información detallada de los aislamientos microbiológicos de *S. aureus*.

De la misma forma contamos con los expedientes de los pacientes correspondientes, de forma electrónica y algunos de forma manual.

Con respecto a los recursos de laboratorio, se cuenta con capital humano profesional en el área y todos los materiales para la realización de las pruebas fenotípicas y genotípicas que se estudiarán.

La información de los expedientes será revisada por residentes de infectología pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría y será analizada por adscritos infectólogos del mismo departamento.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Stryjewski M, Corey R. Methicillin-resistant staphylococcus aureus: An evolving pathogen. *Clinical Infectious Diseases* 2014; 58(Suppl 1):S10-16.
2. Jurado J, Cantero P, Rivero A, Kindelán J.M. Infecciones por estafilococos. Sección de enfermedades infecciosas. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.
3. Barberán J, Menéndez M, del Valle M. Infecciones por estafilococo. Clasificación, factores predisponentes, aspectos patogénicos de relevancia clínica ó diagnóstica, manifestaciones clínicas y formas de comienzo. Servicio de Enfermedades infecciosas. Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla. Madrid. España.
4. Kaplan SL, Hulten KG, Hammerman WA, et al. Six-year surveillance of community-acquired Staphylococcus aureus infections in children. In: the 45th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; October 4-7,2007; San Diego,CA.
5. Quiao Y, Dong F, Song W, Wang L, Yang Y, Shen X. Hospital and community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a 6 year surveillance study of invasive infections in Chinese children. *Acta Pediátrica*. 2013;102; 1081-1086.
6. De Colsa A. Staphylococcus aureus: De la genómica a la clínica. *Revista de Enfermedades infecciosas en Pediatría*. Vol XXIV. Num 95.
7. From the Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus—Minnesota and North Dakota, 1997–1999. *JAMA* 1999; 282: 1123–5.
8. Tavares R, Goyanna T, Nunes N, Meneses R, Barberino M, Nascimento C. Methicillin-resistant and methicillin-susceptible community-acquired Staphylococcus aureus infection among children. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2013;17(5): 573-578.
9. Mehndiratta P y Bhalla P. Typing of methicillin resistant Staphylococcus aureus: a technical review. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2012; (30)1: 16-23.

10. Palavecino E. Clinical, epidemiologic and laboratory aspects of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Methicillin aureus (MRSA) protocols, methods in molecular biology*, 2014 (1);1085.

11. Miranda M. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. *Boletín Médico Hospital Infantil de México*. 2011; 68(4): 262-270.

12. Márquez Ortiz R, Alvarez M, Escobar J, Leal A, Castro B, Mariño A, Barrero E, et al. USA 300-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone is the predominant cause of community and hospital MRSA infection in Colombian children. *International Journal of Infectious Diseases* 2014; 25: e88-e93.

13. Carrillo Márquez MA, Hulten KG, Hammerman W, Lamberth L, Mason EO, Kaplan SL. *Staphylococcus aureus* pneumonia in the era of community-acquired methicillin-resistance at Texas Children's Hospital. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2011; 30: 545-50.

14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CSLI document, PA: CSLI;2014.

15. Procedimiento de Laboratorio: Manual de Sistema Microbiológico Automatizado BD Phoenix™. Becton, Dickinson and Company. p. 1-23.

16. Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* on PulseNet (OPN): Laboratory protocol for molecular typing of *S. aureus* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Department of health and human services centers for disease control and prevention. p. 2-24.

ANEXO 1. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

PREVALENCIA, IDENTIFICACION Y TIPIFICACION MOLECULAR DE LOS DIFERENTES GENOTIPOS DE AISLAMIENTOS DE S. AUREUS Y SU PRESENTACION CLÍNICA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS

Información Clínica / Epidemiológica					
Iniciales del paciente:	Expediente:		Sexo:		
Fecha de nacimiento: dd/mm/aa			Meses:		
Fecha de Ingreso: dd/mm/aa			Días de EIH al aislamiento:		
Fecha de aislamiento:			Servicio:		
Sitio de aislamiento:			Evolución:		
Adquisición de infección:	Comunitaria	Nosocomial	Dx:		
Infección	Localizada		Invasiva		
Tratamiento Antibiótico:	1.	2.	3.	4.	
Fecha de inicio: dd/mm/aa			Duración (días):	Comorbilidades:	

Información Microbiológica											
Microorganismo aislado:		FENOTIPO				No. Identificación					
		SAMS:		SAMR:							
Perfil de susceptibilidad											
Antibiótico	CIM (µg/mL)			Interpretación							
Oxacilina											
Trimetoprim Sulfametoxazol											
Clindamicina											
Rifampicina											
Ciprofloxacina											
Amikacina											
Tigeciclina											
Vancomicina											
EFCP											
Patrón A	Patrón B	Patrón C	Patrón D	Patrón E	Patrón F	Patrón G	Patrón H	Patrón I	Patrón J	Patrón K	

