



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“FRECUENCIA (%) DE *Staphylococcus aureus*  
METICILINO RESISTENTE (MRSA) AISLADOS DE  
PACIENTES DEL INP DURANTE EL AÑO 2014”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**GUADALUPE RAMÍREZ TREJO**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**

**2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

**VOCAL:** Profesor: LUCIANO HERNÁNDEZ GARCÍA

**SECRETARIO:** Profesora: PATRICIA ARZATE BARBOSA

**1er. SUPLENTE:** Profesora: BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN

**2° SUPLENTE:** Profesor: JAVIER FERNÁNDEZ TORRES

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA, INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**QFB Patricia Arzate Barbosa**

**SUSTENTANTE:**

---

**Guadalupe Ramírez Trejo**



## ÍNDICE

➤ ABREVIATURAS .....	7
❖ INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS .....	9

1) INTRODUCCION.....	12
----------------------	----

### I. ANTECEDENTES

2) CARACTERISTICAS GENERALES DEL GÉNERO <i>Staphylococcus</i> 15	
2.1) Características Microbiológicas .....	15
2.2) Características genéticas de <i>S. aureus</i> .....	16
2.3) Habitats naturales.....	17

3) FISIOLÓGÍA ESTRUCTURAL Y FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>S. aureus</i> .....	19
3.1) Estructura de la pared celular.....	19
3.2) Factores de virulencia .....	20
3.2.1) Toxinas.....	21
3.2.2) Enzimas estafilocócicas.....	24

4) ENFERMEDADES CAUSADAS POR <i>S. aureus</i> .....	25
4.1) Enfermedades mediadas por toxinas.....	26
4.2) Infecciones supurativas .....	26
4.3) Otros padecimientos menos comunes.....	27

5) METODOS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y SENSIBILIDAD DE <i>S. aureus</i> .....	28
5.1) Cultivo de muestras biológicas .....	28
5.2) Identificación de <i>S. aureus</i> .....	29
5.2.1) Pruebas bioquímicas manuales.....	29
5.2.2) Kits comerciales y métodos automatizados.....	29

5.2.2.1) Equipo automatizado BD BACTEC <sup>®</sup> FX para hemocultivos.....	29
5.2.2.2) Equipo automatizado BD Phoenix 100 <sup>®</sup> .....	30
5.3) Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.....	31
5.3.1) Difusión en agar con disco .....	31
5.3.1.1) Detección de $\beta$ -lactamasas en cepas de <i>S.aureus</i> .....	32
5.3.2) Microdilución en caldo .....	33
5.3.3) Identificación de MRSA .....	33
5.3.4) CHROMAgar <sup>®</sup> MRSA .....	34
5.3.5) Aglutinación en látex .....	35
5.3.6) Métodos moleculares .....	36
6) MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.....	37
6.1) Principales mecanismos de resistencia bacteriana.....	37
6.1.1) Alteración del transporte de los antibióticos .....	37
6.1.2) Modificación del fármaco (Por inactivación enzimática).....	37
6.1.3) Modificación estructural del “blanco” de acción (Alteración de los receptores).....	38
6.1.4) Otros .....	38
6.2) Principales mecanismos de resistencia en <i>S. aureus</i> . .....	38
6.2.1) Resistencia a $\beta$ -lactámicos .....	38
6.2.1.1) $\beta$ -lactamasas .....	40
6.2.1.2) Resistencia a meticilina.....	41
7)TRATAMIENTO .....	42

## II. PARTE EXPERIMENTAL

8) JUSTIFICACIÓN .....	44
9) OBJETIVOS .....	45
9.1) Objetivo general .....	45
9.2) Objetivos particulares .....	45

10) MATERIALES Y MÉTODOS .....	46
10.1) Siembra de las muestras .....	46
10.1.1) Hemocultivos.....	46
10.1.2) Cultivos de muestras diversas .....	46
10.2) Identificación .....	46
10.3) Detección de <i>S. aureus</i> resistente a meticilina (MRSA).....	49
10.3.1) Control de calidad de la prueba.....	51
10.4) Detección de $\beta$ -lactamasas en cepas de <i>S.aureus</i> .....	51
10.4.1) Difusión en agar con disco (Prueba del borde de la zona de penicilina).....	51
10.4.1.1) Control de calidad de la prueba.....	51
10.4.2) Prueba basada en nitrocefina (Discos de Cefinase <sup>®</sup> BBL BD).....	52
10.4.2.1) Procedimiento. ....	52
10.4.2.2) Control de calidad de la prueba.....	52
11) RESULTADOS.....	53
12) ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	71
13) DISCUSIÓN.....	73
14) CONCLUSIONES.....	75

### III. ANEXOS

❖ Pruebas bioquímicas y antibióticos empleados en las placas del sistema BD Phoenix <sup>®</sup> 100 .....	77
➤ REFERENCIAS .....	81

## ➤ ABREVIATURAS

ADN, DNA	Acido desoxirribonucleico
ANF	Aspirado Nasofaríngeo
ASP	Aspirado
ATCC®	American Type Culture Colection
C EXT	Consulta externa
CLSI	Clinical and Laboratory Standars Institute
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CX	Cirugía
DNAsa	Desoxirribonucleasa termoestable
FADH	Flavín adenín dinucleótido
FMNH	Flavin mononucleótido
FOX	Cefoxitina
GNT	Gastronutrición
HEMATO	Hematología
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucinas
INF	Infectología
INM	Inmunología
INP	Instituto Nacional de Pediatría
IS	Secuencia de inserción
LCR	Liquido cefalorraquídeo
MHA	Agar Mueller-Hinton
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
mm	Milímetros
µg	Microgramos
µm	Micrómetros
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MSCRAMMS	Moléculas de superficies microbianas que reconocen matrices de moléculas adhesivas
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
NaCl	Cloruro de sodio

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NEFRO	Nefrología
NEONATO	Neonatología
NEUMO	Neumología
NEURO	Neurología
NQX	Neurocirugía
ONCO	Oncología
ORTOP	Ortopedia
P	Penicilina
PBP	Proteína de Unión a Penicilina
PBP2a	Proteína de unión a penicilina alterada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMN	Polimorfonucleares
PREH	Prehospitalización
RNA	Ácido ribonucleico
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>SCCmec</i>	Casette Cromosómico Estafilocócico <i>mec</i>
SE	Enterotoxinas estafilocócicas
SECR	Secreción
SECR DE HDA QX	Secreción de herida quirúrgica
SEPE	Síndrome estafilocócico de la piel escaldada
SNC	Sistema Nervioso Central
SST	Síndrome del Shock Tóxico
T. CARDIOVASC	Terapia cardiovascular
Tn	Transposón
TNF	Factor de necrosis tumoral
TSST-1	Toxina-1 del síndrome del shock tóxico
UFC	Unidad Formadora de Colonias
URG	Urgencias
UTI	Unidad de terapia intensiva

## ❖ INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

✓ Cuadro 1. Especies que constituyen el género <i>Staphylococcus</i> .....	15
✓ Figura 1. Genes presentes en el complejo del gen <i>mecA</i> .....	17
✓ Figura 2. Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
✓ Figura 3. Proceso de colonización de <i>S.aureus</i> .....	26
✓ Tabla 1. Enfermedades producidas por <i>S. aureus</i> .....	26
✓ Figura 4. Equipo automatizado para Hemocultivos BD BACTEC <sup>®</sup> FX	30
✓ Figura 5. Equipo automatizado BD Phoenix 100 <sup>®</sup> para identificación y sensibilidad antimicrobiana.....	31
✓ Figura 6. Aspecto típico de las colonias MRSA desarrolladas en CHROMAgar <sup>®</sup> MRSA.....	34
✓ Figura 7. Kits de aglutinación en látex comerciales.....	35
✓ Tabla 2.Principales antibióticos a los que se ha encontrado resistencia en cepas de <i>S.aureus</i> .....	39
✓ Figura 8. Mecanismo de hidrólisis de antibióticos $\beta$ -lactámicos por $\beta$ -lactamasas.....	40
✓ Figura 9. Metodología empleada en el Laboratorio de Bacteriología del INP para identificación bacteriana en hemocultivos.....	47
✓ Figura 10. Metodología empleada en el Laboratorio de Bacteriología del INP para identificación bacteriana en muestras diversas.....	48
✓ Figura 11. Método para la determinación de resistencia a Oxacilina en <i>S.aureus</i> según manual M100 del CLSI.....	49
✓ Tabla 3. Interpretación de la prueba para detección de Resistencia a Oxacilina .....	50
✓ Gráfica 1.Total de muestras trabajadas en el INP durante el año 2014	53
✓ Gráfica 2. Muestras con aislamientos positivos durante el año 2014 en el INP.....	54
✓ Grafica 3. Porcentaje de aislamiento de <i>S.aureus</i> en hemocultivos y muestras diversas durante el año 2014 en el INP.....	54
✓ Figura 12. Tinción de Gram de hemocultivo positivo.....	55
✓ Figura 13. Pruebas bioquímicas positivas para la identificación de <i>S.aureus</i> .....	55

✓ Figura 14. Ejemplos de resultados de las cepas problema.....	56
✓ Tabla 4. Algunos ejemplos de cepas problema analizadas.....	56
✓ Figura 15. Resultados de las cepas control en agar Mueller Hinton.....	56
✓ Grafica 4. Frecuencia de <i>S. aureus</i> aislados para el año 2014 en el INP.....	57
✓ Tabla 5. Porcentaje (%) de cepas MRSA aisladas en hemocultivos y diversas muestras.....	57
✓ Grafica 5. Porcentaje de aislamiento de cepas MRSA en el año 2014 en el INP de acuerdo al tipo de muestra proveniente.....	58
✓ Tabla 6. Incidencia de cepas MRSA aisladas en el INP durante el año 2014 considerando el tipo de paciente.....	59
✓ Gráfica 6. % De cepas MRSA de cada servicio en INP durante el año 2014.....	60
✓ Tabla 7. Incidencia de cepas MRSA en diferentes servicios del INP durante el año 2014.....	60
✓ Tabla 8. Frecuencia de cepas MRSA aisladas en cada mes durante el año 2014 en el INP.....	61
✓ Tabla 9. Resultados de $\beta$ -lactamasas en cepas de <i>S.aureus</i> .....	62
✓ Figura 16. Ejemplos de resultados de las cepas problema.....	62
✓ Figura 17. Resultados de las cepas control en agar Mueller Hinton para Penicilina.....	63
✓ Tabla 11. Algunos ejemplos de cepas problema analizadas.....	63
✓ Figura 18. Prueba para la detección de $\beta$ -lactamasas empleando el disco de Cefinase <sup>®</sup> .....	63
✓ Figura 19. Control de calidad para la prueba de detección de $\beta$ -lactamasas empleando el disco de Cefinase <sup>®</sup> .....	64
✓ Tabla 12 Resumen de resultados de cepas de <i>S.aureus</i> productoras de $\beta$ -lactamasas y MRSA.....	64
✓ Grafica 7. Frecuencia de hemocultivos para el año 2014.....	65
✓ Grafica 8. Frecuencia de aislamiento de diferentes especies bacterianas aisladas de hemocultivos durante el año 2014 en el INP..	66
✓ Grafica 9. Frecuencia de aislamientos en hemocultivos de cepas MRSA en el año 2014.....	67

✓ Grafica 10. Frecuencia de muestras diversas para el año 2014.....	68
✓ Grafica 11. Frecuencia (%) de diferentes especies bacterianas aisladas en muestras diversas durante el año 2014 en el INP.....	68
✓ Grafica 12. Frecuencia de aislamientos en muestras diversas de cepas en el INP durante el año 2014.....	69
✓ Tabla 13. Incidencia de cepas MRSA aisladas por cada tipo de muestra en el INP durante el año 2014.....	69
✓ Grafica 13. Porcentaje de resistencia de cepas MRSA a diferentes antimicrobianos aisladas durante el año 2014 en el INP.....	70
✓ Grafica 14. Porcentaje de resistencia de cepas MSSA a diferentes antimicrobianos aisladas durante el año 2014 en el INP.....	70
✓ Tabla 14. Pruebas bioquímicas empleadas en las placas del equipo BD Phoenix® 100 para identificación de microorganismos Gram negativos.....	77
✓ Tabla 15. Antibióticos empleados en las placas del equipo BD Phoenix® 100 para la sensibilidad de microorganismos Gram negativos.....	78
✓ Tabla 16. Pruebas bioquímicas empleadas en las placas del equipo BD Phoenix® 100 para identificación de microorganismos Gram positivos.....	79
✓ Tabla 17. Antibióticos empleados en las placas del equipo BD Phoenix® 100 para la sensibilidad de microorganismos Gram positivos.....	79
✓ Tabla 18. Pruebas bioquímicas empleadas en las placas del equipo BD Phoenix® 100 para identificación de <i>Streptococcus</i> .....	80
✓ Tabla 19. Antibióticos empleados en las placas del equipo BD Phoenix® 100 para la sensibilidad de <i>Streptococcus</i> .....	80

## 1) INTRODUCCION

*Staphylococcus aureus* es considerada una bacteria potencialmente patógena para el humano a nivel mundial, es causante de diversas infecciones en piel y tejidos blandos, neumonía, septicemia, entre otras, debido a que expresa una gran variedad de factores de virulencia particulares. Su rápida adaptación a los cambios ambientales y su continua capacidad de desarrollar y ampliar la adquisición de resistencia a los agentes antimicrobianos, lo convierte en un importante residente en el ámbito hospitalario.<sup>1</sup>

Estas diversas características contribuyen a su patogenicidad y ayuda a definir la interacción huésped-microbio.

Con la introducción de la penicilina como tratamiento para las infecciones causadas por *S. aureus*, se alcanzaron importantes avances para el control de las infecciones por este microorganismo. No obstante, a pocos años de su introducción, se observó que aproximadamente 60% de los aislamientos mostraron resistencia a este antibiótico.<sup>2</sup>

Posteriormente, con la introducción en el mercado de la meticilina, se plantea una nueva alternativa, hasta que dos años después de su uso se detecta la primera cepa de *S. aureus* resistente a este agente antimicrobiano, denominándose a estas cepas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Desde entonces, se han notificado cepas MRSA a nivel mundial constituyendo esto una preocupación mayor, especialmente en el ambiente hospitalario, debido a la elevada mortalidad asociada con este microorganismo.<sup>2</sup>

Con la aparición de las cepas MRSA no sólo en el ámbito hospitalario, sino también extrahospitalario se hace necesario el uso de agentes antimicrobianos alternativos como los macrólidos, específicamente la eritromicina, así como también las lincosamidas (como clindamicina), que poseen un espectro antibacteriano similar, pero no idéntico, al de la penicilina.<sup>2</sup>

Tomando en cuenta lo anteriormente planteado, es necesario investigar la resistencia a meticilina en *S. aureus* para su tratamiento, ya que desde la perspectiva de la salud pública mundial, esa resistencia constituye un problema que se ha agudizado cada vez más por el mal uso o abuso de los agentes antimicrobianos.

El presente estudio pretende detectar la resistencia a meticilina (presencia del gen *mecA*) en cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de pacientes del Instituto Nacional de Pediatría (INP) a través de pruebas de sensibilidad por el método de difusión en agar con disco.

Cepas en estudio: las cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de los aislamientos realizados de las muestras biológicas de los pacientes del INP, tanto hospitalizados como externos, durante el periodo de enero a diciembre del 2014.

La identificación de las cepas se realizará por medio de pruebas bioquímicas manuales características del género y la especie en estudio (cocos Gram +, catalasa, coagulasa, fermentación del manitol,  $\beta$  hemólisis, etc.) y mediante el sistema automatizado BD Phoenix<sup>®</sup> 100 el cual proporciona la identificación de los microorganismos con su correspondiente antibiograma.

Determinación de la resistencia a meticilina: Para la realización de esta prueba se utilizará la metodología por el método de difusión en agar con disco, siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100, utilizando los discos de cefoxitina (Fox 30  $\mu$ g).<sup>3</sup>

Con la interpretación de los resultados obtenidos de las cepas MRSA se obtendrá la frecuencia con la que éstas se están presentando, logrando de este modo plantear otras alternativas para que el médico proporcione el mejor tratamiento para estos pacientes.

# **I. ANTECEDENTES**

## 2) CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO *Staphylococcus*

### 2.1) Características Microbiológicas

*Staphylococcus aureus* (del latín, *aureus*, dorado) forma parte de la familia *Micrococcaceae*, género *Staphylococcus* (del griego *staphylé*, racimo de uvas; *coccus*, grano o baya), el cual contiene más de 30 especies diferentes de las cuales 16 de ellas se localizan en los humanos, algunas forman parte de la microbiota de piel y mucosas en humanos, y otras se encuentran sólo entre la microbiota de otros mamíferos y aves.<sup>1,4</sup>

**Cuadro 1. Especies que constituyen el género *Staphylococcus*.**

<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. carnosus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. piscifermentans</i>
<i>S. capitis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. kloosii</i>	<i>S. felis</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. muscae</i>	<i>S. arlettae</i>	<i>S. delphini</i>
<i>S. warneri</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. hyicus</i>
<i>S. pasteurii</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. chromogenes</i>
<i>S. caseolyticus</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. lentus</i>	<i>S. vitulus</i>

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram-positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 µm, agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas.<sup>4</sup>

Son bacterias inmóviles (no poseen flagelos), no esporuladas, y sólo algunas cepas son capsuladas, son anaerobios facultativos, pero crecen mejor en condiciones aerobias, son capaces de crecer en un medio con una elevada concentración de sal (NaCl al 7.5%-10%) y a temperaturas de 10°C-40°C.<sup>1,4,5</sup>

Aunque se trata de bacterias no esporuladas, los estafilococos son muy resistentes a diversos agentes, pudiendo sobrevivir a numerosas condiciones ambientales desfavorables durante su camino de un hospedador a otro: resistencia a la luz, temperaturas externas extremas y desecación. Adicionalmente, resisten la acción de los fenoles y de muchos otros desinfectantes.<sup>6</sup>

Producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre), característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos.

*S. aureus* produce coagulasa y crece rápidamente en agar sangre de carnero y muchas cepas producen hemólisis total a las 24-36 horas. Sus colonias miden de 1 a 3 mm, algunas especies producen un pigmento que va de amarillo al dorado, debido a la presencia de carotenoides.<sup>1,4</sup>

Su pared celular consta de una capa externa rica en proteínas y de una capa de mucopéptido y, aunque su estructura antigénica ya se ha definido, los diversos antígenos tienen poco valor en su identificación (excepto la proteína A de *S. aureus*) y tienen unidos los ácidos teicoicos.<sup>6</sup>

Tradicionalmente se dividieron en dos grupos sobre la base de su capacidad para coagular el plasma sanguíneo (la reacción de coagulasa). *Staphylococcus aureus* y algunas especies de *Staphylococcus intermedius* son coagulasa positivo. El resto de los estafilococos son coagulasa negativos.<sup>7</sup>

## **2.2) Características genéticas de *S. aureus***

El genoma de *S. aureus* es circular, su contenido de guanina-citocina (G+C) es de aproximadamente el 32% y está compuesto de un solo cromosoma de alrededor de 2,8 Mb predichos para llevar aproximadamente a 2,500 genes.<sup>8</sup>

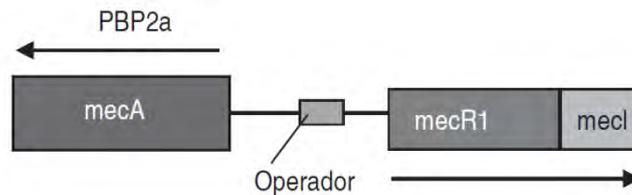
Una característica sobresaliente del genoma de *S. aureus* es la presencia de gran número de elementos móviles (plásmidos, secuencias de inserción y trasposones), que contienen factores de virulencia y resistencia a diversos antibióticos.<sup>4</sup>

Los trasposones pueden transportar uno o más marcadores de resistencia. Por ejemplo, el transposón Tn 554 se encuentra en el cromosoma de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), el cual se ha utilizado para el seguimiento de clonas epidémicas de MRSA.<sup>4</sup>

Los aislamientos de MRSA poseen un elemento cromosómico móvil, el cassette cromosómico estafilocócico *mec* (*SCCmec*), que transporta genes para la resistencia a los antibióticos.<sup>9</sup>

Ocho tipos de *SCCmec* han sido reconocidos. Mientras que los tipos *SCCmec* I, IV, V, VI y VII únicamente codifican para la resistencia a  $\beta$ -lactámicos, los tipos *SCCmec* II, III y VIII contienen genes de resistencia adicional (para aminoglucósidos, fluoroquinolonas, macrólidos, lincosamidas, rifampicinas) originarios de plásmidos o trasposones. Algunos estudios indican que los *SCCmec* tipos II y IV se encuentran circulando en cepas MRSA en México.<sup>15</sup>

Existen cuatro clases genéticas del complejo del gen *mec* (A-D) en *Staphylococcus*. En *S. aureus* sólo se han encontrado las clases A y B. La C se encuentra en *S. haemolyticus* y la D en *S. hominis*. La clase original, clase A, contiene dos genes intactos *mecI* y *mecR1*, así como el gen *mecA*. El gen *mecI* codifica una proteína represora de la transcripción: MecI. El gen *mecR1* codifica una proteína de transducción de señal: MecR1. Las proteínas MecI y MecR1 regulan la transcripción inducible de *mecA* de la siguiente manera: MecR1 registra la presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos con su dominio extracelular de unión a la penicilina y activa su dominio citoplásmico en forma de proteasa, por rompimiento autocatalítico. Esta proteasa rompe la proteína represora MecI que se encuentra unida al sitio operador del gen *mecA*, liberando la represión de la transcripción, por lo que se lleva a cabo la expresión del gen *mecA* produciéndose la proteína PBP2a (Figura 1).<sup>9,15</sup>



**Figura 1 Genes presentes en el complejo del gen *mecA* (gen *mecA* y sus reguladores *mecI* y *mecR1*)**

### **2.3) Habitats naturales.**

Los estafilococos están muy extendidos en la naturaleza, su principal hábitat son la piel, y membranas mucosas de los mamíferos y aves. Se pueden encontrar en la boca, las glándulas mamarias, el intestino, el aparato genitourinario y las vías respiratorias superiores de sus hospederos. Los estafilococos generalmente están en una relación simbiótica con sus hospederos, pero puede volverse patógena cuando existe predisposición e inmunosupresión en el huésped o en presencia de cuerpos extraños: después de la entrada en el tejido del hospedero a través de un trauma de la barrera cutánea, por inoculación con agujas, directamente en la implantación de dispositivos médicos.<sup>8</sup>

Por lo general, cada especie tiende a ocupar una localización anatómica específica en el huésped que coloniza. Entre las especies de mayor importancia que colonizan al humano son: *S. aureus* (fosas nasales) y *S. lugdunensis*; en tanto que en animales se encuentra además de *S. aureus* a *Staphylococcus intermedius*. El *Staphylococcus epidermidis* (que coloniza la piel y a su vez los dispositivos médicos) y el *Staphylococcus saprophyticus* son comúnmente responsables de infecciones relacionadas con dispositivos e infecciones del tracto urinario, siendo éstos menos infecciosos que *S. aureus* y *Staphylococcus capitis* que coloniza el cuero cabelludo.<sup>4</sup>

### 3) FISIOLOGÍA ESTRUCTURAL Y FACTORES DE VIRULENCIA DE *S. aureus*

#### 3.1) Estructura de la pared celular

La capa más externa de la pared estafilocócica se puede recubrir de una cápsula de polisacáridos, de los cuales se han identificado varios serotipos capsulares de *S. aureus*. La cápsula protege a la bacteria al inhibir la fagocitosis de estos microorganismos por los leucocitos polimorfonucleares (PMN).<sup>5</sup>

La mayor parte de los estafilococos producen una biopelícula hidrosoluble laxa (capa de polisacárido extracelular) formada por monosacáridos, proteínas y pequeños péptidos en una cantidad que depende de factores genéticos y de las condiciones de crecimiento. Esta sustancia extracelular une las bacterias a tejidos y cuerpos extraños, como catéteres, injertos, prótesis valvulares y articulares y derivaciones.<sup>5</sup>

La pared celular es una estructura importante, es el blanco de antibióticos como los  $\beta$ -lactámicos y glicopéptidos como la vancomicina. *S. aureus* tiene dos componentes en la pared celular: el peptidoglicano y los ácidos teicoicos.

El peptidoglucano es el componente básico de la pared celular, tanto de bacterias Gram positivas como de las Gram negativas; está compuesto por cadenas o polímeros de ácido-N-acetilmurámico y ácido N-acetilglucosamina ligados en forma cruzada.

Además posee una actividad de tipo endotoxina, ya que estimula la producción de pirógenos endógenos, la activación del complemento, la formación de interleucina-1 (IL-1) por parte de los monocitos y la agregación de los leucocitos PMN (un proceso que origina la formación de abscesos).<sup>4</sup>

Los ácidos teicoicos están constituidos por polímeros de glicerol o ribitol unidos mediante enlaces fosfodiéster y juegan un papel fisiológico importante en el metabolismo de la pared celular. Su función es mediar la unión de estafilococos a las superficies de las mucosas mediante uniones específicas a la fibronectina. Tienen además la capacidad de inducir la producción de anticuerpos.

Aunque los ácidos teicoicos son poco inmunogénicos, estimulan una respuesta humoral específica cuando se encuentran unidos al peptidoglucano.

Los ácidos lipoteicoicos están unidos a la membrana plasmática, tienen una estructura similar a los ácidos teicoicos, excepto porque contienen fosfatos de poliglicerol, además de unirse a un diacilglicerol que sirve como anclaje a la membrana plasmática. Los ácidos lipoteicoicos están involucrados en la inflamación y en la liberación de citocinas por los macrófagos y otras moléculas del sistema inmune.<sup>4</sup>

La fagocitosis es el principal mecanismo para combatir la infección por estafilococos. Los anticuerpos que son producidos neutralizan las toxinas y promueven la opsonización.<sup>7</sup>

### 3.2) Factores de virulencia

Los factores de virulencia de *S. aureus* participan en la adhesión y adquisición de nutrientes para el microorganismo y sirven también para evadir la respuesta inmune del huésped.

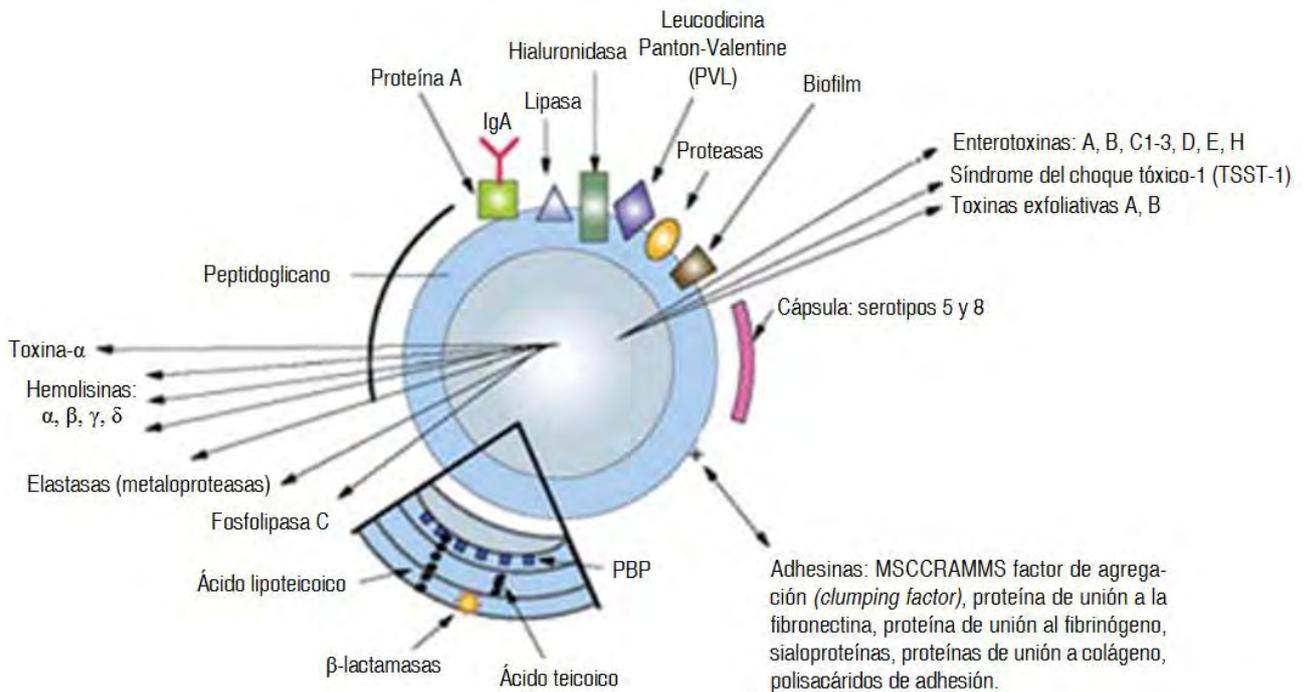
En base a esto se han clasificado en tres categorías:

- 1) Proteínas de adhesión MSCRAMMS, biofilm, ácidos teicoicos, coagulasa; que están involucrados en la **adherencia** a la célula huésped o matriz extracelular.
- 2) Cápsula, peptidoglucano, proteína A, toxinas, enzimas: catalasa, lipasa, coagulasa,  $\beta$ -lactamasas, que están involucrados en la **evasión de la respuesta inmune** del huésped, como la inhibición de la fagocitosis.
- 3) Citotoxinas, enterotoxinas, enzimas: hialuronidasa, fibrinolisisina; involucrados en la **invasión de la célula huésped** y penetración de los tejidos.

Además, también se considera si forman parte estructural de la bacteria o si son enzimas o toxinas (Figura 2).

*S. aureus* produce una gran variedad de proteínas de superficie que contribuyen a su capacidad para colonizar y causa enfermedades al ser humano. La proteína A recubre la superficie de *S. aureus*, se une a la capa de peptidoglucano o a la membrana citoplásmica y tiene afinidad de unión especial el receptor Fc de las inmunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgG4. La proteína A se ha usado en ciertas pruebas serológicas de identificación específicas de *S. aureus*.

Las proteínas MSCRAMMS (moléculas de superficies microbianas que reconocen matrices de moléculas adhesivas) son proteínas de adhesión a la superficie se unen de forma covalente con el peptidoglicano de la pared celular en los estafilococos y resultan importantes para la adherencia a las proteínas de la matriz del anfitrión ligadas a sus tejidos (como fibronectina, fibrinógeno, elastina y colágeno).<sup>5</sup>



**Figura 2 Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*. Tomado de Cervantes-García, et al.<sup>4</sup>**

### 3.2.1) Toxinas

En cuanto a las toxinas presentes en *S. aureus*, éstas se han clasificado de la manera siguiente:

➤ **Citotoxinas:** son enzimas citolíticas, es decir dañan la membrana celular. En este grupo se encuentran:

- Hemolisina α: citotoxina formadora de poros, que producen la entrada y salida de iones y moléculas pequeñas que producen cambios en el balance iónico, como consecuencia se produce la muerte de las células nucleadas y la lisis osmótica de los eritrocitos. La toxina altera

el músculo liso de los vasos sanguíneos y es tóxica para muchas células, como eritrocitos, leucocitos, hepatocitos y plaquetas.<sup>4,5,10</sup>

- Hemolisina  $\beta$ : tiene actividad de fosfolipasa C (esfingomielinasa C), es específica para la esfingomielina y lisofosfatidilcolina, y es tóxica para diversas células, entre las que se encuentran los eritrocitos, los fibroblastos, los leucocitos y los macrófagos. Cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana en las células susceptibles. Se cree que este mecanismo es responsable de las diferencias de sensibilidad de las distintas especies a la toxina.<sup>5,10</sup>
  - Hemolisina  $\gamma$ : afecta neutrófilos, macrófagos y eritrocitos. Se cree que tiene efecto en la inducción de la inflamación.<sup>10</sup>
  - Hemolisina  $\delta$ : es producida por cerca de un 97% de las cepas de *S. aureus*. Tiene un amplio espectro de actividad citolítica, lisa a los eritrocitos, y a muchas otras células de los mamíferos y las estructuras de las membranas intracelulares. Es dermonecrótica y actúa como un surfactante disgregando las membranas celulares mediante una acción de tipo detergente.<sup>5,10</sup>
  - Leucocidina de Panton-Valentine (P-V): ocurre en menos de 5% de las cepas de *S. aureus*. Es citotóxica para los monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares del humano, pero no posee actividad de hemolisina. Esta proteína forma poros en la membrana plasmática de los leucocitos. Lo cual provoca un aumento en la permeabilidad y eventualmente produce la lisis de la célula, produciéndose la liberación de mediadores de la inflamación, con una consecuente respuesta inflamatoria grave. Su interés radica en que se ha identificado en prácticamente todas las cepas de MRSA asociadas a las infecciones comunitarias.<sup>1,5</sup>
- **Superantígenos:** estas toxinas se unen en los macrófagos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), las cuales interaccionan con la subunidad  $\beta$  de los receptores específicos de los linfocitos T ( $V\beta$ TCR). Esto determina la liberación masiva de citocinas por los macrófagos (IL- $1\beta$  y TNF- $\alpha$ ) y los linfocitos T (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$ ). La liberación de TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$  se asocia a hipotensión y shock y la fiebre

se asocia a la liberación de IL-1 $\beta$ . Esto conduce a la liberación de citocinas por ambas células causando daño en los tejidos y liberación de la toxina, dando como resultado hipotensión y liberación de gran cantidad de citocinas.<sup>4,5</sup>

Dentro de esta clasificación de superantígenos, se encuentran las siguientes:

- Enterotoxinas estafilocócicas (SE): Estas toxinas se producen en 30%-50% de las cepas de *S. aureus* y se han identificado diferentes serotipos de la A a la O. Estas toxinas son superantígenos capaces de inducir la activación inespecífica de los linfocitos T y la liberación de citocinas. La enterotoxina A es la que con más frecuencia se asocia a las intoxicaciones alimentarias. Las enterotoxinas C y D se encuentran en los productos lácteos contaminados, y la enterotoxina B produce colitis pseudomembranosa estafilocócica. Se ignora cuál es el mecanismo exacto de acción de la toxina. Resisten temperaturas altas y la hidrólisis por las enzimas gástricas y yeyunales.<sup>4,5</sup>
- Toxinas exfoliativas (o epidermolíticas): Se han identificado dos formas distintas de toxina exfoliativa (ETA y ETB), y ambas pueden producir enfermedad. ETA es termoestable y codificada por un gen cromosómico, mientras que ETB es termolábil y mediada por un plásmido. Ambas pueden producir el síndrome estafilocócico de la piel escaldada (SEPE). Actúan destruyendo los desmosomas (estructuras de adhesión celular) del estrato granuloso de la epidermis, sin producir citólisis o inflamación, por lo que en la capa de la epidermis afectada no se encuentran leucocitos ni estafilococos. Tienen actividad de proteasa serina, lo que desencadena la exfoliación. Después de la exposición de la epidermis a la toxina, se desarrollan anticuerpos neutralizantes protectores, lo que lleva a la resolución del proceso tóxico. El SEPE se observa fundamentalmente en niños pequeños, y rara vez se describe en niños mayores o en adultos.<sup>5,10</sup>
- Toxina-1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1): Anteriormente se denominaba exotoxina pirógena o enterotoxina F, y se considera una proteína termoestable sintetizada por genes cromosómicos. Actúa como superantígeno e induce la liberación de citocinas por macrófagos

y linfocitos T. A bajas concentraciones, produce la extravasación de las células endoteliales, y a altas concentraciones tiene un efecto citotóxico. Su capacidad de atravesar las barreras de las mucosas, provoca los efectos sistémicos del SST.<sup>4</sup>

### 3.2.2) Enzimas estafilocóccicas.

- Coagulasa: *S. aureus* produce dos formas, una forma unida (llamada también factor de aglomeración) y una forma libre. La coagulasa que se une a la pared del estafilococo puede convertir directamente el fibrinógeno en fibrina insoluble para forzar la agregación de los estafilococos. La coagulasa libre logra el mismo resultado al reaccionar con un factor plasmático de tipo globulina (factor de reacción con la coagulasa) para originar una estafilotrombina, un factor semejante a la trombina. Este factor cataliza la conversión del fibrinógeno en fibrina insoluble. Por lo tanto se forma una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, localizando la infección y protegiendo a la bacteria de la fagocitosis.<sup>1,5</sup>
- Catalasa: es otra enzima que degrada el peróxido de hidrógeno dándole protección al microorganismo contra la fagocitosis.<sup>4</sup>
- Hialuronidasa: hidroliza los ácidos hialurónicos, presentes en la matriz acelular del tejido conjuntivo.
- Fibrinolisisina: llamada también estafilocinasa, puede disolver los coágulos de fibrina.
- Lipasas: que hidrolizan los lípidos y garantizan la supervivencia de los estafilococos en las regiones sebáceas del organismo.
- Nucleasa termoestable: que puede hidrolizar el ADN viscoso.<sup>5</sup>

#### 4) ENFERMEDADES CAUSADAS POR *S. aureus*

*S. aureus* es un microorganismo que forma parte de la microbiota normal de la piel, no obstante posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades, sobre todo en personas debilitadas por enfermedades crónicas, lesiones traumáticas, quemaduras o inmunosupresión.

Produce lesiones superficiales en la piel (enfermedades de amplio espectro) y abscesos localizados en otros sitios. Las infecciones por *S. aureus* son supurativas, (que producen y expulsan pus) y tienden a producir abscesos. Las infecciones de la piel y tejidos blandos se caracterizan por la formación de vesículas pustulosas, las cuales comienzan con los folículos pilosos propagándose a los tejidos vecinos. La foliculitis es una infección piógena superficial. Su extensión al tejido prefolicular da lugar al furúnculo.<sup>1,4</sup>

A su vez, causa infecciones invasoras serias como: bacteremias, infecciones del SNC e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis. Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales (incluidas las causadas a través de heridas quirúrgicas). Provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del shock tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo. Además causa septicemia, impétigo y fiebres.<sup>1</sup>

Las infecciones por *S. aureus* comienzan por la llamada colonización, la cual puede ocurrir tanto en los niños como en adultos. La bacteria se encuentra generalmente en las fosas nasales y en ocasiones en la piel o en la ropa, y de estos sitios, *S. aureus* puede transmitirse a otras regiones del cuerpo o membranas mucosas aunque también puede ser de persona a persona a través de contacto directo o de la exposición a fómites contaminados. Si la piel o mucosas se rompen por trauma o cirugía. *S.aureus* que es un patógeno oportunista, puede acceder al tejido cercano a la herida provocando daño local o enfermedades.<sup>1</sup>

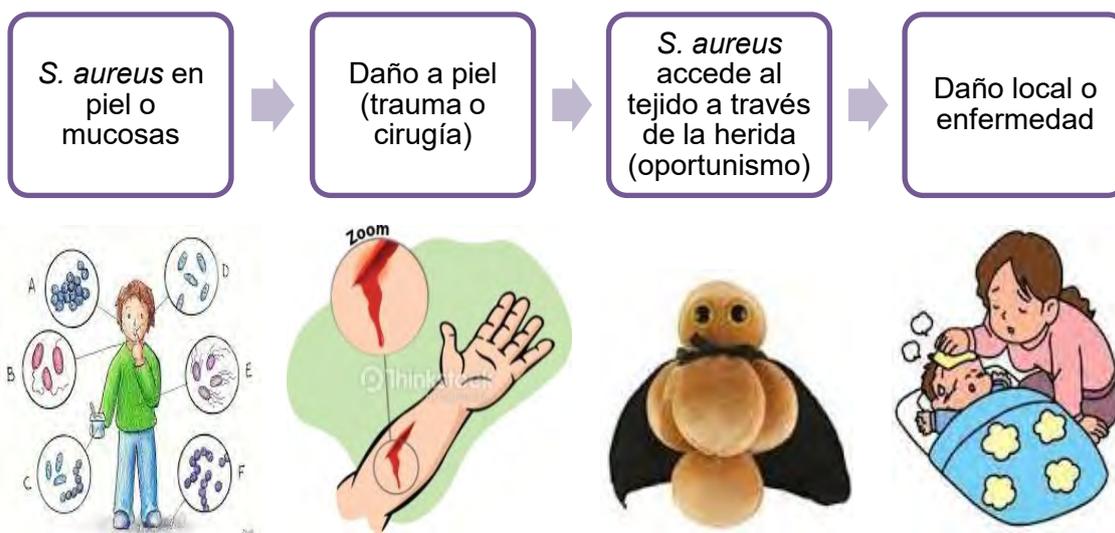


Figura 3 Proceso de colonización de *S.aureus*

**Tabla 1 Enfermedades producidas por *S. aureus*. Modificado de Murray, Patric R.<sup>5</sup>**

<b>4.1) Enfermedades mediadas por toxinas</b>	
Síndrome de la piel escaldada:	Descamación diseminada del epitelio en lactantes; ampollas carentes de microorganismos o leucocitos
Intoxicación alimentaria:	Después de haber ingerido alimentos contaminados con la toxina termoestable, inicio rápido de vómitos intensos, diarrea y cólicos; resolución en el plazo de 24 horas
Shock tóxico:	Intoxicación multisistémica caracterizada en un primer momento por la presencia de fiebre, hipotensión y un exantema maculoeritematoso; elevada mortalidad en ausencia de tratamiento antibiótico inmediato y eliminación del foco de la infección como consecuencia de un shock hipovolémico que origina insuficiencia multiorgánica.
<b>4.2) Infecciones supurativas</b>	
Impétigo:	Infección cutánea localizada que se caracteriza por la presencia de vesículas rellenas de pus sobre una base eritematosa.

Foliculitis:	Impétigo que afecta a los folículos pilosos
Forúnculos:	Grandes nódulos cutáneos rellenos de pus y dolorosos
Carbuncos:	Unión de forúnculos con extensión hacia los tejidos subcutáneos e indicios de enfermedad sistémica (fiebre, escalofríos, bacteriemia)
Bacteriemia y endocarditis:	Diseminación de bacterias hacia la sangre desde un foco de infección; la endocarditis se caracteriza por daños al revestimiento endotelial del corazón
Neumonía y empiema:	Consolidación y formación de abscesos en los pulmones; se observa en sujetos muy jóvenes, ancianos y en pacientes con enfermedad pulmonar de base o reciente; se ha reconocido una forma grave de neumonía necrosante con shock séptico y mortalidad alta.
Osteomielitis:	Destrucción de huesos, en especial del área metafisaria de los huesos largos
Artritis séptica:	Articulación eritematosa dolorosa con acumulación de material purulento en el espacio articular
<b>4.3) Otros padecimientos menos comunes.</b>	
Infecciones de heridas:	Caracterizadas por la presencia de eritema y pus en el lugar de una herida traumática o quirúrgica.
Infecciones del aparato genitourinario:	Tras la inoculación del aparato genitourinario debido a bacteriemia.
Infecciones de catéteres y derivaciones:	Respuesta inflamatoria crónica a bacterias que recubren un catéter o una derivación.
Infecciones de prótesis:	Infección crónica de dispositivo caracterizada por dolor localizado y fallo mecánico del mismo.

## **5) METODOS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y SENSIBILIDAD DE *S. aureus***

La identificación de un organismo presente en una muestra, es el proceso clave del que se encarga el laboratorio. La sospecha de una enfermedad en particular se ve reflejada en el tipo de muestra a analizar, es por ello que el químico debe de ser capaz de diferenciar al posible microorganismo patógeno, de la microbiota normal presente.

En la actualidad, existen una gran variedad de técnicas para la identificación de *Staphylococcus* aislados de muestras clínicas, en primera instancia si se sospecha de una infección causada por *S. aureus*, se debe de realizar el cultivo y posteriormente la realización de pruebas con las colonias obtenidas.

### **5.1) Cultivo de muestras biológicas**

El microorganismo se aísla por estriamiento de la muestra clínica (o de un hemocultivo positivo) sobre medios sólidos tales como agar sangre, agar de soya tripticasa o agar de infusión de corazón, se incuban de 18 a 24 horas a 37°C. Las muestras que puedan estar contaminados con otros microorganismos pueden sembrarse en agar sal manitol que contiene cloruro de sodio al 7,5%, lo que permite crecer a los estafilococos-halo tolerantes, o en otros medios para el aislamiento de microorganismos Gram positivos como el agar fenil-etanol.

La presencia de estafilococos en una muestra biológica podría sospecharse luego de realizar una tinción de Gram de la muestra directa y observar cocos Gram positivos en racimos, tétradas, pares o en cadenas cortas (los racimos se observan debido a que los estafilococos se dividen en tres planos), ya que ésta es la morfología descrita en la literatura.

Las observaciones posteriores deberán efectuarse en cultivos crecidos en caldo, porque los estreptococos crecidos en medio sólido pueden aparecer como grumos. Varios campos deben ser examinados antes de decidir si grumos o cadenas están presentes.

## **5.2) Identificación de *S. aureus***

### **5.2.1) Pruebas bioquímicas manuales**

Luego del desarrollo obtenido de los medios de cultivo, las colonias se someten a diversas pruebas bioquímicas como la de catalasa y producción de coagulasa, permitiendo la rápida identificación del *S. aureus* que es coagulasa positivo. Otra prueba muy útil es la producción de desoxirribonucleasa termoestable (DNAsa), la fermentación del manitol, así como la hemólisis en agar sangre de carnero se utilizan habitualmente para identificar a *S aureus*.<sup>8,11</sup>

### **5.2.2) Kits comerciales y métodos automatizados.**

Hoy en día, se lleva a cabo la identificación de *S. aureus* y otras especies de *Staphylococcus* utilizando kits comerciales, tales como API Staph Ident<sup>®</sup>, API Staph-Trac<sup>®</sup>, Vitek tarjeta GPI<sup>®</sup> y Microscan Pos Combo<sup>®</sup>. Estos comprenden tiras preformadas que contienen los sustratos de prueba.

Los sistemas automatizados proporcionan resultados rápidos de identificación, así como de la sensibilidad antimicrobiana, utilizan sustratos con fuentes de carbono para la identificación y el fundamento para el estudio de susceptibilidad se realiza por diferentes métodos (colorimetría, turbidimetría, fluorimetría, etc.) que detectan el desarrollo bacteriano en micropaneles que contienen diluciones seriadas del antimicrobiano, estableciendo la mínima concentración del antimicrobiano que es capaz de inhibir el desarrollo bacteriano (MIC). Algunos de ellos son Vitek<sup>®</sup>, MicroScan<sup>®</sup>, Unisept<sup>®</sup>, Pasco<sup>®</sup>, Sceptor<sup>®</sup>, Phoenix<sup>®</sup>, Vitek 2<sup>®</sup>, Sensititre<sup>®</sup>, Walk/Away<sup>®</sup>.<sup>12</sup>

#### **5.2.2.1) Equipo automatizado BD BACTEC<sup>®</sup> FX para hemocultivos.**

La muestra a analizar se inocular en un frasco de cultivo BACTEC<sup>®</sup> Peds Plus/F que se coloca luego en el instrumento BD BACTEC<sup>®</sup> FX para la incubación y la lectura periódica. Cada frasco contiene un sensor de fluorescencia en la base del frasco, el desarrollo de microorganismos en el medio aumenta la cantidad de CO<sub>2</sub> y provoca la liberación de fluorescencia del sensor que es leída por un fotodetector que corresponde a la cantidad de CO<sub>2</sub> producido por el crecimiento de microorganismos.

La mayoría de los cultivos positivos se detectarán en las primeras 24 horas tras la inoculación. Sin embargo, existen algunas bacterias de crecimiento lento y los viales en curso deben conservarse durante varios días para garantizar la máxima recuperación (Figura 4).<sup>25</sup>



Figura 4. Equipo automatizado para Hemocultivos BD BACTEC<sup>®</sup> FX

#### 5.2.2.2) Equipo automatizado BD Phoenix 100<sup>®</sup>

Para la identificación, las placas que utiliza el equipo BD Phoenix 100<sup>®</sup> se basan en los resultados de las reacciones colorimétricas, cromogénicas y fluorométricas de los sustratos utilizados por las bacterias.

Para el caso de la sensibilidad antimicrobiana, el sistema BD Phoenix 100<sup>®</sup> emplea el método de microdilución en caldo, para detectar el crecimiento del organismo en presencia de un antibiótico, el sistema emplea por un lado un método colorimétrico que mide los cambios de un indicador redox (azul de alamar) y por otro lado usa un método turbidimétrico que mide la turbidez del medio. El azul de alamar es reducido por NADPH, FADH, FMNH y también por los citocromos, este indicador acepta electrones lo que cambia de su estado oxidado azul no fluorescente a su estado reducido rosa fluorescente.

Cada panel contiene diversos antibióticos con un amplio rango de concentraciones de doble dilución. Los valores de MIC de cada antibiótico son interpretados de acuerdo al manual M100 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).<sup>26</sup>

Las pruebas bioquímicas y los antibióticos empleados por las placas del equipo BD Phoenix 100<sup>®</sup> se describen en la sección de ANEXOS.

Esta herramienta proporciona una disminución en el tiempo de identificación y resultados, ya que se puede tener el perfil bioquímico del organismo en un plazo máximo de 12 horas mientras que los resultados de sensibilidad se obtienen en máximo 16 horas, lo que significa un menor tiempo de entrega de resultados al médico, así como la herramienta necesaria para dar un tratamiento oportuno y eficaz a los pacientes (Figura 5).



**Figura 5. Equipo automatizado BD PHOENIX 100<sup>®</sup> y placas para la identificación y sensibilidad antimicrobiana.**

### **5.3) Pruebas de sensibilidad antimicrobiana**

#### **5.3.1) Difusión en agar con disco**

Anteriormente la prueba con oxacilina era recomendada para *S. aureus*, empleando una suspensión de las colonias a un estándar de 0.5 McFarland inoculado en una placa de agar Mueller-Hinton suplementado con 2% de

NaCl y colocando los discos de oxacilina (1 µg). Las condiciones y criterios de interpretación son indicadas por el CLSI.<sup>14,15</sup>

La prueba empleando los discos de cefoxitina (30 µg) fue propuesta para remplazar el uso de oxacilina, como método de detección porque hay una fuerte correlación con la expresión de PBP2a.<sup>3,14,15</sup>

La cefoxitina es un agente sustituto de oxacilina para la detección de resistencia a oxacilina mediada por el gen *mecA*.

La superioridad respecto al disco de oxacilina radica, entre otras cosas, porque los hiperproductores de penicilinas pueden dar reacciones cruzadas con la oxacilina mediante el método de difusión de disco, y ser falsamente reportados como MRSA. Además, sus halos de inhibición se relacionan con la presencia o ausencia del gen *mecA* mejor que con otros métodos, no está influenciado decisivamente por variaciones de inóculo, temperatura o medios de cultivo utilizados.<sup>20</sup>

Los aislamientos que son cefoxitina resistente deben ser reportados como oxacilina resistente (la resistencia a oxacilina es debida a la presencia del gen *mecA*); otros agentes β-lactámicos, excepto aquellos con actividad anti-MRSA, se deben informar como resistentes o no deben ser reportados.

Cuando se presenta resistente a oxacilina significa que es resistente a todos los antibióticos β-lactámicos, penicilinas, cefalosporinas, combinaciones con inhibidores de β-lactamasas, monobactams y carbapenems.

Esta metodología se describirá detalladamente en la parte de materiales y métodos.

#### **5.3.1.1) Detección de β-lactamasas en cepas de *S.aureus*.**

Se trata de una prueba suplementaria, que detecta un mecanismo de resistencia específica. El manual M100 recomienda que se realice la prueba de detección de producción de β-lactamasas en cepas de *S.aureus* cuando MICs ≤ 0.12 µg/mL o las zonas de inhibición para penicilina son ≥ 29 mm, que es el rango para denominarlas como sensibles a penicilina.<sup>3</sup>

Hay dos métodos para la realización de la prueba: Difusión en disco (Prueba del borde de la zona de penicilina) y la prueba basada en nitrocefina.

La prueba de zona de borde de penicilina en difusión en disco ha demostrado ser más sensible que las pruebas a base de nitrocefina para la detección de la producción de  $\beta$ -lactamasa en *S. aureus*. Se recomienda la prueba zona de borde de penicilina si sólo una prueba se utiliza para la detección de  $\beta$ -lactamasa.

Sin embargo, algunos laboratorios pueden optar por realizar una prueba basada en nitrocefina primero y, si el resultado es positivo, se reportan los resultados como positivos para la  $\beta$ -lactamasas (o resistentes a la penicilina). Si la prueba de nitrocefina es negativa, la prueba de la zona de borde de penicilina se debe realizar antes de informar el aislado como penicilina susceptible en los casos en que la penicilina se pueda utilizar para la terapia (por ejemplo, endocarditis).<sup>3</sup>

Los Estafilococos  $\beta$ -lactamasa positivos son resistentes a penicilina, amino-, carboxi, y ureidopenicilinas. Los Estafilococos  $\beta$ -lactamasa negativo son sensibles a penicilina, amino-, carboxi, y ureidopenicilinas.<sup>3</sup>

### **5.3.2) Microdilución en caldo**

Otra técnica es la prueba de microdilución en caldo que emplea pocillos microtubulares en los que se preparan diluciones seriadas de los antibióticos de prueba, posteriormente se inoculan en una concentración estandarizada del microorganismo para evaluar la concentración mínima inhibitoria.<sup>13</sup>

El CLSI recomienda determinar MIC de oxacilina por la prueba de microdilución en caldo Mueller-Hinton o en dilución de agar suplementado con 2% de NaCl a 24 horas de incubación con una temperatura que no exceda los 35°C. Los aislamientos con un MIC  $\geq 4$  son resistentes y muy probablemente poseen el gen *mecA*.<sup>3,15</sup>

### **5.3.3) Identificación de MRSA**

MRSA es un término usado para describir a los *Staphylococcus aureus* aislados que son resistentes a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluidas penicilinas (también las estables a penicilasas) y cefalosporinas. Este

mecanismo de resistencia es debido a la presencia del gen *mecA* en el genoma de *S. aureus*.<sup>13</sup>

Son varias las técnicas empleadas para la detección de estas cepas y uno de los métodos convencionales para la detección de MRSA es la prueba de difusión en agar con disco empleando los discos de cefoxitina de 30 µg. La metodología se describe en la sección 10.3

#### 5.3.4) CHROMAgar® MRSA

Otra forma de identificar a las cepas MRSA es mediante el uso de CHROMAgar® MRSA, que además de ser selectivo para *S. aureus*, permite identificar a las colonias de MRSA de color rosa o malva, de las que son susceptibles, siendo inhibidas y de otras bacterias que presentan coloración azul, o incoloras. La mezcla cromógena presente en este medio (con la incorporación de cefoxitina para la detección de MRSA) está formada por sustratos artificiales (cromógenos), que liberan compuestos de colores insolubles cuando son hidrolizados por enzimas específicas. Así se facilita la detección de *S. aureus* y su diferenciación de otros organismos. *S. aureus* utiliza uno de los sustratos cromógenos que producen colonias de color rosa o malva (Figura 6).<sup>16</sup>

En una evaluación del medio, la sensibilidad y especificidad de los resultados en comparación con la prueba de difusión en disco de cefoxitina fue del 85.5% al 100% y del 99.8% al 100% respectivamente, dependiendo del tipo de muestra analizada.<sup>17</sup>

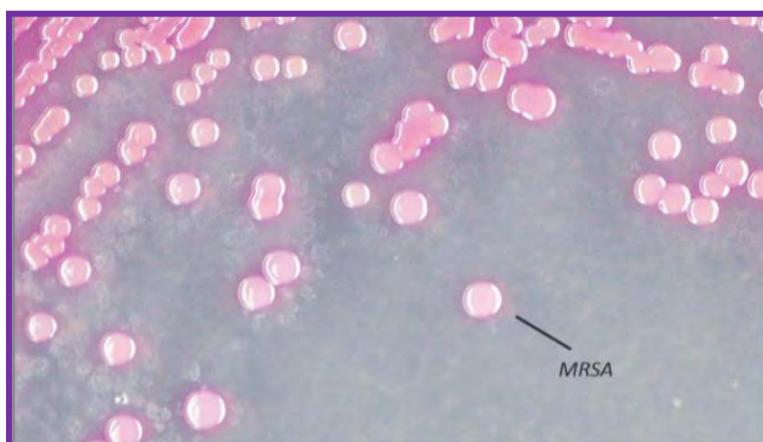


Figura 6. Aspecto típico de las colonias MRSA desarrolladas en CHROMAgar® MRSA

### 5.3.5) Aglutinación en látex

Además del medio cromogénico, se emplean pruebas de aglutinación de látex comerciales.

*S. aureus* puede ser confirmado por pruebas realizadas a las colonias para determinar la aglutinación con partículas de látex recubiertas con inmunoglobulina G y fibrinógeno que se une a la proteína A y el factor de aglutinación, respectivamente, en la superficie celular bacteriana. Estos están disponibles de proveedores comerciales (por ejemplo, Staphaurex<sup>®</sup>). La prueba de látex más reciente (Pastorex<sup>®</sup>) incorpora anticuerpos monoclonales para el serotipo 5 y polisacárido capsular 8 con el fin de reducir el número de falsos negativos. (Algunos aislados clínicos recientes de *S. aureus* carecen de producción de coagulasa y / o factor de aglutinación, que puede hacer difícil la identificación.)

Staphaurex<sup>®</sup> se emplea para la detección del factor de aglutinación y de la proteína A asociada con *Staphylococcus aureus*. Presenta 99.8% de sensibilidad y 99.5% de especificidad.

Staphaurex<sup>®</sup>Plus además de identificar *Staphylococcus aureus*, detecta la superficie de antígenos característicos de las cepas de MRSA como el antígeno somático tipo 18 y capsular 5 con fenotipo meticilino-resistente.

Pastorex Staph Plus<sup>®</sup> es una prueba de aglutinación rápida para la detección simultánea del antígeno de afinidad a fibrinógeno (factor de aglutinación), proteína A, y los polisacáridos capsulares de *Staphylococcus aureus* (Figura 7).



Figura 7. Kits de aglutinación en látex comerciales

### 5.3.6) Métodos moleculares

La detección del gen *mecA* por PCR es considerada el estándar de oro. La extracción de DNA se realiza en el aislamiento y el gen *mecA* se amplifica usando primers específicos.

El ensayo Xpert<sup>®</sup> MRSA/SSA SSTI de Cepheid es una prueba cualitativa de diagnóstico in vitro, indicada para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) en hisopos de infecciones de la piel y los tejidos blandos. La prueba utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real automatizada para detectar el DNA del MRSA/SA. Los primers y sondas empleados detectan secuencias patentadas de la proteína A estafilocócica (*spa*), del gen *mecA* y del cromosoma tipo cassette estafilocócico *mec* (SCC*mec*) insertado en el sitio del *attB* cromosómico del *S.aureus*.<sup>18</sup>

## 6) MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

La multirresistencia a los antibióticos es cada vez más común en *S. aureus* y *S. epidermidis*.

En la actualidad las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes y multirresistentes. La adquisición de esta resistencia se debe principalmente al intercambio de manera horizontal de genes que son transportados por elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones (Tn) y secuencias de inserción (IS).<sup>1</sup>

### 6.1) Principales mecanismos de resistencia bacteriana.<sup>23</sup>

Puede llevarse a cabo por uno o más de los siguientes mecanismos:

#### 6.1.1) Alteración del transporte de los antibióticos

- Transporte activo desde las células bacterianas (Expulsión del antibiótico “Efflux”)

Bacterias resistentes a tetraciclinas sobreproducen proteínas de membrana que funcionan como bombas de reflujo del antibiótico. Éste es expulsado a velocidades mayores que las relacionadas con su previa difusión hacia el interior, por lo que no alcanza proporciones intramicrobianas que afecten significativamente a la bacteria

- Alteraciones de las proteínas de la membrana externa (porinas)

De la modificación por mutación de estas proteínas se genera una disminución del paso del antibiótico, por la alteración de la permeabilidad de la membrana (debido a una modificación de la carga, o la hidrofobicidad).

#### 6.1.2) Modificación del fármaco (Por inactivación enzimática)

- Por enzimas como las  $\beta$ -lactamasas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos. (Ver sección 6.2.1.1)
- Por enzimas modificadoras de aminoglucósidos (adición de sustituyentes). Pueden ser inactivados por al menos tres clases de enzimas, las cuales agregan diferentes sustituyentes a la molécula original, redituando estructuras incapaces de reconocer a su sitio de acción en el rRNA; las adenil transferasas les incorporan moléculas de

adenosina, las fosforil transferasas les insertan grupos fosfato y las acetil transferasas acetilan los grupos amino del antibiótico.

### 6.1.3) Modificación estructural del “blanco” de acción (Alteración de los receptores)

- Bacterias resistentes a eritromicina monometilan o dimetilan un residuo de adenina, situado en la peptidil transferasa del rRNA 23S; ello es catalizado por la Erm, una metil transferasa que disminuye la afinidad de macrolidos y estreptograminas por el RNA.
- Alteración de las PBPs por el gen *mecA* (Ver sección 6.2.1.2)

### 6.1.4) Otros

- Bloqueo del transporte del antibiótico. (Ej. glicerolfostato en fosfomicina)
- Producción de enzima alternativa (bypass) en caso del trimetropim se produce una nueva dihidrofolato reductasa.

## 6.2) Principales mecanismos de resistencia en *S. aureus*.

En la tabla 2 se muestra un resumen de los principales antibióticos a los que se ha encontrado resistencia en cepas de *S.aureus*. Se indican los blancos celulares, los genes involucrados, los productos del gen, su mecanismo de resistencia y la localización del gen.

Para el presente trabajo se dará mayor énfasis en la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos

### 6.2.1) Resistencia a $\beta$ -lactámicos

Existen dos mecanismos de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos en *Staphylococcus*: producción de  **$\beta$ -lactamasas** y **modificación del blanco** por cualquier adquisición de una PBP exógena. Las PBPs son indispensables para la acción de los  $\beta$ -lactámicos, ya que ellos actúan uniéndose a ellas, de este modo las PBPs son inhibidas, interfiriendo con la fase de transpeptidación.<sup>15</sup>

**Tabla 2. Principales antibióticos a los que se ha encontrado resistencia en cepas de *S. aureus*. Modificado de JA Bustos<sup>1,15,21,22</sup>**

Clasificación /Antibiótico	Blanco celular	Genes de resistencia	Producto del gen	Mecanismo de resistencia	Localización
<b>• Inhibición de la síntesis de pared celular</b>					
Penicilina	PBPs (transpeptidación)	<i>blaZ</i>	$\beta$ -lactamasa	Hidrólisis enzimática del núcleo $\beta$ -láctamico	Plásmidos; Tn552
$\beta$ -láctamicos	PBPs (transpeptidación)	<i>mecA</i>	PBP2a	Afinidad reducida al antibiótico	Cromosoma SSCmec; Tn4291
Glicopéptidos (Vancomicina, teicoplanina)	Complejos D-Ala-D-Ala	<i>van</i>	Peptidoglican o alterado D-Ala-D-Lac	Se atrapa la vancomicina en la pared celular. Síntesis de un dipéptido que reduce la afinidad de la vancomicina	Cromosoma; Plásmidos; Tn1546
*Fosfomicina	Síntesis del ácido N-acetil murámico	<i>fosB</i>	Glutión-S-Transferasa	Modificación en la síntesis de N-acetil murámico.	Plásmidos
<b>• Inhibición de la síntesis de proteínas</b>					
Aminoglucósidos (Gentamicina)	RNAr 30S	<i>aacA-aphD</i>	Acetiltransferasa, Fosfotransferasa	Modificación por acetilación o fosforilación	Cromosoma; plásmidos; Tn4001, Tn5404, Tn5405
Macrólidos, lincosamidas	RNAr 50S	<i>ermA, ermB, ermC</i>	Metilasa	Metilación del rRNA 23S	Plásmidos; Tn554
Macrólidos, estreptograminas	RNAr 50S	<i>msrA, vha, vat, vatB,</i>	Acarreadores ABC, Acetiltransferasa	Bomba de expulsión. Modificación por acetilación	Plásmidos
Tetraciclinas (Minociclina, doxiciclina)	RNAr 30S	<i>tetK, tetL, tetM</i>	Sistemas clase K, L y M	Bombas de expulsión Protección ribosomal	Plásmidos, Tn916
Ácido fusídico	Factor de elongación G	<i>fusA, fusB</i>	Factor de elongación G	Alteración del factor de elongación G	Plásmidos
Mupirocina	Isoleucil-RNA-t-sintetasa	<i>mupA</i>	Isoleucil tRNA sintetasa	Producción de una Isoleucil tRNA sintetasa modificada	Plásmidos
Oxazolidinonas (linezolid)	RNAr 50S	<i>rrn</i>	rRNA 23S	Mutación en el dominio V del rRNA 23S, interfiere con la unión ribosomal	Cromosoma

Quinupristina-dalfopristina (Q-D)	RNAr 50S	Q: <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> D: <i>vat</i> , <i>vatB</i>	Metilasa ribosomal  Acetiltransferasa	Reduce la afinidad a la subunidad ribosomal 23S. Modificación enzimática de la dalfopristina	Cromosoma; plásmidos  Plásmidos
Cloramfenicol	RNAr 50S	<i>cat</i>	rRNA 50S	Modificación por acetiltransferasa	Plásmidos
• Inhibición de la síntesis de transcripción					
Rifampicina	RNA polimerasa	<i>rif</i>	RNA polimerasa	Mutación en la subunidad $\beta$ de la RNA polimerasa	Cromosoma
• Inhibición de la síntesis de DNA					
Quinolonas (Ciprofloxacino)	DNA girasa, topoisomerasa IV	<i>par</i>  <i>gyrA</i> o <i>gyrB</i>	Componente ParC de la topoisomerasa IV Componentes GyrA o GyrB de la girasa	Mutación en la subunidad A de la girasa y topoisomerasa IV	Cromosoma
• Inhibidores de moléculas esenciales para la biosíntesis (Antimetabolitos)					
Trimetoprim-sulfametoxazol	Síntesis del ácido tetrahidrofólico	<i>dfrA</i>  <i>sulA</i>	Dehidrofolato reductasa (DHFR) Dehidropteroato sintasa	Afinidad reducida de la DHFR. Sobreproducción de ácido <i>p</i> -aminobenzoico	Cromosoma Cromosoma, Tn4003

### 6.2.1.1) $\beta$ -lactamasas

La resistencia a la penicilina en *S. aureus* es debida a la producción de la enzima que hidroliza a la penicilina, penicilinasas ( $\beta$ -lactamasa).

Estas enzimas hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico, separando el enlace amida, impidiendo la función del antibiótico el cual inhibe la síntesis de la pared celular (Figura 8.)<sup>8,9</sup>

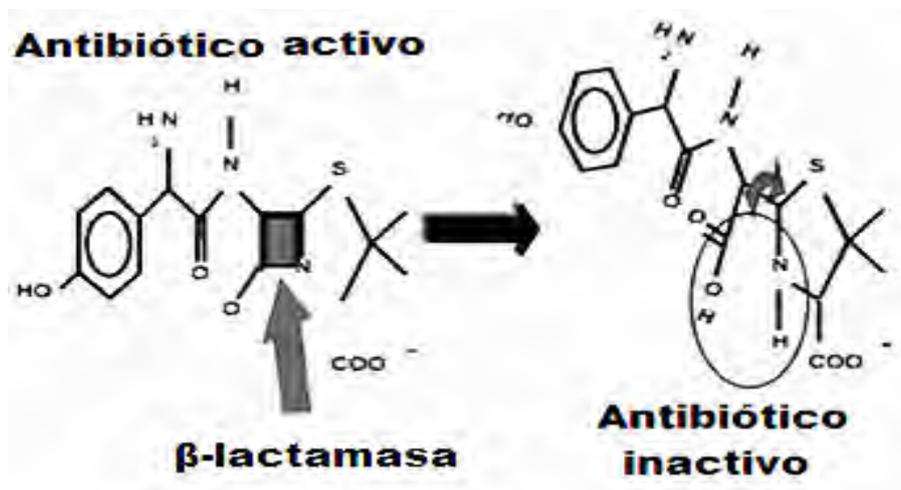


Figura 8. Mecanismo de hidrólisis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos por  $\beta$ -lactamasas.

### 6.2.1.2) Resistencia a meticilina

La resistencia a la oxacilina, meticilina (MRSA) y nafcilina no está mediada por  $\beta$ -lactamasas, en cambio, está mediada por la producción de una proteína de membrana alterada estructuralmente (PBP2a). Esta proteína presenta una baja afinidad no solo a meticilina, sino también a la totalidad de los  $\beta$ -lactámicos (cefalosporinas, carbapenémicos, incluso a la combinación de  $\beta$ -lactámico/inhibidor de  $\beta$ -lactamasas). La proteína PBP2a continúa sintetizando peptidoglicano para la pared celular aún cuando las PBP normales estén inhibidas por los antibióticos.<sup>1,24,</sup>

La proteína PBP2a es codificada por el gen *mecA* (adquirido de forma horizontal) que es considerado el elemento central de la resistencia a meticilina.

Este gen se ubica en una isla cromosómica denominada casete cromosómico estafilocócico (*SCCmec*) que transporta genes para la resistencia a los antibióticos. *SCCmec* contiene el conjunto de genes *mec* (el gen *mecA* y sus reguladores) y el conjunto de genes *ccr*, los cuales codifican recombinasas sitio específicas responsables de la movilidad de *SCCmec*.<sup>9</sup>

## 7) TRATAMIENTO

La penicilina se empleo como el primer tratamiento para las infecciones causadas por *S. aureus*, sin embargo desarrolló una rápida resistencia y en la actualidad una proporción inferior al 10% de estas cepas es sensible a este antibiótico.<sup>5</sup>

Luego de la aparición de las cepas resistentes a la penicilina, se desarrollo la meticilina, una penicilina semisintética resistente a las  $\beta$ -lactamasas, sin embargo las cepas resistentes no tardaron en aparecer.<sup>15</sup>

Es por ello que las opciones tanto para el tratamiento ambulatorio de infecciones leves de los tejidos blandos, como de las infecciones severas de los pacientes hospitalizados son limitadas debido a la creciente resistencia a los antimicrobianos.

La selección de antibióticos apropiados para tratar la infección por MRSA depende de varios factores, incluyendo la gravedad de la enfermedad (local frente a invasiva) y el aislamiento de MRSA.<sup>19</sup>

En el caso de infecciones del tipo ambulatorio y las infecciones menores de la piel, se han usado agentes orales como el trimetoprim-sulfametoxazol, clindamicina, eritromicina, doxiciclina, linezolid, rifampicina, fluoroquinolonas.<sup>19</sup>

Debido a que los aislamientos nosocomiales por lo general son del tipo MRSA, el tratamiento de elección para las infecciones en pacientes hospitalizados será vancomicina intravenosa.<sup>5</sup>

La vancomicina históricamente se ha considerado el fármaco de elección para la infección por MRSA severa; sin embargo, se ha informado de fracasos del tratamiento, es por ello que se emplean nuevos agentes parenterales para infecciones invasivas más graves incluyendo linezolid y, daptomicina. Además se están desarrollando nuevas opciones de tratamiento.<sup>19</sup>

Además del tratamiento antimicrobiano, se emplean otras medidas para la eliminación de la infección como son: el drenaje de las heridas, en las que el médico hace una incisión para drenar el líquido que se ha acumulado allí; además de la eliminación de dispositivos si se trata del origen de la infección.

# **II. PARTE EXPERIMENTAL**

## 8) JUSTIFICACIÓN

En el INP que es un hospital de tercer nivel, donde se atiende en su mayoría a pacientes con patologías de alta complejidad, las prolongadas estadías en el nosocomio, el uso de antibióticos por periodos largos y el uso de dispositivos intravasculares, son factores de riesgo para adquirir infecciones nosocomiales causadas por MRSA.

Tomando en cuenta lo anterior, es necesario investigar la resistencia a meticilina en *S. aureus* para su tratamiento, ya que desde la perspectiva de la salud pública mundial, esa resistencia constituye un problema que se ha agudizado cada vez más por el mal uso o abuso de los agentes antimicrobianos.

Así mismo resulta importante monitorear el aumento de la resistencia de cepas MRSA, para poder plantear estrategias para prevenir y controlar su diseminación.

## 9) OBJETIVOS

### 9.1) Objetivo general

Determinar la frecuencia de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) aisladas de pacientes del INP durante el año 2014, a través del método de difusión en agar con disco.

### 9.2) Objetivos particulares

- Identificar las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestras biológicas de pacientes del INP, usando los medios de cultivo: agar sangre de carnero, agar chocolate y agar fenil-etanol, además de pruebas bioquímicas manuales (catalasa, coagulasa, fermentación del manito,  $\beta$ -hemólisis, etc.) y empleando el sistema automatizado BD Phoenix<sup>®</sup> 100.
- Determinar la resistencia a oxacilina (mediada por el gen *mecA*) a través del método de difusión en agar con discos de cefoxitina 30  $\mu$ g, interpretando los resultados de acuerdo al manual M100 del CLSI.
- Detectar la producción de  $\beta$ -lactamasas en las especies de *Staphylococcus aureus* aisladas, por la metodología de descrita en el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
- Conocer la frecuencia de resistencia de cepas MRSA a los demás antimicrobianos usando el Sistema BD Phoenix<sup>®</sup> 100.

## **10) MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó un estudio observacional, descriptivo, transversal en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría (INP) de Enero a Diciembre del 2014.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* se obtuvieron de las muestras biológicas de pacientes del INP, desde recién nacidos hasta los 18 años de edad, tanto de pacientes hospitalizados como externos, durante el periodo de enero a diciembre del año 2014.

### **10.1) Siembra de las muestras**

#### **10.1.1) Hemocultivos**

Las muestras de sangre (hemocultivos), fueron inoculadas en frascos comerciales por el médico y llevadas al laboratorio, de ahí se incubaron en el equipo BD BACTEC<sup>®</sup> FX a 37°C por 7 días.

Los hemocultivos positivos se sembraron en los siguientes medios de cultivo: Agar sangre de carnero, Agar Fenil-etanol, Agar chocolate, Agar MacConkey y Agar sabouroad, y se realizó una tinción de Gram (Figura 9).

#### **10.1.2) Cultivos de muestras diversas**

En el caso de los cultivos de muestras diversas, éstos también se sembraron en Agar sangre de carnero, Agar Fenil-etanol, Agar chocolate, Agar MacConkey y Agar sabouroad, y una parte de la muestra se inoculó en un tubo con caldo tioglicolato y se resembró a las 24 horas en agar sangre, agar MacConkey y agar chocolate, y se realizó una tinción de Gram (Figura 10).

### **10.2) Identificación**

Después que se observaron cultivos positivos, se procedió a la identificación de los microorganismos, se utilizó el equipo automatizado BD Phoenix 100<sup>®</sup> el cual emplea una placa dividida en dos partes: una para las pruebas bioquímicas y otra para sensibilidad.

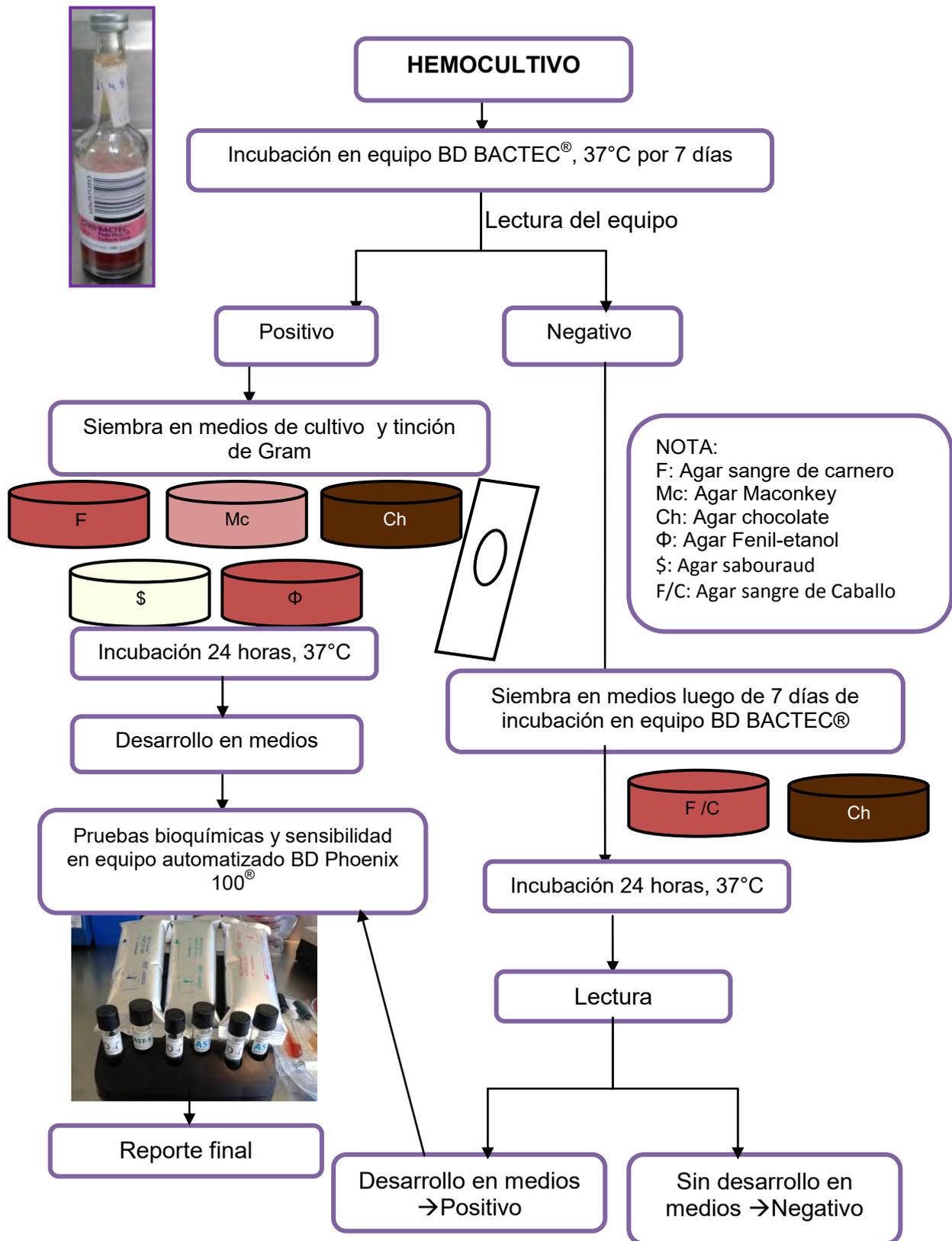


Figura 9. Metodología empleada en el Laboratorio de Bacteriología del INP para identificación bacteriana en hemocultivos.

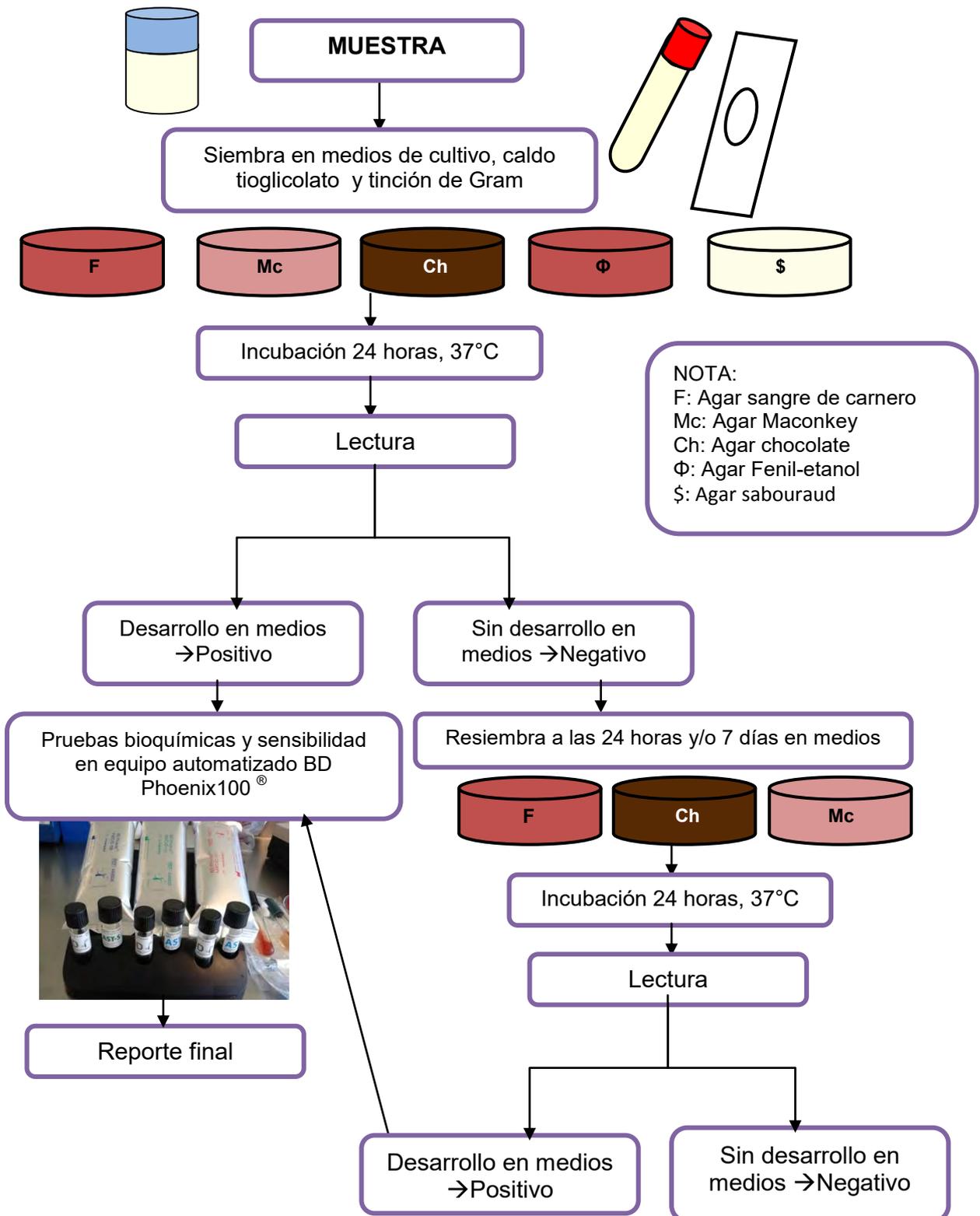


Figura 10. Metodología empleada en el Laboratorio de Bacteriología del INP para identificación bacteriana en muestras diversas.

Por otra parte, también se montaron una serie de pruebas bioquímicas manuales: la tinción de Gram, que nos muestra cocos Gram + agrupados en pares o tétradas, la prueba de catalasa positiva, la fermentación del manitol, así como la prueba de coagulasa, y adicionalmente la prueba de DNAsa.

### 10.3) Detección de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA)

Esta prueba se realizó por el método de difusión en agar con disco, siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100, utilizando los discos de cefoxitina (Fox 30 µg) en Agar Mueller Hinton (Figura 11).<sup>3</sup>

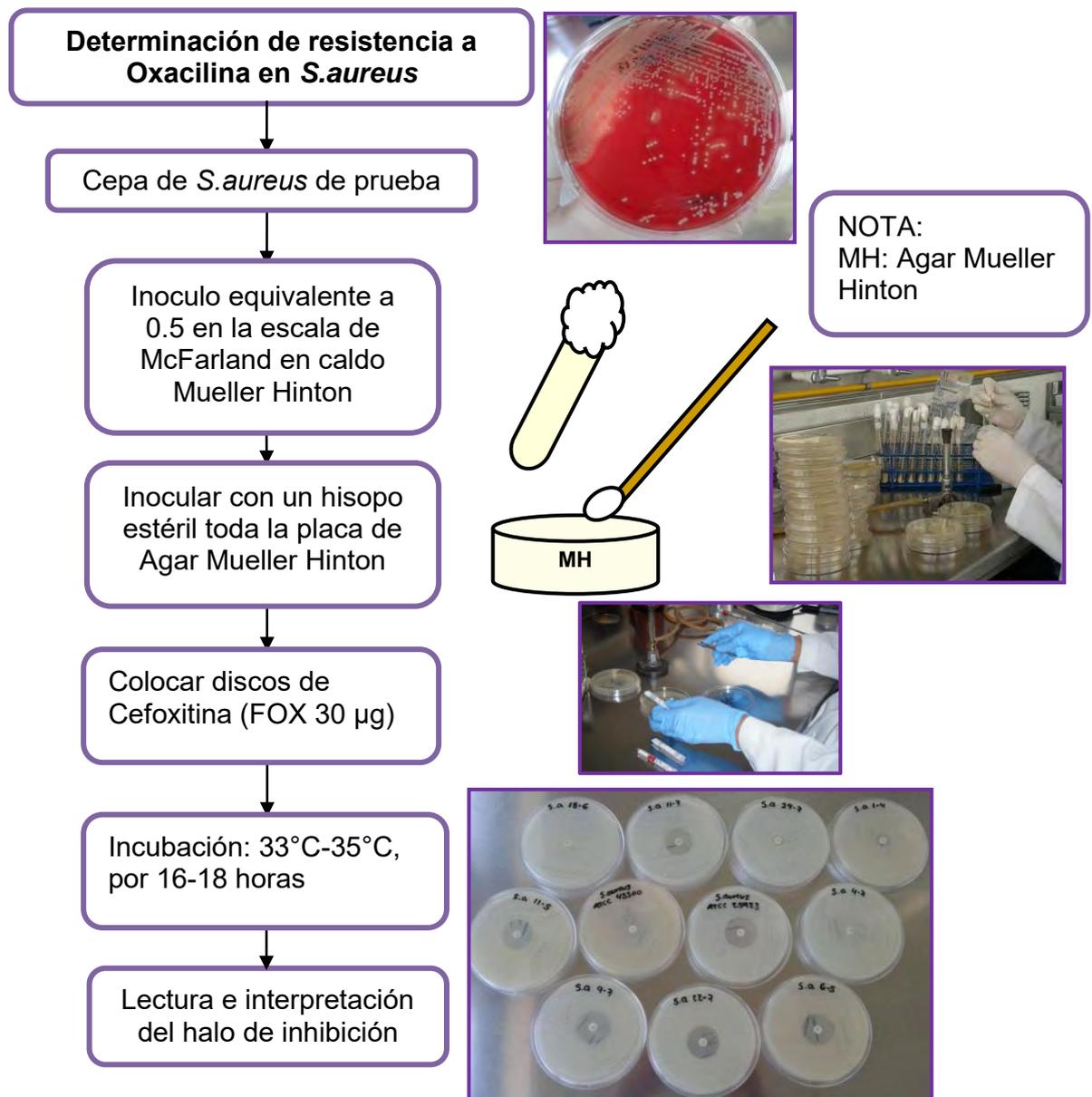


Figura 11. Método para la determinación de resistencia a Oxacilina en *S. aureus* según manual M100 del CLSI

➤ Procedimiento:

1) A partir de un cultivo puro y reciente (de 18 a 24 horas de incubación), tomado de agar Mueller-Hinton, se preparó una suspensión directamente de las colonias equivalente a un estándar de 0.5 en la escala de McFarland.

La densidad de la suspensión se ajustó a alrededor de  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro, comparando su turbidez con el estándar 0.5 de McFarland de sulfato de bario.

2) Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión del inóculo. Se escurrió el exceso de suspensión en las paredes del tubo.

3) Se inoculó toda la placa del agar Mueller-Hinton tres veces para obtener una inoculación uniforme. Se dejó reposar 15 minutos.

4) Con unas pinzas esterilizadas, se colocaron los discos de antibióticos sobre la superficie de la placa. Se dejó reposar 15 minutos.

5) Las placas se invirtieron y se incubaron a  $33^{\circ}\text{C}$ - $35^{\circ}\text{C}$ , por 16-18 horas.

6) Después de la incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición, incluido el diámetro del disco, hasta el milímetro más cercano.\*

\*El criterio de valoración se tomó como el área que no mostró crecimiento detectable a simple vista. Se desestimó el crecimiento leve de colonias diminutas que se detectaron cerca del borde de la zona evidente de inhibición.

**Tabla 3. Interpretación de la prueba para detección de Resistencia a Oxacilina (Detección de resistencia a Oxacilina mediada por *mecA* usando discos de cefoxitina) en *Staphylococcus aureus*.<sup>3</sup>**

Antibiótico	Diámetro del halo de inhibición			Observaciones
	Sensible	Intermedio	Resistente	Reporte
Cefoxitina 30 $\mu$	$\geq 22$ mm = <i>mecA</i> negativo	-----	$\leq 21$ mm = <i>mecA</i> positivo	Reportar: sensible o resistente a oxacilina

### **10.3.1) Control de calidad de la prueba.**

Se realizó empleando el Agar Muellen Hinton y las siguientes cepas de referencia de acuerdo a lo descrito en el manual M100 del CLSI:

- Control negativo: *S. aureus* ATCC® 25923 ( $\beta$ -lactamasa y *mecA* negativo) (23 mm- 29mm)
- Control positivo: *S. aureus* ATCC® 43300 (oxacilina-resistente, *mecA* positivo) ( $\leq$  21 mm)

La metodología fue la misma que se indica para “Detección de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA)” (Figura 11).<sup>3</sup>

### **10.4) Detección de $\beta$ -lactamasas en cepas de *S.aureus*.**

#### **10.4.1) Difusión en agar con disco (Prueba del borde de la zona de penicilina).**

Se utilizó la metodología por el método de difusión en agar con disco, siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), utilizando los discos de penicilina de 10 U.

–Interpretación:

- Borde de la zona afilado ("precipicio") =  $\beta$ -lactamasa positivo
- Borde de la zona difusa o irregular ("playa") =  $\beta$ -lactamasa negativo

#### **10.4.1.1) Control de calidad de la prueba.**

Se realizó empleando el Agar Muellen Hinton y las siguientes cepas de referencia de acuerdo a lo descrito en el manual M100 del CLSI:

- Control negativo: *S. aureus* ATCC® 25923 ( $\beta$ -lactamasa negativo: borde de la zona irregular = “playa”)
- Control positivo: *S. aureus* ATCC® 29213 ( $\beta$ -lactamasa positivo: borde de la zona afilado = “precipicio”).

#### **10.4.2) Prueba basada en nitrocefina (Discos de Cefinase® BBL BD)**

##### **10.4.2.1) Procedimiento.**

Utilizando unas pinzas, se humedeció el disco con una gota de agua esterilizada y, a continuación, se pasó por la colonia a analizar (se tomó el desarrollo desde el margen de la zona que rodeaba a una prueba de disco de penicilina o cefoxitina en una placa de agar Mueller-Hinton).

–Interpretación.

Una reacción positiva aparecerá como un cambio de color amarillo a rojo en el área en la que se aplicó el cultivo ( $\beta$ -lactamasa positivo).

##### **10.4.2.2) Control de calidad de la prueba.**

Se realizó de acuerdo al documento M100 del CLSI empleando las siguientes cepas:<sup>3</sup>

- *S. aureus* ATCC® 29213 – positivo ( $\beta$ -lactamasa positivo)
- *S. aureus* ATCC® 25923 – negativo ( $\beta$ -lactamasa negativo)

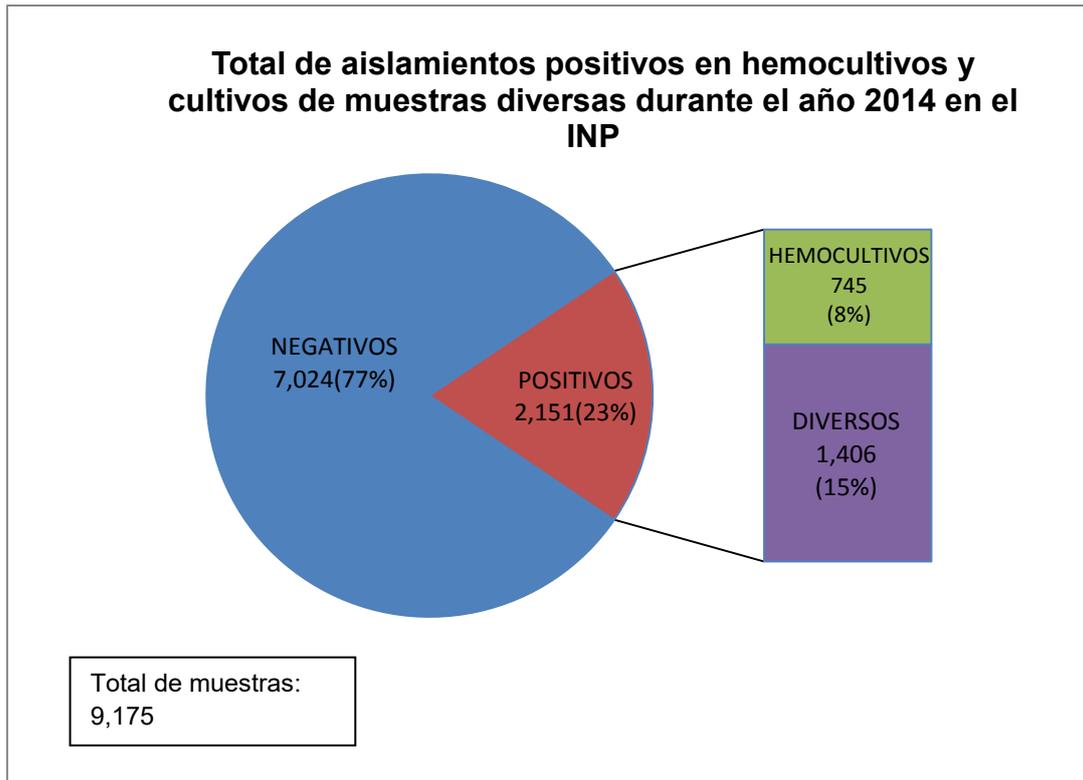
## 11) RESULTADOS

De enero a diciembre del 2014 se trabajaron 9,175 muestras (Gráfica 1), que pertenecieron a hemocultivos y cultivos de muestras diversas: aspirado bronquial, Secreción de herida quirúrgica, Aspirado traqueal, Aspirado nasofaríngeo (ANF), Líquido cefalorraquídeo (LCR), Biopsia de hueso, Líquidos estériles (peritoneal, articular, pleural), Secreción de piel, Absceso, Catéter, Secreción de dispositivo, Exudado ocular, Exudado vaginal, Secreción de nariz, Exudado ótico, Secreción de tejido.



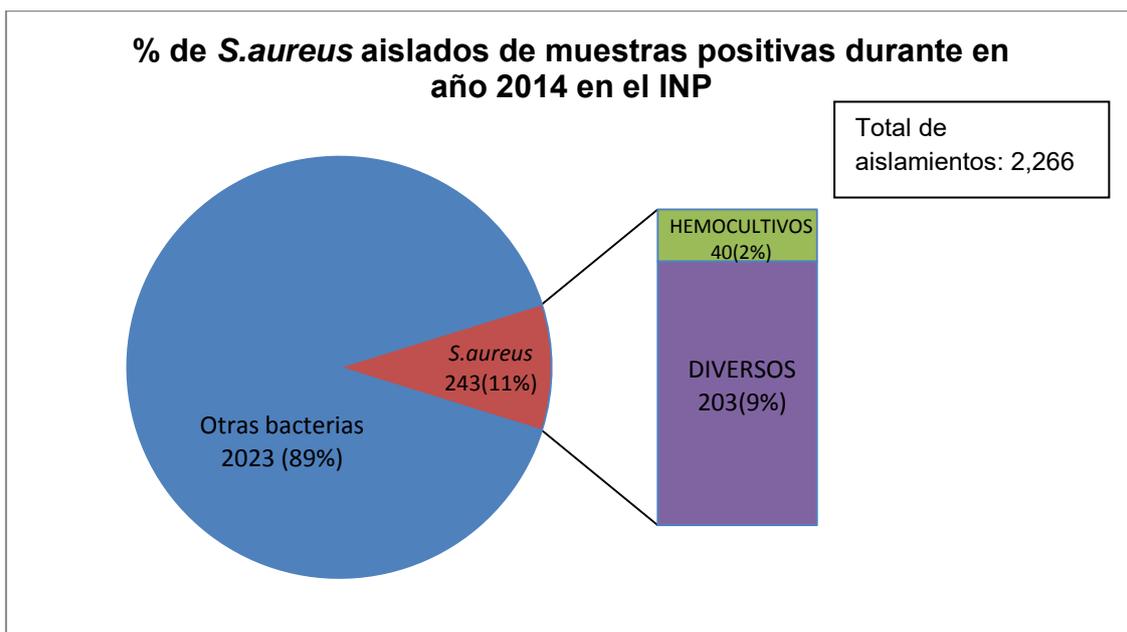
Gráfica 1. Total de muestras trabajadas en el INP durante el año 2014. Muestras 9,175: hemocultivos procesados 6,157 y 3,018 para muestras diversas [Aspirado bronquial, Secreción de herida quirúrgica, Aspirado traqueal, Aspirado nasofaríngeo (ANF), Líquido cefalorraquídeo (LCR), Biopsia de hueso, Líquidos estériles (peritoneal, articular, pleural), Secreción de piel, Absceso, Catéter, Secreción de dispositivo, Exudado ocular, Exudado vaginal, Secreción de nariz, Exudado ótico, Secreción de tejido].

Del total de muestras trabajadas 9,175, se obtuvieron 2, 151 con aislamientos positivos y 7,024 con aislamientos negativos (Gráfica 2).



Gráfica 2. Muestras con aislamientos positivos durante el año 2014 en el INP. Se muestra el total de 745 hemocultivos con aislamientos positivos y para el caso de muestras diversas de 1,406.

De las 2,151 muestras con aislamientos positivos se aislaron un total de 2,266 bacterias de las cuales solamente 243 (11%) resultaron ser *S. aureus*, y el resto (2,023) pertenecen a otras bacterias (Gráfica 3).



Gráfica 3. Porcentaje de aislamiento de *S.aureus* en hemocultivos y muestras diversas durante el año 2014 en el INP. Se observa el porcentaje de aislamiento de *S. aureus* del 11% (243 cepas).

Del total de bacterias, se aislaron 243 cepas de *S. aureus*, provenientes de 237 pacientes diferentes (en dos pacientes se aislaron 3 cepas de cada uno). 40 se obtuvieron de sangre (hemocultivo), y 203 de muestras diversas: 49 de aspirado bronquial, 29 de secreción de herida quirúrgica, 12 de aspirado traqueal, 42 de aspirado nasofaríngeo (ANF), 6 de líquido cefalorraquídeo (LCR), 3 de biopsia de hueso, 7 de líquidos estériles (peritoneal, articular, pleural), 10 de secreción de piel, 19 de absceso, 6 de catéter, 5 de secreción de dispositivo (sitio de catéter, cánula) 3 de exudado ocular, 4 de exudado vaginal, 3 de secreción de nariz, 2 de exudado ótico, 3 de secreción de tejido.

Estos aislamientos de *S.aureus* resultaron positivos a las pruebas bioquímicas manuales realizadas (Figuras 12 y 13).

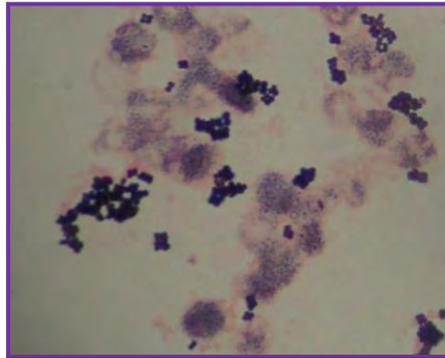


Figura 12. Tinción de Gram de hemocultivo positivo. Se observan cocos Gram positivos en racimos.

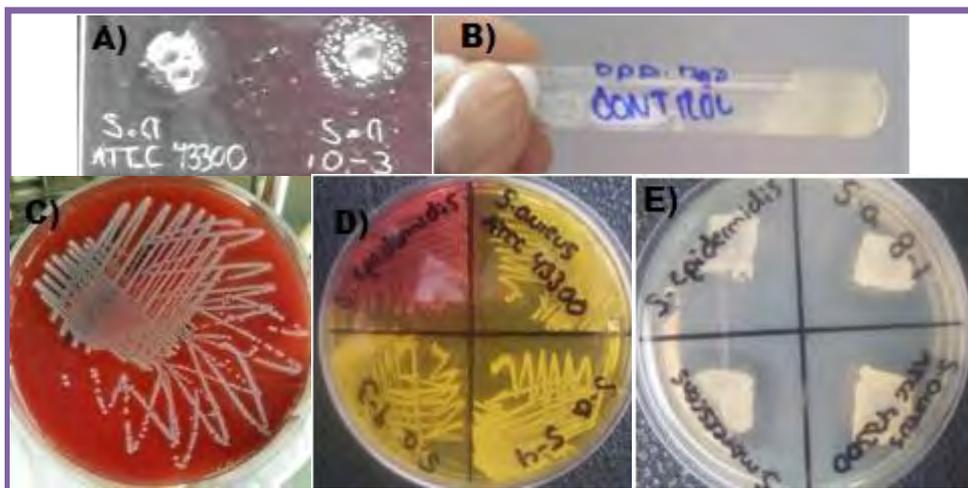


Figura 13. Pruebas bioquímicas positivas para la identificación de *S. aureus*. De izquierda a derecha: A) Catalasa (presencia de burbujas), B) Coagulasa (coagulación del plasma), C)  $\beta$ -hemólisis en agar sangre de carnero, D) Fermentación del manitol (*S. epidermidis* manitol negativo color rojo, *S. aureus* manitol positivo color amarillo) E) DNasa (*S. aureus* DNasa positivo se observa un halo alrededor del desarrollo, *S. epidermidis* DNasa negativo sin halo).

## ❖ RESULTADOS DE CEPAS DE *S.aureus* RESISTENTES A METICILINA (MRSA)

Se realizó la prueba de difusión en agar con discos de cefoxitina (Fox 30 µg) en Agar Mueller Hinton. Algunos de los resultados obtenidos se muestran a continuación (Figura 14):



Figura 14. Ejemplos de resultados de las cepas problema. De izquierda a derecha: S.a 18-6 cefoxitina resistente (0mm), S.a 6-5 cefoxitina sensible (27mm), S.a 22-7 cefoxitina sensible (26mm), S.a 1-4 cefoxitina resistente (13mm).

Tabla 4. Algunos ejemplos de cepas problema analizadas

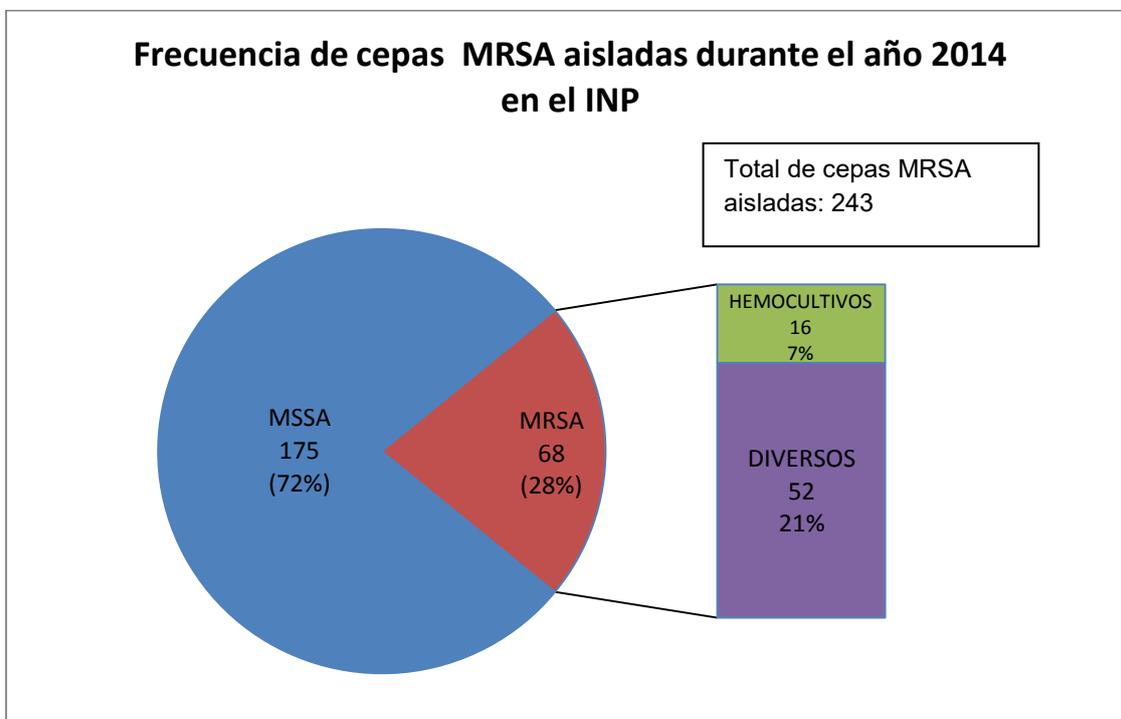
Número de cepa	Discos de antibiótico empleado	Diámetro del halo de inhibición	Resultado
s.a 18-6	Cefoxitina 30 µg	0 mm	Oxacilina resistente
s.a 6-5	Cefoxitina 30 µg	27 mm	Oxacilina sensible
s.a 22-7	Cefoxitina 30 µg	26 mm	Oxacilina sensible
s.a 1-4	Cefoxitina 30 µg	13 mm	Oxacilina resistente

Para el control de calidad de la prueba, los resultados fueron los siguientes (Figura 15):



Figura 15. Resultados de las cepas control en agar Mueller Hinton. De izquierda a derecha: Control positivo *S.aureus* ATCC<sup>®</sup> 43300 cefoxitina resistente (0 mm), Control negativo *S.aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923 cefoxitina sensible (31mm).

De las 243 cepas aisladas de *S.aureus*, el 28% (68 cepas) resultaron ser *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), mientras que el 72% restante (175 cepas) son *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina (MSSA) (Gráfica 4).



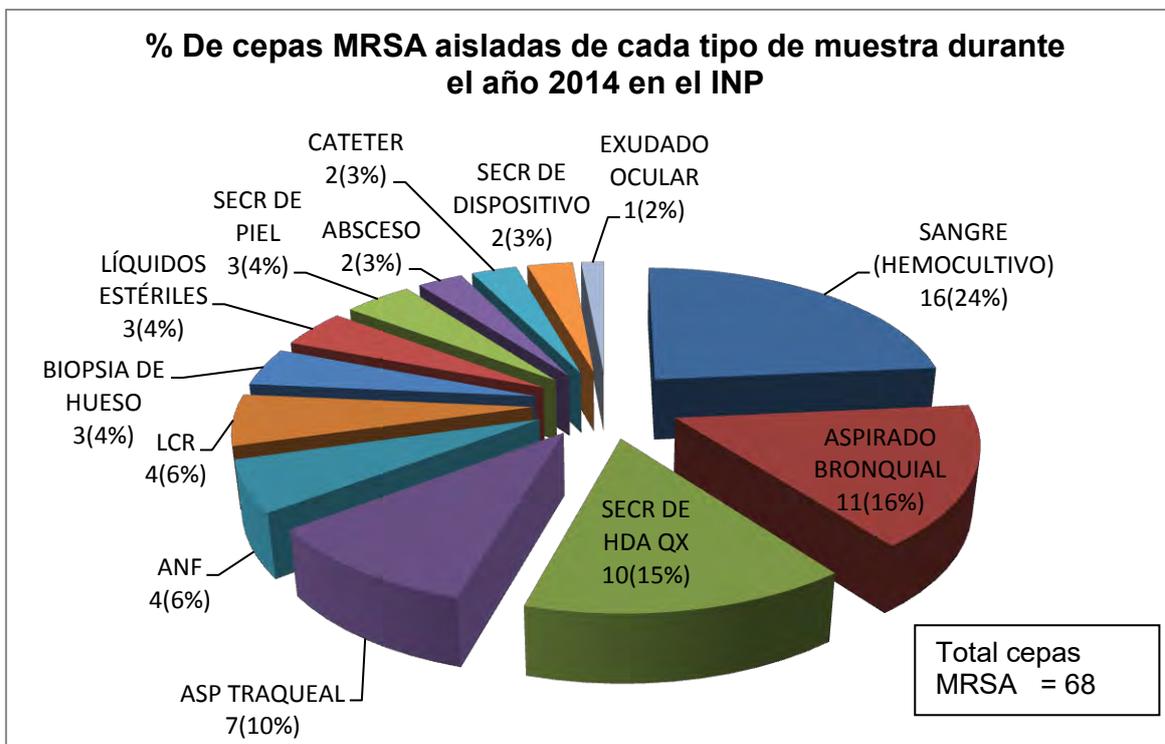
Grafica 4. Frecuencia de *S. aureus* aislados para el año 2014 en el INP. Se aislaron un total de 243 cepas, obteniéndose 68 cepas MRSA positivas (28% del total de *S.aureus* aislados), de las cuales 16 fueron aisladas de hemocultivos (7%) y 52 de cultivos de muestras diversas (21%).

De las 68 cepas MRSA aisladas se tiene que el 24% (16 cepas) pertenecen a los hemocultivos, mientras que el 76% restante (52 cepas) se aislaron de muestras diversas (Tabla 5).

**Tabla 5. Porcentaje (%) de cepas MRSA aisladas en hemocultivos y diversas muestras**

TIPO DE MUESTRA	<i>S.aureus</i> No de cepas	MRSA Número	MRSA %	MSSA Número	MSSA %
SANGRE (hemocultivo)	40	16	24	24	14
DIVERSOS (Cultivos de muestras diversas):	203	52	76	151	86
<b>TOTAL</b>	243	68	100	175	100

A continuación se señala el tipo de muestra y el porcentaje de las cepas MRSA aisladas a partir de ellas (Gráfica 5).



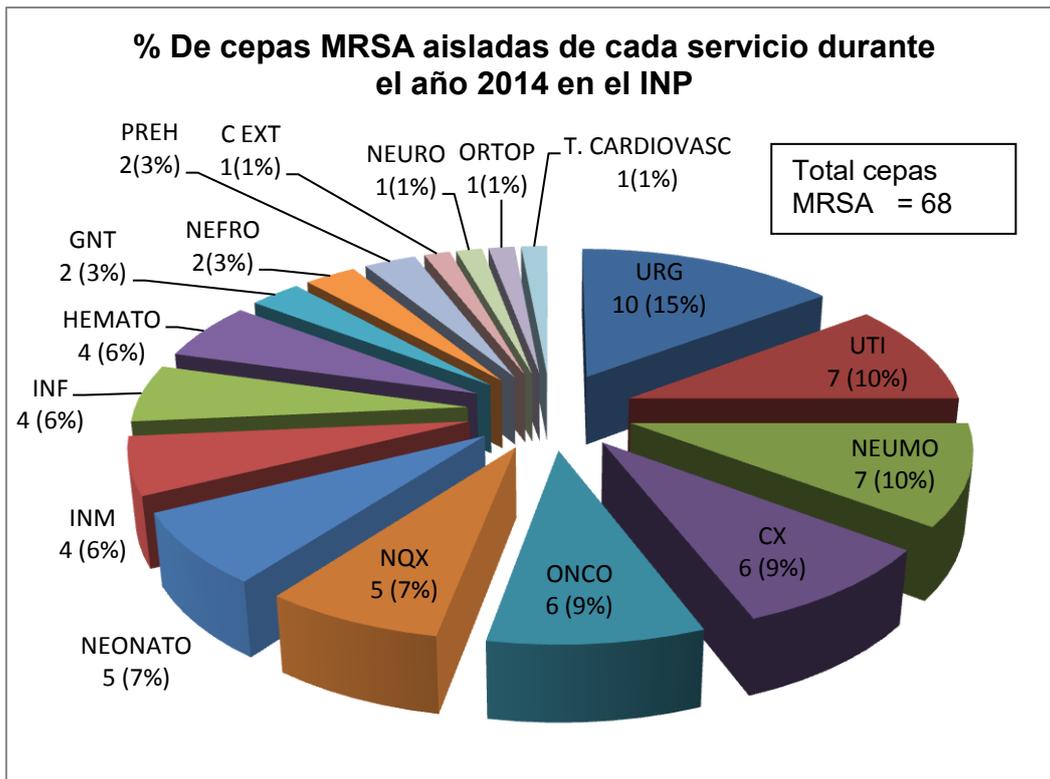
**Grafica 5. Porcentaje de aislamiento de cepas MRSA en el año 2014 en el INP de acuerdo al tipo de muestra proveniente. La mayor frecuencia de cepas MRSA fue para los hemocultivos (24%), le siguen el aspirado bronquial (16%), secreción de herida quirúrgica (15%), aspirado traqueal (10%), aspirado nasofaríngeo (6%), líquido cefalorraquídeo (6%), Biopsia de hueso (4%), otros líquidos estériles (4%), secreción de piel (4%), absceso (3%), catéter (3%), secreción de dispositivo (3%), y exudado ocular (2%).**

Además de analizar la procedencia de cepas MRSA, también se analizó el tipo de paciente (Tabla 6).

**Tabla 6. Incidencia de cepas MRSA aisladas en el INP durante el año 2014 considerando el tipo de paciente**

TIPO DE MUESTRA	MRSA Número No de cepas N=68 (100%)	MRSA %	TIPO DE PACIENTE			
			Internos Número	Internos %	Externos Número	Externos %
Sangre (Hemocultivo)	16	24	16	24	0	0
<b>DIVERSOS</b> (Cultivos de muestras diversas)						
Aspirado bronquial	11	16	11	16	0	0
Secreción de herida quirúrgica	10	15	9	14	1	1
Aspirado traqueal	7	10	7	10	0	0
Aspirado nasofaríngeo (ANF)	4	6	0	0	4	6
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	4	6	4	6	0	0
Biopsia de hueso	3	4	3	4	0	0
Líquidos estériles (peritoneal, pleural, articular)	3	4	3	4	0	0
Secreción de Piel	3	4	3	4	0	0
Absceso	2	3	2	3	0	0
Catéter	2	3	2	3	0	0
Secreción de dispositivo	2	3	2	3	0	0
Exudado ocular	1	2	1	2	0	0
<b>Total</b>	<b>68</b>	<b>100</b>	<b>63</b>	<b>93</b>	<b>5</b>	<b>7</b>

También resulta importante analizar los servicios en donde se aislaron las cepas MRSA, siendo el servicio de Urgencias el que presentó la mayor prevalencia, seguido de la Unidad de Terapia Intensiva (Gráfica 6), la mayoría de los aislamientos pertenecieron a pacientes hospitalizados (Tabla 7), así mismo se puede observar que la mayoría de los aislamientos provinieron de pacientes hospitalizados.



Gráfica 6. % De cepas MRSA de cada servicio en INP durante el año 2014

**Tabla 7. Incidencia de cepas MRSA en diferentes servicios del INP durante el año 2014**

SEVICIO	S.aureus No. de cepas	MRSA Número	MRSA %	TIPO DE PACIENTE			
				Internos Número	Internos %	Externos Número	Externos %
Urgencias	30	10	33	10	100	0	0
Terapia Intensiva	12	7	58	7	100	0	0
Neumología	61	7	11	3	43	4	57
Cirugía	10	6	60	6	100	0	0
Oncología	9	6	67	6	100	0	0
Neurocirugía	11	5	45	5	100	0	0
Neonatología	12	5	42	5	100	0	0
Inmunología	6	4	67	4	100	0	0
Infectología	14	4	29	4	100	0	0
Hematología	11	4	36	4	100	0	0
Gastronutrición	9	2	22	2	100	0	0
Nefrología	10	2	20	2	100	0	0

Prehospitalización	12	2	17	2	100	0	0
Consulta externa	6	1	17	0	0	1	100
Neurología	2	1	50	1	100	0	0
Ortopedia	6	1	17	1	100	0	0
Terapia Cardiovascular	4	1	25	1	100	0	0

Considerando los aislamientos mensuales obtenidos, se tienen las siguientes frecuencias (Tabla 8).

**Tabla 8. Frecuencia de cepas MRSA aisladas en cada mes durante el año 2014 en el INP**

MES	<i>S. aureus</i> No. de cepas	MRSA Número	MRSA %	MSSA Número	MSSA %
Enero	20	5	25	15	75
Febrero	11	2	18	9	82
Marzo	12	6	50	6	50
Abril	17	4	24	13	76
Mayo	14	3	21	11	79
Junio	19	4	21	15	79
Julio	27	10	37	17	63
Agosto	22	5	23	17	77
Septiembre	19	7	37	12	63
Octubre	35	12	34	23	66
Noviembre	21	1	5	20	95
Diciembre	26	9	35	17	65
<b>TOTAL DE CEPAS</b>	243	68		175	

❖ RESULTADOS DE CEPAS DE *S.aureus* PRODUCTORAS DE  $\beta$ -LACTAMASAS

Tabla 9. Resultados de  $\beta$ -lactamasas en cepas de *S.aureus*

<i>S.aureus</i> n=243	Prueba del borde de la zona de penicilina con discos de Penicilina de 10 U		Prueba basada en discos de nitrocefina	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
	232 (95%)	11 (5%)	232 (95%)	11 (5%)

Las 243 cepas de *S.aureus* fueron probadas para detectar  $\beta$ -lactamasas por los dos métodos (borde de la zona de penicilina y nitrocefina) resultando 232 cepas positivas (95%) y 11 cepas negativas (5%) (Tabla 9).

- Prueba de borde de zona de Penicilina (Puede realizarse al mismo tiempo que la prueba de difusión con disco de cefoxitina 30  $\mu$ g).

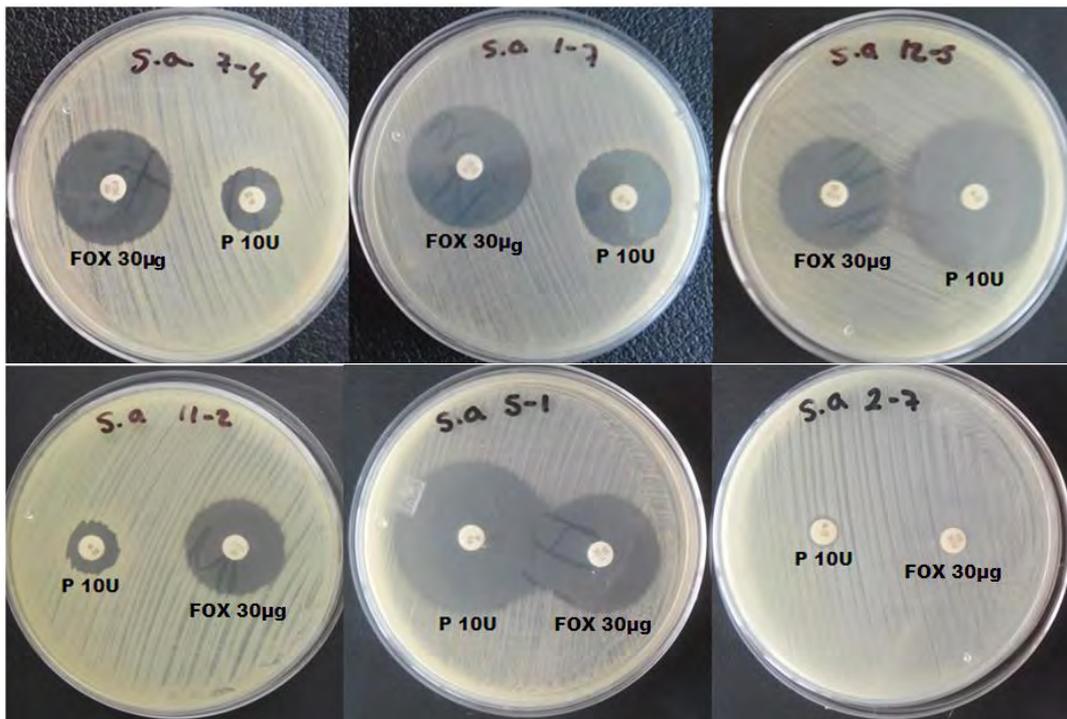


Figura 16. Ejemplos de resultados de las cepas problema. Arriba, de izquierda a derecha:  
 –Para penicilina: S.a 7-4 borde de la zona afilado =  $\beta$ -lactamasa positivo, S.a 1-7 borde de la zona afilado =  $\beta$ -lactamasa positivo, S.a 12-5 borde de la zona irregular =  $\beta$ -lactamasa negativo  
 –Para cefoxitina: S.a 7-4 cefoxitina sensible (26mm), S.a 1-7 cefoxitina sensible (27mm), S.a 12-5 cefoxitina sensible (27mm),  
 Abajo, de izquierda a derecha:  
 –Para penicilina: S.a 11-2 borde de la zona afilado =  $\beta$ -lactamasa positivo, S.a 5-1 borde de la zona irregular =  $\beta$ -lactamasa negativo, S.a 2-7 borde de la zona afilado =  $\beta$ -lactamasa positivo.  
 –Para cefoxitina: S.a 11-2 cefoxitina sensible (27mm), S.a 5-1 cefoxitina sensible (27mm), S.a 2-7 cefoxitina resistente (0mm).

Los resultados del control de calidad se muestran a continuación (Figura 17):



Figura 17. Resultados de las cepas control en agar Mueller Hinton con discos de Penicilina de 10 U. De izquierda a derecha: Control positivo *S.aureus* ATCC® 29213 (borde de la zona afilado =  $\beta$ -lactamasa positivo), Control negativo: *S.aureus* ATCC® 25923 (borde de la zona irregular  $\beta$ -lactamasa negativo).

Tabla 11. Algunos ejemplos de cepas problema analizadas

Número de cepa	Discos de antibiótico empleado	Diámetro del halo de inhibición	Borde de la zona del halo	Color del disco de Cefinase®	Resultado	Interpretación
s.a 7-4	Penicilina 10U	15 mm	Afilado	Rojo	$\beta$ -lactamasa positivo, <i>mecA</i> negativo	Oxacilina sensible, penicilina resistente
	Cefoxitina 30 $\mu$ g	26 mm	-----			
s.a 1-7	Penicilina 10U	24 mm	Afilado	Rojo	$\beta$ -lactamasa positivo, <i>mecA</i> negativo	Oxacilina sensible, penicilina resistente
	Cefoxitina 30 $\mu$ g	27 mm	-----			
s.a 12-5	Penicilina 10U	36 mm	Irregular	Amarillo	$\beta$ -lactamasa negativo, <i>mecA</i> negativo	Oxacilina sensible, penicilina sensible
	Cefoxitina 30 $\mu$ g	27 mm	-----			
s.a 11-2	Penicilina 10U	12 mm	Afilado	Rojo	$\beta$ -lactamasa positivo, <i>mecA</i> negativo	Oxacilina sensible, penicilina resistente
	Cefoxitina 30 $\mu$ g	27 mm	-----			
s.a 5-1	Penicilina 10U	35 mm	Irregular	Amarillo	$\beta$ -lactamasa negativo, <i>mecA</i> negativo	Oxacilina sensible, penicilina sensible
	Cefoxitina 30 $\mu$ g	27 mm	-----			
s.a 2-7	Penicilina 10U	0 mm	Afilado	Rojo	$\beta$ -lactamasa positivo, <i>mecA</i> positivo	Oxacilina resistente
	Cefoxitina 30 $\mu$ g	0 mm	-----			

- Prueba de nitrocefina (Disco de cefinase ®)

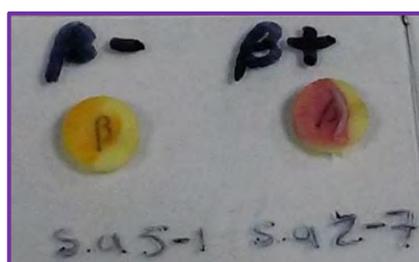


Figura 18. Prueba para la detección de  $\beta$ -lactamasas empleando el disco de Cefinase®, en las cepas problema. De izquierda a derecha S.a 5-1  $\beta$ -lactamasa (-) en color amarillo, S.a 2-7  $\beta$ -lactamasa (+) en color rojo.

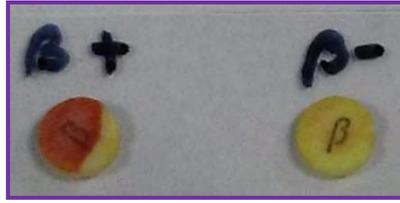


Figura 19. Control de calidad para la prueba de detección de  $\beta$ -lactamasas empleando el disco de Cefinase<sup>®</sup>. De izquierda a derecha: Control positivo *S.aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213  $\beta$ -lactamasa (+) en color rojo, Control negativo *S.aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923  $\beta$ -lactamasa (-) en color amarillo.

Los resultados finales de cepas de *S. aureus* productoras de  $\beta$ -lactamasas y MRSA se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12. Resumen de resultados de cepas de *S.aureus* productoras de  $\beta$ -lactamasas y MRSA.**

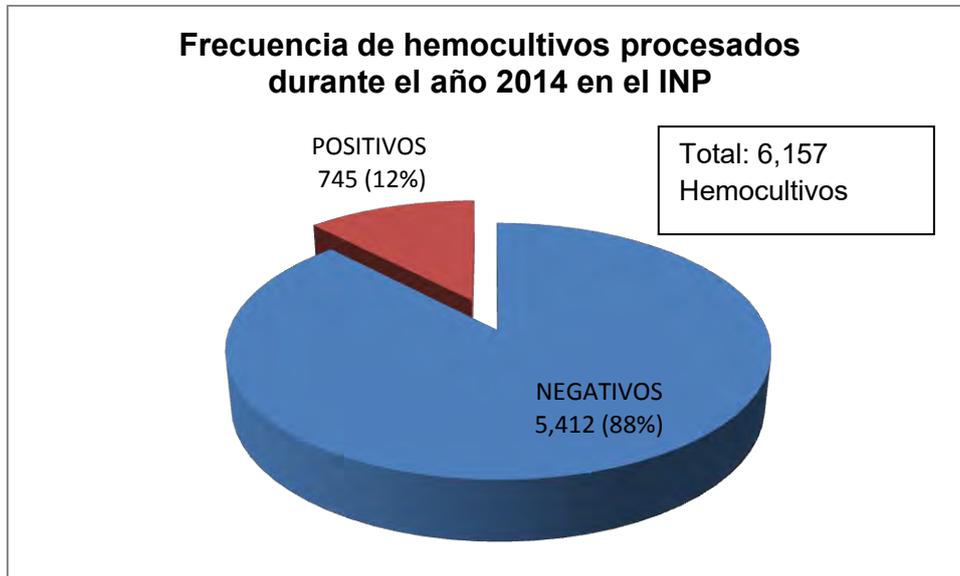
Método	Mecanismo de resistencia			Interpretación	Resultado
	Resistencia a oxacilina mediada por el gen <i>mecA</i>	$\beta$ -lactamasas			
		Difusión en agar con disco de Cefoxitina 30 $\mu$ g	Prueba del borde de zona de penicilina		
MRSA n=68	POSITIVOS 68	POSITIVOS 68	POSITIVOS 68	Oxacilina resistente, $\beta$ -lactamasa positivo = resistente a penicilina	Cuando se presenta resistente a oxacilina significa que es resistente a todos los antibióticos $\beta$ -lactámicos, penicilinas, cefalosporinas, combinaciones con inhibidores de $\beta$ -lactamasas, monobactams y carbapenems, excepto aquellos con actividad anti – MRSA.
		NEGATIVOS 0	NEGATIVOS 0		
MSSA n=175	NEGATIVOS 175	POSITIVOS 164	POSITIVOS 164	Oxacilina sensible, $\beta$ -lactamasa positivo = resistente a penicilina	Los Estafilococos $\beta$ -lactamasa positivo son resistentes a penicilina, amino-, carboxi, y ureidopenicilinas
		NEGATIVOS 11	NEGATIVOS 11	Oxacilina sensible, $\beta$ -lactamasa negativo= sensible a penicilina	Los Estafilococos $\beta$ -lactamasa negativo son sensibles a penicilina, amino-, carboxi, y ureidopenicilinas

Las 68 cepas MRSA todas presentan la resistencia a oxacilina mediada por el gen *mecA*, todas estas cepas resultaron  $\beta$ -lactamasa positivas.

De las 175 cepas MSSA sensibles a oxacilina (*mecA* negativo), 164 cepas (94%) fueron  $\beta$ -lactamasa positivas y 11 (6%) fueron  $\beta$ -lactamasa negativas.

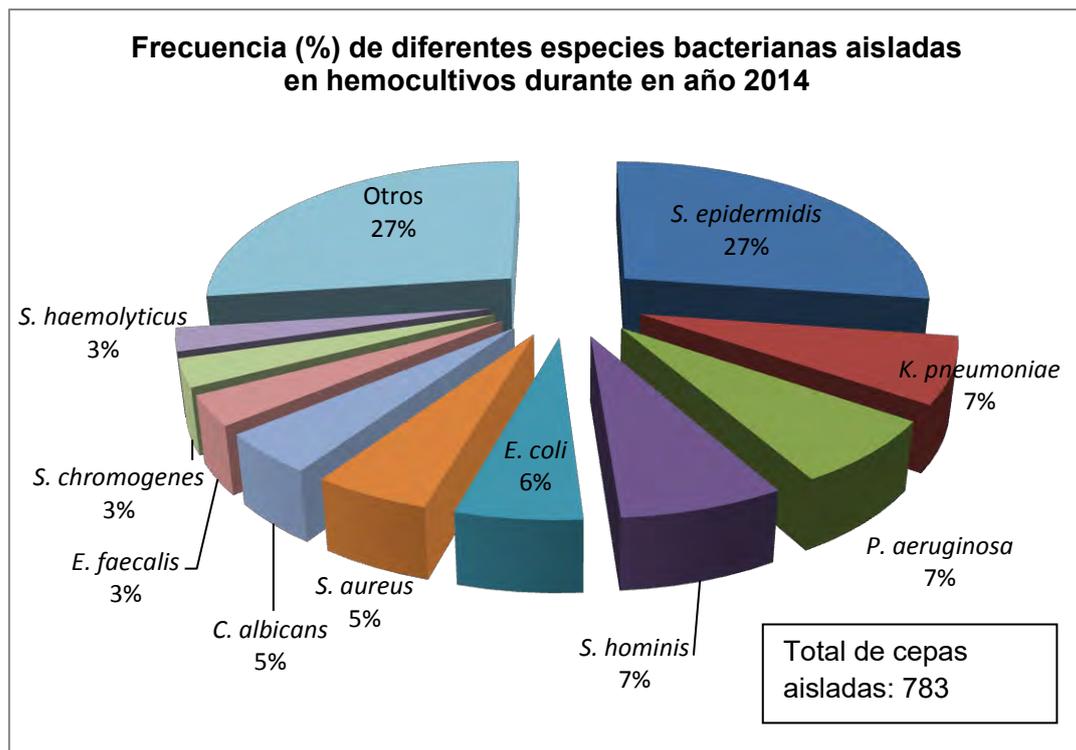
## ❖ HEMOCULTIVOS

El total de los hemocultivos trabajados fueron 6,157, de los cuales 745 (12%) resultaron con aislamiento positivo, mientras que las muestras sin desarrollo (Negativos) fueron 5,412 (88%) (Gráfica 7).



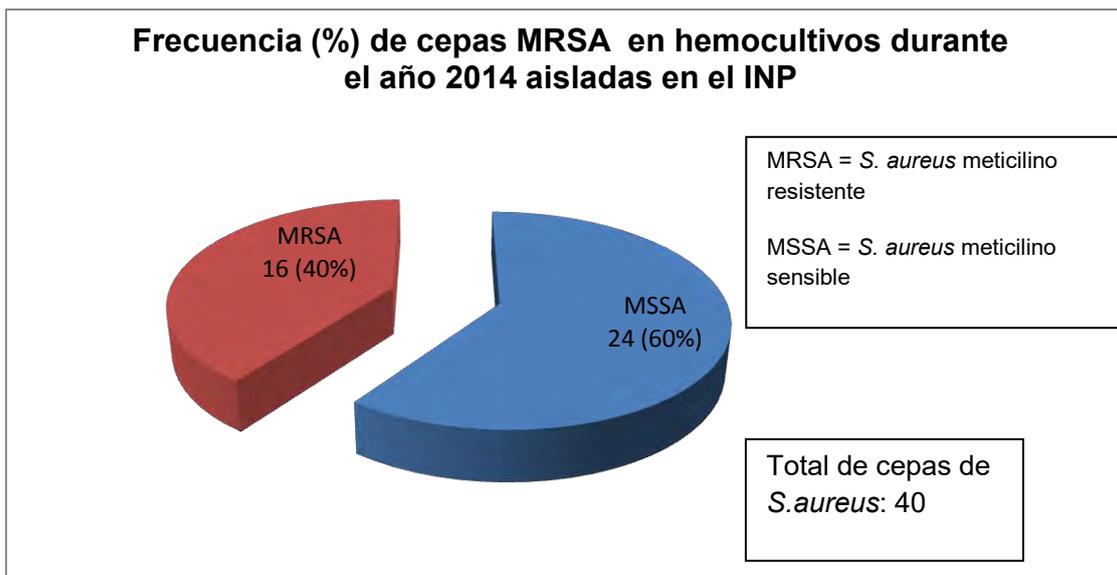
Grafica 7. Frecuencia de hemocultivos para el año 2014, durante el cual se analizaron un total de 6,157 hemocultivos, obteniéndose un 12% de aislamientos positivos.

De los 745 hemocultivos con aislamientos positivos, se lograron aislar un total de 783 cepas de diferentes especies, de las cuales 40 (5%) resultaron ser *S. aureus* y el resto (743) perteneció a otras bacterias (Gráfica 8).



**Grafica 8.** Frecuencia de aislamiento de diferentes especies bacterianas aisladas de hemocultivos durante el año 2014 en el INP. Se observa el porcentaje de aislamiento de *S. aureus* del 5% (40 cepas), en comparación con otras bacterias aisladas, encontrándose la mayor frecuencia para *S. epidermidis* 27%, *K. pneumoniae*, 7%, *P. aeruginosa* 7%, *S. hominis* 7%, *E. coli* 5%, *C. albicans* 4%, *E. faecalis* 3%, *S. chromogenes* 3%, *S. haemolyticus* 3%, y Otros 27% (*S. maltophilia* 2,3%, *S. entérica* 2,2%, *E. faecium* 2,2%, *E. cloacae* 1,7%, *B. cepacia* 1,5%, *S. saprophyticus* 1,1%, *S. pneumoniae* 1,0%, *S. capitis* 1,0%, *K. oxytoca* 1,0%, *C. krusei* 0,8%, *M. morgani* 0,8%, *S. hyicus* 0,6%, *S. caprae* 0,6%, *S. mitis* 0,6%, *S. warneri* 0,6%, *A. lwoffii* 0,5%, *O. anthropi* 0,5%, *S. marcescens* 0,5%, *S. spiritivorum* 0,5%, *S. salivarius* 0,5%, *N. elongata* 0,4%, *S. intermedius* 0,4%, *B. licheniformis* 0,4%, *A. baumannii* 0,4%, *S. agalactiae* 0,4%, *E. aerogenes* 0,4%, *M. luteus* 0,4%, *S. parasanguinis* 0,4%, *A. xylosoxidans* 0,3%, *C. lusitanae* 0,3%, *H. influenzae* 0,3%, *P. orizahabitans* 0,3%, *B. abortus* 0,3%, *N. subflava* 0,1%, *A. caviae* 0,1%, *R. dentocariosa* 0,1%, *P. putida* 0,1%, *S. xylosoxidans* 0,1%, *K. sedentarius* 0,1%, *P. pseudoalcaligenes* 0,1%, *S. pyogenes* 0,1%, *A. otitidis* 0,1%, *P. mirabilis* 0,1%, *C. afermentans* 0,1%, *C. matrochutii* 0,1%, *S. typhi* 0,1%, *S. constellatus* 0,1%, *L. aquatica* 0,1%, *S. paucimobilis* 0,1%).

De las 40 cepas de *S. aureus* aisladas de hemocultivos, el 40% (16 cepas) resultaron positivas para *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), mientras que el 60% restante (24 cepas) son *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina (MSSA) (Gráfica 9).

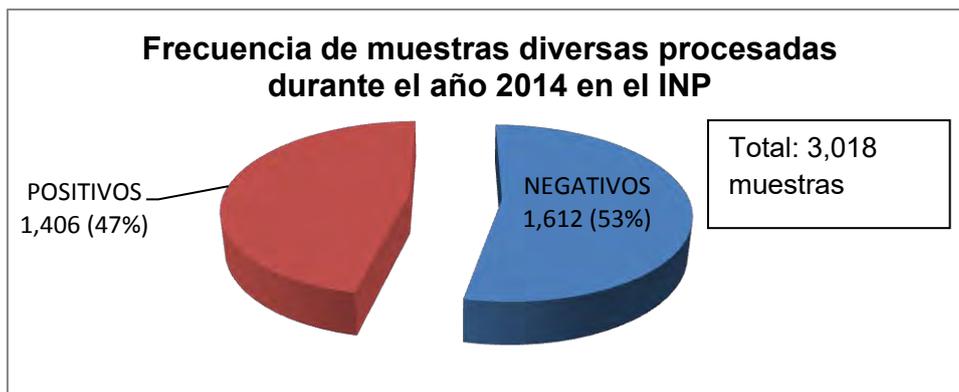


**Grafica 9.** Frecuencia de aislamientos en hemocultivos de cepas MRSA de 40% (16 cepas de un total de 40) en el año 2014.

### ❖ DIVERSOS

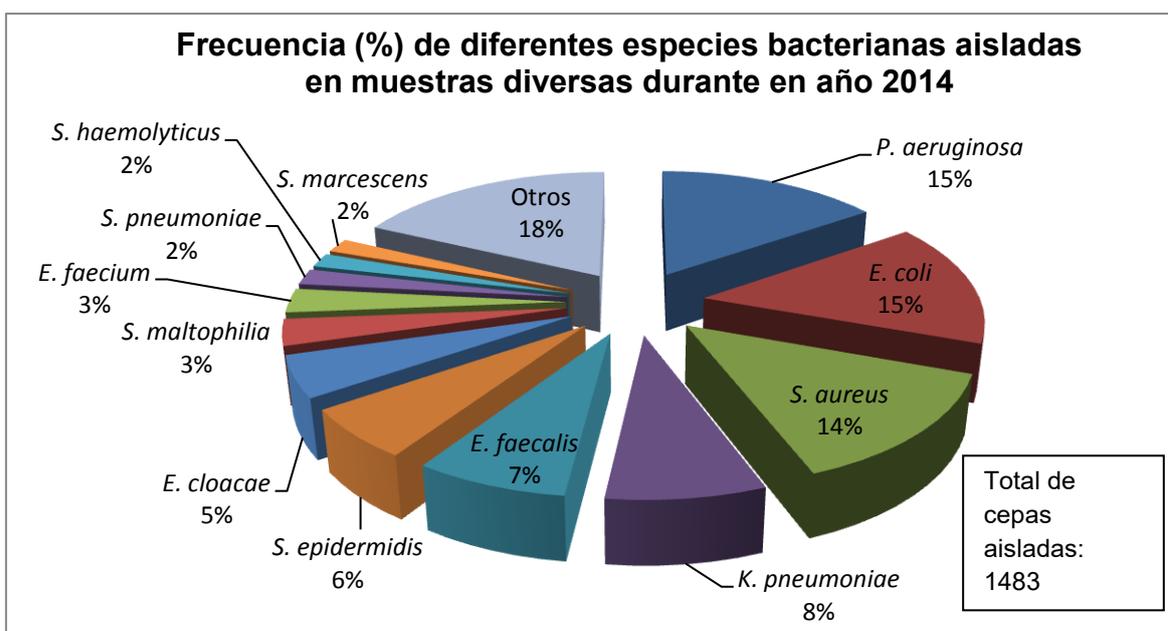
Se trabajó con 3,018 cultivos de muestras diversas: Aspirado bronquial, Secreción de herida quirúrgica, Aspirado traqueal, Aspirado nasofaríngeo (ANF), Líquido cefalorraquídeo (LCR), Biopsia de hueso, Líquidos estériles (peritoneal, articular, pleural), Secreción de piel, Absceso, Catéter, Secreción de dispositivo, Exudado ocular, Exudado vaginal, Secreción de nariz, Exudado ótico, Secreción de tejido.

Del total de muestras (3,018) resultaron 1,406 con aislamiento positivo (47%), mientras que las muestras sin desarrollo (Negativos) fueron 1,612 (53%) (Gráfica 10).



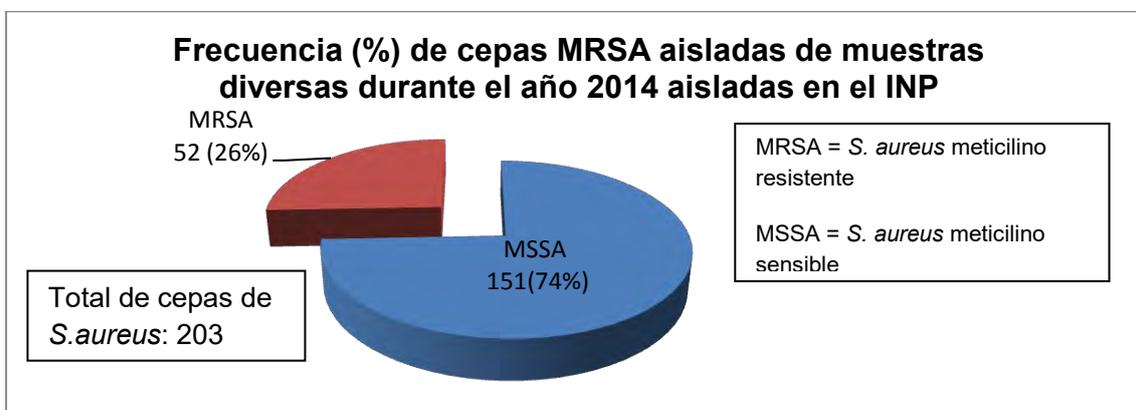
Grafica 10. Frecuencia de muestras diversas para el año 2014, durante el cual se analizaron un total de 3,018 muestras, obteniéndose un 47% de muestras con aislamientos positivos y un 53% de muestras negativas.

De 1,406 muestras diversas con aislamientos positivos, se lograron aislar un total de 1,483 cepas de diferentes especies, de las cuales 203 (14%) son de *S. aureus* y el resto 1280 (86%) pertenecen a otras bacterias. (Grafica 11)



Grafica 11. Frecuencia (%) de diferentes especies bacterianas aisladas en muestras diversas durante el año 2014 en el INP. Se observa la frecuencia de aislamiento de *S. aureus* del 14% (203 cepas), en comparación con otras bacterias aisladas, encontrándose la mayor frecuencia para *P. aeruginosa* 15%, *E. coli* 15%, *K. pneumoniae* 8%, *E. faecalis* 7%, *S. epidermidis* 6%, *E. cloacae* 5%, *S. maltophilia* 3%, *E. faecium* 3%, *S. pneumoniae* 2%, *S. haemolyticus* 2%, *S. marcescens* 2%, y Otros 18% (*Levaduras* 1,7%, *B. cepacia* 1,4%, *K. oxytoca* 1,3%, *P. mirabilis* 1,0%, *S. hominis* 0,9%, *A. lwoffii* 0,9%, *E. aerogenes* 0,8%, *A. baumannii* 0,7%, *P. agglomerans* 0,7%, *M. morgani* 0,6%, *S. agalactiae* 0,6%, *P. putida* 0,6%, *C. freundii* 0,5%, *S. saprophyticus* 0,5%, *K. ascorbata* 0,5%, *M. catarrhalis* 0,5%, *B. cereus* 0,4%, *S. pyogenes* 0,3%, *A. faecalis* 0,3%, *S. warneri* 0,3%, *C. pseudodifericum* 0,3%, *S. salivarius* 0,2%, *P. fluorescens* 0,2%, *S. acidominimus* 0,2%, *S. chromogenes* 0,1%, *S. capitis* 0,1%, *S. hyicus* 0,1%, *S. mitis* 0,1%, *S. oralis* 0,1%, *S. parasanguinis* 0,1%, *C. indologenes* 0,1%, *S. constellatus* 0,1%, *P. vulgaris* 0,1%, *H. parainfluenzae* 0,1%, *S. entérica* 0,1%, *N. elongata* 0,1%, *A. xylosoindans* 0,1%, *S. cristatus* 0,1%, *H. influenzae* 0,1%, *A. caviae* 0,1%, *S. boydii* 0,1%, *P. rettgeri* 0,1%, *A. veronii* 0,1%, *E. casseliflavus* 0,1%, *H. parahaemolyticus* 0,1%, *S. sonnei* 0,1%, *H. haemolyticus* 0,1%).

De las 203 cepas de *S. aureus* aisladas de muestras diversas, el 26% (52 cepas) resultaron MRSA, mientras el 74% restante (151 cepas) son MSSA (Gráfica 12).



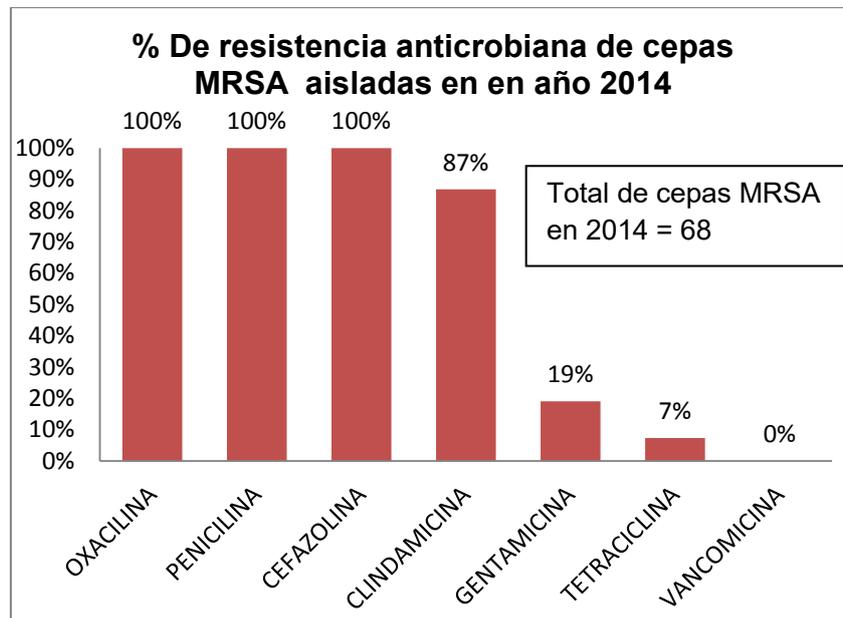
Gráfica 12. Frecuencia de aislamientos en muestras diversas de cepas MRSA de 26% (52 cepas de un total de 203) en el INP durante el año 2014.

La frecuencia de cepas MRSA aisladas por cada tipo de muestra se presenta a continuación (Tabla 13).

Tabla 13. Incidencia de cepas MRSA aisladas por cada tipo de muestra en el INP durante el año 2014

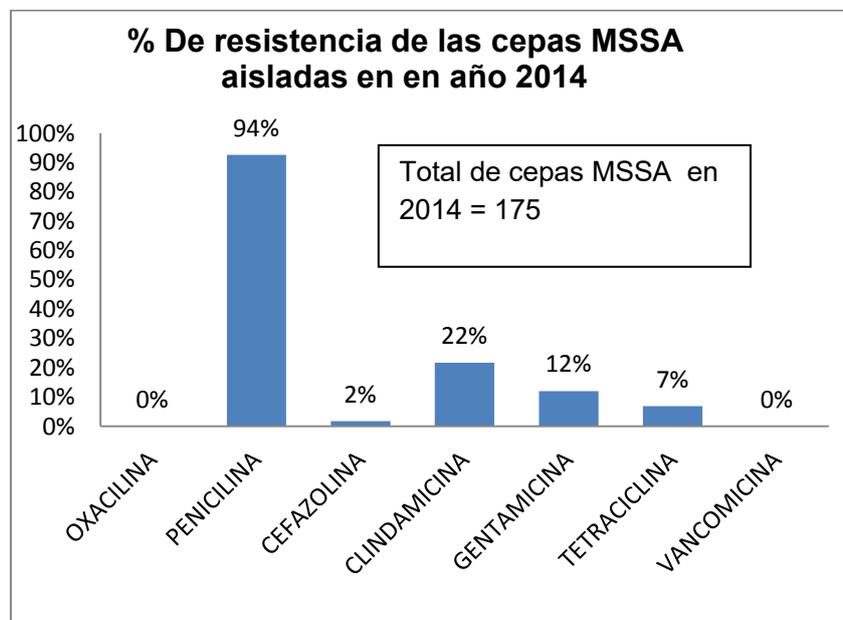
TIPO DE MUESTRA	<i>S. aureus</i> No de cepas	MRSA Número	MRSA %	TIPO DE PACIENTE			
				Internos Número	Internos %	Externos Número	Externos %
Aspirado bronquial	49	11	22	11	100	0	0
Secreción de herida quirúrgica	29	10	34	9	90	1	10
Aspirado traqueal	12	7	58	7	100	0	0
Aspirado nasofaríngeo (ANF)	42	4	10	0	0	4	100
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	6	4	67	4	100	0	0
Biopsia de hueso	3	3	100	3	100	0	0
Líquidos estériles (peritoneal, pleural, articular)	7	3	43	3	100	0	0
Secreción de Piel	10	3	30	3	100	0	0
Absceso	19	2	11	2	100	0	0
Catéter	6	2	33	2	100	0	0
Secreción de dispositivo	5	2	40	2	100	0	0
Exudado ocular	3	1	33	1	100	0	0

- Perfil de resistencia de las cepas MRSA. Se tomó del antibiograma proporcionado por el equipo automatizado BD Phoenix 100® (Grafica 13).



Grafica 13. Porcentaje de resistencia de cepas MRSA a diferentes antimicrobianos aisladas durante el año 2014 en el INP. Muestra la resistencia de MRSA a los diferentes antibióticos: Oxacilina (100%), Penicilina (100%), Cefazolina (100%), Clindamicina (87%), Gentamicina (19%), Tetraciclina (7%), Vancomicina (0%).

- Perfil de resistencia de las cepas de MSSA. Se tomó del antibiograma proporcionado por el equipo automatizado BD Phoenix 100® (Grafica 14).



Grafica 14. Porcentaje de resistencia de cepas MSSA a diferentes antimicrobianos aisladas durante el año 2014 en el INP. Muestra la resistencia de MSSA a los diferentes antibióticos: Oxacilina (0%), Penicilina (93%), Cefazolina (2%), Clindamicina (22%), Gentamicina (12%), Tetraciclina (7%), Vancomicina (0%).

## 12) ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el año 2014 se trabajaron un total de 9,175 muestras que incluyeron hemocultivos y cultivos de muestras diversas, de las cuales 2,151 presentaron aislamientos positivos obteniéndose 2,266 especies bacterianas correspondiente al 23%, coincidiendo con lo reportado por otro estudio de un hospital infantil de tercer nivel el cual reporta 28.32% de positividad.<sup>28</sup>

De las 2,266 cepas aisladas se obtuvieron 243 (11%) cepas de *S. aureus*, de los cuales el 28 % (68 cepas) fueron MRSA. De acuerdo al trabajo de Borrás-Ordaz, la mayoría de los países reportan al MRSA entre 25-60% del total de cepas aisladas de *S. aureus*, aunque este porcentaje puede ser mayor en las Unidades de Cuidados Intensivos, donde pudieran llegar a 70% o 80%.<sup>29</sup> En la Unidad de Terapia Intensiva del INP nosotros encontramos 58% de aislamientos MRSA.

El 24% de las cepas MRSA pertenecieron a los hemocultivos, y el 76% restante se aislaron de cultivos de muestras diversas, mientras que Mederos Hernández encontró el 14% de cepas MRSA aisladas de hemocultivos y el resto para heridas, y secreciones incluidas las traqueo-bronquiales (86%).<sup>24</sup>

En el estudio se encontró que el 93% correspondieron a pacientes hospitalizados (internos) y el 7% restante a pacientes externos, parecido a lo reportado por Martínez-Aguilar (82.4% de origen nosocomial y 17.6% comunitarias).<sup>30</sup>

El servicio de Urgencias presentó el mayor porcentaje de cepas aisladas MRSA con 15% del total de cepas (10/68) en todos los servicios. En este servicio se presentó el 33% de cepas MRSA del total de *S.aureus* aislados, siendo un porcentaje superior a lo reportado por Barrios-López del 10,4% para el mismo servicio.<sup>31</sup>

En el servicio de Neumología obtuvimos el mayor aislamiento de *S. aureus* con 61 cepas, en donde el 11% de estas fueron MRSA, en estas últimas, los aislamientos pertenecieron a pacientes con Fibrosis Quística, estos datos coinciden con lo reportado por Muhlebach y colaboradores del Registro anual

de pacientes de Cystic Fibrosis Foundation (CFF) en donde se reporta del 2% al 21.3% para estos pacientes.<sup>32</sup>

El total de cepas MRSA aisladas de hemocultivos fue del 40% (16/40), lo que es similar a lo reportado por Bishara y colaboradores, del 42,8%.<sup>33</sup> Hakim y colaboradores, reportan solo el 33,3% de cepas MRSA para este tipo de muestras.<sup>34</sup>

Los aspirados bronquiales fueron el tipo de muestra diversa de donde se aislaron la mayoría de las cepas MRSA (11/68), individualmente se obtuvo un aislamiento del 22% (11/49), que resulta menor a lo que reporta Lee y colaboradores del 28%.<sup>35</sup>

Las cepas de MRSA son prácticamente resistentes a todos los  $\beta$ -lactámicos, siendo del 100% para oxacilina, penicilina y cefazolina, además de presentar altos porcentajes de resistencia a otros grupos de antibióticos, similar a lo reportado por López-Martínez y colaboradores (100% resistente a oxacilina y 97% a penicilina).<sup>28</sup>

Las cepas MSSA a pesar de ser sensibles a oxacilina (*mecA* negativas), pueden presentar otros mecanismos de resistencia a los antibióticos, en nuestro caso el 94% (164 cepas) presentaron resistencia a penicilina por la producción de  $\beta$ -lactamasas, mientras que el 6% (11 cepas) no presentaron este mecanismo y fueron sensibles a penicilina. López-Martínez reporta un 92% de resistencia a penicilina para las cepas MSSA.<sup>28</sup>

### 13) DISCUSIÓN

La resistencia a múltiples antibióticos especialmente en infecciones nosocomiales es un problema de salud mundial. *Staphylococcus aureus* es un microorganismo que ha mostrado un aumento en la resistencia a los antibióticos de uso frecuente en infecciones nosocomiales.

En el INP que es un hospital de tercer nivel, que atiende en su mayoría a pacientes con patologías de alta complejidad, las prolongadas estadías en el nosocomio, el uso de antibióticos por periodos prolongados y el uso de dispositivos intravasculares, son factores de riesgo para adquirir infecciones nosocomiales causadas por MRSA.

El aumento en la incidencia de las cepas MRSA es un problema de salud pública que se viene incrementando rápidamente, esto es debido a que prácticamente es resistente a todos los  $\beta$ -lactámicos.

La resistencia a la meticilina está dada por la producción de una proteína de membrana alterada estructuralmente (PBP2a), mediada por el gen *mecA*, indispensable para la acción del  $\beta$ -lactámico, y que determina la pérdida de susceptibilidad no solo a meticilina, sino también la totalidad de los  $\beta$ -lactámicos (cefalosporinas, carbapenémicos, incluso a la combinación de  $\beta$ -lactámico/inhibidor de  $\beta$ -lactamasas).

Estos patrones de resistencia limitan las opciones terapéuticas contra las infecciones de MRSA siendo la vancomicina una de las últimas opciones terapéuticas.

En nuestros resultados se obtiene un 28% de aislamiento de cepas MRSA durante el año 2014, lo que resulta ser de un alto porcentaje y que además coincide con los reportes internacionales. En México, algunos estudios mostrados por Velázquez- Meza señalan un porcentaje de resistencia a meticilina del 24.1%.<sup>21</sup>

Es importante prestar atención a las áreas de hospitalización en donde se obtuvieron la mayoría de los aislamientos de MRSA, para poder plantear

estrategias para su control y evitar su diseminación; en este caso Urgencias y Terapia Intensiva, la última siendo considerada un área crítica donde los pacientes se encuentran sometidos a múltiples procedimientos y tratamientos antimicrobianos, de esta manera los pacientes tienen el riesgo de ser colonizados por microorganismos multirresistentes.

Para la detección de cepas MRSA se debe investigar la resistencia a oxacilina, para lo cual se emplean los procedimientos del manual M100-S26 del CLSI: las pruebas de microdilución para oxacilina o por el método de difusión en agar con discos de cefoxitina de 30µg y llevando a cabo los controles de calidad establecidos con las cepas de referencia (*S.aureus* ATCC® 25923 y *S.aureus* ATCC® 43300).<sup>3</sup>

Si la cepa de *S. aureus* resulta resistente a oxacilina se debe reportar resistente a oxacilina, por otro lado con el método de difusión en agar con disco si resulta resistente a cefoxitina se debe de reportar resistente a oxacilina.

Una vez que se detecta una cepa MRSA se debe reportar resistencia a todos los β-lactámicos y comunicarlo enseguida al médico.

Los resultados que emite el laboratorio deben ser confiables y oportunos, para que el médico pueda corregir o confirmar el tratamiento antimicrobiano, proporcionando la mejor alternativa al paciente.

## 14) CONCLUSIONES

- 1- De los 2,266 aislamientos positivos para diferentes bacterias, 243 (11%) pertenecieron a *S. aureus*.
- 2- De las 243 cepas de *S. aureus* identificadas, el 28 % (68 cepas) fueron MRSA.
- 3- El 24% de las cepas MRSA pertenecieron a los hemocultivos, y el 76% restante se aislaron de cultivos de muestras diversas.
- 4- 232 de las 243 cepas de *S.aureus* aisladas (95%) son productoras de  $\beta$ -lactamasas.
- 5- El 94% (164 cepas) de las cepas MSSA presentaron resistencia a penicilina por la producción de  $\beta$ -lactamasas, mientras que el 6% (11 cepas) no presentaron este mecanismo y fueron sensibles a penicilina.
- 6- Las cepas de MRSA son prácticamente resistentes a todos los  $\beta$ -lactámicos, siendo del 100% para oxacilina, penicilina y cefazolina, además de presentar altos porcentajes de resistencia a otros grupos de antibióticos.

# **III. ANEXOS**

❖ **Pruebas bioquímicas y antibióticos empleados en las placas del sistema BD Phoenix ®100.<sup>25</sup>**

Se utilizan tres tipos de placas para la identificación de los microorganismos. Cada una de ellas contiene diferentes pruebas bioquímicas y antibióticos, y son empleadas dependiendo del tipo de microorganismo a identificar.

- Placas para identificación de Gram negativos

**Tabla 14. Pruebas bioquímicas empleadas en las placas del equipo BD Phoenix® 100 para identificación de microorganismos Gram negativos.**

Nombre del sustrato	Nombre del sustrato	Nombre del sustrato
Acetato	D-galactosa	L-prolina
Ácido alfa-cetoglutarico	D-manitol	L-rammnosa
acido D- gluconico	D-melobiosa	L-triptófano
Acido galacturonico	Esculina	Malonato
acido L-glutámico	Glicina	Maltulosa
ácido L-piroglutámico	Glicina-prolina	N-acetil galactosamina
Acido tiglico	Glutaril-glicina-arginina	N-acetil glucosamina
Adonitol	L-arabinosa	N-acetil-glucosaminida
Beta-alosa	L-arginina	Ornitina
Beta-gentobiosa	L-fenilalanina	Sorbitol
Citrato	Lisina-alanina	Sucrosa
Dextrosa	L-leucina	Urea
D-fructosa	L-prolina	

**Tabla 15. Antibióticos empleados en las placas del equipo BD Phoenix® 100 para la sensibilidad de microorganismos Gram negativos.**

<b>Antibiótico</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Antibiótico</b>
Ácido nalidíxico	Cefpodoxima	Meropenem
Amikacina	Cefsulonida	Moxifloxacino
Amoxicilina	Ceftazidima	Netilmicina
Amoxicilina/Clavunato	Ceftibuten	Nitrofurantoína
Ampicilina	Ceftizoxima	Norfloxacino
Ampicilina/Sulbactam	Ceftriaxona	Ofloxacino
Aztreonam	Cefuroxima	Pefloxacino
Cafalotina	Ciprofloxacino	Piperacilina
Cefalexina	Cloranfenicol	Piperacilina/Tazobactam
Cefazolina	Colistina	Tetraciclina
Cefdinir	Gatifloxacina	Ticarcilina
Cefepime	Gentamicina	Ticarcilina/Clavunato
Cefetamet	Grapfloxacino	Tobramacina
Cefmetazol	Imipenem	Trimetropim/Sulfametoxazol
Cefotaxima	Isepamicina	Trimetroprima
Cefotetan	Kanamicina	Trovafloxacino
Cefoxitina	Levofloxacino	
Cefpiroma	Lomefloxacino	

- Placas para identificación de Gram positivos

**Tabla 16. Pruebas bioquímicas empleadas en las placas del equipo BD Phoenix<sup>®</sup> 100 para identificación de microorganismos Gram positivos.**

Nombre del sustrato	Nombre del sustrato	Nombre del sustrato
Ácido 3-metil adipico	D-manitol	L-prolina
Acido 3-metil glutarico	D-sucrosa	L-prolina
Ácido alfa-cetoglutarico	D-trehalosa	L-triptófano
Acido D-gluconico	Esculina	Maltosa
Acido iminodiacético	Glicina-prolina	Maltotriosa
Ácido L- piroglutámico	L-alanina	Metionina
Alanina-alanina	L-arginina	N-acetil glucosamina
Arginina-arginina	L-fenilalanina	Timidina
Beta-gentiobiosa	L-histidina	Urea
Dextrosa	L-iso-leucina	Valina-alanina
D-fructosa	L-leucina	Nitrocefina

**Tabla 17. Antibióticos empleados en las placas del equipo BD Phoenix<sup>®</sup> 100 para la sensibilidad de microorganismos Gram positivos.**

Antibiótico	Antibiótico	Antibiótico
Amikacina	Ceftriaxona	Oxacilina
Amoxicilina	Cefuroxima	Pefloxacino
Amoxicilina/Clavunato	Ciprofloxacino	Penicilina
Ampicilina	Claritromicina	Piperacilina
Ampicilina/Sulbactama	Clindamicina	Piperacilina/Tazobactam
Azitromicina	Eritromicina	Pristinamicina
Cefaclor	Gatifloxacina	Quinupristin/Dalfopristin
Cefalexina	Gentamicina	Rifampina
Cefalotina	Grapafloxacino	Sinergia con Estreptomina
Cefazolina	Imipenem	Sinergia con Gentamicina
Cefdinir	Kanamicina	teicoplanina
Cefepima	Levofloxacino	Tetraciclina
Cefmetazol	Lincomicina	Ticarcilina
Cefoperazona	Linezolid	Ticarcilina/Clavunato
Cefotaxima	Lomefloxacino	Tobramicina
Cefotetan	Meropenem	Trimetropim/Sulfametoxazol

Cefoxitina	Moxifloxacino	Trimetroprima
Cefpiroma	Netilmicina	Trovafloxacino
Cefpodoxima	Nitrofurantoína	Vancomicina
Ceftazidima	Norfloxacino	
Ceftizoxima	Ofloxacino	

- Placas para identificación de *Streptococcus*.

**Tabla 18. Pruebas bioquímicas empleadas en las placas del equipo BD Phoenix<sup>®</sup> 100 para identificación de *Streptococcus*.**

Nombre del sustrato	Nombre del sustrato	Nombre del sustrato
Ácido L-piroglutámico	D-rafinosa	L-lisina
Alanina	D-sorbitol	L-triptofano
Alanina-alanina	D-trehalosa	L-valina
Amigdalina	D-trehalosa	N-acetil-glucosamina
Arginina-arginina	Esculina	Salicina
Asparagina	Isoleucina	Serina-tirosina
Dextrina	L-arginina	Timidina
D-galactosa	L-histidina	Valina-alanina
D-lactosa	Lisina	
D-manitol	Lisina-alanina	

**Tabla 19. Antibióticos empleados en las placas del equipo BD Phoenix<sup>®</sup> 100 para la sensibilidad de *Streptococcus*.**

Antibiótico	Antibiótico	Antibiótico
Amoxicilina	Eritromicina	Penicilina
Amoxicilina/Clavunato	Ertapenem	Pristinamicina
Ampicilina	Garenoxacina	Quinupristin/Dalfopristin
Cefepima	Gatifloxacina	Sinergia con Estreptomina
Cefotaxima	Gemifloxacina	Sinergia con Gentamicina
Ceftriaxona	Imipenem	Sinergia con Kanamicina
Cefuroxima	Levofloxacino	Teicoplanina
Claritromicina	Linezolid	Telitromicina
Clindamicina	Meropenem	Tetraciclina
Cloranfenicol	Moxifloxacino	Trimetropim/Sulfametoxazol
Daptomicina	Ofloxacino	Vancomicina

## ➤ REFERENCIAS

- 1) **Bustos J, Hadman A, Gutiérrez M.** *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad- Rev Biomed. 2006;17:287-305
- 2) **Sandrea Toledo, Lisette Beatriz, et al.** 2012. Determinación de la Resistencia a meticilina y eritromicina de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en un hospital del estado de Zulia, Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología 2012; 32:88-94.
- 3) **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty sixth edition informational supplement. M100-S26. Wayne (PA), USA: 2016.
- 4) **Cervantes-García, Estrella; García-Gonzalez, Rafael; Salazar-Schettino, Paz María,** Características generales de *Staphylococcus aureus*, Rev Latinoam Patol Clin Med Lab 2014, 61(1):28-40.
- 5) **Murray, Patric R.; Rosenthal, Ken S; Pfaller, Michael A;** Microbiología Médica, 6th edición, Elsevier España, S.L., 2009.
- 6) **Garza-Velasco R.,** Bacterias Patógenas Parte III, Universidad Nacional Autónoma de México, 2da edición, 2003.
- 7) **Fostere, Timothy.** Medical Microbiology, 4th Edition, Chapter 12 *Staphylococcus*, University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Consultado en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/> el 22 de Junio del 2015.
- 8) **Murray, Patric R, Ellen Jo Baron,** Manual of Clinical Microbiology. 9<sup>th</sup> edition, ASM Press, 2007.
- 9) **Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T.,** The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Trends Microbiol 2001; 9:486-93.
- 10) **Dinges MM, Orwen PM, Schlievet PM.** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 2000; 13: 16-34.
- 11) **Garza-Velasco, Raúl,** Manual de bacteriología experimental, Universidad Nacional Autónoma de México, Primera edición, 2011.

- 12) **García-C, Patricia**, Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in vitro, Rev Chil Infect (2002); 19 (Supl. 2): S 96-100.
- 13) **Babel, Brita S., Decker, Catherine F.**, Microbiology and Laboratory Diagnosis of MRSA en Disease-a-Month Volume 54, Issue 12, MRSA: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Pages 769-773 (December 2008).
- 14) **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty second edition informational supplement. M100-S22. Wayne (PA), USA: 2012
- 15) **Courvalain, Patricia., Ledercq, Roland., Rice, Louis B.**, Anibiogram, ESKA publishing, ASM Press, 2010. Chapter 10.  $\beta$ -lactams and Staphylococci.
- 16) **Instrucciones de uso BD BBL<sup>®</sup> CHROMagar<sup>®</sup> Staph aureus / BBL<sup>™</sup> CHROMagar<sup>™</sup> MRSA II**. Abril del 2015. Consultado en <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=32514> el 15 de Octubre del 2015.
- 17) **C.Wendt, N. L. Havill, K. C. Chapin, et al**, Evaluation of a New Selective Medium, BD BBL CHROMagar MRSA II, for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Different Specimenes, Journal of Clinical Microbiology, June 2010, p. 2223-2227.
- 18) **Xpert<sup>®</sup> MRSA/SA SSTI**. 300-5440S Rev. J, April 2012.
- 19) **Johnson, Mark D., Decker, Catherine F.**, Antimicrobial Agents in Treatment of MRSA Infections en Disease-a-Month Volume 54, Issue 12, MRSA: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Pages 793-800 (December 2008).
- 20) **Zurita J, Mejía C, Guzmán-Blanco M**. Diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. Braz J Infect Dis. 2010;14(Suppl 2):S97-S106.
- 21) **Velázquez-Meza ME**. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* metilinoresistente. Salud Pública Méx 2005; 47:381-7.
- 22) **Projan Steven J, Ruzin Alexey**. Chapter Antibiotic Resistance in the Staphylococci, in Gram-Positive Pathogens, 2<sup>nd</sup> edition, ASM Press, 2006. Chapter 10.  $\beta$ -lactams and Staphylococci.

- 23) Garza-Velasco R.**, Bacterias Patógenas Parte V, Universidad Nacional Autónoma de México, 1ra edición, 2007.
- 24) Mederos-Hernández, Jorge, Morejón-García, Moisés**, Frecuencia de aislamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el Hospital “Manuel Fajardo Rivero”. Revista Habanera de Ciencias Médicas 2014;13(3):406-416.
- 25) BD BACTEC® FX Manual del usuario del sistema**, Becton Dickinson and Company.
- 26) BD PHOENIX® Manual del usuario del sistema**. Becton Dickinson and Company, 20013/11.
- 27) BD BBL Paper Discs for the Detection of  $\beta$ -Lactamase Enzymes**. Cefinase® Discs.
- 28) López-Martínez, Briceida; Alcázar-López, Virginia; et al.**, Vigilancia institucional de la susceptibilidad antimicrobiana en patógenos de interés clínico Bol Med Hosp Infant Mex 2013;70(3):222-229
- 29) Borraz C.** Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles [Tesis Doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2006.
- 30) Martínez-Aguilar, Gerardo.** Análisis de genotipos y de los tiempos de duplicación de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina aisladas de infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad. Tesis para Obtener el grado de Doctor en Ciencias Medicas, Universidad de Colima, Colima 2010.
- 31) Barrios-López, Marta**, Características epidemiológicas, clínicas y microbiológicas de las infecciones por *Staphylococcus aureus* adquirido en la comunidad en pediatría, Memoria para optar al Grado de Doctor, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 2012.
- 32) Muhlebach, Marianne S. , Miller, Meredith, et al.**, Treatment intensity and characteristics of MRSA infection in CF, Journal of Cystic Fibrosis 10 (2011) 201–206
- 33) Bishara J, Goldberg E, Leibovic L, et al.**, Healthcare-associated vs hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. Int J Infect Dis 16:e457-e463. 2012.

- 34)Hakim, Hana, Mylotte Joseph M.,** Morbidity and mortality of Staphylococcal bacteremia in children. Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. doi:10.1016/j.ajic.2006.09.016
- 35)Lee MS, walker v, et al.,** The epidemiology of ventilator-associated pneumonia in a network of community hospitals: a prospective multicenter study. Infect Control Hops Epidemiol 34:657-662. 2013.