

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS



“Caracterización fenotípica y molecular de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a drogas tomadas de pacientes que acudieron al Hospital Escuela y al Instituto Hondureño de Seguridad Social en el período de octubre del 2010 a enero del 2011”

TESIS SUSTENTADA POR:

Lilian Elisa Sosa Díaz

**PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS**

TEGUCIGALPA M.D.C. 29 de agosto del 2012

HONDURAS C.A.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

RECTORA
LIC. JULIETA CASTELLANOS

VICERRECTORA ACADÉMICA
RUTILIA CALDERON, PhD.

DIRECTORA DEL SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
OLGA MARINA JOYA, PhD.

DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
MIRNA MARÍN, PhD.

COORDINADORA DEL POSTGRADO EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS
MARITZA CANALES GIRON, MSc

TEGUCIGALPA, M.D.C.

29 de agosto del 2012

HONDURAS C.A

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZOONOTICAS

ASESOR DE TESIS

Norman Rojas, MSc.

TERNA EXAMINADORA:

NORMAN ROJAS, MSc.

LOURDES ENRIQUEZ. MSc.

ESTEBAN CHAVES OLARTE, PhD

Agradecimientos

El presente trabajo se llevó a cabo, gracias a la colaboración de un gran número de personas. Quiero agradecer a todo el equipo técnico de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras por la ayuda brindada hacia mi persona, en especial a la Dra. Ana Sánchez, Dra Maritza Canales, Dra. Lourdes Enríquez y al Dr. Gustavo Fontecha.....Gracias por la oportunidad y la confianza brindada.

Quiero agradecer muy especialmente al Dr. Norman Rojas, ya que sin su ayuda, la culminación de este proyecto no hubiese sido posible, asimismo por su entrega y preocupación, tal como lo debe hacer un verdadero tutor. A la Dra. Linda Herrera y a la Dra. Celeste Galindo del departamento de Bacteriología del Hospital Escuela y del Instituto Hondureño de Seguridad Social, por brindarme desinteresadamente los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* utilizados para este proyecto, asimismo al Dr. Roque López por brindarnos las cepas ATCC necesarias para las pruebas realizadas, asimismo agradezco la colaboración de la Dra. Margarita Paniagua de la Universidad Nacional Autónoma de León (UNAL) quien me brindo la cepa CCGU36501 para llevar a cabo los controles positivos para las pruebas realizadas.

A Leo y Sonia por asistirme desinteresadamente en la preparación de los medios de cultivo y a todas las personas involucradas en este proyecto....muchas gracias.

Lista de abreviaturas

ANAM: Ácido N-acetil Murámico.

BORSA: Boderline Resistant *Staphylococcus aureus*.

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

ETA: Toxina Exfoliativa Termoestable.

ETB: Toxina Exfoliativa Termolábil.

FOX: cefoxitina

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno.

IS: Secuencia de Inserción

MODSA: Modified Resistance *Staphylococcus aureus*.

NAG: N-acetil Glucosamina.

CLSI: Clinical Laboratory Standars Institute

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

OMS: Organización Mundial de la salud

PBP: Proteínas de Unión a Penicilinas.

PEP: Fosfoenol pirúvico

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

POE: Procedimiento Operativo Estándar

PUB: Plásmido.

rpm: revoluciones por minuto

SAIG: *Staphylococcus aureus* con Resistencia Intermedia a Glicopéptidos

SARM: *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina.

SARM-CA: *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina Adquirida en la Comunidad.

SARM-HA: *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina Adquirida en el Hospital.

SCCmec: Casete Cromosómico Estafilocócico.

SPPE: Síndrome de Piel Escaldada Exfoliativa.

TMP: Trimetropín-Sulfametoxazol

Tn: Transposón.

TSST-1: Toxina del Síndrome del Shock Tóxico.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

µg: microgramos

USAID: Agencia de Estados Unidos para el Desarrollo Internacional.

SAIVh: *Staphylococcus aureus* con Resistencia heterogénea a vancomicina

SAIV: *Staphylococcus aureus* con Resistencia Intermedia a Vancomicina.

Tabla de contenido

Agradecimientos	i
Abreviaturas	i
Capítulo 1	1
1.1 Introducción.....	1
1.2. Objetivos	4
1.2.1 Objetivo general	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	4
Capítulo 2: Marco Teórico	5
2.1 Morfología de <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.2 Virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.2.1 Fisiología y estructura, componentes de la pared celular.....	7
2.3 Toxinas y Enzimas	8
2.3.1 Enzimas	8
2.3.2 Toxinas estafilocócicas	9
3.1 Epidemiología de las infecciones causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	11
3.1.2 Cadena Epidemiológica de las infecciones causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	12
3.2 Epidemiología de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina a nivel mundial. ..	14
3.2.1 Epidemiología de SARM en Latinoamérica.	15

3.2.2 Epidemiología de SARM en Honduras	17
3.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina en la comunidad	20
4.1 Tratamiento Farmacológico contra <i>Staphylococcus aureus</i>	23
5.1. Mecanismo de acción de los Beta-Lactámicos y Glicopéptidos.....	25
5.2 Resistencia Antimicrobiana a los betalactámicos	28
5.2.1 Resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> a los betalactámicos	28
6.1. Características generales de la vancomicina.....	32
6.2 <i>Staphylococcus aureus</i> con sensibilidad disminuida a vancomicina y <i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia heterogénea a vancomicina	33
6.3 <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a vancomicina.....	36
7.1 Genoma de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
7.1.1 Gen <i>mecA</i>	39
7.1.2 Estructura del casete cromosómico <i>SCCmec</i>	40
Capítulo 3: Metodología.....	44
Capítulo 4: Resultados	49
Capítulo 5: Discusión de resultados	66
Capítulo 6: Conclusiones	77
Capítulo 7: Recomendaciones	78
Capítulo 8: Referencias	79
ANEXOS.....	96
Anexo 1.1	97

Procedimiento Operativo Estándar (POE) para la recolección, transporte y almacenamiento de muestras.	97
Anexo 1.2.....	98
Procedimiento operativo estándar para el uso correcto del equipo	98
Anexo 1.3.....	100
Procedimiento Operativo Estándar para eliminación de desechos:	100
Anexo 1.4.....	101
Procedimiento Operativo Estándar para el Control de Derrames	101
Anexo 1.5.....	103
Procedimiento Operativo Estándar para el correcto uso de Equipo de Protección Personal.....	103
Anexo 1.6.....	106
Procedimiento Operativo Estándar para la elaboración de medios de cultivo.....	106
Anexo 1.7	108
Procedimiento operativo estándar para el control de calidad del agar Muller-Hinton y de los discos de antibióticos	108
Anexo 1.8.....	110
Procedimiento Operativo Estándar para el aislamiento bacteriano; Técnica de Frobisher	110
Anexo 1.9.....	111
Procedimiento Operativo Estándar para la identificación bacteriana	111

Anexo 1.10.....	114
Procedimiento Operativo Estándar para la determinación de las pruebas de susceptibilidad a drogas de <i>Staphylococcus aureus</i>	114
Anexo 1.11.....	116
Procedimiento Operativo Estándar para la determinación de la proteína PBP2a	116
Anexo 1.12.....	117
Procedimiento Operativo Estándar para la detección del gen <i>mecA</i>	117

Lista de Figuras

Figura 1. Tinción de Gram a partir de un cultivo puro, mostrando la presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	5
Figura 2. Estructura de la pared celular estafilocócica.....	7
Figura 3. <i>Staphylococcus aureus</i> produciendo Hemólisis.....	10
Figura 4. Historia natural de la enfermedad	11
Figura 5. Prevalencia de SARM en el mundo.....	15
Figura 6. Porcentaje de aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia a la meticilina en países de Latinoamérica, 2004.	17
Figura 7. Síntesis de peptidoglucano y mecanismo de acción de los betalactámicos y vancomicina	26
Figura 8. Mecanismo de transpeptidación;sitio en el cual actúan los betalactámicos.....	27
Figura 9. Mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos	30
Figura 10. Mecanismo de resistencia del <i>Staphylococcus aureus</i> a los betalactámicos.....	31
Figura 11. Engrosamiento de la pared celular en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia disminuida a los glicopéptidos	35
Figura 12. Representación de un fragmento del DNA cromosómico de SARM.....	41
Figura 13. 8 casetes cromosómicos estafilocócicos.....	42
Figura 14. Morfología colonial de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar sangre 5%.....	50
Figura 15. Pruebas de identificación bacteriana.....	51
Figura 16. Diámetros de los halos de inhibición con discos de oxacilina.....	52
Figura 17. Diámetros de los halos de inhibición con discos de meticilina.....	52
Figura 18. Diámetros de los halos de inhibición con discos de cefoxitina.....	53

Figura 19. Halos de inhibición “fantasmas” en aislados clínicos.....	53
Figura 20. Elipse “fantasma” rodeando la tira de oxacilina.....	55
Figura 21. CMI de oxacilina en aislados de <i>Staphylococcus aureus</i>	55
Figura 22. CMI de vancomicina frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	56
Figura 23. Prueba de aglutinación en látex.	57
Figura 24.1 PCR múltiple de los aislados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i>	58
Figura 24.2 PCR multiplex de los aislados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i>	59
Figura 25. PCR multiplex de los aislados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i>	59
Figura 26. Origen clínico de los aislados SARM	63
Figura 27. Distribución de la procedencia de los aislamientos por Hospital (H, hospitalizados; CE, consulta externa; NI, no identificado).	64
Figura 28. Distribución de los aislamientos SARM por procedencia hospitalaria.....	65

Lista de cuadros

Cuadro 1. Medidas de control del SARM en los centros hospitalarios, una vez generada la infección por <i>Staphylococcus aureus</i>	13
Cuadro 2. Porcentaje de SARM en algunos países de Latinoamérica en el año 2004.....	16
Cuadro 3. Infecciones por <i>Staphylococcus aureus</i> , Hospital Materno Infantil, Tegucigalpa D.C, Mayo-Diciembre 1977	18
Cuadro 4: Resistencia antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> obtenidas de pacientes del Hospital Escuela Tegucigalpa, Honduras, período 2005-2008.....	19
Cuadro 5. Nuevos agentes para el tratamiento de infecciones estafilocócicas resistentes a meticilina	24

Cuadro 6. Aislamiento de cepas SARV en el mundo.....	36
Cuadro 7. Tipos de casetes estafilocócicos cromosómicos y su composición	42
Cuadro 8. Concordancia entre los métodos de difusión en disco y E-test	60
Cuadro 9. Concordancia entre los métodos de difusión en disco y aglutinación en látex.....	60
Cuadro 10. Concordancia entre las pruebas de difusión en disco y PCR para la detección del mecA.....	61
Cuadro 11. Concordancia entre las pruebas E-test y PBP2a.....	61
Cuadro 12. Concordancia entre las pruebas E-test y mecA.....	61
Cuadro 13. Concordancia entre detección de PBP2a y mecA	62
Cuadro 14 Sensibilidad y especificidad de las pruebas (IC95%).....	62
Cuadro 15. Distribución de SARM según hospital de procedencia.....	64

Dedicatoria

Dedico esta tesis a Dios y la Virgen quienes me han dado la fortaleza de culminar este trabajo de tesis, a mis padres Lilian Díaz y Edgardo Sosa, a mis hermanos Ramón Andrés Sosa y Edgardo Humberto Sosa.

Los grandes espíritus siempre han tenido que luchar contra la oposición feroz de mentes mediocres. (Albert Einstein)

Capítulo 1

1.1 Introducción

Las infecciones ocasionadas por cepas de *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina (SARM), son un problema de salud pública importante en todo el mundo, produciendo infecciones como osteomielitis, endocarditis invasora, artritis séptica y septicemia, siendo un número pequeño de clonas las responsables de las infecciones estafilocócicas. El problema mayor se presenta sobre todo en los hospitales, debido al descuido de las técnicas asépticas, hecho que se agrava por la aparición de cepas resistentes a los antimicrobianos, ya que desde la aparición de los antibióticos, *Staphylococcus aureus* ha expresado una excepcional capacidad para producir variantes resistentes [Duerden BI, 1993; Heymann DL, 2005; Velásquez Meza ME, 2005].

El tratamiento farmacológico utilizado para contrarrestar las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* es variado, a nivel hospitalario encontramos: penicilinas resistentes a betalactamasas, tetraciclinas, aminoglucósidos, eritromicina y vancomicina. Entre las penicilinas resistentes a las betalactamasas se encuentran la meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina y flucloxacilina [Brooks Geo F, 2002; Katzung BG, 2002]

SARM se describió por primera vez en 1961 en Inglaterra, dos años después de la introducción de la meticilina, desde entonces la prevalencia ha ido aumentando. La distribución geográfica de SARM es muy variable, de tal forma que en Hong Kong ha llegado a suponer más del 50% de los aislamientos, mientras que en países del norte de Europa el porcentaje de SARM es menor que en los países del sur [Grundmann H, 2006].

Durante el año 2006 y 2007, Hajo Grundmann y col. llevaron a cabo en Europa una investigación que incluyó 26 países del continente. Uno de los objetivos de este estudio fue coleccionar aislamientos de pacientes con infección invasiva de *Staphylococcus aureus*, encontrándose como resultado un porcentaje total de resistencia del 33.5 % [Grundmann H, 2010].

SARM es ya la principal causa de infección nosocomial en América Latina. Con la ayuda de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y La Agencia de Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID), se creó una red de vigilancia epidemiológica de SARM en la mayoría de los países de Latinoamérica. Manuel Guzmán Blanco y col. llevaron a cabo una revisión de dicha vigilancia epidemiológica y reportaron para el año 2004 una prevalencia de SARM de 80% en Chile y Perú, 59% en Uruguay y 57% en Colombia, además una prevalencia en Centro América de un 64% en Guatemala, 58% en Costa Rica, 20% en Nicaragua y 12% en Honduras [Buitrago G, 2008; Casellas J, 2006; Lisboa T, 2007; Loureiro MM, 2002; Otth RL, 2008; Pan American Health Organization, 2004; Ponce de Leon A, 2008; Seas C, 2006].

En Honduras, en el año de 1977, Carlos Javier Zepeda y col. realizaron un estudio de susceptibilidad antimicrobiana para conocer el porcentaje de resistencia y sensibilidad de *Staphylococcus aureus* a los antibióticos disponibles en esa época; se encontró un porcentaje de 16.4% de resistencia a la oxacilina. Años más adelante, la OPS, en 1993, reportó en Honduras un porcentaje de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina y oxacilina de un 38 y 37% respectivamente, sin embargo en ambos casos no se incluyeron datos de resistencia a meticilina, solamente a oxacilina [OPS, 1993; Zepeda CJ, 1978].

Para el año 2007, Jorge Luis Martínez Lutz y col. llevaron a cabo un estudio en el Hospital Escuela de Tegucigalpa, donde se aislaron cepas de *Staphylococcus aureus* de muestras de pacientes diabéticos. En estas muestras se estudió la sensibilidad bacteriana a diversos antimicrobianos, y se reportó como resultado un porcentaje de 42.9% de resistencia a oxacilina [Martínez JL, 2007].

La falta de evidencia científica de la prevalencia de resistencia a meticilina y sus análogos (oxacilina, cefoxitina, nafcilina) es un tema importante de abordar, ya que las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* generan graves problemas de salud, diseminándose cepas cada vez más virulentas y multirresistentes, además de adquirir resistencia a las drogas antibacterianas que se encuentran de venta libre.

Los datos que se proporcionan en este estudio, son los porcentajes de resistencia de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, oxacilina, cefoxitina y vancomicina de muestras provenientes de pacientes hospitalizados y de la comunidad desde octubre del 2010 hasta enero del 2011. De la misma forma, se obtuvieron resultados, utilizando 2 técnicas fenotípicas de difusión en agar, y se utilizó la prueba de aglutinación en látex para la detección de la proteína de unión a penicilinas “extra” denominada PBP2a, la cual no es afín a todos los antibióticos betalactámicos, siendo este el principal mecanismo de resistencia a los betalactámicos en *Staphylococcus aureus*, esta proteína es el resultado de la expresión de un gen denominado *mecA*. Debido a lo anteriormente expuesto ambas técnicas fueron correlacionadas. Los resultados obtenidos servirán como una línea base para futuras investigaciones y de esta manera contribuir al conocimiento científico en este tema.

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo general- Caracterizar fenotípicamente la resistencia a drogas betalactámicas y detección del gen *mecA* de los aislados de *Staphylococcus aureus* obtenidos de pacientes que acudieron al Hospital Escuela y al Instituto Hondureño de Seguridad Social en el período de octubre del 2010 a enero del 2011.

1.2.1 Objetivos específicos

-Determinar el perfil de susceptibilidad a meticilina, oxacilina, cefoxitina y vancomicina mediante las pruebas de difusión en agar de Kirby-Bauer.y E-test.

Determinar la proteína de unión a penicilinas (PBP2a) en todos los aislamientos de *Staphylococcus aureus* obtenidos para este estudio y correlacionar la presencia de la proteína con el gen *mecA*.

Capítulo 2: Marco Teórico

2.1 Morfología de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus fue descrito por primera vez a finales del siglo XIX por Sir. Alexander Ogston, quien demostró la importancia del rol del microorganismo en infecciones supurativas. *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram-positiva, no móvil, anaerobia facultativa, con un diámetro entre 0.5 y 1 μm , y puede ser distinguido de otros miembros del género *Staphylococcus* por tener habilidad para producir coagulasa. El nombre *Staphylococcus* viene de la palabra griega *staphyle* que significa “racimo de uvas”, esta bacteria está presente en muestras clínicas y aparece como células aisladas, en pares o en cadenas cortas (ver figura 1) [Murray P, 2005; Ogston A, 1883].

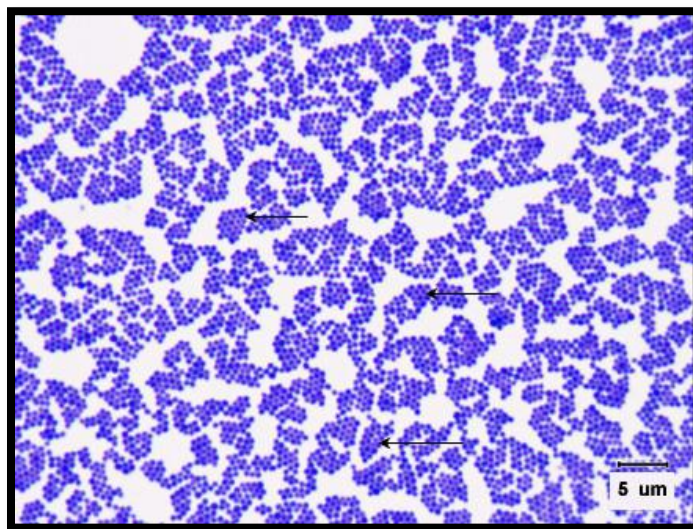


Figura 1. Tinción de Gram a partir de un cultivo puro, mostrando la presencia de *Staphylococcus aureus* dispuestas en pares, cadenas y racimos tomado de: http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab15/images/Saureus03_scale.jpg

Taxonomía del *Staphylococcus aureus* disponible en http://7staphylococcus-aureus.blogspot.com/2007/11/introduccion_9162.html

Categoría taxonómica	Clasificación científica
Dominio	Bacteria
Reino	Prokariote
División	Firmicutes
Clase	Bacili
Orden	Bacillales
Familia	Micrococaceae
Género	Staphylococcus
Especie	S.aureus

Cerca del 25% de las personas es portador asintomático de *Staphylococcus aureus*. Aunque dicho estado precede a la infección con la bacteria, hecho que surge como consecuencia de la interrupción de la barrera cutánea o debido a la alteración de las defensas del hospedador [Heymann DL, 2005; Papadakis SM, 2009]. *Staphylococcus aureus* produce infecciones en piel y tejidos blandos, como ser impétigo, forunculosis y carbuncos, por lo que la bacteria podría diseminarse a tejidos más profundos y provocar enfermedades más graves como son endocarditis, osteomielitis, neumonía, septicemia y síndrome de piel escaldada, esto depende de los mecanismos de virulencia y a la producción de toxinas y enzimas por parte de esta bacteria [Otten, 2004].

2.2 Virulencia de *Staphylococcus aureus*

2.2.1 Fisiología y estructura, componentes de la pared celular.

Peptidoglucano: es el componente básico de la pared celular de *Staphylococcus aureus*, está conformado por capas de cadenas de glucanos construidas con 10 ó 12 subunidades alternantes de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina.

La capa de péptido glucano en *Staphylococcus aureus* se compone de numerosas capas entrecruzadas, lo que confiere una mayor rigidez a la pared celular.

Ácidos teicoicos: median la unión de *Staphylococcus aureus* a las superficies mucosas a través de su unión específica a la fibronectina. Los ácidos teicoicos son polímeros fosfatados que se unen de manera covalente a residuos de ácido N-acetil murámico de la capa de peptidoglucano a través de una unión lipofílica a la membrana citoplasmática.

Proteína A: presente en la superficie de la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus*, se une a la capa de peptidoglucano o a la membrana [Murray P, 2005].

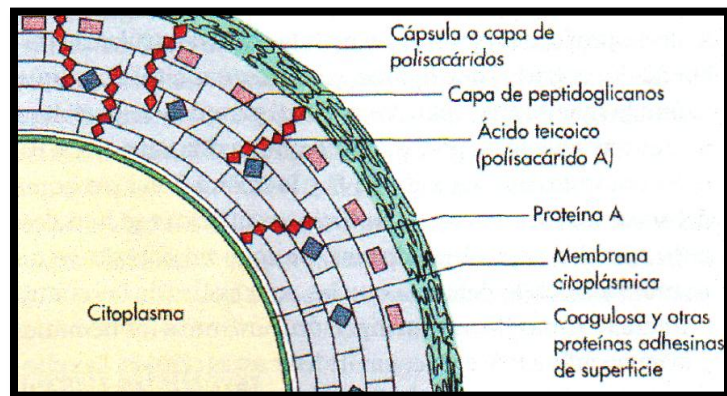


Figura 2. Estructura de la pared celular estafilocócica tomado de [Patrick Murray, 2005]

2.3 Toxinas y Enzimas

Los estafilococos pueden producir enfermedad por la capacidad que tienen para propagarse de modo extenso en los tejidos, mediante la producción de enzimas y toxinas.

2.3.1 Enzimas

Catalasa: los estafilococos producen catalasa, enzima que tiene la característica de convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Esta enzima puede diferenciar el género *Staphylococcus* que son catalasa positivos del género *Streptococcus* que se caracterizan por ser catalasa negativos [Brooks Geo F, 2002]

Coagulasa: se encuentra en dos formas; coagulasa ligada y coagulasa libre o extracelular. Ambas intervienen en la formación de coágulos, convierten el fibrinógeno en fibrina facilitando procesos sépticos y permitiendo la formación de abscesos. La detección de coagulasa libre es la prueba que diferencia *Staphylococcus aureus* de los demás miembros de este género.

Hialuronidasa: degrada el ácido hialuránico de la matriz del tejido conjuntivo y facilita la propagación de la infección.

Penicilinasas: es una betalactamasa que inactiva la penicilina mediante la hidrólisis de su anillo betalactámico.

Otras enzimas: la mayoría de cepas de *Staphylococcus aureus* sintetizan además otras enzimas como lipasas, proteasas, nucleasas o enzimas que hidrolizan los ácidos nucleicos y estafiloquinasas [Ordás, 2006].

2.3.2 Toxinas estafilocócicas

Muchas de las toxinas están bajo control genético de plásmidos, algunas pueden estar bajo control cromosómico y extra cromosómico, y para otras el mecanismo de control genético no está bien definido, tenemos por ejemplo:

Hemolisinas: es una proteína heterogénea que puede causar lisis de eritrocitos y dañar las plaquetas, se identifican cuatro tipos: Alfa, Beta, Gamma y Delta actuando sobre determinadas células del hospedero como leucocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos.

Leucocidina de Panton Valentine: es sintetizada por el 2 a 3% de las cepas, y está compuesta por dos subunidades proteicas, la F y S, sintetizadas independientemente, actúan en forma sinérgica sobre las membranas de las células fagocíticas.

Las leucocidinas se unen a los fosfolípidos de la membrana de los fagocitos y macrófagos induciendo la formación de poros que destruyen la célula al alterar la permeabilidad celular [Ordás, 2006]

Toxina Exfoliativa: se han identificado dos formas distintas de toxinas exfoliativas, Toxina Exfoliativa A y Toxina Exfoliativa B (ETA Y ETB), ambas pueden producir enfermedad. ETA es termoestable y es codificada por un gen cromosómico, mientras que ETB es termolábil y mediada por un plásmido, el síndrome de la piel escaldada estafilocócica (SPEE) se observa fundamentalmente en niños pequeños, y rara vez se describe en niños mayores o en adultos [Murray P, 2005]

Toxina del síndrome del shock tóxico: casi todas las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de los pacientes con síndrome de shock tóxico producen una toxina denominada

TSST-1 la cual es un prototipo de superantígeno, induciendo la liberación de citocinas por macrófagos y linfocitos T [Geo F. Brooks, 2002; Ordás, 2006].

Enterotoxinas: las enterotoxinas estafilocócicas son producidas por cepas muy específicas, sin embargo una de ellas es capaz de sintetizar más de un serotipo de enterotoxinas. Actualmente se diferencian por su actividad serológica no menos de 7 enterotoxinas, que se designan A, B, C1, C2, C3, D y E. La enterotoxina del serotipo A es la que con más frecuencia aparece en los brotes de intoxicación alimentaria y le siguen en orden decreciente las de los serotipos C1, B, D y E. La originalmente descrita enterotoxina F ha sido identificada como la toxina productora del síndrome de shock tóxico en mujeres y ocasionalmente en hombres [Bécquer Lombard A, 1996].



Figura 3. *Staphylococcus aureus* produciendo Hemólisis tomado de: http://fundacionio.org/img/bacteriology/img/Staph_aureus_02.jpg

3.1 Epidemiología de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*

3.1.1 Historia natural de las infecciones por SARM

El proceso infeccioso de *Staphylococcus aureus* se inicia con la exposición del hospedero susceptible a la bacteria, encontrándose la bacteria en una concentración infecciosa (Ver figura 1). En este proceso ocurren dos períodos: El período pre-patogénico donde se refleja el momento de la interacción entre bacteria, ambiente y hospedero, seguido del período patogénico en el que el hospedero presenta cambios tisulares hasta llegar a un estado crónico [OPS, 2002].

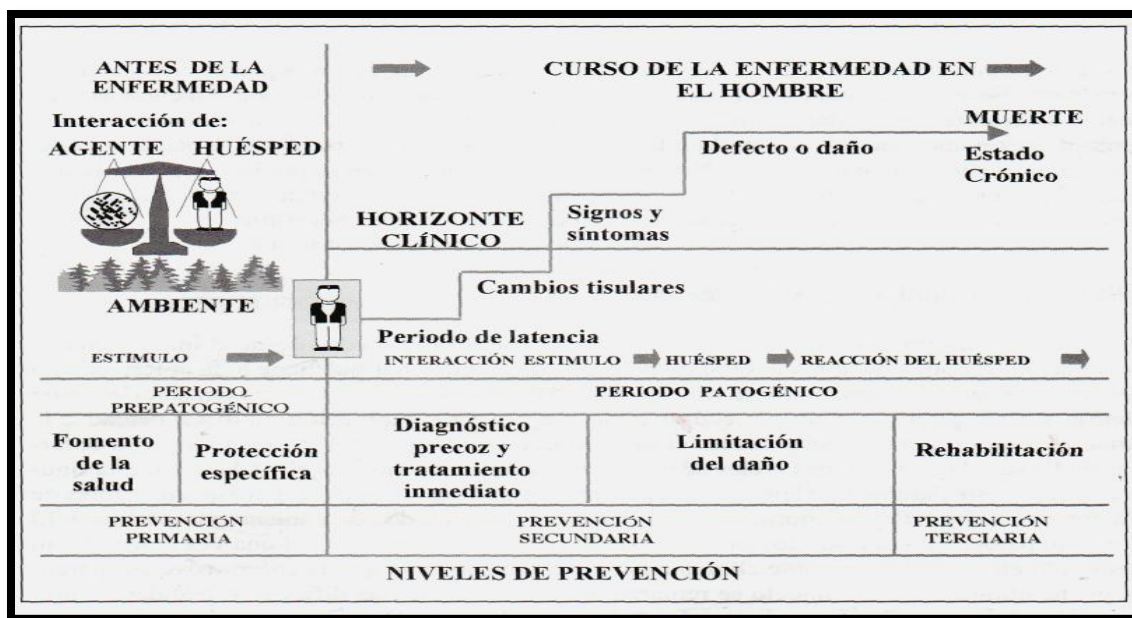


Figura 4. Historia natural de la enfermedad. Modelo propuesto por Level y Clark, en el que se observan 2 períodos; pre-patogénico donde se lleva a cabo la interacción agente-ambiente- hospedero; período patogénico, comportamiento del individuo una vez realizado el estímulo [OPS, 2002].

3.1.2 Cadena Epidemiológica de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*

Para que se produzca un brote nosocomial por SARM es necesario que se establezca la denominada cadena epidemiológica de la infección.

El proceso infeccioso se origina por contacto directo con el agente etiológico, en este caso *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria coloniza especialmente al humano, sin embargo tiene la capacidad de colonizar e infectar otros animales (mamíferos y aves). Este microorganismo sale de su reservorio a través de lesiones abiertas de piel, contaminación aérea y piel colonizada, por lo que la contaminación aérea al estornudar, toser o hablar es considerada como un modo de transmisión directa, además se les considera a los objetos y materiales contaminados, como estetoscopios, esfigmomanómetros y catéteres intravenosos una importante fuente de transmisión, es por estas razones que se han considerado ciertas medidas de control de diseminación de *Staphylococcus aureus* en los centros hospitalarios (ver cuadro 1). *Staphylococcus aureus* tiene como “puerta de entrada” las heridas quirúrgicas, alimentos contaminados y leches sin pasteurizar. Este agente “ataca” a pacientes susceptibles como ser: pacientes en unidad de cuidados intensivos, pacientes quemados, pacientes con estancia hospitalaria prolongada, traslados frecuentes de un hospital a otro, tratamientos prolongados con antibióticos y pacientes con enfermedades subyacentes graves. Los posibles sitios de colonización o infección pueden ser: nariz, garganta, perineo, pliegues inguinales, vagina o recto. Con menor frecuencia piel de la región de los glúteos en pacientes inmovilizados (lesiones superficiales de la piel, úlceras por decúbito o de otra clase, dermatitis); heridas quirúrgicas y quemaduras [OMS, 2004; OPS, 2002; Pulgarín, 2005; Thompson RL, 1982].

Cuadro 2. Medidas de control del SARM en los centros hospitalarios, una vez generada la infección por *Staphylococcus aureus* [Sopena Nieves, 2002].

Detección de casos.

- Vigilancia diaria de las muestras en el Laboratorio de Microbiología.
- Listados de pacientes conocidos, infectados o colonizados por SARM.
- Cultivos de control de los pacientes trasladados de otro centro, con riesgo elevado.

Aislamiento de contacto.

- Habitación individual o compartida con otro paciente con SARM.
- Usar guantes al entrar a la habitación.
- Lavarse las manos tras quitarse los guantes.
- Usar bata para proteger piel y ropa cuando existe riesgo de contaminación con fluidos o secreciones (cura de heridas ,traqueotomía)
- Limitar las actividades o exploraciones fuera de la habitación.
- Restringir las visitas.

Medidas adicionales.

- Lavado del paciente con jabón de clorhexidina.
- Alta temprana al domicilio.
- Descolonización de pacientes, especialmente durante los brotes.
- Estudio de portadores asintomáticos en áreas de alto riesgo y en brotes.
- Limitar el uso de antibióticos.

3.2 Epidemiología de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina a nivel mundial.

Staphylococcus aureus es una de las cuatro causas principales de infecciones hospitalarias junto con *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*. El interés del estudio de este microorganismo radica en su elevada frecuencia, su morbi-mortalidad y su resistencia a diversos fármacos, entre ellos la meticilina, por lo que se ha denominado mundialmente como SARM, cepas causantes de brotes de infección hospitalaria [Camarena JJ, 1999]

Alexander Flemming al momento de descubrir la penicilina en 1928, encontró que dicha molécula era efectiva en el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*, pero ya en 1946 la frecuencia de resistencia del estafilococo por betalactamasas era de 60% [Echeverria Zarate J, 2003]. Es por esto que se obtuvo en 1959, una molécula antibiótica que fue llamada meticilina, primera penicilina semisintética, que tenía la propiedad de evadir la acción de las betalactamasas, desde entonces la meticilina y otras penicilinas semisintéticas como oxacilina y sus derivados fluorados han sido los antibióticos de elección en el tratamiento de estafilococos [Turnidge J, 2008].

Los primeros brotes de SARM fueron documentados en Inglaterra en 1961 y en Dinamarca en 1962. A mediados de la década de 1960 y al principio de la década del 70, el número de casos de SARM se incrementaron exponencialmente en países de Europa como Suiza, Dinamarca y Francia, en cambio países como Finlandia, Islandia, Noruega y Suecia los brotes de SARM fueron encontrados esporádicamente. Posteriormente, la incidencia de SARM declinó rápidamente en toda Europa, decayendo aproximadamente de 20% a menos de 1%, pero un nuevo incremento fue observado en la década de los 80 en Australia, siendo las responsables 5 clonas diferentes [Robert S, 2008].

En América el primer brote de SARM fue reportado en 1968 en la ciudad de Boston, Estados Unidos. Durante la década de los años 80 y 90 la incidencia de dicho microorganismo continuó aumentando, percatándose de su significativa virulencia y resistencia a los antibióticos, lo que obligó al uso de otros fármacos más potentes como la vancomicina, frente a la cual comenzó a aparecer resistencia incipiente, fue entonces cuando en 1996 se aisló en Japón la primera cepa de *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a los glicopéptidos (SAIG) y hasta la fecha se han detectado distintos casos clínicos causados por SAIV repartidos en diferentes partes del mundo. El último peldaño de la escalera de resistencia que presenta *Staphylococcus aureus*, es en el aislamiento de la primera cepa con resistencia total a la vancomicina que se aisló en Estados Unidos en junio del 2002, quedando hasta el momento, pocas alternativas terapéuticas [Navascués A., 2004; Nodarse, 2002].

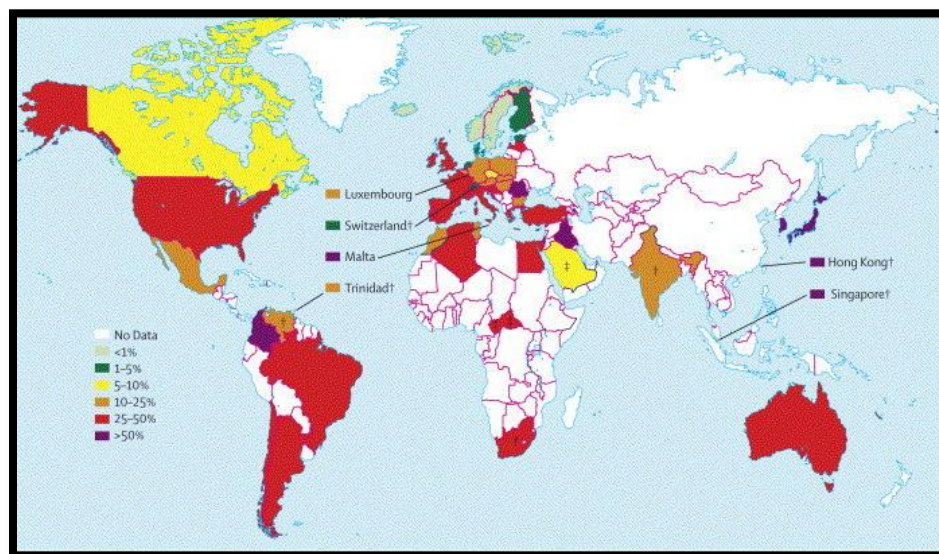


Figura 5. Prevalencia de SARM en el mundo. Datos en blanco, datos no disponibles tomado de [Ordás, 2006, Grudmann 2006].

3.2.1 Epidemiología de SARM en Latinoamérica.

A partir del año 2000, con el apoyo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y de la Agencia de Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID), se inició una red de vigilancia epidemiológica de SARM, donde se incluyeron a la mayoría de los países de Latinoamérica. La información de resistencia de SARM en América Latina para el año 2004 es presentada en el cuadro número 3 y en la figura número 6.

Cuadro 3. Porcentaje de SARM en algunos países de Latinoamérica en el año 2004.[Pan American Health Organization, 2004].

País	% SARM
Chile	80
Perú	80
Uruguay	59
México	52
Colombia	47
Argentina	42
Ecuador	25
Venezuela	25
Guatemala	64
Costa Rica	54
Nicaragua	20
Honduras	12

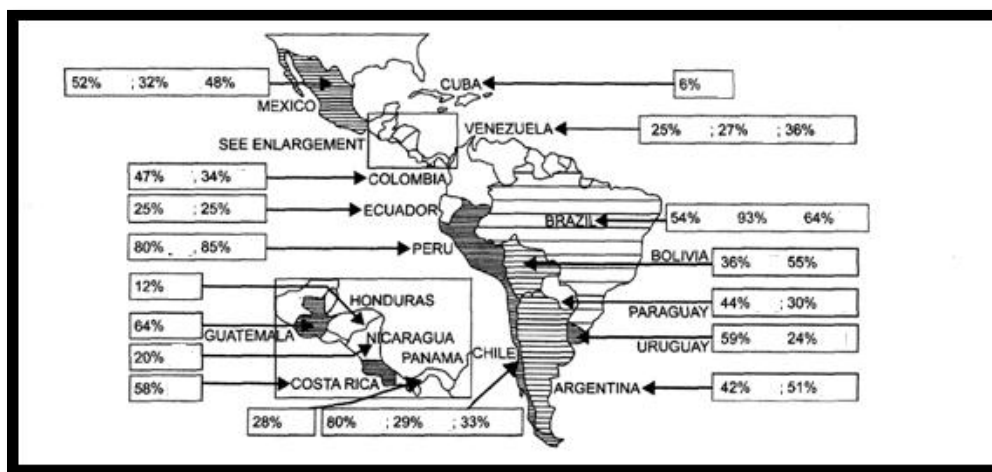


Figura 6. Porcentaje de aislamientos de *Staphylococcus aureus* con resistencia a la metilina en países de Latinoamérica, 2004. Los países que se encuentran sombreados representan una incidencia mayor al 50 % de SARM, la presente figura ha sido tomada del artículo publicado por Manuel Guzmán Blanco y colaboradores, ver las siguientes citas bibliográficas [Buitrago G, 2008; Casellas J, 2006; Guzman-Blanco M, 2009; Lisboa T, 2007; Loureiro MM, 2002; Otth RL, 2008; Pan American Health Organization, 2004; Ponce de Leon A, 2008; Seas C, 2006].

3.2.2 Epidemiología de SARM en Honduras.

En 1977, en Honduras, en el Hospital Materno Infantil, se llevó a cabo un estudio de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* a los antibióticos que para ese mismo año estaban incluidos en el cuadro básico de medicamentos, reportándose los resultados en la cuadro No 3, sin embargo no se reportaron datos de resistencia a metilina, solamente a oxacilina y dicloxacilina.

Cuadro 4. Infecciones por *Staphylococcus aureus*, Hospital Materno Infantil, Tegucigalpa D.C, Mayo-Diciembre 1977 [Zepeda CJ, 1978]

Antimicrobiano	% Resistencia
Penicilina G	94.0
Oxacilina	16.4
Dicloxacilina	17.7
Kanamicina	14.7
Cotrimoxazol	9.9
Gentamicina	5.0
Cefalosporinas	5.8
Cloranfenicol	13.6
Eritromicina	26.5
Tetraciclinas	27.1
Ampicilina	86.4

Debido al aumento en la incidencia de infecciones causadas por SARM, se ha creado en Tegucigalpa un programa de vigilancia epidemiológica que tiene como objetivo principal reportar anualmente los porcentajes de *Staphylococcus aureus* resistentes a los antimicrobianos que se encuentran dentro del cuadro básico de medicamentos del Hospital Escuela. Ver resultados en cuadro número 5. En el período del 2005 al 2008 no se incluyó meticilina en el cuadro básico de medicamentos.

Cuadro 5: Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* obtenidas en pacientes del Hospital Escuela Tegucigalpa, Honduras, período 2005-2008 [WHONET, 2008].

Antibiótico	%R 2005 Neonatología	% R 2006 Hospitalización	% R 2007 Hospitalización	% R 2008 Consulta Externa	% R 2008 Hospitalización
Penicilina G	94.1	93.2	93.2	96.4	95.6
Oxacilina	11.80	18.1	18.1	15.6	28.9
Ampicilina	NA	93.9	93.9	NA	NA
Ceftriaxona	0	0	0	0	NA
Cefalotima	0	NA	NA	NA	NA
Ceftazidima	0	NA	NA	NA	NA
Gentamicina	12.5	19.3	19.3	NA	NA
Clindamicina	5.7	10.9	10.9	10.9	20
Eritormicina	28	31.3	31.3	20.6	35
Vancomicina	0	0	0	0	0
TMP/SMX	5.9	15	15	7.3	7
Amikacina	NA	100	100	NA	NA
Nitrofurantoína	NA	0	0	NA	NA
Ciprofloxacina	NA	NA	NA	10.6	16

3.2.3 *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina en la comunidad.

Durante los últimos 20 años las cepas de SARM han emergido como importantes patógenos, principalmente en infecciones nosocomiales, sin embargo ha habido un incremento de infecciones por SARM adquiridas en la comunidad (SARM-AC) en pacientes sin factores de riesgos conocidos, notificándose casos en diferentes países y áreas geográficas [Torano G, 2001].

La diseminación de los microorganismos multirresistentes en la comunidad probablemente ha sido el resultado de la interacción de muchos factores, de los cuales quizás las causas más importantes sean las mutaciones de los genes, el intercambio de información genética entre miembros de la misma especie o entre miembros de diferente especie y la presión selectiva para sobrevivir en presencia de los antibióticos [Gobernado, 2002].

En la pasada década la epidemiología de las infecciones estafilocócicas cambió particularmente como consecuencia de dos factores principales: el incremento en el número de pacientes externos con excesivo contacto en centros de salud, y la emergencia de clones adquiridos en la comunidad de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina por personas sin algún tipo de contacto con Hospitales o centros de salud, hecho que ha causado preocupación entre los profesionales de la salud. [Falcone M, 2008]

El primer reporte publicado de infección causada por SARM en la comunidad en América Latina, fue en Brasil, donde se aislaron y caracterizaron tres cepas de pacientes con infecciones en la piel y los tejidos. Además se reportó un brote por SARM en la comunidad que afectó a los privados de la libertad y a la gente de comunidades en Montevideo, Uruguay a comienzos del año 2002, de la misma forma se han reportado diversos casos de

SARM adquiridos en la comunidad [Guzman-Blanco M, 2009; Ma XX, 2005; Ribeiro A, 2005].

Existen investigaciones que muestran un incremento en la proporción de *Staphylococcus aureus* en adultos y pacientes pediátricos, quienes no han tenido contacto previo con instituciones de salud y sufren infecciones debidas a SARM. Los hallazgos de cepas aisladas de este tipo de personas, fundamentalmente entre niños no expuestos a los factores antes mencionados, han originado importantes polémicas, porque difieren sustancialmente del conocimiento adquirido hasta el momento sobre su comportamiento epidemiológico y microbiológico, tal es el caso del estudio realizado por Gilda Toraño et al. en la ciudad de la Habana, Cuba. En este estudio demostraron la existencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en niños cubanos que asisten a círculos infantiles, hecho que se llevó a cabo durante los meses de Septiembre y Octubre de 1997. En dicho estudio se tomaron muestras de exudados nasales y faríngeos a 358 niños menores de 5 años, obteniéndose como resultado un 18.7% de cepas de *Staphylococcus aureus* presentes en el tracto respiratorio superior y el 2.2% de esas cepas eran resistentes a meticilina [Broseta A, 2005; Torano G, 2001]

En los últimos años se ha producido un aumento llamativo de los casos de SARM en algunas comunidades aborígenes de Estados Unidos, Canadá y el oeste de Australia. Estos casos han sido originados por cepas de SARM que difieren de las cepas nosocomiales, afectando generalmente a niños y adultos jóvenes sin factores de riesgo.

En otro estudio, realizado en el 2009 por Lozano y col., se caracterizaron microbiológicamente treinta y un queseras artesanales en el Departamento de Atlántida,

Honduras, en el estudio demostraron un alto nivel de contaminación por *Staphylococcus aureus* en la leche cruda, con un recuento total de bacterias mayor de 1000 Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml), hecho que muestra la existencia de pobres condiciones de salud en el ganado de la zona, asociado con la producción de mastitis en el mismo, por lo que podrían producirse brotes por intoxicación alimentaria en aquellas personas que consuman productos elaborados con la leche contaminada [Moreno, 2001]. Estos hallazgos sugieren la aparición de brotes diarreicos producidos por *Staphylococcus aureus* presentes en los alimentos, lo cual sería un tema importante de abordar, por la capacidad que tiene la bacteria de producir cuadros diarreicos, y la posible resistencia a meticilina que estas cepas podrían obtener.

Tal es el caso reportado por Mejía et al. donde reportaron un brote de intoxicación alimentaria causada por *Staphylococcus aureus* en una guardería infantil de Choluteca Honduras, se produjo una intoxicación aguda por alimentos, hecho que afectó a 39 personas de las 43 expuestas, siendo mayormente afectados niños entre 1 y 9 años de edad. El análisis bacteriológico reportó que los alimentos fueron positivos por *Staphylococcus aureus* [Mejía Nuñez MR, 2009]

4.1 Tratamiento Farmacológico contra *Staphylococcus aureus*

El tratamiento farmacológico contra SARM, es variado y depende del cuadro básico de medicamentos en los hospitales de cada país.

A pesar que los SARM adquiridos en el medio hospitalario (SARM-HA) pueden responder únicamente frente a la vancomicina, los SARM-HA también pueden ser sensibles a otros antibióticos como linezolid y tigeciclina, sin embargo pueden presentar resistencia frente a la cefalexina, dicloxacilina, eritromicina y quinolonas. Es importante tener en cuenta que se debe irrigar la herida infectada para que haya éxito en la farmacoterapia. El paciente puede ser tratado con tetraciclina, doxiciclina, clindamicina, trimetropin-sulfa y meticilina [Kjonegaard R, 2006].

En el Instituto de Ciencias Médicas de New Delhi India, Gadepalli y col., estudiaron los patrones de resistencia antimicrobiana de los siguientes antibacterianos: Amikacina, cloranfenicol, ciprofloxacina, cotrimoxazol, clindamicina, eritromicina, ácido fusídico, mupirocina, netilmicina, quinupristina-dalfopristina, rifampicina, tetraciclina y teicoplanina. En este estudio se observó resistencia intermedia a la teicoplanina, hecho de preocupación debido a la aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* medianamente resistentes a glicopéptidos (GISA) [Gadepalli R, 2009].

Marco Falcone y col. publicaron en su estudio titulado “Serias infecciones debido a SARM, un desafío en evolución para los médicos”, nuevos agentes para el tratamiento de infecciones por SARM (Ver en la cuadro No 6) [Falcone M, 2008]

Cuadro 6. Nuevos agentes para el tratamiento de infecciones estafilocócicas resistentes a meticilina [Falcone M, 2008]

Antimicrobiano	Mecanismo de Acción
Linezolid	Agente bacteriostático, actúa en la iniciación del complejo 70 S ribosomal. Se administra vía oral y vía intravenosa. Su biodisponibilidad oral es de 100%. Dosis en adultos: 600 mg. Cada 12 horas.
Quinupristina/Dalfopristina	Derivado de estreptograminas. Agente bacteriostático. Actúa inhibiendo la síntesis de proteínas. Dosis en adultos 7.5 mg/kg de peso por infusión IV cada 8 horas.
Daptomicina	Lipopéptido cíclico. Agente bactericida. Se une a la membrana celular de la bacteria. Dosis en adultos 4-6 mg/kg de peso por infusión intravenosa cada 24 horas.
Tigeciclina	Glicilcyclina derivado de la tetraciclina, agente bacteriostático, con actividad contra un rango general de bacterias Gram positivas y Gram negativas, es bien tolerada, no se necesita de ajustar dosis en caso de disfunción hepática o renal, aprobada contra infecciones de piel y tejidos blandos e infecciones intraabdominales leves y moderadas.
Dalbavancin	Glicopéptido sintético, tiene una vida media en plasma de 7 días, se administra en un total de dos dosis dado una semana de diferencia. Aprobada contra infecciones de piel y tejidos blandos.
Telavancin	Glicopéptido semisintético, tiene una vida media de 7 horas.
Oritavancin	Glicopéptido semisintético de segunda generación, tiene una vida media plasmática de 195 horas.
Everminomicin	Oligosacárido, buena actividad contra SARM, Aplicación clínica restringida debido a su toxicidad.
Lysostaphin	Peptidasa, activa in-vitro contra SARM, su primer uso fue reportado en 1974, efectiva en modelos de conejos con endocarditis causada por SARM.
Iclaprim	Inhibidor bacteriano de la dihidrofolato reductasa (Diaminopirimidina), activa contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, actúa como un rápido bactericida contra Estafilococos resistentes a meticilina, Trimetropin y vancomicina. Tiene un significativo efecto post-antibiótico, es bien tolerado y no tiene efectos adversos significativos. Se encuentra en fase clínica III.
Ceftabiprole	Excelente actividad contra SARM y estable frente a betalactamasas, y alta afinidad por PBP2a, se encuentra en fase clínica III.

Nieves Sopena y Miguel Sabría mencionan en su revisión, el siguiente tratamiento para contrarrestar las infecciones por SARM [Sopena Nieves SM, 2002]

- Tratamiento de las infecciones estafilocócicas: vancomicina, teicoplanina, cotrimoxazol, linezolid, quinupristina-dalfopristina.
- Tratamiento de portadores: Mupirocina.
- Tratamiento de colonización: evitar antibióticos sistémicos y limitar la duración de los tratamientos tópicos para prevenir la aparición de resistencia, mupirocina 2% y como alternativa bacitracina.

5.1. Mecanismo de acción de los Beta-Lactámicos y Glicopéptidos. Biosíntesis del peptidoglucano y mecanismo de acción de las penicilinas, vancomicina y teicoplanina.

La biosíntesis del peptidoglucano consta de cuatro etapas:

- 1- Síntesis de precursores solubles en el citoplasma.
- 2- Los precursores son transferidos a un transportador lipídico situado en la membrana citoplasmática (undecaprenil-fosfato).
- 3- Las unidades disacáridos se polimerizan en cadenas lineales fuera de la membrana, pero aún unidas al undecaprenil-fosfato de la membrana.
- 4- El polímero naciente reacciona por transpeptidación con un peptidoglucano aceptor preexistente.

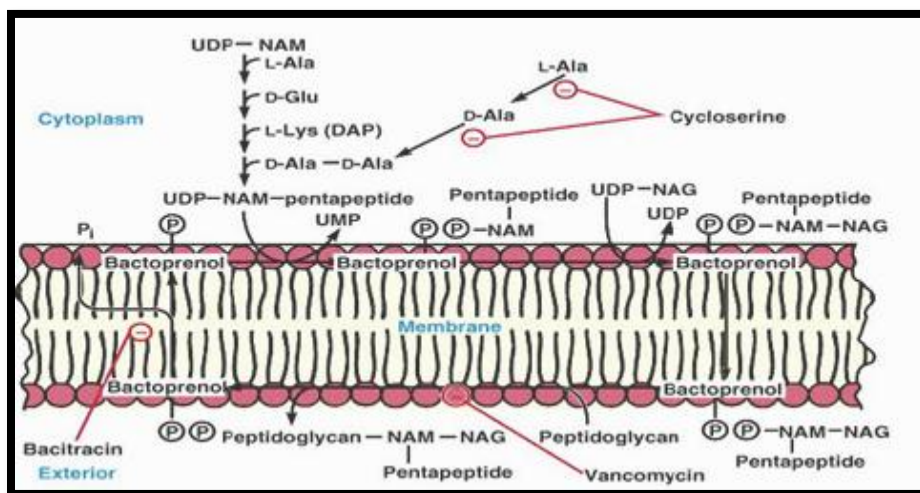


Figura 7. Síntesis de peptidoglucano y mecanismo de acción de los betalactámicos y vancomicina tomado de Prescott, 1999.

El proceso de ensamblaje del peptidoglucano es el punto de acción de diversos antibióticos en su acción terapéutica, ya que estos actúan inhibiendo o bloqueando diversos procesos.

Los monosacáridos que van a constituir la unidad disacárido repetitiva del esqueleto del peptidoglucano (N-acetil glucosamina y ácido N-acetil Murámico) se activan al unirse a uridín difosfato. El ácido N-acetil Murámico (ANAM) es un derivado de la N-acetil glucosamina (NAG) resultado de la adición del ácido láctico derivado del fosfoenol pirúvico (PEP). Luego de este proceso se va produciendo la adición secuencial y ordenada de los distintos aminoácidos al ANAM, reacciones que requieren energía e iones manganeso. Dichos aminoácidos son la L-ala, D-glu, L-lys, D-ala-D-ala, lo cual produce un ANAM pentapéptido.

El complejo formado anteriormente UDP-ANAM-pentapéptido se transfiere a un transportador de membrana llamado undecaprenil-fosfato o bactoprenol. Una vez que el ANAM pentapéptido está unido al undecaprenil, una transferasa, transfiere a este complejo

el NAG generándose el enlace β -1,4 entre NAG y ANAM. El bactoprenol unido al ANAM pentapéptido-NAG “se da vuelta” en la membrana quedando expuesta hacia el medio acuoso exterior de la membrana. Entonces tiene lugar la polimerización de varias unidades disacáridas y ello se logra en una reacción de transglucosidación (sito de acción de la vancomicina).

El polímero surgido de la fase anterior: una cadena lineal de peptidoglucano sin entrecruzar lo cual reacciona con otro peptidoglucano aceptor preexistente mediante una reacción de transpeptidación, es el sito en el cual ejerce su acción los antibióticos betalactámicos (Ver figuras 6 y 7) [Vázquez, 1986; White, 1995].

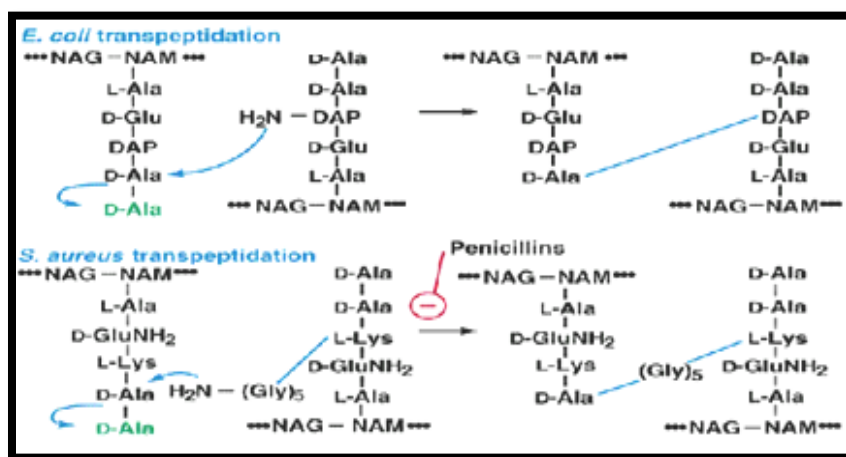


Figura 8. Mecanismo de transpeptidación; sitio en el cual actúan los betalactámicos tomado de Lansing M. Prescott, 1999.

5.2 Resistencia Antimicrobiana a los betalactámicos

5.2.1 Resistencia de *Staphylococcus aureus* a los betalactámicos La resistencia a meticilina es un mecanismo que implica resistencia intrínseca a todos los betalactámicos, incluyendo cefalosporinas y carbapenémicos. Sin embargo existen diversos mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos como ser un incremento en el nivel enzimático, mecanismo importante en el caso de la resistencia por plásmidos, uno de los mecanismos de resistencia de *Staphylococcus aureus* [Zepeda CJ, 1998].

Staphylococcus aureus ha desarrollado diversos mecanismos de resistencia que se explican a continuación:

a- **Producción de betalactamasas:** también denominada resistencia extrínseca. Las betalactamasas son enzimas extracelulares que inactivan a la penicilina mediante la hidrólisis de su enlace betalactámico. El determinante genético que codifica su síntesis (gen bla Z) se localiza habitualmente en plásmidos, que también suelen conferir resistencia a otros antibióticos. El mecanismo de inducción de las betalactamasas es el siguiente: la penicilina y sus análogos favorecen la producción de una proteína anti represora que al inhibir al gen represor de la betalactamasa (gen bla I), aumenta la síntesis de penicilinasas [Imsade, 1973; Imsade, 1978]

b- **Resistencia intrínseca:** también denominada resistencia a la meticilina, es un fenómeno genéticamente complejo donde la cepas de *Staphylococcus aureus* normalmente tiene cuatro tipos de proteínas de unión a penicilinas (PBP) , PBP 1, 2, 3 Y 4, mientras que SARM produce una quinta PBP o “extra” denominada PBP2A o PBP2’, que tiene menor afinidad a la meticilina y al resto de los antibióticos betalactámicos [Hartman BJ, 1986].

c-Tolerancia a los betalactámicos: este fenómeno es debido a una disminución de la actividad autolítica de la bacteria por la presencia de un exceso de inhibidores de las autolisinas. Las cepas tolerantes requieren para su lisis, una concentración de antibióticos, denominada Concentración Mínima Bactericida (CMB), mucho mayor que la necesaria para inhibir su crecimiento [Tuomanen E, 1986].

La resistencia a la meticilina, también puede detectarse en dos grupos de cepas de *Staphylococcus aureus* que no poseen el gen *mecA*. Se trata de “borderline-resistant *Staphylococcus aureus*” (BORSA) y de los “modified resistance *Staphylococcus aureus*” (MODSA).

BORSA: Estas cepas tienen una hiperproducción de betalactamasas y se caracterizan porque presentan Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) más elevadas que las cepas que producen la normalmente la enzima. Este tipo de resistencia fue descrita en 1986 por McDougal y Thornsberry [McDougal LK, 1986]. MODSA: se debe a la existencia modificación de las PBPs tales como PBP1 y PBP2 de baja afinidad y de una mayor concentración de PBP4, estas cepas fueron descubiertas en 1988 por Sierra-Madero y colaboradores.[Nieves Sopena, 1996; Sierra Madero JG, 1988; Thomasz A, 1989] .

En 1981 se descubrió el mecanismo de resistencia a meticilina denominado como resistencia intrínseca. Las cepas de *Staphylococcus sp.* se caracterizan por producir al menos 4 proteínas de unión a penicilinas PBP1, PBP2, PBP3, PBP4 actuando como catalizadores en las reacciones de transpeptidación en la síntesis de peptidoglucano en la construcción de la pared celular, entonces las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina se caracterizan por desarrollar una nueva PBP de baja afinidad por los

antibióticos betalactámicos, denominada PBP2a o PBP2', manteniendo la síntesis de la pared celular cuando las demás PBPs están inhibidas, continuándose la reacción de transpeptidación [Hayes M., 1981] [Chambers HF., 1994; De Lencastre H., 1991; Hartman A., 1981; Ordás, 2006]

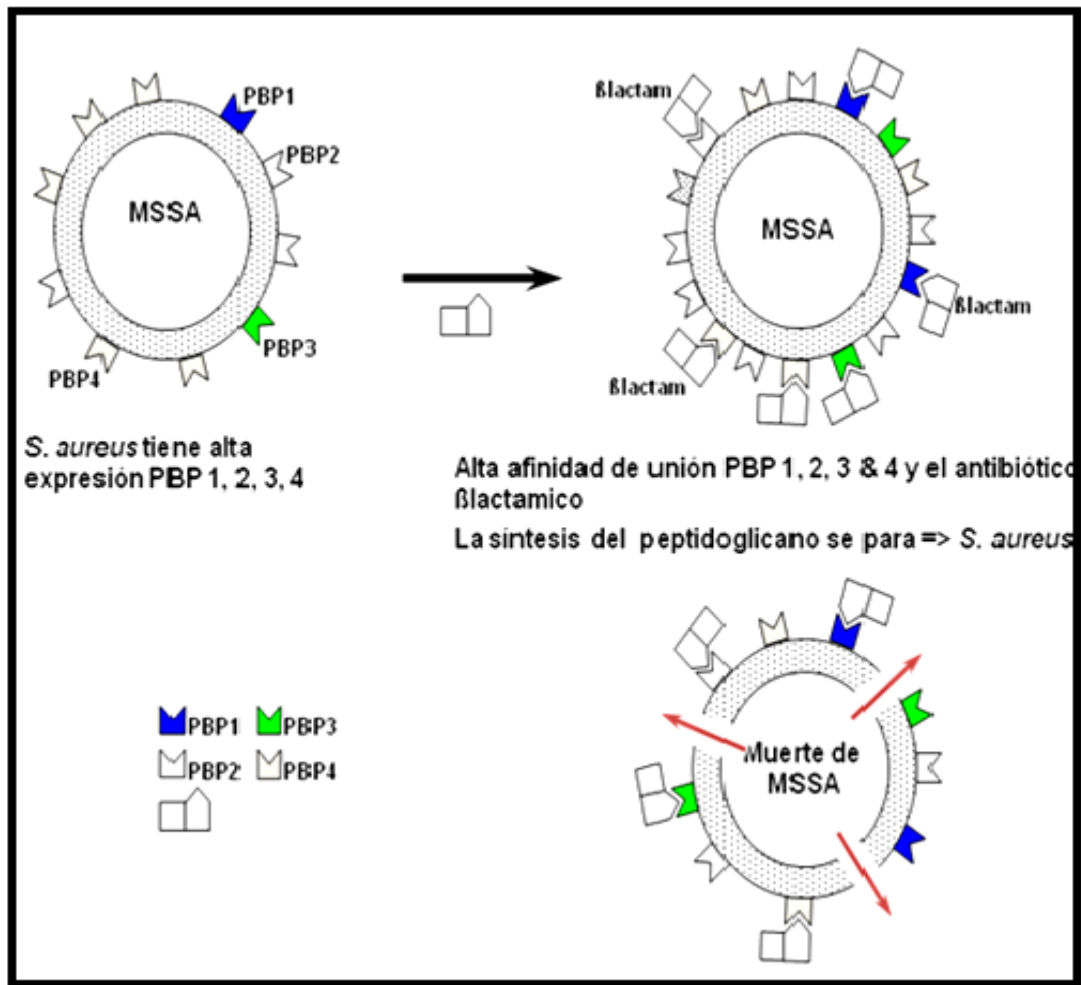


Figura 9. Mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos, interactuando con las diferentes proteínas de unión a penicilinas (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4). Tomado de Alberto Calvo (comunicación personal, evaluación de los medicamentos de resistencia de impacto clínico en *Staphylococcus aureus*)

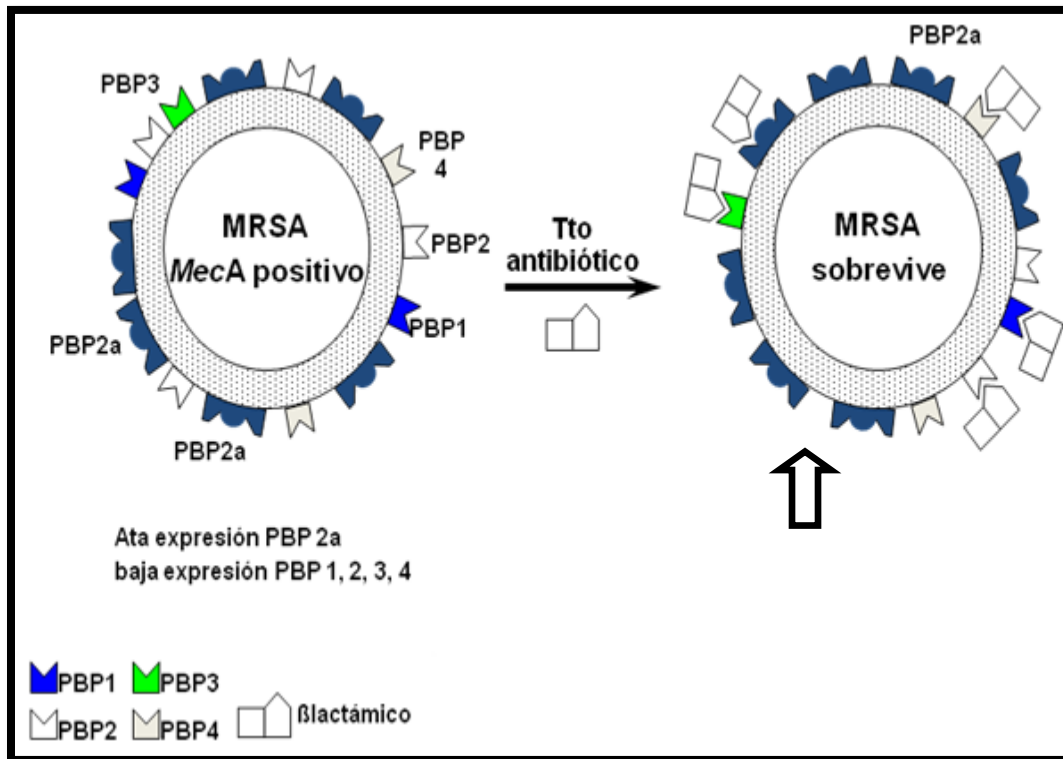


Figura 10. Mecanismo de resistencia del *Staphylococcus aureus* a los diferentes betalactámicos, en este caso la baja afinidad de los antimicrobianos a la proteína PBP2a. Tomado de Alberto Calvo (comunicación personal, evaluación de los medicamentos de resistencia de impacto clínico en *Staphylococcus aureus*)

El problema que ha suscitado en los últimos años, es la aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia disminuida a la vancomicina (SAIVh), al igual que la emergencia de cepas con resistencia total a vancomicina (SARV), quedando pocas alternativas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por SARM. A continuación se explican las características de la vancomicina así como los diversos mecanismos de resistencia.

6.1. Características generales de la vancomicina

La vancomicina junto con la teicoplanina, son antibióticos que pertenecen al grupo de fármacos denominados glicopéptidos, los cuales son moléculas complejas, que químicamente no están relacionados con otro tipo de antibacterianos [Pigrau C, 2003].

La vancomicina fue aislada a inicios de la década de 1950 y obtenida a partir de *Streptomyces orientalis*, el uso de este fármaco fue limitado debido a su nefrotoxicidad. Este antibiótico actúa sobre la pared bacteriana, inhibiendo la transglucilación y se ha empleado fundamentalmente para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos Gram positivos [Pigrau C, 2003].

La vancomicina se ha considerado durante más de 40 años el principal soporte de tratamiento para cepas SARM. Sin embargo el uso excesivo del mismo, ha conllevado a la aparición de cepas SARM con resistencia heterogénea, cepas con resistencia intermedia y cepas resistentes a vancomicina. [Appelbaum PC, 2006]. Los mecanismos de resistencia de cepas SARM a vancomicina difieren según sean aislados SAIV o SARV [Ordás, 2006].

6.2 *Staphylococcus aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina y *Staphylococcus aureus* con resistencia heterogénea a vancomicina

Desde que se demostró la eventualidad que las cepas SARM adquirieron resistencia a vancomicina a nivel laboratorial, la posibilidad que esto ocurriese a nivel clínico, creó preocupación en la comunidad científica [Noble WC, 1992]. En 1996, se aisló en Japón, la primera cepa SAIVh que provenía de un paciente que no respondía al tratamiento con vancomicina, la cepa fue llamada Mu3 y presentó CMI a vancomicina $\leq 4\mu\text{g/ml}$, la cual se consideraría susceptible, sin embargo, presentó subpoblaciones bacterianas que tenían la capacidad de crecer a concentraciones arriba de los $4\mu\text{g/ml}$ (Hiramatsu, 1997, Hiramatsu, 1998). La importancia de estas cepas, radica en la capacidad que tienen de evolucionar a cepas SAIV durante el curso de una infección [Sieradki K, 1999].

Asimismo, en 1996, se aisló en Japón la primera cepa SAIV, la cual provenía de un niño de 4 meses de edad, quien había sido sometido a una cirugía cardiaca y desarrolló una infección de herida quirúrgica causada por SARM. Este aislado presentó una CMI a vancomicina de $8\mu\text{g/ml}$, y fue nombrada como la cepa Mu50 [Hiramatsu K, 1997]. Posteriormente, en 1997, se aisló en Michigan una nueva cepa SAIV, en un paciente sometido a diálisis peritoneal ambulatoria que sufrió peritonitis. Un mes más tarde se aisló la tercera cepa SAIV en un paciente de New Jersey, seguidamente se reportó un caso en New York y un caso en Illinois; [Centers for Disease Control and Prevention, 1997a; Centers for Disease Control and Prevention, 2000; Gilliland KK, 1993] desde entonces se han reportado este tipo de cepas en el mundo. Tal es el caso de Kim y colaboradores quienes reportaron la primera cepa SAIV aislada en Corea, en 1999 Oliver y colaboradores encontraron los 3 primeros aislados de SAIV en Bélgica [Denis O, 2002; Kim MN, 2000]

Se han reportado cepas SAIVh y SAIV en Japón, Australia, Francia, Corea del Sur, Hong Kong, Sudáfrica, Tailandia, Israel entre otros . [Howden B, 2010]

Hiramatsu y colaboradores, en el 2001 describieron la hipótesis de que las cepas SAIVh, son precursoras de las cepas SAIV y ambos fenotipos se expresan dependiendo de la presión selectiva en el uso de glicopéptidos y betalactámicos [Ordás, 2006].

El mecanismo de resistencia de las cepas SAIV, supone un engrosamiento de la pared celular en las bacterias Gram positivas, por una alteración en el balance de las PBPs cuya base genética se desconoce. Las cepas SAIV, sintetizan grandes cantidades de peptidoglucano, aumentando la cantidad de residuos de D-alanil-D-alanina que se unen a las moléculas de vancomicina, capturándolas e impidiendo que estas moléculas alcancen su diana terapéutica en la membrana citoplasmática. (Figura 11).

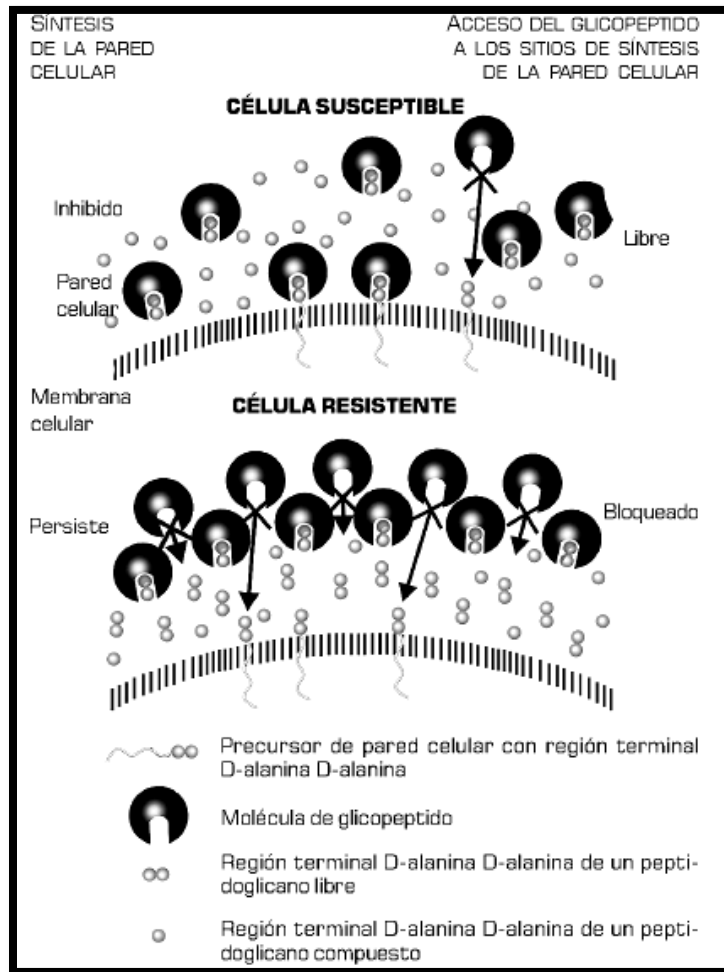


Figura 11. Engrosamiento de la pared celular en cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia disminuida a los glicopéptidos tomado de Domenech, Barcelona España [Domenech, 2003]

6.3 *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina

En el año 2002, se aisló por primera vez una cepa de *Staphylococcus aureus* con resistencia completa a la vancomicina. La cepa provenía del catéter de un paciente de 40 años de edad, con diabetes, enfermedad vascular y fallo renal crónico, previamente el paciente había sido tratado con vancomicina debido a una úlcera de pie, además se aisló del mismo sitio de la infección una cepa de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina, [Chang S, 2003], debido a este descubrimiento se ha supuesto que el mecanismo de resistencia total a vancomicina se deba a la presencia del gen *vanA*, debido a una posible transferencia conjugacional de este gen a partir del *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina al *Staphylococcus aureus*, causando una alteración en el péptido terminal D-alanil-D-alanina a D-alanil-D-lactato, impidiendo la inhibición de la síntesis de la pared celular por la vancomicina (figura 10) [Appelbaum PC, 2006].

Se han descrito 9 casos de SARV en el mundo, la información se resume en el cuadro 7

Cuadro 7. Aislamiento de cepas SARV en el mundo

Cepa	Fecha de aislamiento	de Procedencia	Referencia
MI-SARV	06/2002	Michigan	[Chang S, 2003]
PA-SARV	09/2002	Pensilvania	[Tenover FC, 2004]
NY-SARV	03/2004	New York	[Centers for Disease Control and Prevention, 2004]
MI-SARV	02/2005	Michigan	[Sievert DM, 2008]
MI-SARV	10/2005	Michigan	[Sievert DM, 2008]
MI-SARV	12/2005	Michigan	[Sievert DM, 2008]
MI-SARV	10/2006	Michigan	[Sievert DM, 2008]

1 aislamiento SARV en India, 1 aislamiento SARV en Irán (no han sido confirmados por el CDC).

7.1 Genoma de *Staphylococcus aureus*

Parte de la versatilidad de *Staphylococcus aureus* como patógeno, reside en la dinámica de su genoma. En la actualidad se encuentran disponibles 14 genomas de *Staphylococcus aureus* totalmente secuenciados, donde la presencia y distribución de algunos genes en particular establece la diferencia en resistencia y virulencia.

Entre los elementos genéticos móviles más importantes se encuentran:

- a. Los plásmidos crípticos los cuales codifican genes de resistencia a antibióticos.
- b. Transposones: los cuales codifican algunos genes de resistencia a antibióticos como el Tn554, Tn552, Tn5801 y Tn916-like
- c. Profagos: son bacteriófagos integrados en el genoma bacteriano hasta que algún daño externo induce su escisión y posterior movilización a otras cepas. Codifican toxinas que son importantes en la patogenicidad.
- d. Casetes de resistencia a antibióticos: elementos genéticamente móviles los cuales contienen elementos que confieren resistencia a antibióticos tales como transposones, plásmidos y secuencias de inserción

Estos son importantes en las cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico, ya que algunos contienen el casete cromosómico estafilocócico *mec* que porta el gen responsable de conferirle resistencia a la meticilina, denominado gen *mecA* [De Lencastre H., 2007b; Lindsay JA., 2006; Victor Manuel Baizabal Aguirre, 2009].

7.1.1 Gen *mecA*

El gen *mecA* es un segmento de ADN de un tamaño aproximado de 2 Kb que posee dos elementos reguladores (*mecR1- mecI*) que controlan la transcripción del gen, el cual se encuentra ubicado en un elemento genético denominado casete cromosómico estafilocócico (SCC*mec*). El gen *mecA*, se inserta en el sitio específico del cromosoma bacteriano (attBSCC), cerca del origen de replicación [Cárdenas Páez O., 2009; Grundmann H., 2006; Jiménez Quiceno JN., 2009; Matsushashi M., 1986]. La emergencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) se explica por la adquisición de ADN exógeno, a través del fenómeno denominado transferencia horizontal de genes, donde el elemento genéticamente móvil que contiene el gen *mecA* se inserta en el ADN cromosómico de una cepa meticilina sensible (SAMS).

El elemento genético móvil SCC*mec*, además de contener el gen *mecA*, contiene un sitio de inserción preferencial para transposones y copias integradas de plásmidos que llevan varios genes de resistencia para antibióticos no betalactámicos. Por lo que una vez adquirida la resistencia a betalactámicos, existe la potencialidad de que sea acompañada o seguida de la resistencia a otros antibióticos [Chambers, 1997; Katayama Y., 2000; Lowy, 2003].

Hace algunos años se caracterizaron varios tipos de SCC*mec*, los cuales difieren en tamaño y composición genética, por lo que se han identificado hasta la fecha ocho tipos de SCC*mec*. De los cuales 6 de los mismos han sido muy bien caracterizados (SCC*mec* I, II, III, IV, V, VI), (ver cuadro 8).

Estudios basados en el tipo de SCC*mec* y en análisis filogenéticos, clasifican las cepas de SARM desde dos puntos de vista: como cepas de SARM hospitalarias si presentan SCC*mec*

tipo I, II o III y cepas SARM adquiridas en la comunidad cuando presenten SCC*mec* tipo IV o V.

Además el SCC*mec* puede transportar en forma variable genes de resistencia a otros antibióticos como aminoglucósidos, clindamicina, eritromicina, rifampicina, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol [Diego Tibavizco, 2007; Fowler VG Jr, 2003; Lowy, 2003; Moreillon P, 2005].

Kriswirth y colaboradores llevaron a cabo un estudio donde se colectaron en un lapso de 30 años, 472 cepas de SARM provenientes de diferentes países del mundo. Mediante un análisis de “fingerprinting” o huellas génicas del gen *mecA*, lograron agrupar solamente 6 perfiles divergentes, demostrándose que todas las cepas de SARM derivan de un ancestro en común [Catalano, 1994; Kreiswirth BN., 1993].

7.1.2 Estructura del casete cromosómico SCC*mec*

El SCC*mec* tiene tres componentes genéticos esenciales, son ellos: el complejo de genes *mec*, el complejo de genes *ccr* y una región conocida como región J o “junkyard”. El complejo *mec* contiene además el elemento de inserción IS431*mec*, que ha sido frecuentemente asociado con genes que codifican resistencia a diversos antibióticos y a metales pesados como el mercurio, en algunos aislamientos se encuentra también la secuencia de inserción IS1272 además de otras secuencias de inserción, plásmidos y transposones. Con base en su estructura se han identificado cuatro clases de complejo *mec*: A, B, C, D, siendo las 2 primeras clases las más comunes en *Staphylococcus aureus*.

Se han reportado 5 tipos del complejo *ccr*, cuatro de ellos denominados del 1 al 4, que comparten aproximadamente el 80% de la identidad y presentan los genes *ccrA* y *ccrB*, el quinto tipo más recientemente descrito se denomina *ccr5* o *ccrC*.

El resto del casete cromosómico contiene secuencias de la región J o “junkyard”, que comprende tres fragmentos, J1,J2,J3 que pueden contener plásmidos o transposones portadores de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos y a metales pesados [De Lencastre H., 2007a; Ito T., 2001; Ito T., 2004; Jiménez Quiceno JN., 2009; Nour M., 2005; Zhang K., 2005]

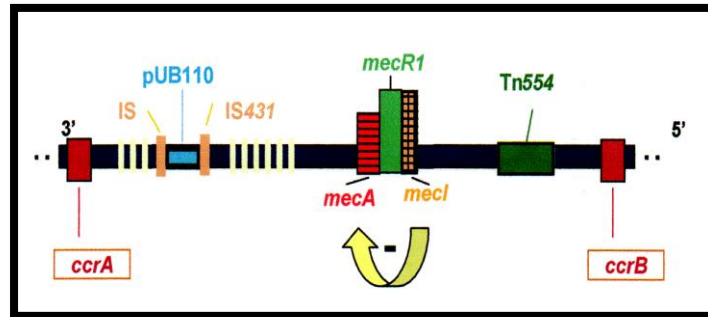


Figura 12. Representación de un fragmento del DNA cromosómico de SARM

Cuadro 8. Tipos de casetes estafilocócicos cromosómicos y su composición [Jiménez Quiceno JN., 2009; Ordás, 2006]

Tipo de Casete	Composición
Scc <i>mec</i> I	<i>ccr</i> tipo 1(<i>ccrA1</i> , <i>ccrB1</i>), complejo <i>mec</i> clase B (<i>mecA</i> , <i>mecR1</i>), IS1271, IS4431.
Scc <i>mec</i> II	<i>ccr</i> tipo 2 (<i>ccrA2</i> , <i>ccrB2</i>), complejo <i>mec</i> clase A (<i>mecA</i> , <i>mecR1</i> , <i>mecI</i>). IS431, pUB110, Tn554
Scc <i>mec</i> III	<i>ccr</i> tipo 3 (<i>ccrA3</i> , <i>ccrB3</i>), complejo <i>mec</i> clase A (<i>mecA</i> , <i>mecR1</i> , <i>mecI</i>), Tn 554, pT181, pI256, IS431, IS256.
Scc <i>mec</i> IV	<i>ccr</i> tipo 2(<i>ccrA2</i> , <i>ccrB2</i>), complejo <i>mec</i> clase B (<i>mecA</i> , <i>mecR1</i>), IS1272.
Scc <i>mec</i> V	<i>ccr</i> C, IS431, <i>mecA</i> <i>mecR1</i>
Scc <i>mec</i> VI	<i>ccrB4</i> , <i>ccrA4</i> , IS1272, <i>mecRI</i> , <i>mecA</i> , IS431
Scc <i>mec</i> VII	CcrC,IS431, <i>mecA</i> , <i>mecR1</i> ,
Scc <i>mec</i> VIII	CcrA4, CcrB4, Tn554, IS431, <i>mecA</i> <i>mecR1</i> <i>mecI</i>

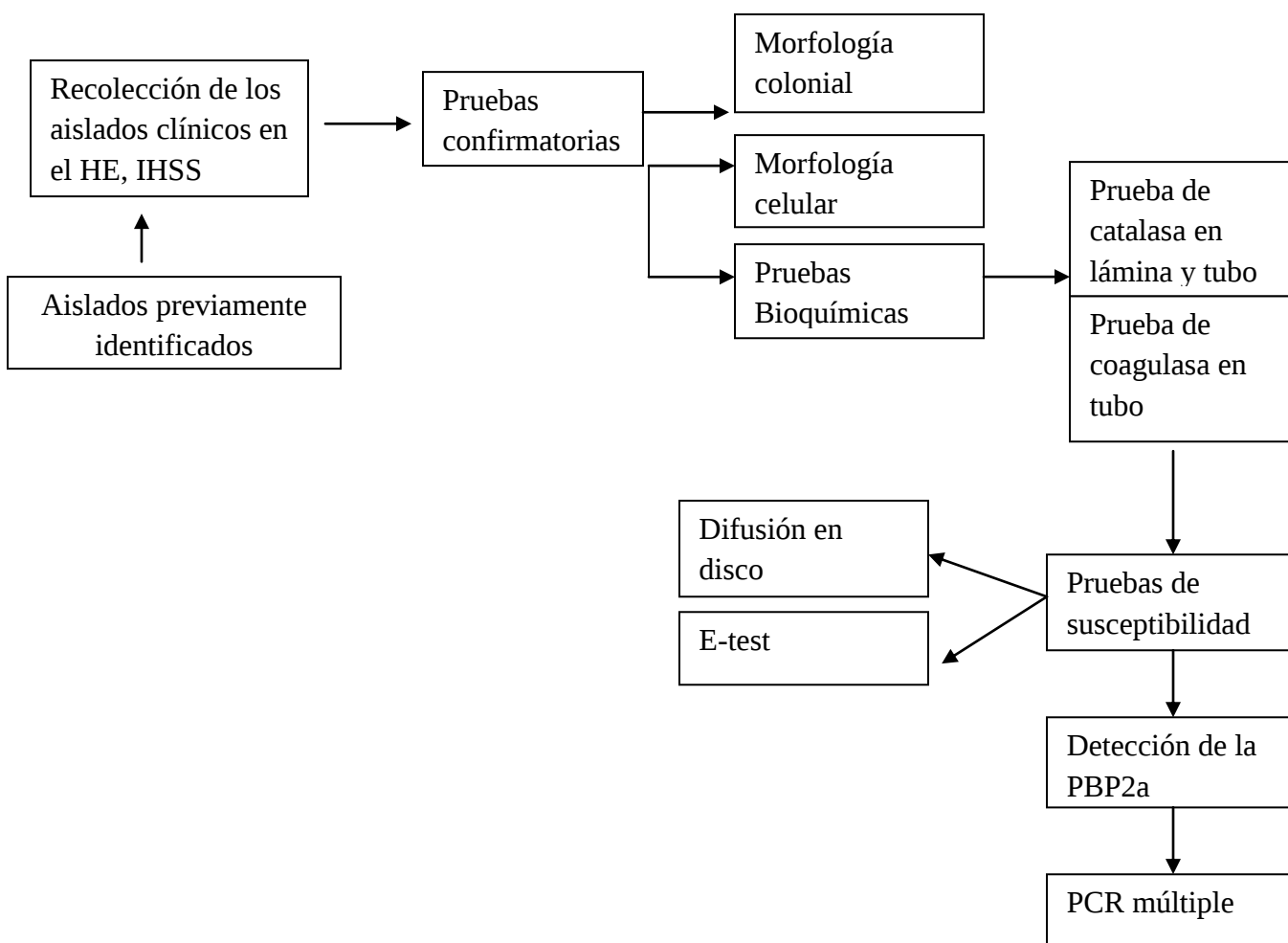
Capítulo 3: Metodología:

En el presente estudio se determinó el perfil de resistencia del *Staphylococcus aureus* a oxacilina, meticilina, cefoxitina y vancomicina, medicamentos de elección en casos de infecciones causadas por el agente antes mencionado. Asimismo, el estudio se basa en la teoría biologicista, donde el objetivo primordial del mismo, es el análisis del comportamiento de la bacteria frente a los diversos antimicrobianos, utilizando diversas técnicas a nivel laboratorio, 3 de las cuales fueron implementadas por primera vez en el país con la finalidad de evaluar los parámetros de sensibilidad y especificidad.

Las técnicas utilizadas se clasificaron en 2 tipos: pruebas fenotípicas, tales como la prueba de difusión en disco; descrita por Bauer y colaboradores, así como también la prueba de E-test® (Solna, Suecia) y la detección de la proteína de unión a penicilinas conocida como PBP2a, (Oxoid®) de la misma forma se implementó una prueba molecular conocida con el nombre de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR para la detección del gen *mecA*, uno de los determinantes de la resistencia a los diversas drogas betalactámicas disponibles hasta la fecha.

A continuación se presenta el flujograma de actividades en el cual se describen la serie de operaciones realizadas para la ejecución del proyecto

Flujograma de trabajo



Tipo de estudio: Descriptivo transversal.

Área de estudio: El estudio se realizó en el Hospital Escuela y en el Instituto Hondureño de Seguridad Social en un periodo de octubre del 2010 a enero del 2011. Ambos hospitales están ubicados en la ciudad de Tegucigalpa, Honduras.

Universo y muestra: se consideró como universo, todos los aislados de *Staphylococcus aureus* que cumplieron los siguientes criterios de inclusión: aislados provenientes de todas las salas del Hospital Escuela y del Instituto Hondureño de Seguridad Social (IHSS) en un periodo de octubre del 2010 a enero 2011. Se calculó el tamaño de la muestra tomándose en cuenta los valores de $Z=1.96$, una prevalencia esperada del 29% (WHONET, 2008, comunicación personal), y un valor de Q del 71%. Se tomó como error el 10%, dando como resultado una muestra mínima de 79 aislados, sin embargo se recolectaron finalmente un total de 114 aislados clínicos. A cada uno de los aislados se le asignó un código de identificación: SA-HE para *Staphylococcus aureus* aislados del Hospital Escuela y SA-IHSS para *Staphylococcus aureus* aislados del Instituto Hondureño de Seguridad Social seguido por el número correspondiente en orden ascendente.

Tipo de muestreo: Muestreo probabilístico

Plan de tabulación y análisis: para la determinación de frecuencias y porcentajes de susceptibilidad y resistencia a drogas, se utilizó el programa estadístico Epiinfo versión 3.4.3 y para la determinar la correlación entre las variables a analizar, se utilizó el paquete estadístico Epidata versión 3.0 mediante la utilización del índice kappa, con intervalos de confianza del 95%.

Métodos y técnicas utilizadas

Morfología colonial: se basa en la observación de las diversas colonias formadas en un medio de cultivo selectivo, en este caso gelosa sangre al 5%.(anexo 1.6) Aquí se pueden determinar: tamaño de la colonia, color, consistencia, borde, opacidad y acción sobre el medio. Para la obtención de las colonias bacterianas se requiere el aislamiento de las mismas mediante la técnica de Frobisher [Murray P, 2005] (anexo 1.8).

Tinción de Gram: Esta prueba se utiliza para diferenciar la estructura de la pared celular en las bacterias. Se colorean de morado las bacterias Gram positivas y de rojo las bacterias Gram negativas.[Murray P, 2005].(anexo 1.9).

Prueba de catalasa: Indica la presencia de la enzima catalasa. Esta enzima desdobla el peróxido de hidrógeno en dos moléculas: agua y oxígeno. La prueba indica positividad al observarse formación de burbujas. Se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus sp.* del género *Streptococcus sp.*[Murray P, 2005](Anexo 1.9)

Prueba de coagulasa: Esta enzima presente en *Staphylococcus aureus*, provoca la formación de coágulos o grumos cuando se mezcla una suspensión bacteriana con plasma. Esta prueba se utiliza para diferenciar las diversas especies de estafilococos. Esta es considerada como la prueba de referencia para diferenciar *Staphylococcus aureus* de los demás estafilococos.[Murray P, 2005] (Anexo 1.9).

Susceptibilidad a drogas mediante difusión en disco (método de Kirby-Bauer): prueba que detecta resistencia/susceptibilidad de los microorganismos a las drogas. Esta técnica consiste en un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, impregnado con el antibiótico a

probar, el cual se difunde en el medio seleccionado, en este caso Agar Muller Hinton.[Bauer AW, 1966].(Anexo 1.10)

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI, Prueba E-test): técnica que combina la prueba de difusión en disco y la prueba de dilución en caldo. Utiliza una tira de plástico que contiene concentraciones crecientes de un determinado antibiótico que van desde 0,016 µg/ml hasta 256 µg/ml [BioMérieux SA, 2011; Rosales, 1997].(Anexo 1.10)

Detección de la proteína de unión a penicilinas (PBP2a): ensayo de aglutinación comercial que contiene partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína de unión a penicilinas denominada PBP2a, presente en SARM, que no posee afinidad por todos los antibióticos de tipo betalactámicos (Oxoid®).(Anexo 1.11)

Detección del gen *mecA*: A través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual es una prueba molecular considerada como el método de referencia para la detección de SARM. [Toruño., 2003].(Anexo 1.12).

Consideraciones éticas: No se aplicó consentimiento informado, ya que este estudio no implicó algún procedimiento que involucró alteración física o psicológica. Se trabajó directamente con la muestra y durante la recolección de las mismas se protegió la identidad del paciente, sin embargo este estudio se sometió y fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación (CEI) del IHSS.

Consideraciones de bioseguridad: Anexo 1.1-1.5

Capítulo 4: Resultados

Población de estudio

Para llevar a cabo el presente estudio, se recolectó durante el periodo del 01 de octubre del 2010 al 31 de enero del 2011 un total de 114 aislados bacterianos, identificados como *Staphylococcus aureus* mediante el sistema automatizado Vitek 2 Compact (BioMérieux, Francia), 70 procedentes del Hospital Escuela (HE) y 44 del Instituto Hondureño de Seguridad Social (IHSS). Los 114 aislados recolectados en ambos hospitales fueron trasladados al laboratorio de investigación de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

Identificación bacteriana

Todos los aislados fueron cultivados en placas conteniendo gelosa sangre al 5% e incubados a 37°C durante 24 horas. Como se puede observar en la figura 14a y 14b, las colonias presentaron una morfología colonial característica, con tamaños entre 2 y 4 mm de diámetro, convexas, opacas, lisas, de consistencia no mucoide y de color dorado o blanco, con hemólisis variable. Sin embargo, el aislado número 70 procedente del Hospital Escuela (SA-HE-070) mostró una morfología colonial diferente a los demás aislados, con colonias grisáceas de 1 mm de diámetro (Fig. 14b).

Todos los aislados se tiñeron mediante Gram y se observaron al microscopio como cocos Gram positivos dispuestos en parejas, tétradas y agrupados como “racimos de uvas” (Fig.14c).

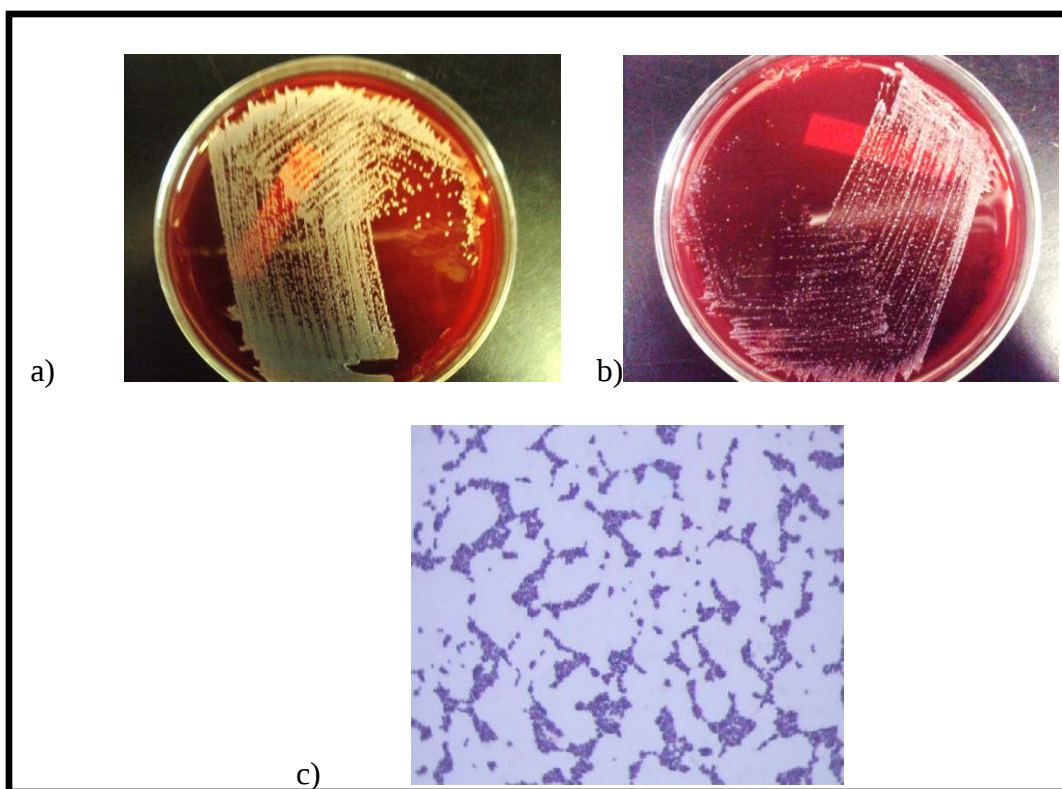


Figura 14. Morfología colonial de *Staphylococcus aureus* en agar sangre 5%. a) Imagen representativa de la mayoría de los aislados, b) aislado SA-HE-070, c) tinción de Gram

Como se observa en las figuras 15a y 15b, todos los aislados fueron positivos para la prueba de catalasa en lámina y catalasa en tubo. Sin embargo, de los 114 aislados, 111 fueron positivos para la prueba de coagulasa en tubo y 3 resultaron negativos (Fig. 15 c y d). Además, 14 aislados resultaron ser repetidos de los mismos pacientes. Finalmente, un aislado fue descartado por contaminación, quedando un total de 96 aislados para los ensayos posteriores, 57 del Hospital Escuela y 39 del IHSS.

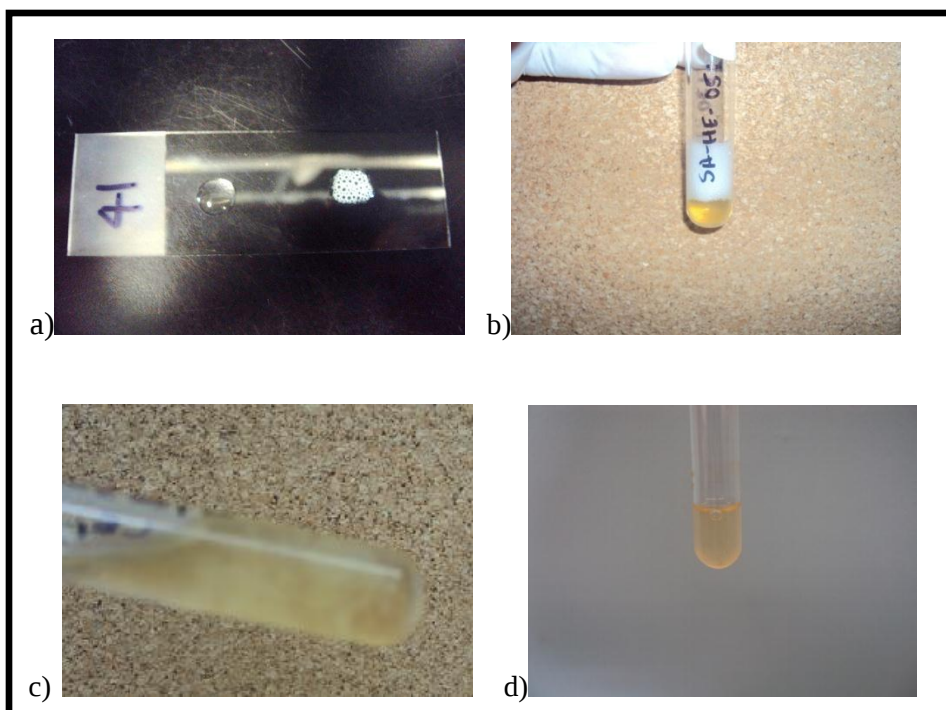


Figura 15. Pruebas de identificación bacteriana. a) Catalasa en lámina; b) Catalasa en tubo; c) Prueba de coagulasa positiva; d) Prueba de coagulasa negativa.

Pruebas de susceptibilidad *in vitro* mediante difusión en disco

Se realizaron las pruebas para el control de calidad del medio de cultivo y de los discos de antibióticos, de acuerdo con las recomendaciones del CLSI, los resultados estuvieron dentro de los parámetros establecidos.

De acuerdo a los criterios establecidos por el CLSI, se consideró un aislado de *Staphylococcus aureus* susceptible a oxacilina cuando los halos de inhibición formados alrededor del disco fueron ≥ 13 mm de diámetro, con resistencia intermedia entre 11 y 12 mm y resistentes ≤ 10 mm, respectivamente [Cockerill FR, 2011]. De la misma forma se utilizaron los siguientes criterios de interpretación para los halos de inhibición producidos por la metilicina: susceptible ≥ 14 mm, resistencia intermedia entre 11 y 14 mm, y resistente ≤ 10 mm de diámetro, asimismo susceptible a cefoxitina ≥ 22 mm y resistente < 22 mm.

En las figuras 16, 17, 18 se muestran las frecuencias de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos al enfrentar los discos de oxacilina, meticilina y cefoxitina con los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*. Los halos de inhibición con ambos discos fueron menores a los 10 mm de diámetro en 15 de los 96 aislados (15.63%), interpretándose como resistentes. La mayoría de los aislados susceptibles presentaron halos de inhibición entre 13-19 mm para oxacilina y entre 14-19 mm para meticilina y arriba de los 23 mm para la cefoxitina. No se observaron halos de inhibición que estuvieran dentro del rango intermedio.

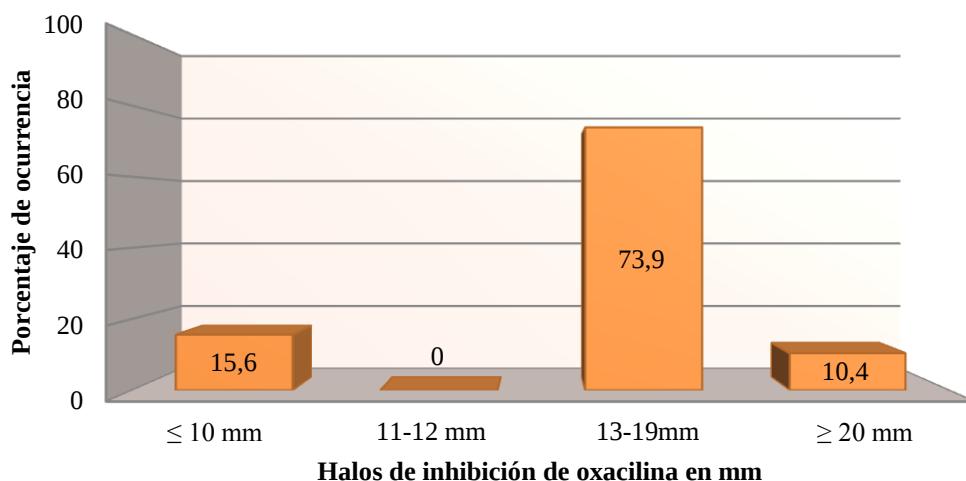


Figura 16. Diámetros de los halos de inhibición con discos de oxacilina

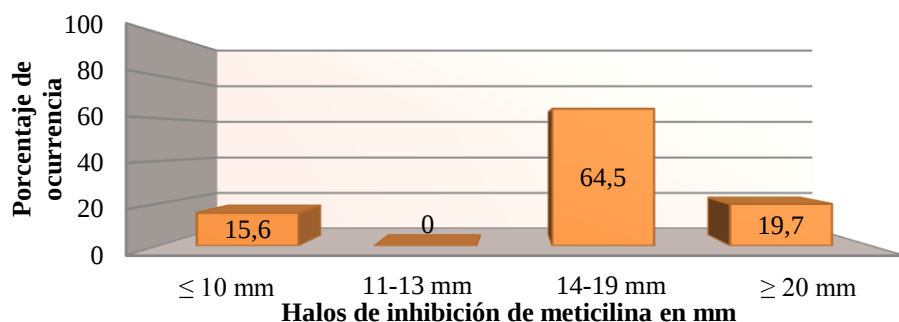


Figura 17. Diámetros de los halos de inhibición con discos de meticilina

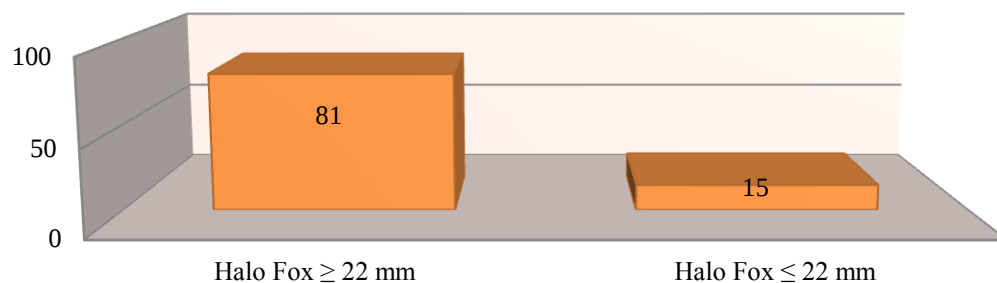


Figura 18. Diámetros de los halos de inhibición con discos de cefoxitina

Como se muestra en la figura 19, dos aislados provenientes del Hospital Escuela (SA-HE-041 y SA-HE-070) que resultaron resistentes a oxacilina a meticilina y cefoxitina, mediante el método de Kirby-Bauer formaron halos de inhibición “fantasmas” alrededor de los discos, caracterizados por la presencia de abundantes colonias dentro del aparente halo, por lo que se procedió a evaluar su resistencia a los betalactámicos mediante la detección de la CMI.

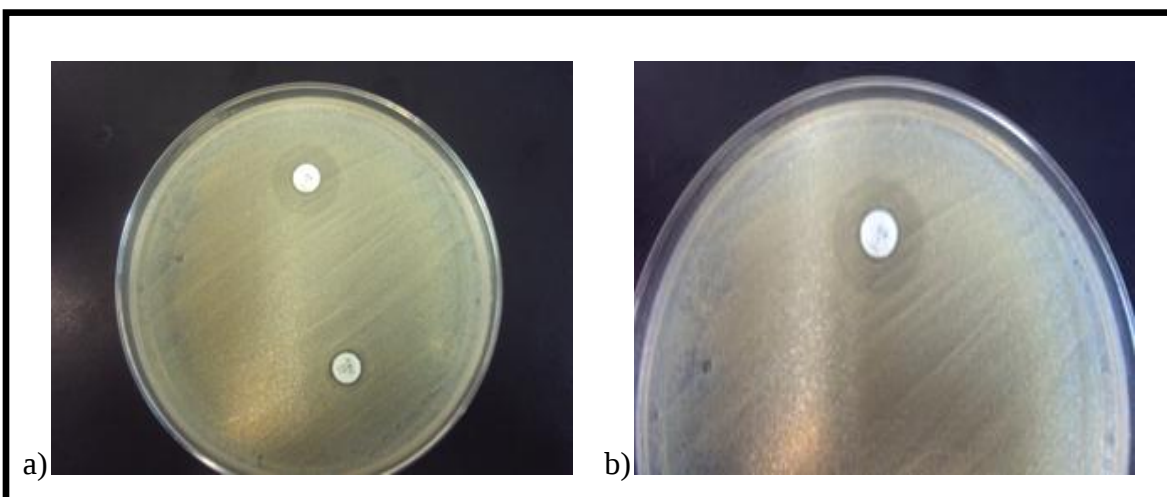


Figura 19. Halos de inhibición “fantasmas” en aislados clínicos: a) SA-HE-041 y b) SA-HE-070

Siguiendo el mismo método, se probaron los discos de vancomicina para evaluar presuntamente la presencia de aislados SARV, aun cuando el CLSI no recomienda su uso para este fin. [Cockerill FR, 2011]. No obstante, todos los halos de inhibición oscilaron entre los 15 y 21 mm de diámetro, bien definidos y sin crecimiento de colonias dentro de los mismos, por lo que se pudo descartar de forma preliminar la existencia de aislados resistentes a vancomicina. Al igual que en los betalactámicos, se procedió a evaluar de forma definitiva la resistencia intermedia de *Staphylococcus aureus* a vancomicina (SAIV) mediante la detección de la CMI.

Determinación de la CMI para oxacilina y vancomicina

De acuerdo a los puntos de corte establecidos por el CLSI, se consideraron aislados susceptibles a oxacilina mediante las tiras de E-test, aquellos aislados con valores de CMI ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ y resistentes si la CMI ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ [Cockerill FR, 2011].

La determinación de CMI con oxacilina produjo halos de inhibición elípticos muy bien definidos en todos los aislados. Solamente el SA-HE-041 (resistente) formó un “halo fantasma” alrededor de la tira, similar al formado en la prueba de difusión en disco. La CMI fue de 48 $\mu\text{g/ml}$, con la aparición de colonias dentro de la elipse por lo que fue clasificado como resistente a oxacilina (Fig. 20). Asimismo el aislado SA-HE-070, que había presentado resistencia por difusión en disco, mostró una CMI de 1.5 $\mu\text{g/ml}$, susceptible de acuerdo al CLSI.

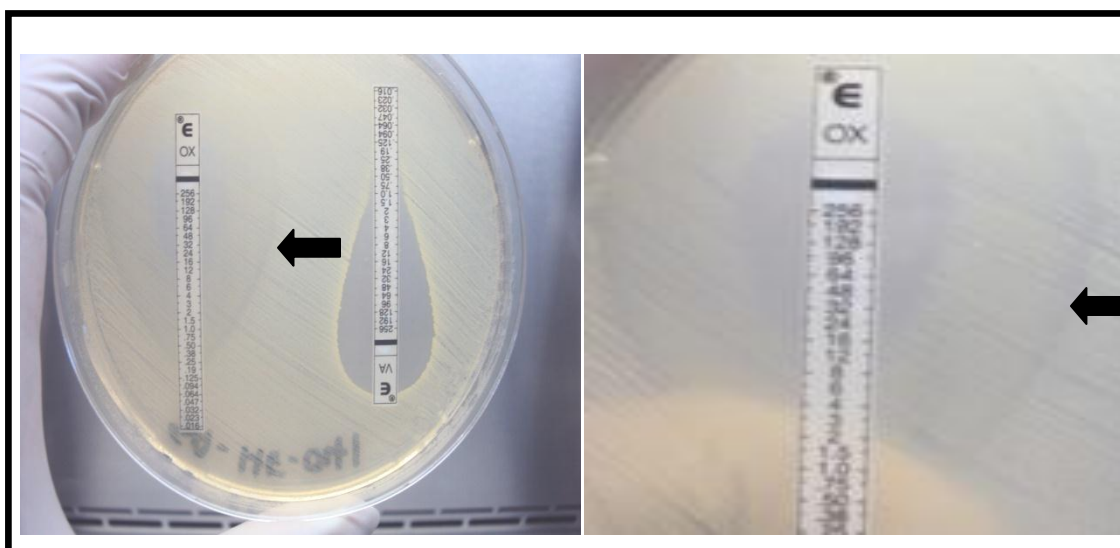


Figura 20. Elipse “fantasma” rodeando la tira de oxacilina en el aislado SA-HE-041

En la figura 21 se puede observar la distribución de frecuencias de CMI de oxacilina que se presentaron en el ensayo de E-test. El 50% mostró una CMI $\leq 0.38 \mu\text{g/ml}$ (CMI₅₀) y el 90% una CMI $\leq 32 \mu\text{g/ml}$ (CMI₉₀).

En total se detectaron 14 (14.6%) aislados con CMI por encima de los $4 \mu\text{g/ml}$, considerados como resistentes, y 82 aislados fueron susceptibles, con una CMI menor a $2 \mu\text{g/ml}$ (85.4%).

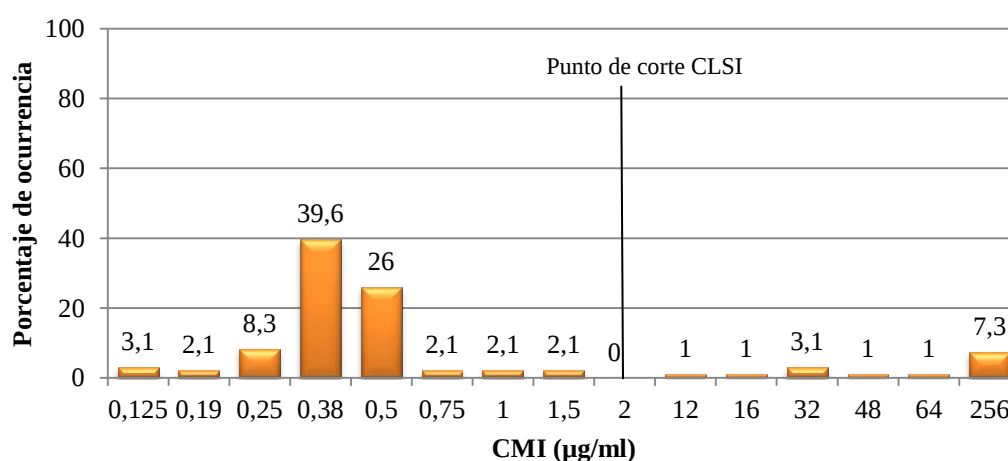


Figura 21. CMI de oxacilina en aislados de *Staphylococcus aureus*

De la misma forma, se determinó la CMI de vancomicina mediante E-test. De acuerdo con CLSI, el punto de corte para aislados susceptibles a vancomicina es $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, intermedios entre 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ y resistentes $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ [Cockerill FR, 2011].

En la figura 22 se puede observar la distribución de frecuencias de CMIs a vancomicina que se presentaron en el ensayo de E-test. El 50% mostró una CMI $\leq 0.75 \mu\text{g/ml}$ (CMI₅₀) y el 90% una CMI $\leq 1.5 \mu\text{g/ml}$ (CMI₉₀). Se encontraron 3 aislados que mostraron una CMI de 2 $\mu\text{g/ml}$ (SA-HE-056, SA-HE-070 y SA-IHSS-023), valor límite de susceptibilidad a vancomicina, además de presentar resistencia a meticilina. Por esta razón, fueron sometidos nuevamente a análisis por sistema automatizado Vitek, que generó reportes de probables fenotipos SAIVh.

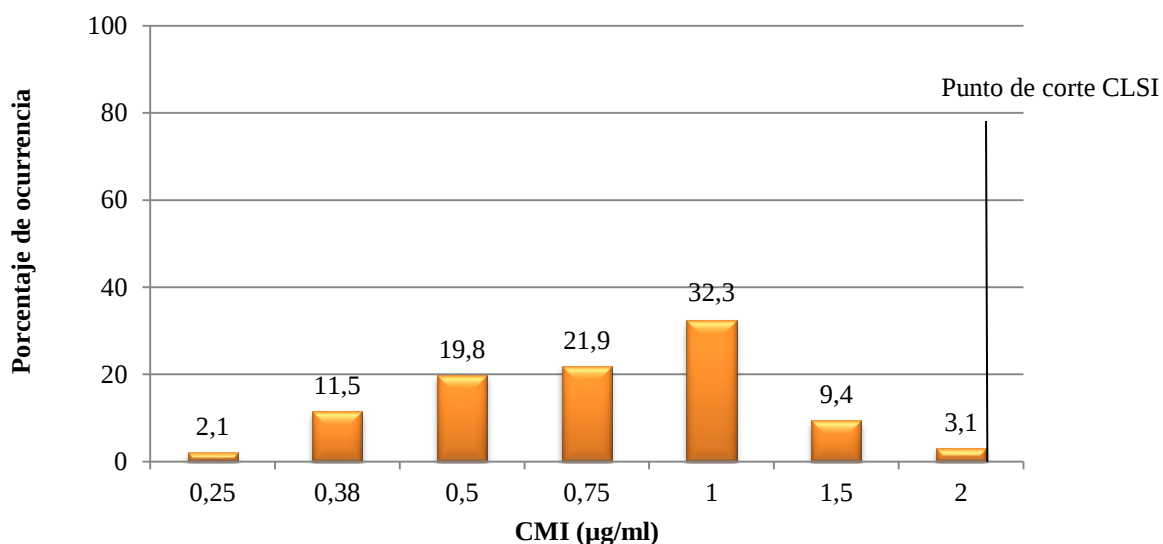


Figura 22. CMI de vancomicina frente a *Staphylococcus aureus*

Detección de la proteína PBP2a

De los 96 aislados clínicos incluidos en el estudio, un total de 82 no mostraron ninguna aglutinación mediante la técnica utilizada, lo que se interpretó como ausencia de la PBP2a. 81 aislados fueron susceptibles a meticilina mediante las pruebas fenotípicas de difusión en disco y E-test. Solamente el aislado SA-HE-041, que mostró resistencia a los betalactámicos, no expresó la proteína PBP2a. Finalmente, 14 fueron positivos por PBP2a, observándose grumos grandes y bien definidos dentro de los primeros 3 minutos (Figura 23).

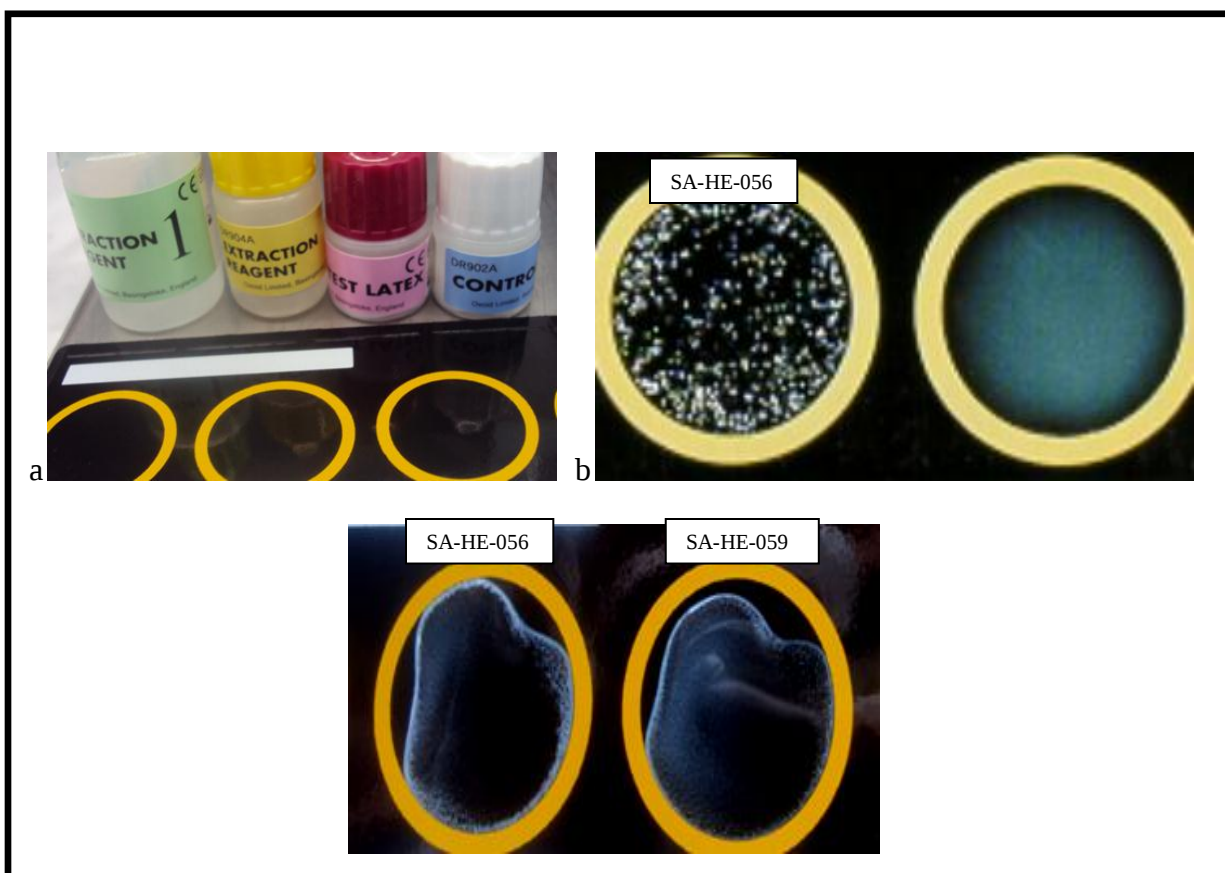


Figura 23. Prueba de aglutinación en látex. a) Kit comercial Oxoid® PBP2a látex; b) Control positivo c) Aislados positivos para la detección de PBP2a; c y d) Control negativo

Detección del gen *mecA*

La estandarización del ensayo para la detección molecular del gen *mecA* no presentó ningún problema, desde la extracción de ADN hasta el desarrollo de una PCR múltiple la cual detectó simultáneamente 2 regiones altamente conservadas de los genes en estudio. El producto de amplificación fue idéntico en todos los aislados *mecA* positivos, independientemente del nivel de resistencia medido en términos de CMI y difusión en disco.

Todos los aislados presentaron las bandas de 370 pb correspondientes al gen ribosómico ARNr 16S, altamente conservado en bacterias. Un total de 14 aislamientos fueron *mecA* positivos, mostrando bandas de identificación muy bien definidas de 310 pb, como se muestra en la figura 24.1 y 24.2. En los pocillos señalados con flechas se colocaron aislados clínicos que fueron fenotípicamente resistentes y *mecA* positivos.

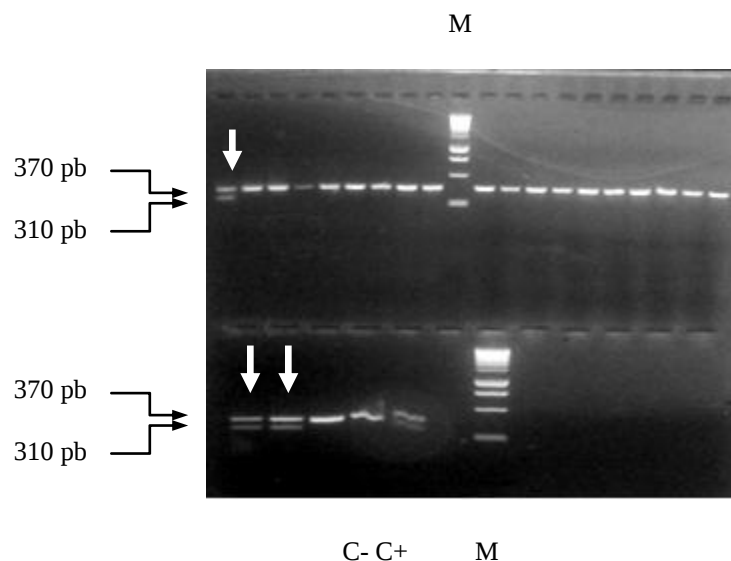


Figura 24.1 PCR multiplex de los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*. M, marcador de peso molecular; C-, control negativo; C+, control positivo. Flechas, aislados positivos por *mecA*

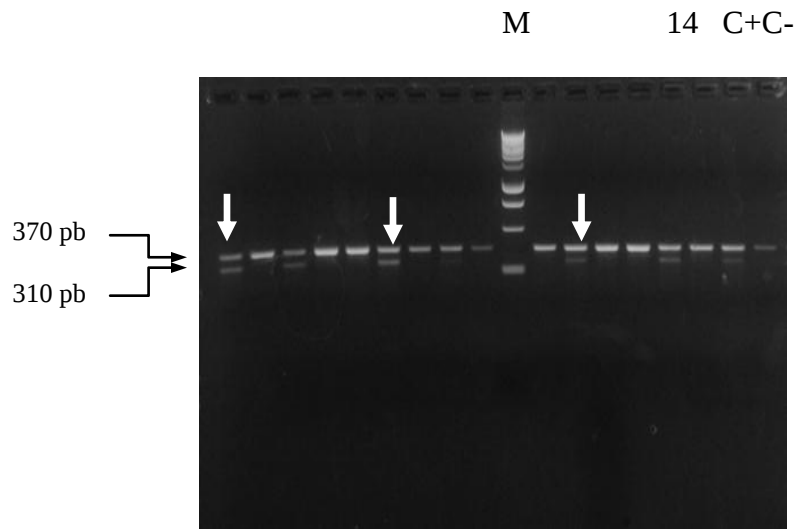


Figura 24.2 PCR multiplex de los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*. M, marcador de peso molecular; C-, control negativo; C+, control positivo. Flechas, aislados positivos por *mecA*; pocillo 14, SA-HE-070 (CMI 1.5 µg/ml).

En la figura 25 se observa que todos los aislados fueron *mecA* negativos. En el pocillo señalado con la flecha se colocó el aislado SA-HE-041, fenotípicamente resistente, pero no expresó la PBP2a ni el gen *mecA*.

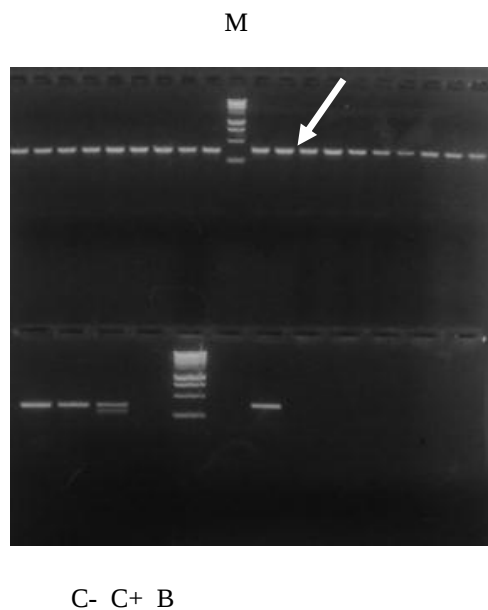


Figura 25. PCR multiplex de los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*. M, marcador de peso molecular; C-, control negativo; C+, control positivo; B, blanco; Flecha, aislado SA-HE-041.

Análisis estadístico para la comparación de pruebas

Cuadro 9. Concordancia entre los métodos de difusión en disco y E-test

	Difusión en disco +	Difusión en disco -
E-test +	14	0
E-test -	1	81

El índice kappa mostró una excelente concordancia del 95.94% entre las técnicas de difusión en disco (Kirby-Bauer) y detección de CMI mediante E-test para la oxacilina.

Cuadro 10. Concordancia entre los métodos de difusión en disco y aglutinación en látex

	Difusión en disco +	Difusión en disco -
PBP2a+	14	0
PBP2a-	1	81

El índice kappa mostró una excelente concordancia del 95.94% entre las técnicas de difusión en disco (Kirby-Bauer) y detección de PBP2a mediante aglutinación para la oxacilina.

Cuadro 11. Concordancia entre las pruebas de difusión en disco y PCR para la detección del gen *mecA*

	Difusión en disco +	Difusión en disco -
mecA+	14	0
mecA-	1	81

El índice kappa mostró una excelente concordancia del 95.94% entre las técnicas de difusión en disco (Kirby-Bauer) y detección del gen *mecA* mediante PCR.

Cuadro 12. Correlación entre las pruebas E-test y PBP2a

	E-test +	E-test -
PBP2a+	13	1
PBP2a-	1	81

El índice kappa mostró una excelente concordancia del 91.64% entre las técnicas de E-test y detección de la PBP2a.

Cuadro 13. Concordancia entre las pruebas E-test y *mecA*

	E-test +	E-test -
mecA+	13	1
mecA-	1	81

El índice kappa mostró una excelente concordancia del 91.64% entre las técnicas de E-test y detección del gen *mecA* mediante PCR.

Cuadro 14. Concordancia entre detección de PBP2a y *mecA*

	<i>mecA</i> +	<i>mecA</i> -
PBP2a+	14	0
PBP2a-	0	82

De acuerdo con el análisis de índice kappa, la concordancia existente entre la expresión de la proteína PBP2a y el gen *mecA* fue del 100 %.

Sensibilidad y especificidad de las pruebas

Se calculó la sensibilidad y especificidad de las pruebas realizadas, tomando como prueba de referencia la detección del gen *mecA* (cuadro 14).

Cuadro 15: Sensibilidad y especificidad de las pruebas (IC95%)

Prueba	Sensibilidad	Especificidad	Intervalo de confianza (95%)
Difusión en disco	100.00%	98.78%	96.43%-100.0%
E-test	92.86%	98.78%	89.20%-96.51%
PBP2a	100.00%	100.00%	96.93%-98.19%

Origen de los aislados SARM

Las muestras clínicas de las cuales se aislaron los SARM fueron en su mayoría secreciones de abscesos y heridas, como se muestra en la figura 26. El origen clínico de los aislados susceptibles a oxacilina no se obtuvo en su totalidad, razón por la cual, la información no fue utilizada para los cálculos.

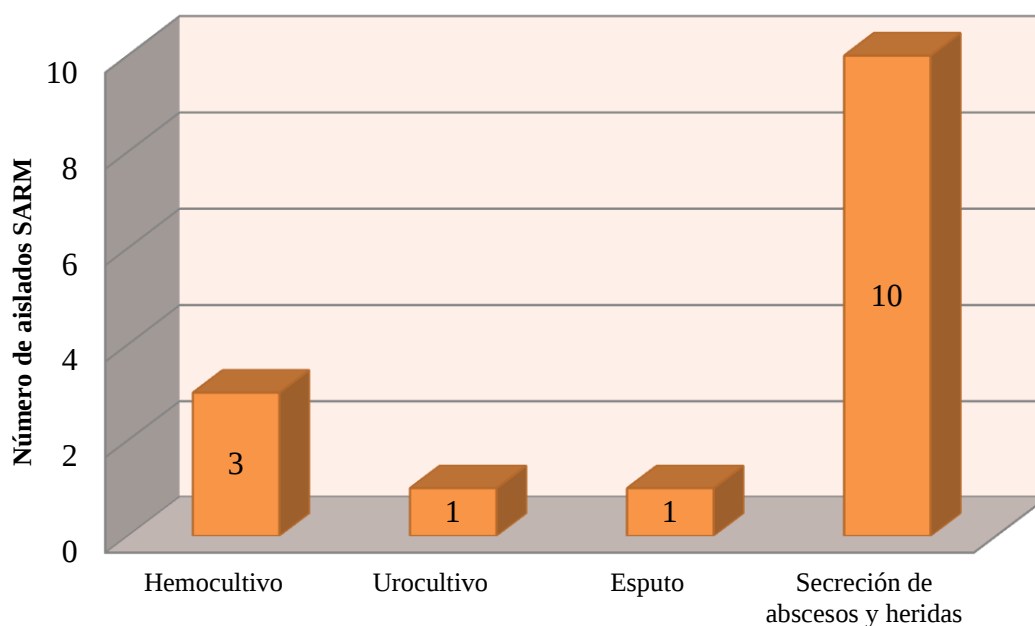


Figura 26. Origen clínico de los aislados SARM

Distribución de SARM según hospital de procedencia

En la figura 27 se muestra la distribución de los 96 aislados de *Staphylococcus aureus* que fueron analizados.

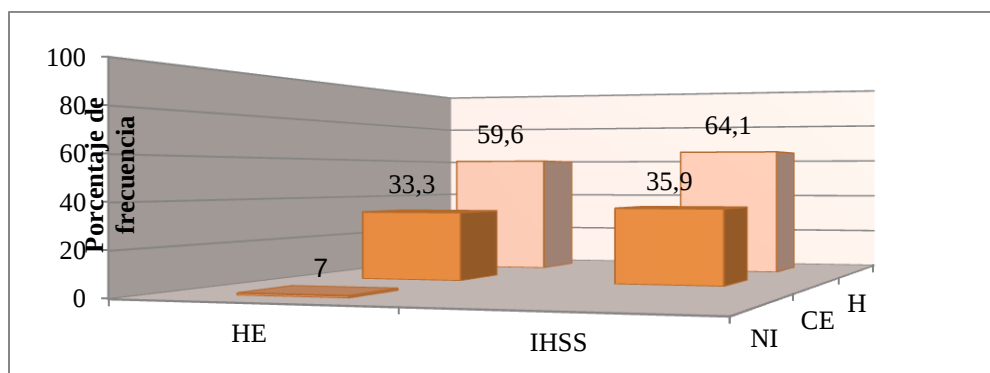


Figura 27. Distribución de la procedencia de los aislados por Hospital. H, hospitalizados; CE, consulta externa; NI, no identificado.

En el cuadro 16 se muestra la distribución de los aislados SARM según el hospital de procedencia, de acuerdo con la información clínica que se pudo recopilar durante la recolección de muestras para este estudio. Solamente en 4 casos no se pudo identificar la procedencia hospitalaria o de consulta externa, por lo que no fueron considerados en los cálculos de frecuencias.

Cuadro 16. Distribución de SARM según hospital de procedencia

Hospital	Aislamiento SARM		Total
	Hospitalizados	CE*	
HE	8/34 (23.5%)	0/19 (0 %)	8/53 (15.1%)
IHSS	6/25 (24.0%)	1/14 (7.1%)	7/39 (17.9%)
Total	14/59 (23.7%)	1/33 (3.0%)	15/92 (16.3%)

* Consulta externa

La distribución de los aislados SARM fue similar en ambos sistemas hospitalarios, la mayoría proveniente de pacientes hospitalizados, y solamente un aislado provino de consulta externa (Figura 28).

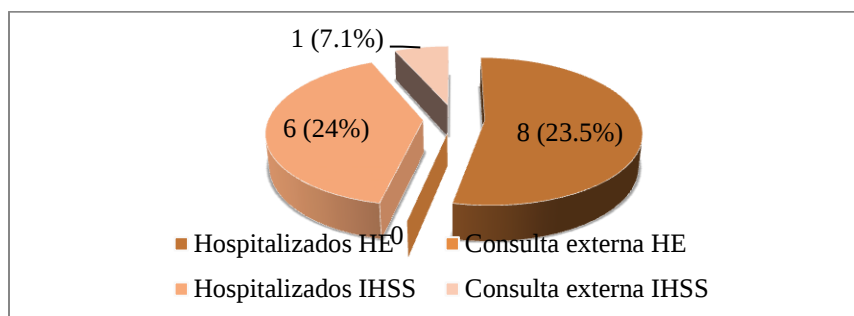


Figura 28. Distribución de los aislados SARM por procedencia hospitalaria.

Capítulo 5: Discusión de resultados

Staphylococcus aureus es una de las bacterias que se aísla con mayor frecuencia a nivel hospitalario, sin embargo esta bacteria ha resurgido en la última década como causante de cuadros clínicos muy graves en la comunidad que van desde infecciones de piel y tejidos blandos hasta enfermedades sistémicas que amenazan la vida del paciente. *Staphylococcus aureus* es un colonizador habitual de piel y mucosas humanas, así como fómites de los ambientes humanos, tiene la capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero mediante sus múltiples factores de virulencia, como toxinas, enzimas extracelulares y moléculas de superficie, que la convierten en un microorganismo con un alto potencial patogénico [Aires de Sousa M, 2004].

Staphylococcus aureus fue la primera bacteria en desarrollar resistencia a los antibióticos, mediante la producción de una enzima que tenía la capacidad de hidrolizar el anillo betalactámico de la penicilina y de esta forma inactivar la acción farmacológica y terapéutica del antibacteriano. Por esta razón se modificó la estructura química de la penicilina a nivel de grupos sustituyentes como hidroxilo y metilo, dando como resultado la meticilina, que se convirtió en el tratamiento de elección para tratar las infecciones causadas por los estafilococos. Sin embargo, poco tiempo después de su introducción, se aisló la primera cepa resistente a meticilina, y desde entonces la incidencia a nivel mundial se ha incrementado progresivamente, por lo que se ha debido recurrir a otras alternativas terapéuticas [Dancer SJ, 2008]

A nivel mundial el porcentaje de SARM es variable, desde el 0.6% en Holanda hasta 66.8% en Japón [Deurenberg RH, 2007].

Se ha reportado que en el continente europeo un cuarto de todos los aislados clínicos causados por *Staphylococcus aureus* fueron SARM, presentando tasas más elevadas de

resistencia a meticilina en el sur de Europa (35% en Portugal hasta 49.3% en Francia), y tasas de resistencia más bajas en el norte de Europa (2.5% en Suecia hasta 4.41% en Holanda). Esto se debe en parte a la implementación de estrategias en los países nórdicos llamados “Search and destroy”, que involucra una búsqueda activa y eliminación de casos de SARM por lo que su diseminación ha sido mucho más limitada [Cercenado E, 1997; Fluit A. C., 2001; Wisplinghoff H, 2005].

En América Latina el porcentaje de SARM también varía de país en país. Tal es el caso de Chile y Ecuador donde el porcentaje de SARM es del 80%, 47% en Colombia, y 25% en Venezuela [Guzman-Blanco M, 2009].

En Honduras el porcentaje de SARM es variable pero se mantiene en niveles bajos, comparado con otros países centroamericanos, tales como Guatemala y Costa Rica, donde se han reportado 64% y 58% de aislados SARM [Epidemiología, 2005-2008].

El primer reporte de resistencia a meticilina en Honduras se dio en 1978, informándose un 16.4% de SARM, mientras que años más recientes se ha reportado entre un 12% de resistencia en el 2004, hasta un 28.9% en el 2008 [Epidemiología, 2005-2008; Guzman M, 2009; Zepeda CJ, 1978]. En este estudio se obtuvieron porcentajes de SARM intermedios con respecto a los encontrados en años anteriores, sin embargo la muestra obtenida no fue representativa para indicar una prevalencia nacional, sino solamente de una población determinada de la capital. No obstante, estas frecuencias son considerablemente más bajas a las encontradas en otros países de la región, y similares a las que presentan algunos países del hemisferio norte. Debido a la ausencia de programas activos de vigilancia y control de brotes de SARM en el país, es importante estudiar a fondo las razones que podrían explicar tales frecuencias, como por ejemplo, el manejo antimicrobiano de los pacientes, la

circulación y disponibilidad de antibióticos a nivel nacional y la detección de portadores de *Staphylococcus aureus*.

Se pudo determinar que los aislados SARM tenían una distribución eminentemente hospitalaria, lo que coincide con varios informes publicados en distintos lugares alrededor del mundo [Cercenado E, 1997; Diekema DJ, 2001; Echevarria JE, 2003; Echevarria JE, 1997]. Además, los 14 aislados SARM de pacientes hospitalizados mostraron multirresistencia a fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas y sulfonamidas, lo que es común en aislados de origen nosocomial [Goetghebeur M, 2007 ; Simor AE, 2004]. Entre las razones de este predominio en pacientes hospitalizados podrían incluirse el incumplimiento de prácticas de control de infecciones a nivel hospitalario, la importación de clonas pandémicas, la existencia de posibles portadores nasales asintomáticos en el personal médico y asistencial, la variación genética espontánea e inducida por la presión selectiva del uso diario de los antibióticos, la condición inmunológica de los pacientes hospitalizados y la alta tasa de colonización de la piel y mucosas por *Staphylococcus aureus* [Guzman-Blanco M, 2009]. La eficiencia de SARM para colonizar superficies corporales fue evidente en este estudio, debido a su predominio en las muestras provenientes de secreciones de abscesos y heridas. Las infecciones de piel y tejidos blandos por SARM suelen ser más complicadas e involucran un abordaje más agresivo y prolongado para lograr el éxito terapéutico. La presencia de SARM en infecciones sistémicas ha sido documentada en estudios más amplios, con mayor número de muestras. El hecho que una tercera parte de los aislados SARM provenían de órganos internos supone su participación en este tipo de infecciones severas y potencialmente fatales, lo que destaca la importancia de buscarlos sistemáticamente en estudios futuros.

El único aislado SARM obtenido del servicio de consulta externa sugiere la existencia de este tipo de cepas a nivel comunitario, como se ha demostrado ampliamente en otros estudios [Baranovich T, 2010; David MZ, 2010; Diekema DJ, 2001; Herold BC, 1998; Paganini H, 2006; Vandenesch F, 2003; Wu D, 2010]. Por ejemplo, se han reportado porcentajes de hasta un 12% de SARM de origen comunitario [Naimi TS 2003]. Por tal razón, la búsqueda de SARM de origen comunitario en Honduras debería extenderse a análisis multicéntricos que involucren los niveles primarios de atención sanitaria, así como estudios de portadores asintomáticos especialmente portadores nasales, ya que la identificación temprana de SARM en pacientes colonizados puede prevenir la transmisión nosocomial de este microorganismo [Giuseppe P, 1999].

La rápida y precisa detección de SARM es importante para guiar una adecuada terapia antibiótica, para esto los laboratorios de microbiología requieren de formación y recursos para identificar correctamente los aislados resistentes [Tenover FC, 2001]. Dentro de las técnicas más utilizadas en Honduras para la determinación de SARM se encuentran el método de difusión en disco con oxacilina y cefoxitina y sistemas automatizados como el Vitek®. La determinación de la CMI mediante microdilución en caldo o por E-test, y las pruebas como la aglutinación en látex y detección del gen *mecA*, brindan información complementaria y confirmatoria específica para SARM. En el presente estudio se incorporaron tres de estas técnicas por primera vez en el país, con el fin de obtener la identificación definitiva de SARM y poner estas importantes herramientas diagnósticas a disposición del sistema de salud nacional. Sin embargo, estos ensayos son costosos y de difícil adquisición, por lo que la confirmación de SARM requiere una evaluación detallada de la confiabilidad y relación costo-beneficio de las técnicas disponibles.

En este estudio se utilizaron dos ensayos de difusión en agar y dos técnicas para la detección de los determinantes de resistencia contra meticilina, con el fin de evaluar su sensibilidad y especificidad analíticas. Los ensayos con discos o tiras de antibióticos son de fácil implementación y estandarización, ya que los protocolos están ampliamente normalizados y pueden ser aplicados en la mayoría de laboratorios clínicos. Todas las pruebas de control de calidad realizadas para ambas técnicas estuvieron dentro de los parámetros establecidos, lo que validó los resultados obtenidos. No obstante, la correcta identificación de SARM utilizando los métodos convencionales es compleja y algunos aislados son difíciles de clasificar ya que pueden aparecer susceptibles por un método y resistentes o intermedios por otro. Es ampliamente aceptado que la detección de SARM en el laboratorio por métodos de difusión en agar está determinada por varios parámetros como temperatura, periodo de incubación y densidad del inóculo, así como la concentración de sales en los medios de cultivo [Kloos WE, 1999].

En las pruebas de difusión en agar, se presentaron dos aislados SARM con fenotipos de resistencia caracterizados por la formación de halos de inhibición atípicos alrededor del disco de antibiótico, con abundantes colonias intrahalo llamados “halos fantasma” [BioMérieux SA, 2011]. Uno de ellos también presentó halo fantasma alrededor de la tira E-test, y fue negativo para PBP2a y gen *mecA*, pero se consideró como un aislado SARM con un mecanismo de resistencia distinto a la adquisición plasmídica del casete cromosómico *mec* (gen *mecA*). Una posibilidad es la producción de un alto nivel de betalactamasas, presente en las cepas conocidas como BORSA [De Lancastre H, 1991; Kernodle DS, 1998; McDougal LK, 1986; Wilson M, 2007]. Alternativamente, este fenotipo de SARM también podría deberse a la modificación de otras proteínas de unión a penicilina (PBP) tales como PBP1, PBP3 y PBP4 conocidas como cepas MODSA [Henze

U, 1996]. En este caso la CMI obtenida para oxacilina indicó un alto nivel de resistencia, más consistente con un fenotipo MODSA, cuya confirmación dependería de pruebas de genotipificación. En estos casos, la correcta identificación de este tipo de resistencia proveería una alternativa terapéutica adecuada.

El otro aislado resistente con halo fantasma, resultó positivo para PBP2a y gen *mecA*, sin embargo presentó una baja CMI por E-test. Las colonias mostraron diversos tamaños, lo cual se ha descrito en aislados con resistencia heterogénea a los antibióticos [Marlowe E, 2001]. Este tipo de aislados es susceptible a bajas concentraciones de oxacilina y solo una pequeña fracción de la población manifiesta resistencia fenotípica, por lo que su detección a nivel de los laboratorios clínicos puede pasar inadvertida, y facilitar su diseminación intrahospitalaria [Marlowe E, 2001]. De acuerdo con la clasificación de Tomasz, los aislados SARM heterogéneos de clase 1, expresan el gen *mecA* y poseen una CMI entre 1.5 y 3 µg/ml, lo que concuerda con el fenotipo encontrado en este estudio [Gil M, 2000; Hartman BJ, 1986; Wilson M, 2007]. Por consiguiente, para su correcta identificación se requiere de la implementación de pruebas adicionales como aglutinación por látex para PBP2a y PCR.

La técnica de aglutinación en látex para la detección de la PBP2a, fue desarrollada en la década de los 90 con el objetivo de crear una prueba más rápida para la detección de resistencia a meticilina [Jafri A K, 2000; Van Griethuysen A, 1999]. Desde el año 2002, el CLSI recomendó su uso en caso de no tener técnicas moleculares disponible, ya que ha demostrado un excelente rendimiento como prueba complementaria para la detección de SARM, destacando su facilidad y rapidez para la obtención de resultados, en comparación con otras metodologías disponibles [Ulloa MT, 2001].

En el presente estudio se obtuvo una excelente sensibilidad y especificidad de la prueba de aglutinación en látex, tal como se ha observado en otros estudios [Felten A, 2002; Marriott D, 1999; Swenson JM, 2005; Velasco D, 2005]. Los resultados mostraron reacciones intensas durante el tiempo establecido y fueron comparables con las cepas control, obteniéndose altos porcentajes de correlación con los métodos implementados en este estudio. Para la interpretación de resultados, se requiere de personal capacitado que puedan brindar resultados óptimos y confiables.

El PCR para la detección del gen *mecA* ha sido considerado como el método de referencia para la determinación de SARM [Chambers H, 1997]. En este estudio se implementó por primera vez en el país esta técnica de diagnóstico molecular para detectar dicho determinante de resistencia a partir de aislados clínicos, y de encontrar posibles cambios en el patrón molecular que se reflejaran en la expresión fenotípica. En otros países del área centroamericana se ha incorporado este ensayo como apoyo diagnóstico y confirmación de la presencia de SARM en muestras clínicas (Cristian Pérez, comunicación personal). El desarrollo de ensayos para la detección de múltiples genes en un solo paso brinda ventajas adicionales como rapidez y validación simultánea de los protocolos de reacción, tal como se observó en este estudio. Asimismo, se han desarrollado PCR múltiples para la detección de regiones hipervariables del casete cromosómico estafilocócico con el objetivo de investigar el posible origen de la cepa aislada, para investigar brotes epidémicos por los diversos clones pandémicos que han aparecido en el mundo y para determinar el perfil de resistencia a los antimicrobianos betalactámicos y no betalactámicos determinados por plásmidos, transposones y secuencias de inserción [Aires de Sousa M, 2004].

Todos los métodos utilizados para la detección de resistencia tuvieron una excelente sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, además de

una excelente correlación entre técnicas fenotípicas. Por esta razón, es posible sugerir una combinación de al menos dos de estas técnicas para la identificación de aislados SARM. Por ejemplo, el uso del método de Kirby-Bauer con una prueba complementaria como la aglutinación en látex para PBP2a podría ser una buena alternativa diagnóstica para laboratorios con volúmenes pequeños a medianos de muestras positivas por SARM. Asimismo, la combinación de E-test con la detección del gen *mecA* provee información más completa de la resistencia a meticilina, apta para laboratorios de hospitales grandes y centros de referencia nacionales. Además, todas son herramientas valiosas para la adecuada vigilancia epidemiológica, control de la diseminación y de eventuales brotes por este tipo de cepas. En el presente trabajo también se planteó determinar la posible presencia de aislados SAIV y SARV, ya que su aparición se ha relacionado con el uso progresivo e indiscriminado de la vancomicina a nivel hospitalario [Betancourt A 2006]. Esto tiene un importante impacto debido a su estrecha relación con fallos terapéuticos a nivel clínico. La vancomicina fue introducida y aprobada por la FDA hace 50 años, y junto con la teicoplanina pertenece al grupo de los glicopéptidos, los cuales están indicados como uno de los últimos recursos terapéuticos a nivel mundial para tratar las infecciones causadas por SARM y otros microorganismos Gram positivos [Betancourt A 2006].

A pesar que el CLSI no tiene criterios de interpretación para Kirby-Bauer, se han observado en los reportes de cepas de SARV detectadas alrededor del mundo, que presentan pequeños halos de inhibición alrededor del disco y por tal razón se incluyó esta técnica como tamizaje en el presente estudio [Pattel J, 2002]. Se han aislado en el mundo un mayor número de infecciones causadas por SARM con susceptibilidad intermedia a la vancomicina, conocidas también como cepas SAIV, detectadas por su valor de CMI [Marlowe E, 2001]. Ninguno de los aislados SARM obtenidos en este estudio mostró

características compatibles con aislados SARV o SAIV, tal como sucede en casi toda América Latina, donde solamente en Brasil se han reportado este tipo de cepas hasta la fecha [Centers for Disease Control and Prevention, 1997b; Chang S, 2003; Denis O, 2002; Kim MN, 2000; McManus J, 1999; Oliveira GA, 2001; Saderi H, 2005].

Por otra parte, se han reportado casos de SARM con resistencia intermedia a vancomicina heterogénea (SAIVh) con valores tan bajos de CMI que podrían ser considerados como aislados susceptibles [Hiramatsu K, 1997; Tenover FC, 2001]. Desde el año 2001 se informaron en Australia los primeros hallazgos de SAIVh, y desde entonces se han incrementado los reportes de este tipo de cepas, encontrándose casos en Japón, Francia, Corea del Sur, Tailandia e Israel entre otros [Gosbell IB, 2003; Howden B, 2010].

El fenotipo SAIVh puede ser detectado en cepas con CMI tan bajas como 0.5 y hasta 2 µg/ml [Leonard SN, 2009; Tenover FC. and Moellering RC, 2007]. Como se mostró en este estudio, se encontraron 3 aislados SARM con posibles fenotipos SAIVh. Estos hallazgos coinciden con varios estudios donde se ha encontrado desde 30% hasta un 50% de los aislados SARM que presentaron CMI de vancomicina de 2 µg/ml [Horne KC, 2009; Musta AC, 2009]. Sin embargo, no fue posible confirmar los resultados obtenidos, ya que las técnicas utilizadas para asegurar la presencia del fenotipo SAIVh son muy costosas y de difícil implementación. La prueba de referencia es el análisis del perfil poblacional del área bajo la curva (PAP-AUC), utilizando concentraciones crecientes de antibiótico [Leonard SN, 2009; Wootton M, 2001]. Un método alternativo para la detección de estas cepas es el E-test GRD, que consiste en una tira doble de concentraciones crecientes de vancomicina y teicoplanina. Los criterios de interpretación para SAIVh por este método son una CMI de vancomicina ≤ 4 µg/ml y CMIs de vancomicina y teicoplanina ≥ 8 µg/ml [Leonard SN, 2009].

De igual forma, varios autores que han estudiado la relación entre la CMI a vancomicina de cepas SARM y la eficacia del tratamiento con glicopéptidos, han reportado que cuando la CMI se incrementa de 0,5 a 2 µg/ml, aumentan las posibilidades de falla terapéutica, aunque las cepas sigan siendo clasificadas como susceptibles. Por lo tanto, concluyen que una CMI a vancomicina de 2 µg/ml es un predictor de respuesta pobre a la terapia con vancomicina [Sakoulas G, 2004; Tenover FC. and Moellering RC, 2007; Traverso F, 2010]. Es necesario completar los análisis de los aislados sospechosos de SAIVh para confirmar su fenotipo y asociarlos con la evolución clínica y terapéutica de los pacientes.

Existen otras alternativas terapéuticas que se podrían considerar y evaluar en caso de pacientes infectados por SARM y con susceptibilidad disminuida a la vancomicina, tales como trimetoprim-sulfametoxazol, minociclina, rifampicina, disponibles en el país. Además están las drogas más nuevas como tigeciclina, linezolid, daptomicina y quinupristina/dalfopristina, que aún no han sido incorporados dentro del cuadro básico de medicamentos en los hospitales donde se realizó este estudio [Traverso F, 2010]. Finalmente, existen nuevas cefalosporinas antiestafilocócicas desarrolladas para combatir las infecciones causadas por SARM que tienen una alta afinidad por la PBP2a [Banerjee R, 2008].

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) ha publicado una guía para la prevención y control de las infecciones causadas por SARM, SAIV y SAIVh. Esta guía aconseja disminuir el uso indiscriminado de vancomicina, así como la participación activa del personal de los laboratorios en la implementación de los métodos necesarios para la identificación y monitoreo permanente de cepas con susceptibilidad disminuida a vancomicina [CDC, 1997].

Capítulo 6: Conclusiones

1. De todos los aislamientos de *Staphylococcus aureus* obtenidos en este estudio, 15.83% fueron resistentes tanto a oxacilina como a meticilina y cefoxitina., 14% de resistencia en el Hospital Escuela y 17.9% en el IHSS, por lo que los pacientes infectados con la bacteria resistente a dichos fármacos no podrían responder a dicho tratamiento y probablemente requieran de otro tipo de antibióticos como la vancomicina.No se observó diferencias entre la difusión en disco con los 3 antibióticos betalactámicos probados. (oxacilina, meticilina y cefoxitina), por lo que dicha técnica es fundamental para la detección de susceptibilidad/resistencia a los antibióticos probados.Los aislamientos SARM en su mayoría provenían de pacientes hospitalizados y solamente un aislamiento provenía de consulta externa. Asimismo, de los 15 aislamientos resistentes, 10 fueron obtenidos a partir de infecciones de piel y tejidos blandos, y cinco provenían de infecciones sistémicas
4. De los 15 aislamientos resistentes, 14 presentaron el mecanismo de resistencia mediado por el gen *mecA* y por la proteína PBP2a, y solo un aislamiento presentó un mecanismo diferente de resistencia.
5. Se presentó una alta concordancia entre las distintas pruebas efectuadas, y todas mostraron sensibilidad y especificidad superior al 90%.
6. No se observó resistencia total ni intermedia a vancomicina.

Capítulo 7: Recomendaciones

1. Realizar los controles de calidad establecidos por el CLSI para la correcta elaboración de pruebas de difusión en agar.
2. Utilizar al menos una prueba fenotípica de susceptibilidad en conjunto con la prueba de aglutinación en látex o PCR para la detección de SARM.
3. Utilizar las tiras E-test ya que generan CMI más exactas.
4. Genotipificar los aislados SARM para obtener mayor información sobre el tipo de casete cromosómico y su adquisición, el origen clonal y la resistencia a otras drogas.
5. Ejecutar estudios prospectivos a largo plazo, que incluyan mayor número de muestras, que incluyan vigilancia diaria de las muestras que llegan al laboratorio de microbiología y cultivos de control de los pacientes trasladados de otro centro de salud con riesgo de SARM elevado.
6. Realizar estudios de portadores asintomáticos de SARM a nivel hospitalario y comunitario.
7. Realizar monitoreos para vigilancia de aislados SARM con susceptibilidad reducida a la vancomicina con el fin de identificar y confirmar la posible circulación de SAIVh.
8. Llevar a cabo estudios de la presencia de SARM en alimentos, especialmente en productos lácteos, como ha sido reportado en estudios realizados.

Capítulo 8: Referencias

- Aires de Sousa M LH. 2004. Bridges from hospitals to the laboratory. FEMS Immunol Med Microbiol 40:101-111.
- Appelbaum PC. 2006. The emergence of vancomycin-intermdiate and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. . Clin Microbiol Infect 12:16-23.
- Banerjee R GM, Basuino L, Strynadka N, Chambers HF. 2008. In Vitro Selection and Characterization of Ceftobiprole-Resistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemoterapy 52:2089-2096.
- Baranovich T ZH, Shabana II, Nevzorova V, Turcutyucov V, Suzuki H. 2010. Molecular characterization and susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals and the community in Vladivostok, Russia. Clin Microbiol Infect 16:575-582.
- Bauer AW KM, Sherris JC and Turck M,. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standarized single disk method. Amer J clin pathol 45:493-496.
- Bécquer Lombard A ML, Lara C,. 1996 Importancia de la detección de enterotoxinas estafilocócicas. Revista Cubana de Alimentos y Nutrición.
- Betancourt A MC, Rivera M, González A, . 2006. Vancomicina. Un Vencedor Vencido. Medicrit, Revista de medicina interna y medicina Crítica 3:136-138.
- BioMérieux SA. 2011. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana mediante E-test. France: BioMérieux.
- Boom R SC, Salimans MM, Jansen CL, Werthiem-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J, . 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acid. J Clin Microbiol 28:495-503.
- Brooks Geo F BF, Morse SA, . 2002. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17, editor.

- Broseta A RP, Otero RJ, . 2005. Emergencia de un clon de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de origen comunitario en la población pediátrica del sur de Madrid. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 24:31-35.
- Buitrago G CJ, Castillo JS., Leal AL., Sanchez R., Alvarez CA, . 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Community-acquired phenotype spread in hospitals in Bogota, Colombia. *Clin Microbiol Infect* 14:Abstract P1438.
- Camarena JJ SR. 1999. Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, disponible en Internet: <http://www.seimc.org/control>.
- Cárdenas Páez O. CBH, Moreno Munoz JA., Pérez Garavito KJ., Rodríguez Ahumada DE. 2009. Determinación de Fenotipos y genotipos de resistencia a macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas B (MLSB) en aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina asociados a la comunidad (SARM-AC) en tres países Latinoamericanos. Bogotá, Colombia: Universidad El Bosque.
- Casellas J CdRAA. 2006. Results survey number 7. *Revista Panamericana de Infectología* 8:48-51.
- Castellano-Gonzales MJP-M, Armindo J. Vivas-Vega, Rosana. 2008. Detección fenotípica y molecular de resistencia a meticilina en *S. aureus*. *Kasmera* 36 (1):28-38.
- Catalano M. 1994. Genotipificación bacteriana en infecciones nosocomiales. *Medicina (Buenos Aires)* 54:596-604.
- CDC. 1997. "Interim guidelines for prevention and control of staphylococcal infection associated with reduced susceptibility to vancomycin". *MMWR Morb Mortal Wkly* 46:626-628,635-636. .
- Centers for Disease Control and Prevention. 1997a. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin -- United States. *MMWR Morb Mortal Wkly* 46:813-815.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1997b. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin -- United States. *MMWR Morb Mortal Wkly* 46:765-766.

- Centers for Disease Control and Prevention. 2000. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin -- Illinois. MMWR Morb Mortal Wkly 48:1165-1166.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*- New York. MMWR Morb Mortal Wkly 53:322-323.
- Cercenado E SCC, Acalá L, BouzaE, . 1997. Situación actual de la resistencia de *Staphylococcus* en España. Rev Clin Esp 2:18-24.
- Cockerill FR WM, Bush K, Dudley MN, Eliopoulous GM, Hardy DJ, Hecht DW et al. 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. USA. 68-80 p.
- Chambers H. 1997 Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implication. Clin Microbiol Rev:781-791.
- Chambers H. 1997. Methicillin resistance in *Staphylococci*: Molecular and biochemical basis and clinical implication clin microbiol rev 10:781-791.
- Chambers HF. SMJ, Hackbarth C.J. 1994. Kineics of penicillin binding protein to penicillin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. Biochem J 301:139-144.
- Chang S SD, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC,Downes FP, Shah S, Rudrik JT et al. 2003. Infection with vancomycin resistance *Staphylococcus aureus* containing the van A gene resistance. N Engl J Med 348:1342-1347.
- Dancer SJ. 2008. The effect of antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61:246–253.
- David MZ DR. 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev 23:616-687.
- De Lancastre H FA, Urban C, Rahal J and Tomasz. 1991. Multiple Mechanisms of Methicillin Resistance and Improved Methods for Detection in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy 632-639:35.

- De Lencastre H, FAMS, Urban C., Rahal J. and Thomasz A. 1991. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. . Antimicrob Agents Chemother 35:632-639.
- De Lencastre H. OD, Thomasz A. 2007a. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptative power Current Opinion in Microbiology 10:1-8.
- De Lencastre H. OD, Tomasz A. 2007b. Current Opinion in Microbiology 10:428-435.
- Denis O NC, Byl B, Knoop C, Dubreux SB, Struelens MJ. 2002. "Emergenncce of Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* in a Belgian Hospital: Microbiological and Clinical Features". Journal of Antimicrobial Chemoterapy 50:383-391.
- Deurenberg RH VC, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. 2007. The moecular evolution of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 13:222-235.
- Diego Tibavizco JYR, Edwin Silva, Sonia Isabel Cuervo, Jorge Alberto Cortés. 2007. ENFOQUE TERAPÉUTICO DE LA BACTERIEMIA POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS. Biomédica 27:294-307.
- Diekema DJ PM, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al, . 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-1999. Clin Infect Dis 32:114-132.
- Domenech A. 2003. Estudio experimental de la eficacia de los glucopéptidos en monoterapia o con beta lactámicos en la infección por *Staphylococcus aureus* con sensibilidad disminuida a los glicopéptidos. [Doctoral]. Barcelona: Universitat de Barcelona. 31-35 p.
- Duerden BI RT, Jewsbury JM, Turk DC, . 1993. Microbiología de las enfermedades infecciosas. México: Lumusa editores.

- Echevarria JE ID. 2003. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. Rev med Hered 14:195-203.
- Echevarria JE OL, Zerpa R, Campana C, Quispe V, Tamariz J, Prada A, Guerra H, Casas J 1997. Prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus* strains, in Hospitalized patients and susceptibility to Teicoplanin in Lima Peru. . 20th International Congress of Chemotherapy Sidney- Australia. Sidney, Australia: International Society of Chemotherapy, Libro de resúmenes.
- Echeverria Zarate J ID. 2003. Estafilococo meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los gram positivos. Revista medica de Heredia 14:195-203.
- Epidemiología Dd. 2005-2008. " Vigilancia epidemiológica de *Staphylococcus aureus* a los antimicrobianos". Tegucigalpa.
- Falcone M SP, Venditti M, . 2008. Serious infections due to methicillin resistance *Staphylococcus aureus*: An evolving challenge for physicians. European Journal of Internal Medicine 20:343-347.
- Felten A GB, Lagrange PH, Casin I 2002. Evaluation of Three Techniques for Detection of Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a Disk Diffusion Method with Cefoxitin and Moxalactam, the Vitek 2 System, and the MRSA-Screen Latex Agglutination Test Journal of Clinical Microbiology 40:2766-2771.
- Fluit A. C. VJ, Schmitz FJ, and European SENTRY Participants. 2001. Frequency of isolation and antimicrobial resistance of gram-negative and gram-positive bacteria from patients in intensive care units of 25 European university hospitals participating in the European arm of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997–1998. Eur J Clin Microbiol 20:617-625.
- Fowler VG Jr OM, Corey GR, Woods CW, Cabell CH, Reller LB, et al. 2003. Clinical identifiers of complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia. Arch Intern Med 163:2066-2072.

- Gadepalli R DB, Kapil A, Sreenivas V, Jais M, Gaird R, Chaundhry R, Samantaray JC, Udo EE. 2009. Clinical and molecular characteristics of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue isolates from three indian hospitals. *Journal of Hospital Infection* 73:253-263.
- Geo F. Brooks JSB, Stephen A. Morse. 2002. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg: El Manual moderno*.
- Gil M. 2000. *Staphylococcus aureus*, microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Revista Chile de infectología* 17:145-152.
- Gilliland KK FP. 1993. "In-vitro characteristics of glycopeptide resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients on CAPD". *J Antimicrob Chemother* 32:267-278.
- Giuseppe P LM, Tralla A, Johnson C, Collins V, Simor A, . 1999. Screening High-Risk Patients for Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* on Admission to the Hospital: is it Cost Effective. *Infection control and hospital epidemiology* 473-477.
- Gobernado M. 2002. Resistencia en *Staphylococcus aureus* ahora a la Vancomicina. *Revista Espanola de Quimioterapia* 15.
- Goetghebeur M LP, Han D, Vicente C. 2007 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A public health issue with economic consequences. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 18:27-34.
- Gosbell IB MD, Ziochos H, and Ward PB 2003. Emergence of hetero-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) in Sydney. *Med J Aust* 178:354.
- Grundmann H AD, Van den Wijngaard C, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich A and the European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group. 2010. Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis. *Plos Medicine* 7:1-14.
- Grundmann H AdSM, Boyce J, Tiemersma E. 2006. Emergence and resurgence of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* as a public health threat. *The lancet* 368:874-885.

- Grundmann H, AdSM, Boyce J., Tiemersma E. 2006. Emergence and resurgence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as a public health threat. *Lancet* 368:874-885.
- Guzman-Blanco M MC, Isturiz R, Alvarez C, Bavestrello L, Gotuzzo E, Labarca L. 2009. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34:304–308.
- Guzman M MC, Isturiz R, Álvarez C, Bavestrello L, Gotuzzo E, Labaren J. 2009. "Epidemiology of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America". *International Journal of Antimicrobial Agents* 34:304-308.
- Hartman A. TB. 1981. Altered penicillin binding proteins in methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 19:726-735.
- Hartman BJ TA. 1986. Expression of Methicillin Resistance in Heterogeneous Strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 29:85-92.
- Hayes M. CA, Wyke W., Ward J.B. 1981. Decreased affinity of a penicillin binding protein for beta lactamics antibiotics in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. *FEMS Microbiol Lett* 10:119-122.
- Henze U BBB. 1996. Penicillin-Binding Protein 4 Overproduction Increases b-Lactam Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40:2121–2125.
- Herold BC IL, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, et al,. 1998. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in children with no no identified predisposing risk. *JAMA* 279:593-598.
- Heymann DL. 2005. El control de las enfermedades transmisibles, publicación científica y técnica. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS).
- Hiramatsu K AN, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S. 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350:1670-1673.

- Horne KC HB, Grabsch EA, Graham M, Ward PD, Xie S, Mayall BC, Johnson PDR, and Grayson ML. 2009. Prospective comparison of the clinical impact of heterogeneous vancomycin-intermediate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-susceptible MRSA. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3447-3452.
- Howden B DJ, Johnson P, Stinear TP, and Grayson ML. 2010. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. *American Society for Microbiology* 23:99-139.
- Im sade J. 1973. Repressor and antirepressor in the regulation of Staphylococcal penicillinase synthesis. *Genetics* 75:1-17.
- Im sade J. 1978. Genetic regulation of penicillinase synthesis in gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 42:67-83.
- Ito T. KY, Asada K., Mori N., Tsutsumimoto K., Tiensasitorn C. 2001. Structural comparison of three types of Staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1323-1336.
- Ito T. MX, Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H., Hiramatsu K. 2004. Novel type V Staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2637-2651.
- Jafri A K RBS, Woods G L. 2000. Evaluation of a latex agglutination assay for rapid detection of oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiol Infect Dis* 36:57-59.
- Jiménez Quiceno JN. COM. 2009. *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina, bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. *IATREIA* 22:147-156.
- Katayama Y. IT, Hiramatsu K. 2000. A new class of genetic element, Staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1549-1555.
- Katzung BG. 2002. *Farmacología Básica y clínica*. 8, editor. San Francisco, USA.

- Kernodle DS CD, Stratton CWN and Kaiser AB. 1998. Association of Borderline Oxacillin-Susceptible Strains of *Staphylococcus aureus* with Surgical Wound Infections. Journal of clinical microbiology 36:219-222.
- Kim MN PC, Woo JH, Ryu JS, Hiramatsu K. 2000. Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. Journal of Clinical Microbiology 38:3879-3881.
- Kjonegaard R ME. 2006. Ataque contra los microorganismos resistentes a Fármacos Nursing 24:8-10.
- Kloos WE BT. 1999. *Staphylococcus and micrococcus* in: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds) Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology. Washington, DC. p 264–282.
- Kreiswirth BN. KJ, Arbeit RD. 1993. Evidence of clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Science 259:227.
- Lawrence W BA, O'toole R, Sherris J. 1972. Reliability of the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method for Detecting Methicillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. American Society for Microbiology 241-247.
- Leonard SN RK, Newton KL, Rybak MJ 2009. " Evaluation of the Etest GRD for the detection of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides". Journal of Antimicrobiol chemoteraphy 63:489-492.
- Lindsay JA. HM. 2006. functIntegrGenomics 6:186-201.
- Lisboa T FM, Hoher J,Borges L,Gómez J,Schifelhain L, Dias F,Lisboa J,Friedman G,. 2007. The prevalence of nosocomial infection in Intensive Care Units in the State of Rio Grande do Sul Rev Bras Ter Intensiva 19:414-420.
- Loureiro MM GB, Quadra M, Pinheiro GS, Asensi MD,. 2002. Study of multi-drug resistant microorganisms isolated from blood cultures of hospitalized newborns in Rio de Janeiro city, Brazil. Braz J Microbiol 33:73-78.

- Lowy F. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest 111:1265-1273.
- Ma XX GA, Pedreira W, Mowszowicz M, Christophersen I, Machiavello S, . 2005. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. Emerg Infect Dis 11:973-976.
- Marlowe E CM, Hindler J, Ward K, and Bruckner D,. 2001. Practical Strategies for Detecting and Confirming Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*: a Tertiary-Care Hospital Laboratory's Experience. 39:2637–2639.
- Marriott D KT, Harkness JL. 1999. Further Evaluation of the MRSA-Screen Kit for Rapid Detection of Methicillin Resistance. Journal of clinical microbiology 37:3783–3784.
- Martínez JL. 2007. Perfil Bacteriológico del pie diabético y conocimiento de cuidados preventivos en el Hospital Escuela. Revista Médica de los post Grados de Medicina UNAH 10:150-155.
- Matsushashi M. IS, Wachi M., Doi M., Inoue M., Ubukata K. 1986. Molecular cloning of the gene of a penicillin binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 167:975-980.
- McDougal LK TC. 1986. The Role of β -Lactamase in Staphylococcal Resistance to Penicillinase-Resistant Penicillins and Cephalosporins. Journal of clinical microbiology 23:832-839.
- McManus J. 1999. " Vancomycin Resistance *Staphylococcus aureus* reported in Hong Kong". Br Med J 318:626.
- Mejía Nuñez MR MA, Suazo H, Campos JC, Rodríguez E, Espinal O, Avelar G, . 2009. Brote por *Staphylococcus aureus* en una guardería infantil en Choluteca, Honduras. Revista Médica Hondureña 77.
- Moreillon P QY, Glauser M. 2005. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). En: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editores. Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingston.

- Moreno PRL. 2001. Diseño y verificación de un sistema de diagnóstico de las condiciones sanitarias en el sector quesero artesanal de Honduras. Tegucigalpa: ZAMORANO. 1-62 p.
- Murray P PM. 2005. Microbiología Médica. Espana.
- Musta AC Rk, Shemes S, Chase P, Jose J, Johnson LB, and Khatib R 2009. Vancomycin MIC plus heteroresistance and the outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: trends over 11 years. Journal Clinical of Microbiology 47:1640-1644.
- Naimi TS LK, Como-Sabetti K, et al. 2003. Comparison of Community and Health Care–Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. JAMA 290:2976-2984.
- Navascués A. G-IJJ, Guillén F.. . 2004. Situación de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el Hospital de Navarra Anales Sis San Navarra [revista en la Internet]. p 21-25.
- Nieves Sopena MS. 1996. Evolucion de un Brote Epidemico por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina,.10-17.
- Noble WC VZ, and Cree RGH,. 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS microbiological letters 93:195-198.
- Nodarse R. 2002. Visión actualizada de las infecciones intrahospitalarias. Revista Cubana Med Milit 31(3):201-208.
- Nour M. MM, Ben Nejma M. 2005. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: emergence and molecular basis. Pathol Biol (París) 53:334-340.
- Ogston A. 1883. *Micrococcus* Poisoning. J Anat Physiol 17:24-58.
- Oliveira GA DAA, Masiero RL, Levy CE, Gomes MS , Cui L, Hiramatsu K and Mamizuka EM. 2001. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Infect Control Hosp Epidemiol 22:443–448.
- OMS OMdlS. 2004. Prevención de las infecciones nosocomiales, Guía Práctica. 59 p.
- OPS. 1993. Información de resistencia microbiana en diferentes países de latinoamérica.

- OPS. 2002. Modulos de principios de epidemiología para el control de enfermedades, Organización Panamericana de la Salud. Washington D.C.
- Ordás CB. 2006. Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales Espanoles. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Otten PS. 2004. Studies on fibronectin binding proteins, proteases, and virulence in *Staphylococcus aureus* [Doctoral]. Stockolm: Karolinska Institute. 5 p.
- Oth RL WS, Bustamante HN, Fernández JH, Oth LC, . 2008. Antimicrobial susceptibility and resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from patients and carriers in Valdivia city, Chile. Rev Chilena Infectol 25:175-178.
- Paganini H VV, Rodríguez AC, Della Latta P, Hernández C, et al,. 2006. Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en niños provenientes de la comunidad en niños de la Argentina. Arch Argent Pediatr 104:295-300.
- Pan American Health Organization P. 2004. Annual report of theMonitoring/Surveillance Network for Resistance to Antibiotics. Organización Panamericana de la Salud OPS/HDM/CD/A/408/6.
- Papadakis SM. 2009. Diagnóstico clínico y tratamiento, infecciones por *Staphylococcus aureus*.
- Patrick Murray KSR, Michael A. Pfaller. 2005. Microbiología Médica Espana.
- Pattel J. 2002. Vancomycin-Resistant Gram-Positive Cocci. Atlanta-USA: CDC.
- Pigrau C. 2003. Oxazolidinona y glucopéptidos. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica 21:157-164.
- Ponce de Leon A A-CC, Benitez A,. 2008. In vitro activity of tigecycline and other antimicrobial drugs against selected pathogens isolated in Mexico. Clin Microbiol Infect 14(Suppl 7):S611:Abstract P2075.
- Pulgarín SM. 2005. Influencia de la catalasa y de la Beta Toxina en la Patogénesis de *Staphylococcus aureus* [Doctoral]. Madrid, Espana: Universidad Complutense de Madrid.

- Ribeiro A DC, Silva-Carvalho MC, Berquo L, Ferreira FA, Santos RN,. 2005. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. . J Clin Microbiol 43:1985-1988.
- Robert S GO, Hardardottir H, Harthug S, Jakobsen T, Kolmos JH, Olsson-Liljequist B, Peltonen R, Tveten Y, Vuopio-Varkila J, Åhrén C, . 2008. Proposal for common Nordic epidemiological terms and definitions for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SARM). Scandinavian Journal of Infectious Diseases 40:495-502.
- Rosales EP. 1997. Interpretación de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana. In: Chile UCd, editor: Boletín de Escuela de Medicina.
- Saderi H OP, Shahrbanooie R. 2005. "Vancomycin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*". Archives of Iranian Medicine 8:100-103.
- Sakoulas G M-BP, Schentag J, Forrest A, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM 2004. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. J Clin Microbiology 42:2398-2402.
- Seas C HK, Ramos R, Bazan E, Rodriguez I, Torres A, . 2006. Oxacillin resistant and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Lima, Peru. Infect Control Hosp Epidemiol 27:198-200.
- Sieradki K RR, Haber SW and Tomasz A,. 1999. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin resistance *Staphylococcus aureus* infection. N Engl J Med 340:517-523.
- Sierra Madero JG KC, Karaffa C, Washington JA. 1988. Role of betalactamase and different testing conditions in oxacillin-borderline-susceptible *Staphylococci*. Antimicrob Agents Chemother 32:1754-1757.
- Sievert DM RJ, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC. 2008. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002–2006. Clinical Infectious Diseases 46:668-674.

- Simor AE LM. 2004. The management of infection and colonization due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A CIDS/CAMM position paper. Can J Infect Dis Med Microbiol 15:39–48.
- Soloaga R CA, Gagetti P, Faccone D, Galas M, grupo de colaboradores MRSA. 2004. Detección de meticilino resistencia en *Staphylococcus aureus*: comparación de métodos convencionales y aglutinación con MRSA-screen latex. Revista Argentina de Microbiología 36:36-40.
- Sopena Nieves SM. 2002. *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina. Medicina Clínica 118 (17):671-676.
- Sopena Nieves SM. 2002. *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina. Medicina Clínica 118:671-676.
- Swenson JM TFaCDSG. 2005. Results of Diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* SSP. Journal of clinical microbiology 43:3818-3823.
- Tenover FC BJ, Lancaster MV 2001. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus* . . Emerging infectious Disease 7:327-332.
- Tenover FC WL, Appelbaum PC, . 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother 48:275-280.
- Tenover FC.and Moellering RC. 2007. The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. Clinical Infectious Diseases 44:1208-1215.
- Thomasz A DH, DeLEncaster HM, Jabes D, McDougall. Billie J. 1989. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin binding protein with modified penicillin binding capacity. Antimicrob Agents Chemother 33:1869-1874.
- Thompson RL CI, Wenzel RP. 1982. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Intern Med 97:309-317.

- Torano G HT, Tamargo I, Borroto S,. 2001. Portadores nasales de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina entre ninos cubanos que asisten a circulos infantiles. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica 19:367-370.
- Toruño. DMEL. 2003. “Perfil de resistencia a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina”. Leon, Nicaragua: Universidad Naciional Autonoma de Leon.
- Traverso F PM, Louge M, Funaro F, Suasnabar R, Cepeda R. 2010. Impacto de la resistencia a la metilicina sobre la mortalidad y vigilancia de la sensibilidad a la vancomicina en bacteriemias causadas por *Staphylococcus aureus*. Revista Argentina de Microbiología 42:274-278.
- Tuomanen E DD, Tornasz A. 1986. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. Antimicrob Agents Chemother 3:512-527.
- Turnidge J RN, Chang FY, Fowler VG, Kellie SM, Bruce S, Tristan A,. 2008. *Staphylococcus aureus*: Microbiology guided medline search. www.antimicrobe.org/sample_staphylococcus.asp.
- Ulloa MT PL, Carmi A, Varela C, Fica A. 2001. Comparison of polymerase chain reaction, latex and disk diffusion for detection of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. Revista Chilena de infectología.
- Van Griethuysen A PM, Van Leeuwen et al. 1999. Rapid slide latex agglutination test for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal Clinical Microbiology 37: 2789-2792.
- Vandenesch F NT, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H,et al,. 2003. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence. Emerging Infectious Diseases 9:978-983.
- Vázquez D. 1986. Biosíntesis de peptidoglucano: mecanismos de acción y selectividad de los antibióticos inhibidores. En: Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona.

- Velasco D TM, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F, Moure R, Villanueva R and Bou G. 2005. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55:379–382.
- Velásquez Meza ME. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistentes. *Redalyc, salud pública de México* 47:381-387.
- Victor Manuel Baizabal Aguirre JOB, Juan José Valdez Alarcón, Alejandro Bravo Patino y Marcos Cajero Juárez. 2009. Caracterización Funcional de la Interacción entre estructuras conservadas de *Staphylococcus aureus* y receptores celulares. *Mensaje Bioquímico* 33:183-184.
- White D. 1995. *The physiology and biochemistry of prokaryotes*. New York.
- WHONET. 2008. Programa de Vigilancia antimicrobiana, Departamento de Epidemiología. Tegucigalpa, Honduras: Hospital Escuela.
- Wilson M OC, Medina G, Otth L, Fernández H, Arce , Zaror A , Lizama V, Gil M, Von Chrisma AM. 2007. Genotipos de *Staphylococcus aureus* con fenotipo meticilino resistente, aislados de pacientes del Hospital Base de Valdivia. *Revista Médica de Chile* 135:596-601.
- Wisplinghoff H EB, Wisplinghoff S, Stefanik D, Plum G, Perdreau-Remington F and Seifert H. 2005. Molecular Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Metropolitan Area of Cologne, Germany, from 1984 to 1998. *American Society for Microbiology* 43:5445-5451.
- Wootton M HR, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, and MacGowan AP 2001 A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother* 47:399-403.
- Wu D WQ, Yang Y, Geng W, Wang Q, Yu S, Yao K, Yuan L, Shen X,. 2010. Epidemiology and molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from skin/soft tissue infections in a children's hospital in Beijing, China. *Diagn Microbiol Infect Dis* 67:1-8.

- Zepeda CJ GJ. 1978. Susceptibilidad del *Staphylococcus aureus* a los antimicrobianos, experiencia en el hospital Materno Infantil Revista médico Hondurena 46:29-32.
- Zepeda CJ GJ. 1998 Resistencia de las bacterias a los antibióticos. Revista Médico Hondurena:88-92.
- Zhang K. MJ, Elsayed S., Louie T., Contly J. 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of Staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. . J Clin Microbiol 43:5026-5033.

Anexo 1: POEs

Anexo 1.1

Procedimiento Operativo Estándar (POE) para la recolección, transporte y almacenamiento de muestras.

I. Objetivo

En el presente POE se explican los procedimientos para la recolección, transporte y almacenamiento de los aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* que fueron utilizados para llevar a cabo el presente estudio, los cuales provenían de 2 de los principales centros hospitalarios de la ciudad de Tegucigalpa, Honduras; Hospital Escuela (HE) e Instituto Hondureño de Seguridad Social (IHSS).

II. Responsabilidad:

El cumplimiento de los siguientes procedimientos para recolección, transporte y almacenamiento de los aislamientos clínicos, es obligatorio para el personal involucrado en esta investigación.

III. Definiciones

Skim milk: Leche descremada, se prepara al 10% para almacenamiento de bacterias, debe de ser autoclaveada a 121°C durante 5 minutos.

IV. Materiales y equipo:

Hielera o caja especial para almacenamiento de las placas que contenían los aislados bacterianos.

Cinta adhesiva.

Marcadores

Asas bacteriológicas

Viales estériles

Skim milk al 10% estéril

Cajas para almacenamiento de viales

Pipetas y puntas estériles

V. Procedimiento:

Recolección, transporte y almacenamiento de las muestras.

1. Los aislamientos bacterianos de *Staphylococcus aureus* fueron recolectados los días martes y jueves de cada semana, hasta recolectar 96 aislamientos clínicos, en un periodo correspondiente de octubre del 2010 a enero del 2011.
2. Los aislamientos clínicos, que se encontraban sembrados en placas de gelosa sangre al 5%, previo a ser entregados, fueron identificados mediante el sistema automatizado Vitek 2 compact (BioMérieux, Francia). Las placas fueron selladas con cinta adhesiva y debidamente rotuladas. Las placas conteniendo los aislamientos clínicos fueron selladas, rotuladas y colocadas en una hielera, para luego ser trasladadas al laboratorio de investigación de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (MEIZ) de la

Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH), a cada uno de los aislamientos clínicos se les asignó un código de identificación; SA-HE para los aislamientos provenientes del Hospital Escuela y SA-IHSS para los aislamientos provenientes del Instituto Hondureño de Seguridad Social. Posteriormente, los aislados fueron resembrados en placas de gelosa sangre al 5% e incubadas a 37 °C por 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas de incubación y el tiempo en que se lleva a cabo la identificación de los aislamientos clínicos, estos han sido almacenados en un refrigerador a 7 °C, asimismo las placas facilitadas en los hospitales de referencia fueron desechadas (ver desechos de material bioinfeccioso).

Los aislamientos fueron almacenados por triplicado en leche descremada estéril de la siguiente manera:

1. Con la ayuda de una micropipeta con punta estéril, se tomaron 500 µl de leche descremada estéril y se colocaron en un vial de plástico estéril.
2. Con un asa bacteriológica, se tomó suficiente cantidad del aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* y se almacenó en el vial que contenía la leche descremada. Los viales se rotularon debidamente, y fueron colocadas dentro de una caja de cartón y se almacenaron en refrigeración hasta su nuevo uso.

Anexo 1.2

Procedimiento operativo estándar para el uso correcto del equipo

I. Objetivo:

En este POE se describe el uso correcto del equipo del laboratorio como son: Cabina de bioseguridad y autoclave.

II. Responsabilidad:

El cumplimiento de los siguientes procedimientos es obligatorio para todo el personal que labore en el laboratorio de investigación de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (MEIZ).

III. Definiciones:

NaClO: Hipoclorito de sodio

IV. Materiales y equipo:

Agua destilada

Guantes resistentes al calor

Cinta testigo

Bolsas rojas de bioseguridad resistentes al calor

Etanol al 70%

NaClO al 1%

V. Procedimiento

Cabina de seguridad biológica: Desinfección y uso.

1. Al iniciar el trabajo, desinfecte la cabina de seguridad biológica con NaClO al 1% durante 30 minutos, posteriormente elimine el NaClO con etanol al 70% de preparación reciente, y deje secar.
2. Activar la luz ultravioleta durante 15 minutos.

Una vez desinfectada la cabina de seguridad biológica:

3. Levante despacio la cortina hasta que la parte inferior de la misma esté alineada con el indicador ubicado en el lado izquierdo del área de trabajo.
4. Encienda la luz blanca y el flujo laminar, si es que la cabina no tuviera activado el modo Smart – Start.
5. Deje que la cabina funcione durante 5 minutos.
6. Lave sus manos y brazos intensamente con jabón germicida.
7. Póngase la bata y los guantes, si fuera necesario póngase los lentes o máscara.
8. Levante la cortina, solo meta los materiales que necesita para su procedimiento. No sobrecargue la cabina.
9. No obstruya las rejillas de aire frontales, laterales o traseras.
10. Cierre lentamente la cortina hasta que se encuentre en la posición correcta para operar.
11. Después de cargar la cabina espere de 2 a 3 minutos para eliminar todos los contaminantes en el área de trabajo.
12. Mantenga todos los materiales al menos 10 centímetros alejados de la cortina.
13. Realice todas las operaciones sucias o contaminadas tan lejos de la cortina como sea posible.
14. Separe los materiales limpios de los contaminados dentro del área de trabajo.
15. No use mechero. Use incineradores eléctricos.
16. Evite usar técnicas o procedimientos que interrumpan el flujo interno de aire
17. Al finalizar el trabajo: La cabina debe mantenerse encendida durante 2 o 3 minutos para liberar el interior de contaminantes.
18. Para sacar los materiales y el equipo de la cabina: los objetos que tuvieron contacto con el material contaminado deben ser desinfectados en la superficie antes de ser retirados de la cabina. Esto incluye los guantes.
19. Todas las gradillas, recipientes deben ser cubiertos antes de ser retirados de la cabina.
20. Limpie la superficie interna de la cabina con etanol al 70% y permita que se seque.
21. Descarte los guantes apropiadamente.
22. Lavase las manos y antebrazos a profundidad con jabón germicida.
23. Baje la cortina para apagar la luz blanca y el flujo laminar. Active nuevamente la luz ultravioleta durante 15 minutos.

Anexo 1.3

Procedimiento Operativo Estándar para eliminación de desechos:

I. Objetivo:

Con este POE se describe detalladamente el proceso para desinfección del equipo utilizado, asimismo el control de derrames bioinfecciosos.

II. Responsabilidad:

El cumplimiento de estos procedimientos es obligatorio para todo el personal que labore en el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (MEIZ).

III. Definiciones

NaClO: Hipoclorito de sodio

IV. Materiales y equipo:

Papel toalla
Solución de NaClO al 1%
Solución de etanol al 70%
Rociadores
Bolsas rojas de bioseguridad
Guantes de látex
Gabacha manga larga
Lentes protectores

V. Procedimiento:

Eliminación de desechos

1. En el caso de placas de Petri donde fueron elaboradas las resiembras bacterianas (*Staphylococcus aureus*) o antibiogramas, colocarlas dentro de una bolsa roja, asegurarse de que la bolsa quede bien amarrada y esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
2. Cuando esté el producto esterilizado, asegurarse bien que el contenido dentro de la bolsa no elimine líquido o alguna sustancia, colocarla dentro de la bolsa de basura común. Es importante que durante este proceso se utilicen todas las medidas de bioseguridad necesarias como ser el uso de gabacha manga larga, guantes de látex, guantes resistentes al calor y mascarilla debido a que el olor emitido por el producto autoclavado es desagradable.
3. En el caso de portaobjetos donde se realizaron las coloraciones de Gram o pruebas de catalasa, colocarlos dentro de un recipiente que contenga NaClO al 1% a modo que se sumerja todo el portaobjeto en el desinfectante.(dejarlo 30 minutos como tiempo mínimo), autoclavar los portaobjetos. Lavar el material con agua y detergente común. En caso de ser necesario limpiarlos con etanol al 70% debido al

residuo que deja el aceite de inmersión, esto último se realiza en aquellos laboratorios donde los portaobjetos son re-utilizables.

4. En caso de las puntas y pipetas Pasteur que se quieran descartar, colocarlas dentro de un recipiente que contenga una solución de NaClO al 1%, luego someter estas puntas en una bolsa roja de bioseguridad, asegurarse de que la bolsa quede bien amarrada y esterilizar en la autoclave a 121 °C por 15 minutos. Cuando esté el producto esterilizado, asegurarse bien que el contenido dentro de la bolsa no elimine líquido u otra sustancia, colocarla dentro de la bolsa de basura común.
5. Si las puntas o pipetas se quieren reutilizar, colocarlas dentro de un recipiente que contenga una solución de NaClO al 1%, luego lavarlos con detergente y jabón y colocarlos en un recipiente resistente al calor y esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Almacenarlas en un lugar limpio y seco.
6. Los tubos de ensayo que contienen suspensiones bacterianas, esterilizarlos en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, lavar con detergente y agua hasta eliminar todo los residuos. Una vez que estén lavados y secos, esterilizarlos nuevamente en la autoclave dentro de una bolsa especial a 121 °C durante 15 minutos y almacenar en un lugar limpio y seco.
7. Los hisopos contaminados, y las tarjetas de reacción que fueron utilizados para realizar los antibiogramas y las pruebas de aglutinación, colocarlos dentro de una bolsa roja de bioseguridad y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Desechar en basura común.
Siempre es importante recordar que debemos utilizar todas las medidas de bioseguridad necesarias para evitar y prevenir accidentes en el laboratorio como ser uso de gabachas manga larga, guantes de látex, mascarilla y de ser necesario lentes de protección.
Lavarse las manos y los antebrazos al terminar el trabajo.

Anexo 1.4

Procedimiento Operativo Estándar para el Control de Derrames

I. Objetivo:

Con este POE se describe detalladamente el proceso para desinfección del equipo y control de derrames bioinfecciosos.

II. Responsabilidades:

El cumplimiento de estos procedimientos es obligatorio para todo el personal que labore en el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (MEIZ).

III. Definiciones:

NaClO: Hipoclorito de sodio

IV. Materiales y Equipo:

Papel toalla

Solución de NaClO al 1%

Solución de etanol al 70%

Rociadores

Bolsas rojas de bioseguridad

Rótulos de precaución

Libreta de apuntes de accidentes y derrames

V. Procedimiento

En caso de derrames fuera de la cabina de bioseguridad:

1. Colocar una toalla limpia o papel toalla sobre el derrame bioinfeccioso, rociar una solución de NaClO al 1% del centro a la periferia, dejar que este desinfectante actúe durante 30 minutos, posteriormente limpiar el sitio de derrame, y agregar etanol al 70%, limpiar nuevamente. Colocar el papel toalla que utilizó para la limpieza del material bioinfeccioso en una bolsa roja de desechos. Para mayor protección utilizar guantes de látex y mascarilla N95 para prevenir aerosoles. Cuando haya un derrame de material bioinfeccioso: Colocar un rotulo de precaución y apuntarse en la libreta de control de accidentes y derrames.

En caso de derrames dentro de la cabina de seguridad biológica:

1. Si se derrama algo durante el procedimiento, todos los objetos en la cabina deben ser descontaminados antes de sacarlos. Desinfecte profusamente el área de trabajo mientras se está en operación (flujo de aire), para prevenir la salida de contaminantes fuera de la campana.
2. Puede colocar un pedazo de papel toalla sobre el derrame y rociar una solución de NaClO al 1%, dejar que la solución ejerza su efecto durante un tiempo mínimo de 30 minutos. Limpiar y con la ayuda de etanol al 70% terminar la desinfección.
3. Es importante mantener SIEMPRE dentro de la cabina de seguridad biológica un recipiente con etanol al 70%. Ese recipiente no debe de sacarse JAMAS de la cabina, con esta solución descontaminamos el área de trabajo y los guantes que estamos utilizando previo a ser desechados.

Anexo 1.5

Procedimiento Operativo Estándar para el correcto uso de Equipo de Protección Personal.

I. Objetivo

En este POE se describe detalladamente el uso del equipo de protección personal,

II. Responsabilidades

El cumplimiento del presente procedimiento es obligatorio para todo el personal que labora en el laboratorio de investigación de enfermedades infecciosas y Zoonóticas (MEIZ).

III. Definiciones

EPP: Equipo de Protección Personal.

IV. Materiales y equipo:

Gabacha o bata manga larga

Guantes de látex

Lentes o gafas de protección

V. Procedimiento

Puesta del equipo de protección personal

1. **Bata:** Cubra con la bata todo el dorso desde el cuello hasta las rodillas, los brazos hasta la muñeca y dóblela alrededor de la espalda, Átesela por detrás a la altura del cuello y la cintura.
2. **Mascara o respirador:** Asegúrese los cordones o la banda elástica en la mitad de la cabeza y en el cuello. Ajústese la banda flexible en el puente de la nariz, acomódesela en la cara y por debajo del mentón y verifique el ajuste del respirador
3. **Gafas:** Colóquesela sobre la cara y los ojos y luego ajústela
4. **Guantes:** Extienda los guantes para que cubran la parte del puño en la bata de aislamiento.

Quitado del equipo de protección personal

1. **Bata:** La parte delantera de la bata y las mangas están contaminadas, desate los cordones, tocando solamente el interior de la bata, pásela por encima del cuello y de los hombros, Voltee la bata al revés, Dóblela o enróllela y deséchela
2. **Mascara o respirador:** La parte delantera de la máscara o respirador está contaminada, no se debe tocar. Primero agarre la parte de abajo, luego los cordones o banda elástica de arriba y por último quítese la máscara o respirador y arrójela en el recipiente de desechos.
3. **Guantes:** El exterior de los guantes está contaminado. Agarre la parte exterior del guante con la mano opuesta en la que todavía tiene puesto el guante y quíteselo. Sostenga el guante que se quitó con la mano enguantada. Deslice los dedos de las manos sin guante por debajo del otro guante que no se ha quitado todavía a la altura de la muñeca y quítese el guante de manera que acabe cubriendo el primer guante. Arroje los guantes en el recipiente de desechos.
4. **Gafas protectoras:** El exterior de las gafas protectoras o de la careta está contaminado, para quitárselas, tómelas por la parte de la banda de la cabeza o de las piezas de las orejas y colóquelas en el recipiente designado para reprocesar materiales o de materiales de desecho, usted lo puede ver todo lo anterior en el siguiente esquema:

SEQUENCE FOR DONNING PERSONAL PROTECTIVE EQUIPMENT (PPE) The type of PPE used will vary based on the level of precautions required; e.g., Standard and Contact, Droplet or Airborne Infection Isolation. 1. GOWN - Fully cover torso from neck to knees, arms to end of wrists, and wrap around the back. - Fasten in back of neck and waist 2. MASK OR RESPIRATOR - Secure ties or elastic bands at middle of head and neck - Fit flexible band to nose bridge - Fit snug to face and below chin - Fit-check respirator 3. GOGGLES OR FACE SHIELD - Place over face and eyes and adjust to fit 4. GLOVES - Extend to cover wrist of isolation gown USE SAFE WORK PRACTICES TO PROTECT YOURSELF AND LIMIT THE SPREAD OF CONTAMINATION - Keep hands away from face - Limit surfaces touched - Change gloves when torn or heavily contaminated - Perform hand hygiene	SECUENCIA PARA PONERSE EL EQUIPO DE PROTECCIÓN PERSONAL (PPE) El tipo de PPE que se debe utilizar depende del nivel de precaución que sea necesario; por ejemplo, equipo Estándar y de Contacto o de Aislamiento de infecciones transportadas por gotas o por aire. 1. BATA - Cubra con la bata todo el torso desde el cuello hasta las rodillas, los brazos hasta la muñeca y dóblela alrededor de la espalda - Átesela por detrás a la altura del cuello y la cintura 2. MÁSCARA O RESPIRADOR - Asegúrese los cordones o la banda elástica en la mitad de la cabeza y en el cuello - Ajústese la banda flexible en el puente de la nariz - Acomódese en la cara y por debajo del mentón - Verifique el ajuste del respirador 3. GAFAS PROTECTORAS O CARETAS - Colóquelas sobre la cara y los ojos y ajústela 4. GUANTES - Extienda los guantes para que cubran la parte del puño en la bata de aislamiento UTILICE PRÁCTICAS DE TRABAJO SEGURAS PARA PROTEGERSE USTED MISMO Y LIMITAR LA PROPAGACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN - Mantenga las manos alejadas de la cara - Limite el contacto con superficies - Cambie los guantes si se rompen o están demasiado contaminados - Realice la higiene de las manos
SEQUENCE FOR REMOVING PERSONAL PROTECTIVE EQUIPMENT (PPE) Except for respirator, remove PPE at doorway or in anteroom. Remove respirator after leaving patient room and closing door. 1. GLOVES - Outside of gloves is contaminated! - Grasp outside of glove with opposite gloved hand; peel off - Hold removed glove in gloved hand - Slide fingers of ungloved hand under remaining glove at wrist - Peel glove off over first glove - Discard gloves in waste container 2. GOGGLES OR FACE SHIELD - Outside of goggles or face shield is contaminated! - To remove, handle by head band or ear pieces - Place in designated receptacle for reprocessing or in waste container 3. GOWN - Gown front and sleeves are contaminated! - Unfasten ties - Pull away from neck and shoulders, touching inside of gown only - Turn gown inside out - Fold or roll into a bundle and discard 4. MASK OR RESPIRATOR - Front of mask/respirator is contaminated — DO NOT TOUCH! - Grasp bottom, then top ties or elastics and remove - Discard in waste container PERFORM HAND HYGIENE IMMEDIATELY AFTER REMOVING ALL PPE	SECUENCIA PARA QUITARSE EL EQUIPO DE PROTECCIÓN PERSONAL (PPE) Con la excepción del respirador, quítese el PPE en la entrada de la puerta o en la antecámara. Quítese el respirador después de salir de la habitación del paciente y de cerrar la puerta. 1. GUANTES ¡El exterior de los guantes está contaminado! - Agarre la parte exterior del guante con la mano opuesta en la que todavía tiene puesto el guante y quíteselo - Sostenga el guante que se quitó con la mano enguantada - Deslice los dedos de la mano sin guante por debajo del otro guante que no se ha quitado todavía a la altura de la muñeca - Quítese el guante de manera que acabe cubriendo el primer guante - Arroje los guantes en el recipiente de desechos 2. GAFAS PROTECTORAS O CARETA ¡El exterior de las gafas protectoras o de la careta está contaminado! - Para quitárselas, tómelas por la parte de la banda de la cabeza o de las piezas de las orejas - Colóquelas en el recipiente designado para reprocessar materiales o de materiales de deshecho 3. BATA ¡La parte delantera de la bata y las mangas están contaminadas! - Desate los cordones - Tocando solamente el interior de la bata, pásela por encima del cuello y de los hombros - Voltee la bata al revés - Dóblela o enróllela y deséchela 4. MÁSCARA O RESPIRADOR - La parte delantera de la máscara o respirador está contaminada — ¡NO LA TOQUE! - Primero agarre la parte de abajo, luego los cordones o banda elástica de arriba y por último quítese la máscara o respirador - Arrojela en el recipiente de desechos EFFECTÚE LA HIGIENE DE LAS MANOS INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE QUITARSE CUALQUIER EQUIPO DE PROTECCIÓN PERSONAL



Anexo 1.6

Procedimiento Operativo Estándar para la elaboración de medios de cultivo

I. Objetivo :

En este POE se describen los pasos a seguir para la elaboración de medios de cultivo, gelosa sangre y agar Muller-Hinton.

II. Responsabilidades:

El cumplimiento del presente procedimiento es obligatorio para todo el personal que labore para dicho proyecto.

III. Definiciones :

AMH: Muller-Hinton

IV. Materiales y equipo:

Placas de petri

Agua destilada

Agar Columbia (base para gelosa sangre)

Agar MH

Espátulas

Balanza analítica

Erlenmeyer

Autoclave

Cabina de bioseguridad

V. Procedimiento:

Preparación de gelosa sangre

1. Con la ayuda de una balanza analítica pesar en un erlenmeyer con exactitud 37 gramos de agar Columbia, agregar 1000 ml de agua destilada.
2. Calentar hasta completa disolución ya sea con la ayuda de un mechero o de una estufa.
3. Esterilizar el medio de cultivo en un autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
4. Retirar el medio de cultivo con la ayuda de guantes resistentes al calor y dejar que el medio de cultivo se enfríe hasta aproximadamente una temperatura de 55 °C.
5. Agregar 5 ml de sangre por cada 100 ml de medio de cultivo y agitar hasta a homogenización.

6. En un gabinete de seguridad biológica, vaciar 20 ml del medio de cultivo en las placas de Petri y esperar a que el medio solidifique.
7. Incubar a 37 °C durante 24 horas las placas previamente preparadas.
8. Pasadas las 24 horas, revisar que la gelosa sangre no se encuentre contaminada, y almacenar en refrigeración.

Preparación de agar Müller Hinton

1. Con la ayuda de una balanza analítica pesar con exactitud en un erlenmeyer 38 gramos de AMH, agregar 1000 ml de agua destilada.
2. Calentar hasta completa disolución ya sea con la ayuda de un mechero o de una estufa.
3. Esterilizar el medio de cultivo en un autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
4. Retirar el medio de cultivo con la ayuda de guantes resistentes al calor y dejar que el medio de cultivo se enfríe hasta aproximadamente una temperatura de 55 °C.
5. En un gabinete de seguridad biológica, vaciar 25 ml del medio de cultivo en las placas de petri y esperar a que el medio solidifique.
6. Incubar a 37 °C durante 24 horas las placas previamente preparadas.
7. Revisar que el AMH no se encuentre contaminado, y almacenar en refrigeración.

Anexo 1.7

Procedimiento operativo estándar para el control de calidad del agar Muller-Hinton y de los discos de antibióticos

I. Objetivo :

En el presente POE se describe la elaboración del control de calidad del AMH previo a la elaboración de las pruebas de susceptibilidad/resistencia a los antimicrobianos.

II. Responsabilidades:

El cumplimiento del presente procedimiento es obligatorio para todo el personal que labore para dicho proyecto.

III. Definiciones :

AMH: Agar Muller-Hinton

Oxa: Oxacilina

Met: Meticilina

Fox: Cefoxitina

Van: Vancomicina

IV. Materiales y equipo:

AMH

Hisopos estériles

Solución salina 0.85% estéril

Tubos de ensayo estériles

Pipetas y puntas estériles

Pinza estéril

Asa bacteriológica

Incinerador

Escala de Mc-Farland

Discos de antibióticos: Ox, Met, Fox, Van

Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Cepa de *Staphylococcus aureus* CCGU36501

Cepa de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212

Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Regla milimetrada

V. Procedimiento:

Control de calidad del agar Muller Hinton.

1. Preparar agar Müller Hinton, medir pH a temperatura ambiente. El pH debe oscilar entre 7.2 y 7.4.
2. Medir la profundidad del AMH en la placa de petri. Este debe medir 4 mm $\pm$ 0.5 mm.
3. Control de esterilidad.

Determinación de la presencia de timina y timidina.

1. Se inocula una placa de agar Müller Hinton con una suspensión de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) equivalente a una suspensión de 0.5 de la escala de Mcfarland, colocar un disco de trimetropin-sulfametoxazole (25 µg). Incubar a 37 °C por 24 horas.
2. El halo de inhibición debe de ser $\geq$ a 21 mm.

Determinación de la presencia de iones divalentes

1. Se inocula una placa de agar Muller Hinton con una suspensión de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) equivalente a una suspensión de 0.5 de la escala de Mcfarland, colocar un disco de gentamicina (10 µg). Incubar a 37 °C por 24 horas.
2. El halo de inhibición debe encontrarse entre un rango de 16 y 21 mm.

Control de calidad de discos de oxacilina, meticilina, cefoxitina y vancomicina.

1. Se inocula una placa de agar Muller Hinton con una suspensión de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) equivalente a una suspensión de 0.5 de la escala de Mcfarland, colocar un disco de oxacilina (1µg), meticilina (5µg), cefoxitina (30µg) y vancomicina (30µg) separados a una distancia de 25 mm. Incubar a 37 °C por 24 horas.
2. El halo de inhibición del disco de oxacilina debe encontrarse entre un rango de 18 y 24 mm.
3. El halo de inhibición del disco de meticilina debe encontrarse entre un rango de 17 y 22 mm.
4. El halo de inhibición del disco de cefoxitina debe encontrarse entre un rango de 23-29 mm.
5. El halo de inhibición del disco de vancomicina debe encontrarse entre un rango de 17 y 21 mm.
6. Para todas las lecturas de los discos de antibióticos se utilizan las tablas del CLSI. [Cockerill FR, 2011].

Anexo 1.8

Procedimiento Operativo Estándar para el aislamiento bacteriano; Técnica de Frobisher

I. Objetivo

En el presente POE se explica detalladamente el proceso para el aislamiento bacteriano denominado: Técnica de Frobisher.

II. Responsabilidades:

El cumplimiento del presente procedimiento es obligatorio para todo el personal que labore para dicho proyecto y para quienes trabajen con bacterias.

III. Definiciones:

Técnica de Frobisher: técnica de aislamiento bacteriano.

IV. Materiales y equipo:

Placas de Petri (con medio de cultivo)
Asa bacteriológica
Incinerador
Cubeta de bioseguridad
Marcadores

V. Procedimiento:

Sembrado de bacterias mediante la técnica de Frobisher

1. Esterilizar un asa bacteriológica de siembra por flameado en la llama de un mechero o incinerador.
2. Introducir el asa bacteriológica en el cultivo bacteriano y recoger de 2 a 3 colonias
3. Sembrar haciendo estrías sobre la superficie de un medio sólido en una placa Petri, volver a esterilizar el asa
4. Tocar en la zona de la placa ya sembrada y hacer un segundo grupo de estrías en una región nueva de la placa.
5. Repetir el proceso una tercera y una cuarta vez, hasta conseguir que los grupos de células se diluyan y se separen células aisladas.
6. Incubar a 37 grados centígrados, durante 24 horas
[Murray P, 2005]

Anexo 1.9

Procedimiento Operativo Estándar para la identificación bacteriana

I. Objetivo

En el presente POE se describen 3 técnicas para la identificación de *S.aureus*: tinción de Gram, prueba de catalasa en placa y catalasa en tubo y prueba de coagulasa en tubo.

II. Responsabilidades:

Estos procedimientos deben ser cumplidos por todo aquel personal que labore para este proyecto.

III. Definiciones

NaCl: cloruro de sodio

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

IV. Materiales y equipo

Asas bacteriológicas

Incinerador

Cabina de bioseguridad

Porta objetos

Agua destilada

Mechero y fósforos

Kit de Gram: cristal violeta, lugol, alcohol-acetona, safranina

Aceite de inmersión

Microscopio electrónico

H₂O₂ 3%

NaCl 0.85%

Caldo simple

Incubadora

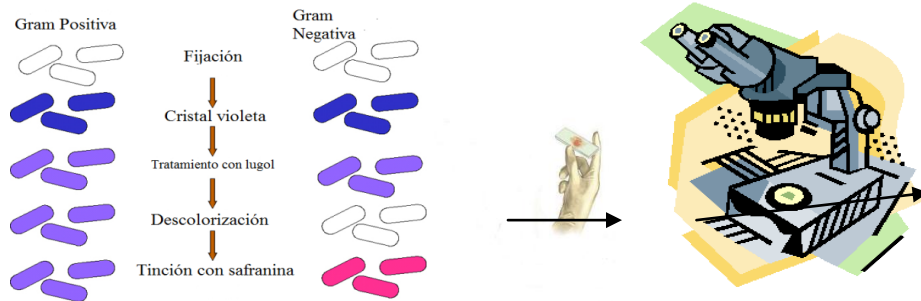
Gradilla

V. Procedimiento

Tinción de gram

1. Colocar sobre un portaobjetos limpio y debidamente rotulado, una gota de agua destilada.
2. Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril, tomar de una a dos colonias de la bacteria y colocarlas en la gota de agua destilada del paso anterior.
3. Fijar la bacteria en el portaobjetos con la ayuda de un mechero.
4. Cubrir la muestra previamente preparada con suficiente cantidad de cristal violeta durante un minuto, eliminar el exceso con ayuda de abundante agua.
5. Cubrir la muestra con lugol durante un minuto, eliminar el exceso con abundante agua.
6. Seguidamente agregar una mezcla de alcohol- acetona durante 3 segundos, eliminar con abundante agua.
7. Cubrir la muestra con safranina y eliminar el exceso con agua.
8. Secar el portaobjetos con papel secante.

9. Agregar una gota de aceite de inmersión
10. Observar en un microscopio en un campo de 100X
11. Utilizar como control negativo una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 [Murray P, 2005]



Prueba de catalasa presuntiva

1. Colocar sobre un extremo del portaobjeto una gota de agua destilada y en el otro extremo colocar una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Rotular debidamente.
2. Esterilizar un asa bacteriológica con la ayuda de un mechero o de un incinerador.
3. Con el asa bacteriológica esterilizada tomar de una a dos colonias de un cultivo en fresco de 24 horas de *Staphylococcus aureus* y colocarla en la gota de agua destilada como se indica en el paso numero 1 y hacerlo de la misma forma con la gota de H₂O₂ al 3%.
4. Se indicará positividad al ponerse en contacto la bacteria con el peróxido de hidrógeno. se observa efervescencia.
5. Utilizar como control negativo una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212



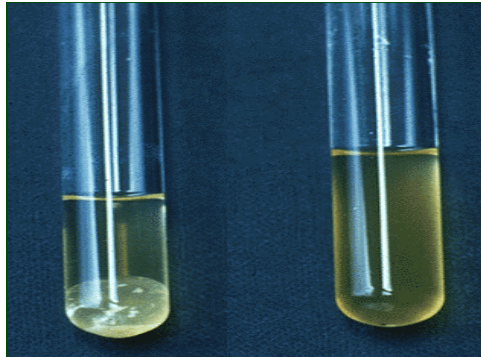
Prueba de catalasa en tubo:

1. Colocar aproximadamente 2 ml de caldo simple en un tubo de ensayo estéril.
2. Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril, tomar 1 o 2 colonias de un cultivo de 24 horas de *S. aureus* e inocularlas en el caldo simple del paso 1.
3. Incubar a 37 °C durante 24 horas.
4. Tomar 1 ml para la prueba de coagulasa y 1 ml para la prueba de catalasa en tubo.

5. Agregar 5 gotas de H₂O₂ al 3% en el tubo de ensayo que contiene el caldo simple con la bacteria..
6. Se indicará positividad al observarse desprendimiento de burbujas.
7. Utilizar como control negativo una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. [Murray P, 2005]

Prueba de coagulasa en tubo

1. En un tubo de ensayo estéril, agregar 1 ml de caldo simple conteniendo la bacteria previamente inoculada como se indica en el paso anterior.
2. En otro tubo de ensayo estéril, agregar $\frac{3}{4}$ partes de solución salina al 0.85% y $\frac{1}{4}$ parte de plasma humano.
3. Mezclar en otro tubo de ensayo estéril, 0.5 ml del inóculo preparado en el paso 1 y 0.5 ml de la mezcla preparada en el paso 2.
4. Incubar a 37 °C durante 30 minutos.
5. La prueba es positiva al formarse un coágulo.
6. Si a los 30 minutos no se llegara a formar el coágulo, se deja incubando la muestra durante 4 horas, si no se forma en 4 horas, dejar incubando durante 24 horas.
7. Utilizar como control negativo una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. [Murray P, 2005]



Anexo 1.10

Procedimiento Operativo Estándar para la determinación de susceptibilidad a drogas.

I. Objetivo

En el presente POE se describen 2 técnicas para la determinación de la susceptibilidad/resistencia a drogas.

II. Responsabilidades

Los presentes procedimientos deben ser cumplidos por todo aquel personal que labore para este proyecto.

III. Definiciones

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

AMH: agar Muller Hinton

NaCl: Cloruro de sodio

Oxa: Oxacilina

Met: Meticilina

Fox: Cefoxitina

Van: Vancomicina

IV. Materiales y equipo

Placas de petri

AMH

Asa bacteriológicas

Incinerador

Cabina de bioseguridad

Hisopos estériles

Tubos de ensayo estériles

NaCl 0.85%

Discos de antibióticos: Oxa, Met, Fox, Van

Tiras de E-test: Oxa, Met

Escala de Mc-Farland

Pinzas estériles

Marcadores

Incubadora

Regla milimetrada

Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Cepa de *Staphylococcus aureus* CCGU36501

V. Procedimiento

Método de difusión en disco

1. Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril, tomar de un cultivo en fresco de *Staphylococcus aureus*, dos o tres colonias de la bacteria y suspender en un tubo de ensayo que contenga una solución salina al 0.85% (ambos estériles) Comparar la turbidez con la escala de McFarland 0.5, la turbidez de ambos tubos debe de ser equivalente.
2. Se prepara el inóculo al introducir un hisopo estéril en la suspensión de la bacteria dejando que se impregne del todo.

3. Sacar el hisopo de la suspensión y apretarlo varias veces contra la pared interna del tubo para eliminar el exceso de suspensión bacteriana.
4. Sembrar la placa en medio de Muller-Hinton, rotando el hisopo sobre toda la superficie, siguiendo 3 direcciones que forman entre si un ángulo obtuso o bien, en seis direcciones, sembrando cada vez solamente la mitad de la placa, del centro hacia la periferia.
5. Posteriormente se deja la placa sembrada cerca del mechero o en la cabina de seguridad biológica con la tapa media abierta, durante 3 a 15 minutos. Se colocarán los discos de oxacilina (1µg), metilicina (5µg), cefoxitina (30µg) y vancomicina (30µg) sobre la superficie sembrada, ya sea manualmente con pinzas o mediante un dispensador especial. Con las pinzas y con un aplicador de madera o algún otro utensilio adecuado, apretar los discos sobre la superficie para que se adhieran a esta.
6. Los discos quedarán regularmente espaciados, aproximadamente a 25 mm uno del otro y a 10 mm del borde. Colocar las placas en una incubadora a 37 °C, posición invertida, durante 18 a 24 horas.
7. Medir el diámetro de los halos de inhibición con instrumento adecuado y se comparará con los datos proporcionados por el CLSI. en este caso se comparan los halos de inhibición formados alrededor del disco. [Bauer AW, 1966; Lawrence W, 1972].

E-test

1. Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril, tomar de un cultivo en fresco de *Staphylococcus aureus*, dos o tres colonias de la bacteria y suspender en un tubo de ensayo que contenga una solución salina al 0.85% (ambos estériles) Comparar la turbidez con la escala de McFarland 0.5, la turbidez de ambos tubos debe de ser equivalente.
2. Se prepara el inóculo al introducir un hisopo estéril en la suspensión de la bacteria dejando que se impregne del todo.
3. Sacar el hisopo de la suspensión y apretarlo varias veces contra la pared interna del tubo para eliminar el exceso de suspensión bacteriana.
4. Sembrar la placa en medio de Muller-Hinton, rotando el hisopo sobre toda la superficie, siguiendo 3 direcciones que forman entre si un ángulo obtuso o bien, en seis direcciones, sembrando cada vez solamente la mitad de la placa, del centro hacia la periferia.
5. Posteriormente se deja la placa sembrada cerca del mechero o en la cabina de seguridad biológica con la tapa media abierta, durante 3 a 15 minutos. Se colocarán las tiras de oxacilina y vancomicina sobre la superficie sembrada, con las pinzas y con un aplicador de madera o algún otro utensilio adecuado, apretar las tiras sobre la superficie para que se adhieran a esta.
6. Las tiras quedarán regularmente espaciadas, y colocadas de manera invertida.
7. Colocar las placas en una incubadora a 37 °C, posición invertida, durante 18 a 24 horas.
8. Con la ayuda de una regla, medir el diámetro de la elipse formada y se compara con los datos proporcionados por el CLSI. En este caso se compara con los datos de CMI [BioMérieux SA, 2011].

Anexo 1.11

Procedimiento Operativo Estándar para la determinación de la proteína PBP2a

I. Objetivo:

En el presente POE se explica en detalle la determinación de la proteína PBP2a en aquellos aislados con resistencia a betalactámicos.

II. Responsabilidades

Este procedimiento deberá cumplirse por todo aquel personal que labore en dicha investigación.

III. Definiciones

PBP2a: Penicilin Binding Protein, Proteínas de Unión a Penicilina.

IV. Materiales y equipo

Asas bacteriológicas

Incinerador

Cámara de bioseguridad

Viales estériles

Baño maría

Kit de reactivos para la detección de la PBP2a, Oxoid®

Puntas estériles

Pipetas

V. Procedimiento

1. Suspende de 3 a 5 colonias de un cultivo en fresco de 24-48 Horas en cuatro gotas del reactivo de extracción # 1 y someter a 100 °C durante 3 minutos.
2. Dejar enfriar a temperatura ambiente y añadir una gota del reactivo # 2.
3. La suspensión debe centrifugarse a 3,000 rpm durante 5 minutos.
4. Mezclar 50 µl del sobrenadante con una gota del látex sensibilizado.
5. Una aglutinación positiva durante los primeros 3 minutos indica la presencia de la PBP2a.
6. Se utilizó como control negativo una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y como control positivo la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC CCGUG36501.

Anexo 1.12

Procedimiento Operativo Estándar para la detección del gen *mecA*

I. Objetivo:

En el presente POE se explica detalladamente la detección del gen *mecA* en aquellos aislados resistentes a betalactámicos

II. Responsabilidades

Este procedimiento deberá cumplirse por todo aquel personal que labore en dicha investigación.

III. Definiciones

Cebadores: es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

IV. Materiales y equipo

Asas bacteriológicas

Incinerador

Cámara de bioseguridad

Viales estériles

Baño maría

Kit de reactivos para la detección del gen *mecA*

Cebadores

Solución salina

Puntas estériles

Pipetas

Agarosa

Agua destilada

Termociclador

Balanza

Espátulas

Cámara electroforética

V. Procedimiento

La extracción del ADN bacteriano se realiza de la siguiente forma (de acuerdo a los procedimientos de Boom y colaboradores

Extracción de ácidos nucleicos por el método de Boom [Boom R, 1990].

1. Colocar 20 µl de sílica en un tubo con capacidad de 1.5 ml.
2. Añadir 500 µl de buffer L6 en cada tubo.
3. Añadir 100 µl de la muestra (incluir control positivo y control negativo)
4. Homogenizar en vortex y colocar 30 minutos en agitador orbital
5. Homogenizar en vortex, centrifugar a 12,000 rpm durante 1 minuto y descartar el sobrenadante con NaOH al 10 M.
6. Lavar 2 veces con 500 µl del buffer L2 y homogenizar en vortex y centrifugar a 12,000 rpm durante 1 minuto, descartar el sobrenadante en un recipiente con NaOH al 10 M.

7. Lavar 2 veces con 500 µl de etanol al 70% frío a 4°C, homogenizar en vortex y centrifugar a 12,000 rpm durante 1 minuto, Descartar el sobrenadante.
8. Adicionar 500 µl de acetona fría a 4, homogenizar y centrifugar por 1 minuto a 12,000 rpm. Descartar cuidadosamente el sobrenadante.
9. Incubar en bloque térmico a 56 °C durante 15 minutos con las tapas de los tubos abiertos.
10. Re suspender la sílica con 60 µl con agua libre de nucleasas, homogenizar en vortex. Incubar a 56°C durante 15 minutos con las tapas de los tubos cerrados para la elución de los ácidos nucleicos. Agitar en vortex, centrifugar a 10,000 rpm por 2 minutos.
12. Extraer cuidadosamente el sobrenadante aproximadamente 50 µl.
13. Guardar los ácidos nucleicos extraídos en congelador a -20 °C por 24 horas o a -70°C por tiempo indefinido.
14. Utilizar como control negativo para la detección del gen *mecA* la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y como control positivo la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC CCUG36501.

Los cebadores utilizados corresponden a 2 regiones altamente conservadas del gen ribosómico 16S de 370 pb: 16S plus: 5'-AGG AGG TGA TCC AAC CGC A-3' y 16S minus: 5'-AAC TGG AAG AAG GTG AT-3', y al gen *mecA* de 310 pb *mecA* plus 5'-TGG CTA TCG TGT CAC AAT CG-3' y *mecA* minus 5'-CTG-GAA-CTT-GTT-GAC-CAG-AG-3' respectivamente. [Soloaga R, 2004]

Asimismo, 2 µl del ADN extraído se agregan a una mezcla que contiene: 200 µM desoxinucleótidos trifosfato; 10 mM Tris (pH 8.3); 50 mM KCl; 1.5 µM MgCl₂; 50 pmol de cebadores y 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Promega®).

La amplificación se realiza en un termociclador de acuerdo al siguiente protocolo: desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos amplificados son separados mediante electroforesis en gel con agarosa al 2% a 100 V por 30 minutos y teñidos con bromuro de etidio, las bandas fueron visualizadas en un transiluminador con luz ultravioleta. [Castellano-Gonzales, 2008]

Esta técnica es considerada como el método de referencia para la determinación de la resistencia a meticilina [Toruño., 2003]

