

GR82
N5A5

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANALISIS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
POSTGRADO EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

**PERSONAL DE SALUD COMO RESERVORIO DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE A METICILINA EN UNA UNIDAD DE ALTO RIESGO
NEONATAL**

María Evelyn Alviárez Vargas

Tutora: MSc. Elsa Velazco

Mérida, Noviembre del 2006

DOCTORA

SERBIULA
Tutto Febres Cordoro

RESUMEN

Personal de Salud como Reservorio de *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina en una Unidad de Alto Riesgo Neonatal.

Lic. María Evelyn Alviarez V, MSc. Elsa Velazco. Laboratorio de Bacteriología Anaeróbica "Roberto Gabaldón". Depto de Microbiología y Parasitología. Universidad de los Andes. Mérida.

Staphylococcus aureus resistente a Meticilina (SARM) es un patógeno intrahospitalario importante; este microorganismo se ha logrado aislar en modernas unidades de cuidados intensivos, produciendo el 50% de cuadros de sepsis severa. Para la adecuada vigilancia y prevención de infecciones intrahospitalarias ocasionadas por cepas de SARM, se han sugerido diferentes medios de cultivo, entre ellos, el agar Manitol Salado suplementado con 6 µg de oxacilina. En el presente estudio se utilizó este medio para detectar cepas SARM en el personal de salud de la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN), del IAHULA, donde el 31,58% de dicho personal resultó portador de cepas SARM heterorresistentes en fosas nasales. El mayor porcentaje de portadores estuvo representado por el personal de enfermería con un 58,33%. el 7,9% del personal muestreado presentó cepas SARM heterorresistentes en manos, encontrándose sólo en el personal de enfermería con un 15%. Se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a todas las cepas SARM, por los métodos de difusión en disco o Kirby Bauer y dilución en agar. Además de la resistencia a la oxacilina el 52,9% de las cepas estudiadas mostró resistencia a la eritromicina y kanamicina, y un 47% de resistencia a gentamicina. Al comparar la sensibilidad y especificidad de diferentes técnicas para la detección de cepas SARM se encontró 100% de sensibilidad y 100% especificidad en la técnica Kirby-Bauer con disco de 1 µg/mL de oxacilina, al compararlo con el método de cribado. El estudio plásmidico reveló que el 25% de cepas SARG mostraron presencia de formas plasmídicas, con un peso molecular aproximado de 23Kb y CIM igual o superior a 256 µg/mL, que procedían en su mayoría de portadores nasales del personal de enfermería. En cepas provenientes de estudios previos de portador y pacientes de años anteriores (1998-2002), se pudo encontrar similitud en el peso molecular, de las formas plasmídicas, al compararlas con las cepas aisladas en el 2003. Este estudio sugiere que las enfermeras siguen siendo fuente importante de diseminación de cepas SARM, por ello, es necesario continuar con las medidas de control como lavado de manos antes y después de la manipulación de pacientes.

*A mis hijos, Evelyn Andrea y
Javier Alejandro*

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen Santísima por permitirme culminar esta etapa tan importante en mi vida, y guiar mis pasos.

A mi madre, a quien le debo lo que soy, con su cariño y amor me has enseñado el verdadero valor de la vida.

A Javier, sin tu cariño y apoyo no lo hubiera logrado, gracias.

A mis suegros, por su cariño y ayuda incondicional.

A mi familia, gracias por apoyarme.

A la Profesora Elsa Velazco, quien ha sido ejemplo a seguir, gracias por confiar en mí.

A la Profesora Beatriz Nieves, gracias por compartir y ayudarme a culminar con éxito esta etapa en mi formación profesional.

Al Laboratorio de Bacteriología Anaeróbica “Roberto Gabaldón”

A todo el personal del Laboratorio de Genética y Química Celular (GEQUIMCEL) de la Facultad de Ciencias.

A los Profesores que forman parte del Postgrado en Microbiología y a todo el personal del Departamento de Microbiología y Parasitología.

A mis compañeros de Especialidad, Maestría en Microbiología Clínica y Maestría en Microbiología de Alimentos.

A la Ilustre Universidad de los Andes.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	i
Índice de Esquemas	v
Índice de Figuras	vi
Índice de Tablas	vii
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.-MARCO TEÓRICO	5
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM).....	5
2.2 Vigilancia y control de las infecciones por SARM.....	10
2.3 Mecanismo de resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> a la meticilina y a otros agentes antimicrobianos.....	14
2.4 Métodos de detección de SARM.....	23
2.5 Alternativas terapéuticas utilizadas para SARM.....	32
3.- OBJETIVOS	34
4.- HIPÓTESIS	36
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.- RESULTADOS	49
7.- DISCUSIÓN	61
8.- CONCLUSIONES	67
9.- RECOMENDACIONES	69
10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO	86

Índice de Esquemas

Esquema 1 Método de cribado para determinar resistencia de SARM.....	41
Esquema 2 Susceptibilidad a la oxacilina y a otros agentes antimicrobianos por la técnica Kirby-Baüer.....	42
Esquema 3 Concentración inhibitoria mínima (CIM) a la oxacilina ante cepas SARM.....	43
Esquema 4 Concentración inhibitoria mínima (CIM) a diferentes agentes antimicrobianos ante <i>S. aureus</i> resistente y sensibles a oxacilina.....	44
Esquema 5 Determinación de la susceptibilidad al disco de cefoxitin de 30 µg/mL en cepas SARM.....	45
Esquema 6 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina.....	47

Índice de Figuras

Figura 1 Ciclos de la PCR.....	31
Figura 2 Formas plasmídicas de cepas SARG provenientes de portadores de fosas nasales y manos aisladas del personal de la UARN (2003). Cepas barridos anteriores (años 1998-2002).....	58
Figura 3 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de gentamicina ante cepas SARG con formas plasmídicas aisladas del personal de la UARN.....	59
Figura 4 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de gentamicina ante cepas SARG con formas plasmídicas aisladas de neonatos y portador de la UARN (periodo 1998-2002).....	60

Índice de Tablas

Tabla 1 Plásmidos relacionados con resistencia a diferentes antimicrobianos en <i>S. aureus</i>	13
Tabla 2 Mecanismo de resistencia de <i>S. aureus</i> a diferentes antibióticos.....	22
Tabla 3 Portadores totales de SARM en fosas nasales y manos según la ocupación.....	50
Tabla 4 Porcentaje de resistencia de 15 cepas SARM ante 11 agentes antimicrobianos por el método de difusión en disco (Kirby-Baüer).....	51
Tabla 5 Perfiles de resistencia de cepas SARM aisladas en fosas nasales y manos del personal que labora en la UARN del IAHULA- Julio 2003 (Kirby-Baüer).....	52
Tabla 6 Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de varios agentes antimicrobianos ante cepas SARM.....	53
Tabla 7 Sensibilidad y especificidad de tres técnicas utilizadas en la detección de SARM en comparación con el método de cribado.....	54
Tabla 8 Características de las cepas SARG y provenientes del personal de salud de la UARN (2003).....	56

Tabla 9 Características de las cepas SARG provenientes
de neonatos y personal de salud de la UARN
caracterizadas en estudios previos (1998-2002.....57

1.-INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina (SARM), representa en Latinoamérica y el mundo, uno de los principales microorganismos responsables de brotes de infección nosocomial. Estas cepas se identificaron poco tiempo después de la introducción de la meticilina a la terapéutica. Los primeros brotes de infección nosocomial por estas cepas se describieron en hospitales Europeos al inicio de los años sesenta, desde entonces, su prevalencia ha ido en aumento en la mayoría de las áreas geográficas (Camarena y Sánchez, 1998).

La vulnerabilidad a la colonización e infección por SARM, depende de factores tales como, la duración de los pacientes dentro del recinto hospitalario, terapias en cuidados intensivos, tratamiento con antibióticos de alto espectro y los pacientes con heridas quirúrgicas y catéteres que facilitan la entrada de este tipo de cepas (Wagenvoort, 2000).

La colonización por SARM está favorecida por la presencia de cuerpos extraños, lesiones persistentes en la superficie mucocutánea y las punciones frecuentes; la tasa de colonización en pacientes hospitalizados oscila entre del 25% al 45% y en el personal de salud de 50% y 70%. El vestíbulo nasal se considera el reservorio por excelencia de cepas SARM en el hombre, especialmente en el personal que tiene acceso a pacientes, como las enfermeras y los médicos. La colonización de las manos

suele ocurrir en forma transitoria, sin embargo, puede persistir hasta varias horas después propagando este tipo de cepas tanto a pacientes como a objetos inanimados (Sanabria y col. 2003; Aravind y col. 1999).

El mecanismo molecular de resistencia a la meticilina más estudiado, es la producción de una proteína modificada de unión a la penicilina de la pared celular (PBP_{2A}), la cual impide la unión de los antibióticos betalactámicos, permitiendo la supervivencia del microorganismo a concentraciones elevadas del antibiótico que en ausencia de dicha proteína, pudieran llegar a ser letales a dicho microorganismo (Torroba y col. 2005). Se conoce un gen asociado a la resistencia a la meticilina, que codifica a las proteínas PBP_{2A} descritas anteriormente, denominado *mecA*. Este gen está localizado en las islas de patogenicidad o IP, extensas regiones del genoma bacteriano presentes en la mayoría de las bacterias patógenas, midiendo en ciertas ocasiones, hasta 200kb (Schmidt y Hensel, 2004).

Para la adecuada vigilancia y prevención de las infecciones intrahospitalarias ocasionadas por cepas SARM, se han sugerido diferentes medios de cultivo para su detección, entre ellos, el agar manitol salado suplementado con 6 µg/mL de oxacilina y 4% de cloruro de sodio, ya que se ha demostrado que identifica de una manera rápida y eficaz cepas SARM heterorresistentes (Mir y col. 1998). También se puede utilizar medios que contienen indicadores cromogénicos como el ORSA (Oxacillin Resistant Screen Agar) el cual identifica colonias SARM, luego de 48 horas de incubación (Apfalter y col. 2002).

Además de la utilización de medios suplementados como los métodos de cribado, existen otras técnicas para la identificación de cepas SARM multirresistentes, entre ellos se utiliza el método de difusión en disco Kirby Baüer utilizando el disco de 1 µg/mL de oxacilina (Calvo y col. 2004). En años recientes, el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2005), recomienda la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima o CIM, tanto por dilución en agar o E test, como por microdilución en caldo, en el estudio de cepas SARM dentro del ambiente hospitalario. También recomienda el disco de cefoxitin de 30 µg/mL en agar Mueller Hinton, ya que la zona de inhibición producida por este disco se correlaciona con la presencia del gen *mecA* (Palecinos, 2002)

En virtud de encontrarse cepas de *S. aureus* muchas veces resistentes a otros antibióticos diferentes a los β_láctamicos como los aminoglucósidos, macrólidos y mupirocina, es importante que en estudios de vigilancia y control se incluyan además de los métodos convencionales para la detección de SARM, métodos de tipificación tales como análisis plasmídicos, fagotipia y/ o reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Conociendo la importancia que tiene SARM como patógeno nosocomial en pacientes neonatos, y la importancia de los portadores nasales y de manos en la transmisión de estas cepas, basándose en estudios previos (Velazco, 2002), se planteó el siguiente trabajo, el cual tiene como objetivo determinar la frecuencia de portadores de SARM en

el personal de salud de la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA), así como también, realizar estudios microbiológicos, a las cepas de SARM y determinar el perfil plasmídico a las cepas de *S. aureus* resistentes a gentamicina (SARG) aisladas en Julio del 2003, cuando se reportó un aumento en la frecuencia de infecciones por SARM en la mencionada unidad.

2.-MARCO TEÓRICO

2.1 *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM):

Los primeros brotes por SARM se descubren en hospitales europeos, la rápida respuesta adaptativa frente a los cambios del medio y su continua diseminación en los hospitales de todo el mundo, han hecho que esta bacteria se convierta en una residente habitual de los recintos intrahospitalarios y ha supuesto uno de los retos terapéuticos y de control de infección más importantes en los últimos años (Camarena y Sánchez, 1998; Domínguez y Rodríguez, 2003). En la década de los 90, se consideró un patógeno principalmente nosocomial pero en los últimos años ha adquirido importancia como patógeno comunitario (Navascues y col. 2004). Cepas SARM han emergido en la actualidad de forma significativa como patógenos comunitarios, especialmente en niños no inmunosuprimidos y con factores de riesgos mínimos, asociado con infecciones de piel y tejidos blandos (abscesos y celulitis) (Eady y Cove, 2003).

Se ha definido como SARM aquellas cepas resistentes a la meticilina, oxacilina y nafcilina, lo que implica resistencia a todos los antibióticos betalactámicos. La resistencia a la meticilina ha sido definida cuando el CIM de meticilina presenta valores iguales o mayores a 16 µg/ml o valores del CIM de oxacilina iguales o mayores a 4 µg/mL (Salgado y col. 2003).

Entre los factores de riesgo que seleccionan y condicionan la colonización por este tipo de cepas, se señalan: las hospitalizaciones prolongadas, las intervenciones quirúrgicas, la permanencia en unidades de cuidados intensivos, el uso indiscriminado de antibióticos y la proximidad al personal médico u otros pacientes colonizados o infectados por SARM. Los portadores nasales de este tipo de cepas representan una fuente importante de dispersión en el ambiente hospitalario (Hernández y col, 2003). SARM representa un importante reto para los servicios de salud pública de muchas instituciones sanitarias de todo el mundo. Este microorganismo es causa frecuente de brotes y es transmisible entre personas y en muchas regiones ha llegado a ser endémicos, aumentando considerablemente la morbilidad, mortalidad y los costos de la atención sanitaria (Struelens, 2000).

Las cepas SARM son introducidas al ambiente hospitalario a través de los visitantes o el personal sanitario. El reservorio fundamental de este microorganismo lo constituyen los pacientes ingresados, infectados o colonizados. En el hombre, SARM coloniza normalmente la porción anterior de las fosas nasales. Otros sitios del cuerpo que pueden colonizarse con SARM incluyen: heridas abiertas, tracto respiratorio, perineo, ombligo (en los infantes), tracto urinario y en las axilas (Boyce y col., 1998).

Las manos del personal sanitario representan la principal vía de infección cruzada de brotes por SARM, aumentando el número de portadores nasales, los cuales constituyen la principal fuente de infección en este tipo de ambientes. El personal que labora en las instituciones hospitalarias (médicos, enfermeras, etc.), son fuentes de diseminación de SARM. En algunos casos, el paciente puede ser colonizado y a su vez, transmitir el

microorganismo a otros pacientes del mismo ambiente hospitalario (Al Haddad y col. 2001).

Una vez traspasadas las barreras de la piel, las cepas SARM se diseminan en los tejidos y se multiplican, produciendo furúnculos, abscesos localizados, en donde, en algunas ocasiones, se produce necrosis, (Lara, 2003). Por otra parte, la transmisión a través de los objetos inanimados es de gran importancia en poblaciones especiales, tales como pacientes pertenecientes a la unidad de cuidados intensivos, unidad de quemados y unidades de cuidados especiales en Neonatología (Camarena y Sánchez 1998).

En los últimos 7 años, en hospitales Europeos y en la India, se ha demostrado la presencia de SARM en 28,4% y 33,5%, respectivamente, en barridos realizados en unidades de cuidados especiales de recién nacidos. Este porcentaje puede aumentar debido a la asociación que existe entre los portadores de dichas cepas, conformados por los trabajadores de las mencionadas unidades, y los factores de riesgo asociados a los recién nacidos, como bajo peso al nacer, enfermedades congénitas, el empleo de catéteres intraumbilicales y la malas condiciones de higiene (Aravind y col. 1999)

SARM produce la mayoría de infecciones ocasionadas por las cepas sensibles a la meticilina (SASM), pero a diferencia de estas cepas, las cepas SARM son aisladas del ambiente intrahospitalario de pacientes con factores predisponentes que favorecen la colonización por este microorganismo. Las infecciones más frecuentemente encontradas son las de heridas quirúrgicas y lesiones de quemaduras (Sopena, 2001). Un individuo colonizado por cepas SARM, en fosas nasales, garganta o manos, puede

transmitirlo a otras personas fuera y dentro del ambiente hospitalario, así como también puede darse el caso de la transmisión por medio del uso de material contaminado, objetos inanimados o aparatos de ventilación mecánica y utensilios personales (Aravind y col. 1999).

En los últimos 20 años se ha presentado un repunte en el desarrollo de ciertas infecciones producidas por *S. aureus* resistentes a la meticilina y a los aminoglucósidos, aisladas de hemocultivos provenientes de pacientes de edad avanzada que cursaban con sepsis y que se encontraban recluidos en unidades de cuidados intensivos. Prego y col. (2004), indican que la presencia de SARM en niños con infecciones de piel, tales como, abscesos, impétigo y celulitis, se ha incrementado en los últimos años en un 54,6% comparado con la década pasada. Este tipo de lesiones aumentan la posibilidad de colonización por este tipo de cepas, en especial, en pacientes quemados o con heridas quirúrgicas infectadas.

Vaquero y col. (2005) realizaron un estudio sobre la colonización e infección de SARM en un servicio de Angiología, donde se evaluó a todos los pacientes ingresados para cirugía vascular, encontrando colonización de cepas SARM en un 40% de los casos; por su parte, Machado y col. (2002) indican que en pacientes pediátricos se han visto implicadas cepas SARM en un 69% de los casos, como agente causal de abscesos de válvulas cardíacas y prótesis de válvulas, llevando posteriormente a sufrir de una sepsis.

La neumonía por SARM representa entre el 1 y 10% de las neumonías extrahospitalarias y hasta un 16% de las neumonías de origen nosocomial. Se producen habitualmente por microaspiración, aunque también pueden ser de origen hematógeno; suelen presentarse en forma de empiema o de bronquitis crónica en algunos casos. Las neumonías nosocomiales por SARM se producen habitualmente en áreas como UCI, quirófanos y unidades de quemados, siempre relacionados con ventilación mecánica (Fagón y col. 1998).

En el caso de las bacteremias, suelen ser de origen nosocomial, aunque también se han descrito cuadros provenientes de la comunidad, pero la gran mayoría se asocia a pacientes hospitalizados crónicos. Se suelen presentar del 15% al 30% de frecuencia en pacientes con cateterismos vasculares, infecciones de heridas quirúrgicas y de partes blandas. (Pujol y col. 1996). En unidades de larga estancia y en centros de hemodiálisis, los pacientes con sondas urinarias, son generalmente colonizados por cepas SARM, llegando a presentar con un 25% de frecuencia infecciones del tracto urinario, que desencadenan bacteremias y sepsis nosocomial (Domínguez y Pujol, 2005; Sopena, 2001).

En la actualidad, SARM ha emergido significativamente como patógeno comunitario, especialmente en niños con factores de riesgo no precisados y predominantemente, asociados a infecciones de piel y tejidos blandos (abscesos y celulitis) (Eady y Cove, 2003). Salgado y col. (2003) señalan que las infecciones por SARM en la comunidad pueden presentar modificaciones epidemiológicas que suelen estar directamente relacionadas con cambios en la resistencia de la bacteria, aumentando así, el riesgo

potencial al diseminarse en la población. Recientes informes relacionan a SARM de origen comunitario como patógeno responsable de muchos cuadros clínicos asociados con hacinamientos en cárceles, debido principalmente a las condiciones insalubres de los centros penitenciarios. Estas infecciones son generalmente infecciones de piel y tejidos, como celulitis, abscesos, artritis séptica, neumonía y sepsis (Vourli y col. 2005).

2.2.- Vigilancia y Control de las Infecciones por SARM.

Diversos estudios de vigilancia de las infecciones por SARM, señalan que existe un incremento global de la prevalencia de SARM, por ejemplo, se puede indicar que en países como Estados Unidos es del 42%, Europa posee una prevalencia del 26,32%, mientras que Colombia y Argentina poseen 8,6% y 42,7%, respectivamente (Velásquez y col. 2002).

En Europa, específicamente en Alemania, los estudios de vigilancia epidemiológica han demostrado la presencia de nuevos brotes epidémicos; lo cual sugiere la necesidad de mejorar y coordinar planes de mayor envergadura destinados a controlar la resistencia a los antibióticos ampliando los métodos de vigilancia y control. Desde el 2001, en los Países Bajos Europeos, se han observado numerosas cepas SARM heterorresistentes, la diseminación de este tipo de cepas suele pasar desapercibida ya que llegan a presentar valores relativamente bajos de CIM entre 4-24 mg/L, alterando la resistencia fenotípica a los antibióticos betalactámicos (Wannet, 2002).

En virtud de la gran preocupación a nivel mundial, sobre esta problemática, Jones en 1996, diseña un programa denominado SENTRY, el cual establece lineamientos acerca de las infecciones producidas por bacterias nosocomiales, entre ellas, cepas SARM. Este programa está conformado por 25 países de los cinco continentes del mundo, entre los cuales figura Venezuela y otros países de Latinoamérica. Su principal objetivo es registrar los microorganismos involucrados en los procesos infecciosos con su respectivo perfil de resistencia a los antimicrobianos.

SARM, presenta en Venezuela una tasa de resistencia a los betalactámicos que se ha mantenido durante varios años, presentando una prevalencia del 91 al 97%, situación similar a otros países latinoamericanos. Por otra parte, Velazco y col. en el año 2002, encontraron una prevalencia del 20% de cepas SARM aisladas en la unidad de alto riesgo neonatal del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes en Mérida, de neonatos que cursaban con algún tipo de infección de origen nosocomial, siendo la conjuntivitis y la sepsis, las entidades clínicas más frecuentes.

Entre las medidas generales de control en caso de brotes por SARM, entre las se pueden señalar:

- Estudios microbiológicos: Confirmación de la presencia del gen *mecA* de las cepas recibidas mediante PCR.
- Estudios de sensibilidad a los antibióticos mediante métodos clásicos de antibiograma, método de microdilución, y E-test, a meticilina (oxacilina), aminoglucósidos y macrólidos.
- Tratamiento antimicrobiano específico y apropiado.

➤ Investigación de origen del brote: si es una adquisición comunitaria o nosocomial, ésta se determina observando si el paciente la desarrolló 48 horas después de haber ingresado a la institución hospitalaria (Domínguez y Rodríguez, 2003).

La confirmación de un brote infeccioso nosocomial o comunitario producido por SARM, y el adecuado estudio de portadores, requiere el aislamiento e identificación del microorganismo a partir de muestras clínicas. Con el fin de establecer la identidad más precisa de dicho microorganismo se han desarrollado una gran variedad de métodos de tipificación (Sopena, 2001). En la actualidad, las técnicas de tipificación por biología molecular, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ribotipificación, electroforesis en gel de campo pulsado.

El análisis del ADN plasmídico fue el primer método molecular utilizado para el estudio de la clonalidad bacteriana. Se basa en la hipótesis de que todos los aislados de una misma cepa contienen el mismo número de plásmidos, con pesos moleculares y patrones de restricción similares (Samburook y Maniatic, 1989). Los plásmidos pueden conferir resistencia a los antibióticos en las bacterias que los poseen, como en el caso de cepas de *S. aureus*. Los factores R contienen de forma característica genes que codifican enzimas que son capaces de destruir o modificar antibióticos y no están integrados al cromosoma bacteriano, como es el caso de los plásmidos que confieren resistencia al cloranfenicol, la kanamicina y la ampicilina (Prescott y col. 2004). También se han encontrado otro tipo de plásmidos que potencian la patogenicidad de la bacteria y se denominan plásmidos de virulencia, estos tienen la capacidad de mediar la

producción toxinas, como es el caso de la cepas enterotoxigénicas de *E. coli* (Luque y Herraiz, 2001, Prescott y col. 2004).

En la tabla 1 se pueden observar las diferentes clases de plásmidos relacionados con la resistencia a algunos agentes antimicrobianos, en cepas de *S. aureus*.

Tabla 1 : Plásmidos relacionados con resistencia a diferentes antimicrobianos en *S. aureus*

Plásmido	Descripción	Resistencia a
PG0400	Plásmido de 33.8 kb conjugativo	Mupirocin
PG0401	Plásmido de 44.1 kb conjugativo	Mupirocin
PG0403	Plásmido de 48.2 kb conjugativo	Mupirocina
PG0402	Plásmido de 11.1 kb digerido con <i>EcoRI-A</i>	Tetraciclina
PG0407	Plásmido de 2.4 kb digerido con <i>EcoRI-E</i>	Tetraciclina
PG0460	Plásmido de 4.4 kb digerido con <i>EcoRI-G</i>	Tetraciclina
PG0423	Plásmido de 7.8 kb digerido con <i>EcoRI-Cla I</i>	Ampicilina
PG0435	Plásmido de 4.6 kb digerido con <i>Hind III</i>	Ampicilina
PSK41	Plásmido conjugativo transportado por el transposon Tn4001	Aminoglucósidos, Antisépticos y Desinfectantes
IS257 PSK1	Plásmido ≤ 2 kb Contiene el gen <i>gacA</i> y son transportados por el transposon TN552	Aminoglucosidos Meticilina y Betalactámicos

(Morton y col. 1995; Firth y col.2000)

2.3.- Mecanismos de resistencia de *Staphylococcus aureus* a la meticilina y a otros agentes antimicrobianos

➤ *Resistencia a la meticilina*

La meticilina y sus análogos se unen e inactivan las proteínas de unión PBPs que se encuentran en la pared bacteriana. Se han descrito de 4 a 6 mecanismos de resistencia a meticilina en cepas de *S. aureus*; uno de ellos es la disminución de los niveles de resistencia de la bacteria, que generalmente es el resultado de la hiperproducción de beta-lactamasas y por producción de meticilinasas, reguladas por plásmidos principalmente. El mecanismo de resistencia a la meticilina más estudiado es el originado por la presencia del gen *mecA* el cual se encuentra localizado en el cromosoma bacteriano, este gen codifica la proteína alterada, la PBP_{2A} con actividad transpeptidasa, que no permite la unión de la meticilina y de otros betalactámicos a la pared celular (Fluit y col. 2001).

En presencia de los antibióticos β-lactámicos, todas las PBP propias de *S. aureus* están inhibidas con excepción de la PBP_{2A}, la cual es la responsable de continuar con la síntesis de la pared celular bacteriana. Por lo tanto, los estafilococos portadores del gen *mecA*, en consecuencia, productores de la proteína PBP_{2A} deben considerarse resistentes a todos los antibióticos β-lactámicos sin excepción, incluyendo carbapenem y cefepime (Ruiz y Moreno, 2006).

El gen *mecA* de aproximadamente 2 kb, se encuentra integrando el ADN cromosómico bacteriano, asociado a un número variable de otros determinantes genéticos, entre los que pueden encontrarse secuencias de origen plasmídico, transposones, secuencias de inserción y por lo tanto, genes que contribuyen a expresar resistencia a los antibióticos no β -lactámicos. Esta zona genética que acompaña al gen *mecA*, en función de su composición presenta un tamaño variable entre 20 y 40 kb. (Koneman, 2001; Murray, 2002).

Además del gen *mecA*, existen otros genes que son transcriptores regulatorios, localizados inmediatamente cerca del promotor del gen *mecA*, estos genes se denominan *mecI* y *mecRI*, genes similares en organización molecular, estructura, función y mecanismo de regulación, a los elementos regulatorios para las enzimas beta-lactamasas en *S. aureus* (genes *blaI* y *blaRI*) (Chambers, 1997; Fluit y col. 2001).

Algunas cepas SARM, presentan un tipo de resistencia denominada heterogénea, este mecanismo se refiere a que los niveles de resistencia varían de acuerdo a las condiciones del cultivo y a los antibióticos β -lactámicos que se utilicen. La mayoría de estas cepas son susceptibles a concentraciones bajas de antibióticos β -lactámicos. Algunas de ellas pueden presentar clones mutantes altamente resistentes denominados población homogénea, que crecen en concentraciones de metilina mayores de 50-100 $\mu\text{g/ml}$ (Chambers, 1997).

➤ *Resistencia a desinfectantes y antisépticos*

Reynaldo y col. (2004) estudian la acción de biocidas tales como el digluconato de clorhexidina, la yodopovidona, y el glutaraldehído alcalinos, en cepas de *S. aureus* resistentes y sensibles a metilina empleando el ensayo Kelsey-Sykes el cual, que permite establecer las concentraciones bactericidas eficaces de los compuestos químicos. En este estudio se encontró que los biocidas evaluados fueron eficaces contra la mayoría de las cepas empleadas en este estudio. Por su parte Mota y Rivero (1999), señalan en su trabajo, sobre evaluación microbiológica de antisépticos y desinfectantes utilizados en el IAHULA, que el cloruro de benzalcomio redujo de manera efectiva cepas de *S. aureus* y otros microorganismos aislados en el área de Neonatología.

Sin embargo, se han descrito numerosas cepas SARM responsables de sepsis intrahospitalaria, que poseen plásmidos que median la resistencia de estas cepas a algunos desinfectantes. Se ha podido demostrar la relación entre el incremento de la resistencia de cepas SARM productoras de beta-lactamasas y a cuatro agentes químicos, como la clorhexidina, cloruro de benzalconium, hexamina y acriflavina (Mc Donnell y Russell, 1999). Diferentes ensayos moleculares de cepas SARM, exhiben la resistencia a otros agentes químicos como el amonio cuaternario y el bromuro de etidio; los primeros estudios que se realizaron al respecto, señalan que este tipo de resistencia está mediada por la presencia de genes denominados *gacA* y *gacC*, y son los mismos que codifican la resistencia a algunos agentes desinfectantes en cepas de *Staphylococcus coagulasa negativo* (Fluit y col. 2001; Lyon y Skurray, 1987).

➤ *Resistencia a los aminoglucósidos*

Los aminoglucósidos actúan interfiriendo la síntesis proteica. Su mecanismo de acción comprende 3 pasos: la unión a la membrana externa, el paso a través de la pared bacteriana externa y la unión a las proteínas de la subunidad 30S, donde interfiere con la síntesis de ARN mensajero (Lorenzo y col. 2005)

En los años más recientes, se ha demostrado que algunas cepas SARM presentan resistencia a la gentamicina, al igual que a otros aminoglucósidos como la tobramicina y la netilmicina. Algunas cepas SARM producen enzimas modificadoras de aminoglucósidos, y en el caso de la tobramicina, se ha reportado que las cepas que poseen el gen *aadD*, poseen altos niveles de resistencia a este antibiótico (Chambers, 1997). El mecanismo de resistencia, de los aminoglucósidos puede deberse a tres procesos: 1. Modificación estructural de las proteínas diana ribosómicas por mutación, de los genes que las codifican, este tipo de resistencia es cromosómica y afecta primordialmente a la estreptomina. 2. Alteración de la permeabilidad a los aminoglucósidos por mutaciones en el sistema de transporte ribosomal y 3. Modificación enzimática del antibiótico, este mecanismo es muy usual encontrarlo en cepas SARM y está codificado a nivel plasmídico o cromosómico, manifestándose con diferentes fenotipos y con valores de resistencia y CIM variables (Sopena, 2001).

Estudios realizados por Carrol y col. (1989) muestran dos grupos fenotípicos, ligados a la resistencia a la gentamicina, en cepas SARM aisladas en el Hospital St. James de Dublín, Irlanda, siendo el fenotipo II representado por metilicilina, gentamicina, kanamicina y estreptomina el más usual. Lemaitre y col. (1998), señalan que el 40% de las cepas SARM estudiadas presentaron resistencia a la gentamicina, además la mayoría de ellas poseían el fenotipo kanamicina, tobramicina, amikacina y neomicina, determinado por CIM en caldo.

En el servicio de Microbiología de la Universidad de Monash, Australia, cepas de *S. aureus* exhiben resistencia a los aminoglucósidos, representada por el patrón gentamicina, tobramicina y kanamicina. Esta resistencia la relacionan con la presencia del transposon *Tn4001*, que está compuesto por 2 copias invertidas de secuencias de inserción de 1.3kb, y que pertenece al grupo pSK1 de plásmidos multirresistente. Además de conferirle resistencia a los aminoglucósidos, estos plásmidos median la resistencia a desinfectantes como el amonio cuaternario y el bromuro de etidio (Byrne y col. 1990).

Ida y col. (2001) identifican por PCR, genes que codifican la resistencia a los aminoglucósidos en 381 aislados clínicos de SARM, la mayoría de estas cepas presentaban valores de CIM para gentamicina y tobramicina mayores a 8 µg/ml; en estas cepas, dichos autores lograron aislar los genes *aac(6')-aph(2')* en 61,7% de los aislados, y en 84,5% el gen *ant(4')*. Estos 2 genes juntos pueden conferirle resistencia a los aminoglucósidos.

➤ *Resistencia a los macrólidos*

Los macrólidos son un grupo de antibióticos alternativos en el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* y algunas cepas SARM. Estos antibióticos actúan en la subunidad 23S del ribosoma, inhibiendo la translocación de la cadena peptídica de la síntesis proteica (Sopena, 2001).

La resistencia a los macrólidos se produce generalmente por 3 mecanismos: 1.- Inhibiendo la penetración del antibiótico al interior de la bacteria, 2.- Modificación enzimática de la diana cromosómica y 3.- Modificación enzimática de los antibióticos siendo este último de escasa incidencia (Lorenzo y col. 2005). Fluit y col. (2001), encontraron diferentes genes, tales como, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ereA* y *ereB*, mediante PCR en 493 cepas de SARM resistentes a eritromicina, aisladas de pacientes provenientes de 24 hospitales universitarios europeos, consiguiendo que el gen *ermA* fué el más comúnmente encontrado en estas cepas (88%).

El gen *ermA* es frecuentemente transportado por el transposon *Tn554*, relacionado también con la resistencia a la tobramicina; el gen *ermB* es asociado al transposon *Tn551*, y el gen *ermC*, estudiado por primera vez en la década de los 70, está localizado en pequeños plásmidos multicopias de tamaño pequeño (2,4 a 5 kb) denominados PE194 y PE1764 (Lyon y Skurray, 1987; Goyal y col. 2004).

➤ *Resistencia a los glucopéptidos*

Los glucopéptidos son un grupo de antibióticos de espectro reducido. Los más utilizados en cepas de *S. aureus* resistentes a otros antimicrobianos son la vancomicina y la teicoplanina. Estos agentes inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana y por ello presentan una actividad excelente frente a organismos gram positivos, incluyendo cepas resistentes a las penicilinas y meticilina (Lorenzo y col. 2005).

La resistencia a la vancomicina está mediada por un grupo de genes denominados *van* y sus subtipos, *vanA*, *vanB* y *vanC*. Algunas cepas SARM poseen el gen *vanA*, a pesar de que los valores de la CIM se encuentran dentro de los niveles terapéuticos (Fluit y col. 2001). Por otra parte, se han observado cepas SARM con resistencia intermedia a la vancomicina en países tales como, Japón, Francia, y Estados Unidos, siendo la mayoría de ellas, aisladas de pacientes con enfermedades subyacentes y crónicas, que han sido tratados durante largos períodos de tiempo con glucopéptidos. En el Estado de Michigan en Estados Unidos, se han reportado recientemente dos casos de infección por SARM resistente a vancomicina, con CIM que oscilan entre 64 µg/mL y 1024 µg/mL, ambas cepas eran portadoras del gen *van A*, y estas cepas no se relacionaban epidemiológicamente entre sí (Ruiz y Moreno, 2006).

➤ *Resistencia a la mupirocina*

La mupirocina o ácido pseudomónico, actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana. Es un antibiótico tópico, especialmente útil en el control de la diseminación hospitalaria de SARM. En años recientes, la resistencia de alto nivel a la mupirocina se ha ido incrementando por el uso indiscriminado y excesivo del antibiótico (Lorenzo, 2005).

Pérez-Roth (2005), realizaron una investigación en el Hospital Nuestra Señora de la Candelaria, en Tenerife, en una diversidad clonal de cepas SARM, a las cuales se les determinó por medio de PCR, el gen *iles-2*. Este gen le confería resistencia a estas cepas a la mupirocina y también le confirió la capacidad de transferir horizontalmente dicha resistencia. Además identificaron 9 plásmidos de la familia *pMUP*, mostrando cada uno de ellos diferentes frecuencias de transferencia conjugativa. En la Tabla 2 se pueden observar diferentes antimicrobianos y el mecanismo de resistencia en cepas de *S. aureus*

Tabla 2. Mecanismo de resistencia de *S. aureus* a diferentes antibióticos

Antibiótico	Blanco celular	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia
Aminoglucósido	Síntesis de proteínas	Unión a la subunidad 30S del ribosoma	Inactivación del antibiótico (Enz modificadora de aminoglucósidos)
Rifampicina	Síntesis de ADN	Inhibición de la molécula de ADN dependiente de la ARN polimerasa	Mutación de los genes que se encuentran en la ARN polimerasa
*TMP-SMZ	Metabolismo celular	Inhibición competitiva de las enzimas relacionadas con la síntesis del ácido fólico	Formación de uniones ineficaces y mutación de los genes gyrasa
Clindamicina	Síntesis de proteínas	Unión a la unidad 50S del ribosoma	Alteración en la mutilación ribosomal
Vancomicina y teicoplanina	Vías celulares	Interferencia en las vías para la síntesis celular e inhibición de la polimerización del peptidoglicano	Hiperproducción de precursores de la pared celular de la célula bacteriana

*TMP-SMZ: Trimetoprin-Sulfametoxazol

(Salaria y Shing, 2001)

2.4.-Métodos de detección de SARM

➤ *Métodos de cribado:*

A partir de la década de los 80, se empiezan a utilizar diversos medios suplementados con meticilina/oxacilina (métodos de cribado), para comprobar el crecimiento de cepas SARM, conjuntamente con metodología clásica para la identificación de *S. aureus*, como tinción de gram, prueba de coagulasa y detección de la proteína A (Swenson y col. 2001)

Estudios recientes, señalan la presencia de cepas SARM heterorresistentes, que presentan MIC de oxacilina inferiores a los 4 µg/mL de oxacilina. Debido a la dificultad de aislamiento de este tipo de microorganismo, se crearon los métodos de *Screening* o de Cribado (Rohrer y col. 2003). En el año de 1985, Lally y col. describen un método para la recuperación de especies SARM, utilizando manitol salado suplementado con 4 µg/mL de oxacilina. Al comparar con pruebas de concentración inhibitoria mínima, se demostró que usando este medio de fácil preparación, se logra aumentar la confiabilidad y reducir la presencia de falsos positivos y negativos.

Van Enk y Thompson en 1992, utilizan un medio de aislamiento primario para cepas SARM, denominado *Oxacillin Resistance Screen Agar* (ORSA), y lo comparan con métodos convencionales e inmunológicos como la aglutinación con partículas de látex utilizados para la identificación de este tipo de microorganismo. Estos autores recomiendan el uso de ORSA para detectar cepas SARM en un lapso de tiempo menor,

acompañado de otras pruebas convencionales de identificación, ya que un porcentaje menor de especies de *Staphylococcus coagulasa* negativo pueden crecer en este medio.

MacKenzie y col. (1995), señalan en su investigación que se pueden aislar cepas SARM, sustituyendo el agar Müller Hinton, suplementándolo con 6 µg/mL de meticilina y 4% de cloruro de sodio, por un agar básico como tripticasa soya obteniendo como resultado la observación de colonias sugestivas de cepas heterorresistentes de SARM. Towner y col.(1998), por su parte, describen un método para SARM utilizando agar nutriente suplementado con 7% de cloruro de sodio y 4 µg de meticilina bajo incubación durante toda la noche a 37 °C, obteniendo un crecimiento abundante de cepas de *S. aureus* sugestivas de ser resistentes a meticilina. Una de las desventajas de utilizar este medio, es que se tienen que realizar pruebas confirmatorias, tales como discos de oxacilina (1 µg/mL) en medio Müller Hinton.

Mir y col. (1998) describen un método para determinar la susceptibilidad a la meticilina, usando manitol salado con 4% de cloruro de sodio y 6 µg/mL de oxacilina, con un incubado de 48 horas a una temperatura de 35 °C. La aparición de colonias señala la presencia de cepas SARM. Este método posee como ventaja, el aislamiento de este tipo de microorganismo en un período de tiempo menor al de las otras técnicas anteriormente señaladas. Por su parte, Jayaratne y Rutherford (1999), comparan el crecimiento de cepas SARM en un medio denominado MSO-6 que contiene manitol salado suplementado con oxacilina y cloruro de sodio con los resultados obtenidos mediante PCR para el gen *mecA* de cepas SARM, y obtienen como resultado relevante

que el 95% de las muestras crecidas en el medio MSO-6 resultaron positivas por PCR para el gen *mecA*.

Apfalter y col. en el 2002, diseñaron un método cromogénico (ORSAB) para determinar la resistencia a oxacilina de cepas de *S. aureus*, e identifican en forma presuntiva las cepas SARM. Comparando el rendimiento de este medio en relación con medios caseros de manitol salado suplementado con oxacilina, y PCR, los autores encontraron que 236 (86%) cepas de las 284 muestreadas inicialmente, resultaron positivas por el ORSAB, medios convencionales y PCR para el gen *mecA*; se demostró además, que este medio tiene altos índices de especificidad por lo que se recomienda para ser utilizado en la detección de rutina de SARM.

Smyth y Kahlmeter (2005) , utilizan un medio de cribado para la detección de SARM, compuesto por manitol salado, sangre de cordero y 4% de cefoxitin, encontrando que el 96,6% de las cepas desarrolladas en este medio, resultaron portadoras del gen *mecA*, concluyendo que este tipo de medio selectivo con cefoxitin presenta mejor rendimiento al compararlo con los medios que han sido suplementados con oxacilina (Esquema 3).

➤ *Método de difusión en disco Kirby-Bauer*

Para conocer la resistencia a la oxacilina en cepas de *S. aureus*, se utiliza un disco de oxacilina de 1 µg/mL en agar Müeller Hinton con 2% con NaCl (CLSI, 2005). A partir del año 2005, el CLSI recomienda el uso del disco de cefoxitin de 30 µg en agar Müeller Hinton para detectar la resistencia a la meticilina, ya que este disco es indicador indirecto de la presencia del gen *mecA* en cepas de *S. aureus*. Torres y col. (2005), realizaron un trabajo comparativo para hallar la resistencia a la meticilina en cepas de *S. aureus* en la Policlínica Metropolitana de Caracas, encontrando que el 88% de los aislados de *S. aureus* mostraron resistencia a la oxacilina, utilizando el método de difusión en agar con 1 µg de oxacilina (homogénea 57% y heterogénea 31%), la CIM, el crecimiento en agar manitol salado suplementado con 6 µg/ml de oxacilina mostraron 88% de resultados positivos cada uno y el disco de cefoxitin detectó 86% de cepas resistentes a oxacilina.

De igual manera, Salimnia y Brown (2005), comparan el rendimiento del método de difusión en agar con el disco de cefoxitin y con el disco de 1 µg de oxacilina y métodos automatizados para determinar la CIM, encontrando que los métodos de CIM tenían una confiabilidad del 99,7 %, al igual que el método de difusión con cefoxitin para la detección de *S. aureus* con resistencia a la meticilina, resultados ligeramente superiores al método de difusión con el disco de 1 µg de oxacilina que arrojó un 93,3% de confiabilidad.

➤ *Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)*

a.- Prueba de dilución en agar: Los ensayos para determinar la susceptibilidad son basados solo en la presencia o ausencia de un halo de inhibición pero no son suficientes para la detección adecuada de cepas SARM. Para obtener resultados confiables es recomendable determinar la CIM mediante ensayos de dilución en agar (CLSI, 2005). La prueba se fundamenta en la siembra de una suspensión estandarizada de bacterias ajustada al patrón 0,5 de McFarland, sobre la superficie de una serie de placas de agar, cada una de las cuales contiene una concentración diferente del antibiótico, que abarca los límites terapéuticos de la droga. Generalmente se utilizan diluciones que van desde 0,5 hasta 32 µg/ml, como en el caso de oxacilina (Koneman y col. 2001).

Para mejorar el rendimiento, el CLSI en el 2005 recomienda una incubación de 48 horas de este tipo de cepas, señalando que este método tiene hasta 100% de especificidad y 95% de sensibilidad tanto para cepas de *S. aureus* como para *Staphylococcus coagulasa negativo* (Chambers, 2001). Kohner y col. (1999), utilizaron aislados de SARM y de *Staphylococcus coagulasa negativo* como controles, para evaluar las pruebas de dilución en agar, difusión en disco y detección de gen *mecA* por PCR, logrando un 97,6% de especificidad en los ensayos por dilución, siempre y cuando se suplemente el agar Müller Hinton y el caldo con 2% de NaCl, y se utilice una temperatura que oscile entre los 30 °C a 35 °C por un período de incubación mayor a las 48 horas.

➤ *Método Inmunológico: Detección de la proteína modificada PBP_{2A}.*

Cepas SARM se caracterizan por la producción de una proteína de baja afinidad a la penicilina denominada PBP_{2A}, esta proteína enlazante modificada es codificada por el gen *mecA*, que además le confiere a estas cepas la resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos. Esta proteína posee una membrana que puede ser removida sin afectar la unión de tipo cinética con el anillo β lactámico (Maltezou y Gramarellou, 2006).

La proteína PBP_{2A} se puede detectar mediante la utilización de una técnica de aglutinación con partículas de látex. Esta técnica se utiliza generalmente, como prueba de rutina en muchos laboratorios, pero se sugiere que se corroboren los resultados mediante PCR para la detección del gen *mecA* (Griethuysen y col. 1999; Van Leeuwen y col. 1999).

➤ *Detección por PCR del gen mecA:*

Esta técnica se ha definido como la amplificación directa de un gen o fragmento de ADN o indirecta de un ARN, presentes en mezclas de muy diferentes fuentes, sin necesidad de una purificación previa de la muestra original (Luque y Herráez, 2001).

El principio del método se basa en la aplicación de ciclos, y cada ciclo consta de tres etapas: 1) Desnaturalización del ADN, 2) Hibridación específica de la hebra sencilla con un oligonucleótido, también se denomina etapa del templado, y 3) Etapa de elongación, que es la replicación de la hebra sencilla por una ADN polimerasa a partir

de un oligonucleótido anterior que actúa como cebador. Es la etapa de amplificación propiamente dicha (72 °C-75 °C) de 1 a 3 minutos, en la que la ADN polimerasa termoestable elonga los cebadores empleados como moldes de ambas hebras originales. La replicación ocurre en dirección 5' a 3' empleando 4dNTPS (Herveg y Barcia, 2004).

La rápida identificación de cepas SARM en la actualidad se basa en la PCR, ya que este tipo de técnica permite la toma de decisiones rápidas, y a su vez, un efectivo y adecuado tratamiento (Jonas y col. 2002). Muchos autores han reseñado en sus trabajos el uso de técnicas basadas en variantes de la PCR, en primer lugar, en la década de los 90 se empezó a usar la PCR simple para el diagnóstico de cepas SARM, específicamente la identificación del gen *mecA* (Fluit y col. 2001).

Kohner y col. en 1999 evaluaron la susceptibilidad a la oxacilina mediante tres métodos previos a la utilización de la PCR, como el método de difusión en disco utilizando taxos de oxacilina de 1 µg y agar Mueller Hinton suplementado con 6 µg de oxacilina y 4% de NaCl, demostrando que el 100% de las cepas desarrolladas en este medio eran portadores del gen *mecA*. Por su parte Ulloa y col. (2002) realizaron pruebas comparativas entre la PCR en cepas SARM y la sensibilidad a la oxacilina, en agar Müeller Hinton suplementado con cloruro de sodio, y encontraron una correlación del 100%, en el momento de identificar el gen *mecA* en las muestras resistentes a oxacilina tanto en el método de cribado como en el método de aglutinación.

Otra variante utilizada para la detección de cepas SARM es la PCR doble o dúplex, que se basa en la detección de dos tipos de genes relacionados con la resistencia a meticilina/oxacilina, en el común de los casos se encuentran el gen *mecA* y los genes *fem* y sus subtipos. Towner y col. en el año 1998, desarrollaron y evaluaron un PCR para la rápida detección de cepas SARM utilizando 2 primers, uno dirigido hacia el gen *mecA* y otro hacia el gen *femB*. De 146 cepas examinadas, 30 que constituyen el 20,54%, resultaron resistentes a la meticilina por métodos convencionales y a su vez portadoras de los genes anteriormente mencionados.

A partir de mediados de los 90 se diseñó la PCR triple, lo cual es una variante de la PCR original o simple pero que utiliza tres primers específicos para cada gen, entre los cuales están el *mecA*, el *fem B* y la fracción 16SrRNA (Vannufel y col. 1995) Maes y col. (2002), realizan un PCR a partir de hemocultivos positivos de 40 pacientes con sepsis, las cuales fueron producidas por cepas SARM previamente identificadas a partir del método automatizado ID32 Staph System y un método de cribado. Los autores determinaron que las muestras presentaban 2 genes diferentes relacionados con la resistencia a meticilina como el *mecA*, *fem B*, además, se detectó el gen de la nucleasa termoestable o nuc. Las muestras fueron comparadas con especies ATCC de SARM y ATCC de *Staphylococcus coagulasa* negativo como cepas controles.

Por ser la PCR el método estándar de oro “*Gold Standard*” para la identificación de SARM, algunos investigadores actualmente buscan la presencia de otros genes y fracciones cromosomales, que indiquen, además de la resistencia a la meticilina en *S. aureus*, la presencia de genes que confieran resistencia a otros grupos de

antimicrobianos. En tal sentido, Pérez-Roth y col. (2001) en cepas SARM, buscan la presencia de los genes *mecA* y *fem B*, y los comparan con otros 2 genes que codifican resistencia a otros antibióticos como lo son los genes *mupA* y *mupB*, y el gen *ile-S* que le confiere a estas bacterias altos niveles de resistencia a mupirocina; encontrando que la mayoría de las cepas estudiadas poseían 3 o 4 genes, confiriéndoles resistencia a estas dos clases de antimicrobianos.

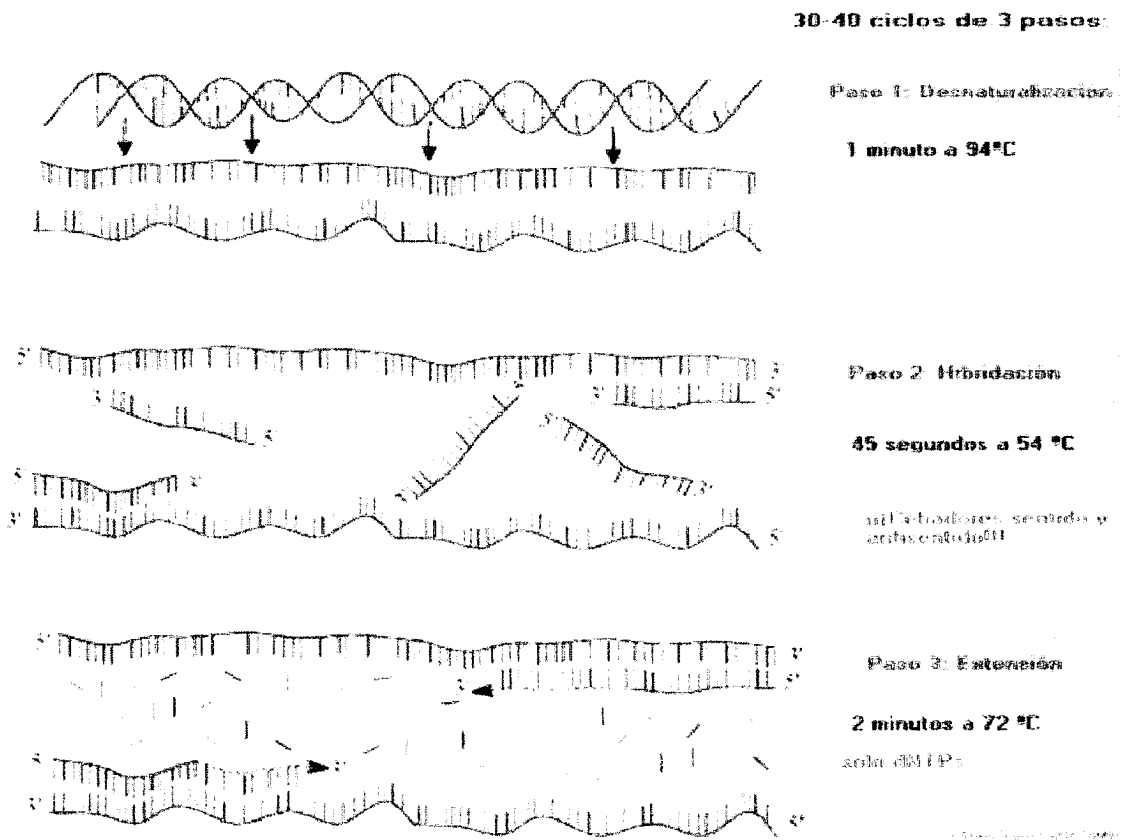


Figura 1 : Ciclos de (Herveg y Barcia, 2004).

2.5.- Alternativas terapéuticas utilizadas para SARM

El tratamiento de portadores o personas colonizadas por SARM consiste en la aplicación por vía tópica de mupirocina, complementando con el adecuado lavado con antisépticos. Este antimicrobiano suele administrarse durante varios días. En los casos de portadores de cepas SARM resistentes a mupirocina, existe la alternativa de bacitracina, utilizado también por vía tópica (Zelaya y col. 2001).

Debido a la resistencia que presentan las cepas SARM a la mayoría de los antibióticos usados en el tratamiento de las infecciones, como los β -lactámicos, macrólidos y aminoglucósidos, la vancomicina continúa siendo la droga de elección para el tratamiento de SARM multirresistente. Otro antibiótico utilizado en la actualidad es la teicoplanina, glucopéptido muy semejante a la vancomicina, que tiene un mecanismo de acción y un espectro de acción amplio. A diferencia de la vancomicina, este antibiótico se puede administrar por vía intramuscular, distribuyéndose ampliamente en los tejidos, utilizado generalmente en infecciones de piel y tejidos blandos ocasionados por cepas SARM (Ruiz y Moreno, 2006).

Algunas fluoroquinolonas (trovafloxacino), estreptograminas (quinupristin-dalfopristina), y derivados carbapenémicos, son agentes antibacterianos con potente actividad frente a SARM (Camarena y Sánchez, 1998). Por otra parte, a partir del año 2003, se han prescrito nuevos antibióticos para el adecuado tratamiento de especies SARM, como las oxazolidonas con su representante, el linezolid, antimicrobiano activo frente a *S. aureus*

(tanto cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles a metilina como cepas SARM) con una CIM90 que varía 1-4 mg/l. La CIM no se afecta por la resistencia a metilina, ciprofloxacino o glucopéptidos, aunque se han encontrado cepas con sensibilidad intermedia a estos antimicrobianos (Ruiz y Moreno, 2006).

3.- OBJETIVOS:

3.1.- Objetivos Generales:

1. **Determinar la presencia de SARM en el personal de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes, mediante un barrido microbiológico realizado en Julio del 2003 (IAHULA).**
2. **Determinar el porcentaje de portadores de cepas SARM en fosas nasales y manos del personal que labora en la UARN del IAHULA.**

3.2.- Objetivos Especificos:

1. **Evaluar la sensibilidad y especificidad del Medio Manitol Salado con oxacilina en relación con el método de difusión en agar con disco de 1µg/mL de oxacilina para la detección de cepas SARM.**
2. **Evaluar la sensibilidad y especificidad del Medio Manitol Salado con oxacilina en relación con la utilización del disco de cefoxitin de 30µg/mL, para la detección de cepas SARM.**
3. **Determinar la presencia de la proteína de unión PBP_{2A} en cepas SARM, mediante un método de aglutinación con partículas de látex y comparar la sensibilidad y especificidad con el Medio Manitol Salado con oxacilina**

4. Determinar los perfiles de resistencia de cepas SARM por el método de difusión en disco Kirby-Baüer.
5. Determinar la Concentración inhibitoria mínima (CIM) por dilución en agar de diferentes agentes antimicrobianos (CIM₉₀ y CIM₅₀) ante cepas SARM.,
6. Determinar formas plasmídicas en cepas de *S. aureus* Resistentes a gentamicina (SARG), aisladas del personal de salud que labora en la UARN del IAHULA.

4.- HIPOTESIS

Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina (SARM) es un importante patógeno nosocomial, implicado en las infecciones intrahospitalarias y el personal de salud que labora en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) continua siendo el principal reservorio de dicho microorganismo.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Población y Muestra:

Se estudiaron muestras provenientes de manos y fosas nasales del personal que labora en la UARN del IAHULA conformado por: 2 médicos especialistas, 4 médicos residentes de 3° año, 2 médicos residentes de 2° año, 1 médico residente de 1° año, 20 enfermeras, 4 estudiantes de medicina, 1 técnico en esterilización y 4 camareras. Dicha actividad se realizó en Julio del 2003, cuando el jefe de la unidad informó sobre un aumento en la frecuencia de infecciones por SARM en los neonatos recluidos en la misma. Todos los datos del personal muestreado fueron recolectado en planillas del PIN (Proyecto de Infecciones Nosocomiales) (Anexo 1).

5.2.- Ambiente

La toma de muestra de los portadores se realizó en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del IAHULA, en los turnos mañana, tarde y noche.

El estudio Microbiológico se realizó en el Laboratorio de Bacteriología Anaeróbica “Dr. Roberto Gabaldón”, adscrito al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes.

La extracción de ADN plásmidico se llevó a cabo en el laboratorio de Genética y Química Celular “GeQuimCel” adscrito al Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes.

5.3.- Estudio Microbiológico

- *Detección de portadores de Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina en el personal que labora en la UARN del IAHULA.*

Para la detección de portadores de SARM en el personal de salud, se procedió a la toma de muestra de fosas nasales y manos de acuerdo al procedimiento descrito en Iseberg (1992). Utilizando un hisopo estéril humedecido con solución fisiológica estéril, se procedió a tomar muestra de cada una de las fosas nasales por separado, y se inoculó en agar manitol salado (Hi-Media) y en agar manitol salado suplementado con 6 µg/mL de oxacilina y 4% de NaCl (Jayaretné y Rutherford 1999). Posteriormente se incubaron las placas a 35°C durante 72 horas. La muestra de las manos se tomó de los dedos pulgar, índice y medio por el método de impronta en placas RODAC conteniendo agar manitol salado (Hi-Media) y agar manitol salado con 6µg/mL de oxacilina. Todas las placas se incubaron a 35°C durante 72 horas (Marshall, 1992), este procedimiento se ilustra en el Esquema 1.

La identificación a nivel de género y especie de las cepas aisladas se realizó de acuerdo a lo descrito en Koneman, (1999).

➤ *Pruebas para determinar la susceptibilidad antimicrobiana:*

a.-Método de difusión en disco: A cada cepa de SARM, se le determinó la susceptibilidad a los siguientes antimicrobianos: gentamicina 10 µg, eritromicina 15 µg, cloranfenicol 30 µg, tobramicina 10 µg, kanamicina 30 µg, amikacina 30 µg, vancomicina 30 µg, estreptomina 10µg, trimetropin sulfametoxazol 23,75 µg y 1,25 µg, clindamicina 2 µg y rifampicina 5µg, mediante el método de difusión en disco Kirby-Bauer. Los antibióticos utilizados provenían de la casa comercial Difco. La susceptibilidad a la oxacilina se corroboró utilizando el disco de oxacilina de 1 µg (Difco) y Agar Müeller-Hinton (Hi-Media) con 2% de NaCl. Las placas se incubaron a 35 °C entre 18-24 horas para oxacilina y 37 °C para el resto de antimicrobianos (NCCLS, 2003) (Esquema 2)

b.- Método de dilución en agar: La concentración inhibitoria mínima (CIM) de oxacilina, eritromicina, gentamicina, tobramicina, amikacina y kanamicina, ante las cepas de SARM, se determinó según el procedimiento descrito por CLSI (2005). Las drogas utilizadas para el presente estudio fueron suministradas por Laboratorios Valmorca, Becton Dickinson y Schering Ploug. El porcentaje de pureza de los antimicrobianos fue el siguiente: oxacilina 85%, eritromicina 61,8%, gentamicina 100%, kanamicina 100% , tobramicina 100% y amikacina 90%. Se empleó agar Müeller Hinton (Hi-Media) suplementado con 2% de NaCl para la CIM de oxacilina y

agar Müller Hinton (Hi-Media) sin suplemento para la CIM de aminoglucósidos y eritromicina. Las placas se incubaron para CIM de oxacilina a 35 °C entre 24 a 48 horas, y para el resto de antimicrobianos a 37 °C entre 18 a 24 horas (Esquema 3 y 4).

c.- Detección de cepas SARM utilizando el disco de Cefoxitin: A cada cepa SARM se le corroboró la resistencia a la meticilina empleando el disco de cefoxitin de 30 µg/mL, del Laboratorio Becton Dickinson, según el procedimiento descrito en CLSI, 2005. Se empleó agar Müller Hinton (Hi-Media) (Esquema 5).

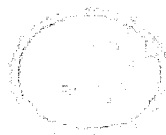
d.- Detección de la proteína de unión PBP_{2A}: A todas las cepas SARM se les determinó la presencia de la PBP_{2A}, mediante un kit comercial denominado MRSA-Screen, de acuerdo a las especificaciones señaladas por la casa comercial Denka Seiken Co., Ltd.

Muestra del paciente
(Secr. nasal, mano, etc.)

Siembra directa

Agar manitol salado con 4% de NaCl y 6 µg/mL de oxacilina
Incubación en estufa 35°C por 72 horas

Crecimiento: Presencia de cepas heterorresistentes



Siembra en medios: Tripticasa soya, BHI, manitol salado

Pruebas de identificación

Catalasa

Coagulasa

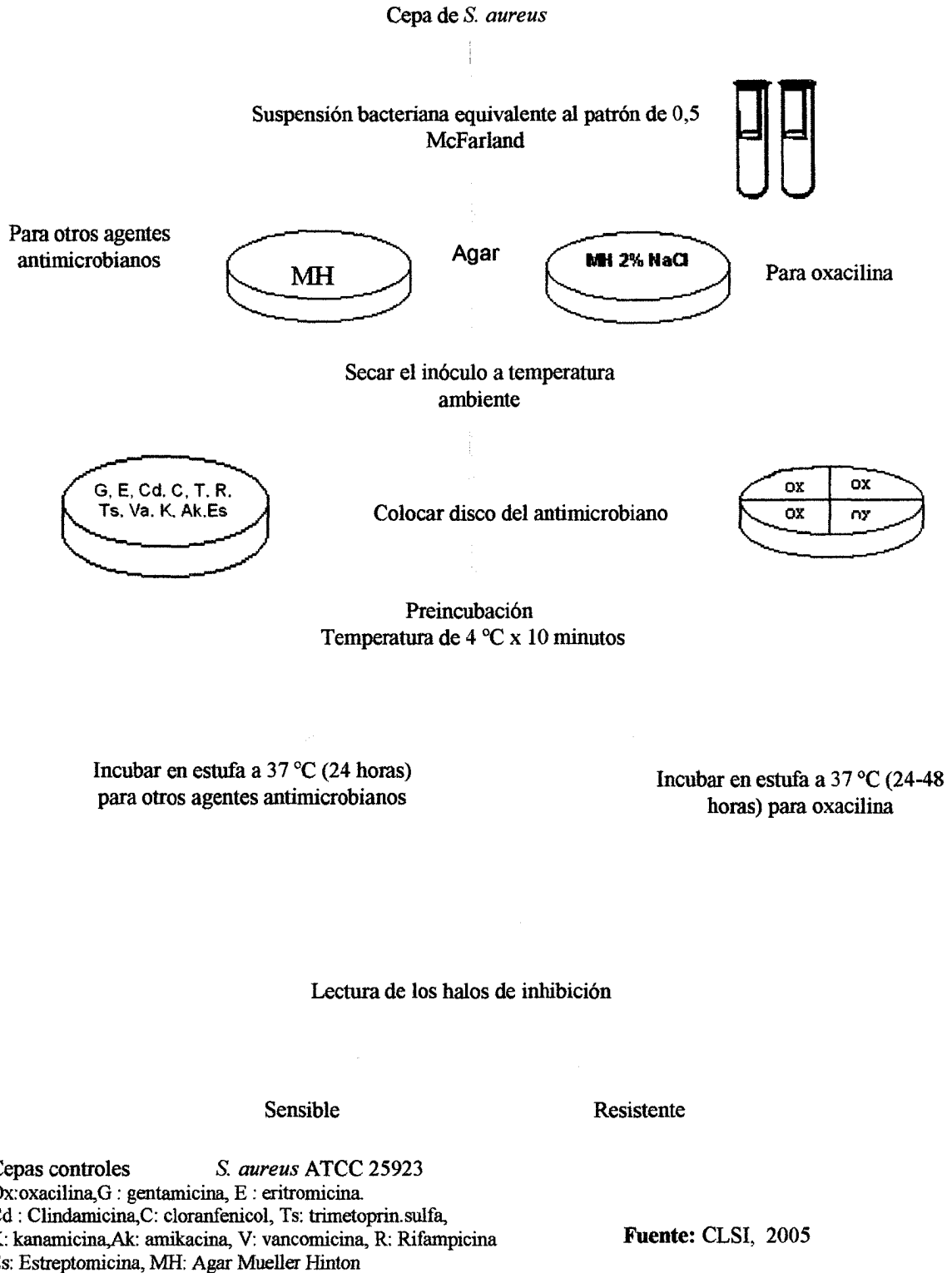
Coloración de Gram

Proteína A

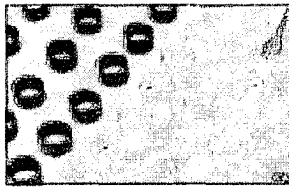
Pruebas de sensibilidad

Fuente: Mir y col. 1998

Esquema 1. Método de cribado para determinar resistencia de cepas de SARM

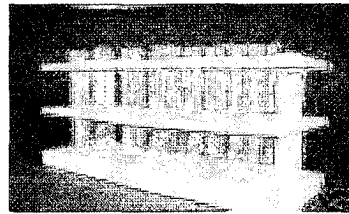
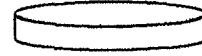


Esquema 2. Susceptibilidad a la oxacilina y a otros agentes antimicrobianos por el Método Kirby Bauer



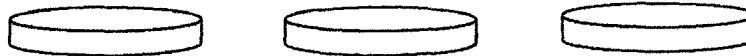
Diluciones de oxacilina 0,5-1028 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Agar Mueller Hinton con 2% de NaCl



Cepas SARM y control
Suspensión 0,5 MacFarland
Dilución 1:10

Inocular 10 μL de la suspensión en
Placas de Agar Mueller Hinton + Diluciones de oxacilina

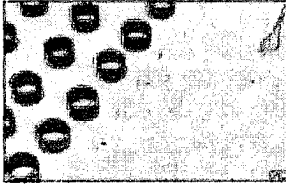


Incubar a 35 °C por 24-48 horas

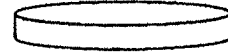
Cepa control: *S. aureus* ATCC 25923

Fuente: CLSI, 2005

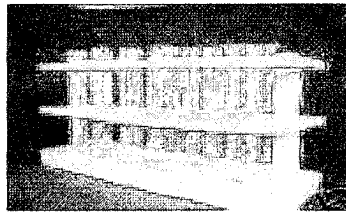
Esquema 3: Concentración inhibitoria mínima (CIM) a la oxacilina ante cepas SARM



Agar Müeller Hinton



- 1 – 1024(µg/mL) gentamicina
- 0.25 – 1024 (µg/mL) eritromicina
- 0.25- 150 (µg/mL) kanamicina
- 4- 256 (µg/mL) amikacina
- 0.5 – 64 (µg/mL) tobramicina



Cepas SARM,SASM y controles
Suspensión 0,5 MacFarland
Dilución 1:10

Inocular 10µL de la suspensión en
Placas de Agar Mueller Hinton + Diluciones del antimicrobiano



Incubar a 37 °C por 18 - 24 horas

Cepa control: *S. aureus* ATCC 25923

Fuente: CLSI, 2005

Esquema 4: Concentración inhibitoria mínima (CIM) de diferentes agentes antimicrobianos ante cepas de *S. aureus* resistentes y sensibles a oxacilina

Cepas SARM



Suspensión al 0,5 MacFarland



Agar Müeller- Hinton



Incubación a 35 °C 18-24 horas

Lectura e interpretación de los halos de inhibición

Cefoxitin:
S: ≥ 20 mm
R: ≤ 19 mm

Cepa control: *S. aureus* ATCC25923

Fuente: CLSI, 2005

Esquema 5: Determinación de la susceptibilidad al disco de cefoxitin de 30 $\mu\text{g/mL}$ en cepas SARM

5.4.-Estudio Plasmídico

El análisis plasmídico se llevó a cabo en cepas SARM y cepas SASM resistentes a gentamicina, seleccionadas de acuerdo a los valores de la concentración inhibitoria mínima. Se realizó el método de lisis alcalina (Esquema 5) de acuerdo a lo descrito por Birboim y Doli (1979) citado en Samburook y Maniatic (1992). Para llevar a cabo la metodología se utilizaron las siguientes soluciones:

Solución I:

Buffer TEG: 25 mM Tris, 10 mM de EDTA, 50 mM de glucosa, pH 8.0 (Las soluciones concentradas pueden tener las siguientes concentraciones : Tris 1M pH 8.0, EDTA 0,25M pH 8.0. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos).

Solución II:

200 mM de NaOH

1% de Duodecil Sulfato de Sodio (SDS).

Solución III:

Preparar una solución de AcOH/AcOK pH 5.2 como se describen a continuación:

Preparar una solución madre de acetato de potasio 5M (294.4 g en agua destilada, llevar a un volumen final de 600 mL). Mezclar 300 mL de Acetato de Potasio 5M, 60 mL de Acido acético glacial y 140 mL de agua destilada. El pH de la solución final debe ser de 5.2 a 5.6. Autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

Caldo LB: Crecimiento de cepas

Transferir 1.5 mL a tubo de microcentrífuga

Centrifugar por 2 minutos
Remover por aspiración

Resuspender en sol I fría:
Añadir RNAasa
Añadir lisostafina o lisosima

Incubar a 37 °C por 1 hora

Añadir soluc. II preparada al momento (fresca)

Colocar en hielo 10 minutos

Centrifugar por 20 minutos

Transferir 700 µl de sobrenadante

Añadir un volumen de alcohol-isoamílico fenol-cloroformo

Repetir el paso anterior

Añadir 0.8 volúmenes de isopropanol y precipitar el ADN plasmídico por 30 min a -20 °C

Centrifugar por 10 minutos

Adicionar de 20 a 50 µl de buffer TAE

Carga del gel de agarosa al 0,8%

Electroforesis 80V por 1 hora

Esquema 6: Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina

Fuente: Samburook y Maniatic, 1992

5.5.- Diseño de Análisis

En este trabajo de investigación, descriptivo de tipo transversal, para el procesamiento de los datos contenidos en las planillas del PIN y las respectivas muestras, se diseñó una base de datos en el conocido programa informativo Excel. A la información que generó la base de datos se le aplicó un análisis descriptivo por medio de tablas y gráficos, empleando el programa del paquete estadístico SPSS versión 10.0 en español.

Los cálculos para especificidad y sensibilidad se realizaron según lo descrito por Soloaga y col. (2004), de la siguiente manera:

- **Cálculo de la Sensibilidad:** Se realizó dividiendo el número de cepas resistentes detectadas por cada método, por el total de cepas que evidenciaron la presencia de cepas heterorresistentes evidenciadas por el método de cribado.
- **Cálculo de la Especificidad:** Se dividió el número de cepas sensibles detectadas por cada método, por el total de las cepas que no demostraron la presencia de cepas heterorresistentes evidenciadas por el método de cribado.

6.- RESULTADOS

De 38 personas que laboran en la UARN del I.A.H.U.L.A, en los turnos mañana, tarde y noche, el 39,47% (15/38) fue portador de cepas SARM, utilizando el método de cribado con manitol salado suplementado con 6 µg/mL de oxacilina. El 31,58% (12/38) del personal fue portador nasal de SARM y se observó la mayor frecuencia en el personal de enfermería con un 58,33% (7/12), seguido de camareras con un 25% (3/12). El 7,9% del personal muestreado presentó cepas SARM en manos, encontrándose sólo en 15% (3/20) del personal de enfermería.

En la tabla 3 se aprecia que el mayor porcentaje de portadores de SARM (en fosas nasales y manos) se encontró en las enfermeras, representado por un 60%, seguido de las camareras y médicos con 20%, cada uno de ellos. Al realizar el método de Kirby Bauer (Tabla 4), se determinó que las cepas de SARM evaluadas, mostraron resistencia ante la eritromicina y kanamicina (52,9%), seguido de la gentamicina con un 47%.

Por otra parte, de acuerdo a la susceptibilidad antimicrobiana, por la técnica de Kirby Bauer, se logró establecer 8 perfiles de resistencia (Tabla 5), observándose que el mayor número de cepas SARM se ubicaron en el perfil II (gentamicina^R eritromicina^R kanamicina^R) y perfil III (gentamicina^R eritromicina^R kanamicina^R tobramicina^R).

El 100% de las cepas SARM mostró altos niveles de resistencia a la oxacilina (CIM₉₀=128µg/mL) (Tabla 6). El 46,6% de estas cepas, mostraron además, elevados niveles de resistencia a los macrólidos (CIM₉₀=64µg/mL de eritromicina). Así mismo, estas

cepas presentaron resistencia a los aminoglucósidos, el 66,6% (CIM₉₀=256µg/mL) y 33,3% (CIM₉₀=128µg/mL) de las cepas estudiadas mostraron resistencia a la gentamicina y amikacina, respectivamente; ubicándose en este grupo cepas SARM, tanto de portadores nasales como de manos.

Tabla 3: Portadores totales de SARM en fosas nasales y manos según la ocupación.

Ocupación	Nº	Portadores de SARM	%
Enfermeras	20	9	60
Médicos	9	3	20
Camareras	4	3	20
Estudiantes de Medicina	4	-	-
Técnico en Esterilización	1	-	-
Total	38	15	100

Tabla 4: Porcentaje de resistencia de 15 cepas SARM ante 11 agentes antimicrobianos por el método de difusión en disco (Kirby Bauer)

Antibiótico	Nº de cepas	%
Eritromicina	9	52,9
Kanamicina	9	52,9
Gentamicina	8	47
Tobramicina	5	29,4
Cloranfenicol	2	11,7
Rifampicina	2	11,7
Trimetoprin-Sulfimetoxazol	2	11,7
Estreptomicina	1	5,8
Vancomicina	0	0
Clindamicina	0	0

Tabla 5: Perfiles de resistencia de cepas SARM aisladas en fosas nasales y manos del personal que labora en la UARN del IAHULA- Julio 2003 (Kirby-Bauer).

Perfiles de resistencia	Nº de cepas	%
I oxacilina ^R eritromicina ^R	1	6,66
II oxacilina ^R gentamicina ^R eritromicina ^R kanamicina ^R	3	20
III oxacilina ^R gentamicina ^R eritromicina ^R kanamicina ^R Tobramicina ^R	3	20
IV oxacilina ^R gentamicina ^R eritromicina ^R kanamicina ^R cloranfenicol ^R tobramicina ^R rifampicina ^R trimetropin-sulfa ^R	1	6,66
V oxacilina ^R gentamicina ^R kanamicina ^R tobramicina ^R rifampicina ^R trimetropin-sulfa ^R	1	6,66
VI oxacilina ^R eritromicina ^R kanamicina ^R	1	6,66
VII oxacilina ^R kanamicina ^R	1	6,66
VIII oxacilina ^R	4	26,66
Total de cepas evaluadas	15	100

Tabla 6: Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de varios agentes antimicrobianos ante cepas SARM

Antibiótico	CIM50 (ug/mL)	CIM90 (ug/mL)	% de Resistencia
Oxacilina	-	128	100
Gentamicina	16	256	66,6
Tobramicina	32	64	60
Kanamicina	12	≥400	53,3
Eritromicina	1	64	46,6
Amikacina	16	128	33,3

Oxacilina : R≥4ug/ml, S≤2ug/ml
 Eritromicina: R≥8ug/ml, S≤0,5 ug/ml
 Gentamicina: R≥8ug/ml, S≤2 ug/ml
 Tobramicina: R≥8 ug/ml, S≤4 ug/ml
 Kanamicina: R≥25 ug/ml, S≤6 ug/ml
 Amikacina: R≥32 ug/ml, S≤16 ug/ml

Se realizaron cálculos de sensibilidad y especificidad para evaluar el rendimiento de los métodos utilizados en este estudio para la detección de cepas SARM, observándose que al comparar la técnica de Kirby Bauer con 1 µg/mL de oxacilina con el método de cribado se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100%. De igual manera al realizar la comparación de la técnica Kirby Bauer con el disco de cefoxitin y la detección de la PBP_{2A}, con el método de cribado se obtuvieron iguales valores de sensibilidad (93,3%) de especificidad (100%) (Tabla 7).

Tabla 7: Sensibilidad y especificidad de tres técnicas utilizadas en la detección de SARM en comparación con el método de cribado

Técnica para detección de SARM	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Kirby Bauer con disco de 1 µg/mL	100	100
Kirby Bauer con disco de cefoxitin 30 µg	93,3	100
Detección de la PBP_{2A}	93,3	100

El análisis plasmídico reveló que de 28 cepas SARG, 7 (25%) mostraron la presencia de formas plasmídicas al realizar su extracción mediante el método de lisis alcalina. Cinco de estas cepas, procedían de portadores nasales y dos de portadores de mano (Tabla 8). Se puede inferir que estas formas plasmídicas poseen un peso molecular aproximado a 23 kb, al igual que los controles utilizados provenientes de barridos anteriores, al compararlos con la escalera de peso molecular utilizada (Fago Lamda/Hind III) (Figura 2)

En cuanto a las cepas caracterizadas en estudios previos, también se observan formas plasmídicas con peso molecular similar, estas cepas provenían de portador nasal y neonatos, que se encontraban en la UARN entre los años de 1998 al 2002 (Figura 2) (Tabla 9).

Cabe destacar, que 5 de las 7 (71,42%) de las cepas SARG aisladas de la UARN en el 2003 donde se observaron formas plasmídicas, la CIM de gentamicina fue superior o igual a 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3). Resultados similares encontramos en las cepas utilizadas como controles provenientes de los barridos realizados desde 1998 al 2002 en la mencionada área, de las cuales, el 50% de cepas SARG (2/4) presentaron un valor de CIM igual o superior a 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 4).

Tabla 8: Características de las cepas SARG provenientes del personal de salud de la UARN (Julio 2003)

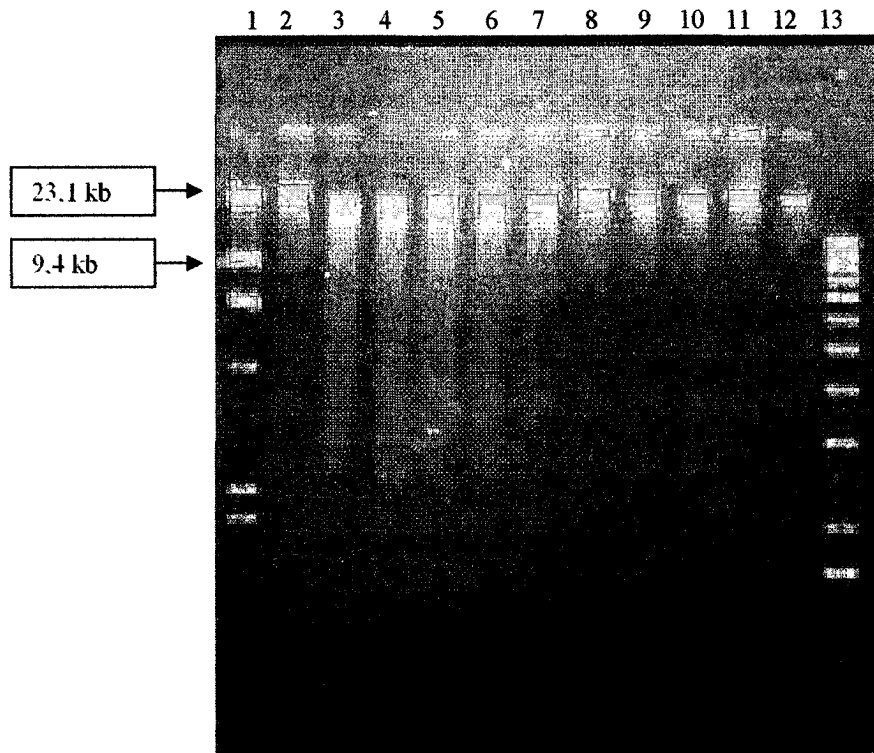
Cepa SARG	Personal de Salud	Portadores	CIM gentamicina (µg/mL)*	Plásmido
FND1.1	Médico	Fosa nasal	256	+
FNI8.2	Camarera	Fosa nasal	≥256	+
FND19.1	Enfermera	Fosa nasal	256	+
FND20.4	Enfermera	Fosa nasal	256	+
FNI22.3	Enfermera	Fosa nasal	8	+
M34.1	Enfermera	Mano	256	+
M36.1	Enfermera	Mano	≥64	+

*CIM gentamicina: R: ≥8 µg/mL S: ≤ 2 µg/mL

Tabla 9: Características de las cepas SARG provenientes de neonatos y personal de salud de la UARN caracterizadas en estudios previos (1998-2002)

Cepa SARG	Año	UARN	Origen de la Muestra	CIM gentamicina (µg/mL)*	Plásmido
088	1998	Neonato	Sangre	512	+
428	1998	Neonato	Secreción de herida quirúrgica	256	+
526-B	1998	Neonato	Sangre	256	+
FNI20.1	2002	Enfermera	Fosa Nasal	128	+

*CIM gentamicina: R: ≥ 8 µg/mL S: ≤ 2 µg/mL



- 1 Fago Lamda/Hind III
- 2 088
- 3 428
- 4 526-B 1998-2002
- 5 FNI20.1
- 6 FND 1.1
- 7 FND8.2
- 8 FND19.1 2003
- 9 FND20.4
- 10 FNI22.3
- 11 M34.3
- 12 M36.1
- 13 Gibco 1Kb (marcador de peso molecular)

Figura 2: Formas plasmídicas de cepas SARG provenientes de portadores de fosas nasales y manos aisladas del personal de la UARN (2003). Cepas barridos anteriores (años 1998, 2002).

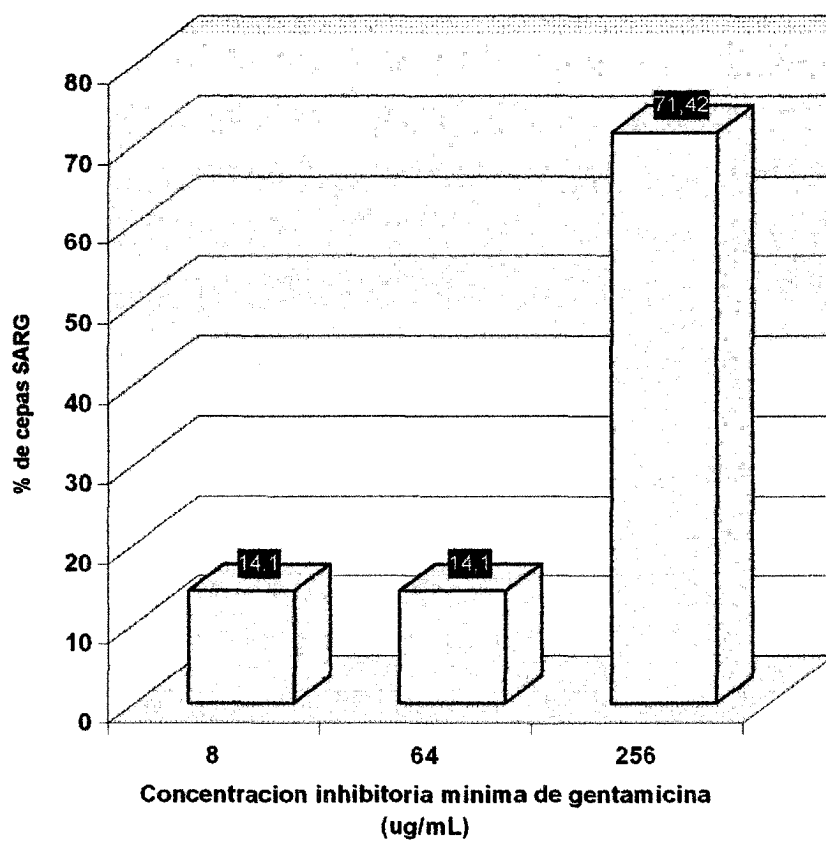


Figura 3: Concentración inhibitoria mínima (CIM) de gentamicina ante cepas SARG con formas plasmídicas aisladas del personal de la UARN (2003)

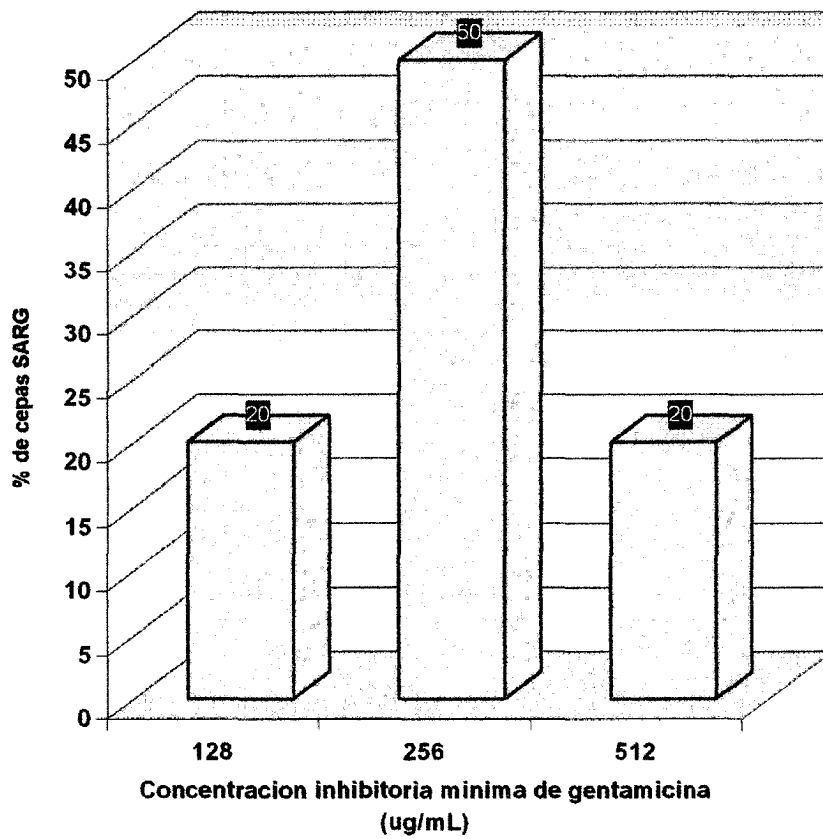


Figura 4: Concentración inhibitoria mínima (CIM) de gentamicina ante cepas SARG con formas plasmídicas aisladas de neonatos y portador de la UARN (periodo 1998-2002).

7.- DISCUSIÓN

S. aureus es un patógeno notablemente versátil, capaz de producir una variedad de infecciones mucho más amplia que la mayoría de las bacterias (Junco y col. 2000). En Venezuela, desde principios de los años 80, las cepas de *S. aureus* resistente a oxacilina/meticilina, se han visto relacionadas a la producción de diferentes infecciones de origen nosocomial, tales como las infecciones de piel y tejidos blandos, principalmente, en áreas de cuidados intensivos. Esta clase de cepas también se han aislado tanto de fosas nasales como de las manos, en el personal que labora en las áreas hospitalarias (Comegna y col. 2000).

Mendoza y col. (2001) reportan un 44,4% (8/18) de portadores de SARM en el personal que labora en un área de Neonatología, encontrando un 70% de portadores nasales. Resultados similares se pudieron encontrar en este trabajo, en el cual, 31,58% del personal era portador nasal de SARM (12/38). Sin embargo, el porcentaje es elevado en comparación al encontrado en el año 2002 por Velazco y col., quienes reportaron que el 22% del personal que prestaba servicio en la UARN del IAHULA, era portador de cepas SARM en fosas nasales.

En el 2003, Hernández y col. realizan una investigación para detectar cepas SARM en fosas nasales de niños cubanos, encontrando que el 0,35% de los niños sanos y el 2% de los niños hospitalizados, eran portadores nasales de cepas SARM, utilizando el medio OMSA (Oxacilina Manitol Sal Agar) para detección de SARM, valores inferiores comparados con este estudio. Además, estudiando los índices de resistencia por el método de difusión en

disco Kirby Baüer, las cepas aisladas en ambos grupos de estudio, también mostraron altos niveles de resistencia a antibióticos, tales como penicilina y eritromicina. Por otra parte, Sanabria y col. (2001) estudiaron al personal hospitalario de diferentes centros asistenciales, buscando portadores nasales de *S. aureus*, obteniendo que el 21% (9/43) de las mencionada cepas aisladas resultaron resistentes a meticilina, el 28%(12/43) resistentes a gentamicina, por Concentración inhibitoria mínima (CIM).

La vía más frecuente de transmisión de SARM, son las manos del personal, y por lo general, las cepas son introducidas en el ambiente intrahospitalario cuando ingresa un paciente infectado o colonizado, quien actúa como reservorio. También puede ocurrir, que un trabajador de la salud se colonice a si mismo al tocarse la nariz, sin haberse efectuado un apropiado lavado de manos u omitido el uso de barreras, luego del contacto con un paciente colonizado por SARM (Zelaya, 2001). En esta investigación, también se detectaron cepas de SARM en manos, en un porcentaje menor, 7,9% (3/38); no obstante, se le debe dar importancia, ya que esto sirve como fuente segura de diseminación dentro del área hospitalaria estudiada en la presente investigación, aunado al hecho de que estas cepas son multirresistentes.

En el servicio de Microbiología de la Universidad de Monash en Australia, cepas de *S. aureus*, procedentes de diferentes muestras clínicas, exhiben resistencia a los aminoglucósidos, representado por el patrón gentamicina, tobramicina y kanamicina, resultado similar al encontrado en esta investigación cuando se realizaron los perfiles de resistencia por el método de Kirby-Baüer, confirmado luego por la CIM, mediante el cual el 20% de las cepas presentaron un patrón de resistencia similar. Esta resistencia se ha

asociado con la presencia del transposon *Tn4001*, el cual está compuesto por 2 copias invertidas de secuencias de inserción de 1,3 Kb, y pertenecen al grupo *pSKI* de plásmidos multirresistentes; además, estos plásmidos median la resistencia a desinfectantes como el amonio cuaternario y el bromuro de etidio (Byrne y col. 1990).

Ida y col. (2001), al realizar CIM para aminoglucósidos en cepas SARM, provenientes de diferentes hospitales de Japón, observaron en 61,67% (235/381) de los aislados, valores de CIM superiores a 8 µg/mL para gentamicina y para tobramicina niveles superiores a 128 µg/mL, resultados que se asemejan con los obtenidos en este estudio, donde el 66,6% las cepas SARM aisladas mostraron un elevado nivel de resistencia para la gentamicina (CIM₉₀ = 256 µg/mL) y el 60% a la tobramicina (CIM₉₀ = 64 µg/mL).

En el año de 1999, Jayaratne y Rutherford, realizaron un barrido para determinar cepas SARM en pacientes hospitalizados, utilizando como medio principal agar manitol salado suplementado con 6 µg/mL de oxacilina, encontrando que el 38,6% de las cepas desarrolladas en este medio, presentaban los genes *mecA* y *nuc*, relacionadas con la resistencia a la meticilina, identificados por PCR. En este estudio las cepas aisladas en el medio manitol salado con 6 µg/ml oxacilina, se les realizó CIM ante oxacilina, encontrando que el 100% (CIM₉₀ = 128 µg/mL) eran realmente cepas SARM, los autores anteriormente señalados sugieren, que cuando se realiza un barrido para la búsqueda de este tipo de cepas utilizando este medio de cultivo, es necesario que éste sea respaldado por estudios de antibiología y biología molecular (PCR).

En la investigación de la colonización por SARM, la rápida detección de SARM en el personal de salud, como enfermeras y médico, de este tipo de cepas es de suma importancia. Al comparar el medio de cribado con oxacilina con la técnica Kirby Baüer utilizando el disco de 1 µg/mL de oxacilina, la sensibilidad fue del 100%, al igual que la especificidad, resultados similares fueron encontrados por Kampf y col. (1998), quienes demostraron un 97,6% de especificidad cuando se les realizó el método de difusión Kirby Baüer con el disco de 1 µg/mL de oxacilina, y un 98,1% de sensibilidad y 95,1% de especificidad utilizando el agar manitol salado suplementado con oxacilina, al compararlos con la PCR para la detección del gen *mecA*

El método de difusión en disco con cefoxitin de 30 µg/mL, es actualmente el mejor indicador para la detección de la resistencia a la oxacilina en cepas de *S. aureus*, recomendada por el NCCLS (actualmente CLSI), en el 2003. Smyth y Kahlmeter (2005), señalan, que empleando disco se lograron identificar un 96,6% de cepas SARM, *mecA* positivas por PCR, indicando que la utilización de esta técnica es más específica y rápida, a diferencia del uso de medios suplementados con oxacilina. En el presente estudio se logró demostrar un 93% de sensibilidad y 100% de especificidad, cuando se empleó el disco de cefoxitin, al compararlo con el método de cribado con oxacilina.

A partir de la década de los 90, en distintos laboratorios microbiológicos de rutina, se realiza la detección de la proteína enlazante PBP_{2A} mediante un método de aglutinación con partículas de látex denominado MRSA-Screen. En el presente trabajo, se realizó la comparación de este método con el de de cribado con oxacilina, hallando valores significativos de sensibilidad y especificidad. Por su parte Van Leeuwen y col. (1999) y

Van Griethuysen y col, (1999) realizan estudios para comparar la detección de la PBP_{2A} con el método de cribado arrojando un 93,6% de sensibilidad, respectivamente, porcentajes similares a los obtenidos en la presente investigación. Cabe destacar, que la detección por aglutinación de partículas de látex de la PBP_{2A}, reduce el tiempo de reporte y entrega de resultados, al ser comparado con los métodos de cribado que utilizan oxacilina y con aquellos que emplean suplementos con cefoxitin (Soloaga y col. 2004).

En la presente investigación se lograron observar formas plasmídicas en cepas SARG en un 25% de los portadores de fosas nasales y manos. Estos plásmidos aproximadamente poseen 23 kb, al igual que los plásmidos extraídos de las cepas utilizadas como controles, pertenecientes a neonatos y portador nasal de barridos realizados en el periodo 1997-2002. El tamaño de los plásmidos relacionados con la resistencia a los aminoglucósidos oscila entre 25 Kb a 50Kb, además estas formas plasmídicas en su mayoría pertenecen a la familia PSK y PGO, y están relacionados con la resistencia a gentamicina, trimetoprin y compuestos de amonio cuaternario (Morton y col. 1995; Firth y col. 2000).

En bacterias gram positivas, se presenta la limitación, como en el caso de *S. aureus*, que para poder aislar y observar adecuadamente bandas de ADN plasmídico es necesario que la concentración de ADN sea igual o superior a 1 µg/mL (Samburook y Maniatic, 1987).

Carrol y col. (1989), señalan en su estudio sobre plásmidos asociados con la resistencia a la gentamicina, que en la mayoría de las cepas de *S. aureus* resistentes a este antimicrobiano, expresaban niveles de CIM de gentamicina elevadas, con un promedio de 120 µg/mL. Resultados similares se han encontrado en esta investigación, donde las cepas SARG con

formas plasmídicas presentaban una CIM de gentamicina mayor o igual a 256 µg/mL, en los portadores nasales, de manos y en la mayoría de las cepas de los barridos anteriores.

De acuerdo a los resultados del presente estudio el principal reservorio de SARM en la UARN continua siendo el personal de enfermería. Cepas SARM con un similar patrón plasmídico, circulan en la mencionada área desde los primeros barridos realizados en la mencionada unidad desde el año 1998 hasta la presente fecha. Este importante hallazgo sugiere que dicho personal de salud actúa como fuente de diseminación de SARM de personal a neonato, de manera similar a lo encontrado en estudios realizados previamente en la mencionada área (Velazco, 2000).

8.- CONCLUSIONES:

- Durante el periodo estudiado, se aislaron cepas SARM en un 39,47% procedente de fosas nasales y manos de portadores pertenecientes al personal que labora en la Unidad de alto Riesgo Neonatal del IAHULA, utilizando el método de cribado de manitol salado suplementado con 6 $\mu\text{g/mL}$ de oxacilina
- El mayor porcentaje de portadores nasales y de manos estuvo representado por las enfermeras con un 60%.
- Mediante la técnica de difusión en disco Kirby Baüer, las cepas SARM evaluadas mostraron resistencia a eritromicina y kanamicina (52.9% cada uno) , seguido de la gentamicina con un 47%, siendo el perfil II (gentamicina, eritromicina, kanamicina), el más frecuentemente encontrado.
- El 100% de las cepas SARM mostraron altos niveles de resistencia a oxacilina ($\text{CIM}_{90}=128 \mu\text{g/mL}$), además, la mayoría de estas cepas mostraron altos niveles de resistencia a macrólidos ($\text{CIM}_{90}=64 \mu\text{g/mL}$) y aminoglucósidos ($\text{CIM}_{90}=256 \mu\text{g/mL}$).

- Se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad elevados al comparar la técnica de difusión Kirby Baüer utilizando el disco de 1µg/mL de oxacilina, disco de cefoxitin de 30 µg/mL y la detección de la proteína modificada PBP_{2A} con la técnica de cribado con manitol salado suplementado con oxacilina.
- Al realizar el análisis plasmídico se pudo observar que el 25% de las cepas SARG analizadas mostraron, formas plásmidicas de aproximadamente 23Kb, estas cepas además presentaban en su mayoría, una CIM mayor o igual a 256 µg/mL. Así mismo se pudo demostrar que el 100% de las cepas SARG, también eran resistentes a meticilina.
- Del análisis plásmidico de las cepas SARG, se infiere que el personal de salud que labora en la UARN puede haber actuado como reservorio y fuente de transmisión de este tipo de cepas a los neonatos.
- El personal de salud de la UARN del IAHULA, principalmente las enfermeras, permanece como principal reservorio de cepas SARM multirresistente.

9.- RECOMENDACIONES

- Realizar en forma permanente barridos microbiológicos para la detección de SARM, en la UARN y en otras áreas de hospitalización del IAHULA, en el momento en que se reporte un incremento en la frecuencia de dicho microorganismo.
- Realizar la tipificación de las cepas SARM que se aislen de todo el personal de salud, que pertenezcan a diferentes áreas intrahospitalarias mediante análisis de ADN plásmidico, y otras técnicas moleculares, como la PCR.
- Seguir utilizando el medio de cribado con manitol salado suplementado con 6 $\mu\text{g/mL}$ de oxacilina, para barridos microbiológicos cuando se sospeche de brotes por SARM ya que como podemos observar en el presente estudio, nos permite obtener resultados confiables a un bajo costo.
- El disco de 1 $\mu\text{g/mL}$ de oxacilina es útil para la evaluación de la susceptibilidad a la meticilina en cualquiera de los laboratorios microbiológicos, siempre y cuando se cuiden las condiciones de incubación y preparación del medio de cultivo.
- Continuar con la vigilancia y control de portadores de cepas SARM, promoviendo el lavado de manos y el tratamiento del personal que actúe como reservorio de este tipo de cepas.

10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Haddad, E., Udo, E., Mokadas, E., Sanyal, S. y Grubb, W. (2001). Persistence of a clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in burns unit. *J. Med. Microbiol.*, 50, 558-564.

- Apfalter, P., Assadian, O., Kalczyk, A., Lindenmann, V., Makristathis, A., Mustafa, S., Rotter, M. y Hirschi, A. (2002). Performance of a new chromogenic oxacillin resistance screen medium (Oxoid) in the detection and presumptive identification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 44, 209-211.

- Aravind, P., Krishnan, O., Path, D., Srinivasa, H. y Joseph, V. (1999). *Screening of Burns Unit Staff of a Tertiary Care Hospital for Methicillin Resistant Staphylococcus aureus Colonisation*. McGill J. Med. H. Page. Disponible en: www.mjm.mcgill.ca

- Boyce, J. (1998). Diagnosis and Treatment of Serious Antimicrobial Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin. Infect. Dis.*, 4(4).

- Byrne, M., Gillespie, M. y Skurray, R. (1990). Molecular analysis of a gentamicin resistance transposonlike element in plasmids isolate from North American *Staphylococcus aureus* strains. *Ant. Ag. Chem.*, 34(11), 2106-2113.

- Calvo, A., Rodríguez, C., Andrade O., Bertuglia, F. y Márquez, N. (2004). *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente: Detección de PBP2 mediante la técnica de látex y evaluación de la resistencia asociada. *Bol. Venez. Infectol.*, 15(1), 18-22.

- Camarena, J. y Sánchez, R. (1998). *Infección por Staphylococcus aureus resistente a meticilina*. Reunión del SEIMC. Disponible en www.seimc.org.

- Carrol, J.D., Pomeroy, H., Russel, R., Arbuthnott, J., Keane, C., McCormick, O. y Coleman, D. (1989). A new methicillin an gentamicin resistant *Staphylococcus aureus* in Dubin: molecular genetic analysis. *J. Med. Microbiol.*, 28,15-23

- Chambers, H. (1997). Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical and Clinical Implications. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10, 781-791.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)/NCCLS Antimicrobial Susceptibility Testing Standards. (2005); M100-S12. Wayne, Pennsylvania.

- Comegna, M., Guzmán, M., Camona, O. y Molina, M. (2000). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 20(1).

- Domínguez, M y Rodríguez, J. (2003). Proyecto de estudio *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en España (Protocolo GEIH Gemara SARM 2003). Disponible en www.seimc.org.

- Eady, A. y Cove, J. (2003). Staphylococcal Resistance Revisited: Community Acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*- an Emerging Problem for the Management of Skin and Soft Tissue Infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 16, 103-124.

- Eurosurveillance Archives. (2000). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: *Hacia una respuesta*. Disponible en www.google.com.

- Fagon, J., Maillet, J. y Novara, J. (1998). Hospital – Acquired Pneumonia: Methicillin Resistance and Intensive Care Unit Admission. *Am. J. Med.*, 104(5), 17S-23S.

- Firth, N., Apisiridej, S., Berg, T., O'Rourke, B., Curnock, S., Dyke, K. y Skurray, D. (2000). Replication of Staphylococcal Multiresistance Plasmids. *J. Bacteriol.*, *182*(8), 2170-2178.
- Fluit, A., Maarten, R., Visser, A. y Schmitz, F. (2001). Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Review.*, *14*, 836-871.
- Goyal, R., Shing, N., Manchanda, V. y Marthur, M. (2004). Detection of clindamycin susceptibility in macrolide resistant phenotype of *Staphylococcus aureus*. *In. J. Med. Microbiol.* *22*,(4), 251-254
- Gudiol, F. (2003). *Análisis epidemiológico y pronóstico de la bacteremia del adulto en un hospital comarcal*. Disponible en: www.tdx.cesca.es
- Hernández, I., Toraño, G., González, M. y González, I. (2003). *Staphylococcus aureus* Resistente a la Meticilina: Detección de Portadores Entre Niños Hospitalizados y Niños Sanos de la Comunidad. *Rev. Cubana. Med Trop.*, *55*(3), 153-161.
- Herveg, J. y Barcia, M. (2004). *Biología molecular. Reacción en cadena de la polimerasa (la PCR)*. Universidad Mayor San Simón. Cochabamba Bolivia. Disponible en: [www.http//campus.ucl.ac.be/SBIM2520](http://campus.ucl.ac.be/SBIM2520)

- Ida, T., Okamoto, R., Shimauchi, C., Okubo, T., Kuga, A. y Inoue, M. (2001). Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes by Susceptibility Testing: Epidemiology of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 39(9), 3115-3121.

- Institute National Committee for Clinical Laboratory Standards Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (NCCLS). (2003); M100-S12. Wayne, Pennsylvania.

- Iseberg H, (1998). *Plasmid Fingerprinting of Staphylococci. Clinical Microbiology Procedure Handbook*. Washington: American Society for Microbiology.

- Jayaratne, P. y Rutherford C. (1999). Detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from growth on manitol salt oxacillin agar using PCR for nosocomial surveillance. *Diag. Microbiol. Inf. Dis.*, 35, 13-18.

- Jonas, D., Speck, M., Daschner, F. y Grundmann, H. 2002. Rapid PCR- Based Identification of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* from Screening Swabs. *J. Clin. Microbiol.* 40(5), 1821-1823

- Jones, R. (1996). The Emergent Needs for Basic Research, Education, and Surveillance of Antimicrobial Resistance. Problem Facing the Report From the American Society for Microbiology Task Force on Antibiotic Resistance. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 25, 153-161.

- Junco, R., Marreo, M y Lara, C. 2000. *Staphylococcus* e Infección Nosocomial. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.*, 38(1), 24-28.

- Kampf, G., Lecke, C., Cimbali, A., Weist, K. y Ruden, H. (1998). Evaluation of Mannitol Salt Agar for Detection of Oxacillin Resistance in *Staphylococcus aureus* by Disk Diffusion and Agar Screening. *J. Clin. Microbiol.* 36 (8), 2254-2257.

- Kohner, P., Uhl, J., Kolbert, C., Persing, D. y Cockerill, F. (1999) .Comparison of Susceptibility Testing Methods With *mecA* Gene Analysis for Determining Oxacillin (Methicillin) Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* and Coagulase- Negative *Staphylococcus spp.* *J. Clin. Microbiol.*, 37(9), 2952-2961.

- Koneman, E., Allen, S. y Janola, W. (2001). *Diagnóstico de laboratorio*. Texto Atlas. Buenos Aires: Panamericana.

- Lally, R., Ederer, M. y Woolfrey, B. (1985). Evaluation of Manitol Salt Agar with Oxacillin as Screening Medium for Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 22(4), 501-504.

- Lara, M. (2003). *Perfil de resistencia a antimicrobianos de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina*. Revista on-line del Ministerio de Salud del Perú. Disponible en www.minsa.gob.ni.

- Lemaitre, N., Sougakoff, W., Masmoudi, A., Fieve, M., Bismuth, R. y Jarlier, V. (1998). Characterization of Gentamicin-Susceptible Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Involved in Nosocomial Spread. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 81-85.

- Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J., Lizasoain, I. y Moro M. (2005). *Velásquez Farmacología Básica y Clínica*. 17ª Edición. Madrid- España: Editorial Panamericana.

- Luque, J. y Herraiz, A. (2001). *Biología molecular e ingeniería genética*. Madrid- España: Editorial Harcourt.

- Lyon, B. y Skurray, R. (1987). Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basis. *Microbiol. Rev.*, 51(1), 88-134.

- MacKenzie, A., Richardson, H., Lannigan, R. y Wood, D. (1995). Evidence that National Committee for Clinical Laboratory Standard Disk Test Is Less Sensitive than the Screen Plate for Detection of Low Expression Class. *J. Clin. Microbiol.*, 33(7), 1909-1911.

- Maes, N., Magdalena, J., Rottiers, S., De Gheldre, J. y Struelens, M. (2002). Evaluation of a Triple PCR Assay to Discriminate Staphylococci and Determine Methicillin Resistance from Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.*, 40(4), 1514-1517.

- Marshal, R. (1992), Standard Methods for the Examination of Dairy Products. Am. Pub. Health. Assoc. (APHA). USA. 402-407.

- McDonnell, G. y Russell, D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Action, and Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(1), 147-179.

- Mir, N., Sánchez, M., Baquero, F., López, B., Calderón, C. y Cantón, R. (1998). Soft Salt Mannitol Agar Cloxacillin Test: a Highly Specific Bedside Screening Test

- for Detection of Colonization with Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 36(4), 986-989.
- Morton, T., Jhonston, L., Patterson, J. y Archer, G. (1995). Characterization of a Conjugative Staphylococcal Mupirocin Resistance Plasmid. *Ant. Ag. Chem.* 39 (6), 1272- 1280.
 - Murray, P., Rosenthal, K., Kobayashi, G. y Pfaller, M. (2002). *Microbiología médica*. Madrid: Editorial Elseiver. 198-212.
 - Navascues, A., García-Irure, J. y Guillén, F. (2004). Situación de *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina en el Hospital de Navarra (2000-2002). *An. Sist. Sanit. Navar.*, 27(1), 21-25.
 - Palecino, E. (2002). Métodos recomendados para el estudio de la susceptibilidad en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativo* y *Staphylococcus saprophyticus*: Nuevos punto de corte e interpretación de resultados. *Rev. Chil Infect.*, 19 (2), 119-124

- Pawa, A., Noble, C. y Howell, S. (2000). Co-transfer of Plasmids in Association with Conjugative Transfer of Mupirocin and Penicillin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 49, 1103-1107.

- Pérez-Roth, E., Claverie-Martín, F., Villar, J. y Méndez, S. (2001). Multiplex PCR for Simultaneous Identification of *Staphylococcus aureus* and Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance. *J. Clin. Microbiol.*, 39(11), 4037-4041.

- Pérez-Roth, E., Lopez-Aguilar, C., Alcoba, F., Lorenzo, F. y Méndez, F. (2005). *Resistencia a altos niveles de mupirocina en linajes pandémicos de staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM)*. Disponible en www.micelio.unex.es

- Prego, J., Galiana, A., Pujadas, M., Almada, K., Boulay, M., Carugati, M., Castro, M., Delfino, M., Ferreiro, B., Gandaro, P., Ihitz, A., Lustemberg, A., Mas, M., Telechea, D. y Paiva, R. (2004). Infecciones de Piel y Partes Blandas en Pacientes Ambulatorios. *Arch. Ped. Urug.*, 75(4), 300-306.

- Prescott, M., Harley, J. y Klein, D. (2004). *Microbiología*. (5^{ta} edición). Editorial McGraw-Hill Interamericana. pp. 713 y 812.

- Pujol, M., Peña, C., Pallares, R., Ariza, J., Ayats, J., Domínguez, M. y Gudiol, F. (1996). Nosocomial *Staphylococcus aureus* Bacteremia Among Nasal Carriers of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Strains. *Am J Med*, 100, 509-516.

- Reboli, A., Jhon, J. y Levkoff, A. (1989). Epidemic Methicillin- Gentamicin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Neonatal Intensive Care Unit. *AJDC*. 143, 34-39.

- Reynaldo, M., Flores, B., Viegas, J. y Magariños, M. (2004). Eficacia de algunos biocidas contra estafilococos hospitalarios sensibles y resistentes a la meticilina en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Panam. Salud. Publica*, 16(3).

- Salaria, M y Singh, M. (2001). Methicillin Resistant- *Staphylococcus aureus*. *Ind. Ped.* 38, 29-36.

- Salgado, C., Calfee, D. y Farr, B. (2003). Interventions to Prevent Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Transmission in Health Care Facilities: What Works?. *Clin. Microb. News.*, 25(18), 137-144.

- Salimnia, H. y Brown, W. (2005). *Detection of Oxacillin Resistant in Staphylococcus aureus: Comparison of Phoenix Oxacillin and Cefoxitin MICs, MicroScan Oxacillin MIC, Oxacillin and Cefoxitin Disk Diffusion, and mecA Gene Detection*. Revista electronica de Becton Dickinson Company. Disponible en: <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/whitepapers/lr222305.pdf>.

- Samburook, J, y Maniatic, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 1-25

- Sanabria, R., Laspina, F., Balmaceda, M., Samudio, M., Fariña, N., Campuzano, A., Aparicio, C., Acosta A. y Ortiz G. (2003). *Portación Nasal de Staphylococcus aureus en Personal Hospitalario. Frecuencia y Patrón de Sensibilidad Antimicrobiana*. Revista del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones de la Salud. Disponible en: www.iics.una.py

- Schmidt, H. y Hensel, M. (2004). Pathogenicity Island in Bacterial Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(1), 34-55.

- Smyth, R. y Kahlmeter, G. (2005). Mannitol Salt Agar-Cefoxitin Combination as a Screening Medium for Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 43 (8), 3797-3799.

- Soloaga, R., Corso, A., Gagett, P., Faccone, D. y Galas, M. (2004). Detección de meticilino resistencia en *Staphylococcus aureus*: Comparación de métodos convencionales y aglutinación con MRSA-Screen Latex. *Rev. Arg. Microbiol.* 36, 36-40

- Sopena, N. (2001). *Evolución de un brote epidémico por Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (SARM)*. Tesis para optar por el título de Magister Scientiae en Bacteriología. Universidad de Barcelona. España. Disponible en <http://www.tdx.cesca.es>.

- Struelens, O. (2000). *Staphylococcus aureus* Resistentes a la Meticilina: Hacia una Respuesta Coordinada a un Desafío Permanente. *Euro Surveill.*, 5(3), 25-26.

- Swenson, J., Spargo, J., Tenover, F. y Ferraro, M. (2001). Optimal Inoculation Methods and Quality Control for the NCCLS Oxacillin Agar Screen Test for Detection of Oxacillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 39(10), 3781-3784.

- Torres, L. Calvo, A. Colmenares, J. Rodríguez, J. y Pedroza, R. (2005). *Detección fenotípica y molecular de la B-lactámico resistencia en cepas de Staphylococcus aureus*. XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología. Disponible en: <http://caibco.ucv.ve>

- Torroba, L., Rivero, M., Otermin, I., Gil, A., Iruin, A., Maraví-Poma, E. y García J. (2005). *Resistencia antimicrobiana y política de antibióticos: MRSA, GISA y VRE*. Disponible en www.cfnavarra.es

- Towner, K., Talbot, D., Carrant, R., Webster, C. y Humpreys, H. (1998). Development and Evaluation of a PCR Based Immunoassay for the Rapid Detecton of Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 47, 607-613.

- Ulloa, T., Portel., Carmi, A., Varela, C. y Fica, A. (2001). Comparación de reacción de polimerasa en cadena, látex y antibiograma para detección de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. *Rev. Chil.Infectol.* 18, 4.

- Van Enk, R. y Thompson, R. (1992). Use of a Primary Isolation Médium for Recovery of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 30(2), 504-505.

- Van Griethuysen, A., Pouw, M., Van Leeuwen, N., Heck, M., Willemse, P., Buiting, A. y Kluytmans, J. (1999). Rapid Slide Latex Agglutination Test for Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 37(9): 2789,2792

- Van Leeuwen, W., Van Pelt, C., Luijendijk, A., Verbrugh, H. y Goessens, F. (1999). Rapid Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates by the MRSA-Screen Latex Agglutination Test. *J. Clin. Microbiol.* 37 (9), 3029-3030.

- Vannufel, P., Gigi, J., Ezzedine, H., VADERCAM, B., Delme, M., Wauters, G. y Gala, JI. (1995). Specific Detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus* Species by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 33(1), 2864-2867.

- Vaquero, F., Llana, J., Fleites, A., López, D., Cubillas, H., Alonso, N., Santamarta, E., Ramos, M., Cambor, L., Menéndez, M., Carreño, J., Rodríguez, J. y Gutiérrez, J. (2005). Control de la infección-colonización por *Staphylococcus aureus* resistente a metilina en un servicio de angiología y cirugía vascular. *Angiología*, 56(6), 561-570.

- Velásquez, J., Lizaraso, F., Wong, W., Alfaro, C., Véliz, J., Salazar, J., Larrea, H., Gamarra, J. y Smaquispe, R. (2002). Vigilancia de la resistencia de *Staphylococcus aureus* a la oxacilina-vancomicina y patrones de coresistencia. *Rev. Per. Soc. Med. Intern.*, 15(4).

- Velazco, E. (2000). *Epidemiología de infecciones nosocomiales por staphylococcus aureus en una unidad de alto riesgo neonatal*. Trabajo de Grado para optar por el

título de Magister Scientiae en Microbiología Clínica. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes. Merida.

- Velazco, E., Nieves, B., Araque, M., Torres, A. y Calderas, Z. (2002). Epidemiología de infecciones Nosocomiales por *Staphylococcus aureus* en una unidad de Alto Riesgo Neonatal. *Enf. Infecc. Microbiol. Clin.*, 20, 321-325.
- Vourli, S., Perimeni, D., Makri, A., Polemis, M., Voyiatzi, A. y Vatopoulos, A. (2005). Community Acquired MRSA Infections in a Pediatric Population in Greece. *Euro Surveill.* 10 (5), 78-79
- Wagnert, JHT. (2000). Medidas de control de SARM adoptada por los países bajos, a raíz de la expansión de la unión Europea. *Euro Surveill.* 5(3), 26-28
- Wannet, W. (2002). Diseminación de un clon de SARM con heterorresistencia a la oxacilina en los Países Bajos. *Euro Surveill.*, 7(5), 73-74.
- Zelaya, L., Zelaya, JL., Miranda, U., Guillermo-Albites, J. y Hernández, D. Portadores intrahospitalarios de *Staphylococcus aureus* y sensibilidad a los antimicrobianos. *Rev. Per. Enf. Inf. Trop.*, 1(1)

© 1996 JNE

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
 FACULTAD DE FARMACIA
 POSTGRADO EN MICROBIOLOGIA CLINICA
 LABORATORIO DE INVESTIGACION EN BACTERIOLOGÍA ANAERÓBICA
 "Dr. Roberto Gabaldon"

BARRIDO MICROBIOLÓGICO. UNIDAD DE ALTO RIESGO NEONATAL JULIO 2003.
 Hoja de Registro para el Personal de Salud. Portadores Nasales y de manos de *Staphylococcus aureus* y portadores en mano de bacilos gram negativos no exigentes.

N° _____ Fecha _____ Nombre _____ Edad _____ Sexo: M _____ F _____
 Ocupación: Enfermera _____ Especialista _____ Estudiante Medicina _____ Médico Residente
 1° _____ 2° _____ 3° _____ Camarera(o) _____ Enfermedad de Base _____
 Presenta Rinorrea en el momento de la toma de muestra: Si _____ No _____ Ha recibido tratamiento
 Antimicrobiano en los últimos 6 meses. Si _____ No _____ Especifique el Antibiótico _____

**TOMA DE MUESTRA DE FOSAS NAALES:
 AGAR MANITOL SALADO**

Fosa nasal izq		Horas	Desarrollo bacteriano (Cuadrantes)				Fosa nasal der		Horas	Desarrollo bacteriano (Cuadrantes)			
Crecimiento			I	II	III	IV	Crecimiento			I	II	III	IV
SI	NO	24					SI	NO	24				
		48							48				
		72							72				

Identificación

Identificación

AGAR MANITOL SALADO CON OXACILINA

Fosa nasal izq		Horas	Desarrollo bacteriano (Cuadrantes)				Fosa nasal der		Horas	Desarrollo bacteriano (Cuadrantes)			
Crecimiento			I	II	III	IV	Crecimiento			I	II	III	IV
SI	NO	24					SI	NO	24				
		48							48				
		72							72				

Identificación

Identificación

TOMA DE MUESTRA DE LOS DEDOS DE LAS MANOS

Mano Izq _____
 Dedos Pulgar Índice Medio Manitol Salado Contaje Manitol Salado con oxacilina Contaje

Der _____

Identificación

Identificación