



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

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

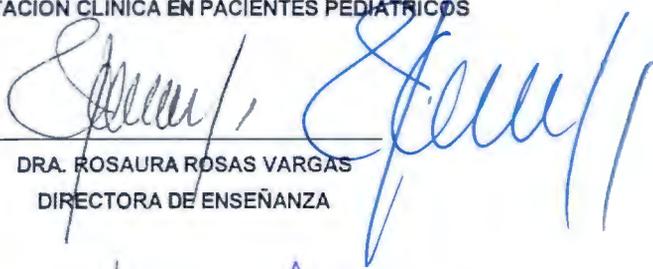
TESIS
PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:
DRA. PATRIK ELIANA SARMIENTO WILCHES

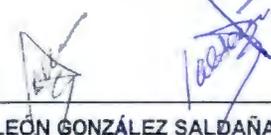
TUTOR
DR. AGUSTIN RAFAEL DE COLSA RANERO



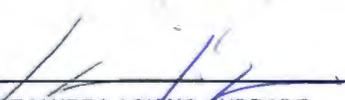
PREVALENCIA, IDENTIFICACION Y TIPIFICACION MOLECULAR DE LOS
DIFERENTES GENOTIPOS EN AISLAMIENTOS DE S. AUREUS Y SU
PRESENTACIÓN CLÍNICA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS


DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS
DIRECTORA DE ENSEÑANZA


DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO


DR. NAPOLEÓN GONZÁLEZ SALDAÑA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA


DR. AGUSTÍN RAFAEL DE COLSA RANERO
TUTOR DE TESIS


DRA. ALEJANDRA AQUINO ANDRADE
CO-TUTOR DE TESIS


M. EN C. LUISA DÍAZ GARCÍA
ASESOR METODOLÓGICO



TESISTA

Dra Patrik Eliana Sarmiento Wilches

Médico Pediatra – Grado a Obtener: Médico Especialista en Infectología

TUTOR

Dr. Agustín De Colsa Ranero

Médico Adscrito al Departamento de Infectología Pediátrica

Jefe del Laboratorio de Microbiología Molecular

Torre de Investigación Instituto Nacional de Pediatría

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

CO-TUTOR

Dra. Alejandra Aquino Andrade

Adscrita al Laboratorio de Microbiología Molecular

Torre de Investigación de Instituto Nacional de Pediatría

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

TUTOR METODOLÓGICO

M. en C. Luisa Díaz García

Adscrita al Servicio de Investigación Clínica

Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría

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

COLABORADORES

Q.F.B. Antonino Lara Hernández

Adscrito al Laboratorio de Bacteriología Clínica

Torre de Investigación de Instituto Nacional de Pediatría

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

Q.F.B. Patricia Arzate Barbosa

Jefa del Laboratorio de Bacteriología Clínica

Torre de Investigación de Instituto Nacional de Pediatría

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

INDICE

1. RESUMEN	6
2. MARCO TEORICO	7- 19
SISTEMA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	13-14
Detección de resistencia a oxacilina	14
Detección de resistencia a clíndamicina	14
Detección de resistencia a vancomicina	14-15
Detección de resistencia a linezolid	15
Detección de resistencia a daptomicina	15
TIPIFICACION DE FAGOS	15
SEROTIPIFICACION	15
BIOTIPIFICACION	16
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS	16
ANALISIS DE PLASMIDOS DE DNA	16
ANALISIS DE DNA CROMOSÓMICO POR ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE ENDONUCLEASAS/	16
ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA SOUTHERN RIBOTIPIFICACIÓN /	
TIPIFICACIÓN BINARIA	16-17
ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS (PFGE)	17
REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA BASADA EN MÉTODOS DE	
TIPIFICACIÓN	17
Reacción en cadena de polimerasa con iniciador arbitrario AP-PCR/ Amplificación	
polimórfica aleatorizada de DNA	17
Reacción en cadena de polimerasa con polimorfismo de longitud de fragmentos de	
Restricción (PCR-RFLP)	17

ANÁLISIS SECUENCIAL DE DNA BASADO EN MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN	
<i>Multi-Locus-Sequence-Typing</i> (MLST)	17-18
<i>Single-Locus-Sequence-Typing</i> (SLST)	18
TIPIFICACIÓN DE CASETE CROMOSÓMICO <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>)	18
TIPIFICACIÓN DEL PERFIL DE GENES DE TOXINAS	18-19
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19-20
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	20
6. OBJETIVOS	20
6.1 Objetivo general	20
6.2 Objetivos específicos	20
7. CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	21
8. POBLACIÓN DE ESTUDIO	21
9. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	21
10. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	21
11. UBICACIÓN DEL ESTUDIO	21
12. MATERIAL Y MÉTODOS	21-24
13. DEFINICION OPERACIONAL DE LAS VARIABLES	24-27
14. TAMAÑO DE LA MUESTRA	27
15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
16. CONSIDERACIONES ÉTICAS	27
17. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	28
18. FACTIBILIDAD	28
19. RESULTADOS	28-36

20. DISCUSIÓN	36-39
21. PERSPECTIVAS	39
22. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40-42
23. ANEXOS	
ANEXO 1. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	43

TABLAS

Tabla 1: Definición de variables	24-27
Tabla 2: Cronograma de actividades	28
Tabla 3. Género de los pacientes con infección por <i>S. aureus</i>	29
Tabla 4. Género de los pacientes con infección por <i>S. aureus</i> según fenotipo.	29
Tabla 5. Clasificación de aislamientos según sitio de adquisición de <i>S. aureus</i> .	30
Tabla 6. Distribución de los diferentes servicios donde se encontraron los aislamientos de <i>S. aureus</i> adquiridos hospitalariamente.	30
Tabla 7. Diagnósticos de base y su relación con patrones clonales de <i>S. aureus</i>	31
Tabla 8. Muertes y relación con infección asociada a catéter y patrones clonales	32
Tabla 9. Complicaciones y relación con patrones clonales.	33
Tabla 10. Características de los pacientes fallecidos por bacteriemia por <i>S. aureus</i> .	34
Tabla 11. Patrones de Co-resistencia en <i>S. aureus</i> .	35
Tabla 12. Clasificación de patrones clonales según origen de adquisición de <i>S. aureus</i> .	36

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

Presenta: Patrik Eliana Sarmiento Wilches. R5 de Infectología Pediátrica

Tutor Clínico: Dr. Agustín de Coisa Ranero / Co-tutor: Dra. Alejandra Aquino Andrade

Tutor metodológico: M. en C. Luisa Díaz García

1. RESUMEN:

Antecedentes: *Staphylococcus aureus* es un patógeno de gran importancia tanto a nivel hospitalario como comunitario, debido a su virulencia, así como a su elevada tasa de morbi-mortalidad. Otro aspecto relevante de este patógeno es el incremento de su resistencia a los antibióticos convencionales. En los años 90s aparecieron los primeros casos de *S. aureus* resistente a metilicina (SAMR) en pacientes sin antecedentes de hospitalización, éstas cepas se llamaron SAMR-AC (SAMR adquiridos en la comunidad). Debido a incremento de resistencia de 2-64% en 30 años se teme una diseminación que se convierta en un problema grave de salud pública en éste siglo. La alarma se suscitó al encontrar un mayor número de infecciones graves de piel y tejidos blandos entre niños y adultos jóvenes sin factores de riesgo. **Justificación:** En el Instituto Nacional de Pediatría (INP) se ha logrado recolectar los aislamientos de *S. aureus* en el lapso de los últimos 8 años. Se observa con preocupación cómo el aumento de SAMR se empieza a ver reflejado también en nuestro medio. El aumento de la metilicina-resistencia de aislamientos hospitalarios se puede estimar aproximadamente en un 60%; sin embargo, desconocemos la frecuencia de SAMR en la comunidad y de igual forma no conocemos los genotipos en el INP, así como tampoco sabemos las características de los pacientes con éstos aislamientos. **Objetivos:** Describir la presentación clínica y los diferentes genotipos moleculares de *S. aureus* en los aislamientos de hemocultivos obtenidos en pacientes pediátricos en el INP en un primer periodo que incluye los años 2006-2008. **Materiales y Métodos:** Estudio observacional, de cohorte retrospectiva, descriptivo y retrolectivo. En esta primera fase del estudio se analizaron en forma retrospectiva aislamientos de *S. aureus* en hemocultivos, obtenidos en pacientes pediátricos en el INP en los años 2006-2008. Se describieron las características clínicas y epidemiológicas de dichas bacteriemias, se analizó su patrón de resistencia a oxacilina y de co-resistencia para otros antibióticos anti-estafilocócicos como clindamicina, trimetoprim-sulfametozaxol (TMP-SMX) y rifampicina. Se corroboró la resistencia a metilicina a través de la detección del gen *mecA* a través de PCR en punto final. Además se realizó la tipificación molecular de todos los aislamientos a través de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE). **Análisis de Resultados:** La información obtenida se analizó para establecer la prevalencia y distribución de los diferentes genotipos de *S. aureus*, así como las características clínicas y demográficas de los pacientes, analizando frecuencias relativas y absolutas.

2. MARCO TEORICO:

Históricamente "*Staphylococcus*" podría explicar la etiología de "incurable boils: forúnculos incurables" descritos en la sexta plaga en Egipto. El término *Staphylococcus* proviene de la expresión griega "*Staphylos*", que significa [racimo de uvas] y "*kokkos*" [baya o semilla] a las que se asemeja en su apariencia macroscópica como cocos de un diámetro entre 0.7 y 1,2 micras, con tendencia a formar grupos y no formar esporas^{1, 2}. Fue así como fueron vistos y clasificados por primera vez en 1882, por el cirujano escocés Sir Alexander Ogston. Dos décadas más tarde, un médico alemán, Friedrich J. Rosenbach describió 2 colonias pigmentadas y propuso la nomenclatura *Staphylococcus albus* (del latín: blanco) y *Staphylococcus aureus* (del latín "aurum"): [oro], del cual se reconoce su importancia clínicopatológica¹. Se caracteriza por su capacidad coagulante del plasma (S. coagulasa positivo) pudiendo sobrevivir en condiciones poco favorables. Desde el momento del nacimiento el neonato puede colonizarse por contacto directo persona a persona o con el ambiente donde se encuentre. El reservorio más frecuente son las fosas nasales anteriores, por el alto contenido de ácido teicoico al que se adhiere. Se puede encontrar en otras superficies mucosas como la perineal, axilas, orofaringe; además en la piel y en el tracto gastrointestinal. Aproximadamente un 60% de la población norteamericana puede estar colonizada, de los cuales 30% son portadores permanentes y 30% portadores transitorios, el 40% restante no se encuentra colonizado². Estas cifras cambian según la existencia de factores predisponentes para colonización, como son: pertenecer a personal de salud, diabéticos en tratamiento con insulina, pacientes con demopatías crónicas, pacientes en hemodiálisis crónica y consumidores de drogas endovenosas².

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

La evasión de *S. aureus* frente a los mecanismos defensivos se realiza a través de diferentes factores como: a) la cápsula polisacárida, con características antifagocíticas, b) la proteína A, que se une a anticuerpos, inactiva la acción opsonizante de la IgG y produce consumo de complemento, c) proteínas que inhiben la quimiotaxis y la extravasación de los polimorfonucleares al sitio de infección y d) citoquinas que destruyen los polimorfonucleares, una de ellas la Leucocidina de Pantón- Valentine². Esta expresa 2 subunidades: lukS-PV y lukF-PV, (ambas derivadas del locus *pvl*). Se ha comprobado que las cepas comunitarias de *S. aureus* (SAMR-C) producen dicha citotoxina, mientras que cepas metilino-sensibles (SAMS) y cepas metilino-resistentes adquiridas de forma hospitalaria (SAMR-H) no suelen portarla^{2,3}.

El efecto de LPV es formar poros heptaméricos en las membranas leucocitarias, causando su destrucción. Clínicamente las cepas LPV (+) causan infecciones de tejidos blandos, como furunculosis (93%), abscesos cutáneos (50%) e incluso neumonías de rápida progresión, como neumonías necrotizantes que tienen un alto grado de fatalidad. De forma contraria, infecciones como endocarditis, choque tóxico, neumonías con bacteriemia y mediastinitis entre otras, se han asociado con LPV (-)². Se ha encontrado en SAMR-C genes *luk-S* y *luk-F* que codifican para ésta. Existen estudios en animales y seres humanos que proponen un rol importante en la virulencia de SAMR-C: sin embargo, estas observaciones no están sustentadas aún por estudios clínicos con buen nivel de evidencia. Dentro de la contraparte los estudios no han demostrado peor evolución en cepas con LPV (+) en pacientes con bacteriemias y se registra igual mortalidad en pacientes con neumonía asociada a cuidado de la salud con LPV (+) y LPV (-), por lo que sólo puede concluirse que si se relaciona con virulencia, pero no es el principal determinante de ésta en SAMR-C¹.

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

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

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

Una vez el estafilococo supera la barrera mecánica de la piel y mucosas, tiene gran capacidad de producir tejido necrótico, fibrina y gran número de leucocitos polimorfonucleares. Si los mecanismos de defensa no son eficaces, pasarán a través de los vasos linfáticos al torrente sanguíneo y a través de bacteriemia, generando focos metastásicos múltiples en piel, articulaciones, hueso, endocardio y pulmón, convirtiéndose

en una infección sistémica¹. Los pasos en el desarrollo de la infección son entonces: inoculación, colonización, invasión y evasión de la respuesta del huésped^{2,3}.

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

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

Se define infección asociada a cuidado de la salud cuando el paciente tenga más de 48 horas de hospitalización al momento en que se obtuvo el aislamiento, según registro de fecha de crecimiento microbiológico sin considerar otros factores de riesgo asociados, exceptuando pacientes que tengan evidencia del mismo proceso infeccioso activo, previo a ingreso a la Institución. Se considerará pacientes con adquisición comunitaria con factores de riesgo hospitalario: pacientes con aislamiento microbiológico en las primeras 48 horas pero con al menos uno de los siguientes factores de riesgo: 1. Historia de hospitalización (excluyendo la normal del neonato), con antecedente de cirugías, diálisis estancia hospitalaria prolongada y/o colonización por *S. aureus* en el último año, 2. Portar catéter intravascular central o implantable al momento del cultivo^{4,5}.

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

Se definirá infección asociada a catéter, según el método diferencial de tiempo, con crecimiento primero en catéter central y crecimiento en catéter periférico en un lapso mayor o igual a 120 minutos o aislamiento en hemocultivo periférico relacionado con aislamiento en cultivo de punta de catéter por técnica semicuantitativa de rodamiento (Maki) con ≥ 15 unidades formadoras de colonias (U.F.C) de *S. aureus*. Lo anterior asociado a 1 o más signos clínicos de bacteriemia: fiebre ($\geq 38.0^{\circ}\text{C}$) / hipotermia (36°C), apnea, bradicardia, hipotensión⁴.

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

Se definirá neumonía por *S. aureus* al aislamiento del mismo en sangre, aspirado pulmonar, líquido pleural y/o empiema así como signos y síntomas consistentes con neumonía más hallazgos compatibles en estudios de imágenes pulmonares (radiografías,

tomografías torácicas si se tienen). Neumonía complicada se define si presenta: 1. Neumonía necrotizante, 2. Empiema o 3. Abscesos pulmonares^{4,5}.

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

A finales de la década de 1950 surge la metilina, diseñada para infecciones por *S. aureus* penicilino-resistente, pero en 1961 ya se reporta el primer caso de *S. aureus* resistente a ésta, en Inglaterra. Aparecen entonces otras isoxazoliipenicilinas (dicloxacilina, oxacilina, entre otras) que reemplazan la metilina, dada su nefrotoxicidad. La resistencia a metilina se considera un referente nominal clínico y de laboratorio, pues no se usa en éstos ámbitos para definir resistencia a la misma⁶.

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

Normalmente los beta-lactámicos se unen a las proteínas de unión a penicilina (PBP) nativas que están en la pared estafilocócica, inhibiendo la biosíntesis del peptidoglucano. La resistencia está generada por producción de proteínas PBP de baja afinidad a éstos, llamadas PBP-2a, codificadas por el gen *mecA*, de 2.1 kb de longitud, localizado en la isla genómica móvil (casete cromosómico estafilocócico *mec* (*SCCmec*), el cual contiene otros genes reguladores y secuencias de inserción. Son 11 tipos de *SCCmec* identificados, de los cuales es importante diferenciar los *SCCmec* I, II y III, que se encuentran en cepas hospitalarias (SAMR-AH) que no tienen leucocidina de Panton-Valentine (LPV-), son casetes cromosómicos relativamente grandes, que permiten alojar un gran número de genes de resistencia para otros antimicrobianos, por lo que se infiere que las cepas hospitalarias tienen mayor co-resistencia, con un patrón de multidrogo-resistentes (MDR) y requieren glucopéptidos para su tratamiento⁶.

Los tipos de *SCCmec* IV y V a la inversa, tienen leucocidina de Panton-Valentine positiva (LPV+) y pertenecen a cepas adquiridas en la comunidad : SAMR-AC, que se relacionan con infecciones cutáneas y pulmonares necrosantes. Son casetes más pequeños, que alojan menos genes, lo que infiere menos co-resistencia, por lo que éstas infecciones pueden tratarse con antibióticos como clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclinas entre otros. Lo anterior demuestra la importancia de conocer si la cepa de SAMR es comunitaria u hospitalaria, dado que tiene implicaciones de resistencia y definirá la elección antibiótica más idónea^{2,3,6,7}.

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

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

Para los años 90's aparecieron en el Oeste Australiano los primeros casos en pacientes sin antecedentes de hospitalización, denominándose a éstas cepas *S. aureus* meticilino-resistente de adquisición en la comunidad (SAMR-AC). La cual se expandió en años siguientes a Europa, Estados Unidos, Latinoamérica y Asia¹. Se describe entonces un alarmante incremento de la resistencia a oxacilina, de *S. aureus* de un 2% a un 64% en 30 años⁹, lo que hizo real y más cercano el temor a una diseminación eficiente y se ve entonces con preocupación como un problema de salud pública potencial en éste siglo.

Estas cepas generalmente afectaron personas jóvenes, sin contactos infectantes, produciendo infecciones cutáneas y neumonías¹. Como se describió anteriormente éstas cepas se diferenciaron de las de SAMR-H (principales clonas pandémicas). Las cepas de SAMR-AC eran susceptibles a múltiples antibióticos no beta-lactámicos y portaban el casete *SCCmec* tipo IV y menos frecuentemente el tipo V así como LPV(+). De ésta manera aparecieron nuevas clonas. USA 400 (ST1-SAMR-IV) fue la primera clona en USA, la cual fue desplazada en poco tiempo por USA 300 (ST8-SAMR-IV), que se convirtió en la principal causa de infecciones de tejidos blandos en adultos¹. En Francia de forma paralela emergió la clona ST5 Geraldine, la cual es más prevalente ahora que la clona previa ST8¹. No pasó mucho tiempo para que SAMR-C entrara en los hospitales, causando infecciones invasivas y así dando controversia a su rótulo de "adquirido en la comunidad". Actualmente se informa que el 16% de infecciones invasivas por SAMR son debidas al genotipo (USA-300), que originalmente apareció en la comunidad¹. Se ha asociado un genotipo USA-300 multi-resistente con hombres homosexuales, con el fenotipo VISA (*S. aureus* de resistencia intermedia a vancomicina) y se ha reportado resistencia a vancomicina en pacientes con endocarditis infecciosa causada por ésta clona¹. En la actualidad en Estados Unidos se ha visto un leve aumento de SAMR en los niños, mientras en América Latina éste aumento es más notable. USA-300 es el genotipo más relacionado con los aislamientos de SAMR en ambas poblaciones y ésta diferencia se explica al parecer por una ventaja competitiva de ésta clona en América Latina¹⁰. Se sigue describiendo además que la LPV es un factor patogénico de SAMR: 96% de casos y se sigue relacionando con neumonía necrotizante, pero también predomina en cepas de SAMS: 92% de casos, siendo mayor su prevalencia en casos de neumonía con respecto a infecciones en otras localizaciones: 46% en casos de artritis séptica por SAMS y 25% en los casos de osteomielitis en niños en Estados Unidos⁹. De la misma forma SAMR y la

clona USA-300 se sigue viendo más en niños, asociado a neumonía¹¹. Para el año 2005, fallecieron en EUA 18,650 personas por infecciones graves causadas por SAMR y no se encontró antecedente de atención hospitalaria o algún factor de riesgo en el hospedero. Esto generó el estudio y caracterización de estas cepas de SAMR-C así como la diferenciación con respecto a SAMR-H con respecto a sus diferentes casetes cromosómicos *SCCmec*⁹. Dentro de éstos conocimientos se ha podido diferenciar por ejemplo que la clona USA-300 que circula en países como Colombia y otros países de América del Sur, así como Australia tiene *SCCmec* tipo IVc y no porta el elemento móvil catabólico de arginina con respecto a las clonas USA300 de USA, pero se desconoce las implicaciones clínicas de éstos hallazgos¹⁰. La importancia de este estudio radica en reconocer que los mecanismos que dieron lugar a la aparición de cepas comunitarias resistentes siguen siendo motivo de controversia, la frecuencia de cepas de *S. aureus* resistentes a metilicina es elevada (50-85%) y hasta ahora las únicas medidas de prevención que han mostrado ser útiles para disminuir la resistencia son: el uso adecuado de antibióticos, usar guantes para el contacto con lesiones y secreciones de los pacientes con estas infecciones, la descontaminación de piel y nariz de pacientes colonizados por SAMR previo a cirugía y la implementación del lavado de manos^{1,9}. Se ha visto como estas medidas han reducido las infecciones por SAMR a un total de 1481 eventos reportados por *The National Health Service* entre abril de 2010 a marzo de 2011, con una reducción del 50% con respecto a 2008-2009 de la misma forma se ha reducido la mortalidad por SAMR en Inglaterra, la cual se redujo de 1652 casos a 488 en el 2010¹.

Ammons y cols en el 2010, investigaron SAMR y los elementos génicos de resistencia del *SCCmec* en adultos en la frontera de México y el sur de Texas, en 57 aislamientos encontrados entre 375 cultivos nasales. Encontraron 6 cepas de SAMR, 5 de ellas con *SCCmec* tipo IV. También encontraron casete *Spa*, correspondiente a clonas USA-300 y USA-600. Se explicó estos hallazgos, por transferencia horizontal de los mecanismos de resistencia, dada la facilidad para cruzar la frontera y adquirir antimicrobianos sin receta médica con selección secundaria de resistencia, así como adquisición de nuevas clonas nasofaríngeas⁹. Con respecto a estudios hospitalarios, en el lapso de 1999-2003 en un hospital de tercer nivel de atención se encontró una clona con *Spa* tipo 2, *SCCmec* tipo II y en un Hospital pediátrico en un período de tiempo similar, se detectó una nueva clona, que se denominó "M" de México con un *SCCmec* IV y la clona multiresistente Nueva York/Japón con *SCCmec* II que la reemplazó pero al final del seguimiento del estudio (7 años) se controló con antimicrobianos⁹.

Los reportes de infección por SAMR-C en niños, son aún más escasos y se limitan a series de casos o estudios de portadores. Se conocen entre éstos, los estudios de Velasquez y cols (2009), que reporta un 10% de colonización por *S. aureus* y un 0.93% de SAMR entre 2,345 niños de guarderías del norte y sur de México. De las 22 cepas de SAMR que se encontraron, se separaron en 6 clonas por PFGE y dentro de éstas se halló uno de los perfiles con similitud a la clona USA-100, de origen hospitalario, estadounidense. Lo anterior confirma la capacidad de diseminación de la resistencia que se infiere por migración poblacional⁹. Con respecto a la resistencia a vancomicina, se documentó en Japón desde 1997, la susceptibilidad reducida a vancomicina y en el 2002, apareció la primera cepa de *S. aureus* resistente a vancomicina (SARV) en EUA el SARV se define por CIM $\geq 16 \mu\text{g/mL}$. Hasta la fecha se ha documentado 9 cepas SARV: 7 en Michigan y 2 provenientes de Irán e India. La resistencia a vancomicina, es adquirida de

los *Enterococcus* spp. por un plásmido de conjugación que porta un transposón (Tn 1546) que contiene el operón *vanA*, que alteran la configuración de los dipéptidos terminales de los precursores de peptidoglucano: (d-Ala-d-Ala) a (d-Ala-d-Lac), lo que disminuye la afinidad de los glucopéptidos, interfiriendo en su sitio de acción. *vanA* confiere resistencia a vancomicina y teicoplanina⁶.

Más frecuente que SAVR es el *S. aureus* con susceptibilidad intermedia a vancomicina (VISA), que presenta CIM entre 4-8 µg/mL y poblaciones heterogéneas de éstas (hVISA) con CIM de 1-2 µg/mL. El mecanismo de resistencia de éstos, se da por engrosamiento de la pared bacteriana de forma progresiva, hasta dificultar el paso de glucopéptido por la misma además se ha documentado una disminución en la degradación autolítica. La prevalencia de (hVISA) es muy variable, de 0-74%, la mayoría de reportes: de 5-15%. Su detección se realiza por E-test, cuando la zona de inhibición de crecimiento es > 8 µg / mL para vancomicina y teicoplanina o ≥ 12 µg /mL solamente para teicoplanina. La sensibilización para su diagnóstico radica en la necesidad de otros esquemas antibióticos como: linezolid, quinupristin/dalfopristin, TMP-SMX y daptomicina⁶.

Con respecto al *S. aureus* metilino-resistente adquirido en la comunidad (SAMR-C), su incidencia ha aumentado en las últimas décadas, a partir de 1990, incluyendo población previamente sana, como causa de infecciones no sólo localizadas a nivel de piel, sino también infecciones sistémicas que requieren manejos agresivos. De ésta manera, también se ha sensibilizado su reporte en la población pediátrica, encontrando diferentes publicaciones que hacen referencia a aumento de morbimortalidad: Es así como visualiza una real preocupación cuando el CDC reportó en 1999, los primeros 4 casos de muerte pediátrica en Minnesota y Dakota Norte, entre 1997-1999 asociados a SAMR-C⁷. Luego en un Instituto Pediátrico del Norte de Brasil, se reportó en el 2008 que el 4.9% de las cepas de SA-AC eran resistentes a la metilina: SAMR. De la misma forma un estudio de seguimiento por 3 años en un hospital pediátrico en Texas, publicado en el 2005, documentó un porcentaje de SAMS-C (8.2%) con respecto a SAMR-H (4.4%), en pacientes con infecciones invasivas y un estudio en Hawaii, en niños hospitalizados con neumonía por CA-SA, reveló más complicaciones pulmonares en pacientes infectados con SAMR para el año 2010⁸.

Con respecto a los métodos diagnósticos, hay métodos fenotípicos y genotípicos^{12,13}. Dentro de los métodos fenotípicos, son más fáciles de realizar e interpretar, costo-efectivos, ampliamente disponibles aunque menos discriminatorios. Agrupa los aislamientos en pequeños grupos y es útil en el tamizaje inicial para la identificación de cepas epidémicas conocidas⁶. Entre ellos se encuentra:

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA. Miden la sensibilidad antimicrobiana con respecto a diferentes antibióticos, con puntos de corte de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) según el *Clinical Laboratory Standards Institute*: (CLSI), la FDA y el *European Committee Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), que permiten considerar un microorganismo como susceptible, de resistencia intermedia o de alta resistencia. Se interpreta como "susceptible" cuando el aislamiento es inhibido por la concentración de antibiótico usual alcanzada cuando se emplea la dosis recomendada para el tratamiento¹³. Los puntos de corte se determinan basados en la distribución de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), dosis, parámetros farmacocinéticos y

farmacodinámicos de antimicrobiano. El antibiograma con sus puntos de corte da resultados rápidos pero no debe usarse como único método para identificar SAMR, porque los patrones de resistencia están influenciados por: el entorno, presión antibiótica selectiva, pérdida y adquisición de plásmidos con genes de resistencia y otros mecanismos genéticos. También existen métodos de difusión en disco, caldos de microdilución y test de sensibilidad con escala (E-test), que requieren incubación luego de crecimiento del *S. aureus* en cultivo puro, cuyos resultados de resistencia deben ser confirmados por métodos alternativos^{12,13}.

Detección de resistencia a oxacilina: Una característica de resistencia a metilina es su expresión heterogénea, con la mayoría de células susceptibles a bajas concentraciones de oxacilina y sólo un pequeño grupo de células crecen a una concentración mayor que 50 mcg/mL. Existen diferentes métodos, incluyendo caldos y agares, bajo incubación a temperaturas no mayores a 35°C con lectura luego de 24 horas de incubación. Debe suplementarse los medios de Mueller-Hinton con NaCl al 2% para los test de dilución¹³. Con respecto a las pruebas de difusión de disco (Kirby-Bauer), se ha demostrado que los discos de cefoxitina son equivalentes a los de oxacilina. El CLSI ha adoptado éste disco para predecir la resistencia a oxacilina mediada por *mecA*, pero los resultados se reportan para oxacilina y no para cefoxitina. Se requieren métodos alternativos para confirmar los resultados de éstos métodos fenotípicos¹³.

Detección de resistencia a clindamicina: El mecanismo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS) se da por metilación ribosomal, dependiente de gen *erm*, que puede ser inducible o constitutivo¹¹. Cuando es constitutivo, se tiene resistencia a eritromicina y clindamicina al tiempo. Cuando es inducible, se comprueba con la prueba D (D test), usando un disco de clindamicina de 2 µg y uno de 15 µg de eritromicina, distanciados 15-26 mm en agar sangre o de Mueller-Hinton con un inóculo estándar. Luego de incubación, cuando se aplana el halo de inhibición de la clindamicina, se considera que eritromicina induce resistencia a clindamicina (resistencia inducible). Esta resistencia cobra importancia para las cepas SAMR-C que pueden ser sensibles a clindamicina¹³. Otro mecanismo de resistencia son las bombas de flujo, codificadas por gen *msr* (fenotipo M), con resistencia a eritromicina y sensibilidad a clindamicina¹¹.

Detección de resistencia a vancomicina: En el 2006, CLSI disminuyó el punto de corte de ≤ 4 µg/mL a 2 µg/mL. Hay diferentes métodos de medición. La microdilución el caldo es el estándar de oro pero tarda tiempo, poco empleado. Se ha reportado aumento de clonas con MIC superiores a 2 µg/mL en ciertos hospitales¹³. Aislamientos clasificados como hVISA tienen MIC en rango de susceptibilidad cuando se evalúan por los métodos convencionales, pero exhiben células con CMI en rango intermedio cuando se hace análisis poblacional, que es el estándar de oro, sin embargo se cuenta con agares con 4 o 6 µg/mL de vancomicina o teicoplanina, macrométodo y el E-test para resistencia a glicopéptido¹³. La prevalencia de hVISA varía de 0-74%, según área geográfica, por la falta de estandarización diagnóstica y la inestabilidad fenotípica, una vez los aislamientos son subcultivados, congelados y almacenados. Debe sospecharse hVISA, VISA y a VRSA ante: tratamientos prolongados con vancomicina, cultivos con crecimiento de *S. aureus* a pesar de tratamiento, morfología atípica de pequeñas colonias, reacción de catalasa débil e incremento de la MIC de daptomicina¹³. No se tiene métodos claramente

aceptados para detección de hVISA, es difícil discriminar entre 2-4 µg /mL. La CLSI establece MIC ≥ 8 µg /mL para VRSA en caldos de microdilución. Los métodos automatizados para detección de VISA y VRSA tienen sensibilidad variable. Se recomienda E-test para confirmar VRSA o VISA. Cualquier *S. aureus* con resultados de CMI ≥ 8 µg /mL debe confirmarse en laboratorios de referencia¹³.

Detección de Resistencia a linezolid: Se cuantifica con puntos de corte para disco de difusión ≥ 21 mm y CMI ≤ 4 µg /mL en *S. aureus*. Organismos con resistencia por disco de difusión deben confirmarse con CMI¹³.

Detección de Resistencia a daptomicina: La CSLI provee punto de corte de MIC ≤ 1 µg /mL para sensibilidad a daptomicina y confirmación con otro método ante no susceptibilidad. Hay pobre correlación entre métodos automatizados, E-test y métodos de referencia. Los medios necesitan ser suplementados con calcio. En caso de E-test: 40 µg /mL¹³.

Dentro de las cefalosporinas de quinta generación, la *Food Drug Administration* (FDA) aprobó la ceftarolina para SAMR, su actividad sobre éste radica en la afinidad a PBP2a y la sensibilidad a ésta se estableció con MIC ≤1 µg /mL (FDA). Hay estudios que afirman que el 99.1% de las cepas de SAMR con diferentes *SCCmec* son inhibidas por ceftarolina mas un nuevo inhibidor de beta-lactamasas (avibactam) a ≤ 2 µg /mL¹³.

TIPIFICACION DE FAGOS:

Se estandarizó por el Subcomité internacional de tipificación de fagos para *Staphylococcus*. Se han aceptado 23 fagos internacionales para tipificar cepas humanas de *S. aureus*. Requiere el mantenimiento del fago biológico activo, demandan tiempo y se considera que una alta proporción de SAMR no se tipifica. Es preferida como la técnica inicial de abordaje en investigación epidemiológica^{12,13}.

SEROTIPIFICACION:

Cepas de la misma especie pueden diferir en sus determinantes antigénicos expresados como lipopolisacáridos de superficie, proteínas de membrana y capsulares. Hay diferentes métodos: aglutinación bacteriana, aglutinación en látex, coaglutinación y ensayos enzimáticos. La técnica es reproducible pero tiene pobre discriminación y limitada actividad en el campo epidemiológico. Se han identificado 11 fagos, pero los más frecuentes para SAMR son el tipo 5 y 8¹².

BIOTIPIFICACION:

Usa patrones de características metabólicas expresadas por el aislamiento, como son: producción de ureasa, hidrólisis en Tween 80 y tolerancia a medios químicos y colorantes. Las técnicas son simples, reproducibles, fáciles de realizar pero no para gran número de muestras. La producción de ureasa es un importante marcador epidemiológico de los clones EMRSA-15 y EMRSA -16 ¹².

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS:

Comprende varios métodos: tipificación de proteínas celulares, inmunotransferencia, enzimas multilocus, electroforesis y zimotipificación¹². Los métodos genotípicos son costosos, técnicamente demandantes, pero más discriminatorios y con mayor eficacia diagnóstica. Permiten diferenciar cepas epidémicas de cepas endémicas^{12,13}. Entre ellos:

1. ANALISIS DE PLASMIDOS DE DNA:

Fue la primera técnica molecular usada en investigación. Se caracteriza por diferenciar aislamientos según número y tamaño de plásmidos. Fácil de realizar, pero carece de reproducibilidad por la existencia de plásmidos con diferentes formas moleculares, patrones de migración diferente en electroforesis y eliminación o ganancia de transposones. Cepas relacionadas pueden tener un perfil de plásmidos diferente. No útil en epidemias. La restricción con endonucleasas (REA) ha mejorado su poder de discriminación¹².

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

Las endonucleasas cortan el DNA en una secuencia nucleótida específica. El número y tamaño de los fragmentos de restricción generados depende de la secuencia de reconocimiento de la enzima y la composición del DNA. Los fragmentos son separados según tamaño en gel de agarosa por electroforesis. El patrón se tinte con bromuro de etidio y se examina a la luz ultravioleta. Su desventaja es el gran número de bandas generadas, que pueden sobreponerse y dificultar su interpretación^{12,13}.

En el análisis Southern los fragmentos de restricción son transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las variaciones en el número y formas de los fragmentos detectados se refieren como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción¹².

La ribotipificación se basa en la hibridación Southern, pero las enzimas realizan digestión de RNA ribosomal y los fragmentos obtenidos se marcan con radioisótopos o con uracilo. EcoR1 es la enzima que produce mayor número de bandas. Es una técnica reproducible, pero con menor eficiencia con respecto a electroforesis de campos pulsados para identificar cepas SAMR¹².

La tipificación binaria también es una modificación de la técnica Southern, pero se basa en la detección de presencia o ausencia de combinación de locus genéticos de PCR. Los productos amplificados se detectan por electroforesis en gel o PCR en tiempo real. Pueden usarse objetivos binarios de identificación como: genes de toxinas, genes de resistencia antibiótica, locus *SCCmec* y marcos de lectura derivados de fagos. Su eficacia depende del número de sondas empleadas. Se usa para estudiar relaciones clonales y rutas de transmisión de cepas de SAMR bovino¹².

3. ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS (PFGE):

Es una variante de la electroforesis en gel de agarosa convencional, donde la orientación de los campos eléctricos a través del gel cambia periódicamente. Esta modificación facilita la separación de los fragmentos de acuerdo al tamaño, minimizando la sobreposición de éstos, permitiendo obtener menos fragmentos pero de mayor longitud que con la electroforesis de campo constante. La enzima más empleada en investigación de SAMR es la *SmaI*. Es una técnica de proceso elaborado que requiere equipos y reactivos costosos, pero tiene alta reproducibilidad y es el estándar de oro para tipificar SAMR. Es el método más eficaz en estudios epidemiológicos de brotes comunitarios y hospitalarios^{9,10}. La base de datos nacional de PFGE para SAMR, permite la identificación de la mayoría de linajes de éstos. Sin embargo, faltan protocolos estandarizados que permitan comparar con los aislamientos en otros países¹².

4. METODOS DE TIPIFICACION BASADOS EN LA REACCION EN CADENA DE POLIMERASA (PCR). Dentro de éstas se reconocen:

a) **Reacción en cadena de polimerasa con iniciador arbitrario AP-PCR - Amplificación polimórfica aleatorizada de DNA:** Usa iniciadores (primers) de secuencias nucleótidas arbitrarias de homología desconocida con una secuencia blanco. La técnica no requiere digestión de los segmentos amplificados. El poder discriminatorio es variable, dependiendo del número de secuencia de iniciadores utilizados. Tiene poca interreproducibilidad entre laboratorios. Es útil en estudios de epidemias y como prueba de tamizaje rápida¹².

b) **Reacción en cadena de polimerasa con polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP):** Amplifica fragmentos definidos de DNA, con posterior digestión del producto amplificado con la restricción enzimática. Los polimorfismos generados permiten mejor discriminación de las cepas. Se emplea el gen *coa* y el gen *spa* para la identificación de SAMR¹².

5. ANALISIS SECUENCIAL DE DNA BASADO EN METODOS DE TIPIFICACION:

a) **Multilocus-Sequence-Typing (MLST):** Se basa en el análisis secuencial de múltiples genes conservados (*housekeeping genes*). Los siete genes estudiados: *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* y *yqiL*. Las diferentes secuencias de cada gen están asignadas como diferentes alelos y cada SAMR es definido por los alelos de los 7 genes¹². Se usa en

conjunto con el análisis de PCR del *SCCmec* como método de referencia para los estudios multicéntricos de SAMR. El subcomité de sociedad microbiológica de tipificación de *S. aureus* ha aceptado una nomenclatura internacional para éstos tipos de clones, por ejemplo un clon epidémico de Inglaterra: EMRSA-15 es referido como MLST22-MRSA *SCCmec* tipo IV. Existe una base de datos a nivel de la web con respecto a la tipificación MLST: (www.mlst.net) para la comparación de resultados¹². Esta técnica ha sido usada para identificar cepas de ganado asociadas a SAMR y su transmisión entre especies humanas y animales. Ha mostrado buen nivel de concordancia con los resultados obtenidos por PFGE y tipificación por *Spa*¹².

b) Single-Locus-Sequence-Typing (SLST): Se usa para comparar la variación de la secuencia de un solo blanco genético. Los genes empleados son usualmente repeticiones de secuencias cortas (SSR). Los genes para la proteína A (*spa*) de 24 pb y la coagulasa (*coa*) de 81 pb en las cepas de SAMR tienen secuencias de repeticiones que determinan cada linaje. La tipificación de *Spa* diferencia entre cepas con fagos identificables vs. no identificables. Esta técnica es útil en vigilancia nacional e internacional así como estudios epidemiológicos locales, sin embargo, también se recomienda combinarla con marcadores de genes de resistencia como *SCCmec*¹².

6. TIPIFICACION DE CASETE CROMOSÓMICO *mec* (*SCCmec*):

El casete *SCCmec* es un elemento genético móvil de resistencia, que contiene el complejo genético *mecA* y el complejo genético *ccr* con diferentes alotipos. Se conocen principalmente 8 tipos de *SCCmec*: (I-VIII) entre las diferentes cepas de SAMR. Cada *SCCmec* codifica para la resistencia a diferentes antibióticos. Los estudios han encontrado relación entre cepas adquiridas en hospital (SAMR-H) y *SCCmec*: I, II y III mientras que las cepas de *S. aureus* adquiridas en la comunidad: (SAMR-C) contienen los cassettes IV y V. Sin embargo, se reportan variantes^{12,13}.

Existen diferentes métodos para el estudio de *SCCmec* como son: mapeo por PCR de complejo *mec*, complejo *ccr* y región *j* o la determinación de la secuencia de fragmentos internos de los genes recombinantes¹².

TIPIFICACION DEL PERFIL DE GENES DE TOXINAS

SAMR tiene diferentes tipos de toxinas. Los genes de las enterotoxinas se encuentran codificados en islas de patogenicidad. Los genes de la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV) se encuentran en bacteriófagos y se transfieren entre linajes. Estos perfiles genéticos de las toxinas se usan para tipificar cepas de SAMR. Se ha encontrado diferentes perfiles toxigénicos de SAMR según el área geográfica^{12,13}.

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

Se recomienda la PCR múltiple para la detección de toxinas de SAMR. Es una técnica reproducible, fácil de interpretar y con un alto grado de discriminación, útil para estudiar la diversidad cromosómica y la evolución histórica de SAMR¹².

3. JUSTIFICACIÓN

En el Instituto Nacional de pediatría se ha logrado recolectar aislamientos de *S. aureus* en el periodo de los últimos 8 años. Se observa con preocupación cómo el aumento de SAMR se ve reflejado también en nuestro medio, no solo a nivel hospitalario, sino también a nivel comunitario. En la actualidad, la sensibilidad de *S. aureus* en el segundo semestre de 2013 reporta 61% de sensibilidad a oxacilina y 56% de sensibilidad a clindamicina; sin embargo, en años recientes se llegó alcanzar resistencias alrededor del 70% y recientemente se ha notado su descenso. Desconocemos la frecuencia de SAMR a nivel hospitalario y comunitario, su mortalidad y sobretodo los genotipos prevalentes. Ante éste contexto sólo conocer a detalle la epidemiología de las infecciones por *S. aureus*, permitirá cuantificar el problema a nivel local en relación a los patrones de resistencia y co-resistencia, así como sino generará información con respecto a las características de la población infantil afectada por los diferentes genotipos y suscitara la inquietud con respecto a generar conductas para mejorar el uso indiscriminado de antibióticos y propondrá estudios posteriores para conocer portación de casetes cromosómicos, así como factores de patogenicidad de los genotipos más frecuentes en el Instituto Nacional de Pediatría.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los datos con respecto a resistencia de *S. aureus* en América Latina son limitados, se describen clonas resistentes desde 1990 en Brasil, Argentina, Chile, Colombia, México y Paraguay con diversos perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos. En México se ha identificado de forma aislada, una mayor frecuencia de la clona Nueva York/Japón⁹. En México no se tiene un registro del número de infecciones graves ni de mortalidad asociada a infecciones por SAMR-C ni SAMR-H. La información que se posee proviene de estudios aislados⁹.

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

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

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Cuál es la epidemiología de las infecciones por *Staphylococcus aureus* aislados en pacientes con en el Instituto Nacional de Pediatría?, ¿Cuál es la frecuencia de SAMR adquirido en la comunidad?, ¿Cuál es el patrón de co-resistencia para otros antibióticos?, ¿Cuáles son los genotipos más frecuentes en estas infecciones?

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Describir la presentación clínica y los diferentes genotipos *S. aureus* de los aislamientos clínicos obtenidos en pacientes pediátricos en el Instituto Nacional de Pediatría en el periodo de 2006-2008.

6.2 Objetivos Específicos

1. Describir las características (edad, sexo y comorbilidades) de los pacientes en los que se obtuvo aislamientos de *S. aureus* en hemocultivo.
2. Conocer la prevalencia y distribución de *S. aureus* de origen comunitario como hospitalario y aquellos con riesgo de adquisición hospitalaria.
3. Conocer la distribución de los diferentes genotipos de *S. aureus*.
4. Describir la distribución de los diferentes genotipos de *S. aureus* aislados según los diferentes servicios hospitalarios.
5. Describir los diversos patrones de resistencia a meticilina de los *S. aureus* (SAMS y SAMR, VISA, hVISA, VRSA), así como los patrones sugestivos de co-resistencia.
6. Analizar la relación clonal de los aislamientos de *S. aureus* a través de PFGE.

7. CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

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

8. POBLACIÓN DE ESTUDIO: Pacientes pediátricos (0-18 años) que fueron ingresados en el Instituto Nacional de Pediatría en el periodo 2006-2008, en que se documentaron aislamientos de *S. aureus* en hemocultivos.

9. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Aislamiento de *S.aureus* en hemocultivos que se encuentre conservada, así como los expedientes de dichos pacientes (0-18 años) en que fue aislado el *S. aureus* en el periodo de estudio mencionado.

10. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

Pacientes cuyo aislamiento no se encuentre conservado. Pacientes con más de 2 microorganismos en sus aislamientos de hemocultivos. Expedientes clínicos que no cuenten con la información necesaria para el análisis.

11. UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El Instituto Nacional de Pediatría, en Ciudad de México es el sitio de estudio en el cual se recolectarán los aislamientos de hemocultivos con *S. aureus* así como los expedientes respectivos de los pacientes con toda la información acerca de ésta infección clínica confirmada por éste microorganismo. En el Laboratorio de Bacteriología se realizó la identificación bacteriana a través de cultivos bacteriológicos, pruebas bioquímicas correspondientes, asimismo se realizaron pruebas automatizadas de susceptibilidad antimicrobiana, mientras que en el Laboratorio de Microbiología Molecular (Virología en Investigación= de la torre de Investigación del mismo INP, se realizó la confirmación molecular de presencia del gen *mecA* y se realizó la tipificación de los aislamientos por campos pulsados en gel de agarosa (PFGE).

12. MATERIALES Y MÉTODOS

En ésta cohorte retrospectiva se revisarán todos los registros de hemocultivos positivos para *S. aureus* en del periodo 2006-2008 así como los expedientes correspondientes a éstos niños de 0-18 años, ingresados en el INP, incluyendo sólo los pacientes con bacteriemia confirmada por dicho microorganismo, sin importar si tenían otros focos infecciosos asociados por el mismo microorganismo.

De la información de los registros de muestras de hemocultivo central: Catéteres percutáneos, implantables, cortos, así como de hemocultivos periféricos, se extraerá datos como: fecha de toma de hemocultivo y sensibilidad antibiótica de *S. aureus* por

antibiograma. Este registro se revisará de forma consecutiva. No se incluirá el análisis de otras muestras positivas para *S. aureus* de forma simultánea a los hemocultivos en un mismo paciente, como pueden ser los aislamientos obtenidos de las siguientes muestras biológicas: orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), secreciones purulentas varias (heridas, infecciones cutáneas-piel y tejidos blandos, infecciones osteoarticulares, líquido pleural, líquido peritoneal), cualquier dispositivo de implantación quirúrgica (prótesis cardíacas-articulares-óseas, válvulas de derivación ventricular).

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

Se analizará el patrón de resistencia a oxacilina a través de métodos automatizados, así como se evaluará la co-resistencia a clindamicina, Rifampicina y TMP-SMX. Estas resistencias se evaluarán de acuerdo a los valores de las CIM (concentraciones inhibitorias mínimas) para antibióticos descritos, registrado en el reporte del sistema Microscan (Dade-Behring) e interpretadas según guías de *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2006-2008* ^{14,15}.

Se revisará los registros de la resistencia a metilicina, evaluada por medio de método fenotípico de disco de cefoxitina de 30 µg con lectura de patrón sensible si halo de restricción es ≥ 22 mm y patrón resistente si halo es < 21 mm y la detección molecular por PCR de gen *mecA*, que confirma dicha resistencia a oxacilina con la presencia de éste.

Si hay un patrón con resistencia a oxacilina, clindamicina, Trimetoprim- Sulfametoxazol (TMT-SMX) y/o otros antibióticos (de forma simultánea): Sugiere co-resistencia asociada a casetes cromosómicos hospitalarios como son (I-III).

Si hay un patrón de resistencia a oxacilina pero sensibilidad a algunos de los demás antibióticos: clindamicina, TMT-SMX, entre otros sugiere patrón de co-resistencia asociada a casetes cromosómicos pequeños como son los comunitarios: (IV-VI).

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

Teniendo en cuenta las definiciones de estudios previos y de *Infectious Diseases Society of America (IDSA)*⁴ establecidas, se definirá si los pacientes presentan una infección por *S. aureus* y se clasificará según los criterios ya descritos en el marco teórico, si se trata de una Infección asociada al cuidado de la salud, una infección adquirida en la comunidad o una infección adquirida en la comunidad con factores de riesgo hospitalarios.

Se registrará la información consignada en el registro de Laboratorio de Bacteriología Clínica del INP, con respecto a pruebas para *S. aureus*, como son: evaluación morfológica macroscópica en medios con agar sangre, la definición del tipo de hemólisis del medio, evaluación microscópica por tinción de Gram, detección de sensibilidad a oxacilina con disco de cefoxitina o de oxacilina, pruebas bioquímicas como: test de coagulasa (*S. aureus* es un microorganismo positivo para la reacción de coagulasa). Pruebas

moleculares: PCR para detección de *mecA*, cuya presencia confirma la resistencia a oxacilina y la Identificación del microorganismo en hemocultivos por el método automatizado Bact/Alert (Biomerieux) y detección de sensibilidad antimicrobiana a través del sistema Microscan (Dade-Behring), con interpretaciones de las sensibilidades antibióticas basado en las guías de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2006-2008)¹⁴.

Los métodos moleculares que se emplearán será la PCR para detección de *mecA*, mientras que para la tipificación genotípica de los aislamientos sanguíneos de *S. aureus* será la electroforesis en gel de campos pulsados ¹⁵. La cual se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Molecular (Laboratorio de Virología en Investigación) en la Torre de Investigación del INP.

La técnica de electroforesis de campos pulsados en gel de agarosa se llevará a cabo por medio de los pasos siguientes¹⁶. Cambiar a formato de artículo, revisar aspectos metodológicos

- Inoculación de una única colonia de *S. aureus* en agar BHI . Se incuba los cultivos a 35-37°C.
- Preparar agarosa Seaken Gold 1.8% en TE buffer. Poner en baño caliente 65 C
- Ajustar la suspensión de BHI a la lectura de Microscan 1,1 a 1,3
- Transferir 200 µL de la suspensión celular al tubo de microcentrifuga
- Centrifugar a 13000 por 35 minutos.
- Aspirar el sobrenadante
- Resuspender en 300 µL de buffer TE y equilibrar tubos en 37° C de baño caliente por lo menos por 15 minutos.
- Adicionar 4 µL de lisostatina a la suspensión celular. Se mezcla vigorosamente en vortex la solución
- Adicionar 300 µL de agarosa al 1.8% a la suspensión y mezclar con pipeta
- Disponer en los pozos
- Refrigerar por 10 minutos
- Remover los bloques y poner en tubos que contengan 3 ml de EC buffer lisis
- Incubar a 37° C por 4 horas en horas de la noche
- Vaciar y remplazar con 4 ml de amortiguador TE . Poner en rotador por 30 minutos.

- Lavar el bloque 3 veces más con amortiguador TE
- Reservar el bloque a 4 C en buffer TE.

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

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

13. DEFINICION OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

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

Adquisición	Si la infección se adquirió en la comunidad o en el centro hospitalario, registrado en el expediente clínico o si es comunitaria pero con factores de riesgo hospitalarios.	Cualitativa nominal	Comunitaria (COM):1 Con factor de riesgo hospitalario: (FRH):2 Hospitalario (HOSP): 3.
Sitio de aislamiento en infecciones de catéter y en otras localizaciones.	Se consideró una abreviatura para aislamiento de hemocultivo periférico o central o de ambos así mismo como se consideró si se hizo diagnóstico de infección asociada a catéter ya sea por tiempo diferencial y/o por evidencia clínica de bacteriemia asociada con uso de catéter. Se asignó abreviatura para otros sitios de aislamientos diferentes al sanguíneo, *aunque no serán analizados sus resultados en esta fase del estudio.	Cualitativa nominal.	0: HC: Aislamiento de Hemocultivo periférico. Infección no relacionada a catéter 1: HCC: Aislamiento de hemocultivo central. Infección relacionada a catéter 2:HCPC: Aislamiento de hemocultivo central y periférico. Infección relacionada a catéter 3.SEC: SECRECCIÓN 4.ATB: Aspirado traqueo-bronquial
Relación de infección sanguínea con catéter	Se definió como afirmativo o negativo la relación con infección de torrente sanguíneo por <i>S. aureus</i> asociada a catéter. Si es por tiempo diferencial, si creció 2 horas antes en catéter central con respecto a catéter periférico, si se obtuvo > 15 u.f.c de <i>S. aureus</i> en punta de catéter más hemocultivo periférico positivo y/o si se presentó signos de bacteriemia asociados a uso de catéter.	Categoría Nominal Categoría nominal	Relación a catéter 1: si 2: no Relación a catéter 1: si 2: no
Expresión de gen <i>mecA</i>	Expresión de gen <i>mecA</i> , el cual se relaciona con resistencia a oxacilina.	Categoría nominal	0: no expresa <i>mecA</i> 1: expresa <i>mecA</i> .
Expresión de co-resistencia	Clasificación inferida según interpretación clínica de la CIM para antibióticos descritos registrado en el reporte de Microscan (Dade Behring) Si hay un patrón con resistencia a oxacilina y clindamicina, TMT-SMX y otros antibióticos: Se infiere co-resistencia asociada a casete cromosómico hospitalario. Si hay un patrón de resistencia a oxacilina pero sensibilidad a clindamicina, TMT-SMX y/o otros antibióticos se confiere patrón de co-resistencia asociada a casetes cromosómicos comunitarios.	Cualitativa ordinal	Corresistencia patrón comunitario (CoRx- C):0 Corresistencia patrón hospitalario (CoRx-H):1
Identificación del aislamiento	Nombre del género y especie del microorganismo aislado con base al patrón bioquímico que permite la identificación de la especie bacteriana, con pruebas de sensibilidad realizadas con disco de oxacilina o cefoxitin y pruebas de sensibilidad automatizadas, Información registrada en las bitácoras del Laboratorio de Bacteriología Clínica	Cualitativa nominal	<i>S.aureus</i> meticilinosensible (SAMS):1 <i>S.aureus</i> meticilinoresistente (SAMR):2
Muestra biológica	Muestra biológica de la cual se realiza el aislamiento y que se encuentra registrado en las bitácoras del laboratorio de Bacteriología Clínica del INP. ** Se analizará sólo la información relacionada a las muestras de hemocultivos.	Cualitativa nominal	Hemocultivo Central (HC-C) Hemocultivo Periférico (HC-P)

Tipo de infección	<p>El diagnóstico clínico de la infección con la que cuenta el paciente según limitación de proceso infeccioso a órgano-espacio específico o diseminación sistémica, registrado en el expediente clínico.</p> <p>*** Para efectos de éste estudio se tomó como criterio de inclusión los aislamientos de pacientes con bacteriemia (infección invasiva) independiente de la existencia de otros focos infecciosos, como los que aquí se mencionan, ya sean localizados o invasivos.</p>	Cualitativa nominal	<p>***Localizada, no invasiva (N.I): 0</p> <p>Infección urinaria (IU) Neumonía (N) Neumonía complicada (NC) Neumonía asociada a ventilador (NAV) Herida quirúrgica (HX) Infección de piel y tejidos blandos (PTB)</p> <p>***Invasiva (I): 1</p> <p>Bacteriemia (B) Catéter (CAT) Peritonitis (P) Osteomielitis (OS) Infección de Sistema Nervioso Central (SNC)</p>
Severidad de la Infección	Se considera de forma afirmativa si hay presencia de complicaciones o desenlace: muerte del paciente y negativa en caso contrario.	Cualitativa nominal	<p>1: no 2: si</p>
Susceptibilidad a Oxacilina (OXA)	Interpretación clínica de la CMI registrado en el reporte de hemocultivo automatizado con sensibilidad antimicrobiana a través del sistema Microscan (Dade-Behring).	Cualitativa ordinal	<p>0: Sensible: S 1: Intermedio: I 2: Resistente: R</p>
Susceptibilidad a Trimetoprim Sulfametoxazol (TMT)	Interpretación clínica de la CMI registrado en el reporte de hemocultivo automatizado con sensibilidad antimicrobiana a través del sistema Microscan (Dade-Behring).	Cualitativa ordinal	<p>0: Sensible: S 1: Intermedio: I 2: Resistente: R</p>
Susceptibilidad a Clindamicina (CLD)	Interpretación clínica de la CIM registrado en el reporte de hemocultivo automatizado con sensibilidad antimicrobiana a través del sistema Microscan (Dade-Behring).	Cualitativa ordinal	<p>0: Sensible: S 1: Intermedio: I 2: Resistente: R</p>
Susceptibilidad a Rifampicina (RIF)	Interpretación clínica de la CIM registrado en el reporte de hemocultivo automatizado con sensibilidad antimicrobiana a través del sistema Microscan (Dade-Behring).	Cualitativa ordinal	<p>0: Sensible: S 1: Intermedio: I 2: Resistente: R</p>
Susceptibilidad a Ciprofloxacina (CPF)	Interpretación clínica de la CIM registrado en el reporte de hemocultivo automatizado con sensibilidad antimicrobiana a través del sistema Microscan (Dade-Behring).	Cualitativa ordinal	<p>0: Sensible: S 1: Intermedio: I 2: Resistente: R</p>
Susceptibilidad a Amikacina (AMK)	Interpretación clínica de la CIM registrado en el reporte de hemocultivo automatizado con sensibilidad antimicrobiana a través del sistema Microscan (Dade-Behring).	Cualitativa ordinal	<p>0: Sensible: S 1: Intermedio: I 2: Resistente: R</p>
Susceptibilidad a Tigeciclina (TIG)	Interpretación clínica de la CIM registrado en el reporte de hemocultivo automatizado con sensibilidad antimicrobiana a través del sistema Microscan (Dade-Behring).	Cualitativa ordinal	<p>0: Sensible: S 1: Intermedio: I 2: Resistente: R</p>
Susceptibilidad a Vancomicina (VAN)	Interpretación clínica de la CIM registrado en el reporte de hemocultivo automatizado con sensibilidad antimicrobiana a través del sistema Microscan (Dade-Behring).	Cualitativa ordinal	<p>0: Sensible: S 1: Intermedio: I 2: Resistente: R</p>
Servicios	Servicio en el que se localiza el paciente en el momento de la toma de muestra para hemocultivo, registrado en el expediente clínico.	Cualitativa nominal	<p>1 Infectología 1. Urgencias 2. Oncología 3. Neurología 4. Cardiología 5. GN 6. Hematología 7. Cirugía 8. Endocrino 9. Neonatología 10. UTIP 11. Inmunología</p>

Diagnóstico base	Se consideró diagnósticos más comunes, se agruparon de forma categórica y se les asignó un número.	Cualitativo nominal	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sano 2. Neurológico 3. Cardiopatía 4. Oncológico 5. LES 6. Sx Kawasaki 7. Anemia Aplásica 8. Endocrino 9. CMV congénito 10. Qx Abdominal 11. ID1a 12. Metabolopatía
Complicaciones	Se describen los principales eventos de mal estado clínico y hemodinámico así como diseminación a otros órganos, asociados con infección sistémica por <i>S. aureus</i> .	Cualitativa Nominal	<ol style="list-style-type: none"> 1: Sepsis 2. Sepsis grave 3. Choque séptico 4. Falla multiorgánica FMO 5. Neumonía 6. Embolos sépticos 7. Endocarditis
Desenlace	Es el estado clínico al final de la hospitalización, corresponde a curación de infección o en caso contrario muerte asociada a esta. Se considera ítem de muerte no relacionada con evento infeccioso principal por <i>S. aureus</i> como un evento diferente.	Categórica Nominal	Desenlace: 0: curación 1: muerte 2: MNoRI: muerte no relacionada

14. TAMAÑO DE LA MUESTRA

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

15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

16. CONSIDERACIONES ETICAS

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

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

17. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

	Enero 2014- Febrero 2014	Marzo 2014 – Abril 2014	Mayo 2014 – Junio 2014	Julio 2014 – Agosto 2014	Sept 2014- Diciembre 2014	Diciembre 2014- Marzo 2015
Búsqueda Bibliográfica						
Diseño del protocolo						
Presentación para revisión y aprobación por comité académico						
Captación y registro de datos						
Análisis de resultados / Entrega						

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

18. FACTIBILIDAD

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

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

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

La información de los expedientes será revisada por residentes de Infectología pediátrica del INP y será analizada por adscritos infectólogos del mismo departamento.

19. RESULTADOS

En el primer periodo de estudio de 3 años (2006-2008), se obtuvieron en forma retrospectiva 47 hemocultivos no repetitivos con aislamientos de *S. aureus*, que fueron correlacionados con infección clínica en 47 pacientes hospitalizados en el INP. Todos los hemocultivos fueron detectados por el método automatizado Bact/Alert (Biomérieux) y se les realizó identificación y detección de sensibilidad antimicrobiana a través del sistema Microscan (Dade-Behring).

DETECCION FENOTIPICA-GENOTIPICA

Desde el punto de vista fenogenotípico se detectaron 22 aislamientos de *S. aureus* meticilinoresistente (SAMR), por contar con resistencia a oxacilina y corroborado por con la detección molecular del gen *mecA*; sin embargo, en uno de éstos aislamientos con resistencia a oxacilina (MIC >4 mcg/ mL) no se detectó el gen *mecA*, por lo que se consideró un falso positivo en el antibiograma. Se repitió su antibiograma, resultando meticilinosensible, por lo que se analizaron un total de 22 SAMR. De los 47 aislamientos, los 25 aislamientos restantes de *S. aureus* resultaron sensibles a oxacilina (SAMS), que fueron corroborados al no detectarse el gen *mecA*.

EPIDEMIOLOGÍA

De los 47 pacientes, 29 pacientes eran niños (62%) y 18 pacientes eran niñas (38%) (Tabla 3). Las edades de los pacientes se encontraron en un rango de 11 días a 16 años, con una mediana de 25 meses. De los pacientes con aislamientos de SAMS, 13 eran niños (52%) y 12 eran niñas (48%), mientras que los pacientes con aislamientos de SAMR, 16 eran niños (72%) y 6 eran niñas (27%) (Tabla 4). Al comparar las edades de los pacientes con SAMS y SAMR a través de la prueba de t de student, se encontró que los pacientes con SAMS tenían una media de edad de 76.8 meses (6.4 años), mientras que pacientes con SAMR mostraron una media de 43.09 meses (3.59 años), siendo esta estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$).

Tabla 3. Género de los pacientes con infección por *S. aureus*

GENERO	No. DE PACIENTES	PORCENTAJE
Masculino	29	61.7%
Femenino	18	38.3%
TOTAL	47	100%

Tabla 4. Género de los pacientes con infección por *S. aureus* según fenotipo

GENERO	MASCULINO	%	FEMENINO	%	TOTAL
SAMS	13	52%	12	48%	25 (100%)
SAMR	16	72%	6	27%	22 (100%)
TOTAL	29	62%	18	38%	47 (100%)

De los pacientes con SAMS, 10 aislamientos eran de origen comunitario, 7 tenían factores de riesgo para adquisición hospitalaria y 8 correspondían a aislamientos de origen nosocomial, siendo el servicio de oncología el que contó con el mayor número de aislamientos (n:3). Con respecto a los 22 aislamientos de SAMR, no se obtuvieron aislamientos de origen comunitario, 3 tuvieron factores de riesgo de adquisición hospitalaria y 19 fueron aislamientos de origen nosocomial, de éstos últimos, se

encontraron con mayor número de aislamientos en los servicios de cirugía general (n:8) e infectología (n:4) (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Clasificación de aislamientos según sitio de adquisición de *S. aureus*

FENOTIPO ADQUISICION	SAMS	SAMR	TOTAL
Comunitario	10	0	10
Con factores de riesgo hospitalario	7	3	10
Hospitalario	8	19	25
Total	25	22	47

Tabla 6. Distribución de los diferentes servicios donde se encontraron los aislamientos de *S. aureus* adquiridos hospitalariamente

SAMS hospitalario: 8			SAMR hospitalario: 19		
Infectología	2	Clona NR: 2	Infectología	5	Clona I: 3
					Clona II: 1
					Clona III: 1
			Urgencias	2	Clona NR: 1
Oncología	3	Clona NR: 1			Clona II: 1
		Clona IV: 1	Oncología	1	Clona I: 1
		Clona IX: 1	Cardiología	2	Clona II: 2
Cardiología	2	Clona VI: 1	Gastronutrición	1	Clona NR: 1
		Clona NR: 1	Hematología	1	Clona II: 1
			Cirugía	4	Clona I: 2
Endocrinología	1	Clona NR: 1			Clona II: 1
					Clona V: 1
			Endocrinología	1	Clona II: 1
			UTIP	2	Clona NR: 1
					Clona I: 1
TOTAL	8	8	TOTAL	19	19

UTIP: Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica

ASPECTOS CLÍNICOS

Patología de Base

1. SAMS. De los 25 pacientes con infecciones por SAMS, sólo 4 de ellos eran previamente sanos y 21 (84%) contaban con alguna patología de base. Los principales diagnósticos de base relacionados fueron: 11 pacientes con diagnósticos oncológicos (52%), de ellos, la mitad era leucemias agudas; 3 pacientes contaban con cardiopatía y dos de ellos contaban con algún padecimiento neurológico de base.

2. SAMR. De los 22 pacientes con SAMR, ninguno de ellos era previamente sano, y de las patologías de base, también el diagnóstico oncológico era el más frecuente (23%), mientras que los pacientes con diagnóstico neurológico y cirugía abdominal eran los segundos más frecuente con 4 pacientes cada uno (Tabla 7).

Tabla 7. Diagnósticos de base y su relación con patrones clonales de *S. aureus*

SAMS		
Previamente sano	4	Clona NR: 3 Clona VI: 1
Neurológico	2	Clona NR: 1 Clona X: 1
Cardiológico	3	Clona NR: 1 Clona VI: 2
Oncológico	11	Clona NR: 5 Clona IV: 3 Clona IX: 2 Clona X: 1
LES	1	Clona NR: 1
Anemia aplásica	1	Clona NR: 1
Endocrinológico	1	Clona NR: 1
Inmunodeficiencia primaria	1	Clona IX: 1
Metabolopatía	1	Clona NR: 1
TOTAL	25	25

SAMR		
Neurológico	4	Clona I: 1 Clona II: 1 Clona III: 1 Clona V: 1
Cardiológico	3	Clona NR: 1 Clona I: 1 Clona II: 1
Oncológico	5	Clona NR: 1 Clona I: 2 Clona II: 2
LES	1	Clona III: 1
Sx. Kawasaki	1	Clona II: 1
Anemia aplásica	1	Clona NR: 1
Endocrinológico	2	Clona I: 1 Clona II: 1
CMV congénito	1	Clona II: 1
Cirugía abdominal		Clona I: 3 Clona II: 1
	22	22

LES: Lupus Eritematoso Sistémico / CMV: Citomegalovirus

Infección Relacionada a Catéter

1. SAMS. De los 25 pacientes con aislamientos de SAMS, 9 de ellos presentaron infección relacionada al catéter (36%), de los cuales 78% fueron de adquisición hospitalaria, mientras que los 2 aislamientos restantes (22%) contaron con factores de riesgo hospitalario. No se presentaron muertes asociadas a bacteriemia en los 9 casos. Aunque se reportaron 2 muertes asociadas a bacteriemia en el grupo de SAMS, ninguna de ellas se relacionó a infección del catéter.

2. SAMR. De los 22 pacientes con aislamientos de SAMR, 18 pacientes (82%) tuvieron una infección relacionada a catéter, 16 de dichas infecciones fueron de adquisición hospitalaria (89%), mientras que el 11% tuvo factores de riesgo de adquisición hospitalaria. En el grupo de SAMR relacionado a catéter, se registraron 4 fallecimientos (22%) todos siendo de adquisición hospitalaria, y un fallecimiento adicional en este grupo que no se relacionó a catéter (Tabla 8).

Tabla 8. Muertes y relación con infección asociada a catéter y patrones clonales.

SAMS				SAMR			
Muertes relacionadas a bacteriemia	Infección relacionada a catéter	0	0	Infección relacionada a catéter	4	Clona I: 2	Clona II: 1
	Infección no relacionada a catéter	2	Clona NR: 1		Infección no relacionada a catéter	1	Clona NR: 1
Clona IV: 1							
TOTAL		2	2				5
Muertes no relacionadas a bacteriemia	Infección relacionada a catéter	0	0	Infección relacionada a catéter	0	0	0
	Infección no relacionada a catéter	1	Clona NR: 1	Infección no relacionada a catéter	0	0	0
TOTAL		1	1		0	0	0

NR: No relacionado

Complicaciones y Mortalidad

De los 47 pacientes con bacteriemia por *S. aureus*, 19 de ellos (40%) presentaron alguna complicación y 8 pacientes fallecieron, de los cuales 7 fueron asociados a la bacteriemia (15%).

1. SAMS. De los pacientes con aislamientos de SAMS, 8 presentaron complicaciones (32%), siendo la sepsis, sepsis severa y choque séptico las más frecuentes en este grupo; 2 pacientes presentaron émbolos sépticos. De este grupo fallecieron 2 pacientes, que representa el 25% de mortalidad de los casos complicados, pero el 8% del total de pacientes con SAMS. Los 2 fallecimientos fueron secundarios a choque séptico refractario, uno de ellos asociado a varicela y choque tóxico.

2. SAMR. Con respecto a los pacientes con aislamiento de SAMR, 11 presentaron complicaciones (50%), la sepsis, sepsis severa y choque séptico fueron también las más frecuentes en este grupo; uno de los pacientes presentó endocarditis con émbolos sépticos secundarios, mientras que un paciente presentó neumonía. En este grupo se presentó un mayor número de muertes, con un total de 5, que representa un 23% de las infecciones totales por SAMR y 45% de los casos complicados por SAMR. De los pacientes fallecidos, 3 cursaron con choque séptico y uno con falla orgánica múltiple, mientras que otro falleció a causa de endocarditis y émbolos sépticos (Tablas 9 y 10).

Tabla 9. Complicaciones y relación con patrones clonales.

SAMS			Muerte relacionada a bacteriemia	SAMR			Muerte relacionada a bacteriemia
Sepsis			3	Sepsis			3
Sepsis	2	Clona NR: 2		Sepsis	2	Clona II: 2	
Sepsis + émbolos	1	Clona NR: 1		Sepsis+ émbolos + endocarditis	1	Clona I: 1	1
Sepsis severa			2	Sepsis severa			3
Sepsis severa	1	Clona IX: 1		Sepsis severa	2	Clona I: 2	
Sepsis severa + émbolos	1	Clona NR: 1		Sepsis severa + neumonía	1	Clona V: 1	
Choque séptico			3	Choque séptico			4
Choque séptico	1	Clona NR: 1	1	Choque séptico	1	Clonal: 1	1
	1	Clona IV: 1			3	Clona II: 3	2
Choque séptico + tóxico	1	Clona IV: 1	1				
				Falla multiorgánica			1
				1	Clona NR: 1		1
TOTAL		8	2	TOTAL		11	5

NR No relacionado

Mortalidad y tratamientos

1.SAMS: Se presentaron 2 casos de muerte asociados a bacteriemia por *S. aureus*, 1 de ellos, con tratamiento oportuno desde 1 día antes de aislamiento, pero fallece a los 2 días de éste. En el segundo caso si se evidencia inicio de tratamiento a los 3 días de aislamiento, lo que sumado a varicela de base, provoca complicación y avance rápido de bacteriemia por *S. aureus*, con muerte del paciente el día del inicio del esquema antibiótico.

2. SAMR: De los 5 casos de muerte asociados a bacteriemia por SAMR, 2 iniciaron tratamiento tardíamente, a los 5 días de aislamiento, de éstos 2 casos uno falleció a los 9 días de inicio de tratamiento, lo que podría esperarse por el retraso del inicio del esquema y el otro falleció mucho tiempo después, por la infección asociada a sus comorbilidades y

por ser una endocarditis con complicaciones. En otro caso el paciente no recibió el tratamiento idóneo para SAMR y muere 3 días luego de aislamiento. Dos de los pacientes restantes recibieron tratamiento el día del aislamiento y otro desde un día antes y sin embargo todos fallecieron, lo que infiere la letalidad de su infección. (Tabla 10).

Tabla 10. Características de los pacientes fallecidos por bacteriemia por *S. aureus*

	Edad	Género	Enf. de base Foco infeccioso	Adquisición	Res. a clóster	Antibiótico al Inicie	Ajuste de AB posterior al tratamiento	Complicación	Días transcurridos desde el aislamiento hasta la muerte	Clona
SAMS	15 a	M	Seno	Comunitaria Infectología	No	DCX CEFO	DCX CEFO	Choque séptico	1	NR
	4 a	M	Oncológico Varicela	Riesgo hospitalario Infectología	No	MER AMK	CLD	Choque séptico y tóxico	2	IV
SAMR	4 m	F	Cardiológico Neumonía	Hospitalaria Cardiología	No	CLD CEFO	TEICO	Choque séptico	7	II
	14 m	M	Endocrino IRC	Hospitalaria Infectología	SI	CPX	MERO VAN/TEICO (15)	Sepsis Endocarditis Embolos	38	I
	12 a	M	Oncológico IRC	Hospitalaria UTIP	SI	CPX METRO	MERO VAN (5)	FMO	14	NR
	3 a	M	Oncológico IRC	Hospitalaria Hematología	SI	CTX DCX VAN (1)	VAN	Choque séptico Embolos	1	II
	2 a	M	Cirugía Abdominal IRC	Hospitalaria Cirugía	SI	CTX CLD	MERO AMK	Choque séptico	4	I

IRC: Insuficiencia renal crónica, FMO: Falla multiorgánica, DCX: Diclloxacilina, CLD: Clindamicina, VAN: Vancomicina, CEFO: Cefotaxime, TEICO: Teicoplanina
CPX: Ciprofloxacino, AMK: Amikacina, CTX: Ceftriaxona, METRO: Metronidazol NR: No relacionado
USAR ABREVIATURAS SUGERIDAS POR EL CLSI

CO-RESISTENCIAS DE *S. aureus* A OTROS ANTIBIÓTICOS

A los 47 aislamientos de *S. aureus*, se les realizó susceptibilidad antimicrobiana a través del sistema Microscan (Dade-Behring) para otros antibióticos diferentes a oxacilina, como son: clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX), rifampicina y vancomicina.

1. SAMS. De los 25 aislamientos de SAMS, 21 de ellos (84%) no presentaron co-resistencia a los otros antibióticos mencionados. Se encontró resistencia intermedia a clindamicina en 3 aislamientos, los cuales no presentaron resistencia a ningún otro antibiótico, de éstos, 2 fueron de adquisición comunitaria y uno con factores de riesgo para infección hospitalaria. Se documentó curación en los 3 casos. Se obtuvo además un aislamiento resistente a clindamicina, pero sin resistencia a otros antibióticos, el cual fue de adquisición comunitaria, pero se asoció a choque séptico y fallecimiento. No se detectó resistencia intermedia (VISA / CMI >4 µg/mL) ni total a vancomicina (VRSA / MIC >16 µg /mL) en ninguno de los aislamientos.

2. SAMR. De los 22 aislamientos de SAMR, sólo un aislamiento (5%) no contaba con co-resistencia mientras que el resto tenía algún patrón de co-resistencia. La co-resistencia más frecuentemente encontrada fue a la clindamicina en 21 de los aislamientos (95%). 17 de los aislamientos presentaron resistencia a clindamicina de forma aislada (81%), mientras 3 presentaron resistencia a clindamicina y TMP-SMX (14%), mientras que un aislamiento tuvo resistencia a clindamicina y rifampicina. Ningún aislamiento presentó una co-resistencia a los 3 antibióticos. No se detectó resistencia intermedia (VISA / MIC >4 µg /mL) ni total a vancomicina (VRSA / MIC >16 µg /mL) en ninguno de los aislamientos (Tabla 11).

Tabla 11. Patrones de Co-resistencia en *S. aureus*

Co-RESISTENCIA	SAMS	Patrón clonal	SAMR	Patrón clonal
Sin co-resistencia	21	0	1	Clona NR : 1
Resistencia a Clindamicina y Rifampicina	0	0	1	Clona III : 1
Resistencia a Clindamicina y TMP-SMX	0	0	3	Clona I: 1 Clona II: 1 Clona V : 1
Resistencia completa a Clindamicina	1	Clona NR: 1	17	Clona I : 7 Clona II: 7 Clona III: 1 Clona NR: 2
Resistencia intermedia a Clindamicina	3	Clona NR: 1 Clona VI: 1 Clona IX: 1	0	
TOTAL	25	4	22	22

TMP-SMX: Trimetoprim-Sulfametoxazol. NR: no relacionado

CLONALIDAD.

Los 47 aislamientos de *S. aureus* se sometieron a electroforesis en gel en campos pulsados (PFGE), de los cuales 30 aislamientos (64%) se clasificaron en 8 patrones clonales distintos, mientras que 17 aislamientos (36%) no pudieron agruparse en alguno de los patrones clonales, por lo que fueron nombrados como NR (No relacionado). Las clonas VII y VIII (previamente identificadas en nuestro laboratorio) no fueron encontradas en aislamientos tanto de SAMS como SAMR.

1. SAMS. De los 25 aislamientos de SAMS, 14 no se relacionaron a un patrón electroforético (56%) y 3 pertenecieron a la clona IV (12%), 3 a la clona VI (12%), 3 a la clona IX (12%) y finalmente 2 a la clona X (8%) (Tabla 12). De los 8 aislamientos de SAMS de pacientes que presentaron complicaciones, no hubo relación clonal en 5 de ellos (62%), mientras 2 aislamientos, correspondieron a la clona IV (25%) y un aislamiento a la clona IX (13%) (Tabla 9 y 10).

2. SAMR. De los 22 aislamientos de SAMR, solamente 3 aislamientos (14%) no tuvieron relación clonal. Las clonas predominantes fueron la clona I y la clona II con 8 (36%) aislamientos, respectivamente, la clona III con 2 (9%) aislamientos y la clona V con un aislamiento (5%) (Tabla 12). De los 11 aislamientos de SAMR de pacientes que presentaron complicaciones, 10 de ellos se agrupaban en algunas de las clonas (91%), mientras que sólo un aislamiento no tuvo relación clonal. De las clonas identificadas, predominó la clona II con 5 aislamientos (50%), la clona I con 4 aislamientos (40%) y la clona V con un solo aislamiento (10%) (Tabla 9 y 10).

Tabla 12. Clasificación de patrones clonales según origen de adquisición de *S. aureus*

ADQUISICIÓN	SAMS	SAMR
COMUNITARIA	CLONA NR: 5	-
	CLONA VI: 2	-
	CLONA IX: 1	-
	CLONA X: 2	-
FACTORES DE RIESGO HOSPITALARIO	CLONA NR: 4	CLONA I: 1
	CLONA IV: 2	CLONA II: 1
	CLONA IX: 1	CLONA III: 1
HOSPITALARIA	CLONA NR: 5	CLONA NR: 3
	CLONA IV: 1	CLONA I: 7
	CLONA VI: 1	CLONA II: 7
	CLONA IX: 1	CLONA III: 1
		CLONA V: 1

20. DISCUSIÓN.

Las infecciones por *S. aureus* son de gran importancia clínica dada las altas tasas de complicaciones y mortalidad asociada. En décadas recientes ha sido notable el incremento de SAMR a nivel hospitalario y más recientemente el incremento de SAMR a nivel comunitario^{1,17}. Por ejemplo, en EUA se ha reportado un alarmante incremento de SAMR comunitario de un 2% a un 64% en 30 años⁹. A nivel hospitalario, el *S. aureus* es el segundo coco Gram positivo más frecuentemente aislado después de los *Staphylococcus* coagulasa negativos. La frecuencia de resistencia a meticilina depende de la epidemiología local de cada hospital, oscilando entre un 50-80%⁹. Según datos de la red de vigilancia de USA, la proporción de infecciones del torrente sanguíneo por *S. aureus* causadas por MRSA, aumentó de 27 % durante 1990-1994 a 54 % en el periodo 2000-2004¹⁸. La resistencia a meticilina para *S. aureus* comunitarios depende de la región y ubicación geográfica. En México hay muy poca información de los patrones de susceptibilidad para SAMR comunitarios. En este estudio se recopiló en forma retrospectiva 47 aislamientos en hemocultivos con *S. aureus*, de los cuales 22 (47%) correspondieron a SAMR, mientras 25 (53%) fueron SAMS. Como dato relevante es que en el periodo de dichos aislamientos (2006-2008), ninguno de los aislamientos de SAMR fue de adquisición comunitaria (SAMR-C), es probable que con el transcurso de los años pueda incrementar la aparición del mismo, dada la transición epidemiológica que se ha observado en algunos países^{1,17}. Como era de esperarse el 86% de los SAMR fueron de

adquisición hospitalaria (SAMR-H), mientras que el 14% de los pacientes contaban con factores de riesgo para adquisición hospitalaria (catéteres, colonización, etc.). En el caso de los aislamientos de SAMS sabemos que predominan a nivel comunitario, pero también pueden aparecer a nivel hospitalario, dada la colonización permanente y transitoria de los pacientes y personal de salud, siendo muchas de estas infecciones derivadas de la colonización endógena¹⁹. En el presente estudio se encontró que el 40% de los aislamientos de SAMS fueron de adquisición comunitaria, 28% contaban con factores de riesgo para adquisición hospitalaria y 32% de adquisición hospitalaria en el INP. A nivel internacional se describe aproximadamente que el 60% de los aislamientos de *S. aureus* hospitalario, tanto en unidades de adultos como pediátricas corresponden a SAMR en EUA; en más de la mitad de los países en América Latina y Asia llega a superar el 50%, mientras que en países Europeos como España, Francia e Italia se aproxima al 30%^{1,20}. Varios estudios en hospitales de tercer nivel en México de 1980 a la fecha, reportan una prevalencia de SAMR hospitalario entre 7-30% y en un estudio reciente en un hospital de tercer nivel en Guadalajara, Jalisco, donde se recolectaron aislamientos de *S. aureus* por 2 años (2009-2011), se encontró una prevalencia SAMR del 65%²⁰.

En relación al género y la edad de presentación de bacteriemia por *S. aureus*, el género masculino predominó en 62%, pero se eleva al 72% para aquellos con SAMR. Del total de pacientes con *S. aureus* presentaron una mediana de 2 años (rango 11 días - 16 años). Al realizar la comparación a través de la *t* de Student, se encontró que la media de edad para pacientes con SAMS era de 6 años, mientras que para el grupo de pacientes con SAMR eran más pequeños, mostrando una media de 4 años, resultando esto estadísticamente significativo. En la literatura existen datos muy heterogéneos al respecto, pero la mayoría coincide en que las infecciones nosocomiales invasoras por SAMR-H se presentan predominantemente en niños menores de un año de edad (incidencia de 14.7 por 100,000 frente a ≤ 1 por 100,000 en niños mayores). De la misma forma, en un estudio retrospectivo en un Hospital de Beijing, en el que se incluyeron 59 pacientes, se encontró que más del 80% de los niños con SAMR, independientemente de su lugar de adquisición eran menores de 3 años, el 22% eran neonatos⁵. En un estudio griego prospectivo, donde se incluyeron niños entre 0-14 años con infecciones comunitarias, los aislamientos de SAMS se encontraron en niños con edad promedio de 6 años con respecto a 5 años en los pacientes con SAMR-C, sin encontrar significancia estadística²¹.

Al analizar si los pacientes contaban con alguna patología de base, se encontró que el 84% de los casos con SAMS tenían alguna enfermedad subyacente, y el grupo de enfermedad predominante fue la oncológica en un 52%. Mientras que para los pacientes con SAMR todos tenían alguna enfermedad de base. Esta conclusión coincide con la literatura mundial, en la que se que reporta que los pacientes con SAMR, suelen tener más comorbilidades asociadas²².

La frecuencia de complicaciones fue de 40% (SAMS 32% y SAMR 50%) con una mortalidad del 15% (SAMS 8% y SAMR 23%). Al calcular la razón de momios (OR), se encontró que los pacientes con aislamientos de SAMR tienen 2.1 veces mayor riesgo de complicaciones y 3.2 veces más riesgo de muerte, con respecto a los pacientes con SAMS. En estos casos, los amplios intervalos de confianza que pasan por valor nulo se deben al bajo número de aislamientos en éste estudio. La mortalidad global asociada a

bacteriemia fue de 7 pacientes (15%), un paciente adicional falleció, pero no asociado a bacteriemia. De los pacientes que presentaron complicaciones por SAMS el 25% falleció, mientras que para aquellos con SAMR el 45% falleció. La mortalidad por bacteriemia por MRSA a nivel mundial oscila entre el 30-65%, mientras que en nuestro estudio la mortalidad fue del 23%, este hecho puede atribuirse a la muestra pequeña de 47 pacientes incluidos¹. El mayor riesgo de muerte es respaldado por un meta-análisis de 31 estudios que comparaban pacientes adultos con bacteriemia por SAMS y SAMR, encontrándose un mayor riesgo de 1.93 veces (IC 95% 1.54-2.42) por SAMR en relación a SAMS (p .001)²³. El 57% de todas las bacteriemias por *S. aureus* se relacionó a infección de catéter (36% de los SAMS y 82% de los SAMR), siendo este parámetro también estadísticamente significativo.

De los 25 aislamientos de SAMS, la mayoría (84%) no presentaron co-resistencia a otros antibióticos, solamente 4 aislamientos (16%) presentaron co-resistencia a clindamicina (3 con resistencia intermedia y un aislamiento resistente). No hubo un patrón de clonalidad predominante en estos aislamientos, siendo 2 NR y un aislamiento respectivamente para clonas VI y IX. En un estudio israelí donde se capturaron 240 aislamientos de SAMS en pacientes pediátricos, el 26% tenía resistencia a clindamicina, la cual se relacionó al fago 2 en 62% de los casos²⁴. En otro estudio en los EUA también se ha documentado un incremento importante en la resistencia a clindamicina, de un 3 a un 11% en un periodo de tan solo 3 años²⁵.

Como era de esperarse, el 95% de los aislamientos de SAMR presentaron co-resistencia, principalmente a clindamicina. De los 21 SAMR resistentes, predominó la resistencia a clindamicina en todos aislamientos, 17 de ellos con resistencia aislada a clindamicina, 3 resistentes a clindamicina y TMP+SMX, mientras que un aislamiento con resistencia a clindamicina y rifampicina. Esta co-resistencia mayor en SAMR puede ser explicado por el tipo de casetes cromosómicos esperados en los aislamientos hospitalarios (casetes tipo I, II, III)⁶, sin embargo uno esperaría una mayor co-resistencia a otros antibióticos como TMP-SMX y rifampicina, por lo que también se podría generar una hipótesis de que estos aislamientos de SAMR correspondan a clonas de SAMR-C infiltradas a nivel hospitalario; esto podrá corroborarse en un estudio posterior en que se analicen los patrones de casetes cromosómicos en estos aislamientos. Está reportado que la incidencia de SAMR-C ha aumentado en el medio hospitalario, encontrándose una frecuencia muy variable entre 16-73% de los aislamientos de SAMR hospitalarios, correspondientes a la clona USA 300, que portan casetes cromosómicos IV y V que son más pequeños y que se asocian a la portación de leucocidina Panton-Valentine^{1,26}. De los 17 aislamientos de SAMR con co-resistencia aislada a clindamicina, se asociaron predominantemente a clonas I (n=7) y II (n=7), mientras que 2 aislamientos fueron NR y un solo aislamiento correspondió al patrón clonal III. Llama la atención que adicionalmente se encuentran dos aislamientos con patrón clonal I y II con un aislamiento cada uno que cuentan con co-resistencia a TMP-SMX, esto pudiera representar la adquisición de un gen de resistencia a TMP-SMX en forma adicional.

Dado a que no se obtuvieron aislamientos de SAMR de origen comunitario no se pudo analizar la co-resistencia en ellos, en donde se esperarían patrones de co-resistencia menor dado a que los casetes cromosómicos suelen ser más pequeños (IV y V) y hay menos posibilidad de alojar otros genes de resistencia.

No se detectó resistencia intermedia (I) a Vancomicina (MIC ≥ 4 mcg/mL) ni total (R) a Vancomicina (MIC ≥ 16 μ g/mL) en ninguno de los 47 aislamientos, lo que concuerda con lo inusual y la alarma epidemiológica que implicaría, ya que solo existen 17 aislamientos de VRSA en el mundo (13 en USA, 1 en Portugal, 1 en India, 1 en Irán y 1 recientemente documentado en Brasil)²⁷.

Con respecto a la clonalidad, de los 47 aislamientos de *S. aureus*, 30 (64%) tenían un patrón clonal específico mientras 36% tenían un patrón clonal no relacionado (NR). De los aislamientos de SAMS, 14 (56%) no pertenecieron a alguna clona y de los restantes, las clonas más frecuentes fueron IV, VI y IX contando cada una de ellas con 3 aislamientos, representando 12% cada una del total de SAMS, cabe mencionar que las clonas VI y IX son de adquisición hospitalaria o en pacientes con factores de riesgo para adquisición hospitalaria pero al ser aislamientos de SAMS, sugiere ser cepas propias del huésped. La clona X aportó 2 aislamientos adicionales, los cuales fueron claramente adquiridos en la comunidad.

De los 22 aislamientos de SAMR, 3 de ellos (14%) no tuvieron relación clonal y 19 (86%) tuvieron una clara clonalidad, siendo las clonas I y II, cada una con 8 aislamientos (36%) del total de los aislamientos de SAMR, la clona III tuvo 2 aislamientos, mientras que la clona V uno solo. Las clonas I y II generaron mayores complicaciones, la clona II el 50% de los casos y la clona I en el 40%, falleciendo 2 pacientes en cada grupo clonal. No hubo una distribución específica de las clonas predominantes en los diferentes servicios del hospital, lo que apoya una distribución heterogénea y circulación endógena de las clonas I y II. Es importante resaltar que hay una clara división entre los patrones clonales detectados tanto en SAMS (IV, VI, IX y X) como en SAMR (I, II, III y V). Los patrones clonales de todos estos aislamientos serán comparados posteriormente con clonas de referencia (cepas ATCC) para estandarizar su clasificación internacional basado en PFGE (PulseNet, con patrones USA 100 a USA 1100).

Si bien los estudios de tipificación molecular de *S. aureus* a través de PFGE en México han sido pocos, se ha reportado en adultos en la frontera de México, al sur de Texas, clonas: USA 100, USA 300, USA 600, lo cual se atribuye a uso de antibióticos sin receta así como a selección y transferencia horizontal de los mecanismos de resistencia entre las bacterias. Se ha encontrado además una clona propia de México, la clona (M) con un SCC mec IV, resistente a penicilina, oxacilina y gentamicina, la cual predominó entre 1997 y el año 2000 y desde el 2002, la clona internacional Nueva York / Japón con SCC mec tipo II que la desplazó en los últimos años^{9,17,28}.

21. PERSPECTIVAS

Se incrementará el número de aislamientos de *S. aureus*, para que la colección sea más representativa, sobre todo al poder incluir aislamientos de años más recientes (2009-2014), para así poder observar si ha habido alguna transición epidemiológica entre SAMS y SAMR, así como la participación de SAMR-C que no fue encontrado en este estudio. Además se identificará las clonas específicas de los diversos SAMR en base a patrones electroforéticos internacionales. En un estudio posterior se analizarán los diferentes patrones de SCC para los aislamientos de SAMR.

22. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stryjewski ME, Corey RC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An evolving pathogen. *Clinical Infectious Diseases* 2014; 58(Suppl 1):S10-19.
2. Jurado J, Cantero P, Rivero A, Kindelán J.M. Infecciones por estafilococos. Sección de enfermedades infecciosas. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. Programa de formación médica continuada acreditado. 2002; 8(62):3305-3308.
3. Barberán J, Menéndez M, del Valle M. Infecciones por estafilococo. Clasificación, factores predisponentes, aspectos patogénicos de relevancia clínica o diagnóstica, manifestaciones clínicas y formas de comienzo. Servicio de Enfermedades infecciosas. Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla. Madrid. España.
4. Kaplan SL, Hultén KG, González BE, Hammerman WA. Six-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. *The 45th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America*. 2007, October 4-7; San Diego, CA.
5. Quiao Y, Dong F, Song W, Wang L, Yang Y, Shen X. Hospital and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 6 year surveillance study of invasive infections in Chinese children. *Acta Pediátrica*. 2013;102; 1081-1086.
6. De Colsa AR. *Staphylococcus aureus*: De la genómica a la clínica. *Revista de Enfermedades infecciosas en Pediatría*. 2011; Enero-Marzo: Vol XXIV. Num 95; 91-94
7. From the Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*—Minnesota and North Dakota, 1997–1999. *JAMA*. 1999; 282: 1123–1125.
8. Tavares R, Goyanna T, Nunes N, Meneses R, Barberino M, Nascimento C. Methicillin-resistant and methicillin-susceptible community-acquired *Staphylococcus aureus* infection among children. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2013; 17(5): 573-578.
9. Miranda MG. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. *Boletín Médico Hospital Infantil de México*. 2011; 68(4): 262-270.

10. Márquez RA, Alvarez MI, Escobar JA, Leal AL, Castro BE, Mariño AC, Barrero ER, et al. USA 300-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone is the predominant cause of community and hospital MRSA infection in Colombian children. *International Journal of Infectious Diseases*. 2014; 25: e88-e93.
11. Carrillo Márquez MA, Hulten KG, Hammernan W, Lamberth L, Mason EO, Kaplan SL. *Staphylococcus aureus* pneumonia in the era of community-acquired methicillin-resistance at Texas Children's Hospital. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2011; 30: 545-550.
12. Mehndiratta PL, Bhalla P. Typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a technical review. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2012; (30)1: 16-23.
13. Palavecino EL. Clinical, epidemiologic and laboratory aspects of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Methicillin-resistant S. aureus (MRSA) protocols. Methods in molecular biology*. 2014; vol 1085.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CSLI document, PA: CSLI. 2006-2014.
15. Procedimiento de Laboratorio: Manual de Sistema de Detección de sensibilidad antimicrobiana *Microscan (Dade-Behring)* 2006; p 1-23.
16. Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* on PulseNet (OPN): Laboratory protocol for molecular typing of *S. aureus* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Department of Health and Human Services centers for disease control and prevention*. p. 2-24.
17. Velásquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* metiliclorresistente. *Salud Pública de México*. 2005; 47(5): 381-387.
18. Dancer SJ. Importance of the environment in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning. *Lancet Infectious Diseases*. 2008; 8:101-13.
19. Styers D, Sheehan DJ, Hogan P, Sahn DF. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. *Annals of Clinical Microbiology Antimicrobials*. 2006; 5(2): 1-9.

20. Borbón EM, Villaseñor A, Martínez E, Uregui J, Villaseñor R, Ruiz M. SCC mec types and pvl gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from children hospitalized in a tertiary care hospital in México. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2014; 46: 523-527.
21. Niniou I, Vourli S, Lebessi E, Foustoukou M, Vatopoulos A, Pasparakis D.G, Kafetzi A and Tsolia M.N. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children in central Greece. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*. 2008; 27: 831-837.
22. McNeil J. *Staphylococcus aureus*: antimicrobial resistance and the immunocompromised child. *Infection and Drug Resistance*. 2014; 7: 117-127.
23. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with Methicillin-Resistant and Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: A Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 36:53-59.
24. Shouval DS, Samra Z, Shalit I, Livni G, Bilvasky E, Ofir O, Gabda R and Amir J. Inducible clindamycin resistance among methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* infections in pediatric patients. *The Israel Medical Association Journal*. 2011; 13: 605-608.
25. Kaplan SL, Hultén KG, González BE, Hammerman WA, Lamberth L, Versalovic J, Mason Jr EO. Three year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. *Clinical Infectious Diseases*. 2005; 40: 1785-91.
26. Hultén KG, Kaplan SL, Lamberth L, Slimp K, Hammerman W, Carrillo-Marquez M et al. Acquired *Staphylococcus aureus* infections at Texas Children's Hospital. *Infection control and Hospital Epidemiology*. 2010; 31(2): 183-190.
27. Rossi F, Díaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincón S et al. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *New England Journal of Medicine*. 2014; 370(16):1524-1531.
28. Rodríguez-Noriega E, Seas C, Guzmán-Blanco M, Mejía C, Alvarez C, Bavestrello L et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010; 14(7): E560-E566.

23. ANEXOS

23.1 HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

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

Iniciales del paciente:	Expediente:			Sexo:	
Fecha de nacimiento: dd/mm/aa				Edad:	
Fecha de ingreso: dd/mm/aa				Días de EIH al aislamiento:	
Fecha de aislamiento:				Servicio:	
Adquisición de infección:	Comunitaria	FRH	Hospitalaria	Dx:	
Otros focos infecciosos					
Tratamiento Antibiótico:	1.	2.	3.	4.	
Fecha de inicio de antibiótico: dd/mm/aa	Cambio antibiótico luego de aislamiento: SI : cuál? NO	Duración (días):	Comorbilidades:		
Infección asociada a catéter: SI: / NO:	Complicaciones: - SI : cuál? - NO	Severidad de infección: - SI - NO	Desenlace: - Curación - Muerte asociada a infección - Muerte no asociada a infección		

Microorganismo aislado:		Presencia de mecA				No. identificación		
		SI: SAMS: / No:SAMR:						
Perfil de susceptibilidad								
Antibiótico	CIM (µg/mL)			Interpretación				
Oxacilina								
TMP-SMX								
Clindamicina								
Rifampicina								
Tigeciclina								
Vancomicina								
PATRONES CLONALES PFGE								
Clona I	Clona II	Clona III	Clona IV	Clona V	Clona VI	Clona IX	Clona X	Clona NR