

DETECCION DE *Staphylococcus aureus* EN PERSONAL MEDICO-
QUIRURGICO DE LA UNIDAD DE CARDIOLOGIA EN EL HOSPITAL
UNIVERSITARIO SAN IGNACIO (HUSI)



SILVIA KATHERINE PINEDO DELGADO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar al título

BACTERIÓLOGA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

CARRERA DE BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ, JUNIO DE 2015

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N°13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.”

DEDICATORIA

“En primera instancia a Dios por guiarme e iluminar el mejor camino en mi vida, a la memoria de mi abuelita, ha sido mi mayor razón de llevar a cabo este proyecto, a mi madre, es el motor de mis sueños y mis metas, por su amor incondicional y dedicación constante, quiero compartir este trabajo a todas las demás personas que me acompañaron y fueron constantes durante mi carrera.”

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a mi directora de trabajo, Marylin Hidalgo, que con toda su experiencia y conocimiento me brindó su colaboración y continuo apoyo para culminar la realización de este proyecto. Gracias por su colaboración, apoyo, comprensión y por ser una mujer ejemplar para muchos de nosotros.

A la PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN IGNACIO (HUSI), quienes financiaron la totalidad del proyecto y facilitaron la realización del proyecto colaborándonos con la aprobación de la toma de muestra al personal médico y la realización del estudio.

AL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA ESPECIALIZADO Y AL LABORATORIO DE MICOLOGIA, que permitieron la realización de ensayos para el proyecto, por medio del préstamo de sus instalaciones.

Contenido

1. Resumen	8
2. Introducción	9
3. Planteamiento del problema y justificación	11
4. Marco Teórico	15
4.1 Agente etiológico: <i>Staphylococcus aureus</i>	15
4.2 Generalidades de colonización e historia	16
4.3 Resistencia mediada por betalactamasas	18
4.3.1 Resistencia mediada por Betalactamasas	19
4.3.2 Fenómeno de tolerancia	19
4.3.3. Resistencia intrínseca	19
4.4 métodos para la detección de resistencia a meticilina.	22
4.4.1 Difusión en disco de Oxacilina y Cefoxitina.	22
4.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
4.4.3 Otros métodos.	26
4.5 Principio del Procedimiento de PCR en tiempo real.	27
4.5.1 Sensibilidad	27
4.5.2 Especificidad	28
4.6. Realización del Procedimiento qPCR BD MAX	28
4.7. Realización del Procedimiento qPCR ROCHE	32
5. Objetivos	35
Objetivo general	35
Objetivos específicos	35
6. Propuesta metodológica	37
6.1. Diagrama de Flujo General	40
7. Resultados	42
8. Discusión de resultados	47
9. Conclusiones	52
10. Bibliografía	53
11. Anexos	58

TABLA DE FIGURAS

FIGURA 1. COLONIAS B-HEMOLÍTICAS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> EN MEDIO AGAR SANGRE.	15
FIGURA 2. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO QUE ILUSTRA LA FORMA EN <i>S. AUREUS</i> ADQUIERE RESISTENCIA A LA METICILINA Y SU CAPACIDAD PARA EXPRESAR DIFERENTES FACTORES DE VIRULENCIA.	20
FIGURA 3 ORGANIZACIÓN MOLECULAR DE LA REGIÓN MEC EN EL CROMOSOMA DE <i>S. AUREUS</i> (FUENTE: CHAMBERS HF, 1997).	21
FIGURA 4: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE DISCOS DE OXACILINA Y CEFOXITINA, TOMADA EN LAS INSTALACIONES DEL LAB. DE BACTERIOLOGÍA ESPECIALIZADA DE PUJ.	23
FIGURA 5A: PCR DE PUNTO FINAL. B: PCR EN TIEMPO REAL (FUENTE: LAB. BACTERIOLOGÍA ESPECIAL PUJA).	24
FIGURA 6 FASES DE LA REACCIÓN DE PCR (FUENTE: APPLIED BIOSYSTEMS).	25
FIGURA 7 CARACTERÍSTICAS DE UNA GRÁFICA DE AMPLIFICACIÓN EN TIEMPO REAL (FUENTE: APPLIED BIOSYSTEMS).	26
FIGURA 8 ÁGAR CROMOGÉNICO (FUENTE: MALHOTRA-KUMAR S, 2010).	27
FIGURA 9 SNAP BD MAX™MRSA EXTRACTION TUBES AND MASTER MIX TUBES INTO REAGENT STRIPS.	29
FIGURA 10 CARTUCHOS DE LE LECTURA DE PCR.	30
FIGURA 11 ESTANTE DE CARGA (S) EN EL SISTEMA BD MAX™.	31
FIGURA 12 KIT EMPLEADO PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA.	33
FIGURA 13 EQUIPO DE ROCHE UTILIZADO PARA LA QPCR.	33
FIGURA 14 IMAGEN REPRESENTATIVA DE QPCR POSITIVA.	34
FIGURA 15 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL DIAGRAMA DE FLUJO CON EL PROCEDIMIENTO REALIZADO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>S. AUREUS</i> EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA ESPECIAL.	40
FIGURA 16 COMPARACIÓN DE TÉCNICAS UTILIZADAS CON GOLD ESTÁNDAR.	44
FIGURA 17 ESTADO PORTADOR DEL PERSONAL MÉDICO QUIRÚRGICO.	45
FIGURA 18 NIVEL DE EFECTIVIDAD DE LA PROFILAXIS UTILIZADA.	45
FIGURA 19 IDENTIFICACIÓN GRÁFICA MRSA POSITIVO EN EL CANAL 640.	58
FIGURA 20 COMPARACIÓN CONTROL NEGATIVO VS POSITIVO PARA MRSA EN CANAL 640.	59
FIGURA 21 CRECIMIENTO EN AGAR MANITOL Y EN AGAR SANGRE POSITIVO.	60
FIGURA 22 REPRESENTACIÓN DE SENSIBILIDAD CON DISCOS DE OXACILINA.	60
FIGURA 23 IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE PRUEBAS PILOTO REALIZADAS Y CONFIRMADAS.	61
FIGURA 24 REPRESENTACIÓN GRÁFICA PCR CONVENCIONAL.	62
FIGURA 25 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE UN RESULTADO POSITIVO Y NEGATIVO DE QPCR BD MAX.	63

1. Resumen

Staphylococcus aureus, es un microorganismo Gram positivo, considerado como un patógeno capaz de causar diferentes infecciones a cualquier tipo de pacientes.

Cepas como lo son SAMR (*S.aureus meticolino resistente*) son resistentes a un amplio rango de agentes antimicrobianos, nuevas cepas de SAMR se han convertido en importantes agentes capaces de causar numerosos infecciosos en humanos.

Estudios previos en países europeos han mostrado una prevalencia de *S.aureus* y *S.aureus* meticolino resistente del 9.6 y 11.6% respectivamente en personal médico que incluye enfermeras y médicos quirúrgicos. Nuestro estudio buscó la detección de *S.aureus* en personal médico quirúrgico de la unidad de cardiología en el hospital universitario San Ignacio (HUSI).

Para realizar el estudio se seleccionó a todo el personal médico quirúrgico de la unidad de cardiología. A cada miembro se le tomó dos hisopados nasales de ambas narinas, las muestras fueron sometidas a extracción de DNA y posterior al análisis por PCR en tiempo real adicionalmente se utilizaron métodos convencionales para la identificación y la detección de la resistencia a la meticolina.

Se pretende con la prueba de PCR en tiempo real amplificar e identificar en menor tiempo la colonización de *S.aureus* meticolino resistente en personal médico quirúrgico de la unidad de cardiología en comparación con los método tradicionales empleados.

2. Introducción

Staphylococcus aureus es considerado como uno de los patógenos con mayor capacidad de ocasionar diferentes infecciones en cualquier tipo de pacientes. *S.aureus* se considera la especie más virulenta del género de *Staphylococcus*.

Entre el 20 y 25% de la población sana esta colonizada persistente o transitoriamente por este tipo de microorganismo. La mayoría de las infecciones causadas por *S.aureus* son de tipo endógeno, es decir que se originan por las cepas que colonizan el individuo enfermo. Sin embargo este tipo de microorganismo puede ser adquirido también de una fuente exógena como lo son procedimientos quirúrgicos y /o procedimientos diagnósticos

S.aureus meticilino resistente (SAMR) se asocia a infecciones nosocomiales logrando demostrar que en los hospitales y clínicas la tasa de colonización por SAMR representa el 25% de los aislamientos de *S.aureus*, siendo aún más alta en hospitales de alta complejidad y en determinadas áreas críticas como lo son en unidad de cuidados intensivos (UCI) o en sales de cirugía cardiovascular. (1)

En la actualidad se considera que *S.aureus* es la segunda causa de bacteriemia en Latinoamérica y en Europa la primera en infecciones intrahospitalarias como lo es endocarditis (2)

La bacteriemia más frecuente por *S.aureus* en el medio hospitalario son las de origen nosocomial, habitualmente asociadas a catéteres vasculares relacionadas con la asistencia y el rol del personal hospitalario como reservorio y transmisor de cepas de *S. aureus* de persona a persona y de paciente a paciente y en otros casos pacientes que sufren una enfermedad de base como diabéticos insulino dependientes y los sometidos a hemodiálisis que predisponen

aún más al paciente de padecer una bacteriemia, considerando que *S.aureus* está involucrado en endocarditis infecciosa posterior a procesos quirúrgicos (3), en consecuencia, la población médica se considera el reservorio con mayor fuente de contagio y la primera causa de propagación de colonización por *S.aureus*, por el contacto directo con los pacientes y por las malas prácticas higiénicas como el lavado de manos con el fin de evitar posterior colonizaciones a los pacientes.

El personal médico como enfermeras, anesthesiólogos y médicos quirúrgicos son considerados como el principal reservorio y por lo tanto un fómite importante para la propagación y colonización de nuevos pacientes, actualmente la colonización oscila en la actualidad entre (9.6-11.6%) a nivel mundial, y es considerado como un verdadero peligro para el desarrollo de cuadros clínicos infecciosos en pacientes intervenidos (4)

Por ello, para mejorar los pronósticos del desarrollo de cuadros clínicos infecciosos es necesario erradicar el foco de infección que limita posteriores infecciones o colonizaciones.

El objetivo de este estudio es identificar la colonización por *Staphylococcus aureus*, en hisopados nasales del personal médico de cirugía cardiovascular en el hospital universitario San Ignacio (HUSI) de la ciudad de Bogotá

3. Planteamiento del problema y justificación

La resistencia antimicrobiana se ha convertido en una amenaza significativa para la Salud Pública, microorganismos como la de *Staphylococcus aureus* son de particular interés debido a su alta virulencia y resistencia frente a diferentes antibióticos (5); desde 1880 se ha reconocido a este microorganismo como uno de los principales agentes causantes de diferentes infecciones en piel y tejidos blandos, con tasas de mortalidad cerca del 50% (6) especialmente en individuos inmunocomprometidos con la característica principal que *S. aureus* es un agente que se disemina fácilmente (7)

La frecuencia de infecciones nosocomiales y de la comunidad, producidas por *Staphylococcus*, se ha elevado en las últimas dos décadas a nivel mundial según la OMS, quien pone en manifiesto que este microorganismo se ha convertido en una grave amenaza para la salud pública (8). Adicional, se han considerado que diversos factores como: terapias ineficientes, estadías hospitalarias prolongadas, reingresos, hemodiálisis, catéter vascular, entre otros hacen que los pacientes sean más propensos a adquirir infecciones complicando la terapia antibiótica (9)

Actualmente, se conoce que en la población general sana puede existir un 20% de portadores persistentes de *S. aureus*, un 60% de portadores intermitentes, y un 20% restante de no portadores (10).

Para ser colonizado se requiere un contacto con el microorganismo por medio de fómites o el contacto directo con una persona infectada (11)

En la actualidad el contacto que tiene más impacto en la colonización es el del rol del personal hospitalario como reservorio y transmisor de cepas de *S. aureus* de persona a persona y de paciente a paciente (12)

Por otra parte, la frecuencia de portadores nasales entre el personal médico en diferentes hospitales de Latinoamérica y Europa oscila entre el 4.6 a 5.1% (13). En un estudio realizado en personal de salud de Hospitales de Nicaragua, la frecuencia de portadores nasales de SARM fue del 11,6% en España, el 5.6% en Nicaragua. (14)

De acuerdo a esto en el ámbito hospitalario, la búsqueda activa y la descolonización de portadores sanos de SAMR, proporcionan una nueva alternativa en la salud de los pacientes, visitantes o trabajadores asistenciales como lo son médicos y/o enfermeras. Los pacientes hospitalizados constituyen el reservorio fundamental con altas tasas de prevalencia, el personal asistencial colonizado por cepas SAMR se puede convertir en fuente importante de infección para los pacientes más susceptibles y, en especial, en la unidad de cirugía cardiovascular, ya que en diferentes revisiones han demostrado que este ha sido un importante foco para generar endocarditis post-quirúrgica.(14) Por lo tanto, la vigilancia epidemiológica y las medidas de control son importantes para prevenir la transmisión por *S.aureus*. Las medidas utilizadas incluyen higiene rigurosa de manos y superficies, control de contactos, descubrimiento de portadores, control de la difusión aérea y por fômites, y búsqueda de la fuente de infección (15).

De esta manera, dada la importancia de este patógeno a nivel mundial y en nuestro medio, al ser uno de los principales agentes causantes de infección en la comunidad e infección y mortalidad nosocomial, como lo es la endocarditis infecciosa posterior a procesos quirúrgicos (15), se hace oportuno evaluar la colonización nasal por *Staphylococcus aureus meticilino*

resistente, en el personal médico que ingresa al servicio de cirugía cardiovascular del Hospital Universitario San Ignacio (HUSI), de la Ciudad de Bogotá, ya que este grupo de individuos presenta un probable factor de riesgo para la diseminación de este microorganismo en el ámbito hospitalario, colonización de nuevos pacientes e inclusive el desarrollo de cuadros clínicos infecciosos en pacientes intervenidos.

CAPITULO I
MARCO TEORICO

4. Marco Teórico

4.1 agente etiológico: *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es coco Gram positivo, de crecimiento en forma de racimo, anaerobio facultativo, inmóvil, no forma esporas, coagulasa y catalasa positivo (15). Inmóvil que permanecen aislados o se agrupan en pares, cadenas o racimos en el cultivo; tienen un diámetro entre 0,5 y 1 mm, son anaerobios facultativos, fermentan el manitol, son capaces de crecer en un medio con una elevada concentración de sal y a temperaturas desde 18 a 40°C. Su Pared está compuesta por peptidoglucano asociado a ácidos teicoicos, mientras que la superficie está recubierta de la proteína A. Son colonias opacas, circulares, lisas, enteras y doradas, debido a los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento, de ahí el nombre de la especie. En agar sangre las colonias son grandes presentando una actividad hemolítica variable (16)

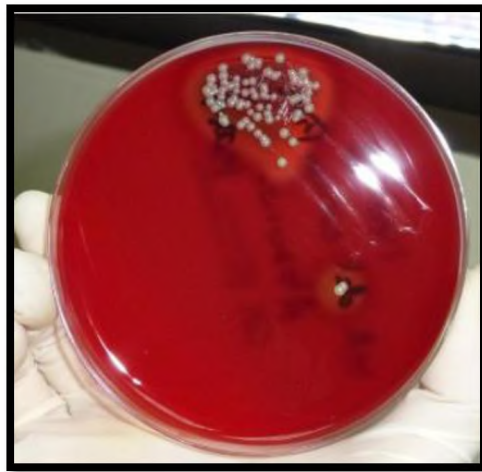


Figura 1. Colonias β -hemolíticas de *Staphylococcus aureus* en medio Agar sangre.
(Fuente: instalaciones lab. De microbiología hospital san Jorge).

Los factores de virulencia más importantes que poseen son: adhesina, catalasa, coagulasa, lipasas, hialuronidasa, estafilosinasa, nucleasa y toxinas como: la toxina alpha o hemolisina alpha, toxina beta o esfingomielinasa, toxina delta o hemolisina delta, toxina gamma o hemolisina gamma, leucocidina, enterotoxinas, exfoliatina y exotoxinas pirógenas (17.1)

Staphylococcus aureus es un agente etiológico de diversas patologías que se aísla con mayor frecuencia en las infecciones nosocomiales y comunitarias (2, 17.), presenta una patogenicidad variable que le permite causar desde infecciones, superficiales hasta infecciones con compromiso vital (endocarditis infecciosa posterior a procesos quirúrgicos, septicemias, meningitis, bacteremia, osteomielitis, síndrome de shock toxico, síndrome de piel escaldada, infección del SNC y del tracto genitourinario entre otros) (18).

4.2 Generalidades de colonización e historia.

La asociación de la colonización nasal por *Staphylococcus aureus* y la infección estafilocócica fue descrita por primera vez en la década de 1930 (18). Desde 1930, la epidemiología de *S aureus* ha cambiado dramáticamente, y *S aureus* resistente a la meticilina (MRSA) ha alcanzado niveles epidémicos relevantes en los hospitales y en la comunidad (19). Con la epidemiología cambiante de MRSA, múltiples estudios han confirmado la colonización nasal como un factor de riesgo para la infección subsiguiente, (20).

A través del tiempo se han encontrado por lo menos tres estados de portadores de nasales de *S. aureus* en individuos sanos: intermitentes, persistentes y no portadores. Estudios longitudinales han mostrado que cerca del 20% son portadores nasales persistentes,

aproximadamente 60% son intermitentes y cerca de un 20% son no portadores (17-18). De estos, el segundo grupo es el más propenso a ser colonizado por cepas de SAMR (18).

En una revisión de literatura se estimó que los portadores de *S. aureus* tienen 1.8 veces de mayor riesgo de desarrollar diferentes infecciones (19). En la actualidad se han identificado con mayor riesgo de adquirir infecciones posteriores en cirugía osteo-articular (19), cirugía cardíaca (20) y probablemente en otras cirugías con implante de material protésico. Resaltando que indiscutiblemente los grupos de individuos que tienen mayor riesgo de ser portadores son: a) diabéticos tratados con insulina, b) hemodializados crónicos, c) en diálisis peritoneal ambulatoria, d) adictos a drogas intravenosas, e) infección por VIH sida y/o rinosinosis crónica.

La evolución natural de las infecciones por *S.aureus* se pueden transmitir por personal externo como las enfermeras, médicos, otros profesionales de la salud o visitantes, principales focos para que se transmita este tipo de microorganismo y genere algún tipo de infección grave o leve al paciente que en ese momento se encuentra en hospitalización o se encuentra cursando por una intervención quirúrgica.

El principal nicho ecológico de *S. aureus* en humanos lo constituyen las fosas nasales anteriores, las cuales son fuentes potenciales de infección y un factor de riesgo elevado para subsiguientes infecciones invasivas (21). Se han registrado que las subsiguientes infecciones invasivas ocurren en personas que están colonizadas con esta bacteria (22) y han demostrado que *S. aureus*, en algunas ocasiones, puede tener una estrategia eficaz para evadir la respuesta inmune del hospedador y de esta forma sobrevivir en los tejidos, eludiendo la acción antibiótica y estableciendo así la infección crónica (23). Estudios y artículos publicados demuestran que las manos representan un factor importante en la transmisión de *S. aureus*

de la piel y mucosas a los pacientes, según investigaciones, el nivel de portación en el personal hospitalario es mayor que en la población en general. (23-24)

Las infecciones estafilocócicas muchas veces están asociadas a síndromes leves como foliculitis e intoxicaciones alimentarias, hasta otros de elevada mortalidad, como neumonía, endocarditis y síndrome de *shock* tóxico etc (24). En otros estudios, Se ha comprobado que la rasquiña nasal casi permanente induce a la autoinoculación en la cavidad nasal en pacientes atópicos (24-25). Debido a que *S. aureus* coloniza la piel y este continuo friccionado casi permanente induce su autoinoculación en la cavidad nasal es asociado como “estado de portador nasal de SAMR” (25).

Dados estos antecedentes que evidencian la importancia de este patógeno a nivel mundial y en nuestro medio, al ser uno de los principales agentes causantes de la infección en la comunidad y mortalidad nosocomial (26); se propone este estudio con el fin de generar prevención, realizando la búsqueda activa en el personal médico quirúrgico de la unidad de cardiología, cuyo reservorio se ha incrementado en los últimas décadas, y por el cual debe ser considerado como uno de los fómites con mayor riesgo para la infecciones subsiguientes.

4.3 Resistencia mediada por betalactamasas.

De acuerdo a la presencia de SARM en la comunidad y sitios hospitalarios, se describen en tres mecanismos de Resistencia de SARM a los β -lactámicos los cuales son: Mediada por β -lactamasas, fenómeno de Tolerancia y Resistencia Intrínseca. (27)

4.3.1 Resistencia mediada por Betalactamasas.

Staphylococcus aureus produce una enzima mayormente codificada por plásmidos, que inactiva el antibiótico mediante la apertura de su anillo betalactámico. Estas cepas producen altas cantidades de betalactamasa (Resistencia *Borderline*), hacen que la acción de la oxacilina y meticilina sea lenta. No presentan la PBP 2a, proteína transpeptidasa codificada por gen *mecA* (28)

4.3.2 Fenómeno de tolerancia

Staphylococcus aureus presenta una tolerancia a la acción bactericida de los antibióticos betalactámicos, corresponde a una modificación mínima de las PBPs (Proteínas transpeptidasas) 1, 2 y 4 con baja afinidad por este grupo de antibióticos. Al igual que el mecanismo anteriormente descrito, no contienen la PBP 2a (27)

4.3.3. Resistencia intrínseca.

Este mecanismo de resistencia también conocida como “Resistencia a la Meticilina”, se debe a la incorporación del gen *mecA* al ADN bacteriano del *S. aureus*, muy probablemente por la transferencia horizontal de las especies estafilococos coagulasa negativos, es determinante de la resistencia que agrupa a todos los betalactámicos. El gen *mecA* se localiza en un gran elemento genético de 30 a 40 kb, conocido como casete cromosómico (*SCCmec*), que codifica a una proteína ligadora de penicilina transpeptidasa PBP 2a (29)

La proteína PBP 2a, codificada por el gen *mecA*, con un peso de 78 kDa, posee baja afinidad y por consiguiente, resistencia a prácticamente todos los antibióticos betalactámicos. Esta proteína conserva su actividad transpeptidasa y carboxipeptidasa, contribuye a la síntesis de la pared celular, generando un peptidoglucano estable, mientras que las PBP 1, 2 y 3 son inactivados por los antibióticos betalactámicos (Figura 2) (Gerald, John et al. 2002, Hiramatsu, Katayama et al. 2002)

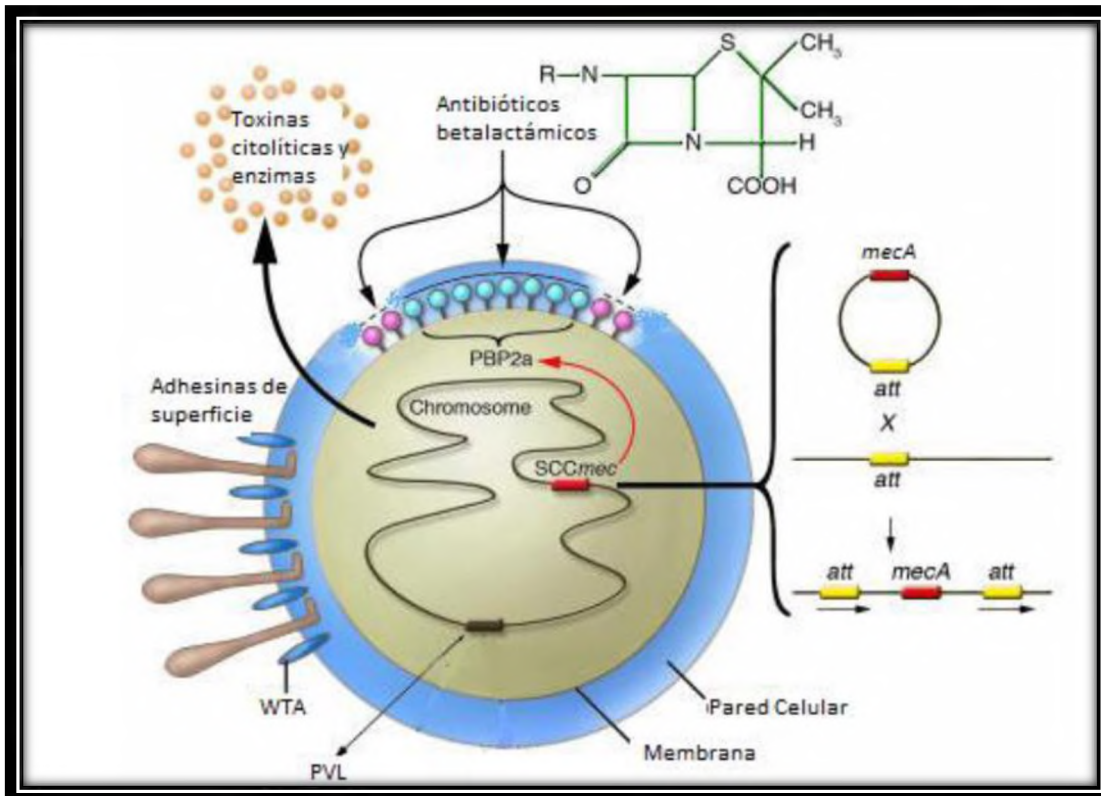


Figura 2. Diagrama esquemático que ilustra la forma en *S. aureus* adquiere resistencia a la meticilina y su capacidad para expresar diferentes factores de virulencia.

La bacteria expresa adhesinas de proteínas de superficie y de la WTA y también segrega muchas toxinas y enzimas por la activación de genes cromosómicos. El gen *mecA* codifica

una nueva proteína β -lactama insensibles a la penicilina vinculante, PBP2a. (Fuente: Timothy J. Foster, 2004).

El *Cassette* en el cromosoma *mec* de *Staphylococcus aureus* (*SCCmec*), se sitúa en un sitio específico del cromosoma bacteriano (*attBsc*), cerca del grupo de genes *pur-nov-his*. Existen genes regulatorios para el gen *mecA*, el *mecI* y *mecR*, el primero reprime la expresión del gen y el otro la conduce. Además de la existencia de cinco factores *fem* (factor esencial para la resistencia a la meticilina), que también regulan la expresión (Figura 3) (30)

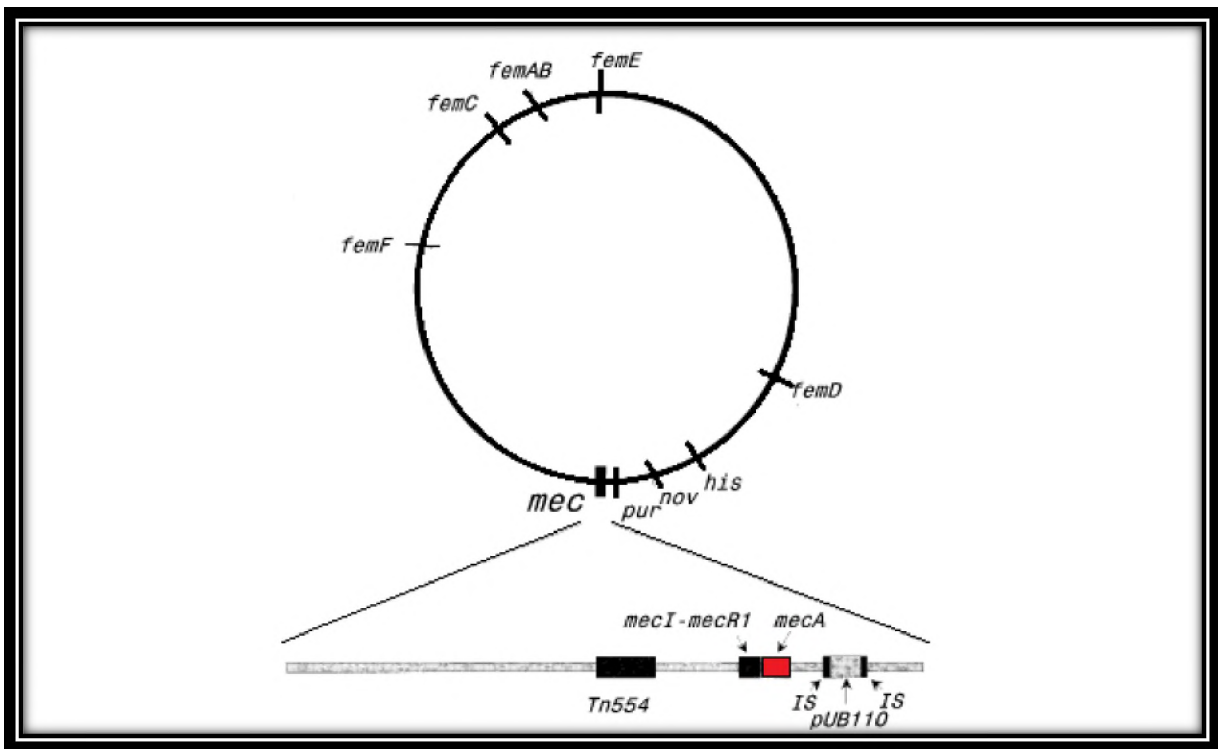


Figura 3 Organización molecular de la región *mec* en el cromosoma de *S. aureus* (Fuente: Chambers HF, 1997).

El *SCCmec* es capaz de liberar una variedad de diferentes determinantes de resistencia y virulencia, posee tres componentes genéticos esenciales: el complejo de genes *mec*

compuesto por el gen *mec A* y sus genes reguladores *mecRI* y *mecI*, el complejo de genes *ccr*, que codifica para recombinasas responsables de la movilización de *SCCmec*, y una región conocida como J (*Junkyard*), que puede contener plásmidos o transposones portadores de genes de resistencia a antibióticos no betalactámicos y a metales pesados(31)

4.4 métodos para la detección de resistencia a meticilina.

4.4.1 Difusión en disco de Oxacilina y Cefoxitina.

La detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) es potencialmente un problema usando la técnica de difusión en disco, debido a la expresión heterogénea de la resistencia a meticilina en varias cepas y a que la resistencia depende de las condiciones de crecimiento (32)

La oxacilina ha sido el antibiótico recomendado por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), para las pruebas fenotípicas de la predicción de la resistencia a las penicilinas por su estabilidad y sensibilidad. Sin embargo, la Cefoxitina, es un mayor potente inductor del sistema del gen *mecA*, ya que induce la producción de PBP2a y por tanto, los resultados reportados de la prueba de disco de difusión tienen mejor correlación con la presencia del gen *mecA*, que los resultados de la prueba de disco de difusión usando Oxacilina (33).

Según las normas CLSI, para la técnica de difusión en disco, debe ser en agar Mueller-Hinton, con una suspensión de colonias equivalente a 0,5 de McFarland e incubación de 24 horas. Para oxacilina, es sabido que la temperatura de incubación afecta los resultados, por tanto, como máximo la temperatura es de 35°C, se considera que *S. aureus* es sensible a la oxacilina cuando el halo de inhibición es mayor o igual a 24mm para un disco de oxacilina

de 1 μg . Mientras que para cefoxitina se ha encontrado alta precisión a temperaturas de incubación de 35°C a 37°C, se considera que *S. aureus* es sensible a la cefoxitina cuando el halo de inhibición es mayor de 20 mm para un disco de oxacilina de 30 μg (34).



Figura 4: representación gráfica de discos de oxacilina y cefoxitina, tomada en las instalaciones del lab. De Bacteriología especializada de PUJ

4.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR es una reacción química que permite la amplificación de un gen o de un fragmento de ADN, con los objetivos de disponer de la cantidad suficiente para utilizarlo con fines diversos, o bien, para detectar cantidades de ADN diana en diversas muestras (35)

Involucra ciclos de calor de la muestra para la desnaturalización, que es la separación de las dos cadenas sencillas que forman la doble cadena de ADN; hibridación de los cebadores o primers, se acoplan y se alinean al ADN diana en la secuencia específica; y elongación de los cebadores por una ADN polimerasa termoestable, copiando idénticamente la secuencia

específica determinada. En teoría, cada ciclo de amplificación da el doble del número de moléculas diana del ADN (36).

Entre las modalidades de la PCR, se encuentran principalmente la PCR de punto final y la PCR en tiempo real. La diferencia entre ambas se debe a que la PCR en tiempo real, genera un amplicón que se puede observar conforme la amplificación progresa, lo que elimina el análisis post PCR, este método requiere el uso de secuencias sintéticas “primers” y la presencia de marcadores fluorescentes unidos a la secuencias sintéticas para lo cual es necesario la presencia de un equipo (termociclador) que permita medir la intensidad de fluorescencia ; mientras que en la PCR de punto final, el producto generado no se detecta sino hasta que la amplificación se ha llevado a cabo y posteriormente el amplicón es visualizado en un gel de agarosa y se fundamenta en la amplificación de la región de interés en el ADN molde, mediante secuencias sintéticas específicas. (Figura 6) (Biosystems)

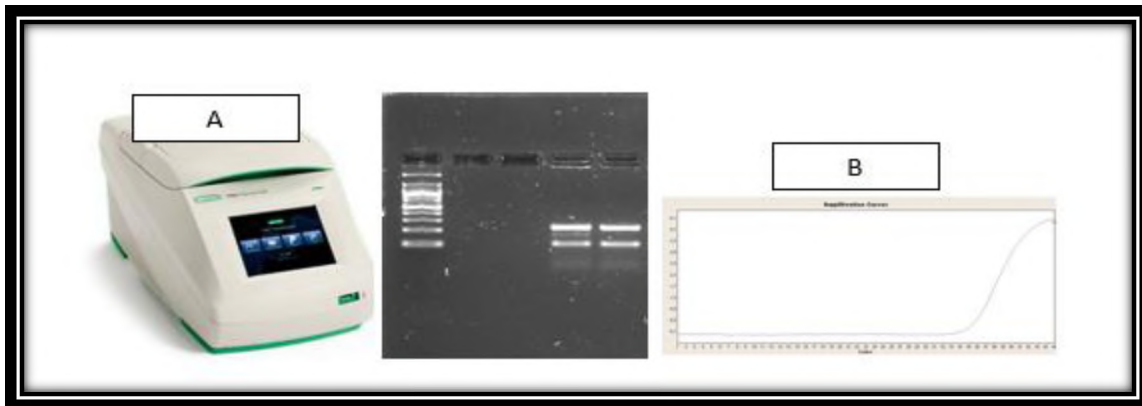


Figura 5A: PCR de Punto Final. B: PCR en Tiempo Real (Fuente: Lab. Bacteriología especial PUJA).

La adición de sondas permite que la reacción de la PCR en tiempo real, sea cuantitativa y emita una señal fluorescente por cada ciclo, es decir, la cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo es proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado (36)

Se distinguen en la cinética de amplificación tres fases (Fig 6)

Fase Geométrica. Durante esta fase todos los reactivos de la reacción se encuentran en abundancia; la eficiencia de amplificación bajo las condiciones experimentales es muy cercana al 100%, en esta fase la cinética de amplificación tiene un comportamiento 2^n en donde a partir de una molécula de DNA se generan 2 moléculas de DNA (Biosystems).

Fase Lineal. Los primers, dNTP's y/o enzima comienzan a ser factores limitantes, además de la generación de pirofosfato y decaimiento de la actividad enzimática que afectan la eficiencia de amplificación de manera constante, por lo que no es posible llevar a cabo un ensayo cuantitativo en esta parte (Biosystems).

Fase estacionaria. En este punto se detiene la amplificación, la cantidad de producto obtenida es constante sin importar cuantos ciclos más se prolongue la reacción (Biosystems).

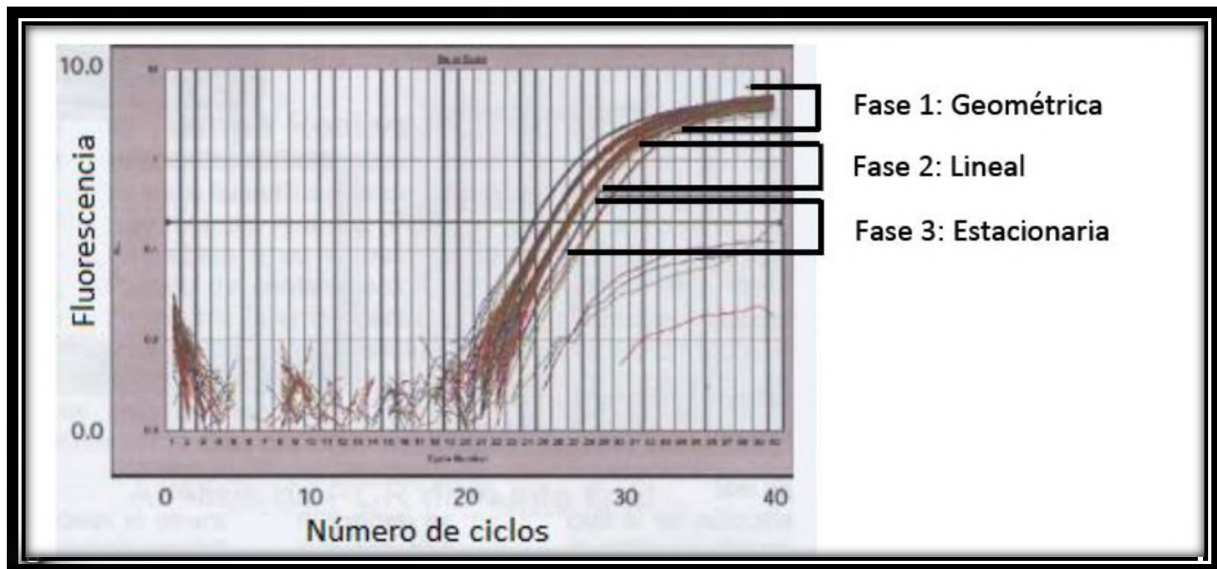


Figura 6 Fases de la Reacción de PCR (Fuente: Applied Biosystems).

Para efectuar los ensayos de cuantificación dentro de la fase geométrica es necesario definir un umbral de detección, en el cual todas las muestras puedan ser comparadas entre sí. Al ciclo en el cual cada muestra consigue, llegar a este umbral de detección, se le conoce como Ct (threshold cycle), el cual es un número que indica los ciclos que le tomo a cada muestra generar la cantidad suficiente de fluorescencia para ser detectada. A mayor cantidad de ADN que se encuentre en una muestra, menor número de ciclos requerirá para alcanzar el umbral de detección (Figura 9) (37).

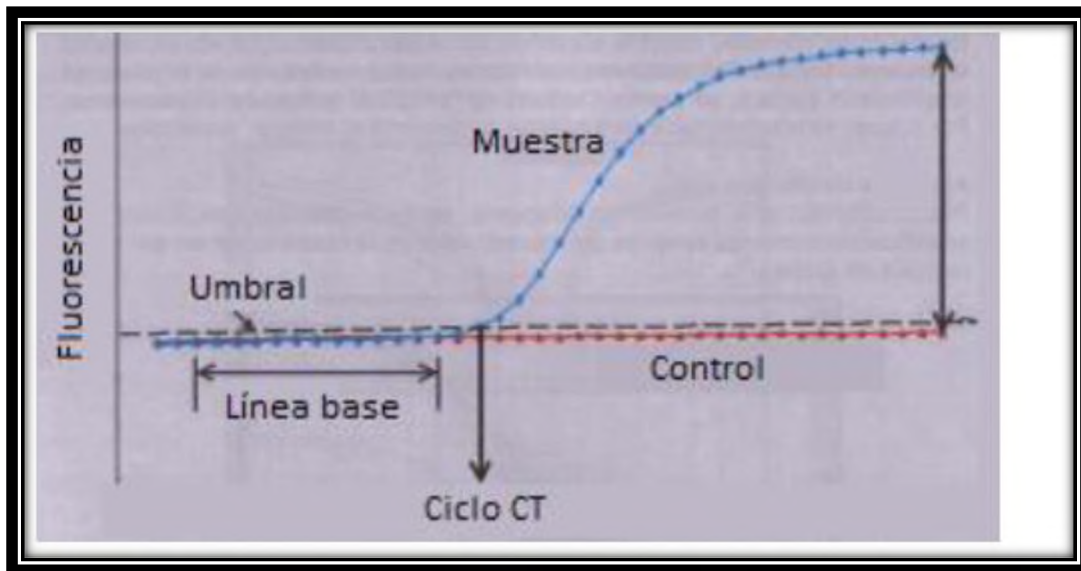


Figura 7 Características de una gráfica de amplificación en Tiempo Real (Fuente: Applied Biosystems).

4.4.3 Otros métodos.

Una prueba rápida, sencilla, y económica, es la aglutinación en látex para la identificación de resistencia a la meticilina en *Staphylococcus aureus*, con la detección de la PBP 2a (39).

Debido al alto costo que implican los métodos de una PCR, se han creado alternativas como la de un ágar cromogénico, selectivo, diferencial y rápido; debido a la resistencia a antibióticos en el ágar, las colonias de MRSA crecen y producen cambios de distinto color causados por la ruptura del sustrato cromogénico por una enzima específica de *Staphylococcus aureus* (Figura 8) (40).



Figura 8 Ágar cromogénico (Fuente: Malhotra-Kumar S, 2010).

4.5 Principio del Procedimiento de PCR en tiempo real.

En la técnica de PCR en tiempo real, se emplean diferentes estuches que provienen de diferentes casas comerciales, entre ellos encontramos en de BDMAX y el de LightCycler de Roche útiles para la identificación de SAMR.

4.5.1 Sensibilidad

La sensibilidad se define como aquella capacidad de la prueba para clasificar correctamente al enfermo como enfermo, es decir, detectar a los individuos con la enfermedad que presentan un resultado positivo (verdaderos positivos). Indica qué tan buena es una prueba para identificar las personas enfermas (41).

4.5.2 Especificidad

La especificidad se define como aquella capacidad de la prueba para clasificar correctamente al sujeto sano como sano, es decir, catalogar a los individuos sin la enfermedad que presentan un resultado negativo (verdaderos negativos). Indica en qué medida es buena la prueba para identificar a los individuos sanos (41).

4.6. Realización del Procedimiento qPCR BD MAX

El sistema BD MAX™ utiliza una combinación de reactivos líticos para llevar a cabo la lisis celular y la extracción de DNA. Después de la lisis celular enzimática a temperatura elevada, los ácidos nucleicos liberados son capturados por perlas de afinidad magnéticas. Las perlas, con los ácidos nucleicos unidos, se lavan y los ácidos nucleicos son eluidos por calor en tampón de elución. ADN eluido se neutralizó con tampón de neutralización y se transfiere a la Tubo Master Mix para rehidratar los reactivos de PCR. El reactivo de amplificación reconstituido se dispensa en el BD MAX™ Cartucho de PCR el cual se encuentran sellados por el sistema antes de iniciar la PCR para evitar la evaporación y la contaminación del amplicón.

Las dianas de ADN amplificadas se detectan utilizando hidrólisis (TaqMan®), las cuales son sondas marcadas en un extremo con un colorante fluorescente reportero (fluoróforo) y en el otro con un resto extintor. Las sondas marcadas con diferentes fluoróforos se utilizan para detectar SARM y SPC amplicones en dos canales ópticos diferentes de la BD MAX™ System. Cuando las sondas están en su estado nativo, la fluorescencia del fluoróforo es

extinguido debido a su proximidad al extintor. Sin embargo, en la presencia de ADN diana, las sondas hibridan a sus secuencias complementarias y se hidrolizan por la actividad exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa, ya que sintetiza la hebra naciente a lo largo de la plantilla de ADN. Como resultado, los fluoróforos se separan de las moléculas de inhibidor de la fluorescencia y la fluorescencia se emite. La cantidad de fluorescencia detectada en los dos canales ópticos utilizados para el ensayo de MRSA BD MAX™ es directamente proporcional a la cantidad de la sonda correspondiente que se hidroliza. El sistema BD MAX™ mide estas señales al final de cada ciclo de amplificación, y algoritmos de cálculo interpolan automáticamente los resultados.

El sistema consta de un instrumento, un ordenador personal con un software previamente instalado para la realización de pruebas y la visualización de los resultados y de un escáner de código de barras

Este sistema requiere el uso de cartuchos desechables de un solo uso para los reactivos y el proceso de PCR. Este cartucho consta de las siguientes partes:

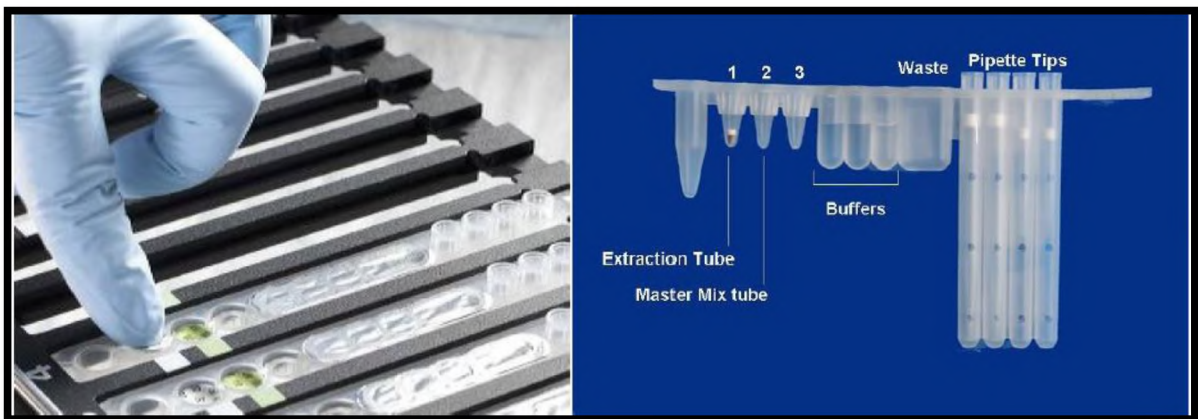


Figura 9 Snap BD MAX™MRSA Extraction tubes and Master Mix tubes into reagent strips

El proceso consta de los siguientes pasos (Baron 2010):

1. Reactivos líquidos en el cartucho.
2. Adicionar suspensión de muestra.
3. Los microorganismos son mezclados en el filtro
4. La lisis ultrasónica rompe los microorganismos y libera el ADN.
5. El ADN pasa a través del filtro y entonces entra a la primera cámara de reactivo.
6. Las moléculas de ADN se mezclan con los reactivos rehidratados y son llevados al vial de reacción.
7. PCR y detección en el tubo de reacción integrado.

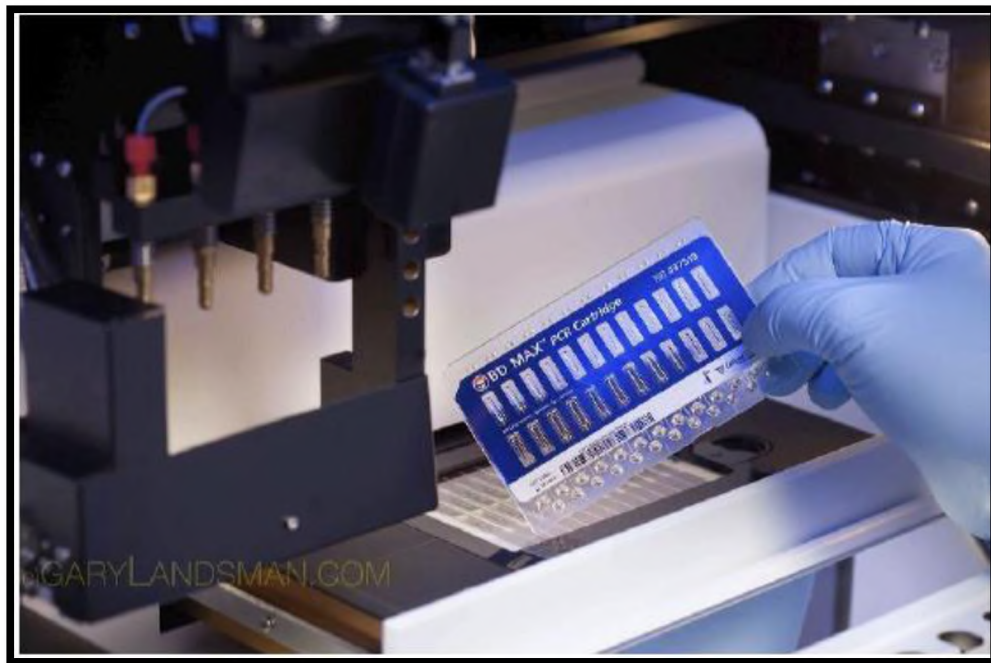


Figura 10 cartuchos de la lectura de PCR



Figura 11 Estante de carga (s) en el sistema BD MAX™

Cada cartucho del ensayo, incluyen también Controles de calidad que son:

-Control de procesamiento de muestra (SPC, siglas en inglés). Garantiza el procesamiento adecuado, ya que contiene un plásmido de *Drosophila*. El SPC supervisar la presencia de inhibidores en la PCR y asegurar que las condiciones de la reacción de PCR (temperatura y tiempo) sean las adecuadas para la reacción de amplificación y que los reactivos PCR sean funcionales.

4.7. Realización del Procedimiento qPCR ROCHE

Realización del procedimiento:

El kit de detección LightCycler® MRSA proporciona cebadores y sondas HybProbe® para la amplificación y detección específica de la secuencia del gen mecA. También proporciona una plantilla de control positivo para la interpretación fiable de los resultados. Los reactivos premezclados convenientes contienen los componentes para la amplificación, así como el control interno (IC). El estuche reduce al mínimo el riesgo de contaminación y contiene todos los reactivos necesarios para la detección; sólo el ADN tiene que ser añadido y antes debe realizarse una extracción previa de este, indicada por el kit.

La realización de la prueba es en el instrumento LightCycler, el cual es programado para cumplir ciclos de desnaturación, cycling, melting and cooling, obteniendo como resultado una gráfica de cuantificación absoluta el cual presenta dos canales que serán interpretados según la presencia o no del casete SCCmec:orfX.

Canal 640: presenta resistencia

Canal 705: no presenta resistencia

Características

- Control Interno (IC) identifica los especímenes con inhibidores del proceso de amplificación para maximizar la fiabilidad kit
- IC se amplifica con los mismos cebadores como el ADN diana pero detecta en un canal de fluorescencia separada
- Analiza las 48 muestras / 56 reacciones

Velocidad

- Equipo automatizado de amplificación y se obtiene resultados dentro de 1-2 horas

Conveniencia

- Todos los componentes del kit se proporcionan en soluciones listas para el uso



Figura 12 kit empleado para la extracción de DNA



Figura 13 equipo de roche utilizado para la qPCR

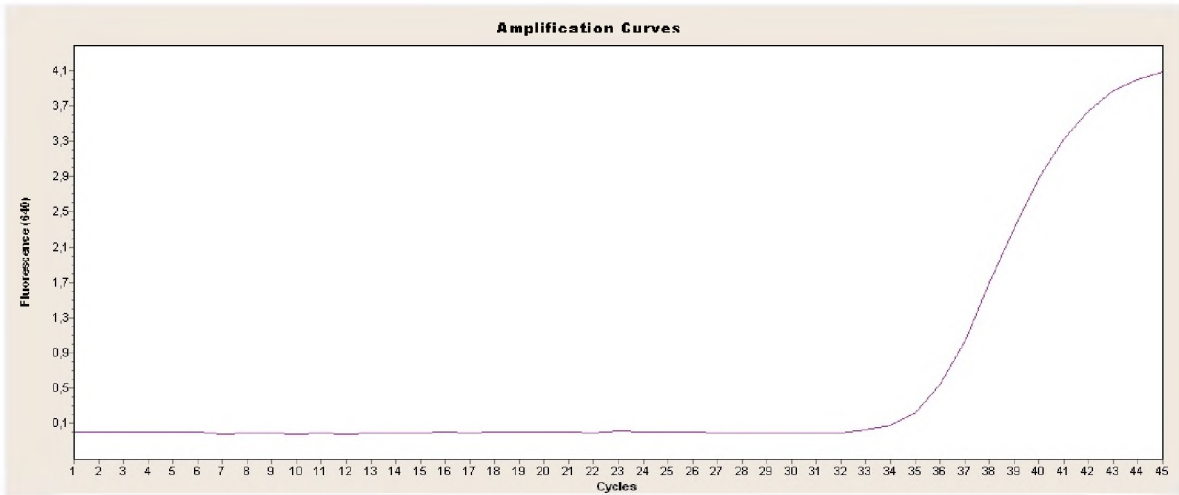


Figura 14 imagen representativa de qPCR positiva

5. Objetivos

Objetivo general

Identificar la colonización por *Staphylococcus aureus*, en el personal médico de cirugía cardiovascular por medio hisopados nasales en el hospital universitario San Ignacio (HUSI) de la ciudad de Bogotá.

Objetivos específicos

- Detectar por medio de métodos tradicionales la colonización por *S.aureus* en el personal médico de cirugía cardiovascular.
- Detectar la colonización *S.aureus* por medio de PCR convencional.
- Detectar la colonización por *S.aureus* por medio de PCR en tiempo real de Roche y BDMAX
- Analizar la información para comparar las diferentes metodologías de los hallazgos encontrados en la investigación.

CAPITULO II

METODOLOGIA

6. Propuesta metodológica

Población estudio: se seleccionó un grupo de personas que cumplían con los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión: en el estudio se incluyó a todo el Personal médico quirúrgico de la unidad de cirugía cardiovascular del HUSI. Se consideró como requisito parcial que el Personal médico acepte de forma voluntaria su participación sin remuneración alguna.

Criterios de exclusión: se excluyó el personal que no cumplía con las características específicas de inclusión y aquellos que no integren el equipo de trabajo de cirugía cardiovascular.

Muestra: se le tomó una muestra en dos momentos distintos de mucosa nasal al personal médico quirúrgico por técnica de barrido con un escobillón flexible, siguiendo el instructivo recomendado por la secretaria distrital de salud para la toma y procesamiento de muestras.
(42)

Transporte: las muestras se recolectaron en un medio de transporte con carbón activado “amies”, para su posterior transporte y procesamiento en el laboratorio de Bacteriología especializada de la Pontificia Universidad Javeriana.



fig. 14 tubos de transporte (Fuente: LEGACY, MRSA PCR Specimen Collection Guide)

A partir de las muestras obtenidas se determinó la presencia o ausencia de *S.aureus* y se realizó una clasificación por medio de técnicas como métodos tradicionales, PCR convencional y PCR en tiempo real (qPCR) mediante la prueba LighCycler de Roche y BDMAX.

Identificación microbiológica presuntiva: a partir de las muestras obtenidas, se realizó una siembra en agar sangre con el fin de observar el tipo de hemolisis y características de las colonias y en agar manitol.

A partir de estas siembras se realizó prueba de catalasa con peróxido de hidrogeno, prueba de coagulasa implementando el kit “coagulase test” y coloración de Gram con el fin de seleccionar en grampositivas y gramnegativas respectivamente.

Test de difusión en disco a oxacilina:

El test de difusión en disco se llevó a cabo preparando un inóculo ajustado al 0,5 McFarland y extendiéndolo sobre la placa de agar Müller Hinton; se utilizaron discos de oxacilina de 1 µg, según las normas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013).

Análisis del gen mecA. Reacción en cadena de la polimerasa

Se aplicó un protocolo de PCR múltiple que permite la detección del gen mecA; Tras la PCR, los fragmentos amplificados fueron analizados mediante electroforesis de agarosa (1%), esta PCR amplifica un gen control interno 16 S de un tamaño de 241 pares de bases y un gen de identificación de especie de *S. aureus* de 108 pares de bases y otro del gen mecA de 174 pares de bases. (43)

Análisis del gen mecA. PCR en tiempo real

Mediante la implementación de dos protocolos distintos se realizó la identificación del gen mecA, por medio de dos técnicas de casas comerciales distintas como lo son prueba LighCycler de test de Roche y BDMAX.

A partir de la técnica LighCycler de test de Roche se procedido a realizar una extracción previa de DNA, y posterior la preparación de la reacción en cada capilar. Por último se analizó y se interpretó los resultados de acuerdo al manual de instrucciones consultado.

En la prueba BDMAX se realizó una organización puntual de los cartuchos en la maquina a leer y la implementación de la muestras, posterior se analizó y se interpretó los resultados de acuerdo al manual de instrucciones consultado.

Profilaxis: a aquellos pacientes que su resultado fue Positivo para la detección de SAMR se procedió a dar profilaxis con mupirocina durante 5 días.

Procesamiento de datos: los datos obtenidos se transcribirán manualmente del instrumento al programa por duplicado (Excel) con copia única de las gráficas en el instrumento manipulado.

6.1. Diagrama de Flujo General

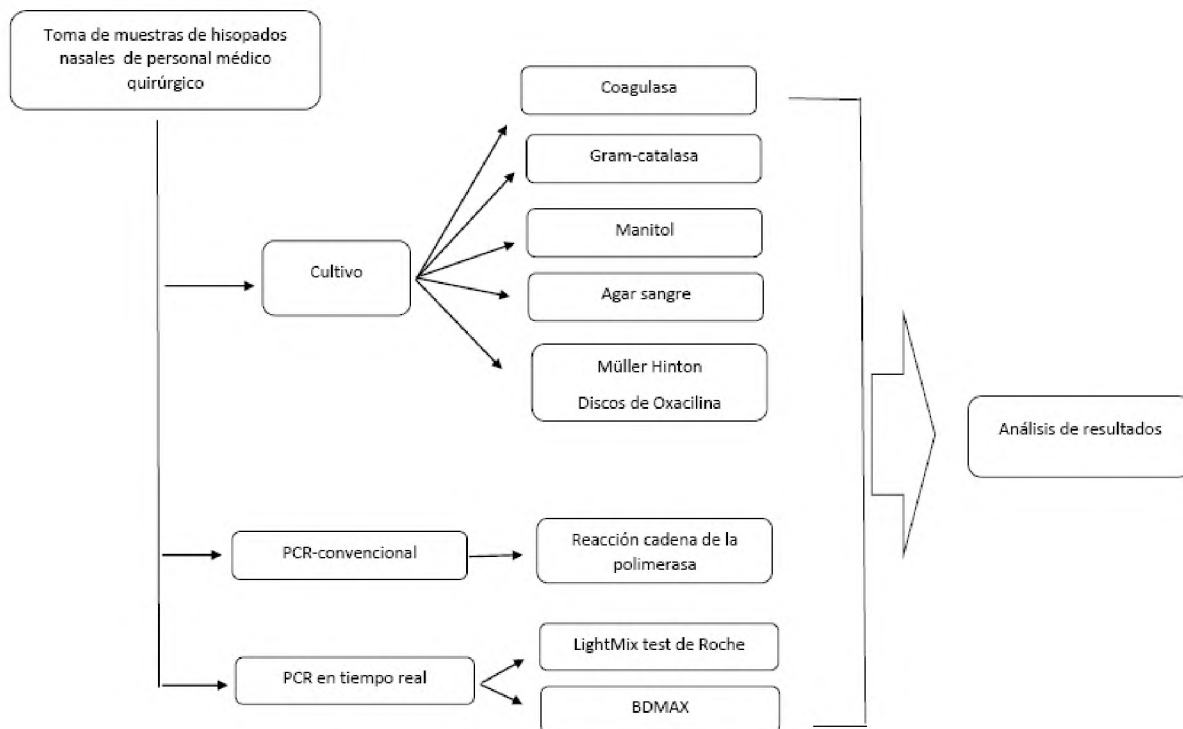


Figura 15 representación gráfica del diagrama de flujo con el procedimiento realizado para la identificación de *S. aureus* en el laboratorio de Bacteriología especial

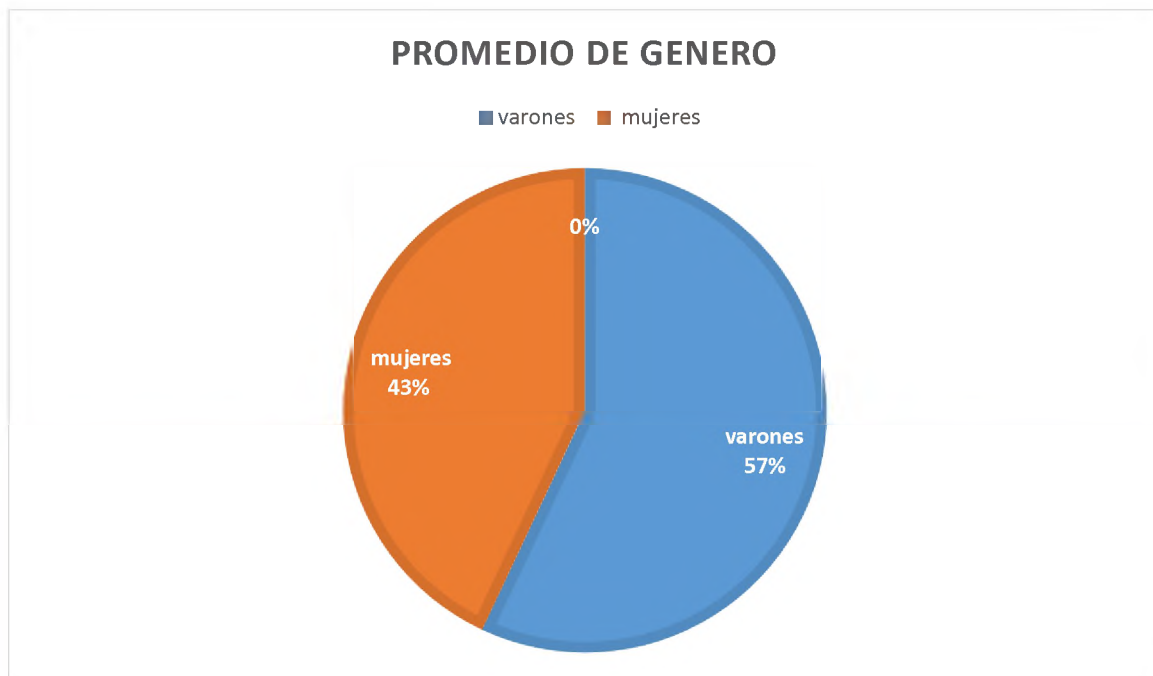
CAPITULO III

RESULTADOS

7. Resultados

PRIMERA TOMA DE MUESTRAS

En esta primera toma de muestras se recolectaron una totalidad de 7 muestras, tomados directamente de las dos narinas del personal médico quirúrgico. Con rangos de edades de 22-56 años y un promedio de género entre: varones 57% y mujeres 43%.



De la primera toma realizada, se encontró que por medio de métodos tradicionales 5 muestras no crecieron en agar sangre y en agar manitol, el restante de las muestras (2) se observó crecimiento en los agares previamente mencionados.

Las 2 muestras fueron cocos grampositivos, catalasa positivos, coagulas positivos y manitol positivo.

El disco de Oxacilina reveló que una de las muestras era resistente con un halo de 13 mm y la otra muestra sensible con un halo de inhibición de 22mm. Luego con la identificación y con la prueba de oxacilina se identificó 1 muestra positiva para SAMR y se obtuvo 1 crecimiento para MSSA.

De acuerdo a los hallazgos encontrados, se realizó la PCR convencional para las dos muestras el cual se confirmó la presencia de MRSA reportada por métodos tradicionales con discos de oxacilina de 1 µg.

Por último, al implementar la técnica de PCR tiempo real de Roche las 7 muestras dieron los siguientes resultados:

1 muestra evidenció amplificación para MRSA en el ct 31 y las 6 restantes no se observó ninguna amplificación.

Con PCR tiempo real de BDMAX ninguna de las 7 muestras evidenció amplificación o emisión de fluorescencia lo que se interpretó como resultado negativo

De acuerdo a los resultados encontrados en las diferentes pruebas realizadas se establece un nivel de concordancia entre la prueba Gold estándar que corresponde a los discos de oxacilina, frente a las diferentes pruebas como PCR tradicional y qPCR Roche y BDMAX.

Gold standard (cultivo: oxacilina)	PCR tradicional	qPCR Roche	qPCR BDMAX
Concordancia	100%	100%	0%

Figura 16 comparación de técnicas utilizadas con Gold estándar.

Cabe resaltar que al personal cuyo resultado fue positivo para SAMR se procedió a la administración de profilaxis con mupirocina.

SEGUNDA TOMA DE MUESTRAS

En esta segunda toma de muestras se recolectaron una totalidad de 7 muestras, tomados directamente de las dos narinas del personal médico quirúrgico.

De la segunda toma realizada, se encontró que por medio de métodos tradicionales todas las muestras procesadas fueron resultados negativos.

De acuerdo a los hallazgos encontrados, no se realizó la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR convencional) ya que ninguna de las muestras procesadas arrojó resultados positivos.

Al implementar la técnica de PCR en tiempo real (qPCR, por LighCycler de test de Roche se evidenció la amplificación de una muestra para MRSA con un número de copias muy bajo,

y el restante de muestras (6) fueron resultados negativos; en cambio, al implementar qPCR por BDMAX todas las 7 muestras procesadas arrojó resultados negativos.

Hay que resaltar que la muestra que en la primera toma fue resultado positivo para MRSA y fue tratado posterior con mupirocina, el resultado de la segunda muestra fue negativo en todas las técnicas empleadas.

De acuerdo a los resultados encontrados tanto en la primera y segunda toma de muestras en las diferentes pruebas realizadas se relaciona en el siguiente cuadro, evidenciando la presencia de un estado intermitente, persistente y no portador.

Código interno	Primera toma	Segunda toma	estado
1290001	Negativo	Negativo	no portador
1290002	Negativo	Negativo	no portador
1290003	Negativo	Negativo	no portador
1290004	Negativo	Positivo para MRSA	intermitente
1290005	Positivo para MSSA	Negativo	intermitente
2040001	Positivo para MRSA	Negativo	intermitente
2040002	Negativo	Negativo	no portador

Figura 17 estado portador del personal médico quirúrgico

Para el paciente que en la primera toma de muestras dio un resultado positivo por los métodos de identificación empleados se realizó una profilaxis con mupirocina la cual se obtuvo un resultado de efectividad:

Positivo para MRSA	Efectividad mupirocina
2040001	100%

Figura 18 nivel de efectividad de la profilaxis utilizada.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8. Discusión de resultados

Staphylococcus aureus es uno de los microorganismos considerados actualmente de importancia médica, ya que es capaz de causar un rango amplio de infecciones, que han ido en aumento con la aparición creciente de cepas resistentes a antibióticos. La resistencia a meticilina y los antibióticos β -lactámicos se debe a la expresión de una proteína transpeptidasa (PBP2a) codificada por el gen *mecA*, que se encuentra en el cromosoma de MRSA.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede evidenciar un porcentaje 28% de SARM codificada por el gen *mecA* en la población medica quirúrgica de la unidad de cardiología y un 14% de colonización por SAMS; dadas estas estadísticas las cuales demuestran una alta colonización de cepas como SARM en el personal de cirugía cardiovascular se relaciona como un verdadero peligro en la colonización de nuevos pacientes y en el desarrollo de cuadros clínicos infecciosos en pacientes intervenidos.

Trabajos realizados a la fecha muestran que la colonización por *S. aureus* en personal médico como enfermeras, anestesiólogos y médicos quirúrgicos sigue siendo la causa más común para el desarrollo de cuadros clínicos relevantes como lo es la endocarditis. Se han establecido tasas de colonización que se encuentran entre 9.6-11.6% y de acuerdo a estos datos establecidos y los datos de este nuevo estudio se confirma aún más el alcance de este microorganismo para poder colonizar, y el porcentaje que se encuentra en desarrollo para la colonización especialmente personal médico.

Cabe mencionar que la detección del gen *mecA* por qPCR, son considerados los métodos de ayuda para la correcta detección de MRSA (Fluit, Visser et al. 2001). En el presente estudio, el ensayo de qPCR en el equipo LighCycler identifico los 2 MRSA detectados , pero además logra detectar desde 10 copias, para la identificación del gen *mecA*, el cual logra una mayor sensibilidad tanto analítica como experimental en comparación con la qPCR BD MAX que no reconoció ninguna de las muestras como positivas, para lo cual existe una posible explicación: La expresión fenotípica de resistencia depende de las condiciones de crecimiento (temperatura, osmolaridad del medio, etc.) , al momento de realizar la toma y almacenarla en el en el medio de transporte con carbón activado, nosotros garantizamos las condiciones de almacenamiento y el adecuada interpretación del instructivo del tiempo de mantenimiento en el medio de transporte, por lo cual es una alternativa que pudo inferir al momento del procesamiento de las muestras, pero a pesar que en el laboratorio se tomó todas las medidas de seguridad necesarias.

La tecnología de BD MAX permite que el DNA de MRSA sea extraído, amplificado y detectado en cámaras separadas de un cartucho desechable, que contienen los reactivos necesarios. Durante el estudio no se presenta ningún resultado inválido o inhibición de la PCR, los controles internos amplifican adecuadamente y no existió necesidad de repetir alguna muestra. El tiempo promedio de proceso es de 1.18 hr, significativamente menor que el proceso en el LighCycler (2,30 hr), pues este tiempo depende significativamente de la experticia de analítico, y del tiempo empleado tanto en la extracción del DNA manual y el tiempo empleado en la resuspension y preparación de la qPCR para su posterior lectura en el equipo. El tiempo resulta un factor vital para este tipo de infecciones, ya que con este diagnóstico rápido, el médico pueda indicar el tratamiento más adecuado a su paciente y que

entre menos manipulación le demos a la muestra mayor confiabilidad de resultados daremos a la hora de la lectura.

La clasificación por género de las 14 muestras analizadas desde cultivos básicos utilizados y posterior con la confirmación del gen *mecA* por PCR y qPCR, revelan que el 59% corresponde a pacientes de sexo masculino, en la literatura encuentran dos estudios que describen el 71% y 62% de pacientes hombres con infección causada por MRSA (43).

La literatura nos indica, que respecto al servicio médico, el 28.6% de los aislamientos de SAMR corresponde a Cirugía General y otro 28.6% a Nefrología; en cuanto al tipo de muestras, el 37.5% es de heridas quirúrgicas, seguido por el 14.3% de hemocultivos y 12.5% de líquido de diálisis. *S.aureus* es el patógeno nosocomial principal de infecciones de piel y tejidos blandos, esta es la posible explicación de porqué el servicio de cirugía cardiovascular y las muestras de heridas quirúrgicas presentan un porcentaje mayor de aislamientos de SAMR

Con los resultados obtenidos en nuestro estudio y con revisiones de estudios previos, se demuestra que MRSA es uno de los microorganismos más aislados en HUSI y que la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, especialmente con el aumento de la resistencia como lo es MRSA, resulta crucial para la terapia de los pacientes infectados. La rápida detección de MRSA junto con la pronta aplicación de la terapia más adecuada, ayudaría a reducir la prevalencia de infecciones. (44)

El método de rutina del laboratorio es laborioso, requiere tiempos de incubación y los resultados pueden tardar varios días (3-4 días) mencionar cuantos días; el ensayo de qPCR en el equipo LighCycler y/o BD MAX se considera una alternativa que pretende un diagnóstico rápido, una sensibilidad mayor, como es el caso de una de nuestras pacientes que en la segunda muestra se obtuvo un resultado positivo para MRSA con un número de copias muy bajo y no se pudo aislar en ningún medio por su baja concentración de microorganismo.

Sin embargo, estos ensayos moleculares tienen limitaciones, ya sea por su alto costo o por las limitaciones del personal en manejar este tipo de quipos, es importante recordar que el desarrollo de la tecnología es útil y el ser humano debe apropiarse con el fin de garantizar un resultado para certero y apropiado que ayude a salvar la vida de muchos de nuestros pacientes.

Por último, la adquisición de una profilaxis básica como la mupirocina, se considera como una estrategia sencilla pero eficaz para descolonizar aquellas personas que son portadoras de MRSA y en un tiempo prolongado conseguir una descolonización total como se observó en los médicos quirúrgicos colonizados y que adquirieron profilaxis, en la segunda muestra de confirmación no se encontró colonización alguna por este microorganismo.

CAPITULO V
CONCLUSIONES

9. Conclusiones

Esta investigación estableció el porcentaje de colonización por MRSA en personal médico quirúrgico en el HUSI, lo cual se considera un riesgo importante en el desarrollo de cuadros clínicos posteriores a la intervención quirúrgica.

Dada la importancia de este trabajo se requiere mayor información en todas las áreas críticas de HUSI con el fin de poder identificar la colonización respectiva y establecer mejores estrategias terapéuticas tanto para los pacientes como para el personal que se encuentra colonizado.

La identificación del gen *mecA* por reacción de la cadena de la polimerasa en tiempo real, es una nueva alternativa para la identificación oportuna y precisa de la colonización por *S.aureus* meticilino resistente.

10. Bibliografía

1. Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ, et al. Enferm infecc Microbiol Clin 2008; 26: 269-77
2. Fowler VG Jr, Justice A, Moore C et al. Risk factors for haematogenous complications of intravascular catheter-associated *Staphylococcus aureus* bacteraemia. Clin Infect Dis 2005;40: 95-703.
3. Abraham J, Mansour C, Veledar E et al. *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis: the Grady Memorial Hospital experience with methicillin-sensitive *S. aureus* bacteremia. Am Heart J 2004; 147:536-39.
4. Skov R, et al. Update on the prevention and control of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). Int J Antimicrob Agents. 2012
5. Knox R. "Celbenin"-resistant staphylococci. Br Med J 1961; 1:126
6. Wisplinghoff et al, Clinical Infectious Diseases 2004; 39:309-17
7. Lowy, Franklin D. (20 -agosto-1998). «*Staphylococcus aureus* infections» (PDF). *NEJM* (en inglés) (Estados Unidos: Massachusetts Medical Society) **339** (8): 520–532.. Consultado el 7 de enero de 2015.
8. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/> : primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos
9. Grundmann H, et al. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. Lancet. 2006.
10. David M, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microb Rev. 2010
11. Miller L, et al. Colonization, Fomites, and Virulence: Rethinking the Pathogenesis of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. CID. 2008
12. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 505-520

13. Opal SM, Mayer KH, Stenberg MJ et al. Frequent acquisition of multiple strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by health care workers in an endemic hospital environment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1990; 11: 479-484
14. Skov R, et al. Update on the prevention and control of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Int J Antimicrob Agents*. 2012
15. Reyes J, et al. Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequencetype 8 lineage in Latin America. *CID*. 2009
16. KANAFANI Z., FOWLER V. *Staphylococcus aureus* infections: New challenges from an old pathogen. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24(3) : 182-193
17. Chambers H, Archer G, Matsushashi M. Lower-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 424-8
18. Alowy F, et al. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998.
19. Chua K, et al. Not Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA)! A Clinician's Guide to Community MRSA – its Evolving Antimicrobial Resistance and Implications for Therapy. *Clin Infect Dis*. 2011.
20. Tubbicke A, et al. Transmission rates, screening methods and costs of MRSA—a systematic literature review related to the prevalence in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012
21. Peterson LR, et al. Multicenter evaluation of the LightCycler methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) advanced test as a rapid method for detection of MRSA in nasal surveillance swabs. *J Clin Microbiol*. 2010 May;48(5):1661-6
22. Resist Net, Grupo colaborativo. La resistencia a los antibióticos en América Latina: Importancia de los programas ARTENIS y RESISTNET. En Salvatierra- González R, Benguigui Y. Resistencia antimicrobiana en las Américas: magnitud del problema y su contención. OPS. 2000. p. 39-53
23. Arias C, et al. Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in enterococci and staphylococci from Colombian hospitals, 2001-2002. *J Antimicrob Chemother*, 2003
24. Arias C, et al. MRSA USA300 clone and VREF—a U.S.-Colombian connection? *N Engl J Med*. 2008

25. Cueto M, Pascual A. Microbiología y Patogenia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. En: Pahissa A, Soler H, Soto A, Matos L, Serrano E, Roig MA editores. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1ª ed. Barcelona (España): Marge Books ed.; 2009: 15-29.
- 26.2. Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. N Engl J Med 2001;344:11-6
27. Gil, M. (2000). "*Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina." Revista Chil Infectología 17: 145-152.
28. Gerald, L. M., et al. (2002). Enfermedades infecciosas: Principios y práctica. Buenos Aires, Argentina, Médica Panamericana.
29. Hiramatsu, K., et al. (2002). "Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Int J Med Microbiol 292(2): 67-74.
30. Chambers, H. F. (1997). "Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications." Clin Microbiol Rev 10(4): 781-791.
31. De Lencastre, H., et al. (2007). "Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power." Curr Opin Microbiol 10(5): 428-435.
32. Sakoulas, G., et al. (2001). "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains." J Clin Microbiol 39(11): 3946-3951.
33. Swenson, J. M. and F. C. Tenover (2005). "Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp." J Clin Microbiol 43(8): 3818-3823.
34. Anand, K. B., et al. (2009). "Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA." Indian J Med Microbiol 27(1): 27-29
35. Cabrera, J. L. and M. A. H. Sanchez (2001). Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética : conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Barcelona, Elsevier.
36. Fluit, A. C., et al. (2001). "Molecular detection of antimicrobial resistance." Clin Microbiol Rev 14(4): 836-871, table of contents.

37. Murray, P. R., et al. (2009). Microbiología médica. España, ELSEVIER.
38. Skov, R., et al. (2006). "Phenotypic detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion testing and Etest on Mueller-Hinton agar." *J Clin Microbiol* 44(12): 4395-4399.
39. Qian, Q., et al. (2010). "Direct detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* in blood culture broth by use of a penicillin binding protein 2a latex agglutination test." *J Clin Microbiol* 48(4): 1420-1421
40. Malhotra-Kumar, S., et al. (2010). "Evaluation of chromogenic media for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J Clin Microbiol* 48(4): 1040-1046.
41. Sánchez, N. A. (2002). "¿Son la sensibilidad y la especificidad medidas obsoletas para determinar la bondad de una prueba diagnóstica?" *Revista Facultad Nacional de Salud Pública* 20(1): 149-159.
42. <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo%20IIH/Manual%20Toma%20Muestras.pdf>
43. (Sakoulas, Gold et al. 2001, Batista, Gutierrez et al. 2008).
44. Miller, Perdreau-Remington et al. 2005, Moran, Krishnadasan et al. 2006

CAPITULO VI
ANEXOS

11. Anexos

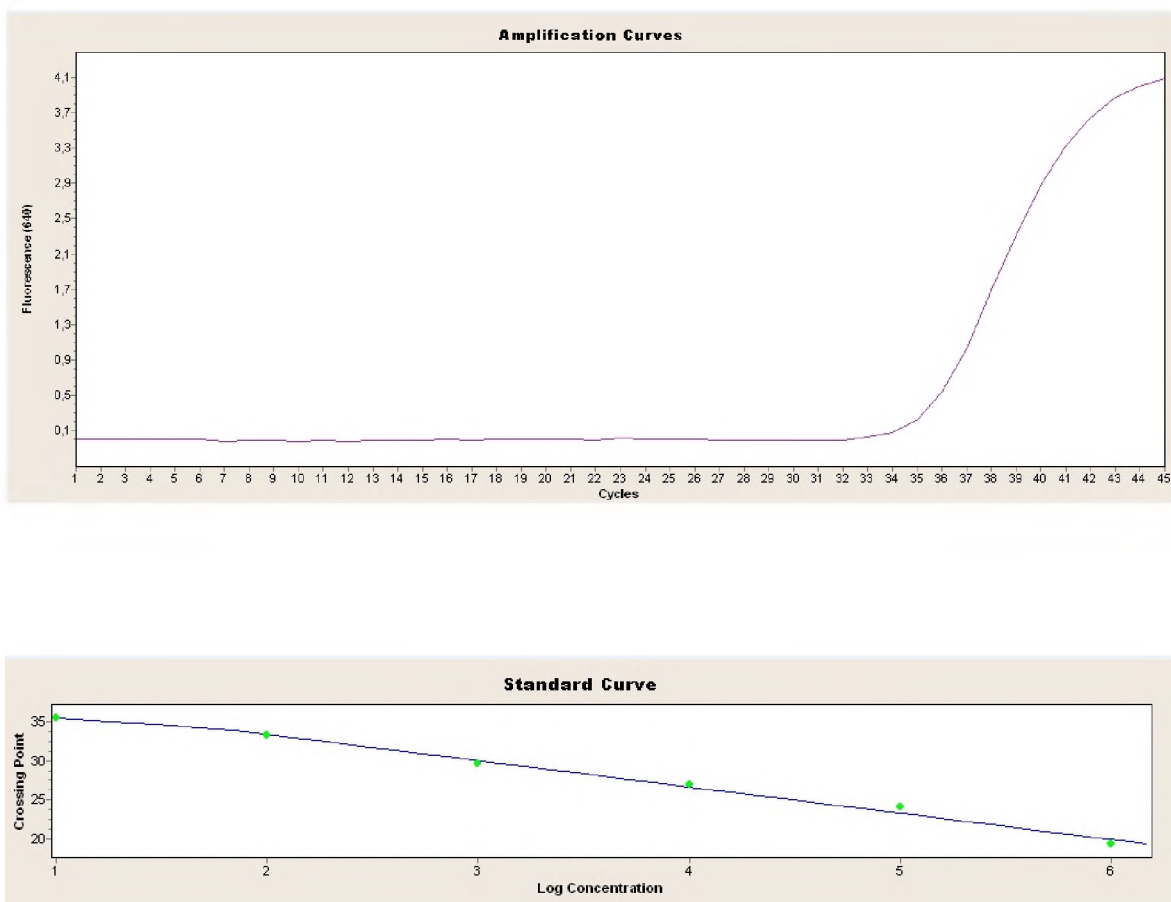


Figura 19 identificación grafica MRSA positivo en el canal 640

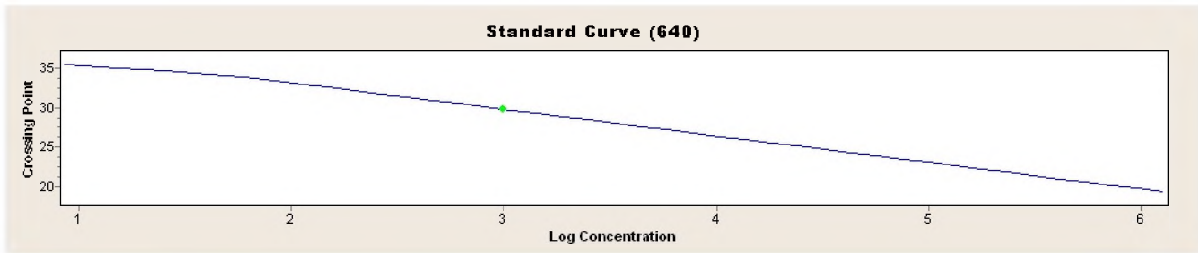
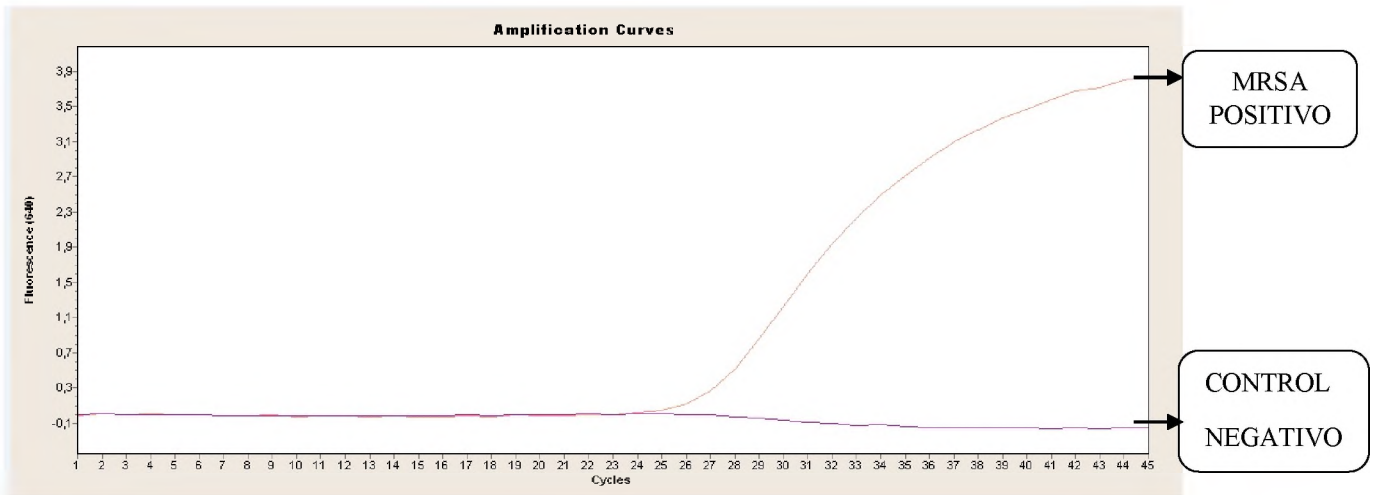


Figura 20 comparación control negativo vs positivo para MRSA en canal 640

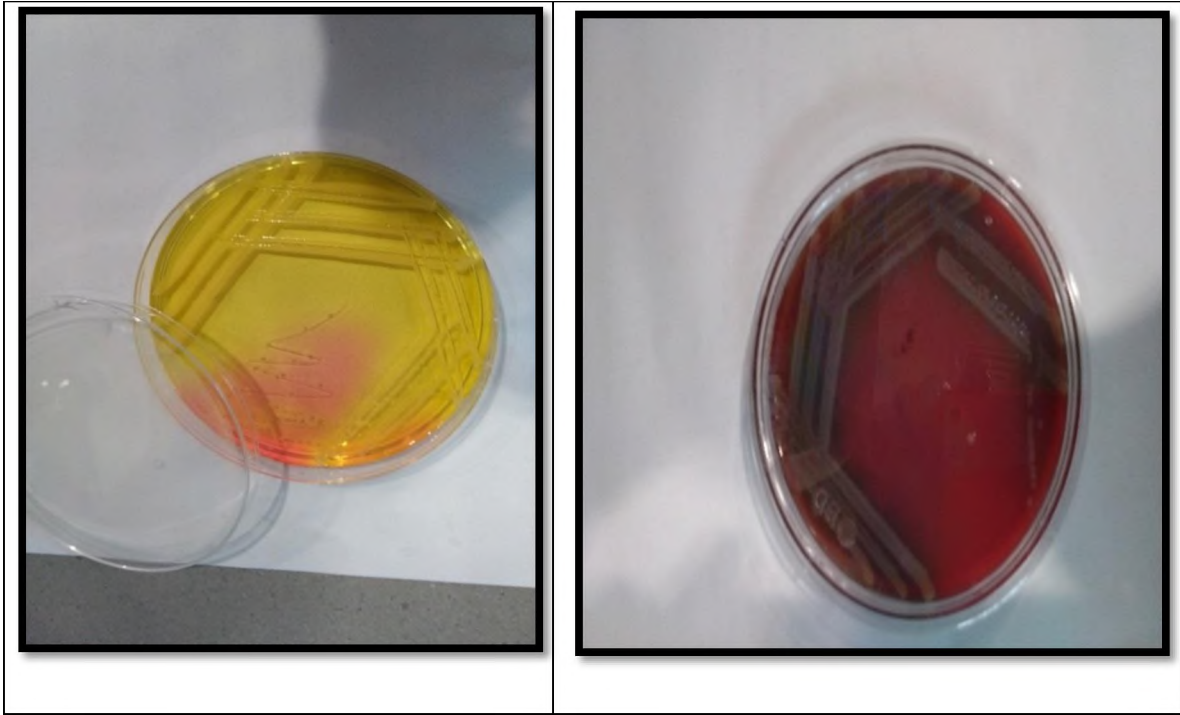


Figura 21 crecimiento en agar manitol y en agar sangre positivo.

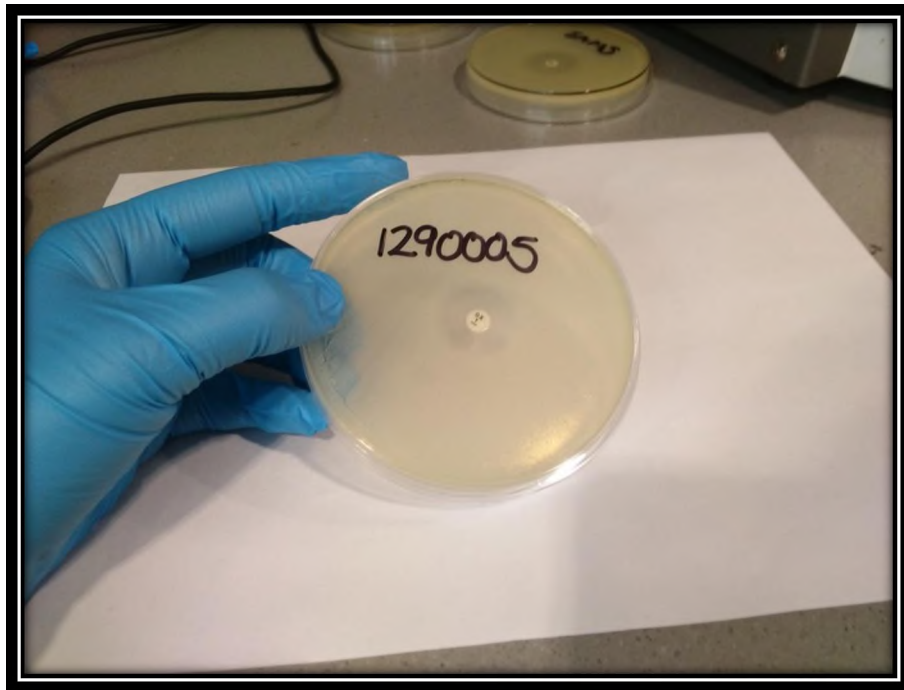


Figura 22 representación de sensibilidad Con discos de oxacilina.

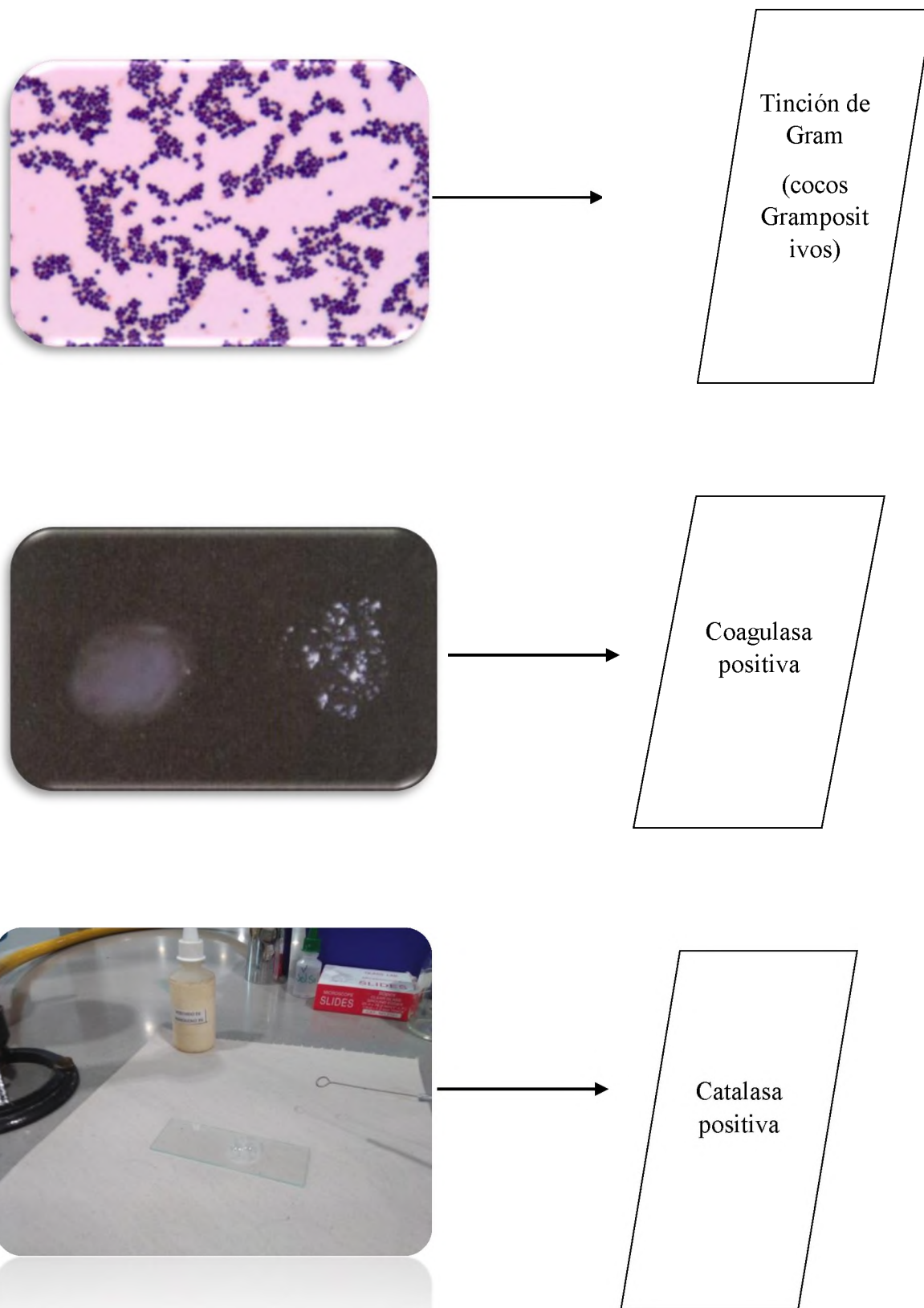


Figura 23 imágenes representativas de pruebas piloto realizadas y confirmadas.

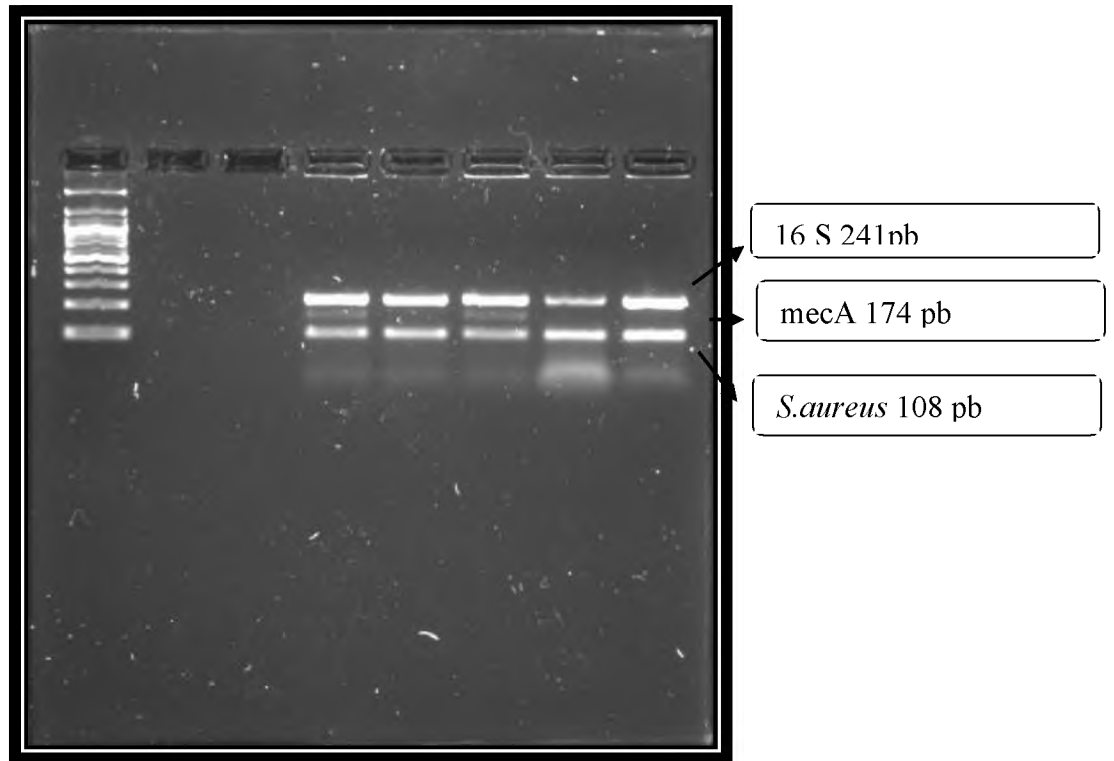


Figura 24 representación gráfica PCR convencional

Evidencia de tres bandas para muestra MRSA positivo y dos bandas para SARM, obtenidas a partir de controles estándar reflejados en los primeros 4 pozos.

Run 18: SILVIA MRSA

Position	Test Name	Sample Tube	Patient ID	
SP Status		PCR Status	Accession	Result
Lot Number				
A1	BD MAX MRSA	001425390320150430CE67	4160006	
Success		Success	002	NEG
00314(07)				
A7	BD MAX MRSA	001425390320150430CE69	4170007	
Success		Success	007	POS
00314(07)				

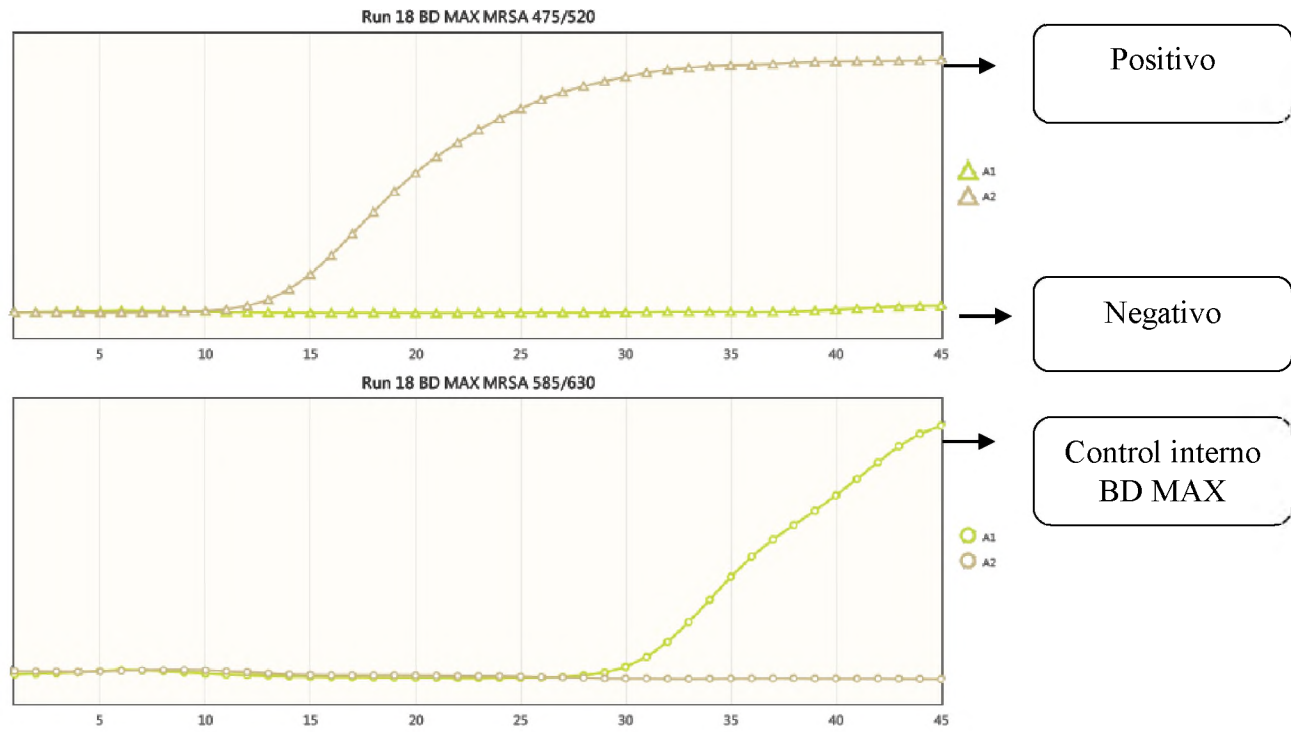


Figura 25 representación gráfica de un resultado positivo y negativo de qPCR BD MAX