

**Hospital Pediátrico “Juan Manuel Márquez”  
Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”**

**Infecciones neonatales de inicio en la comunidad por  
*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Hospital  
Pediátrico “Juan Manuel Márquez”, 2010 - 2013**

**Tesis para optar por el Título de Máster en  
Bacteriología - Micología**

**Autor**

Dr. Alexis Monzote López

**La Habana 2016**

**Hospital Pediátrico “Juan Manuel Márquez”**  
**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”**

Infecciones neonatales de inicio en la comunidad por  
*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Hospital  
Pediátrico “Juan Manuel Márquez”, 2010 - 2013

**Tesis para optar por el Título de Máster en  
Bacteriología - Micología**

**Autor**

Dr. Alexis Monzote López

**Tutor**

Lic. Gilda Toraño Peraza. DrC  
Dra. Roxana Gozá Valdés. MsC

**Asesores**

Lic. Liliam Díaz Novo. MsC  
Dra. Margarita Valdés-Dapena Vivanco. PhD

**La Habana 2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis tutoras, asesoras y demás profesores que me han formado como microbiólogo,  
y más que nada como ser humano*

*A mis colegas del laboratorio de Microbiología del Hospital Pediátrico “Juan Manuel  
Márquez”, en especial a la Lic. Yigany Vila*

*A la Dra. Arianna Castillo y al Lic. Daniel Salazar*

*A mis amigos*

## **DEDICATORIA**

A mis padres, esposa y en especial a mi hija

## SÍNTESIS

**Introducción/Objetivos:** *Staphylococcus aureus* es una causa importante de infecciones neonatales de inicio en la comunidad, problemática que se agrava ante la emergencia de aislados de la bacteria resistentes a meticilina (SARM) como agente etiológico. En Cuba existe poca información al respecto, por lo que abordar aspectos microbiológicos de las infecciones por SARM de inicio en la comunidad en neonatos resulta imprescindible en la práctica pediátrica.

**Materiales y Métodos:** Estudio observacional de corte transversal realizado en el período 2010-2013 en el Hospital Pediátrico “Juan Manuel Márquez” (HPJMM), en el que se incluyeron 105 aislamientos responsables de infecciones neonatales por SARM de inicio en la comunidad. Para la confirmación de SARM se emplearon los métodos de difusión con discos de cefoxitina, microdilución en caldo para oxacilina y cefoxitina, y la prueba de látex Slidex MRSA Detection (Biomérieux, Francia). Mediante reacción en cadena de la polimerasa se determinó la presencia de la Leucocidina de Pantón Valentine (LPV).

**Resultados/Discusión:** Se demostró alta prevalencia de infecciones por SARM y así mismo se puso de manifiesto resistencia elevada a eritromicina (85,7%) y ciprofloxacino (75,2%). La detección de un 16,2% de resistencia a gentamicina, así como un 13,3% a la clindamicina, constituye un signo de alarma. La susceptibilidad para vancomicina ratifica la recomendación de su empleo como antimicrobiano de primera línea en el tratamiento. Los genes que codifican para la LPV se detectaron en 87,5% de los aislamientos, lo que apunta a un origen comunitario de las cepas.

**Conclusiones:** Las infecciones neonatales de inicio en la comunidad por SARM productor de LPV son frecuentes en el HPJMM, lo que demanda la implementación de un sistema de vigilancia activa y control.

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>AAC:</b> Enzimas con actividad acetiltransferasa	<b>IRAB:</b> Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas
<b>ACME:</b> Elemento móvil catabólico de arginina	<b>ISS:</b> Secuencia del sitio de integración
<b>AIDS:</b> Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas	<b>IV:</b> Vía intravenosa
<b>ANT:</b> Enzimas con actividad nucleotidiltransferasa	<b>LPV:</b> Leucocidina de <i>Panton Valentine</i>
<b>APH:</b> Enzimas con actividad fosfotransferasa	<b>MET:</b> Etest macrométodo
<b>BHI:</b> Infusión cerebro corazón	<b>MH:</b> <i>Mueller Hinton</i>
<b>BORSA:</b> <i>S. aureus</i> con resistencia de bajo nivel o resistencia <i>borderline</i> a la oxacilina	<b>MLS<sub>B</sub>:</b> Fenotipo macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B
<b>ccr:</b> Recombinasas del casete cromosómico	<b>MLST:</b> <i>Multilocus Sequence Typing</i> , siglas en inglés
<b>CDC:</b> Centro para el Control de Enfermedades	<b>MS<sub>B</sub>:</b> Fenotipo de resistencia a macrólidos y estreptograminas del grupo B
<b>CLSI:</b> <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i> , siglas en inglés. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio de EUA	<b>ORF:</b> Fragmento de lectura abierta
<b>CMI:</b> Concentración mínima inhibitoria	<b>PAP:</b> <i>Population analysis profile</i> , siglas en inglés. Perfil de Análisis Poblacional
<b>cMLS<sub>B</sub>:</b> Fenotipo constitutivo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B	<b>PBP:</b> Proteína de unión a la penicilina
<b>erm:</b> <i>Erythromycin ribosome methylase</i> , siglas en inglés	<b>RCP:</b> Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>Etest:</b> <i>Elipsometric Test</i> , siglas en inglés. Prueba del Elipsómetro	<b>SARM:</b> <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
<b>EUA:</b> Estados Unidos de América	<b>SARM - AC:</b> SARM adquirido en la comunidad
<b>GISA:</b> <i>S. aureus</i> con susceptibilidad disminuida a glicopéptidos	<b>SARM - AG:</b> SARM asociado al ganado
<b>GRD:</b> <i>Glycopeptide Resistance Detection</i> , siglas en inglés.	<b>SARM - AH:</b> SARM asociado a la asistencia sanitaria
<b>HC:</b> Historia Clínica	<b>SARM - AHCC:</b> SARM asociado a la atención sanitaria de comienzo en la comunidad
<b>HPJMM:</b> Hospital Pediátrico "Juan Manuel Márquez"	<b>SASM:</b> <i>S. aureus</i> sensible a meticilina
<b>hVISA:</b> <i>S. aureus</i> heterorresistente a la vancomicina	<b>SCC<sub>mec</sub>:</b> <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i> , siglas en inglés. Casete Cromosómico Estafilocócico <i>mec</i>
<b>IAAS:</b> Infecciones asociadas a la asistencia sanitaria	<b>SIDA:</b> Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<b>iMLS<sub>B</sub>:</b> Fenotipo inducible de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B	<b>ST:</b> Secuencia tipo
<b>IPK:</b> Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"	<b>UCI:</b> Unidad de Cuidados Intensivos
<b>IPTB:</b> Infecciones de piel y partes blandas	<b>UFC:</b> Unidades formadoras de colonias
<b>ISQ:</b> Infección del sitio quirúrgico	<b>VINCat:</b> Sistema de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales en Hospitales de Cataluña
	<b>VISA:</b> <i>S. aureus</i> con susceptibilidad intermedia a vancomicina
	<b>VO:</b> Vía oral
	<b>VRSA:</b> <i>S. aureus</i> resistente a vancomicina

## TABLA DE CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Objetivos .....	5
<b>II. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>7</b>
2.1. Generalidades.....	7
2.2. Resistencia a la meticilina (oxacilina) en <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
2.2.1. Evolución de la resistencia a la meticilina en <i>S. aureus</i> .....	8
2.2.2. Bases moleculares de la resistencia a meticilina .....	9
2.2.3. Expresión y detección de la resistencia a meticilina .....	13
2.2.3a. Resistencia <i>borderline</i> a la oxacilina.....	15
2.3. Epidemiología de las infecciones por <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (SARM) .....	16
2.3.1. Infecciones por SARM asociado a la atención sanitaria .....	19
2.3.2. Infecciones por SARM adquirido en la comunidad.....	20
2.4. Mecanismos de resistencia de aislamientos de SARM a antimicrobianos no betalactámicos .....	26
2.4.1. Mecanismos de resistencia a glicopéptidos .....	26
2.4.2. Mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos.....	29
2.4.3. Mecanismos de resistencia a los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B .....	29
2.4.4. Mecanismos de resistencia a linezolid .....	31
2.4.5. Resistencia a quinolonas .....	33
2.4.6. Resistencia a tetraciclinas .....	33
2.4.7. Resistencia a cloranfenicol .....	34

2.4.8. Resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol .....	34
2.4.9. Resistencia a rifampicina.....	35
2.5. Tratamiento de las infecciones por SARM en la clínica pediátrica.....	35
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
3.1. Diseño general del estudio.....	39
3.2. Operacionalización de las variables.....	39
3.3. Confirmación de la identificación como <i>S. aureus</i> de los aislamientos procedentes del Hospital Pediátrico “Juan Manuel Márquez” (HPJMM) .....	44
3.4. Confirmación de los aislamientos como SARM.....	45
3.4.1. Detección de la resistencia a la cefoxitina .....	45
3.4.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de oxacilina .....	45
3.4.2a. Preparación de las placas para la determinación de la CMI .....	45
3.4.2b. Preparación del inóculo .....	47
3.4.2c. Inoculación de las placas de microdilución .....	48
3.4.2d. Incubación de las placas y lectura de los resultados .....	49
3.4.3. Determinación de la CMI para cefoxitina .....	49
3.4.4. Detección de la proteína PBP2a .....	49
3.5. Determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos no betalactámicos .....	50
3.5.1. Detección fenotípica de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B .....	50
3.6. Detección de los genes que codifican para la Leucocidina de <i>Panton Valentine</i> (LPV).....	51
3.6.1. Extracción de ADN.....	51

3.6.2. Detección de LPV por Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	52
3.6.3. Controles.....	54
3.7. Análisis de los resultados y procesamiento estadístico .....	54
3.7.1. Cálculo de la prevalencia de resistencia a la meticilina entre aislamientos de <i>S. aureus</i> responsables de infecciones en el servicio de Neonatología del HPJMM .....	54
3.7.2. Descripción de variables demográficas, clínicas y terapéuticas relacionadas con las infecciones por SARM.....	55
3.7.3. Relación entre la producción de LPV y algunas variables clínicas ....	55
3.8. Consideraciones éticas .....	55
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
4.1. Confirmación de la resistencia a meticilina .....	57
4.2. Prevalencia de las infecciones neonatales por SARM en el HPJMM.....	58
4.3. Resistencia antimicrobiana a antibióticos no betalactámicos.....	63
4.3.1. Perfiles de resistencia antimicrobiana.....	74
4.4. Descripción de variables demográficas, clínicas y terapéuticas relacionadas con las infecciones por SARM en el HPJMM.....	76
4.5. Detección de los genes que codifican para la LPV .....	83
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>91</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>

## **ANEXOS**

# ***Introducción***

### I. INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo comensal y patógeno, tanto de humanos como de varias especies de animales (1). Constituye la especie más virulenta e importante desde el punto de vista clínico dentro del género. Debido a su alto grado de patogenicidad es una de las principales causas de infecciones nosocomiales y responsable de una amplia gama de entidades nosológicas, tales como: lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios, artritis séptica, osteomielitis, endocarditis, síndrome del shock tóxico, meningitis, neumonías, infección del tracto urinario, entre otras (2).

Desde la descripción clásica de la enfermedad estafilocócica y el reconocimiento del papel de la bacteria en la formación de abscesos, constituye uno de los patógenos más significativos y versátiles de la especie humana, no solo por las enfermedades que ocasiona, sino por lo compleja que se hace la terapéutica de estas. Se sitúa entre las bacterias con mayor capacidad de desarrollar resistencia a los antimicrobianos a través de múltiples mecanismos intrínsecos o adquiridos (3-5).

El fenómeno de la resistencia en *S. aureus* se puso de manifiesto desde el mismo inicio de la era antibiótica, cuando en 1946, solo dos años después del uso ampliado de la penicilina, emergieron las cepas productoras de betalactamasas; pero es sin lugar a dudas la resistencia a la meticilina uno de los mecanismos de mayor impacto clínico y terapéutico, pues significó un importante punto de inflexión en el tratamiento de las enfermedades debidas a esta bacteria (3, 4).

Las infecciones por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) inicialmente se incrementaron de forma rápida en el contexto de las infecciones asociadas con el sistema sanitario. Posteriormente y a nivel internacional se reportan nuevas cepas entre pacientes sin los factores de riesgo clásicos conocidos y con características moleculares distintas que le diferencian de las resistentes a meticilina asociadas a los cuidados sanitarios (SARM-AH), denominadas SARM adquirido en la

comunidad (SARM - AC), que afectan principalmente a individuos jóvenes. Estos informes alertan sobre la emergencia, rápida diseminación y gravedad de este microorganismo y enfatizan que es responsable en gran parte del incremento de la carga de enfermedad observada en la última década. Algunos estudios señalan que es particularmente importante en la población pediátrica y varían desde infecciones de la piel y tejidos blandos a infecciones de las vías respiratorias inferiores y de la circulación sanguínea, y se asocian con una morbilidad significativa y costos hospitalarios considerables. Se calcula que las personas infectadas por SARM tienen una probabilidad de morir un 64% mayor que las infectadas por cepas no resistentes (3, 4, 6-8).

A diferencia de lo que ocurre en poblaciones de adultos, varios estudios señalan una incidencia elevada de las infecciones invasivas en niños pequeños, incluso brotes en unidades de cuidados intensivos neonatales asociados tanto a SARM de origen hospitalario como comunitario. Se reporta una tendencia al incremento de las infecciones de comienzo tardío por SARM en neonatos previamente sanos en varios países, destacándose la presencia de infección materna recurrente y por cepas productoras de Leucocidina de *Panton Valentine* (LPV), toxina a la que se asocia una mayor virulencia, aunque no demostrada en todos los estudios. A pesar de esto existen escasos reportes en este grupo de edad (8-12).

En Cuba, investigaciones conducidas por algunos grupos de trabajo proporcionan datos que revelan la circulación de SARM tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad (13-15). Un estudio conjunto entre Holanda (Hospital Canisius-Wilhelmina, Nijmegen) y Cuba (IPK y Hospital "Hermanos Ameijeiras"), aborda la epidemiología molecular de SARM y revela cepas de origen comunitario como causa de infecciones asociadas a la atención sanitaria. Otra investigación más reciente que incluyó aislamientos de SARM procedentes de cuatro hospitales cubanos evidenció la circulación predominante de cepas relacionadas genéticamente con el clon USA300 de SARM-AC, principal agente de infecciones en los Estados Unidos (EUA) (16-18).

Sin embargo, existe desconocimiento respecto a la incidencia de infecciones por SARM entre la población pediátrica cubana y en particular en la etapa neonatal, y el peso de estas en la morbi-mortalidad neonatal. A la inexistencia de datos validados nacionalmente acerca de la tasa de infecciones asociadas a la atención sanitaria y comunitarias por SARM se añade la carencia de información para definir si el nivel de control de estas está en relación con las exigencias de las recomendaciones internacionales (19, 20). Los patrones de resistencia a antibióticos tampoco son conocidos más allá de los datos obtenidos por cada uno de los laboratorios de Microbiología de los diferentes hospitales del país.

Considerando todos estos antecedentes y el reporte de los primeros aislamientos de SARM con susceptibilidad intermedia y resistente a la vancomicina en Latinoamérica, en la presente investigación se propone un acercamiento a la situación clínica y microbiológica de las infecciones por SARM en neonatos ingresados en el Hospital Pediátrico “Juan Manuel Márquez” (HPJMM). Estudios previos en esta institución revelan que la circulación de SARM constituye una problemática en aumento, pero no existen datos específicos de su prevalencia en las infecciones neonatales (17, 21-24).

Para dar respuesta a esta interrogante se plantea una investigación con los siguientes objetivos:

### 1.1. OBJETIVOS

1. Definir la prevalencia de infecciones neonatales por *S. aureus* resistente a la meticilina en el Hospital Pediátrico “Juan Manuel Márquez”.
2. Determinar la susceptibilidad de los aislamientos de *S. aureus* resistente a la meticilina responsables de infecciones neonatales a los antimicrobianos no betalactámicos recomendados para el tratamiento.
3. Describir variables demográficas, clínicas y terapéuticas de las infecciones neonatales por *S. aureus* resistente a la meticilina en el período de estudio.
4. Demostrar el predominio de aislados productores de Leucocidina de *Panton Valentine* entre los aislamientos de *S. aureus* resistente a la meticilina responsables de infecciones neonatales en el Hospital Pediátrico “Juan Manuel Márquez”.

***Marco Teórico***

## II. Marco Teórico

### 2.1. Generalidades.

La denominación del género *Staphylococcus* fue asignada por Ogston en 1883 y deriva del griego *staphylé* (“en racimo de uvas”), debido a la morfología que adoptan las células en las tinciones que se realizan a partir de cultivos en medios de agar. Agrupa 51 especies distintas y a su vez, *S. aureus* está dividida en dos subespecies: *S. aureus* subsp. *aureus* y *S. aureus* subsp. *Anaerobius*. En la edición de 1986 del Manual *Bergey* estaba incluido en la familia *Micrococcaceae*, pero estudios genéticos posteriores y el análisis quimio-taxonómico documentaron su diversidad y lo reubicaron en la línea filogenética de *Bacillus/Lactobacillus/Streptococcus*. La clasificación taxonómica de los estafilococos quedó de la siguiente forma (2, 25):

- **Dominio:** Bacteria
- **Filo XIII:** Firmicutes
- **Clase I:** Bacilli
- **Orden I:** Bacillales
- **Familia VIII:** Staphylococcaceae
- **Género I:** *Staphylococcus*

Dentro del género, *S. aureus* es el mejor exponente de supervivencia y adaptación al medio ambiente debido a la gran capacidad para desarrollar resistencia a los antimicrobianos y a la diversidad de factores que regulan su virulencia. Así por ejemplo, la resistencia antibiótica exhibida por linajes de *S. aureus* adaptados a animales debe ser considerada una gran amenaza para la salud pública, pues estos pueden adaptarse al hospedero humano. La transmisión persona a persona es la forma más usual de diseminación y ocurre a través del contacto con

secreciones procedentes de lesiones en piel, descarga nasal o a través de las manos (1).

*S. aureus* es un microorganismo ubicuo, con predilección por la piel, glándulas cutáneas y membranas mucosas de mamíferos. En el ser humano, coloniza la piel y las mucosas de distintas localizaciones del cuerpo. El lugar más frecuente de colonización se encuentra en la parte anterior de las fosas nasales, seguidas del área perineal-ingles, de la orofaringe y de las axilas (1).

### **2.2. Resistencia a la meticilina (oxacilina) en *S. aureus*.**

En la mayoría de los aislamientos de estafilococos la resistencia a la oxacilina es mediada por el gen *mecA*, que codifica para la proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a, también denominada PBP2'), que tiene baja afinidad de unión a todos los betalactámicos. Aislamientos con test positivo para *mecA* o PBP2a deben ser reportados como resistentes a oxacilina. De igual modo, aislamientos resistentes a oxacilina por Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), CMI de cefoxitina, o test de difusión por disco de cefoxitina también deben ser reportados como resistentes a la oxacilina. Los mecanismos no mediados por el gen *mecA* son raros, e incluyen al nuevo gen homólogo *mecC* (26) .

#### **2.2.1. Evolución de la resistencia a la meticilina en *S. aureus*.**

Entre 1959-1960 se introduce y comercializa en Europa la meticilina, penicilina semisintética que resiste la acción de la betalactamasa que degrada la penicilina. Sin embargo, ya en 1961 aparecen los primeros aislamientos de SARM realizados por Jevons y Knox en Inglaterra y dos años más tarde se produce el primer brote epidémico de infección nosocomial en el Reino Unido. Después de una diseminación inicial durante los años 60 declinó casi hasta cero en los años 70, para reaparecer a mediados de la década del 80 donde se produce una segunda onda de infección que se extiende por los hospitales de Europa, Australia y EUA, aunque con una distribución desigual (7).

A finales de los años 80 se informan cepas de *S. aureus* en las que la resistencia a meticilina se acompaña de resistencia a otros grupos antibióticos, incluyendo cloranfenicol, tetraciclina, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas. En 1993 se notificaron infecciones por cepas de SARM sin resistencia acompañante y entre individuos para los cuales no se identificaron factores de riesgo; por ejemplo entre aborígenes australianos que habitaban en comunidades lejanas y que no habían sido previamente hospitalizados. Posteriormente, en 1999, se notificaron en EUA cuatro casos de niños que fallecieron con infecciones graves por SARM - AC (3, 4).

### **2.2.2. Bases moleculares de la resistencia a meticilina.**

En respuesta a la terapia con betalactámicos *S. aureus* adquirió dos determinantes de resistencia: el gen *blaZ* que codifica para una betalactamasa que confiere resistencia solo a las penicilinas y el gen *mecA*, de localización cromosómica y adquisición exógena. El control de la transcripción de ambos determinantes de resistencia es regulado por genes represores homólogos (*blaI* y *mecI*) y genes reguladores de la señal de transducción (*blaR1* y *mecR1*, respectivamente). El sistema regulador *bla* interrumpe eficientemente la fuerte represión mediada por *mecI* sobre *mecA*, permitiendo la expresión óptima de la resistencia (27, 28).

La transcripción del gen *mecA* se produce cuando el betalactámico llega a la célula y se une al receptor-dominio de unión a penicilina en la membrana citoplasmática, codificado por el gen *mecR1*. Se desencadena entonces una señal que induce a la proteasa autocatalítica a unirse a *mecI*, el cual está bloqueando la región operadora de *mecA*. De esta manera queda libre el operador de *mecA* y es posible la expresión de PBP2a (28, 29).

Se han descrito además otros genes de naturaleza cromosómica que no están comprendidos en el gen *mec* y que son esenciales para la expresión fenotípica de la resistencia, denominados genes *fem* A-F (factores esenciales para la expresión

de la resistencia a meticilina). Estos se han detectado tanto entre cepas de *S. aureus* sensibles como resistentes. También se reconocen los genes cromosómicos *chr*, cuyas mutaciones conducen a una resistencia de alto nivel a meticilina. La resistencia de alto nivel a los betalactámicos es más elevada cuanto mayor es el número de mutaciones que se producen en el gen *mecA* y en su secuencia reguladora, mientras que las mutaciones cromosómicas en una zona ajena a estos genes juegan un papel mucho menor (28, 29).

La secuenciación de nucleótidos de la región circundante al gen *mecA* reveló que estaba situado en un elemento genético móvil designado como *SCCmec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*), integrado en el cromosoma bacteriano en el extremo 3' del fragmento de lectura abierta (ORF) *orfX*. Su movilidad se debe a la presencia de dos genes específicos únicos, *ccrA* y *ccrB*, que codifican las denominadas recombinasas del casete cromosómico A y B, responsables de su integración y escisión (28).

Estudios adicionales sobre la estructura de los elementos de *SCCmec* muestran que este es muy diverso en su organización estructural y contenido genético. Sin embargo, todos los elementos de *SCCmec* comparten varias características: a) portan el gen *mecA* como parte del complejo genético *mec*, b) presencia de genes *ccr* (*ccrAB* o *ccrC*) como componentes del complejo genético *ccr*, c) integración en un sitio específico en el cromosoma estafilocócico, conocido como secuencia del sitio de integración de SCC (ISS: *integration site sequence*), que sirve como el blanco para la recombinación mediada por *ccr*, y d) presencia de secuencias terminales en los extremos, repetidas, directas y mayormente inversas. Contienen además tres regiones de unión (J1, J2, J3, previamente conocidas como "junkyard", "regiones chatarras"), que se localizan entre y alrededor de los complejos genéticos *mec* y *ccr* (28).

De forma curiosa, las regiones cromosómicas con secuencias directas e inversas - repetidas - conservadas, pero sin complejos genéticos *ccr* y *mec*, ocasionalmente se encuentran integrados en la ISS. Este elemento se considera como precursor o

remanente de SCC, y se describe como  $\Psi$ SCC. Así por ejemplo, el elemento móvil catabólico de arginina (ACME: *Arginine Catabolic Mobile Element*) identificado en la cepa USA300, se conoce como  $\Psi$ SCC. Los tamaños de los elementos  $\Psi$ SCC son muy diversos y oscilan desde 105 bp en el  $\Psi$ SCC<sub>h1435</sub> identificado en la cepa *S. hemolyticus* JCSC1435 hasta 32 kb en el ACME. A este elemento se atribuye la exitosa diseminación del clon USA300 de *S. aureus* y aunque su función no se ha precisado aún, si se ha demostrado que aumenta la habilidad para colonizar la piel y membranas mucosas en ratones (28, 30, 31).

Descubrimientos recientes aumentan significativamente el entendimiento sobre la diversidad del elemento SCC<sub>mec</sub> y su contribución en la evolución de SARM (32). Múltiples tipos de elementos SCC parecen haber evolucionado a través de transferencias genéticas horizontales repetidas entre varias especies de estafilococos. Durante los últimos años se han identificado genes homólogos al *mecA* en varias especies de estafilococos, así como en otros microorganismos estrechamente relacionados con el género (28).

La recombinación entre los complejos de genes *mec* y *ccr* diversifican al elemento SCC<sub>mec</sub>. Cinco complejos de genes *mec* y ocho complejos *ccr* se combinan para generar los 11 tipos de SCC<sub>mec</sub> que se reconocen hasta la fecha (28, 33). Los elementos SCC<sub>mec</sub> I-VIII se identificaron a partir de cepas de SARM aisladas de humanos. Los tipos IX, X y XI y el Tipo V(5&5C2) fueron identificados a partir de SARM asociados al ganado (SARM - AG), surgieron recientemente y se extendieron en todo el mundo (28).

El origen del SCC<sub>mec</sub> continúa siendo desconocido, aunque probablemente se haya adquirido a partir de otras especies de estafilococos diferentes a *S. aureus*. Trabajos recientes sugieren considerable homología del gen *mecA* con genes *mec* presentes en estafilococos cuagulasa negativa, perteneciente al grupo de *S. sciuri*, el cual no se encuentra con frecuencia en humanos, pero se aísla de animales y productos alimenticios. Interesantemente, aunque *S. sciuri* contiene el gen *mecA* (79,5% de homología en su secuencia de ADN y un 87,8% en la de los

aminoácidos) se mantiene sensible a la meticilina porque este no se expresa, debido a que carece de los genes reguladores *mecR1* y *MecI*. Más recientemente, un grupo de investigadores japoneses notaron que tres de las cuatro especies del grupo *S. sciuri* (*S. sciuri*, *S. vitulinus* y *S. fleurettii*, pero no *S. lentus*) contienen el gen *mecA* con grados de variabilidad en la homología con el gen *mecA* encontrado en la cepa de SARM N315. De las tres especies, solo *S. fleurettii* expresa *in vitro* la resistencia a la meticilina y tiene elevada homología (99,8% identidad de nucleótidos) con la cepa N315; esto apoya la hipótesis de que *S. fleurettii* es el origen del gen *mecA*, lo que unido al descubrimiento del nuevo gen *mecA* homólogo, *mecC* en SARM aislados del ganado y *mecB* en macrococos, refuerza la importancia de la transferencia activa de genes *mecA* homólogos intra e interespecies y elementos *SCCmec* entre estafilococos y especies bacterianas relacionadas (33-36).

Se han descrito en aislados de *S. aureus* y de estafilococos coagulasa negativa sensibles a la meticilina varios casetes “SCC no-mec”, provistos de una recombinasa funcional. Así, algún aislado de estafilococo sensible a la meticilina provisto de un casete SCC no-mec podría haber adquirido el complejo del gen *mec* de un aislado de *S. fleurettii*, tras haber estado sometido a una presión antibiótica. Asimismo, puesto que *S. fleurettii* es una especie saprófita en animales, la formación del *SCCmec* podría haber ocurrido inicialmente en animales y, a partir de ellos, pasar a los aislados de *S. aureus* humanos (36).

El mecanismo a través del cual los elementos *SCCmec* pueden ser transferidos no está claro. Algunos autores reportan estudios *in vitro* de transformación y transducción mediada por fagos. Mediante este último mecanismo no se pueden transferir *SCCmec* mayores de 45 kb, por lo tanto no es probable que algunos elementos *SCCmec* como el tipo II y tipo V(5C2&5) sean transferidos por eventos de transducción. En este sentido, a nivel mundial se debatió la posibilidad de la contribución de plásmidos conjugativos como portadores de la resistencia a la meticilina. Finalmente, si la transducción sirvió como un mecanismo de

transferencia horizontal del gen *mecA*, este debió haberse establecido en un elemento *SCCmec* único de pequeño tamaño en el cromosoma de *S. aureus* sensible a la meticilina. Posterior a múltiples eventos de recombinación se formaron elementos *SCCmec* grandes, tales como el tipo II y tipo V(5C2&5) (28).

### **2.2.3. Expresión y detección de la resistencia a meticilina.**

*S. aureus* normalmente contiene cuatro PBPs, de las cuales las PBPs 1, 2 y 3 son esenciales. La resistencia a la meticilina debida a la adquisición del gen *mecA* o *mecC*, que codifican para la producción de PBP2a y PBP2c, respectivamente, implica resistencia a todos los betalactámicos (penicilinas, combinaciones de betalactámico con inhibidor de betalactamasa, cefalosporinas, y carbapenémicos), con excepción de las nuevas cefalosporinas, ceftobiprole y ceftarolina, que presentan valores de CMI relativamente bajos frente a estafilococos resistentes a la oxacilina, debido a su gran afinidad por la PBP2a y probablemente también para PBP2c. El mecanismo que permite a PBP2a resistir a la mayoría de los antibióticos está relacionado con un sitio alostérico, es decir, un sitio muy lejano al sitio activo de la enzima pero capaz de controlar su activación. Estudios recientes muestran que el incremento de la CMI para ceftarolina está asociado con una disminución en la afinidad por la PBP2a, como consecuencia de alteraciones en esta proteína (37-43).

La expresión fenotípica de la resistencia es compleja y se afecta por diferentes factores como la temperatura, el pH, la osmolaridad, la presencia de secuencias cromosómicas reguladoras y de otros genes cromosómicos no relacionados. Se pueden diferenciar dos tipos de cepas de SARM, unas con resistencia homogénea y otras con resistencia heterogénea (37, 38).

En las cepas que presentan resistencia homogénea o de alto nivel a la oxacilina, la mayor parte de la población expresa la resistencia. Sin embargo, la expresión fenotípica de la resistencia a la meticilina generalmente es heterogénea (CMI de oxacilina 1-16 µg/mL). En las cepas con expresión heterogénea solo una pequeña

proporción de la población ( $\leq 0,1\%$ ) sobrevive con concentraciones de oxacilina superiores a  $10 \mu\text{g/mL}$ , mientras que la mayor parte no es viable con bajas concentraciones del antimicrobiano ( $1\text{-}5 \mu\text{g/mL}$ ). La mayoría de los aislamientos clínicos presentan este patrón de heterorresistencia bajo las condiciones rutinarias de cultivo. Sin embargo, las cepas heterogéneas pueden aparecer como homogéneas bajo ciertas condiciones como el crecimiento en un medio hipertónico (suplementado con 2% de NaCl) o la incubación a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Estos cambios en la expresión de la resistencia bajo diferentes condiciones de cultivo son transitorios y fenotípicos (37, 38).

La cefoxitina es un marcador alternativo de la presencia de *mecA/mecC* ya que es un inductor más potente del sistema regulatorio de *mecA/mecC*; induce una mejor expresión del gen y en consecuencia mejora también la detección de la resistencia a la metilina en el laboratorio. Por otra parte es más estable que la oxacilina durante la conservación. La utilización del disco de cefoxitina es especialmente útil y de preferencia sobre el disco de oxacilina para detectar la resistencia a oxacilina en las cepas heterorresistentes (37, 38).

El fenotipo de resistencia a la metilina en *S. aureus* se puede detectar en el laboratorio mediante la técnica de difusión con discos de cefoxitina ( $30 \mu\text{g}$ ) o por microdilución en caldo para oxacilina y cefoxitina; para este caso se utiliza el medio *Mueller Hinton* (MH) ajustado con cationes y suplementado con 2% de NaCl. Se requiere un inóculo equivalente al 0,5 de la escala de *McFarland* y 24 horas completas de incubación en atmósfera aerobia a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . La incubación a temperaturas superiores a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  puede interferir en la detección de la resistencia a la metilina en los estafilococos. Una cepa de *S. aureus* se considera resistente a oxacilina cuando la CMI de oxacilina es  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ . Cuando se emplea cefoxitina se interpreta como resistente a todo aislamiento con halo de inhibición  $\leq 21 \text{ mm}$  o CMI  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$  lo que indica la presencia de *mecA/mecC* y por tanto, la resistencia a todos los betalactámicos. Por el contrario, la sensibilidad a cefoxitina en

*S. aureus* (halo  $\geq 22$  mm, CMI  $\leq 4$   $\mu\text{g/mL}$ ) descarta la presencia del gen *mecA/mecC* (37, 38).

También se puede emplear el método de *screening plate* (dilución en agar), utilizando agar MH suplementado con 4% de NaCl y 6  $\mu\text{g/mL}$  de oxacilina e incubación por 24 horas entre 33 - 35 °C. El crecimiento de al menos una colonia o un crecimiento fino confirma la resistencia a oxacilina (37, 38).

A pesar de que las cepas con heterorresistencia suelen mostrarse como sensibles a muchos betalactámicos, cuando se realiza un antibiograma esta interpretación puede conducir a fracasos terapéuticos. Las cepas con resistencia homogénea a la oxacilina presentan alto nivel de resistencia cruzada a todos los betalactámicos incluyendo las penicilinas, cefalosporinas, y carbapenémicos (37, 38).

Para identificar en el laboratorio la resistencia a la oxacilina mediada por el gen *mecA* se pueden utilizar también reactivos de látex o ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral para determinar la proteína PBP2a o Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) para detectar el gen *mecA* (37, 38, 44, 45). También han sido diseñados medios cromogénicos (*MRSA ID*, *MRSA Screen*, *MRSASelect*<sup>™</sup>) para la identificación de SARM, incluso evaluados para el aislamiento de SARM - AG (46). Con el nuevo descubrimiento del gen *mecC* la comunidad científica internacional se propuso la tarea de desarrollar métodos que permitieran su identificación a partir de aislamientos clínicos. Los métodos de RCP que se usaron inicialmente no fueron discriminatorios, pues detectaban simultáneamente la presencia de ambos genes y requerían una RCP convencional adicional para *mecA*, y así distinguirlo del genotipo *mecA*<sub>LGA251</sub>. Recientemente se han descrito métodos de RCP simples y múltiples para su detección, incluso en tiempo real (47-50).

### **2.2.3a. Resistencia *borderline* a la oxacilina.**

Las cepas de *S. aureus* con resistencia de bajo nivel o resistencia *borderline* a la oxacilina (*borderline oxacillin-resistant Staphylococcus aureus*, BORSA) se

caracterizan por CMI de oxacilina en el punto de corte de resistencia o una dilución por encima de este (4-8 µg/mL). Pueden ser divididas en dos categorías en función de la presencia o ausencia del gen *mecA* o *mecC*. Si no los contienen, esta resistencia de bajo nivel puede deberse a la hiperproducción de la betalactamasa estafilocócica o a la modificación (hiperproducción o alteración) de las PBPs 1, 2, 3, 3' o 4 (37, 38).

Las cepas que hiperproducen betalactamasa son sensibles a las asociaciones de betalactámico con inhibidor de betalactamasa (ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam). Para detectar las cepas BORSA se recomienda el estudio en paralelo de la susceptibilidad frente a un disco de oxacilina (1 µg) y otro con oxacilina y clavulánico (a concentración de 4 µg). Si se produce ampliación del halo de inhibición utilizando este último, podría presumirse que el mecanismo de resistencia implicado es la hiperproducción de penicilinasa. No obstante, algunas cepas de *S. aureus* pueden ser sensibles al ácido clavulánico, incluso a una concentración de 1 µg, por lo que esta prueba no será siempre concluyente. Las cepas *borderline mecA* o *mecC* negativas son sensibles a la cefoxitina (halo  $\geq$  22 mm), y por ende a todos los betalactámicos (37, 38).

No existen datos clínicos que sugieran que el nivel de resistencia expresado por las cepas *borderline mecA/mecC* negativas conduzca al fracaso terapéutico y los datos obtenidos en estudios en animales demuestran que la oxacilina es eficaz en el tratamiento de infecciones causadas por este tipo de cepas. Algunas parecen producir una metilinasasa capaz de hidrolizar la metilina en ausencia del gen *mecA/mecC*, pero su relevancia y el gen responsable no se conocen (37, 38).

### **2.3. Epidemiología de las infecciones por SARM.**

Las infecciones por SARM son responsables de más muertes en los EUA cada año que el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El Centro para el Control de Enfermedades (CDC, siglas en inglés) estima que en el año 2011 ocurrieron 80 461 infecciones invasivas por SARM y 11 285 muertes relacionadas.

Así mismo, la Oficina Nacional de Estadísticas de Inglaterra reportó 1 629 muertes por este microorganismo durante el 2005. En el Reino Unido causó 1 652 muertes en el 2006, cifra muy superior a la notificada en 1993 (solo 51 casos). Tasas elevadas también se notifican en la mayoría de los países africanos: Nigeria (29,6%), Kenia (27,7%), Camerún (21,3%) y Marruecos (14,4%) (51-55).

La mayoría de los aislamientos de SARM a nivel mundial se agrupan en un limitado número de clones, algunos de los cuales están relacionados con epidemias globales. Dentro de estos se encuentran el ST239 en Asia y América del Sur y ST8 en los EUA (56). Los aislamientos de SARM se clasifican como asociados a la asistencia sanitaria (SARM - AH), SARM - AC y más recientemente SARM - AG, que son a menudo relacionados con ciertos clones y factores de virulencia (57, 58).

En el año 2000, el CDC de Atlanta define como caso de infección por SARM - AC a toda infección por SARM diagnosticada en pacientes no internados o dentro de las primeras 48 horas de hospitalización, si el paciente carece de factores de riesgo asociados con la atención sanitaria, como: hemodiálisis, cirugía, residente en un centro de larga estancia u hospitalización durante el año previo (excluida la estancia hospitalaria en el momento del nacimiento), la presencia de un catéter o un dispositivo percutáneo en el momento del cultivo, o aislamiento previo de SARM en el paciente (12, 59-61). Esta definición fue modificada más tarde con la intención de excluir el aislamiento previo de SARM como criterio de SARM - AH (4).

Dada la compleja epidemiología de los aislamientos de SARM - AC en el entorno hospitalario y la circulación de SARM - AH en la comunidad, no es posible establecer una clara diferenciación entre estos dos tipos de cepas. Investigadores del CDC proponen entonces clasificar las infecciones atendiendo al lugar donde comienzan y aparece una tercera categoría, la de infecciones por SARM asociados a la atención sanitaria de comienzo en la comunidad (SARM - AHCC), en la que se incluyen los casos que pueden ser infecciones por SARM - AH por la

historia de exposición al entorno hospitalario, pero tienen comienzo en la comunidad. Este esquema de clasificación en tres categorías tiene sus limitaciones porque una historia de exposición al ambiente hospitalario no excluye la posibilidad de la adquisición de SARM en la comunidad (4, 61).

En el entorno animal, las infecciones por SARM representan también un problema en incremento en los últimos 10 años, inicialmente como causa de enfermedad clínica en animales de compañía y caballos. Algunos de los clones de SARM - CA emergentes en Europa están relacionados con los animales, especialmente con los cerdos. Este fenómeno se ha estudiado sobre todo en países como Holanda, Alemania y Dinamarca y se define con la categoría SARM - AG, que incluye principalmente cepas pertenecientes a la línea clonal 398 (ST398, descrito por primera vez en el año 2005 y de origen porcino). Este tipo de cepas también se ha detectado en España y generalmente son resistentes a tetraciclina, por lo que puede constituir un buen marcador inicial de sospecha en aislamientos de *S. aureus* implicados en infecciones de piel y tejidos blandos (IPTB), especialmente si existe relación profesional con animales (58, 62, 63).

El fenómeno de la resistencia a meticilina en *S. aureus* es cada vez mayor y se hizo más evidente a partir de la descripción de aislamientos de SARM en muestras de ganado en el Reino Unido y aislamientos clínicos humanos procedentes del Reino Unido, Irlanda y Dinamarca que albergan un gen distinto homólogo al *mecA*, llamado *mecC* (antes *mecA<sub>LAGA251</sub>*), localizado en un nuevo elemento *SCC<sub>mec</sub>* designado con tipo IX. Este tiene aproximadamente 70% de similitud con el gen *mecA* y codifica para una PBP (PBP2c) con menos de 63% de identidad de aminoácidos con la PBP2a. Los aislamientos de SARM positivos para el gen *mecC* representan un problema potencial para la salud pública, porque no pueden ser detectados empleando los test diagnósticos utilizados para detectar el gen *mecA* y la proteína PBP2a a través de la RCP y test de aglutinación con partículas de látex, respectivamente (47, 57, 58, 62, 64-66).

El descubrimiento inicial del gen *mecC* reveló que aislamientos de ganado y humanos en proximidad geográfica estaban altamente relacionados, lo que sugiere la transmisión entre los dos. Trabajos más recientes han demostrado que está presente en aislamientos procedentes de diferentes complejos clonales, definidos por MLST: 49, 130, 425, 599 y 1943, presentes en humanos y un amplio rango de especies de animales en Europa. Estos incluyen ganado, ovejas, perros, gatos, conejillos de indias, conejos, ratas, erizos, nutrias, liebres, lince, entre otros; así como de aislamientos clínicos humanos procedentes de Irlanda, Inglaterra, Escocia, Dinamarca, Alemania, Suecia, Noruega, Francia, Suiza, Bélgica y los Países Bajos (48, 57, 67-70).

Otras investigaciones demuestran que en los aislamientos en los cuales se ha detectado el gen *mecC*, no se detectan los genes que codifican para la LPV. Adicionalmente, todos se revelan susceptibles al resto de los antimicrobianos diferentes a los betalactámicos (57, 62, 67-69).

### **2.3.1. Infecciones por SARM asociado a la atención sanitaria.**

Los aislamientos de SARM - AH portan un elemento *SCCmec* estructuralmente más grande, perteneciente a los tipos I, II, III y más recientemente al tipo VIII. Son resistentes a varias clases de antibióticos no betalactámicos y portan con frecuencia significativamente menor los genes que codifican para la LPV. Generalmente se recuperan de personas que han estado expuestas al ambiente hospitalario y entre pacientes adultos con una o más comorbilidades asociadas (4, 71).

Las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (IAAS) continúan siendo una gran carga para la sociedad. Solo en Europa afectan a más de 4 millones de pacientes anualmente y se estima que causan 16 millones de días-cama adicionales, responsables de 7 billones de euros en costos médicos directos. Una revisión sistemática de múltiples artículos científicos revela que los modelos de

transmisión de las IAAS ganan en complejidad y que la gran mayoría de los estudios se enfocan en la transmisión de SARM en el ambiente hospitalario (72).

Desde su aparición este microorganismo ha ido aumentando su prevalencia y diseminado paulatinamente en los países occidentales, primero en el nosocomio y después en la comunidad en el marco del concepto «adquisición de infección asociada a la atención sanitaria de comienzo en la comunidad». Por ejemplo, en España a partir del primer aislamiento de SARM en San Sebastián, en 1977, la prevalencia no ha dejado de aumentar de forma significativa, hasta situarse en la última década por encima del 30%, convirtiéndose en una situación endémica en muchos hospitales (6).

Las causas de la emergencia de SARM son múltiples y entre ellas destacan la situación del hospedero (comorbilidad, institucionalización, etc.), las malas prácticas en el control de la infección y la presión de tratamiento antimicrobiano. Esta problemática alcanza una mayor envergadura ante la pérdida de sensibilidad a la mayoría de los antibióticos empleados en el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* (macrólidos, lincosamidas, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y cloranfenicol), quedando disponibles escasas alternativas, entre ellas los glicopéptidos (6).

SARM - AH ocupa un lugar destacado entre las bacterias responsables de infecciones del sitio quirúrgico (ISQ), úlceras por presión y del pie diabético, bacteriemias y neumonía asociada a la ventilación mecánica. En las fascitis necrotisante suele formar parte de la flora polimicrobiana que las causa, pero es muy raro como agente único (6, 33).

### **2.3.2. Infecciones por SARM adquirido en la comunidad.**

La epidemiología de las infecciones por *S. aureus* en la comunidad está muy revisada, pero la mayoría de las publicaciones se relacionan con la emergencia de SARM-AC en EUA, donde actualmente es responsable del 80% de las infecciones de piel y tejidos blandos en la comunidad. Además, se está convirtiendo en un

importante patógeno nosocomial, constituyendo en algunas regiones el responsable de más de la mitad de los casos de infección por SARM intrahospitalarios (7, 73, 74).

En otras partes del mundo la epidemiología de SARM-AC es menos conocida, existen pocos estudios de estas infecciones en niños y aunque se habla de su emergencia a nivel mundial, la situación varía notablemente en diferentes áreas geográficas.

Los aislamientos de SARM - AC se distinguen de su contraparte, los aislamientos de SARM - AH, por medio de estudios moleculares. Portan elementos *SSCmec* pequeños que no incorporan otros genes de resistencia a antibióticos diferentes del *mecA*, muy frecuentemente *SCCmec* tipo IV y otros tipos (V - VII). Las infecciones que producen tienden a ocurrir en pacientes jóvenes previamente sanos y predominantemente son IPTB, aunque también puede ocasionar varios síndromes clínicos graves como neumonía necrotizante y sepsis severa (4, 71).

En diversos estudios se señala que los aislamientos de SARM - AC se multiplican más rápidamente que los de SARM - AH. Esto guarda relación con el tamaño del genoma y una mayor susceptibilidad a los antimicrobianos pues el gasto metabólico necesario para generar multirresistencia compite con el necesario para la multiplicación celular. Poseen distintos factores de virulencia: proteína adhesiva del colágeno, superantígenos, enterotoxinas, toxinas exfoliativas, bacteriocinas, proteína A, alfa-hemolisinas y la LPV (4, 6).

La LPV fue descrita por primera vez en 1894 por Van de Velde y se demostró asociada a IPTB en 1932 por Panto *et al.* Es una toxina específica de *S. aureus* con actividad leucocitotóxica y dermonecrótica debida a la presencia de dos componentes: la subunidad luk-S PV (codificada por el gen *lukS-PV*) que se une al receptor de los leucocitos y los macrófagos y la subunidad luk-F PV (codificada por el gen *lukF-PV*) que produce la apertura de los canales de calcio de la membrana celular, altera la permeabilidad de esta y provoca la lisis celular. Los

genes *lukF-PV* y *lukS-PV* se pueden diseminar entre cepas por medio de bacteriófagos y se encontraban en menos del 5% de los aislamientos de *S. aureus* antes del advenimiento de la emergencia de las infecciones por SARM - AC, a mediados de la década de 1990 (4, 71, 75). Actualmente se cuestiona su papel en la gravedad de estas infecciones y se investigan nuevos factores asociados que podrían conferir un mayor grado de virulencia o contribuir a la gravedad de las infecciones por *S. aureus* productor de LPV. Recientemente se han descrito en modelos murinos otros determinantes como las modulinas solubles en fenol y el elemento móvil catabólico de arginina (71).

Desde el punto de vista clínico las cepas LPV positivas tienden a causar furunculosis (93%), abscesos cutáneos (50%) e incluso neumonías, de forma rápida y progresiva con un alto grado de fatalidad. Sin embargo, en otro tipo de infecciones, como las endocarditis, síndrome de shock tóxico y mediastinitis se detectan cepas SARM LPV negativas. Es por esto que el rol determinante de la LPV como factor de virulencia aún es motivo de controversia y se estudia la posible combinación de su acción con otros factores de virulencia, principalmente la co-participación de la proteína A y las hemolisinas alfa y gamma. Adicionalmente se analiza también el papel de genes reguladores de expresión de diferentes factores de virulencia, por ejemplo el gen *agr que* regula la expresión de varias hemolisinas, leucocidinas y la propia LPV (39).

Las infecciones por SARM - AC, excepcionales hace una década, comenzaron a diseminarse en EUA y otros países. En un inicio involucraba a colectivos de individuos en contacto más o menos estrecho: niños y jóvenes en los que causaba fundamentalmente infecciones cutáneas graves, a personas que practicaban deportes de contacto, y a usuarios de drogas por vía parenteral, homosexuales, prisioneros, personal militar, comunidades religiosas, individuos portadores de tatuajes y vagabundos. Posteriormente se extendieron a toda la comunidad e investigaciones recientes lo consideran como la etiología más frecuente de las infecciones cutáneas supuradas (6).

Las infecciones por SARM - AC se informan por ejemplo entre jugadores de fútbol rugby, lucha libre y esgrima, lo que guarda relación con el hecho de que cualquier pérdida de la integridad de la piel constituye el factor de riesgo más significativo para adquirirla. Otros factores de riesgo incluyen contactos estrechos y compartir toallas, bálsamos y equipos (76).

En los EUA el incremento en la prevalencia de SARM - AC se debe en gran parte a la expansión de un solo clon, designado como USA300. En Europa, donde la prevalencia de las infecciones por este agente es mucho menor, el clon más común es el ST80 (33). El primer reporte de SARM - AC en Latinoamérica fue en el año 2001 en un hospital de Uruguay, donde Galiana *et al.* informaron infecciones en cuatro niños en los que no se constataban los factores de riesgo clásicos del SARM - AH (77).

La mayoría de las infecciones por este microorganismo afectan a la piel y los tejidos blandos. La furunculosis es la más frecuente y en su forma más característica exhibe un centro de color violáceo, expresión de la necrosis asociada, que se relaciona con la presencia de la LPV. Con frecuencia se forman abscesos y placas celulíticas (50 - 70%). Más raramente se presentan en forma de impétigo, pústulas o nódulos, o síndrome de la piel escaldada, que se relaciona con la presencia de toxinas exfoliativas. Aunque el proceso suele quedar localizado en la zona cutánea puede extenderse y causar bacteriemia, shock séptico y un síndrome similar al shock tóxico estreptocócico pero producido por otras toxinas, ya que habitualmente no se detecta el gen *tst* que codifica la toxina 1 estreptocócica (6).

Otra de las manifestaciones características del SARM - AC productor de toxinas tipo LPV es la neumonía, descrita inicialmente en niños e individuos jóvenes. La afectación pulmonar a menudo es multilobar y, a diferencia de la causada por SARM - AH, suele progresar con rapidez, se absceda y puede cursar con hemorragia y acompañarse de bacteriemia, shock séptico, distrés respiratorio y una elevada mortalidad. En la necropsia suele observarse una neumonía

necrosante hemorrágica bilateral, que también obedece a la presencia de alfa-hemolisinas y otras toxinas (6).

Otras manifestaciones menos frecuentes son: piomiositis, artritis séptica, osteomielitis y endocarditis, en cuya patogenia juega un papel importante la proteína adhesiva del colágeno (6). La osteomielitis causada por cepas de *S. aureus* productores de LPV tienen mayor severidad y se caracteriza por una frecuencia mayor de abscesos subperiósteos e intraóseos, así como enfermedad multifocal y trombosis venosa profunda (78).

La enfermedad estafilocócica en los neonatos está reconocida desde hace siglos, cuando se describió en 1773 el pénfigo neonatal. Las manifestaciones clínicas en esta etapa de la vida dependen de dos factores fundamentales: la edad gestacional del neonato (alto riesgo de infección los bajo peso al nacer) y el aislamiento de estafilococo causante de infección (particular relevancia SARM – AC) (79).

Las infecciones neonatales invasivas más frecuentes son la bacteriemia y la sepsis. La sepsis neonatal puede ser de inicio temprano o tardío y se caracteriza fundamentalmente por: hipotermia (más común que la fiebre y a menudo es observada como el signo inicial), apnea, bradicardia, cianosis, alimentación pobre, distensión abdominal, diarrea, letargo, irritabilidad, entre otros. La bacteriemia se observa con mayor frecuencia en prematuros y se relaciona con el uso de catéter, infecciones de piel y tejidos blandos, neumonía, infecciones osteoarticulares y meningitis. También pueden ocurrir enfermedades mediadas por toxinas incluyendo el síndrome de la piel escaldada estafilocócico, el síndrome de shock tóxico (SST) y la enfermedad exantemática parecida al SST neonatal. El SST es causado por una toxina pirogénica que actúa como superantígeno. Estos incluyen la toxina 1 del SST y varias enterotoxinas, con mayor frecuencia el serotipo B o C (79).

Históricamente *S. aureus* ha sido el patógeno bacteriano predominante de endocarditis neonatal, pero reportes recientes indican que los estafilococos coagulasa negativa son más comunes. En los recién nacidos pretérminos y los que tienen alguna cardiopatía congénita es donde más se desarrollan las endocarditis por *S. aureus* asociadas a bacteriemia. Los síntomas y signos que se pueden presentar en esta entidad son inespecíficos y similares a los de otras enfermedades como la sepsis y las cardiopatías congénitas, incluyen distres respiratorio, taquicardia y alimentación pobre. La presentación clínica en general puede ser indistinguible de una bacteriemia con endocarditis a un neonato con bacteriemia sin endocarditis (79).

Las infecciones de piel son las manifestaciones más comunes de la enfermedad estafilocócica en neonatos a término. Aproximadamente dos tercios se presentan con celulitis o abscesos y el tercio restante con pustulosis (79).

La infección de las mamas es otra de patologías ocasionadas por *S. aureus* en este período de la vida. Esta suele ocurrir durante la segunda semana de la vida y se presenta generalmente con aumento de volumen de la glándula mamaria, inflamación, eritema y rubor. Puede o no drenar de forma espontánea absceso. El manejo incluye tratamiento antimicrobiano sistémico y el drenaje quirúrgico cuidadoso del absceso, particularmente en neonatos del sexo femenino (79).

La infección umbilical (onfalitis) puede ser invasiva, aunque, el espectro de presentación clínica es variado. Puede ir desde una funisitis hasta una inflamación extensa de la pared abdominal con eritema y fascitis necrotizante. Desde el punto de vista clínico se separa en cuatro categorías: 1- funisitis y secreción umbilical, 2- onfalitis con celulitis de la pared abdominal, 3- onfalitis con sepsis sistémica y 4- onfalitis con fascitis (79).

## 2.4. Mecanismos de resistencia de aislamientos de SARM a antimicrobianos no betalactámicos.

### 2.4.1. Mecanismos de resistencia a glicopéptidos.

Los estafilococos en general mantienen una elevada sensibilidad a los glicopéptidos, sin embargo, se han descrito aislamientos con sensibilidad disminuida a vancomicina y teicoplanina. Una cepa de *S. aureus* se define con susceptibilidad intermedia (VISA) cuando la CMI de vancomicina, determinada por el método de microdilución en caldo, es de 4-8 µg/mL. Asimismo, se considera que una cepa es resistente a vancomicina (VRSA) si la CMI es  $\geq 16$  µg/mL. Las cepas VISA pueden presentar susceptibilidad disminuida o resistencia a la teicoplanina, por lo que hoy suele utilizarse el término GISA (*S. aureus* con susceptibilidad disminuida a glicopéptidos) para definir las (26, 37).

Aunque no existe un consenso para considerar a un aislado de *S. aureus* como heterorresistente (hVISA o *heterogeneous vancomycin-intermediate S. aureus*) en general se acepta que este fenómeno está presente cuando la CMI está en el rango sensible (CMI  $\leq 2$  µg/mL), pero para una proporción de las células de la población está en el rango intermedio. Sin embargo, solo por el resultado de CMI de vancomicina no se puede predecir hVISA. Además, los aislados de *S. aureus* con una CMI de vancomicina de 4 a 8 µg/mL son infrecuentes, aquellas con CMI de 2 µg/mL son relativamente frecuentes (37, 80).

Los aislamientos VISA y hVISA se comunicaron por vez primera en Japón y posteriormente se aislaron en otras áreas geográficas (EUA, Europa, Hong Kong, Corea y España). Recientemente se reportó el primer caso en Argentina de un aislamiento de *S. aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad, con sensibilidad intermedia a la vancomicina y no sensibilidad a la daptomicina. De manera general, estas cepas se aíslan con una frecuencia muy baja y fundamentalmente después de un tratamiento prolongado con glicopéptidos (24, 81).

La aparición de aislados con este fenotipo obedece a alteraciones en la estructura del peptidoglucano de la pared celular, lo que conduce a un engrosamiento de esta, lo que determina un secuestro de las moléculas del glicopéptido, impidiendo su unión a los restos D-alanina-D-alanina (diana de actuación de estos antimicrobianos). Las cepas GISA presentan además un aumento de la expresión de la PBP2a, e incluso una disminución de la sensibilidad a la daptomicina, debido probablemente a la dificultad para alcanzar su diana de acción (membrana citoplasmática) (42, 81).

Las cepas VISA y hVISA manifiestan los dos tipos de expresión de la resistencia a los glicopéptidos en *S. aureus*: a) expresión homogénea (CMI de vancomicina 8-16 µg/mL) y b) expresión heterogénea (CMI 1-4 µg/mL). Las cepas con expresión heterogénea son más frecuentes y en ellas la población resistente está presente con una frecuencia de  $< 10^5$  a  $10^6$ . Su detección resulta muy difícil con los métodos habituales en los que se utiliza un inóculo de  $5 \times 10^4$  UFC por pocillo (método de microdilución) o de  $1 \times 10^4$  UFC por depósito (método de dilución en agar). Por otra parte, las cepas con el fenotipo de sensibilidad intermedio tienen una escasa estabilidad en ausencia de glicopéptidos, de manera que con frecuencia revierten al fenotipo sensible tras sucesivos subcultivos en medios que no contienen glicopéptidos en su composición (37, 42).

Aunque se han evaluado varios métodos para el cribado de las cepas de estafilococos con resistencia intermedia o con heteroresistencia a los glicopéptidos es difícil la confirmación. En ocasiones sus características morfológicas son diferentes a las de las cepas sensibles, con apariencia de cultivos mixtos de colonias grandes y pequeñas de pigmentación variable, por eso se debe determinar la sensibilidad a la vancomicina en cada uno de los diferentes morfotipos (80, 82).

Para detectar las cepas VISA se debe determinar la CMI por dilución en caldo o mediante la prueba del Elipsómetro (*Elipsometric Test*, Etest) o bien mediante el cribado en una placa de agar infusión cerebro corazón (BHI) con 6 µg/mL de

vancomicina e incubación por 24 horas. Hay que tener en cuenta que las CMI's obtenidas mediante Etest suelen ser siempre una dilución superior a las obtenidas por microdilución y que el método que define a una cepa como VISA es este último (37, 81).

En las infecciones graves por *S. aureus* existe una evidente asociación entre CMI's  $\geq 4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  de vancomicina y el fracaso terapéutico, y entre este y la detección de cepas heterorresistentes. Muchas de las cepas VISA descritas con una CMI de vancomicina de 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se desarrollaron bajo presión selectiva de la vancomicina en pacientes tratados con este antimicrobiano en los que fracasó el tratamiento. Debido a la naturaleza inestable de este fenotipo, cuando las cepas se analizan repetidamente en el laboratorio, la CMI puede descender hasta 1-2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , por lo que es aconsejable determinar la CMI del primer aislamiento del paciente (42, 80).

Aunque se describen múltiples métodos para la detección en los laboratorios de microbiología de las cepas hVISA, este es un problema. Entre los métodos recomendados están: cribado en agar BHI más 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de vancomicina, en agar BHI más 3 o 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de vancomicina, o en agar MH más 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de teicoplanina o 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de vancomicina, el análisis poblacional (*Population analysis profile*, PAP), etest macrométodo (MET) y etest GRD (*Glycopeptide Resistance Detection*). La regla de oro para la identificación de las cepas hVISA es el PAP, pero por su complejidad solo es posible realizarlo en laboratorios de referencia. Esta técnica permite detectar el fenotipo hVISA en cepas de *S. aureus* con CMI de vancomicina tan bajas como 0,5 - 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (80, 82, 83).

En el año 2002 se informaron los dos primeros aislamientos de VRSA por el mecanismo transferible *vanA* en los EUA. Hasta el año 2012 se notificaron once aislamientos de VRSA, nueve de los cuales se identificaron fundamentalmente en el estado de Michigan en los EUA, uno en Irán y otro en la India. En general, causaron principalmente IPTB en pacientes con enfermedades crónicas subyacentes. En el 2013 el Laboratorio de Microbiología del Hospital de Clínicas

de la Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo, notificó a la OPS/OMS sobre el primer hallazgo de VRSA, en Brasil que al mismo tiempo constituye también el primero en América Latina (23).

### **2.4.2. Mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos.**

Se han descrito distintos mecanismos de resistencia bacteriana a los aminoglucósidos: disminución de la entrada del antibiótico a la célula, modificación de la diana ribosomal, expulsión activa del antibiótico y modificación enzimática, pero este último mecanismo es el más frecuente en *Staphylococcus* spp (37, 81).

Existen tres familias de enzimas citoplasmáticas capaces de modificar este grupo de antimicrobianos: enzimas con actividad fosfotransferasa (APH), enzimas con actividad acetiltransferasa (AAC) y enzimas con actividad nucleotidiltransferasa (ANT). Los lugares de acción de estas enzimas varían según el tipo de antibiótico aminoglucósido. El nivel de resistencia antibiótica que estas enzimas confieren varía significativamente entre microorganismos en función de distintos factores como la cantidad de enzima sintetizada, la eficacia catalítica y el tipo de sustrato sobre el que actúe. Los fenotipos de resistencia a aminoglucósidos más frecuentes en *Staphylococcus* spp. y las enzimas modificantes asociadas son: resistencia a estreptomina asociada a la producción de ANT(6'), resistencia a amikacina y kanamicina asociada a la producción de APH(3')-III, resistencia a estreptomina, amikacina y kanamicina asociada a la producción de ANT(6') y APH(3')-III, resistencia a tobramicina, amikacina y kanamicina asociada a la producción de ANT(4')-I y resistencia a gentamicina, tobramicina, amikacina, kanamicina y netilmicina asociada a la producción de AAC(6')-APH(2'') (37, 81).

### **2.4.3. Mecanismos de resistencia a los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B (MLS<sub>B</sub>).**

Los macrólidos (M), junto con las lincosamidas (L) y las estreptograminas B (S<sub>B</sub>) son tres grupos de antimicrobianos de estructuras químicas diferentes pero con mecanismos de acción similares. En *S. aureus* la resistencia a los macrólidos

(eritromicina, claritromicina, azitromicina, midecamicina) puede asociarse a diferentes fenotipos de sensibilidad o de resistencia a las lincosamidas (clindamicina), que se pueden identificar en el laboratorio mediante el método de difusión con discos de eritromicina y clindamicina o mediante dilución en caldo, utilizando una combinación de ambos antimicrobianos. Los fenotipos que se observan mediante difusión con discos son:

- Resistencia a la eritromicina y a la clindamicina: resistencia constitutiva a la eritromicina y a la clindamicina (fenotipo cMLS<sub>B</sub>)
- Resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina pero con un achatamiento del halo de la clindamicina en la proximidad de la eritromicina (D-test positivo): resistencia constitutiva de expresión inducible (fenotipo iMLS<sub>B</sub>)
- Resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina sin achatamiento del halo (D-test negativo): resistencia a la eritromicina mediada por una bomba de expulsión activa (fenotipo MS<sub>B</sub>)
- Resistencia a la clindamicina y sensibilidad a la eritromicina debido a la acción de enzimas que inactivan las lincosamidas (codificadas por los genes *Inu*), aunque es poco frecuente (37, 81).

Los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos del grupo MLS<sub>B</sub> que subyacen bajo los cuatro fenotipos de resistencia anteriormente indicados pueden resumirse en:

- 1) Modificación de la diana (ARNr 23S): Mediante la metilación o mutación de un residuo de adenina localizado en la subunidad 23S del ARN ribosomal. Como consecuencia, los antibióticos del grupo MLS<sub>B</sub> no pueden fijarse en la secuencia diana y se obtiene resistencia cruzada a los tres grupos de antibióticos (fenotipo MLS<sub>B</sub>). Las enzimas con acción metilasa son codificadas principalmente por genes *erm* (erythromycin ribosome methylase, *ermA*, *ermB*,

*ermC*, entre otros) y en raras ocasiones por el gen *cfr*. Los genes *ermA* y *ermB* forman parte de transposones de integración cromosómica, mientras que *ermC* es de localización plasmídica.

- 2) Expulsión activa del antimicrobiano relacionado con diferentes genes de codificación plasmídica del tipo *msrA*. Son sistemas complejos con especificidad para la expulsión de macrólidos de 14 y 15 átomos y estreptograminas B (fenotipo MS<sub>B</sub>). La clindamicina no es sustrato de estos sistemas de expulsión activa, por lo que conserva su actividad antibacteriana.
- 3) Inactivación del antimicrobiano (genes de tipo *InuA*, *vatA*, *vatB*, *vatC*, *vgbA*, *vgbB*). El gen *InuA* confiere resistencia a lincosamidas y los genes *vat* y *vgb* a estreptograminas.
- 4) Modificación de la diana por mutación del ARNr 23S y/o de proteínas ribosómicas (37, 81).

Otros fenotipos que se pueden detectar pero que son infrecuentes son: L, LS<sub>A</sub>, SA y S<sub>B</sub> (resistencia a lincosamidas y estreptograminas del grupo A y B, respectivamente) por mecanismos de inactivación, expulsión activa del antibiótico o por modificación de la diana. La inactivación se debe principalmente a lincosamida-nucleotidiltransferasas codificadas por tres genes (*InuA*, *InuB* y *InuC*), mientras que la modificación de la diana se debe a una metilasa codificada por el gen *cfr* que conduce a una resistencia combinada a clindamicina, cloranfenicol o florfenicol, oxazolidinonas, pleuromutilinas y a estreptograminas del grupo A (37, 81).

#### **2.4.4. Mecanismos de resistencia a linezolid.**

El uso clínico del linezolid se aprobó desde el año 2000 y se ha convertido en una opción terapéutica primordial en las infecciones por bacterias grampositivas, incluido SARM. Se utiliza fundamentalmente para el tratamiento de las infecciones complicadas o no de la piel y tejidos blandos y para la neumonía adquirida en la

comunidad y el hospital por patógenos grampositivos. Es también indicado para el tratamiento de infecciones por *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (84).

En el laboratorio se pueden observar tres fenotipos de resistencia al linezolid en estafilococos: a) resistencia cruzada al linezolid y a las pleuromutilinas; b) resistencia cruzada al linezolid, los fenicoles, las pleuromutilinas, las lincosamidas y la estreptogramina A; y c) resistencia cruzada al linezolid, los macrólidos y el cloranfenicol. Estos se corresponden con los tres tipos de mecanismos de resistencia que han sido descritos para el linezolid y en general para las oxazolidinonas (37, 81, 84-86):

- a) Mutaciones nucleotídicas en el dominio V del ARNr 23S (gen *rrn*) muy diversas pero fundamentalmente del tipo Gly2447Thr, Thr2500Ala y Gly2576Thr (23S RNA G2576U, reportada en estafilococos y enterococos), siendo esta última la más frecuente. Este es el mecanismo de resistencia más usual y los niveles de resistencia aumentan en función del número de copias del gen ARNr 23S afectadas, que suelen ser cinco o seis en los estafilococos.
- b) Adquisición plasmídica del gen *cfr* que codifica la producción de una metiltransferasa ribosómica y que confiere resistencia a cinco clases de antimicrobianos (fenicoles, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptogramina A).
- c) Mutaciones en los genes (*rpIC* y *rpID*) que codifican las proteínas L3 y L4 de la subunidad ribosómica 50S, poco frecuentes.

Diversas combinaciones de estos mecanismos pueden coexistir en una misma cepa. En el primer caso generalmente se observan CMI de linezolid elevadas (> 32 µg/mL) aunque también pueden ser inferiores dependiendo del número de alelos mutados; para el caso de la resistencia mediada por el gen *cfr* algunas cepas pueden presentar CMI en el rango de sensibilidad ( $\leq$  4 µg/mL), por ello siempre que se sospecha resistencia al linezolid es necesario analizar

conjuntamente los resultados de sensibilidad al resto de los antimicrobianos afectados por este mecanismo. Además, al tratarse de un mecanismo de resistencia transferible, si no se detecta precozmente, hay riesgo de transmisión a otras cepas si no se implantan las medidas adecuadas (37, 84).

### **2.4.5. Resistencia a quinolonas.**

El principal mecanismo de resistencia a fluoroquinolonas consiste en mutaciones en las dianas de acción del antibiótico, en concreto en la ADN topoisomerasa IV (*ParC* y *ParE*) y en la ADN-girasa (*GyrA* y *GyrB*). Asimismo, la resistencia puede estar ocasionada a mutaciones en el gen *norA*, responsable de un mecanismo de expulsión activa (37).

No todos los compuestos tienen la misma potencia frente a la ADN-girasa y la topoisomerasa IV por lo que existen importantes diferencias en la actividad de las distintas fluoroquinolonas frente a *Staphylococcus* spp. Las mutaciones responsables de la resistencia se suelen producir primero en los genes que codifican la diana primaria (para la mayoría de compuestos la topoisomerasa IV, *ParC*) y a continuación la diana secundaria (habitualmente la ADN-girasa, *GyrA*) (37).

Entre las fluoroquinolonas disponibles las menos activas son norfloxacin y ciprofloxacino, seguidas de ofloxacino, levofloxacino y esparfloxacino y de moxifloxacino y gemifloxacino, estas últimas son las que presentan mayor actividad (37).

### **2.4.6. Resistencia a tetraciclinas.**

La resistencia a tetraciclina y doxiciclina en *Staphylococcus* spp. es bastante frecuente y puede ser debida a dos mecanismos: aumento de la expulsión activa y protección del ribosoma. El primer mecanismo está codificado por los genes *tetK* y *tetL* y el segundo por los genes *tetM* y *tetO* (81).

La resistencia mediada por *tetK* afecta solo a la tetraciclina, aunque confiere resistencia inducible a doxiciclina; mientras que la mediada por *tetM* implica resistencia cruzada a tetraciclina, doxiciclina y minociclina. La resistencia a tetraciclina no se puede utilizar como marcador de resistencia a todo el grupo (81, 87).

### **2.4.7. Resistencia a cloranfenicol.**

El cloranfenicol es un antibiótico bacteriostático que actúa inhibiendo la transpeptidación en la síntesis proteica, al unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. La resistencia a esta droga en *S. aureus*, es debida a su modificación enzimática por la acción de una acetiltransferasa mediada por plásmidos (88).

### **2.4.8. Resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol (cotrimoxazol).**

Debido a que el 95%–100% de los aislamientos de SARM-AC son susceptible in vitro al cotrimoxazol, este se ha convertido en una importante opción terapéutica contra las infecciones de piel y tejidos blandos adquiridas en la comunidad. No es recomendado en el tercer trimestre del embarazo, ni en lactantes menores de dos meses (87).

Las sulfamidas actúan interfiriendo la síntesis del ácido tetrahidrofólico pues constituyen análogos competitivos del ácido paraminobenzoico, esencial en la síntesis de aminoácidos y nucleótidos. Por su parte, el trimetoprim es un análogo del ácido dihidrofólico, que actúa en un paso posterior a las sulfamidas, impidiendo la reducción enzimática de este a ácido tetrahidrofólico. En *S. aureus* la resistencia a sulfamidas se produce por aumento de la producción de ácido paraminobenzoico gracias a una mutación cromosómica. En cambio, la resistencia al trimetoprim puede responder a una menor afinidad de la enzima dihidrofolatorreductasa por el antibiótico, o a un aumento de su producción. La resistencia es mucho más común a las sulfamidas, pero la combinación de ambos fármacos resulta sinérgica (88).

#### **2.4.9. Resistencia a rifampicina.**

La rifampicina inhibe la síntesis bacteriana de ARN a través de la unión a la ARN polimerasa. El mecanismo de resistencia depende de alteraciones (inserciones, supresiones o mutaciones puntuales) en el gen *rpoB*, que codifica para la subunidad  $\beta$  de la enzima ARN polimerasa (89).

#### **2.5. Tratamiento de las infecciones por SARM en la clínica pediátrica.**

En la Tabla 2.1 se exponen las recomendaciones de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (AIDS, siglas en inglés) para el manejo de los principales síndromes clínicos encontrados en la clínica pediátrica (87).

El tratamiento de estas entidades comprende el drenaje de los abscesos, el desbridamiento del tejido necrótico, la extracción de los cuerpos extraños (incluye los catéteres vasculares) y la administración de antibióticos. La selección y la dosis inicial de los fármacos dependen de la localización de la infección, la gravedad del proceso y la probabilidad de participación de cepas resistentes (90, 91). En consecuencia es fundamental conocer los patrones de resistencia local para iniciar el tratamiento.

Las bacteriemias, endocarditis, neumonías y otras infecciones graves requieren terapéutica intravenosa prolongada con vancomicina. Este antibiótico resulta eficaz frente a la mayoría de las infecciones por SARM - AC y en algunas infecciones graves se puede asociar con rifampicina o aminoglucósidos (87, 92).

Tang *et al.* realizaron un estudio *in vitro* con el objetivo de comparar la eficacia antibacteriana de antibióticos antiestafilocócicos en combinación con fosfomicina o rifampicina en infecciones asociadas a la formación de biofilm. Este reveló que la fosfomicina aumenta la actividad de linezolid, minociclina, vancomicina y teicoplanina. Estas combinaciones terapéuticas son incluso mejores que los regímenes combinados con rifampicina, y pueden proporcionar ventajas terapéuticas en infecciones relacionadas con catéter y prótesis articulares (93).

Tabla 2.1. Recomendaciones de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas para el tratamiento de las infecciones pediátricas por SARM.

Entidad clínica	Tratamiento
<b>Abscesos, furúnculos y carbunco</b>	Incisión y drenaje
<b>Celulitis purulenta</b>	Vía oral (VO): clindamicina, cotrimoxazol, doxiciclina, minociclina y linezolid
<b>Celulitis no purulenta</b>	VO: clindamicina, amoxicilina + cotrimoxazol o tetraciclina, linezolid
<b>IPTB complicada</b>	Vancomicina (Intravenosa-IV), linezolid (VO/IV), clindamicina (VO/IV)
<b>Bacteriemia</b>	Vancomicina (IV), daptomicina (IV)
<b>Endocarditis infecciosa de válvula nativas</b>	Vancomicina (IV), daptomicina (IV)
<b>Endocarditis infecciosa de válvulas protésicas</b>	Vancomicina + gentamicina + rifampicina (IV) Reemplazo quirúrgico de la válvula
<b>Neumonía</b>	Vancomicina (IV), linezolid (VO/IV), clindamicina (VO/IV)
<b>Osteomielitis</b>	Desbridamiento y drenaje quirúrgico. Vancomicina (IV), daptomicina (IV), linezolid (VO/IV), clindamicina (VO/IV). Algunos autores recomiendan añadir rifampicina
<b>Artritis séptica</b>	Desbridamiento y drenaje quirúrgico del espacio articular. Vancomicina (IV), daptomicina (IV), linezolid (VO/IV), clindamicina (VO/IV)
<b>Meningitis</b>	Vancomicina, linezolid. Algunos expertos recomiendan añadir rifampicina

En la etapa neonatal la terapia empírica dependerá de la resistencia local, de la severidad de la infección y del perfil de toxicidad de los antibióticos disponibles para este periodo de la vida. La vancomicina y la clindamicina constituyen las

principales opciones terapéuticas frente a las infecciones por SARM – AC. El cotrimoxazol puede ser considerado una opción terapéutica en infecciones leves, siempre y cuando no existan antecedentes de íctero fisiológico prolongado. El linezolid es otra de las alternativas terapéuticas disponibles y es de mucha utilidad en la neumonía e infecciones complicadas o no de la piel y tejidos blandos (79).

En el siglo pasado los antibióticos proporcionaron un gran beneficio para la salud humana pero ahora la diseminación de la resistencia antimicrobiana constituye un gran reto para la salud en siglo XXI. Nuevas estrategias para combatir las infecciones por SARM deben ser aplicadas de forma urgente. En este sentido, algunos autores han identificado una sorprendente hendidura en la armadura bacteriana, que en un futuro puede permitir el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para combatir las infecciones por este agente: la inhibición del primer paso en la biosíntesis del ácido teicoico re-sensibiliza a SARM a los betalactámicos (94).

En los últimos años se ha constatado la escasa actividad de los tratamientos antibióticos habitualmente recomendados, esencialmente con glicopéptidos, frente a las infecciones producidas por microorganismos Gram positivos, sobre todo SARM, a pesar de mostrar valores de CMI por debajo del punto de corte de sensibilidad. Los fenómenos de tolerancia (evento genético por el cual una población bacteriana no muere o muere muy lentamente en presencia de un antimicrobiano bactericida), persistencia (estado fenotípico no heredable y transitorio por el que una subpoblación bacteriana sobrevive a concentraciones letales de un antimicrobiano con independencia de su mecanismo de acción) y heterorresistencia (fenómeno epigenético por el que se aíslan subpoblaciones isogénicas con menor sensibilidad cuando la población bacteriana se somete a concentraciones por encima del valor de la CMI) han sido en parte señalados como causantes de este hecho. Los nuevos antimicrobianos, entre ellos la daptomicina, se ven menos afectados por este tipo de fenómenos y deben considerarse de elección cuando se demuestre o sospeche su presencia (95).

# ***Materiales y Métodos***

### III. Materiales y Métodos

#### 3.1. Diseño general del estudio.

Se realizó un estudio observacional de corte transversal en el HPJMM, en conjunto con el Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas (IRAB) del IPK, en el período Enero 2010 – Julio 2013.

El universo estuvo constituido por el total de aislamientos de SARM (105 aislamientos) recuperados a partir de muestras clínicas de neonatos (edad de 0 a 28 días) atendidos en el servicio de Neonatología. Solo se incluyó el primer aislado de un paciente en un mismo año de estudio. Los aislados de SARM se detectaron a través del método de Bauer y Kirby empleando discos de oxacilina (1 µg) o cefoxitina (30 µg), en función de la disponibilidad de estos durante el período de estudio.

El traslado de los aislamientos al IPK se realizó en tubos 100 x 13 mm con agar nutriente, teniendo en cuenta las normas de bioseguridad establecidas para el transporte de material infeccioso. En el laboratorio de IRAB se procedió a la confirmación de la identificación y a la conservación en caldo triptona soya con glicerol al 15% a -70 °C para la posterior caracterización microbiológica con base en la detección fenotípica de la resistencia a la meticilina y la presencia del gen *mecA*, así como para la realización de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana y determinación de los genes que codifican para la LPV mediante RCP.

#### 3.2. Operacionalización de las variables.

Las variables que se analizaron en el estudio se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Variables demográficas, clínicas y epidemiológicas consideradas durante el estudio de las infecciones neonatales por SARM en el HPJMM, 2010 - 2013.

Variable	Tipo	Descripción	Categorías	Indicador
<b>Clasificación de la infección por SARM según lugar de inicio</b>	Cualitativa nominal politómica	Según criterios establecidos por el CDC(61)	<b>Infecciones por SARM - AH:</b> Cuando el aislamiento de SARM se obtiene durante o después del cuarto día calendario de hospitalización.	<b>Frecuencias absolutas y relativas</b>
			<b>Infecciones por SARM-CAH:</b> aislamiento de SARM en un paciente ambulatorio o antes del cuarto día calendario de hospitalización, y con uno o más de los siguientes factores de riesgo: historia de hospitalización (excluida la estancia hospitalaria en el momento del nacimiento) o cirugía en el año previo, presencia de un catéter vascular central durante dos días antes del cultivo	

Tabla 3.1. Continuación

Variable	Tipo	Descripción	Categorías	Indicador
<b>Clasificación de la infección por SARM según lugar de inicio</b> (continuación)			<b>Infecciones por SARM-AC:</b> aislamiento de SARM en un paciente ambulatorio o antes del cuarto día calendario de hospitalización, con ausencia de los criterios antes mencionados	
<b>Edad</b>	Cuantitativa continua	Edad biológica medida en años o meses cumplidos	0 - 6 días, 7 -13 días, 14 – 20 días, 21 a 28 días	<b>Frecuencias absolutas y relativas</b>
<b>Sexo</b>	Cualitativa nominal dicotómica	En dependencia del sexo biológico	Femenino Masculino	<b>Frecuencias absolutas y relativas</b>
<b>Color de la piel</b>	Cualitativa nominal politómica	Pigmentación de la piel	Blanco Negro Mestizo	<b>Frecuencias absolutas y relativas</b>

Tabla 3.1. Continuación

Variable	Tipo	Descripción	Categorías	Indicador
<b>Días de estadía hospitalaria</b>	Cuantitativa discreta	Según los días de estancia en el hospital	1 - 7 días, 8 -15 días, 16 días o más	<b>Frecuencias absolutas y relativas</b>
<b>Factores de riesgo</b>	Cualitativa nominal politómica	Condición que predispone a la infección por SARM	Presencia de dispositivo percutáneo o intravascular Historia de hospitalización en UCIN o estadía hospitalaria prolongada Antecedentes de infección por SARM-AH o SARM-AC Antibioticoterapia previa Presencia de lesiones en piel en el neonato, madre u otro familiar, otras	<b>Frecuencias absolutas y relativas</b>
<b>Diagnóstico clínico del paciente</b>	Cualitativa nominal politómica	Impresión de diagnóstico clínico del paciente	IPTB: impétigo, furunculosis, celulitis, absceso, mastitis, onfalitis, entre otras Otitis media aguda supurada, neumonía, bacteriemia, ISQ, adenitis, otras	<b>Frecuencias absolutas y relativas</b>

Tabla 3.1. Continuación

Variable	Tipo	Descripción	Categorías	Indicador
<b>Tipo de Muestra</b>	Cualitativa nominal politómica	Producto patológico de donde se aísla SARM	Secreción de piel y tejidos blandos, exudado ótico, sangre, secreción del sitio quirúrgico, líquido pleural, catéter, secreción osteoarticular, otras	<b>Frecuencias absolutas y relativas</b>
<b>Tratamiento</b>	Cualitativa nominal politómica	Según protocolo establecido para cada entidad clínica	Tratamiento quirúrgico: Incisión y drenaje  Antibioticoterapia: glicopéptidos, macrólidos, oxazolidinonas, cotrimoxazol, quinolonas, lincosamidas, rifamicinas, anfenicoles, aminoglucósidos, otros  Tratamiento quirúrgico + antibioticoterapia	<b>Frecuencias absolutas y relativas</b>
<b>Susceptibilidad antimicrobiana</b>	Cualitativa nominal politómica	Según los criterios establecidos por el CLSI 2015 (26)	Sensible  Intermedia  Resistente	<b>Frecuencias absolutas y relativas</b>

### 3.3. Confirmación de la identificación como *S. aureus* de los aislamientos procedentes del HPJMM.

Se sembró una asada del crecimiento del tubo de agar nutriente en el que se recibieron los aislamientos, en placas de agar sangre al 5% y estas se incubaron a 37 °C durante 18 - 24 h. La identificación se realizó por técnicas convencionales teniendo en cuenta las características fenotípicas de las colonias, coloración de Gram, prueba de la catalasa, prueba de la coagulasa en tubo y test rápido de aglutinación de partículas de látex, empleando el reactivo *Slidex Staph Plus* (Biomerieux, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante (2). En todos los casos se utilizó como control positivo la cepa ATCC *S. aureus* 25923. En la Figura 3.1 se resume la metodología seguida.

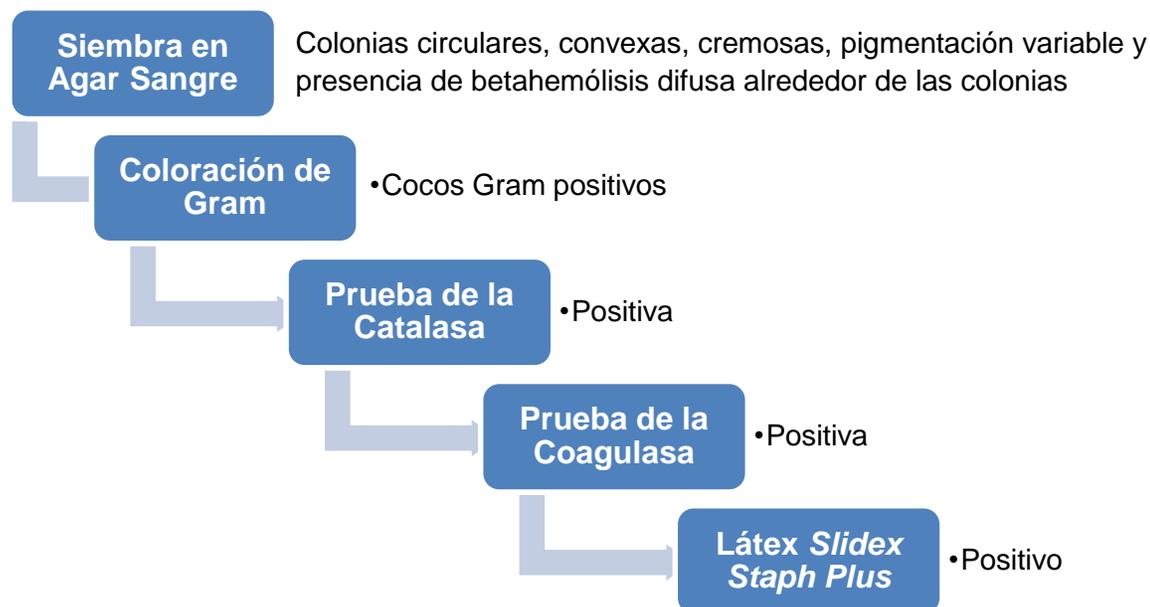


Figura 3.1. Metodología seguida para la identificación convencional de *S. aureus* en el laboratorio IRAB – IPK.

### 3.4. Confirmación de los aislamientos como SARM.

Para la confirmación de la resistencia a meticilina se utilizaron cuatro métodos diferentes: difusión por discos para cefoxitina, microdilución en caldo para determinar la CMI de oxacilina y cefoxitina, y aglutinación por látex para detección de PBP2a.

#### 3.4.1. Detección de la resistencia a la cefoxitina.

Se procedió a la detección fenotípica de la resistencia a meticilina mediada por el gen *mecA* o *mecC* utilizando el disco de cefoxitina (30 µg) y la técnica de difusión en disco de Bauer y Kirby, según el procedimiento descrito por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio de EUA (*Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI*) del año 2015. Ante un halo de inhibición del crecimiento  $\leq 21$  mm se informó SARM, mientras que un halo  $\geq 22$  mm indicó un aislamiento sensible a la cefoxitina y se informó *S. aureus* sensible a meticilina (SASM) (26).

#### 3.4.2. Determinación de concentración mínima inhibitoria de oxacilina.

Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana para oxacilina empleando el método de microdilución en caldo, siguiendo el procedimiento recomendado por el CLSI (26, 96).

##### 3.4.2a. Preparación de las placas para la determinación de la CMI.

Se utilizaron placas de microdilución estériles y apirogénicas, de 96 pocillos y fondo plano. Aplicando la siguiente fórmula se prepararon 25 mL de la solución madre de oxacilina en agua destilada estéril, a una concentración de 1 280 µg/mL, partiendo de una droga con 900 µg/mg de potencia. La solución así preparada se distribuyó en alícuotas que se conservaron a -20 °C.

$$m = V \times [ ] / P$$

$$m = 25 \text{ mL} \times 1280 \text{ } \mu\text{g/mL} / 900 \text{ } \mu\text{g/mg} = 35,5 \text{ mg} = \mathbf{0,0355 \text{ g}}$$

Leyenda: m: cantidad que se debe pesar de la droga (mg)

V: volumen que se desea preparar de la solución madre (mL)

[ ]: concentración a la que debe quedar la droga en la solución madre ( $\mu\text{g/mL}$ )

P: potencia de la droga ( $\mu\text{g/mg}$ )

Para el recubrimiento de las placas de microdilución se siguió el procedimiento que se describe a continuación, que permitió la obtención de 10 placas.

- Se removió un vial del antimicrobiano de la conservación (-20 °C).
- Se calculó el volumen necesario para preparar 10 mL de la primera dilución de la droga a colocar en la placa de microdilución. Se consideró que el intervalo de concentración de la oxacilina debía estar entre 512 y 0,5  $\mu\text{g/mL}$ .

$$1 \text{ } 280 \text{ } \mu\text{g/mL} \times V_1 = 512 \text{ } \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 4 \text{ mL}$$

- Se colocó el volumen antes calculado (4 mL) en un balón volumétrico y se llevó hasta 10 mL con caldo MH suplementado con NaCl al 2%.
- Se prepararon 12 tubos corning estériles de 15 mL y se enumeraron del 1 al 12.
- Se distribuyeron, a partir del segundo tubo, 5 mL de Caldo MH + NaCl al 2%.
- Se añadieron al primer tubo los 10 mL de la dilución del antimicrobiano preparada previamente en el volumétrico.
- Se transfirieron 5 mL del primer tubo al segundo; 5 mL de este al tercero y se procedió así sucesivamente hasta llegar al tubo 11.

- Se reservó el tubo 12 para emplearlo como control de crecimiento (medio sin antimicrobiano).
- Se volcó el contenido del tubo 12 sobre la tapa de una placa Petri o “comedero” estéril y con una pipeta multicanal (ocho canales) se cargaron 50 µL para llenar la columna 12 de las 10 placas de microdilución que se sensibilizaron con oxacilina.
- Se procedió de la misma forma para cada una de las diluciones del antimicrobiano en las columnas correspondientes en cada placa (de la 11 a la 1).
- Se taparon las placas con plástico autoadhesivo.
- Se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### **3.4.2b. Preparación del inóculo.**

En cada placa se probaron simultáneamente hasta ocho aislamientos, incluyendo la cepa control (cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213).

Los inóculos de cada cepa en estudio se prepararon directamente a partir de un cultivo de 18-24 horas en solución salina estéril. Se ajustó la concentración a  $5 \times 10^4$  UFC/mL, para lo cual se realizó la lectura de la densidad óptica en un fotolorímetro (CO 700D) a 625 nm (DO = 0,08 - 0,13).

Se prepararon ocho tubos conteniendo 4,95 mL de caldo MH suplementado con NaCl 2% (identificando correctamente cada tubo con un aislamiento en estudio) y de las suspensiones antes preparadas se tomaron 50 µL y se añadieron al tubo correspondiente (dilución 1/100).

**3.4.2c. Inoculación de las placas de microdilución.**

Se volcó el contenido del primer tubo en una tapa de placa petri o “comedero” estéril y se tomaron 50 µL con una pipeta multicanal; estos se descargaron en la placa de microdilución, en la hilera correspondiente al aislamiento en cuestión.

Tras la inoculación de las placas el intervalo de diluciones quedó de la forma que se muestra en la Figura 3.2.

**Concentración de Oxacilina (µg/mL)\***

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[ ]	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	CC
A												
B	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
C	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
D	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
E	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
G												
H												

**Figura 3.2. Esquema general que muestra las diluciones de oxacilina en una placa de microdilución para la determinación de la CMI de esta droga frente a aislamientos de *S. aureus*, en el laboratorio de IRAB - IPK.**

\* Los números al inicio de cada columna significan la concentración de oxacilina que se añadió desde la fila A hasta la H.

**A-G** - cada fila se corresponde con un aislamiento en estudio

**H** - cepa *S. aureus* ATCC 29213

**CC** - Control de crecimiento (caldo MH sin droga)

**[ ]** - Concentración del antibiótico µg/mL

Justo antes de proceder a la incubación se realizó un control de inóculo a partir del pocillo 12 (control de crecimiento) de algunas de las cepas en estudio (al azar). Para esto se tomaron 10  $\mu$ L y se diluyeron en 10 mL de solución salina estéril, se transfirieron 100  $\mu$ L a una placa de agar MH y con una espátula de vidrio se expandió el inóculo. Se incubó a 35  $\pm$  2  $^{\circ}$ C por 24 h, al término de las cuales se procedió al conteo de las colonias, debiendo oscilar este entre 10 y 50 colonias.

### **3.4.2d. Incubación de las placas y lectura de los resultados.**

Las placas de microdilución se incubaron a 30  $^{\circ}$ C por 24 horas. La lectura se realizó de forma visual y se informaron las CMI siguiendo los criterios del CLSI, de acuerdo con los cuales un aislamiento se considera SARM cuando la CMI para oxacilina es  $\geq$  4  $\mu$ g/mL (26).

### **3.4.3. Determinación de la CMI para cefoxitina.**

Para determinar la CMI de cefoxitina se empleó el método de microdilución en caldo y se siguió el mismo procedimiento descrito con anterioridad para la oxacilina. En el Anexo 1 se recoge la metodología específica seguida para el recubrimiento de placas de cefoxitina. Todos los aislamientos con CMI  $\geq$  8  $\mu$ g/mL se consideraron resistentes, y se informaron SARM (26).

### **3.4.4. Detección de la proteína PBP2a.**

Para la detección fenotípica indirecta del gen *mecA* se empleó el juego de reactivos *Slidex MRSA Detection* (Biomerieux, Francia), que consiste en una prueba rápida de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal contra la PBP2a. Se partió de cultivos puros de 18 - 24 horas obtenidos en placas de agar sangre y se procedió siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

### **3.5. Determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos no betalactámicos.**

Se utilizó el método de microdilución en caldo (96) y se fijaron los intervalos de concentración que a continuación se relacionan: vancomicina (128-0,125 µg/mL), rifampicina (16-0,015 µg/mL) y trimetoprim/sulfametoxazol (32-0,03/608-0,55 µg/mL). Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para la determinación de la CMI de oxacilina y cefoxitina. La metodología específica seguida para el recubrimiento de las placas de cada una de las drogas evaluadas se muestra en el Anexo 1.

Para gentamicina, tobramicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, doxiciclina, minociclina, ciprofloxacino y cloranfenicol se empleó el método de difusión por discos de Bauer y Kirby (97). A través del sistema automatizado VITEK® 2 Compact versión 6.019 (bioMérieux, Francia) y de acuerdo con las especificaciones del fabricante se determinó la susceptibilidad antimicrobiana para teicoplanina, linezolid, levofloxacino, moxifloxacino, tigeciclina y quinopristina/dalfopristina. En todos los casos, para la interpretación de los resultados se siguieron los criterios del CLSI (26).

#### **3.5.1. Detección fenotípica de resistencia a los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B.**

Las diferentes expresiones fenotípicas de esta resistencia se identificaron mediante el método de difusión con discos de eritromicina y clindamicina, empleando el D-test, según las recomendaciones del CLSI (26).

Se colocó un disco de eritromicina (15 µg) y otro de clindamicina (2 µg) separados a una distancia de 15 o 20 mm sobre la superficie de una placa de agar MH inoculada con la suspensión bacteriana. Los resultados se interpretaron de la siguiente forma:

- Resistencia a la eritromicina y a la clindamicina sin achatamiento del halo de inhibición de la clindamicina (D-test negativo, cMLS<sub>B</sub>: resistencia constitutiva a la eritromicina, a la clindamicina y a las estreptograminas B).
- Resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina pero con un achatamiento del halo del disco de la clindamicina en la proximidad del de la eritromicina (D-test positivo, iMLS<sub>B</sub>: resistencia inducible a la eritromicina, a la clindamicina y a las estreptograminas B).
- Resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina sin achatamiento del halo del disco de esta última (D-test negativo, MS<sub>B</sub>).
- Resistencia a la clindamicina con sensibilidad a la eritromicina (D-test negativo).

### **3.6. Detección de los genes que codifican para la LPV.**

La presencia de los genes que codifican para la LPV se demostró por RCP en 96 de los 105 aislamientos de SARM, pues en nueve de ellos se produjo pérdida de la viabilidad durante la conservación (98).

#### **3.6.1. Extracción de ADN.**

La extracción de ADN se realizó mediante el método de Chelex-100 (Sigma, EUA) al 5% en buffer TE al 1X, pH 8,8, siguiendo el protocolo utilizado por McDonald *et al.*, 2005 con ligeras modificaciones (99). A continuación se exponen los pasos seguidos:

- Se dispensaron 500 µL de solución salina fisiológica estéril en un vial de 1,5 mL (uno por aislamiento).
- Se transfirió al vial una asada de un cultivo en agar sangre de carnero 5% (18 - 24 horas) de cada aislamiento en estudio y se agitó (vórtex corto).

- Se transfirieron 100  $\mu$ L de esta suspensión a un vial con 300  $\mu$ L de Chelex-100 al 5%.
- Se calentó a 100 °C por 15 minutos.
- Se atemperaron los viales y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos.
- Se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a otro vial estéril de 1,5 mL.
- Se conservó el sobrenadante (ADN) a -20 °C hasta su uso.

### 3.6.2. Detección de LPV por RCP.

Se utilizó el kit HotStarTaq<sup>®</sup> *Plus* DNA Polymerase comercializado por Qiagen (Alemania) y los cebadores descritos por Lina *et al.*, 1999 (98). La reacción ocurrió en un volumen final de 25  $\mu$ L, en el que se incluyeron los componentes que se resumen en la Tabla 3.2. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 3.3.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf *Mastercycler personal* (Alemania) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de repeticiones de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por un minuto, finalmente una extensión a 72 °C por dos minutos (98).

La presencia y la talla de los productos de amplificación se determinó mediante electroforesis submarina (Major Sciences MP, Japón) en gel de agarosa al 2% (w/v) en tampón TBE 1X. El mismo se tiñó con solución de bromuro de etidio (Promega, EUA) y se fotodocumentó con el programa Fire Reader 15.06 (Cambridge, Reino Unido). En cada corrida electroforética se empleó un patrón de peso molecular de 100 bp *ladder* (Promega, EUA). Se definió como resultado positivo la observación de una banda similar a la talla esperada (433 bp) y negativo cuando no se observó ninguna banda (98).

Tabla 3.2. Componentes de la mezcla de reacción para la detección por RCP de los genes que codifican para la LPV entre los aislamientos de SARM recuperados en el HPJMM, 2010 - 2013.

Componentes de la reacción	Volumen requerido para una reacción	Concentración final
Coral load PCR buffer 10x (contiene 15 mM de MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µL	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 µL	3 mM
dNTPs (10 mM)	0,5 µL	0,2 mM cada uno
Q - Solution 5x	5 µL	1x
Cebador lukPV-1 (50 pmol/µL)	0,25 µL	0,5 µM
Cebador lukPV-2 (50 pmol/µL)	0,25 µL	0,5 µM
HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase (5 U/µL)	0,5 µL	2,5 U
H <sub>2</sub> O	12 µL	
ADN	2,5 µL	

Tabla 3.3. Cebadores utilizados para la detección por RCP de los genes que codifican para la LPV entre los aislamientos de SARM recuperados en el HPJMM, 2010 - 2013.

Nombre	Secuencia	Gen
lukPV-1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	<i>lukS-PV</i>
lukPV-2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAGC	<i>lukF-PV</i>

### 3.6.3. Controles.

Como medidas generales para evitar la contaminación de las muestras se definieron áreas de trabajo separadas, uso de gabinetes para RCP y puntas con filtros. Se utilizó como control positivo el ADN extraído a partir de la cepa de SARM USA300, donada por el Instituto de Salud Pública de Chile. Como control negativo se empleó agua de grado molecular.

### 3.7. Análisis de los resultados y procesamiento estadístico.

Se empleó una Laptop DELL con ambiente de Windows 8 y Microsoft Office 2010. Se utilizó Microsoft Word como procesador de texto. Los datos que se obtuvieron se introdujeron en una base de datos y se analizaron con la ayuda del programa EPIDAT versión 3.0. Para el análisis de los datos se utilizaron indicadores porcentuales y los resultados se expusieron en tablas y gráficos. En el caso de las variables cuantitativas se calculó la media y desviación estándar.

#### 3.7.1. Cálculo de la prevalencia de resistencia a la meticilina entre aislamientos de *S. aureus* responsables de infecciones en el servicio de Neonatología del HPJMM.

Para el cálculo de la prevalencia de la resistencia a meticilina entre los aislamientos de *S. aureus* se utilizó la siguiente fórmula.

$$\text{Infecciones por SARM} \times 100 / \text{Infecciones por } S. \text{ aureus.}$$

En el numerador se consideró el número de neonatos con cultivo positivo para SARM, contando solo el primer aislamiento de cada paciente en cada año de estudio. En el denominador se consideró el total de neonatos con cultivos positivos para *S. aureus* en cada año de estudio. Este último dato se obtuvo de los Informes Anuales del Laboratorio de Microbiología del HPJMM, 2010 - 2013.

### **3.7.2. Descripción de variables demográficas, clínicas y terapéuticas relacionadas con las infecciones por SARM.**

Para la descripción de las características clínicas más frecuentes de las infecciones por SARM se revisaron las historias clínicas (HC) de los neonatos ingresados durante el período de estudio. Para esto se utilizó una planilla de recolección de datos (Anexo 2).

### **3.7.3. Relación entre la producción de LPV y algunas variables clínicas.**

Se relacionó la presencia de la LPV con la necesidad de incisión y drenaje, y la presencia de complicaciones. Para ello se realizó la prueba de Chi-cuadrado de Pearson con corrección de Yates y un nivel de confianza del 95%, empleando el programa para análisis epidemiológicos de datos tabulados EPIDAT versión 3.0. Un valor  $p \leq 0,05$  indicó asociación estadísticamente significativa.

### **3.8. Consideraciones éticas.**

El Consejo Científico del HPJMM aprobó la ejecución del estudio y este quedó inscrito como un proyecto de investigación institucional. El protocolo de investigación fue además aprobado por el Comité de Ética del IPK (Código CEI - IPK 01 - 13).

El manejo de la información sobre los pacientes e historias clínicas fue confidencial. En el laboratorio se tuvieron en cuenta las prácticas y procedimientos que corresponden al nivel de seguridad biológica II, según establece la Resolución No. 103 del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (2002) (100), pues *S. aureus* está incluido entre los agentes biológicos con riesgo individual moderado y comunitario limitado (101).

# ***Resultados y Discusión***

### IV. Resultados y Discusión

Desde la descripción de SARM en 1960 este microorganismo se ha convertido en uno de los más importantes asociados a la salud humana. Esto ha motivado múltiples estudios centrados en la resistencia antimicrobiana y la caracterización molecular de clones, con vistas a controlar, la diseminación de las infecciones por SARM tanto a nivel hospitalario como comunitario. Este patógeno se asocia con altas tasas de mortalidad y morbilidad, por lo que investigar su prevalencia entre aislamientos de *S. aureus* y corroborar la concordancia entre los diferentes métodos disponibles para su detección constituye una preocupación constante para laboratorios con recursos limitados, como el del HPJMM.

#### 4.1. Confirmación de la resistencia a meticilina.

Entre el 2010 y 2013 el laboratorio de Microbiología del HPJMM informó 170 infecciones neonatales por *S. aureus* (Informes anuales 2010 - 2013) y notificó entre ellas 105 infecciones por SARM, a partir de las cuales se recuperaron los 105 aislamientos que conformaron el universo del presente estudio. En el laboratorio IRAB - IPK se confirmó para todos la identificación como *S. aureus* y resistencia a la meticilina, a través del empleo del disco de cefoxitina (halo  $\leq 21$  mm), la CMI de oxacilina (CMI  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ ), la CMI de cefoxitina (CMI  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ) y el empleo del reactivo *Slidex MRSA Detection* (Biomérieux, Francia).

Los resultados de estas pruebas permitieron inferir, hasta este punto, que en los 105 aislamientos el mecanismo responsable de la resistencia es la presencia de modificaciones en las PBP2a, codificadas por el gen *mecA* (26, 37).

La coincidencia entre estos y los resultados informados inicialmente por el HPJMM ratifican la utilidad del uso del disco de cefoxitina para detectar SARM en la práctica hospitalaria habitual. Entre las ventajas que se le atribuyen se citan: sirve de marcador de susceptibilidad a meticilina, los halos de inhibición se relacionan con la presencia o ausencia del gen *mecA/mecC*, no está influenciado decisivamente por variaciones de inóculo, temperatura o medios de cultivo

utilizados y sus resultados no parecen estar afectados, en la misma extensión que los discos de oxacilina, por la hiperproducción de penicilinasas, que pueden dar lugar a pequeños halos de inhibición. Por otra parte, se han aislado cepas de *S. aureus* portadoras del gen *mecA* que sin embargo, son sensibles a oxacilina, lo que vuelve incierto el uso del disco de esta droga para el diagnóstico del SARM (102).

Sasirekha *et al.* al evaluar diferentes métodos fenotípicos para la detección de SARM en 153 aislamientos de *S. aureus* demuestran con el empleo del E-test de oxacilina, 42 aislamientos resistentes, mientras que a través del agar *screening plate* detectan 16 aislamientos más, por lo que obtienen para este último un 100% de sensibilidad y 87,4% de especificidad. Sobre esta misma muestra, utilizando el método de Bauer y Kirby con el disco de cefoxitina informan 43 aislamientos de SARM, con un 100% de sensibilidad pero una especificidad superior (99,1%) (103).

#### **4.2. Prevalencia de las infecciones neonatales por SARM en el Hospital Pediátrico “Juan Manuel Márquez”.**

En función de los resultados de la confirmación de los aislamientos como SARM, en la Tabla 4.1 se representa la prevalencia de la resistencia a la meticilina entre las infecciones neonatales causadas por *S. aureus* para cada año del período de estudio. Es evidente una tendencia al incremento en el HPJMM de la recuperación de aislamientos de SARM.

El primer reporte de infección por este microorganismo en dicha institución hospitalaria se registra en el año 2002 cuando Díaz estudia 122 aislamientos de *S. aureus*, de los cuales el 13,1% resultan resistentes a la meticilina (difusión por disco de oxacilina, CMI para oxacilina y detección del gen *mecA*), con mayor frecuencia entre los aislamientos de pacientes ingresados y menor para los aislados de infecciones de origen comunitario. Un alto porcentaje de estas presentan resistencia cruzada con otras familias de antibióticos. Es válido destacar

que en once años la prevalencia de la resistencia a la meticilina aumenta un 54,6% (21).

Los datos del presente estudio se encuentran por encima de la media hospitalaria (52,4 y 59,3%) según reporta Monzote *et al.* (22). Esta observación está en congruencia con el incremento de las infecciones por este agente notificada en varios países, incluso en Latinoamérica y sobre todo entre los niños más pequeños (71). Al mismo tiempo, el incremento puede obedecer parcialmente a que el laboratorio realiza una mejor detección de aislados de SARM, a través del uso del disco de cefoxitina.

**Tabla 4.1. Prevalencia de resistencia a la meticilina entre aislamientos de *S. aureus* responsables de infecciones neonatales en el HPJMM, 2010 - 2013.**

Años de estudio	Infecciones por <i>S. aureus</i>	Infecciones por SARM	
		No.	%
2010	38	25	65,8
2011	56	28	50
2012	45	31	68,9
2013	31	21	67,7

Así por ejemplo, nótese en la Tabla 4.1 que en el 2011 la prevalencia es menor, año en el que se empleó el disco de oxacilina eventualmente como el método de identificación de SARM ante la no disponibilidad de discos de cefoxitina. El disco de oxacilina tiene bajo nivel de detección de SARM frente a cepas con fenotipo heterorresistente, por lo que estas pueden mostrarse sensibles en el antibiograma (falsos negativos) (26, 37).

De manera general, estos resultados confirman que SARM se ha establecido como causa importante de infecciones en la comunidad, y refleja la situación actual de este patógeno en la población neonatal.

La discusión acerca del incremento de la prevalencia de infecciones por SARM en neonatos en el HPJMM en el período de estudio resulta difícil porque en Cuba no existen datos nacionales sobre la tasa de infecciones hospitalarias por SARM y tampoco se ha podido establecer la epidemiología de las infecciones extrahospitalarias asociadas a esta bacteria (17). Estas últimas dificultan el manejo y control epidemiológico de los brotes de infecciones y favorecen la transmisión horizontal de resistencia a otras cepas de la microbiota en individuos sanos o colonizados por *S. aureus* (104).

*S. aureus* es una causa importante de infecciones neonatales de inicio en la comunidad, pero no existen muchos estudios centrados en este grupo de edad. En los últimos años se notifica la emergencia de infecciones producidas por aislamientos de clones específicos de SARM - AC en neonatos, tanto en la comunidad como en el medio hospitalario, principalmente en EUA. Estas cepas son frecuentemente portadoras de la LPV, toxina relacionada con mayor virulencia y se destaca la frecuente asociación de estas con infección materna concurrente. Sin embargo, no se disponen de datos en la mayoría de los países sobre la prevalencia de infecciones neonatales por SARM y *S. aureus* LPV(+) en la comunidad; los pocos casos comunicados fuera de EUA han sido principalmente por cepas sensibles a la meticilina (12).

En una serie de infecciones neonatales de inicio en la comunidad en el Servicio de Urgencias del Hospital 12 de Octubre de Madrid, España, el 3,3% son por SARM y el 6,7% por cepas productoras de LPV (12). Estas cifras son menores a las reportadas por el estudio de una serie de neonatos norteamericanos, donde el porcentaje de resistencia a la meticilina que se refiere es del 68% (9). En un estudio retrospectivo más reciente que incluye las infecciones por *S. aureus* en

niños ingresados desde 2002 a 2007 en varios hospitales pediátricos de EUA, la prevalencia de SARM-AC es superior (81%) (105).

Un estudio prospectivo en Tennessee, EUA, entre el 2007 - 2009 encuentra que los niños nacidos de madres colonizadas por *S. aureus* durante el embarazo o en el momento del parto, tienen más probabilidad de ser colonizados por esta bacteria en el período neonatal inmediato. En dicho estudio, cerca del 10% de las madres y el 2,5% de los bebés se demuestran colonizados por SARM en el momento del parto. Los autores identificaron la transmisión horizontal madre-hijo como el primer mecanismo de colonización estafilocócica temprana en los bebés, aunque la transmisión vertical también puede ocurrir (106, 107).

A diferencia de *Streptococcus agalactiae*, la importancia de la colonización por SARM y su implicación en sepsis neonatal no está bien documentada y existen pocos estudios que demuestren transmisión vertical e infección neonatal. Algunos autores reportan que la colonización vaginal de SARM en gestantes es más frecuente en mujeres portadoras de *S. agalactiae*; incluso apuntan que este podría promover el crecimiento de SARM por inhibición de otros microorganismos competitivos (106).

Una investigación publicada por Reyes *et al.* en el Hospital Universitario “Gustavo Aldereguía Lima” en Cienfuegos, durante el año 2010, demuestra en pacientes hospitalizados una frecuencia superior de infecciones por SARM (23,5%) a la frecuencia de infección por SARM en pacientes atendidos por consulta externa (7,2%) (108). Los resultados de la presente investigación difieren de las de dicho estudio, lo que puede estar dado por el hecho de que sus autores emplean el método de difusión con disco de oxacilina para la detección inicial de la resistencia a la meticilina. De la misma forma, otro estudio en el Hospital Pediátrico de Centro Habana reporta una incidencia de 66,7% en infecciones de origen hospitalario por SARM (109).

En el ámbito internacional, *S. aureus* y en particular SARM, representa un patógeno predominantemente asociado con infecciones serias, tanto nosocomiales como adquiridas en la comunidad (neumonía, bacteriemia e IPTB). Datos recientes indican que *S. aureus* representa el 52% de esas infecciones y SARM es responsable del 24% de las infecciones estafilocócicas. En algunos países asiáticos como China, Japón y Korea, más del 60% de las infecciones nosocomiales por cocos Gram positivos están causadas por SARM. En Europa la prevalencia total es de 40 - 45% y en los EUA, 30 - 35% (110).

Los datos del presente trabajo son más bajos que los encontrados por Kejela *et al.* en Etiopía, el cual reporta en niños que asisten a escuelas primarias, una prevalencia de 18,8% (55).

SARM causa aproximadamente 100 000 infecciones invasivas y alrededor de 20 000 muertes por año en los EUA, de las cuales cerca de 1000 infecciones y 100 muertes ocurren en niños menores de un año; produce entre el 59% y 72% de todas las IPTB y en niños el 95% de estas son debidas a SARM - AC. Diferentes clones comunitarios producen enfermedad en unidades de cuidados intensivos neonatales, incluso entre neonatos a término y previamente sanos (107).

En los EUA, el Sistema Nacional de Vigilancia de las Infecciones Nosocomiales reporta en el 2003 que cerca del 60% de los aislamientos de *S. aureus* en unidades de cuidados intensivos son resistentes a la meticilina. En este mismo país un estudio observacional retrospectivo (período de 10 años), informa que la incidencia de infección por *S. aureus* aumenta más del doble, pasando de 14,8/1000 admisiones en 1999 a 35,7/1000 admisiones en 2008; pero la incidencia de las infecciones por SARM aumentan 10 veces, pasando de 2 casos/1000 admisiones en 1999 a 20,7 casos/1000 admisiones en 2008. Para el año 2008 SARM representó el 58% del total de las infecciones por *S. aureus* en niños hospitalizados en EUA, cifra inferior a la encontrada en la presente investigación (33, 111).

En Argentina, un estudio prospectivo en niños con infecciones por *S. aureus* adquiridas en la comunidad encuentra que el 62% de estas son causadas por SARM, que las IPTB representan el 62% de los aislamientos y el 38% provienen de niños con infecciones invasivas (112). Una investigación que incluye diferentes países de Latinoamérica (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, México, Panamá, Perú y Venezuela), demuestra que la prevalencia de SARM es de 48%, con una variación de 29% (Colombia y Brasil) a 79% (Perú) en el 2011 (113).

La alta tasa de resistencia a la meticilina en el servicio de Neonatología del HPJMM señala la necesidad de dilucidar el origen (comunitario o asociado a la asistencia sanitaria) de estas infecciones. La definición actualmente aceptada de infecciones por SARM - AC es difícil de aplicar a esta población porque todos los neonatos están expuestos al ambiente hospitalario al nacimiento. En general, lo más aceptado es no considerar el antecedente de nacimiento como factor de riesgo para infección asociada al hospital. Por otro lado, el neonato es un paciente con características especiales: la inmadurez del sistema inmune lo hace más susceptible a infecciones invasivas, las características de la piel facilitan su infección y existen cuadros clínicos típicamente neonatales, como la onfalitis y mastitis, que no está claro donde encuadrarlos (infecciones invasivas o IPTB) (12).

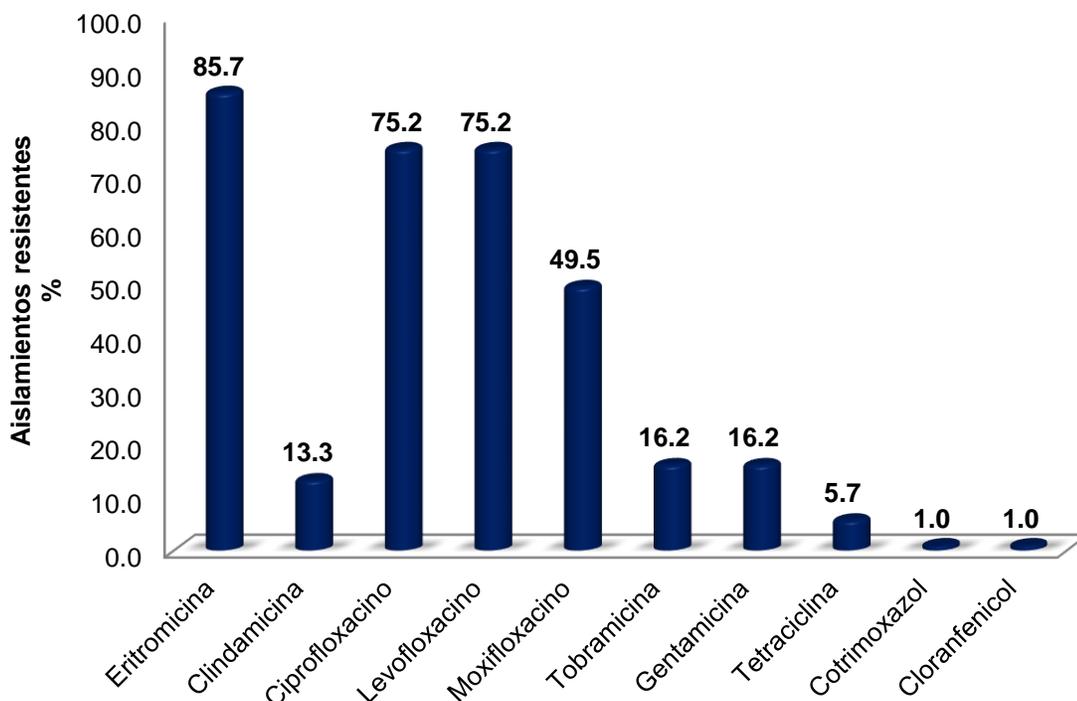
### **4.3. Resistencia antimicrobiana a antibióticos no betalactámicos.**

El impacto clínico de la resistencia antimicrobiana requiere el estudio de los mecanismos implicados con el fin de contribuir a una adecuación rápida y dirigida del tratamiento así como para el seguimiento y el control epidemiológicos. Una investigación realizada por Gasch *et al.* en pacientes con bacteriemia por SARM arroja que la terapia antimicrobiana inicial de forma inapropiada es el único factor predictor característico de mortalidad temprana (114).

En la Figura 4.1 se muestran los porcentajes de resistencia antimicrobiana de los 105 aislamientos neonatales de SARM frente a antibióticos no betalactámicos. Se

observaron altos niveles de resistencia para eritromicina (85,7%), ciprofloxacino (75,2%) y levofloxacino (75,2%). Muy bajos niveles de resistencia se detectaron para tetraciclina, cotrimoxazol y cloranfenicol. No se encontró resistencia a doxiciclina, minociclina, tigeciclina, rifampicina, quinopristina-dalfopristina, linezolid, vancomicina y teicoplanina. La resistencia encontrada para gentamicina y clindamicina constituye un signo de alarma y pudiera poner en dudas su utilización como fármacos de primera línea en el tratamiento de las infecciones neonatales.

Tradicionalmente los aislamientos hospitalarios de SARM se caracterizaron por presentar resistencia asociada a varios grupos de antimicrobianos y cuando más tarde se describen las primeras infecciones por este agente adquiridas en la comunidad, esta se constituye en una de las principales características para distinguir entre unos y otros. Los aislamientos de SARM - AC se consideran por mucho tiempo susceptibles a todos los agentes antimicrobianos, excepto a los betalactámicos. Sin embargo, actualmente la resistencia se incrementa a un mayor número de antibióticos, incluyendo eritromicina y fluoroquinolonas para ambos tipos de aislamientos (35). Esto lo reafirma un estudio realizado por investigadores del CDC, en el que se detecta resistencia a tetraciclina y clindamicina en el 9% y 6,2% de los aislamientos de SARM estudiados, respectivamente (115).



**Figura 4.1. Resistencia antimicrobiana de SARM frente a antibióticos no betalactámicos en el servicio de neonatología del HPJMM, 2010 - 2013.**

En la presente investigación se reportan cifras muy inferiores a las encontradas por Wu *et al.* en hospitales pediátricos en Beijing (China): 85,7% para clindamicina y eritromicina; 78,6% para gentamicina; 64,3% para cotrimoxazol; 71,4% para cloranfenicol; 57,1% para tetraciclina y ciprofloxacino y 28,6% para rifampicina (116).

Velázquez-Guadarrama *et al.* al estudiar 95 aislamientos de SARM en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” revelan que el 100% son sensibles a vancomicina y observan resistencia a eritromicina (97,7%), clindamicina (82,2%) y ciprofloxacino (70%). Informan además una cepa de SARM resistente al linezolid; aun cuando no documentan el uso previo de este antibiótico, sin embargo se conoce que esto puede deberse al uso de antibióticos como el cloranfenicol que

podría producir mutaciones en el dominio V del ARNr 23S, que inducen resistencia cruzada a linezolid (117, 118).

También Perazzi *et al.* al evaluar la sensibilidad de aislamientos de SARM de origen hospitalario y adquiridos en la comunidad a antiguos y nuevos antimicrobianos, demuestran para los aislamientos de SARM - AH resistencia simultánea a eritromicina, clindamicina, gentamicina, ciprofloxacino, levofloxacina y moxifloxacina; y sensibilidad a tigeciclina, vancomicina, teicoplanina y linezolid. En cambio para los aislamientos de SARM - AC solamente reportan resistencia a betalactámicos (119).

En los últimos años el aumento de las infecciones por cepas de SARM de origen comunitario ha renovado el interés por la utilización de la clindamicina como alternativa terapéutica, por lo cual la detección de resistencia antimicrobiana al grupo MLS<sub>B</sub> es objetivo de múltiples investigadores. En el presente estudio se observó un 85,7% de resistencia a eritromicina y 13,3% a clindamicina. Estos valores reflejan niveles de resistencia elevados para macrólidos, lo que implica que no sean de utilidad en el tratamiento de las infecciones por este agente. En relación a las lincosamidas, aunque el valor reportado no es elevado en términos numéricos sí es preocupante. La clindamicina no es un antimicrobiano de uso cotidiano y se reporta como una de las primeras líneas de tratamiento en las infecciones por SARM. El valor de resistencia total al complejo MLS<sub>B</sub> se encontró por encima del 10% sugerido para considerar a la clindamicina como tratamiento empírico de primera línea ante infecciones por SARM, aunque algunos autores plantean hasta un 15% (87, 120-123).

Mediante el análisis de la resistencia a eritromicina y clindamicina se puede inferir el mecanismo implicado, así como identificar el fenotipo de resistencia (26, 37). El fenotipo MS<sub>B</sub> (resistencia a los macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono y a las estreptograminas B pero no a la clindamicina ni a los macrólidos de 16 átomos) debido a un mecanismo de expulsión activa codificado principalmente por genes

del tipo *msrA* se encontró en 76 aislamientos de SARM (72,4%); en estos casos la clindamicina constituye una opción terapéutica.

El fenotipo  $MLS_B$  se demostró en 14 aislamientos (13,3%) lo que implica resistencia a los macrólidos de 14, 15 y 16 átomos de carbono, las lincosamidas y las estreptograminas del grupo B. El mismo está codificado por genes *erm* y puede ser de expresión constitutiva o inducible ( $cMLS_B$  o  $iMLS_B$ ). En el primer caso se produce resistencia cruzada de alto nivel a todos los antimicrobianos del grupo, mientras que el fenotipo inducible se presenta como resistencia a los macrólidos pero sensibilidad a las lincosamidas y a las estreptograminas B en ausencia de un inductor (eritromicina). En las cepas con fenotipo  $iMLS_B$  la eritromicina induce la expresión del mecanismo de resistencia, por lo que la confirmación de este en los laboratorios de Microbiología es de vital importancia (26, 37). En el presente estudio la mayor parte de los aislamientos en los cuales se detectó esta resistencia portaban el fenotipo inducible (85,7%). No se observó ningún aislamiento de SARM con el patrón de resistencia a clindamicina y sensibilidad a eritromicina.

La prevalencia de la resistencia inducible a  $MLS_B$  entre clones de SARM no es ampliamente reportada, aunque países como Sudáfrica, la India y Polonia lo informan con relativa frecuencia. En un estudio brasileño el 11,3% de los aislamientos de *S. aureus* muestran este fenotipo (77). Otra investigación realizada por Zriouil *et al.* en Marruecos reporta un incremento del fenotipo inducible (64,3%) en aislamientos de SARM, incluso con resistencia asociada a cotrimoxazol, rifampicina y ácido fusídico; también encuentran el fenotipo de resistencia a lincosamidas (32.1%) (124). La no detección oportuna de este mecanismo conduce a fracasos terapéuticos debido a la inducción in vivo durante el tratamiento con clindamicina (37).

Las quinolonas constituyen en la actualidad, junto a los betalactámicos, los antibióticos de mayor uso (88). El surgimiento y la extensión de resistencia a este grupo de antibióticos dependerán del patógeno, del antibiótico, del lugar de la

infección y la carga bacteriana, de la integridad de los mecanismos de defensa del hospedero y de la dosis usada, entre otros factores. Hay una relación inversa entre concentración del antimicrobiano y selección de mutantes resistentes, por lo que no se deberían infradosificar para evitar la selección de mutantes resistentes. En general, cuanta más actividad tiene una quinolona más tarda en aparecer la resistencia clínica (125).

Las quinolonas son fácilmente excretadas en el sudor y pueden suprimir el crecimiento de la microbiota normal, incluido *S. aureus* que coloniza la piel, nariz y garganta. El uso extendido de estas se reconoce como promotor de la resistencia a las fluoroquinolonas en SARM, aunque este grupo de antimicrobianos no es usado con frecuencia en el tratamiento de las infecciones por este microorganismo (56). En un estudio donde se examinan los índices de SARM en un hospital de tercer nivel en Caen, Francia durante un período de 10 años, los autores identificaron un incremento significativo en las tasa de infección por SARM después de un incremento en los niveles de prescripción de fluoroquinolonas seguido de un período de uso limitado (126). De forma inversa, una caída significativa en las tasas de SARM se relaciona con la disminución en el uso de fluoroquinolonas durante un período de 4 años en el Hospital “Saint-Louis” de París, Francia (127). En una investigación de prevalencia realizado en pacientes ancianos admitidos en un hospital del Reino Unido, se encuentra una fuerte asociación entre la colonización por SARM y el uso previo de ciprofloxacino (128).

En el HPJMM el segundo antibiótico en mostrar los más altos niveles de resistencia fueron las quinolonas, en particular ciprofloxacino y levofloxacino (75,2%), lo que se ajusta a los reportes internacionales. Un estudio realizado por Vindel *et al.* en el 2006 notifica valores entre el 84,2 y el 92% de resistencia frente a quinolonas (129). En Cuba las tasas de resistencia reportadas frente a ciprofloxacino son de igual manera elevadas en aislados recuperados de infecciones de pacientes hospitalizados. En el Hospital Militar Central “Dr. Luis Díaz Soto” en La Habana es de 72%, contrario a lo encontrado en el Hospital

General “Gustavo Aldereguía Lima” de Cienfuegos (11,3%) (108, 130). El amplio uso del ciprofloxacino en Cuba por más de 20 años pudiera ser, sin lugar a dudas, el principal promotor de estos niveles de resistencia.

En relación a los aminoglucósidos los dos fenotipos más frecuentes de resistencia que se pueden encontrar al realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* son: a) resistencia a la gentamicina y a la tobramicina pero sensibilidad aparente a la amikacina, debida a la enzima bifuncional AAC(6')-APH(2''), que afecta a casi todos los aminoglucósidos de utilización clínica, con la excepción de la estreptomina; y b) sensibilidad a la gentamicina y resistencia a la tobramicina y a la amikacina, adquirida mediada por la enzima nucleotidiltransferasa o adeniltransferasa denominada ANT(4')(4'') que confiere resistencia a tobramicina, amikacina y kanamicina (37, 81).

Para poder detectar los dos principales mecanismos de resistencia en la presente investigación se incluyeron en el estudio de susceptibilidad a antimicrobianos no betalactámicos los discos de gentamicina y tobramicina. El 16,2% de los aislamientos de SARM recuperados en el HPJMM resultaron resistentes a ambos aminoglucósidos, cifras similares a la reportada en Etiopía por Kejela *et al.* para la gentamicina (15,4%), donde en cambio se informan porcentos de resistencia alarmantes para otros antimicrobianos, tales como vancomicina (12,8%), cotrimoxazol (17,9%) y cloranfenicol (59 %) (55).

Por otra parte, aunque las tetraciclinas muestran buena actividad *in vitro*, los informes sobre su uso en el tratamiento de las infecciones por SARM son limitados. Parecen ser efectivas en el tratamiento de las IPTB pero las evidencias son insuficientes para apoyar su uso en infecciones invasivas. En el presente estudio los niveles de resistencia para esta droga fueron muy bajos, lo que guarda relación con su limitado uso en las edades pediátricas. En correspondencia, son inferiores a las informadas por ejemplo, por Espinosa *et al.*, en el Hospital Clínico-Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”: 27,8% de resistencia a la tetraciclina y susceptibilidad intermedia para minociclina (1,3%) (131).

El incremento de las infecciones por SARM trae como resultado un aumento en los costos de los tratamientos y el uso de recursos médicos. Una proporción significativa de estas requieren tratamiento con glicopéptidos, particularmente vancomicina. Antes del año 2006 los aislamientos de SARM eran considerados susceptibles a este antimicrobiano cuando se obtenía una CMI  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ ; no obstante, este valor de corte se redefinió debido a la pobre respuesta terapéutica observada en los pacientes con infecciones causadas por aislamientos con CMI  $> 2 \mu\text{g/mL}$  (110, 132).

Por más de cuatro décadas la vancomicina resultó el tratamiento de elección en las infecciones por SARM. Recientemente, aislamientos con altas CMI de vancomicina ( $> 1 \mu\text{g/mL}$ ) pero en el rango de susceptibilidad, se asocian con falla terapéutica y mortalidad en el paciente, lo que en parte pudiera explicarse por inadecuados niveles séricos de la droga durante el tratamiento. Las fallas terapéuticas y la disponibilidad de otras alternativas efectivas pueden debilitar la posición de vancomicina como antibiótico de primera línea. Sin embargo, la emergencia de la resistencia y algunas consideraciones relacionadas con los costos, señalan la necesidad de una valoración integral cuando se propone el empleo de antimicrobianos alternativos (133, 134). Las recomendaciones internacionales continúan respaldando el uso de la vancomicina con independencia del valor de la CMI. Su información debe usarse solo como un parámetro adicional para la decisión terapéutica que al mismo tiempo debe estar respaldada por la respuesta clínica (133, 135).

Un estudio de cohorte retrospectivo diseñado por Chang *et al.* concluye que los valores de CMI de teicoplanina  $> 1,5 \mu\text{g/mL}$  pueden predecir un resultado desfavorable y tasas de mortalidad elevadas entre pacientes con bacteriemia por SARM tratados con este antibiótico (136). A nivel mundial existen pocos reportes sobre la relación existente entre CMI de teicoplanina y respuesta desfavorable al tratamiento.

El 100% de susceptibilidad a la vancomicina puesto de manifiesto durante el estudio para los aislados de SARM responsables de infecciones en el servicio de neonatología del HPJMM coincide con lo reportado por Cuevas *et al.* en España y Traverso *et al.* en Argentina, quienes emplearon también el método de CMI (137, 138). De la misma forma se corresponde con el informe de Zriouil *et al.* en Marruecos, sin embargo es válido acotar que el método de difusión con disco para evaluar la susceptibilidad a la vancomicina utilizado en dicha investigación, no es suficiente para descartar la susceptibilidad intermedia a la droga por su falta de capacidad discriminadora (124, 139).

En esta investigación se detectó para el 74,3% de los aislados de SARM una CMI  $\geq 1\mu\text{g/mL}$ , aunque solo el 8,6% mostraron CMI = 2  $\mu\text{g/mL}$ , lo que pudiera comprometer su utilidad en el tratamiento de infecciones graves. Estos resultados coinciden con los encontrados en un estudio realizado en niños coreanos donde la mayoría de los aislamientos clínicos de SARM muestran CMI para vancomicina  $\geq 1.0\mu\text{g/mL}$  (140).

Varios autores ratifican la gran disparidad entre los valores de CMI para vancomicina, dependiendo de la técnica empleada. Hsu *et al.* demuestran un 70% de cepas de SARM con CMI para vancomicina  $\geq 1,5\mu\text{g/mL}$  por Etest contra solo un 7% por el método de microdilución. Así mismo, un estudio multicéntrico en EUA que incluyó 1800 SARM compara los valores de CMI para vancomicina y daptomicina obtenidos por ambas técnicas, y obtienen por Etest, un 90,4% de aislamientos con CMI  $\geq 1,5\mu\text{g/mL}$  contra solo 3,1% por microdilución (132, 141).

Nichol *et al.* en 27 aislamientos de SARM con CMI de vancomicina de 2  $\mu\text{g/mL}$  detectan la presencia del fenotipo hVISA en siete cepas (25,9%) utilizando el MET y confirmado mediante el método de referencia internacional (PAP) (142). En un estudio llevado a cabo en Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú se describen nueve cepas hVISA entre 1570 aislamientos de *S. aureus* (0,57%) (143).

En la serie de aislamientos neonatales de SARM del HPJMM no se observó resistencia al linezolid, y esto coincide con lo reportado a nivel internacional, aunque es preciso reconocer que la susceptibilidad se estudió por Vitek2 compact, por lo que cepas con resistencia de bajo nivel pudieron no ser detectadas (26, 84, 144).

El Linezolid es una de las alternativas terapéuticas de gran valor clínico en la infecciones por SARM. Por esta razón son necesarios monitoreos continuos para detectar el surgimiento de cepas resistentes y establecer lineamientos en el uso apropiado del antibiótico. La resistencia al linezolid en aislamientos clínicos se reporta inicialmente en *Enterococcus faecium* y *S. aureus*, posteriormente se describe en SCN, *Enterococcus faecalis*. y estreptococos del grupo *viridans* (145). Esta generalmente ocurre en pacientes con tratamientos prolongados o ante el uso elevado de este antimicrobiano en algunos hospitales lo que favorece la diseminación de clones resistentes, o por diseminación de transposones o plásmidos que contienen el gen *cfr*. Aunque algunos estudios documentan la reversión de la resistencia en ausencia de linezolid, un reporte reciente demuestra que la mutación G2576U es conservada en un aislamiento de *S. haemolyticus* después de 30 pases en un medio libre del antibiótico (37, 81, 85).

El método más adecuado para detectar la resistencia al linezolid es el de microdilución. Los resultados de CMI obtenidos por Etest son generalmente más bajos, principalmente cuando la resistencia está mediada por el gen *cfr* y las CMIs pueden ser tan bajas como 1 o 2 µg/ml (sensibles). El método de difusión con discos no detecta adecuadamente la resistencia al linezolid, excepto en los casos con alto nivel (CMI > 32 µg/mL). Las cepas resistentes al linezolid mediada por el gen *cfr* se muestran simultáneamente resistentes a la clindamicina y al cloranfenicol pero sensibles a los macrólidos. No obstante, la relativa frecuencia de cepas que presentan dos o tres mecanismos de resistencia diferentes (resistencia al cloranfenicol, resistencia de tipo MLS<sub>B</sub>, etc.) dificulta la adecuada detección de resistencia al linezolid mediada por el gen *cfr* (37, 81).

Ross *et al.* reportan menos del 1% de resistencia en *S. aureus*, estafilococos coagulasa negativos, y aislamientos de enterococos procedentes de los EUA entre el año 2002 y 2009 (146). Es perentorio señalar que este antimicrobiano es de reciente incorporación en Cuba al cuadro básico de medicamentos y que su uso se restringe solo a infecciones invasivas y frente a fallas en la respuesta a la vancomicina.

Con el propósito de determinar la eficacia y seguridad del linezolid en comparación con glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* a nivel internacional, se lleva a cabo en el 2013 un meta-análisis de ensayos controlados y aleatorizados. El linezolid se demuestra entonces como mejor tratamiento en pacientes con IPTB, pero no en bacteriemia o neumonía. No se encuentran diferencias en relación a la mortalidad, pero el linezolid se asocia con más efectos adversos hematológicos y gastrointestinales. Basados en este análisis, el linezolid parece ser una mejor opción terapéutica que los glicopéptidos en pacientes con infecciones por *S. aureus*, especialmente en IPTB. Sin embargo, cuando el médico de asistencia decide usar linezolid, el riesgo de eventos adversos debe ser tomado en cuenta de acuerdo con las características específicas del paciente (110).

Por otra parte, el cotrimoxazol se ha convertido en una opción importante para el tratamiento de infecciones de piel y tejidos blandos en pacientes no internados, debido a que el 95 - 100% de los SARM - AC son susceptibles *in vitro*. Pocos estudios sugieren su utilidad en infecciones de huesos y articulaciones. Al mismo tiempo, algunos reportes de casos y un ensayo aleatorizado indican su potencial eficacia en el tratamiento de infecciones invasivas, como bacteriemia y endocarditis. Este antimicrobiano es efectivo en el tratamiento de IPTB purulentas en niños pero no ha sido evaluado en el tratamiento de infecciones invasivas (87).

En el presente trabajo se reporta solo un 1% de resistencia a cotrimoxazol, muy inferior a lo encontrado por Díaz (93,8%) en el año 2002, en el propio HPJMM (21). Varios factores pueden justificar el hecho de que en 11 años la resistencia a

este antimicrobiano decreciera en más del 90%: a) los altos niveles de resistencia encontrados en aquel momento conllevaron a un reposo en su uso en el hospital, b) predominio actual de aislamientos de SARM - AC y c) diferencias de resultados en relación a los métodos de detección empleados (en el 2002 difusión por disco; en el estudio actual microdilución en caldo).

Igualmente, Vidal en el año 2000, en el CIMEQ, demuestra un 84% de resistencia frente a cotrimoxazol en aislados intrahospitalarios de SARM por lo que este se excluye del esquema de tratamiento de la institución para infecciones por este microorganismo. En cambio, en un estudio más reciente en la misma institución se encuentra una resistencia de solo un 8% frente a este fármaco y se coloca nuevamente a esta droga dentro de las alternativas de tratamiento disponibles (147).

### **4.3.1. Perfiles de resistencia antimicrobiana.**

Derivado del análisis de los resultados obtenidos en el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana se aprecia entre los aislamientos de SARM del HPJMM una tendencia al incremento de la resistencia a macrólidos y lincosamidas. De manera general todos los aislamientos se clasifican multidrogosresistentes (MDR) siguiendo los criterios de Magiorakos *et al.* (148). En la Tabla 4.2 se exponen los perfiles o patrones de resistencia encontrados entre ellos, lo que puede constituirse en una herramienta de utilidad para la selección de la terapia antibiótica en dicha institución hospitalaria.

Los aislados de SARM-AH suelen ser multiresistentes, mientras que los SARM-AC normalmente tienen resistencia aislada a meticilina y a otros betalactámicos. No obstante, en los últimos años se ha descrito un aumento de las resistencias antibióticas en los aislados SARM-AC en todo el mundo. Así por ejemplo, en un estudio que describe los patrones de resistencia de aislados de SARM LPV (+) procedentes de los cinco continentes, entre el 2008 y 2010, se objetivaron cepas

multirresistentes en todas las regiones, con una prevalencia máxima del 35% en el sur de Europa (149).

**Tabla 4.2. Patrones de resistencia antimicrobiana demostrados para los aislamientos de SARM en el servicio de neonatología del HPJMM, 2010 - 2013.**

Patrones de resistencia antimicrobiana	No. aislamientos	%
FOX	8	7,6
ERY-FOX	5	4,8
CN-TOB-FOX	2	1,9
CIP-LEV-FOX	1	1,0
CIP-LEV-MOX-FOX	1	1,0
ERY-CD-FOX	9	8,6
ERY-CIP-LEV-FOX	21	20,0
ERY-CIP-LEV-MOX-FOX	34	32,4
CN-TOB-CIP-LEV-MOX-FOX	3	2,9
CN-TOB-ERY-FOX-TE	1	1,0
ERY-CIP-LEV-FOX-CL	1	1,0
ERY-CIP-LEV-FOX-TE	1	1,0
ERY-CIP-LEV-MOX-FOX-TE	3	2,9
ERY-CD-CIP-LEV-FOX	2	1,9
ERY-CD-CIP-LEV-MOX-FOX	2	1,9
CN-TOB-ERY-CD-FOX-SXT	1	1,0
CN-TOB-ERY-CIP-LEV-FOX	1	1,0
CN-TOB-ERY-CIP-LEV-MOX-FOX	8	7,6
CN-TOB-ERY-CIP-LEV-MOX-FOX-TE	1	1,0

**Leyenda:** FOX: cefoxitina, CIP: ciprofloxacino, LEV: levofloxacino, MOX: Moxifloxacino, ERY: eritromicina, CL: cloranfenicol, TE: tetraciclina, CN: gentamicina, TOB: tobramicina, CD: clindamicina, DX: doxiciclina, SXT: cotrimoxazol.

Más del 90% de los aislamientos presentaron resistencia a diferentes grupos de antibióticos; la mitad de ellos (52,4%) tuvieron un patrón de resistencia para betalactámicos, macrólidos y quinolonas (cefotaxima, eritromicina y ciprofloxacino). La quinta parte (20,3%) de los aislamientos fueron resistentes al menos a tres antibióticos diferentes a los betalactámicos.

Al respecto de los patrones de resistencia son múltiples los informes a nivel internacional. Por ejemplo, una investigación realizada en Marruecos durante el 2007 demuestra un 96,4% de aislamientos de SARM resistentes a aminoglucósidos, fluoroquinolonas, y tetraciclina; además de un 89,3% de resistencia a rifampicina (124). De la misma forma, en China encuentran una prevalencia de tres clones de SARM con dos perfiles de resistencia característicos: gentamicina-ciprofloxacino-rifampicina-levofloxacino y gentamicina-ciprofloxacino-clindamicina-eritromicina-tetraciclina-levofloxacino-trimetoprim/sulfametoxazol (150). Los patrones descritos en la presente investigación no coinciden con los reportados por los autores de este último trabajo.

#### **4.4. Descripción de variables demográficas, clínicas y terapéuticas relacionadas con las infecciones neonatales por SARM en el HPJMM**

La gran diversidad de tipos de infecciones por SARM y la variabilidad de muestras a partir de las cuales se puede recuperar este microorganismo es una evidencia de su diseminación tanto a nivel hospitalario, como en la comunidad. La distribución porcentual de las muestras clínicas a partir de las que se realizaron aislamientos de SARM en el presente estudio se muestra en la Tabla 4.3.

Las muestras más frecuentes fueron las secreciones de lesiones de piel y tejidos blandos (86,6%), seguidas de sangre (4,8%) y exudado ótico (4,8%). Esta distribución da la medida, aún sin tener una caracterización molecular de los aislamientos, que la mayoría de las infecciones podrían ser producidas por SARM - AC. Otras muestras a partir de las cuales se recuperaron aislamientos de

SARM con menor frecuencia fueron: exudado ocular, exudado uretral y secreción de absceso faríngeo.

**Tabla 4.3. Frecuencia de aislamientos de SARM según muestra clínica en el servicio de neonatología del HPJMM, 2010 - 2013.**

<b>Muestras clínicas</b>	<b>No</b>	<b>%</b>
<b>Secreciones de IPTB</b>	91	86,6
<b>Sangre</b>	5	4,8
<b>Exudado Ótico</b>	5	4,8
<b>Otras</b>	4	3,8
<b>Total</b>	105	100

Estudios precedentes en Cuba también demuestran un predominio de IPTB por SARM (21% en el Hospital Militar Central “Dr. Luis Díaz Soto”, 2009), y que las muestras de lesiones de piel y tegumento son las más frecuentes (8,6% en el Hospital Universitario “Dr. Gustavo Aldereguía Lima”, 2010; 26% en el CIMEQ, 2010) (108, 130, 147). Otra investigación realizada en el Hospital Pediátrico de Centro Habana por Menéndez, reporta un predominio de aislamientos de SARM a partir de hemocultivos y catéter, totalmente diferente a lo encontrado en esta investigación, debido quizás a la procedencia nosocomial de estas (109). En este mismo sentido, Díaz informa previamente en el HPJMM que la mayor parte de los aislamientos de *S. aureus* proceden de muestras purulentas (151).

Zriouil *et al.* en Marruecos refieren que la mayoría de los aislamientos de *S. aureus* recuperados a partir de muestras de piel y del sitio quirúrgico son resistentes a la metilina (70,9%). También recuperan aislamientos de SARM de secreciones respiratorias (16,4%) y bacteriemias (8,9%), y con menor frecuencia de catéter y líquido pleural (124). La incidencia de bacteriemia por *S. aureus* aumenta con el incremento de la edad; bajas tasas se observan en la población

pediátrica, aproximadamente 8,4/100 000 casos por año y predominan los episodios de bacteriemias por SARM (135).

La revisión de las HC se materializó para 97 (92,4%) de los 105 casos que conformaron el universo de estudio, debido a que ocho (7,6%) neonatos no requirieron ingreso hospitalario. La media de edad de los neonatos fue de  $15,1 \pm 6,7$  días, lo que guarda relación con las infecciones de inicio tardío en esta etapa de la vida. El sexo que predominó fue el femenino (56,7%) y el color de piel blanca (70,1%).

Tras esta revisión y los datos disponibles en el laboratorio de Microbiología del HPJMM las infecciones por SARM se pudieron agrupar de acuerdo a su origen siguiendo los criterios del CDC (61), de la siguiente forma: adquiridas en la comunidad (103/105; 98%), asociadas a la atención hospitalaria (1/105; 1%) y asociadas a la atención hospitalaria de comienzo en la comunidad (1/105; 1%).

Un estudio en los EUA donde analizan las infecciones invasivas por SARM durante el año 2014, concluye que la incidencia de las infecciones por SARM – AH decrecen en un 5,36%, mientras que las adquiridas en la comunidad se incrementan en un 1,57% comparadas con las que ocurren en el año 2013 (61).

Un estudio prospectivo y multicéntrico de vigilancia de las infecciones extrahospitalarias por *S. aureus* en niños de la Argentina demuestra que en infecciones por SARM, la mediana de edad fue 36 meses y prevalecieron los varones (59%) (121). Fortunov *et al.* al realizar un estudio en el Hospital Pediátrico de Texas, EUA, con el objetivo de describir la presentación clínica de la infección neonatal por *S. aureus* adquirido en la comunidad, encuentran también que las infecciones por SARM ocurren predominantemente en varones (74%), pero la razón de la predisposición del sexo masculino a la infección no está clara (9).

Iwamoto *et al.* en los EUA, concluye que SARM afecta a niños pequeños sobre todos menores de 90 días y niños negros (10). De manera general, López *et al.* reportan un incremento en este país del número de hospitalizaciones por IPTB

(0,46% a 1,01% entre 1997 y 2009), la mayor parte de ellas entre neonatos, lactantes y niños en edad preescolar (152).

**Tabla 4.4. Tipos de infecciones producidas por SARM en el servicio de neonatología del HPJMM, 2010 – 2013.**

<b>Tipo de Infección</b>	<b>No.</b>	<b>%</b>
<b>Infecciones de piel y tejidos blandos</b>	86	81,9
Mastitis	62	59,1
Celulitis/Abscesos	13	12,4
Celulitis	3	2,9
Abscesos	10	9,5
Onfalitis	6	5,7
Furunculosis	4	3,8
Balanitis	1	0,9
<b>Infección Invasiva</b>	10	9,5
Bacteriemia	1	0,9
Bronconeumonía/sepsis	1	0,9
Sistémica	1	0,9
IPTB/bacteriemia-Sepsis	5	4,8
Adenitis/bacteriemia	1	0,9
Epidermolisis Bulosa Congénita/ sepsis sistémica	1	0,9
Absceso retrofaríngeo/Meningitis aséptica	1	0,9
<b>Otitis Media Aguda Supurada</b>	5	4,8
<b>Otras</b>	4	3,8

La mayor parte de los neonatos ingresados en el HPJMM tuvieron IPTB, fundamentalmente mastitis, seguidas de infecciones invasivas y otitis media aguda supurada, tal y como se muestra en la Tabla 4.4. Estos resultados son un reflejo de la especial tendencia de SARM-AC a causar IPTB y de su baja frecuencia en infecciones invasivas.

Casado-Verrier *et al.* al evaluar las características clínicas y microbiológicas, así como los datos epidemiológicos de todos los pacientes que acudieron al Servicio de Urgencias del Hospital Universitario “La Paz”, en Madrid, con una infección cutánea supurativa adquirida en la comunidad, encuentran como tipos de infección más frecuentes los abscesos (30,7%), los furúnculos (30,7%) y furunculosis (23%). Otro dato de importancia es que en los pacientes en los que se aísla SARM - AC (62%) se observa una llamativa necrosis tisular (153). Otro estudio en los EUA describe a los abscesos y celulitis como las presentaciones clínicas más frecuentes de las IPTB (73).

En estrecha relación con lo anterior en el presente estudio se identificaron como posibles factores predisponentes a la infección por SARM: la cesárea (38/39,1%), el parto pretérmino (2/2,1%), el bajo peso (1/1,0%), el uso de antibioticoterapia previa (5/5,2%), el ingreso en unidad de cuidados intensivos neonatales (1/1,0%), la estadía prolongada en el hospital materno (1/1,0%) e IPTB en la madre (3/3,1%). El 15,2% de los neonatos presentaron complicaciones, algunos de ellos con más de una: extensión del proceso (7/6,7), sepsis sistémica (6/5,7), bacteriemia (2/1,9%), reingreso (2/1,9%) y meningitis aséptica (1/0,9%).

Yamakawa *et al.* también con el objetivo de poder predecir tempranamente la infección por SARM – AH para adoptar medidas de control eficaces, encuentran cuatro variables como factores de riesgo en las unidades de cuidados intensivos: intubación, heridas abiertas, tratamiento con antibiótico y administración de esteroides (154).

La revisión de las HC aportó también datos sobre la antibiótico-terapia impuesta en cada caso. El 97,9% de los pacientes recibió tratamiento antimicrobiano y en el 85,1% el uso de antibióticos se combinó con tratamiento quirúrgico. Durante el estudio, al 57,9% de los pacientes se les indicó antibióticos en monoterapia y al 42,1% en terapia combinada. Los antibióticos más utilizados fueron gentamicina (81,1%), vancomicina (42,1%) y cotrimoxazol (29,5%).

El tratamiento quirúrgico es fundamental para la resolución de la mayoría de las IPTB, fundamentalmente abscesos y muchos autores coinciden en que en los casos leves debe ser el único tratamiento (87). En el estudio de Casado-Verriera *et al.* comentado con anterioridad, se observa que el 50% de los pacientes con IPTB mejoran cuando reciben solamente tratamiento con betalactámicos y drenaje; en el otro 50% se necesita la administración de un antibiótico activo frente a SARM - AC e incluso repetir el drenaje (153). En función de estos resultados y los obtenidos en otros estudios, el único factor asociado de forma independiente con el fracaso terapéutico es haber recibido un antibiótico inactivo frente a este patógeno (155, 156).

Hay que destacar la importancia del drenaje o el desbridamiento quirúrgico precoz de las infecciones supurativas de la piel y los tejidos blandos. Si se realiza de forma tardía o insuficiente se favorece la bacteriemia persistente y la diseminación de la infección, lo que complica el curso de la enfermedad y alarga la duración del tratamiento antibiótico. Una investigación realizada en el área pediátrica del Hospital Universitario "Vall d'Hebron" en Barcelona, España, concluyen que el drenaje quirúrgico fue la terapéutica de elección en el 67% de los pacientes, que dada su buena evolución no precisaron tratamiento con antimicrobianos (71).

No existen guías de consenso para tratamiento de infecciones por SARM en neonatos. Fortunov *et al.* reporta que la terapia antibiótica empírica que predomina en su estudio frente a pustulosis y celulitis/abscesos es clindamicina en un 75% y 58% respectivamente. Además que todos los pacientes con infecciones invasivas fueron tratados con vancomicina. También informa que el 71% de sus neonatos

fueron tratados con gentamicina, ampicilina o cefalosporinas para efecto sinérgico o cobertura empírica para otras bacterias, fundamentalmente gram negativas (157).

Herigon *et al.* al realizar un estudio observacional retrospectivo para evaluar el uso de agentes antimicrobianos para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* en pacientes internados en 25 hospitales pediátricos de cuidado terciario en los EUA, entre 1999 y el 2008, demuestran un aumento en su utilización de un 52% al 79%. Para la clindamicina se registra el mayor incremento, de un 21% en 1999 al 63% en 2008. El uso de vancomicina en cambio se mantiene estable, mientras que para el cotrimoxazol (9% contra 12%) y linezolid (0% contra 5%) se demuestra un pequeño incremento. Por el contrario, el uso de antibióticos betalactámicos disminuye significativamente durante el período de estudio. La prescripción de antibióticos para niños hospitalizados con infecciones por *S. aureus* ha cambiado drásticamente desde la aparición del SARM - AC, lo que refleja un aumento de la terapia efectiva contra este microorganismo (111).

Yamakawa *et al.* plantean que la terapia prolongada con glicopéptidos causa la emergencia de cepas VISA y hVISA. Recientemente informan además que los aislamientos hVISA pueden ser también generados por SARM expuestos al imipenem. Este grupo de investigadores, a través de un estudio de prevalencia retrospectivo en 750 cepas clínicas de SARM procedentes de 31 hospitales universitarios japoneses, aisladas en 1990, un año antes de la introducción de la vancomicina para uso clínico en Japón, no identifican cepas VISA; pero a través del análisis poblacional identifican 38 cepas hVISA (5,1%) en 19 de los hospitales. Estos resultados revelan la circulación de cepas hVISA en las instituciones de salud japonesas incluso antes de la introducción clínica de la vancomicina (158).

La epidemiología de *S. aureus* ha condicionado la modificación del uso de antibióticos en el tratamiento de las infecciones a lo largo del tiempo, observándose una disminución en la administración de betalactámicos y un aumento en la utilización de otros antimicrobianos. En este sentido la emergencia

del SARM - AC también es una situación de actual interés. No necesariamente todas las infecciones por SARM deben ser tratadas con glicopéptidos, e incluso no todas merecen tratamiento con antibióticos, cuyo uso indiscriminado conduce inexorablemente a la selección de cepas resistentes. Si bien el empleo de determinados antibióticos varía en las distintas regiones geográficas, cada infección estafilocócica posee peculiaridades que influyen en la elección del tratamiento, así como existen recomendaciones de tratamiento antibiótico para infecciones en localizaciones específicas (87, 111).

La antibiótico-terapia empírica se debe basar en la susceptibilidad local de SARM - AC. La clindamicina con o sin gentamicina para pacientes con infecciones no invasivas y vancomicina, oxacilina y gentamicina para infecciones invasivas, donde menos del 10% de los aislamientos de SARM sean resistentes a la clindamicina. El cotrimoxazol puede incrementar el riesgo de kernicterus en las primeras semanas de vida, por lo que su uso debería ser después del período neonatal inmediato. En áreas con incremento de la resistencia a la clindamicina puede ser una opción a considerar.

#### **4.5. Detección de los genes que codifican para la LPV**

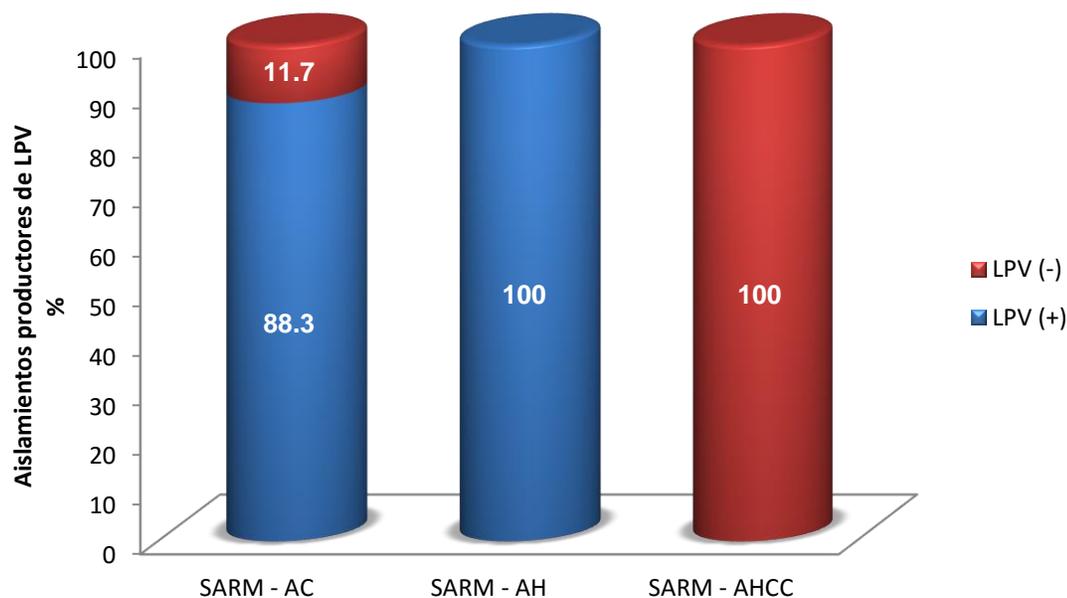
Existe una fuerte asociación epidemiológica entre la LPV y la aparición de infecciones por SARM-AC, debido a que los genes de esta toxina se han detectado en la mayoría de las cepas de SARM – AC aisladas en el mundo. Su presencia es menos frecuente en los aislados SASM-AC, y rara en SARM-AH. Aunque la mayoría de las publicaciones hacen referencia a las cepas USA300 y USA400, también se ha visto la mayor frecuencia de LPV en otras cepas de SARM-AC fuera de EUA. Su presencia se asocia con IPTB, infecciones osteoarticulares y neumonía necrotizante. A excepción de esta última entidad, no se reconoce asociación entre la LPV y las altas tasas de mortalidad, incluyendo la bacteriemia (135, 159, 160).

Además, cada vez son más las publicaciones que hacen referencia a infecciones por SARM-AC productor de LPV, principalmente en Europa (161). A pesar de la asociación epidemiológica descrita, muchos investigadores no consideran la presencia de esta toxina como marcador de SARM-AC. Otros estudios revelan la circulación de aislamientos de SARM – AH también productores de LPV (159). En muchos reportes la LPV es considerada el primer factor de virulencia de SARM-AC, pero existe controversia entre la evidencia clínica-epidemiológica y los resultados encontrados en los diferentes modelos experimentales. Sin embargo, existen otros datos experimentales que sugieren que la contribución de la LPV a la patogénesis de la infecciones por SARM-AC puede ser pequeña, quizás dependiente de otros factores de virulencia, o relacionado con algún componente de susceptibilidad del huésped, lo que indica que podría ser un marcador de cepas con potencial de causar infecciones graves, pero no ser el principal determinante de virulencia (162, 163).

En este estudio los aislamientos de SARM fueron frecuentemente portadores de LPV (84/87,5%, de los 96 aislamientos que integraron el estudio). Se observó además, que las infecciones por cepas con LPV fueron con más frecuencia IPTB (67/84) que invasivas (9/84) (79,8% vs 10,7%,  $p < 0,001$ ). Esta asociación es importante desde un punto de vista clínico, y se debe tener presente para el manejo y tratamiento de las infecciones por *S. aureus* en la comunidad. La frecuencia de infecciones por cepas portadoras de la LPV demostrada es superior a la encontrada en un estudio europeo donde la prevalencia de infecciones por SA-AC LPV (+) en población pediátrica fue del 30% (164).

Aunque actualmente se discute el papel de la LPV en la virulencia de las infecciones, en este estudio se observa que la presencia de esta toxina determina la mayor capacidad necrotizante de *S. aureus* en las IPTB, puesta de manifiesto en la mayor frecuencia de abscesos y necesidad de drenaje (78,8% vs 21,2%,  $p < 0,001$ ). Aunque este hecho hace pensar que las infecciones por cepas LPV (+) son más graves, en este trabajo se observa que tienen mejor pronóstico debido a

que de los 84 neonatos donde se aislaron SARM productores de LPV, 71 no desarrollaron complicaciones.



**Figura 4.2. Relación entre la producción de LPV y el origen del aislamiento de SARM responsable de infecciones neonatales en el HPJMM, 2010 - 2013.**

Retomando los resultados de la agrupación de las infecciones por SARM de acuerdo a su origen (Acápite 4.4), se pudo determinar la relación de estos y la presencia de los genes que codifican para la LPV, tal y como se expone en la Figura 4.2. En el grupo de SARM - AC se detectó un número superior de aislamientos productores de LPV, así como en el único aislamiento de SARM - AH. Este último resultado coincide con el informe del primer estudio de tipificación molecular en Cuba, también se detectan los genes de la LPV en aislamientos responsables de infecciones asociadas a la atención sanitaria (16).

En otro estudio más reciente en Cuba, donde se caracterizan en detalle los clones de SARM responsable de infecciones en cuatro hospitales, entre los que se incluyen dos hospitales pediátricos se detecta que el 100% de estos eran SARM – AC. La mayoría de ellos relacionados con el clon USA 300 de

SARM – AC productor de LPV (83%). La diversidad genética de estos aislamientos sugiere que este clon asociado a infecciones en niños y adultos jóvenes no se diseminó recientemente en el país, sino que se introdujo en múltiples ocasiones. Un aspecto relevante a destacar en dicha investigación es que la totalidad de los aislamientos estudiados procedían de pacientes ingresados y no se encontró ningún clon relacionado con infecciones asociadas a la atención sanitaria. Estos resultados realzan la importancia de la diseminación de clones comunitarios en los hospitales y coincide con los resultados de este trabajo y un estudio previo en el HPJMM donde gran parte de los aislamientos de SARM – AH tenía los genes de la LPV (18, 22).

Cada vez la diferenciación entre SARM - AC y SARM - AH se hace más difícil. Los aislamientos de SARM - AH pueden circular en la comunidad, especialmente entre adultos. Adicionalmente, algunos informes demuestran que clones de SARM con SCC*mec* tipoIV, y particularmente el USA300, causan brotes nosocomiales e infecciones entre pacientes con enfermedades crónicas (4). Otro estudio realizado en China revela una alta prevalencia de SARM – AH productor de LPV y asociados a IPTB, pero no a neumonía y bacteriemia (159).

Nichol *et al.* informan la presencia de LPV en 328 de 366 SARM - AC (89,6%) y 6 de 868 SARM - AH (0,7%), a diferencia de Sunga *et al.* que solo detectan los genes que codifican para esta toxina en el 10% (4/40) de SARM - AC (140, 142). Otros autores informan 71,4% de aislamientos positivos para LPV entre SARM - AC y 4,17% en *S. aureus* sensibles a meticilina (116).

Vandenesch *et al.* al caracterizar aislamientos de SARM - AC provenientes de EUA, Europa y Oceanía, con el objetivo de determinar si los genes de LPV representan un marcador estable de este tipo de cepas a nivel mundial o la existencia de otros rasgos genéticos comunes, encuentran que solo dos genes son exclusivos de estas cepas y compartidos por los aislamientos de los tres continentes: el SCC*mec* tipo IVa y el locus LPV. Dicho estudio demuestra que no ocurrió la diseminación de un solo clon alrededor del mundo, sino que es probable

la evolución simultánea de varios clones de SARM - AC en diferentes localizaciones. Por último, demuestra que dentro de cada continente los antecedentes genéticos de SARM - AC no corresponden a los de SARM - AH, lo que sugiere que estas cepas no surgen de las de SARM - AH locales. La diseminación de un limitado número de clones en cada continente sugiere que las cepas de SARM - AC son patógenos adaptados exitosamente a la comunidad (165).

Frick *et al.* al estudiar a los cultivos positivos para SARM - AC en el área pediátrica del Hospital Universitario "Vall d'Hebron", España, entre agosto de 2006 y enero de 2009, encuentran que el 100% de los aislamientos son productores de LPV (71). Otra investigación también en España entre 13 pacientes con infecciones supuradas, demuestra que 11 aislamientos de SARM - AC eran productores de LPV; dos de ellos, resistentes a macrólidos, clindamicina, aminoglucósidos, quinolonas y cotrimoxazol y portadores del SCC*mec* tipo V. Un dato curioso en dicho estudio lo constituye el informe de un aislamiento no productor de LPV, resistente a quinolonas y macrólidos y portador del SCC*mec* tipo IV, recuperado a partir de un paciente con el antecedente de viaje a Cuba (153).

*S. aureus* se caracteriza por la capacidad de incorporar material genético de otras cepas de especies estafilocócicas diferentes e incluso de bacterias de otros géneros. Esta excepcional plasticidad lo dota de nuevas características infectivas en relación con su virulencia y su resistencia a los antibióticos. Las nuevas características adaptativas de este antiguo patógeno han determinado en los últimos años cambios epidemiológicos importantes en las infecciones estafilocócicas, sobre los cuales deberá prestarse atención sistemáticamente (71).

***Conclusiones***

### V. CONCLUSIONES

- La alta prevalencia de infecciones neonatales por SARM en el HPJMM evidencia un incremento de este fenómeno durante el período de estudio y lo señala como un problema clínico epidemiológico emergente que demanda la implementación de un sistema para su vigilancia activa y control.
- La alta resistencia a macrólidos y quinolonas demostrada desaconseja su uso en el tratamiento de las infecciones neonatales por SARM; por el contrario, la susceptibilidad para cotrimoxazol y vancomicina ratifican la recomendación de su empleo como antimicrobianos de primera línea en el tratamiento.
- El predominio de infecciones de piel y tejidos blandos sugiere que la emergencia de SARM en el servicio de neonatología es a expensas de aislamientos comunitarios.
- El amplio uso de antibiótico-terapia combinada, no siempre justificada, puesta de manifiesto en el servicio de Neonatología del HPJMM realza la necesidad de la revisión continua de los protocolos de tratamiento en dicha institución, con el fin de lograr un uso más racional de los antibióticos disponibles y evitar la emergencia de resistencia.
- La detección de la Leucocidina de *Panton Valentine* en la mayoría de los aislamientos estudiados apunta a la circulación de clones comunitarios como causa de infecciones neonatales y contribuye a la redirección de la terapéutica antimicrobiana empírica.

# ***Recomendaciones***

### VI. RECOMENDACIONES

- La demostración de que las infecciones neonatales por SARM constituyen un problema emergente en el HPJMM apunta a la necesidad de realizar un estudio que abarque los aislamientos sensibles y resistentes a la meticilina, donde se analicen en profundidad aspectos clínicos y epidemiológicos.
- Identificar con certeza el origen de los aislamientos de SARM causantes de infecciones neonatales mediante el uso de técnicas de epidemiología molecular.

# ***Referencias Bibliográficas***

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shephard MA, Fleming VM, Connor TR, Corander J, Feil EJ, Fraser C, et al. Historical zoonoses and other changes in host tropism of *Staphylococcus aureus*, identified by phylogenetic analysis of a population dataset. PLoS One. 2013;8(5):e62369.
2. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Inc; 2013.
3. Chaves F. Emergencia de infecciones pediátricas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociadas a la comunidad: ¿debemos dar la alerta? . Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28(10):672-4.
4. David MZ, Daum RS. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. Clin Microbiol Rev. 2010;23(3):616–87.
5. McCallum N, Berger-Bächli B, Senn MM. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol. 2010;300:118–29.
6. Pigrau C, Barberán J. Infecciones de piel y partes blandas por grampositivos multirresistentes. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26 Supl 2:21-30.
7. Figueiredo AMS, Ferreira FA. The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(3):265-78.
8. Zervou FN, Zacharioudakis IM, Ziakas PD, Mylonakis E. MRSA Colonization and Risk of Infection in the Neonatal and Pediatric ICU: A Meta-analysis. Pediatrics. 2014;133(4):e1015 -e23.
9. Fortunov RM, Hulten KG, Hammerman WA, Mason EO Jr, Kaplan SL. Community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in term and near term previously healthy neonates. Pediatrics. 2006;118(3):874-81.
10. Iwamoto M, Mu Y, Lynfield R, Bulens SN, Nadle J, Aragon D, et al. Trends in Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. Pediatrics. 2013;132(4):e817-e24.

11. Dantes R, Mu Y, Belflower R, Aragon D, Dumyati G, Harrison LH, et al. National Burden of Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections, United States, 2011. *JAMA Intern Med.* 2013;173(21):1970-8.
12. Barrios-López M, Rojo-Conejo P, Gómez-González C, Chaves-Sánchez F. Infecciones neonatales por *Staphylococcus aureus* de inicio en la comunidad. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(5):316-8.
13. Duquesne A, Castro N, Monzote A, Paredes I. Caracterización de aislamientos de *Staphylococcus aureus* comunitarios en muestras purulentas. 2015.
14. Duquesne A, Castro N, Monzote A, Paredes I, Cabrera C. Caracterización de aislamientos nosocomiales de *S. aureus* en muestras purulentas en un hospital ortopédico en Cuba. *Revista Cubana de Ortopedia y Traumatología [Internet].* 2015 Jan 2015; 29(2). Available from: <http://www.revortopedia.sld.cu/index.php/revortopedia/article/view/63/45>.
15. Armas A, Suárez B, Crespo N, Suárez A. Resistencia de *Staphylococcus aureus* a la meticilina en aislamientos nosocomiales en un hospital provincial. *Gaceta Médica Espirituana.* 2015;17(3).
16. Hopman J, Toraño G, Espinosa F, Klaassen CH, Menéndez D, Meis JF, et al. USA300 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Cuba. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2012;1:2.
17. Toraño G, Monzote A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Cuba. *The APUA Newsletter.* 2013;31(3):20-1.
18. Leiva O, Stojanov M, Zayas AM, Barreras G, González M, Martínez L, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from 4 Cuban hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;81(1):1-3.
19. Rodríguez-Baño J, Bischofberger C, Álvarez-Lerma F, Asensio A, Delgado T, García-Arcal D, et al. Vigilancia y control de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. Documento de consenso GEIH-SEIMC y SEMPSPH. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26(5):285-98.

20. Humphreys H, Grundmann H, Skov R, Lucet JC, Cauda R. Prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2009;15(2):120-4.
21. Díaz L. Aislamiento y drogorresistencia de *Staphylococcus aureus* en el Hospital “Juan Manuel Márquez” durante el año 2002 [Tesis de Maestría en Microbiología, Mención en Microbiología Clínica]. La Habana: Universidad de La Habana; 2003.
22. Monzote A, Toraño G, Díaz L, Valdés-Dapena M. Incremento de las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en un hospital pediátrico de Cuba. Panorama Cuba y Salud. 2016;11(1):9-15.
23. OPS/OMS. Alerta epidemiológica: *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. Boletín Epidemiológico [Internet]. 2013 [cited 2013 Jun 30]. Available from:  
[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=22189&Itemid=](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22189&Itemid=).
24. Errecalde L, Ceriana P, Gagetti P, Erbín M, Duarte A, Rolón MJ, et al. Primer aislamiento en Argentina de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad con sensibilidad intermedia a la vancomicina y no sensibilidad a la daptomicina. Rev Argent Microbiol. 2013;45(2):99-103.
25. Schleifer KH, Bell JA. Family VIII. *Staphylococcaceae*. In: De Vos P, Boone DR, Garrity GM, Castenholz RW, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editor. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Second ed. New York: Springer; 2011.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
27. Arêde P, Ministro J, Oliveira DC. Redefining the Role of the  $\beta$ -Lactamase Locus in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*:  $\beta$ -Lactamase Regulators Disrupt the Mecl-Mediated Strong Repression on *mecA* and Optimize the Phenotypic Expression of Resistance in Strains with Constitutive *mecA*

- Expression. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2013 [cited 2013 Jun 28]; 57(7):[3037-45 pp.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23587945>.
28. Ito T, Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Han X, Hiramatsu K. Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC): A Unique Gene Transfer System in Staphylococci. 2013. In: Bacterial Integrative Mobile Genetic Elements [Internet]. Landes Bioscience; [291-305]. Available from: <http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/5345/>.
29. Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, et al. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Infect Chemother. 2013;45(2):117-36.
30. Barbier F, Lebeaux D, Hernandez D, Delannoy AS, Caro V, Francois P, et al. High prevalence of the arginine catabolic mobile element in carriage isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. J Antimicrob Chemother. 2011;66:29–36.
31. Urushibara N, Kawaguchiya M, Kobayashi N. Two novel arginine catabolic mobile elements and staphylococcal chromosome cassette mec composite islands in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotypes ST5-MRSA-Vand ST5-MRSA-II. J Antimicrob Chemother. 2012;67(8):1828-34.
32. Shore AC, Coleman DC. Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insights. Int J Med Microbiol [Internet]. 2013 [cited 2013 Jun 28]; 14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.002>.
33. Pantosti A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health. Front Microbiol [Internet]. 2012 [cited 2013 Jul 9]; 3:[127 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321498/pdf/fmicb-03-00127.pdf>.
34. Fluit AC, Carpaij N, Majoor EAM, Bonten MJM, Willems RJL. Shared reservoir of *ccrB* gene sequences between coagulase-negative staphylococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2013 [cited 2013 Jun 28]. Available from:

<http://jac.oxfordjournals.org/content/early/2013/04/18/jac.dkt121.abstract?sid=8f5f7cb0-7443-4ba4-acc8-4e9b8446e399>.

35. Moellering RC. MRSA: the first half century. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(4):4–11.
36. Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(10):4352-9; discussion 4353. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(2):946.
37. Morosini MI, Cercenado E, Ardanuy C, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(6):325-32.
38. Ardanuy C, Cercenado E, Morosini MI, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. 2011. In: *Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [Internet]. Available from: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
39. De Colsa A. *Staphylococcus aureus*: De la genómica a la clínica. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría.* 2011;XXIV(95):91-4.
40. Mendes RE, Tsakris A, Sader HS, Jones RN, Biek D, McGhee P. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* displaying increased MICs of ceftaroline. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:1321–4.
41. Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, de Lencastre H, Perreten V, Holden MTG, *et al.* Guidelines for Reporting Novel *mecA* Gene Homologues. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(10):4997–9.
42. Giske CG, Martínez-Martínez L, Cantón R, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, *et al.* EUCAST guidelines for detection or resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST [Internet]. 2012 [cited 2013 Feb 10]. Available from: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Consultation/EUCAST\\_guidelines\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_121222.pdf&sa=U&ei=8d1](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/EUCAST_guidelines_detection_of_resistance_mechanisms_121222.pdf&sa=U&ei=8d1)

[mUjRB4WQ9gTo7oA4&ved=0CBwQFjAA&usg=AFQjCNEv-D9zqXBYUDQ5kx4ABWrYIq-oQA](http://mUjRB4WQ9gTo7oA4&ved=0CBwQFjAA&usg=AFQjCNEv-D9zqXBYUDQ5kx4ABWrYIq-oQA).

43. Otero LH, Rojas-Altuve A, Llarrull LI, Carrasco-López C, Kumarasiri M, Lastochkin E, *et al.* How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(42):16808-13.
44. van der Zee A, Roorda L, Hendriks WDH, Ossewaarde JM, Buitenwerf J. Detection of novel chromosome-SCC*mec* variants in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and their inclusion in PCR based screening. *BMC Research Notes* [Internet]. 2011 [cited 2013 Jun 28]; 4:[150 p.]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/150>.
45. Shina KS, Song HG, Kim H, Yoon S, Hong SB, Koo SH, *et al.* Direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from blood cultures using an immunochromatographic immunoassay-based MRSA rapid kit for the detection of penicillin-binding protein 2a. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;67:301-3.
46. Verkade E, Verhulst C, van Cleef B, Kluytmans J. Clinical evaluation of Bio-Rad MRSASelect™ medium for the detection of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:109–12.
47. Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, *et al.* Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA<sub>LGA251</sub>*. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(4):395–400.
48. Kriegeskorte A BB, Idelevich EA, Köck R, Friedrich AW, Karch H, *et al.* Human MRSA Isolates with Novel Genetic Homolog, Germany. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2012 [cited 2013 Jun 28]; 18(6):[1016–8 pp.]. Available from: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1806.110910>.
49. Pichon B, Hill R, Laurent F, Larsen AR, Skov RL, Holmes M, *et al.* Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of *nuc*, Panton-Valentine leucocidin (PVL), *mecA* and homologue *mecA<sub>LGA251</sub>*. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(10):2338-41.

50. Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, *et al.* Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(8):3765–73.
51. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Atlanta, GA: CDC; 2013 [cited 2013 Oct 7]. Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf&sa=U&ei=I99mUr38IYuA9QS6hYHQDg&ved=0CBwQFjAA&usg=AFQjCNF35CoyuwLNUmmkMWsWykIY-8HimQ>.
52. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, *et al.* Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *J Am Med Assn.* 2007;298:1763.
53. Blot SI, Vandewoude KH, Hoste EA, Colardyn FA. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med.* 2002;162:2229.
54. Kesah C, Ben S, Odugbemi TO, Boye CS, Dosso M, Ndinya JO, *et al.* Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9:153-6.
55. Kejela T, Bacha K. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among primary school children and prisoners in Jimma Town, Southwest Ethiopia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2013;12:11.
56. Holden MTG, Hsu L, Kurt K, Weinert LA, Mather AE, Harris SR, *et al.* A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic. *Genome Res.* 2013;23:653–64.
57. Harrison E, Paterson GK, Holden MTG, Larsen J, Stegger M, Larsen AR, *et al.* Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. *EMBO Mol Med.* 2013;5:509–15.

58. Cuny C, Layer F, Strommenger B, Witte W. Rare Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a Novel *mecA* Homologue in Humans in Germany. PLoS ONE. 2011;6(9):e24360.
59. Centers for Disease Control and Prevention. Community associated MRSA information for clinicians. Infection control topics. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2005 [cited 2009 Feb 8]. Available from: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar\\_mrsa\\_ca\\_clinicians.html#4](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca_clinicians.html#4).
60. Morrison MA, Hageman JC, Klevens RM. Case definition for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect. 2006;62:241.
61. Centers for Disease Control and Prevention. Active Bacterial Core Surveillance (ABCs) Report, Emerging Infections Program Network, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, 2014. 2014 [cited 2016 Jun 25]. Available from: <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/mrsa14.html>.
62. Unnerstad HE, Bengtsson B, af Rantzien MH, Börjesson S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing *mecC* in Swedish dairy cows. Act Vet Scand. 2013;55:6.
63. Aspiroz C, Lozano C, Gilaberte Y, Zarazaga M, Aldea MJ, Torres C. Caracterización molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina ST398 en pacientes con infecciones cutáneas y sus familiares. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30(1):18-21.
64. Laurent F, Chardon H, Haenni M, Bes M, Reverdy ME, Madec JY, *et al.* MRSA Harboring *mecA* Variant Gene *mecC*, France. Emerg Infect Dis. 2012;18(9):1465-7.
65. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, *et al.* Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis. 2011;11(8):595-603.
66. Kim C, Milheiriço C, Gardete S, Holmes MA, Holden MTG, Lencastre H, *et al.* Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus*

strain LGA251 and its contribution to the  $\beta$ -lactam-resistant phenotype. *J Biol Chem.* 2012;287(44):36854-63.

67. Monecke S, Gavier-Widen D, Mattsson R, Rangstrup-Christensen L, Lazaris A, Coleman DC, *et al.* Detection of *mecC*-Positive *Staphylococcus aureus* (CC130-MRSA-XI) in Diseased European Hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Sweden. *PLoS ONE.* 2013;8(6):e66166.

68. Loncaric I, K ubber-Heiss A, Posautz A, Stalder GL, Hoffmann D, Rosengarten R, *et al.* Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. carrying the *mecC* gene, isolated from wildlife. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2013 [cited 2013 Jun 28]; 14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Characterization+of+methicillin-resistant+Staphylococcus+spp.+carrying+the+mecC+gene%2C+isolated+from+wildlife>.

69. Paterson GK, Larsen AR, Robb A, Edwards GE, Pennycott TW, Foster G. The newly described *mecA* homologue, *mecA*<sub>LGA251</sub>, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2012 [cited 2013 Jun 28]; 67(12):[2809-13 pp.]. Available from: <http://jac.oxfordjournals.org/content/67/12/2809.abstract>.

70. Vandendriessche S, Vanderhaeghen W, Soares FV, Hallin M, Catry B, Hermans K, *et al.* Prevalence, risk factors and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carried by humans and animals across livestock production sectors. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2013 [cited 2013 Jun 28]; 68(7):[1510-6 pp.]. Available from: <http://jac.oxfordjournals.org/content/68/7/1510.abstract>.

71. Frick MA, Moraga-Llop FA, Bartolom e R, Larrosa N, Campins M, Roman Y. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad en ni os. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(10):675-9.

72. van Kleef E, Robotham JV, Jit M, Deeny SR, Edmunds WJ. Modelling the transmission of healthcare associated infections: a systematic review. *BMC Infect Dis.* 2013;13:294.

73. Ray GT, Suaya JA, Baxter R. Incidence, microbiology, and patient characteristics of skin and soft-tissue infections in a U.S. population: a retrospective population-based study. *BMC Infect Dis.* 2013;13(1):252.
74. Otter J, French GL. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *J Hosp Infect.* 2011;79:189-93.
75. Deghorain M, Van Melderen L. The Staphylococci Phages Family: An Overview. *Viruses.* 2012;4:3316-35.
76. Patel D, Kumar A, Feucht C. Infectious and Dermatologic Conditions. In: Patel DR, Greydanus DE, Baker RJ, eds. *Pediatric Practice: Sports Medicine.* New York: McGraw-Hill; 2009 [cited 2013 Jun 14]. Available from: <http://www.accesspediatrics.com/content/6977027>.
77. Mejía C, Zurita J, Guzmán-Blanco M. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Braz J Infect Dis* [Internet]. 2010 [cited 2011 Jul 15]; 14 Supl 2. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-86702010000800003&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702010000800003&lng=en).
78. Churchill RB, Gonzalez BE. Bone, Joint, Soft Tissue Infections. In: Rudolph CD, Rudolph A, Lister GE, First L, Gershon A, eds. *Rudolph's Pediatrics.* 22nd ed. New York: McGraw-Hill; 2011 [cited 2013 Jun 14]. Available from: <http://www.accesspediatrics.com/content/7022654>.
79. Nizet V, Bradley JS. Staphylococcal Infections. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, editor. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn.* 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, Inc; 2011. p. 489-515.
80. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):99-139.
81. Torres C, Cercenado E. Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(8):541–53.

82. Cheong JWS, Harris P, Oman K, Norton R. Challenges in the microbiological diagnosis and management of hVISA infections. *Pathology*. 2011;43(4):357–61.
83. Riederer K, Shemes S, Chase P, Musta A, Mar A, Khatib R. Detection of Intermediately Vancomycin-Susceptible and Heterogeneous *Staphylococcus aureus* Isolates: Comparison of Etest and Agar Screening Methods. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2011 [cited 2011 Dec 16]. Available from: <http://jcm.asm.org/content/49/6/2147.full>.
84. Mendes RE, Deshpande LM, Jones RN. Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist Updat*. 2014;17(1-2):1-12.
85. Long K, Vester B. Resistance to Linezolid Caused by Modifications at Its Binding Site on the Ribosome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(2):603-12.
86. López-Fabal F, Román F, Almagro M, Sanz N, Gómez-Garcés JL. *Staphylococcus coagulasa* negativos resistentes al linezolid: características fenotípicas, genotípicas y sensibilidad a combinaciones de antibióticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(7):442–7.
87. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. *Clin Infect Dis*. 2011;52(3):e18–e55.
88. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27:44-52.
89. Forrest GN, Tamura K Rifampin Combination Therapy for Nonmycobacterial Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(1):14-34.
90. Lowry A, Bhakta KY, Nag PK. Infectious Disease. In: Lowry AW, Bhakta KY, Nag PK, eds. *Texas Children's Hospital Handbook of Pediatrics and Neonatology*. New York: McGraw-Hill; 2011 [cited 2013 Jun 14]. Available from: <http://www.accesspediatrics.com/content/7441352>.
91. Erickson MA, Merritt C, Polousky JD. Orthopedics. In: Hay Jr. WW, Levin MJ, Deterding RR, Abzug MJ, Sondheimer JM, eds. *CURRENT Diagnosis &*

- Treatment: Pediatrics. 21st ed. New York: McGraw-Hill; 2012 [cited 2013 Jun 21]. Available from: <http://www.accesspediatrics.com/content/56825061>.
92. Hay Jr. WW, Levin MJ, Deterding RR, Abzug MJ, Sondheimer JM. Specific Antimicrobial Agents. In: Hay Jr. WW, Levin MJ, Deterding RR, Abzug MJ, Sondheimer JM, eds. CURRENT Diagnosis & Treatment: Pediatrics. 21st ed. New York: McGraw-Hill; 2012 [cited 2013 Jun 14]. Available from: <http://www.accesspediatrics.com/content/56833062>.
93. Tang HJ, Chen CC, Cheng KC, Toh HS, Su BA, Chiang SR, *et al.* In vitro efficacy of fosfomicin-containing regimens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilms. J Antimicrob Chemother. 2012;67:944–50.
94. Sutcliffe IC. Exposing a chink in the armor of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PNAS. 2012;109(46):18637–8.
95. Morosini MI, Cantón R. Tolerancia y heterorresistencia en microorganismos grampositivos. Med Clin (Barc). 2010;135(Supl.3):16-22.
96. Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
97. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
98. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, *et al.* Involvement of Panton-Valentine Leukocidin-Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. Clin Infect Dis. 1999;29:1128-32.
99. McDonald RR, Antonishyn NA, Hansen T, Snook LA, Nagle E, Mulvey MR, *et al.* Development of a Triplex Real-Time PCR Assay for Detection of Panton-Valentine Leukocidin Toxin Genes in Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2005;43(12):6147-9.
100. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Resolución N° 103. Reglamento para el establecimiento de los requisitos y procedimientos de seguridad biológica en las instalaciones en las que se hace uso de agentes

biológicos y sus productos, organismos y fragmentos de estos con información genética. La Habana: CITMA; 2002. Disponible en:

<http://www.medioambiente.cu/legislacion/resoluciones/R-103-02%20CITMA.htm>.

101. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Resolución N° 38. Lista Oficial de los Agentes Biológicos que afectan al hombre, los animales y las plantas. Gaceta Oficial República de Cuba. 2006; 56: 999-1001.

102. Nakib MA, Réglier-Poupet H, Longo M, Adam J, Raymond J, Zambardi G, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing low-level methicillin resistance may not be detected by the VITEK2® system. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2012 [cited 2013 Jun 28]; 72(2):[193-5 pp.]. Available from: [http://www.dmidjournal.com/issues?issue\\_key=S0732-8893%2811%29X0013-5](http://www.dmidjournal.com/issues?issue_key=S0732-8893%2811%29X0013-5).

103. Sasirekha B, Usha MS, Amruta AJ, Ankit S, Brinda N, Divya R. Evaluation and Comparison of Different Phenotypic Tests to Detect Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and their Biofilm Production. *Int J PharmTech Res*. 2012;4(2):532-41.

104. Millan AB, Domínguez MA, Borraz C, González MP, Almirante B, Cercenado E, et al. Bacteriemias de presentación comunitaria y nosocomial por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(6):336-41.

105. Mera R, Suaya JA, Amrine-Madsen H, Hoge CS, Miller LA, Lu EP, et al. Increasing role of *Staphylococcus aureus* and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States: a 10-year trend of replacement and expansion. *Microb Drug Resist*. 2011;17(2):321-8.

106. Méndez S, Agulla A, Luaces J. Transmisión vertical de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(1):70-6.

107. Jimenez-Truque N, Tedeschi S, Saye EJ, McKenna BD, Langdon W, Wright JP, et al. Relationship Between Maternal and Neonatal *Staphylococcus aureus* Colonization. *Pediatrics*. 2012;129(5):e1252-e9.

108. Reyes ID, Chamero S, Flores M, Ortega S, Farias T. Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. *Revista Electrónica de PortalesMedicoscom* [Internet]. 2010 [cited 2013 Sep 16]; V(10). Available from:

<http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/2352/5/Deteccion-de-Staphylococcus-aureus-resistente-a-la-meticilina>.

109. Menéndez D. Infecciones hospitalarias por *Staphylococcus* resistente a meticilina en el Hospital Pediátrico de Centro Habana [Tesis para optar por el Título de Licenciada en Microbiología]. La Habana: IPK; 2009.

110. Fu J, Ye X, Chen C, Chen S. The Efficacy and Safety of Linezolid and Glycopeptides in the Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. PLoS One. 2013;8(3):e58240.

111. Herigon JC, Hersh AL, Gerber JS, Zaoutis TE, Newland JG. Manejo antibiótico de las infecciones pediátricas por *S. aureus* a lo largo del tiempo. Pediatrics. 2010;125:e1294-e300.

112. Rojo P, Barrios M, Palacios A, Gomez C, Chaves F. Community-associated *Staphylococcus aureus* infections in children. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010;8(5):541-54.

113. Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC, Gallegos B, Castro AL, Martino MD, et al. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). Braz J Infect Dis. 2013;17(6):672-81.

114. Gasch O, Camoez M, Domínguez MA, Padilla B, Pintado V, Almirante B, et al. Predictive factors for early mortality among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2013 [cited 2013 Jun 28]; 68(6):[1423-30 pp.]. Available from: <http://jac.oxfordjournals.org/content/68/6/1423.abstract>.

115. McDougal LK, Fosheim GE, Nicholson A, Bulens SN, Limbago BM, Shearer JE, et al. Emergence of resistance among USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing invasive disease in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(9):3804–11.

116. Wu D, Wang Q, Yang Y, Geng W, Wang Q, Yu S, et al. Epidemiology and molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from skin/soft tissue infections in a children's hospital in Beijing, China. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;67(1):1-8.

117. Velázquez-Guadarrama N, Viguera JC, Escalona G, Arellano J, Giono S, Nava M. Resistencia a linezolid en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y enterococos con elevada resistencia a aminoglucósidos en un hospital pediátrico de tercer nivel. Bol Med Hosp Infant Mex. 2010;67:17-26.
118. Besier S, Ludwig A, Zander J, Brade V, Wichelhaus TA. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: Gene dosage effect, stability, fitness costs, and cross-resistances. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(4):1570-2.
119. Perazzi B, Camacho M, Bombicino K, Flores Z, Vay C, Famiglietti A. *Staphylococcus aureus*: nuevos y antiguos antimicrobianos. Rev argent microbiol [Internet]. 2010 [cited 2013 Jun 15]; 42(3):[199-202 pp.]. Available from: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412010000300010&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412010000300010&lng=es&nrm=iso).
120. Tamariz JH, Cruz J, Atencia A, Figueroa J, Horna G, Guerra H. Resistencia a clindamicina inducida por eritromicina en *Staphylococcus aureus* aislados en tres hospitales de Lima, Perú. Acta Med Per [Internet]. 2009 [cited 2013 Jan 21]; 26(1):[13-25 pp.]. Available from: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/acta\\_medica/2009\\_n1/pdf/a06v26n1.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/acta_medica/2009_n1/pdf/a06v26n1.pdf).
121. Paganini H, Della MP, Muller B, Ezcurra G, Uranga M, Aguirre C, et al. Estudio multicéntrico sobre las infecciones pediátricas por *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente provenientes de la comunidad en la Argentina. Arch Argent Pediatr [Internet]. 2008 [cited 2013 Sep 10]; 106(5). Available from: <http://www.scielo.org.ar/scieloOrg/php/articleXML.php?pid=S0325-00752008000500005&lang=en>.
122. Rodvold KA, McConeghy KW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. Clin Infect Dis. 2014;58(Suppl 1):S20-7.
123. Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, Dellinger EP, Goldstein EJC, Gorbach SL, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Skin and Soft Tissue Infections: 2014 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2014:1-43.

124. Zriouil SB, Bekkali M, Zerouali K. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage at the Ibn Rochd University Hospital Center, Casablanca, Morocco. *Braz J Infect Dis*. 2012;16(3):279-83.
125. Alós JI. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(5):290-7.
126. Parienti JJ, Cattoir V, Thibon P, Lebouvier G, Verdon R, Daubin C, *et al*. Hospital-wide modification of fluoroquinolone policy and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rates: A 10-year interrupted time-series analysis. *J Hosp Infect*. 2011;78(2):118-22.
127. Lafaurie M, Porcher R, Donay JL, Touratier S, Molina JM. Reduction of fluoroquinolone use is associated with a decrease in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolation rates: A 10 year study. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(4):1010-5.
128. Hori S, Sunley R, Tami A, Grundmann H. The Nottingham *Staphylococcus aureus* population study: prevalence of MRSA among the elderly in a university hospital. *J Hosp Infect* [Internet]. 2002 [cited 2013 Jan 21]; 50(1):[25-9 pp.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+Nottingham+Staphylococcus+aureus+population+study%3A+Prevalence+of+MRSA+among+the+elderly+in+a+university+hospital>.
129. Vindel A, Trincado R, Gómez E, Cabrera R, Boquete T, Sola C, *et al*. Prevalence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals between 1996 and 2002. *J Clin Microbiol*. 2006;44(1):266-70.
130. Nodarse R. Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina mediante disco de cefoxitina. *Rev Cub Med Mil* [Internet]. 2009 [cited 2012 Jan 28]; 38(3-4). Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-65572009000300004&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572009000300004&lng=es).
131. Espinosa F, López AL, Hart M, Toraño G. Susceptibilidad antibacteriana de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en el hospital Clínico-Quirúrgico Hermanos Ameijeiras de La Habana, Cuba. *La Gaceta Inf Mic Clin Lat*. 2012;2(2):47-54.

132. Rojas L, Bunsow E, Muñoz P, Cercenado E, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. Vancomycin MICs do not predict the outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in correctly treated patients. J Antimicrob Chemother. 2012;67:1760–8.
133. Goldstein EJC, Van Hal SJ, Fowler VG. Is It Time to Replace Vancomycin in the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections? . Clin Infect Dis [Internet]. 2013 [cited 2013 Jun 28]; 56(12):[1779-88 pp.]. Available from: <http://cid.oxfordjournals.org/content/56/12/1779.abstract>.
134. López-Medrano F, Aguado JM. *Staphylococcus aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina. Nuevos problemas para el clínico. Med Clin (Barc). 2010;135(4):160-1.
135. van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of Mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Clin Microbiol Rev. 2012;25(2):362–86.
136. Chang H, Hsu P, Yang C, Siu L, Kuo A, Chia J, *et al.* Influence of teicoplanin MICs on treatment outcomes among patients with teicoplanin-treated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a hospital-based retrospective study. J Antimicrob Chemother. 2012;67:736–41.
137. Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ, Vindel A, Trincado P, Boquete T. *Staphylococcus* spp. en España: situación actual y evolución de la resistencia a antimicrobianos (1986-2006). Enferm Infec Microbiol Clin. 2008;26(5):269-77.
138. Traverso F, Peluffo M, Louge M, Funaro F, Suasnabar R, Cepeda R. Impacto de la resistencia a la metilina sobre la mortalidad y vigilancia de la sensibilidad a la vancomicina en bacteriemias causadas por *Staphylococcus aureus*. Rev argent microbiol. 2010;42:274-8.
139. Mimica MJ. Clinical implications of vancomycin susceptibility testing in *Staphylococcus aureus*. Braz J Infect Dis [Internet]. 2013 [cited 2013 Jun 28]; 17(2). Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-86702013000200028&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702013000200028&lng=en&nrm=iso&tlng=en).

140. Sung J, Lee J, Choi EH, Lee HJ. Changes in molecular epidemiology of community-associated and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korean children. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74(1):28–33. Pubmed Central PMCID: Jun 28.
141. van Hal SJ, Barbagiannakos T, Jones M, Wehrhahn MC, Mercer J, Chen D, *et al*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vancomycin susceptibility testing: methodology correlations, temporal trends and clonal patterns. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:2284–7.
142. Nichol KA, Adam HJ, Roscoe DL, Golding GR, Lagacé-Wiens PRS, Hoban DJ. Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canada. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2013 [cited 2013 Jun 28]; 68(1). Available from: [http://jac.oxfordjournals.org/content/68/suppl\\_1/i47.abstract?sid=8f5f7cb0-7443-4ba4-acc8-4e9b8446e399](http://jac.oxfordjournals.org/content/68/suppl_1/i47.abstract?sid=8f5f7cb0-7443-4ba4-acc8-4e9b8446e399).
143. Zurita J, Mejía C, Guzmán-Blanco M. Diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Braz J Infect Dis* [Internet]. 2010 [cited 2011 Jul 15]; 14 Supl 2. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-86702010000800005&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702010000800005&lng=en).
144. Jones RN, Flonta M, Gurler N, Cepparulo M, Mendes RE, Castanheira M. Resistance surveillance program report for selected European nations (2011). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(4):429-36.
145. Ager S, Gould K. Clinical update on linezolid in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Infect Drug Resist*. 2012;5:87-102.
146. Ross JE, Farrell DJ, Mendes RE, Sader HS, Jones RN. Eight-year (2002–2009) summary of the linezolid (Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum; ZAAPS) program in European countries. *J Chemother*. 2011;23(2):71-6.
147. Vidal D. Incremento de la incidencia de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina en un hospital de tercer nivel en Cuba, 2007-2010 [Tesis para optar por el grado de Master en Bacteriología y Micología]. La Habana: IPK; 2012.

148. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81.
149. Macedo-Vinas M, Conly J, Aschbacher R, Blanc D, Coombs G, Daikos G, *et al.* Global Survey of Panton Valentine Leucocidin Positive (PVL+) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (IAAC), 2012.
150. Cheng H, Yuan W, Zeng F, Hu Q, Shang W, Tang D. Molecular and phenotypic evidence for the spread of three major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones associated with two characteristic antimicrobial resistance profiles in China. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2013 [cited 2013 Jun 28]. Available from: <http://jac.oxfordjournals.org/content/early/2013/06/12/jac.dkt213.abstract?sid=1da0378a-72e4-46b3-871d-e8fb420fd762>.
151. Monzote A. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Hospital Pediátrico "Juan Manuel Márquez", 2010-2012 [Tesis para optar por el título de Especialista de Primer Grado en Microbiología]. La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2013.
152. Lopez MA, Cruz AT, Kowalkowski MA, Raphael JL. Trends in Resource Utilization for Hospitalized Children With Skin and Soft Tissue Infections. *Pediatrics* [Internet]. 2013 [cited 2013 Aug 15]; 131(3):[e718 -e25 pp.]. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/content/131/3/e718.abstract?sid=459edd4a-a80c-480d-b1ff-35154161936b>.
153. Casado-Verrier B, Gómez-Fernández C, Paño-Pardo JR, Gómez-Gil R, Mingorance-Cruz J, Moreno-Alonso R, *et al.* Prevalencia de infecciones de piel y tejidos blandos producidas por *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina Comunitario en Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(6):300-6.
154. Yamakawa K, Tasaki O, Fukuyama M, Kitayama J, Matsuda H, Nakamori Y, *et al.* Assessment of risk factors related to healthcare-associated methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* infection at patient admission to an intensive care unit in Japan. *BMC Infect Dis.* 2011;11:303.

155. Davis SL, Perri MB, Donabedian SM, Manierski C, Singh A, Vager D, *et al.* Epidemiology and outcomes of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):1705-11.

156. Ruhe JJ, Smith N, Bradsher RW, Menon A. Community-Onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft-tissue infections: impact of antimicrobial therapy on outcome. *Clin Infect Dis.* 2007;44(6):777-84.

157. Fortunov RM, Hulten KG, Hammerman WA, Mason EO, Kaplan SL. Evaluation and Treatment of Community-Acquired *Staphylococcus aureus* Infections in Term and Late-Preterm Previously Healthy Neonates. *Pediatrics.* 2007;120(5):937-45.

158. Yamakawa J, Aminaka M, Okuzumi K, Kobayashi H, Katayama Y, Kondo S. Heterogeneously vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) emerged before the clinical introduction of vancomycin in Japan: a retrospective study. *J Infect Chemother [Internet].* 2011 [cited 2012 Dec 27].

159. Hu Q, Cheng H, Yuan W, Zeng F, Shang W, Tang D, *et al.* Panton-Valentine Leukocidin (PVL)-positive Healthcare-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Are Associated with Skin and Soft Tissue Infections and Colonized Mainly by Infective PVL-encoding Bacteriophages. *J Clin Microbiol.* 2014.

160. Kreienbuehl L, Charbonney E, Eggimann P. Community-acquired necrotizing pneumonia due to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* secreting Panton-Valentine leukocidin: a review of case reports. *Annals of Intensive Care.* 2011;1:52.

161. Rasigade JP, Laurent F, Lina G, Meugnier H, Bes M, Vandenesch F, *et al.* Global distribution and evolution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*, 1981-2007. *J Infect Dis.* 2010;201(10):1589-97.

162. Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(1):43-54.
163. Lo WT, Wang CC. Panton-Valentine leukocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatr Neonatol.* 2011;52(2):59-65. Pubmed Central PMCID: Jul 9.
164. Rojo P, Gómez C, Petrunia B, Stirbien I, Georgescu E, Avedillo P, et al. Community-acquired *Staphylococcus aureus* infections across Europe. ESPID 2011- 29th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases. 2011 La Haya. 2011.
165. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(8):978-84.

***Anexos***

**ANEXO 1**

**Procedimiento general de preparación de las placas de microdilución para la determinación de la CMI de aislamientos de *S. aureus* para cefoxitina, vancomicina, rifampicina y trimetoprim/sulfametoxazol.**

**Cefoxitina**

Se preparan 25 mL de la solución madre a una concentración de 1280 µg/mL, partiendo de una droga con 1000 µg/mg de potencia (100%), utilizando agua destilada estéril como solvente y diluyente.

$$m = V \times [ ] / P$$

$$m = 25 \text{ mL} \times 1280 \text{ µg/mL} / 1000 \text{ µg/mg} = 32 \text{ mg} = \mathbf{0,032 \text{ g}}$$

Se calcula el volumen necesario de la solución madre para preparar 10 mL de la primera dilución de cefoxitina a colocar en la placa de microdilución, que finalmente queda de la siguiente forma:

$$1280 \text{ µg/mL} \times V_1 = 512 \text{ µg/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 4 \text{ mL}$$

**Concentración de Cefoxitina (µg/mL)\***

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[ ]	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	CC
A												
B	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
C												
D												
E												
F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
G												
H												

CMI para la cepa patrón *S. aureus* ATCC 29213: 1 - 4 µg/mL

**ANEXO 1 (Página 2)**

**Procedimiento general de preparación de las placas de microdilución para la determinación de la CMI de aislamientos de *S. aureus* para cefoxitina, vancomicina, rifampicina y trimetoprim/sulfametoxazol.**

**Vancomicina**

Se preparan 25 mL de la solución madre en agua destilada estéril a una concentración de 1280 µg/mL, partiendo de una droga con 1 101µg/mg de potencia<sup>1</sup> (110.1%).

$$m = V \times [ ] / P$$

$$m = 25 \text{ mL} \times 1280 \text{ µg/mL} / 1067,97 \text{ µg/mg} = 29,9 \text{ mg} = \mathbf{0,0299 \text{ g}}$$

Se calcula el volumen necesario de la solución madre para preparar 10 mL de la primera dilución de vancomicina a colocar en la placa de microdilución, que finalmente queda de la misma forma:

$$1280 \text{ µg/mL} \times V_1 = 256 \text{ µg/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

		<b>Vancomicina (µg/mL)</b>											
<b>Tubos</b>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[ ]		128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	CC
A													
B													
C													
D													
E													
F													
G		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
H													

CMI para la cepa patrón *S. aureus* ATCC 29213: 0.5 - 2 µg/mL

<sup>1</sup> La potencia de la droga se calcula utilizando la siguiente fórmula:  
Potencia= 1101 x 1 x (1 - 0,03)= 1067.97 µg/mg

**ANEXO 1 (Página 3)**

**Procedimiento general de preparación de las placas de microdilución para la determinación de la CMI de aislamientos de *S. aureus* para cefoxitina, vancomicina, rifampicina y trimetoprim/sulfametoxazol.**

**Rifampicina**

Se preparan 25 mL de la solución madre a una concentración de 640 µg/mL, partiendo de una droga con 950 µg/mg de potencia (95 %), utilizando Metanol como solvente y agua destilada estéril como diluyente.

$$m = V \times [ ] / P$$

$$m = 25 \text{ mL} \times 640 \text{ µg/mL} / 950 \text{ µg/mg} = 16,8 \text{ mg} = \mathbf{0,0168 \text{ g}}$$

Se calcula el volumen necesario de la solución madre para preparar 10 mL de la primera dilución de rifampicina a colocar en la placa de microdilución, que finalmente queda de la siguiente forma:

$$640 \text{ µg/mL} \times V_1 = 32 \text{ µg/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

		Rifampicina (µg/mL)											
Tubos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[ ]		16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	CC
A													
B													
C		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
D													
E													
F		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
G		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
H													

CMI para la cepa patrón *S. aureus* ATCC 29213: 0.004 - 0.015 µg/mL

**ANEXO 1 (Página 4)**

**Procedimiento general de preparación de las placas de microdilución para la determinación de la CMI de aislamientos de *S. aureus* para cefoxitina, vancomicina, rifampicina y trimetoprim/sulfametoxazol.**

**Trimetoprim/Sulfametoxazol**

**Trimetoprim:** Se preparan 25 mL de la solución madre a una concentración de 1 280 µg/mL, partiendo de una droga con 980 µg/mg de potencia (98%), utilizando ácido láctico 0.05 mol/L (cuidando no exceder el 10% del volumen final) como solvente y agua destilada estéril como diluyente.

$$m = V \times [ ] / P$$
$$m = 25 \text{ mL} \times 1280 \text{ µg/mL} / 980 \text{ µg/mg} = 32,6 \text{ mg} = \mathbf{0,0326 \text{ g}}$$

Se calcula el volumen necesario de la solución madre para preparar 10 mL de la primera dilución de trimetoprim a colocar en la placa de microdilución.

$$1\ 280 \text{ µg/mL} \times V_1 = 64 \text{ µg/mL} \times 10 \text{ mL}$$
$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

**Sulfametoxazol:** Se preparan 25 mL de la solución madre a una concentración de 24 320 µg/mL, partiendo de una droga con 1 000 µg/mg de potencia (100%), utilizando medio volumen de agua destilada estéril con algunas gotas de NaOH 2,5 mol/L como solvente y agua destilada estéril como diluyente.

$$m = V \times [ ] / P$$
$$m = 25 \text{ mL} \times 24320 \text{ µg/mL} / 1000 \text{ µg/mg} = 608 \text{ mg} = \mathbf{0,608 \text{ g}}$$

Se calcula el volumen necesario de la solución madre para preparar 10 mL de la primera dilución de sulfametoxazol a colocar en la placa de microdilución.

$$24\ 320 \text{ µg/mL} \times V_1 = 1\ 216 \text{ µg/mL} \times 10 \text{ mL}$$
$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

**ANEXO 1 (Página 5)**

**Procedimiento general de preparación de las placas de microdilución para la determinación de la CMI de aislamientos de *S. aureus* para cefoxitina, vancomicina, rifampicina y trimetoprim/sulfametoxazol.**

El recubrimiento de la placa finalmente queda de la siguiente forma:

		Trimetoprim/Sulfametoxazol (µg/mL)										
Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[ ]	32/ 608	16/3 04	8/ 152	4/ 76	2/ 38	1/ 19	0,5/ 9,5	0,25/ 4,75	0,125/ 2,3	0,06/1 ,1	0,03/ 0,55	CC

A												
B												
C												
D												
E												
F												
G	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
H												

CMI para la cepa patrón *S. aureus* ATCC 29213: ≤ 0.5/9.5 µg/mL

ANEXO 2

Planilla de recogida de datos reflejados en las historias clínicas de los neonatos ingresados con infecciones por SARM en el HPJMM entre el 2010 - 2013.

1- Nombre del paciente: \_\_\_\_\_ HC: \_\_\_\_\_

2- Edad: \_\_\_\_\_ días Sexo: \_\_\_\_\_

3- Motivo de ingreso: \_\_\_\_\_

4- Fecha de cultivo microbiológico: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Estancia del paciente en el hospital, previo al cultivo: \_\_\_\_\_ días.

5- Tipo de muestra:

Exudado o aspirado de Infecciones de Piel y Partes Blandas \_\_\_\_\_

Exudado Ótico \_\_\_\_\_ Sangre \_\_\_\_\_ Líquido Pleural \_\_\_\_\_

Lavado bronquioalveolar \_\_\_\_\_ Otro tipo de muestra respiratoria \_\_\_\_\_

Herida Quirúrgica \_\_\_\_\_ Orina \_\_\_\_\_ Catéter \_\_\_\_\_ LCR \_\_\_\_\_

Articular \_\_\_\_\_ Ósea \_\_\_\_\_ Otras \_\_\_\_\_

6- Factores extrínsecos (presentes el día de la toma de muestra)

a. Catéter venoso: Central: \_\_\_ Periférico \_\_\_ Arterial \_\_\_ Sonda urinaria \_\_\_\_\_

b. Sonda nasogástrica (aspiración)

c. Sonda nasogástrica (alimentación)

d. Ventilación mecánica invasiva

e. Alimentación parenteral

f. Cirugía Localización: Cerebral \_\_\_ Cabeza-Cuello \_\_\_ Miembros \_\_\_

Tórax \_\_\_ Abdominal \_\_\_ Otros \_\_\_\_\_

g. Otros \_\_\_\_\_

7- ¿Estuvo ingresado el paciente, previamente? (Considerar aquí, un año antes del ingreso actual) No \_\_\_\_\_ Si \_\_\_\_\_

ANEXO 2 (Página 2)

Planilla de recogida de datos reflejados en las historias clínicas de los neonatos ingresados con infecciones por SARM en el HPJMM entre el 2010 - 2013.

8- Diagnóstico clínico:

Especificar tipo de infección:

Neumonía \_\_\_ Otras infecciones respiratorias \_\_\_\_\_ (especificar)

Meningitis \_\_\_ Infección del tracto urinario \_\_\_ Bacteriemia \_\_\_

Endocarditis \_\_\_ Artritis \_\_\_ Osteomielitis \_\_\_

Piel y tejidos blandos \_\_\_\_\_ Sepsis de la Herida Quirúrgica \_\_\_\_\_

Otras \_\_\_\_\_

9- Complicaciones:

SRIS \_\_\_\_\_ Shock séptico \_\_\_ Bacteriemia secundaria \_\_\_\_\_

Endocarditis \_\_\_ Derrame Pleural \_\_\_ Absceso pulmonar \_\_\_\_\_

Extensión de la infección \_\_\_\_\_ Otras complicaciones \_\_\_\_\_

10- Tratamiento antimicrobiano.

11. Estadía hospitalaria: \_\_\_ días. Fecha de Ingreso: \_\_\_\_\_ Fecha de Egreso: \_\_\_\_\_