

Universidad de Cartagena

Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias Básicas
Unidad Académica de Microbiología
Cartagena de Indias



Prevalencia de Infecciones Adquiridas en la Comunidad por *Staphylococcus aureus* Resistente a Metilina en el Hospital Infantil Napoleón Franco Pareja de la Ciudad de Cartagena de Indias durante el período Octubre-Diciembre de 2009

Proyecto de Investigación en la Facultad de Medicina
presentado como requisito para Ascenso
en el escalafón docente para ascender
de la categoría de **Profesor Asistente
a Profesor Asociado**
en la Universidad de Cartagena

Autor

Niradiz de las Mercedes Reyes Ramos

Colaborador

Hernando Pinzón

INFORME FINAL

ENERO 2011

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina - SARM	5
1.2. Epidemiología del <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina adquirido en la comunidad (SARM-AC)	6
1.3. Factores de riesgo para la infección pediátrica por <i>Staphylococcus aureus</i> adquirido en la comunidad	9
1.4. Infecciones pediátricas causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> adquirido en la comunidad	10
2. METODOLOGIA	
2.1. Diseño metodológico, población estudio y recopilación de la información	12
2.2. Análisis microbiológicos de los aislamientos	12
2.2.1. Toma y procesamiento de muestras clínicas	12
2.2.2. Pruebas microbiológicas para la confirmación de <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.2.2.1. Tinción de gram	14
2.2.2.2. Prueba de la catalasa	14
2.2.2.3. Prueba de la coagulasa	14
2.2.2.4. Prueba de aglutinación en látex	14
2.2.3. Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> a antibióticos	15
2.3. Pruebas moleculares	15
2.3.1. Extracción de ADN genómico	15
2.3.2. Amplificación por PCR múltiple de los genes <i>nuc</i> , <i>mecA</i> y <i>PVL</i>	16
2.3.3. Tipificación del casete cromosomal SCC <i>mec</i> en los aislamientos	17
2.4. Procesamiento de la información y análisis estadístico	17
3. RESULTADOS	18
4. DISCUSION	28
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	31
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	33
7. ANEXOS	
7.1. Consentimiento Informado	38

RESUMEN

Introducción. Las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA) resistentes a meticilina (SARM) son causa aumentada de morbilidad y mortalidad asociada a las infecciones por esta bacteria, las cuales conforman un espectro amplio que incluye desde infecciones relativamente inocuas hasta procesos sistémicos que comprometen seriamente la vida del paciente. Aunque las cepas SARM se asociaron inicialmente a infecciones nosocomiales, en los últimos años se ha observado que han ido cambiando su epidemiología ya que en diversas áreas geográficas del mundo se ha reportado la emergencia en la comunidad de estas cepas SARM causando principalmente infecciones en pacientes sin ningún nexo con los servicios hospitalarios. Estas cepas SARM adquiridas en la comunidad (SARM-AC) afectan principalmente a jóvenes y niños sin patologías previas y se han asociado con mas frecuencia a infecciones de piel y tejidos blandos, y con menos frecuencia a infecciones graves no asociadas previamente con SA, como neumonías y fascitis necrotizantes. En estos aislamientos SARM-AC, la resistencia a meticilina no se acompaña de resistencia a otros antibióticos, excepto en algunos casos donde se observa resistencia aislada a eritromicina o a algún otro antimicrobiano. Actualmente se acepta que las cepas SARM-AC representan un problema potencialmente grave cuya prevalencia está en aumento en diversas áreas del mundo, incluyendo Estados Unidos, Australia, Taiwan, y Brasil, entre otros. Aunque Colombia no es ajena a esta problemática infecciosa, en nuestro país los estudios sobre la prevalencia y caracterización de cepas SARM son bastante limitados, y en la ciudad de Cartagena en particular no se dispone de datos epidemiológicos ni se conocen las características clínicas ni microbiológicas de las cepas SARM-AC causantes de infecciones en nuestro medio, especialmente en la población pediátrica. Por lo tanto, la realización de este estudio aporta información nueva sobre los aspectos clínicos, epidemiológicos, microbiológicos y moleculares de los aislamientos SARM que actualmente están causando infecciones adquiridas en la comunidad en la población pediátrica de la ciudad de Cartagena de Indias.

Metodología. El presente fue un estudio retrospectivo, descriptivo, de corte transversal, del tipo serie de casos. Previo consentimiento informado por parte de los padres o guardianes de los pacientes, se revisaron las historias clínicas y se estudiaron los

aislamientos clínicos de pacientes con diagnóstico de infección por SARM-AC atendidos en el Hospital Infantil Napoleón Franco Pareja (HINFP) de la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia, durante el período comprendido entre Octubre a Diciembre de 2009. Las historias clínicas se revisaron para definir los factores de riesgo predisponentes a la infección. A los aislamientos clínicos se les determinó la susceptibilidad a antibióticos mediante el método de difusión en disco según los estándares del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Además, se realizaron ensayos moleculares para la caracterización de los aislamientos. **Procesamiento de la información.** Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 13.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL). Se calculó la frecuencia del gen *mecA* en el total de aislamientos clínicos de SA y se determinó la prevalencia de cepas SARM en el período de estudio. Los aislamientos se clasificaron en dos grupos de acuerdo a la presencia del gen *mecA*: MSSA (SA sensibles a meticilina; *Mec* negativos) y SARM (SA resistentes a meticilina; *Mec* positivos) y se correlacionaron con los datos clínicos, microbiológicos, y moleculares. La información recopilada de las historias clínicas se utilizó para identificar los factores predisponentes de la infección y la frecuencia de los diferentes tipos de infecciones presentadas en el período de estudio. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante la prueba exacta de *Fisher* usando un valor $P < 0.05$ para la significancia estadística. **Resultados.** Se obtuvieron un total de 60 aislamientos reportados como SA por el laboratorio clínico del HINFP, los cuales fueron obtenidos de un número igual de pacientes diagnosticados con infección de adquisición comunitaria. Cada uno de los 60 aislamientos fue analizado mediante ensayos microbiológicos y moleculares en los laboratorios del grupo de Genética y Biología Molecular. Del total de 60 aislamientos, 52 presentaron pruebas confirmatorias positivas para SA, para una frecuencia de 86.7%. El 50% de los aislamientos ($n = 26$) fueron *mecA* positivos (SARM) y el 50% ($n = 26$) fueron *mecA* negativos (MSSA). De las 26 cepas SARM, una presentó resistencia a clindamicina, dos a eritromicina, una a trimetoprim sulfa, y tres a gentamicina, mientras que de las 26 cepas MSSA, tres fueron resistentes a eritromicina. No se encontró resistencia a rifampicina ni a vancomicina en los aislamientos estudiados y no se encontró asociación con los diferentes factores de riesgo analizados.

Palabras clave: SARM-AC, Mec-A, PVL, SCCmec, S. aureus

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina - SARM

Staphylococcus aureus (SA) es una bacteria Gram positiva considerada mundialmente como un importante patógeno humano causante de enfermedades tanto nosocomiales como adquiridas en la comunidad ^{1, 2}. El panorama actual de la infección por SA se ha complicado ya que en los últimos años se ha encontrado que los aislamientos obtenidos tanto de individuos sanos como de pacientes con infecciones causadas por esta bacteria han presentado cambios en sus patrones de resistencia a antibióticos y en sus genes de virulencia ^{3, 4}. De particular interés, tanto médico como científico, ha sido el surgimiento y diseminación de cepas resistentes a meticilina (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: SARM)⁴. La resistencia a este antibiótico se debe a la adquisición horizontal del gen *mecA*, el cual codifica una proteína fijadora de penicilina, la PBP2a, que es una transpeptidasa importante en la síntesis del peptidoglicano y que a diferencia de las otras proteínas fijadoras de penicilina presentes en las cepas sensibles, la PBP2a presenta baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos ⁵⁻⁷. La adquisición de este gen *mecA* le ha conferido al SA resistencia a todos los antibióticos beta-lactámicos.

El gen *mecA* se encuentra en un elemento genético móvil grande, conocido como el ***casete cromosomal estafilocócico mec*** ("*staphylococcal cassette chromosome mec*", *SCCmec*), el cual ha sido transferido horizontalmente por especies relacionadas del género *Staphylococcus* a cepas precursoras de SA sensibles a meticilina, en múltiples eventos independientes entre sí ^{8, 9}. En la actualidad se han identificado siete tipos principales de casetes *SCCmec*, del I-VII, los cuales difieren entre sí en su contenido genético y organización ¹⁰⁻¹³. Los tipos *SCCmec* IV, V, VI y VII son responsables de resistencia solo a antibióticos beta lactámicos, mientras que los tipos I, II y III son responsables de resistencia a múltiples clases de antibióticos, debido principalmente a la presencia de genes adicionales de resistencia codificados en plásmidos y transposones que se han integrado en el elemento *SCCmec* ¹².

Los elementos SCC*mec* difieren entre sí en su repertorio de determinantes de resistencia a los antibióticos. El tipo I, que se diseminó entre las cepas SARM aisladas en los años 60, durante los primeros años de empleo de los beta-lactámicos, sólo contiene la resistencia a los antibióticos que confiere el producto del gen *mecA*. En contraste, los SCC*mec* tipos II y III, presentes en cepas dominantes en los años 80, contienen múltiples genes de resistencia a diferentes antibióticos. Tanto el SCC*mec* tipo IV como el tipo V son elementos pequeños, ya que les falta el fragmento donde se integran los transposones y plásmidos, por lo tanto, no acarrearán resistencia a otros antibióticos diferentes a los beta-lactámicos. Al igual que el tipo I, pero a diferencia del tipo II y III, los tipos IV y V son altamente transmisibles.

La diseminación de las cepas SARM en amplias zonas geográficas del mundo probablemente refleja su gran habilidad para causar infecciones, persistir y diseminarse de una región a otra, y aún a diferentes continentes. Desde hace muchos años se han reportado brotes epidémicos de infecciones por SA en todo el mundo. Estos se han detectado en una gran variedad de lugares, tales como hospitales, centros de atención y clínicas, y en años recientes, en la comunidad ³. Actualmente, estos brotes se clasifican en infecciones nosocomiales e infecciones adquiridas en la comunidad.

1.2. Epidemiología del Staphylococcus aureus resistente a meticilina adquirido en la comunidad (SARM-AC)

Hasta hace pocos años las infecciones por SARM generalmente se adquirían dentro de los hospitales. Sin embargo, a finales de los años 90 emergieron cepas SARM causantes de infecciones en adultos y niños sanos en las comunidades, y su prevalencia ha aumentado significativamente en los últimos años. La adquisición de estas cepas no se relaciona con los factores de riesgo tradicionales atribuidos a las cepas SARM hospitalarias (SARM-AH), son resistentes a pocos antibióticos y presentan la inclusión de factores de virulencia específicos ¹⁴⁻¹⁶. Las cepas de SA que causan estas infecciones se han denominado cepas SARM adquiridas en la comunidad (SARM-AC).

El primer caso de infección causada por SARM-AC fue reportado en Australia en 1990, en una comunidad aborígen sin ningún contacto con el sistema de salud nacional ¹⁷. Luego en 1997 el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades ¹⁸ reportó en Minnesota, Estados Unidos, la muerte de 4 niños previamente saludables, los cuales rápidamente desarrollaron neumonías necrotizantes y sepsis ocasionadas por SARM-AC ¹⁸. Desde esa fecha se ha visto una diseminación mundial de este tipo de aislamientos y un incremento de las infecciones producidas por ellos, según reportes publicados en España ¹⁹, Japón ²⁰, Canadá ²¹, Estados Unidos ^{22, 23}, Australia ²⁴, Taiwan ²⁵, Brasil ¹², y Colombia ^{1, 26} entre otros.

Para clasificar una cepa de SA como SARM-AC se debe cumplir con la condición de que halla sido aislada de un paciente cuya infección se halla originado en la comunidad y que carezca de los factores de riesgo asociados a una infección nosocomial, tales como hospitalizaciones frecuentes y recientes, estancia prolongada en salas de cuidados especiales, uso de dispositivos invasivos como sondas o catéteres, cirugías recientes o diálisis, empleo de drogas intravenosas o una prolongada exposición a los antibióticos ²⁷⁻²⁹. Actualmente se desconoce si las cepas SARM han emergido *de novo* en la comunidad o si por el contrario se han ido extendiendo en la comunidad después de su transmisión inicial desde un centro de salud, guardería infantil, o instituciones al cuidado de individuos a largo termino (asilos, orfanatos, etc.)³⁰. Lo cierto es que las oportunidades de diseminación hacia y a través de la comunidad están en aumento debido a que cada vez mas pacientes están siendo dados de alta médica de los hospitales después de ser tratados por una infección con SARM. De igual forma, hay un mayor potencial para un contacto mas estrecho debido a las condiciones de hacinamiento de los individuos, principalmente niños procedentes de familias numerosas y/o que asisten a guarderías y jardines infantiles con un número elevado de individuos ^{30, 31}.

Independientemente de su origen, el surgimiento de las cepas SARM en la comunidad es una enorme amenaza con implicaciones clínicas importantes, ya que los tratamientos antibióticos pueden fallar dando como resultado complicaciones que pueden terminar con la muerte del paciente. Por lo tanto, las estrategias tendientes a disminuir la

utilización de los antibióticos que favorecen la selección de estas cepas resistentes es un paso esencial para controlar su surgimiento y diseminación en los hospitales y en la comunidad ³².

La aparición de cepas SARM-AC con características diferentes a las de las cepas SARM-AH ha provocado una alerta entre los centros y organizaciones de salud dedicados al estudio y control de este microorganismo ³². Las infecciones por estas cepas SARM-AC son un problema emergente en muchas partes del mundo, su dimensión real aún no se conoce, y las consecuencias de su cambio epidemiológico, sus manifestaciones clínicas y su control pueden convertirse en un problema de salud pública serio en un futuro cercano. Por lo tanto, se requiere establecer medidas sanitarias para controlar la reemergencia de este agente patógeno, y de ser posible, eliminarlo a tiempo para evitar que se convierta en una grave amenaza para la comunidad ³³⁻³⁵.

En nuestro país, la combinación de los resultados encontrados en varios estudios muestran un aumento significativo en la frecuencia de las infecciones ocasionadas por aislamientos SARM-AC (1% en 2001 a 26% en 2008), principalmente infecciones de piel y tejidos blandos en personas que acuden a las instituciones de salud de mediana y alta complejidad. Los análisis moleculares de aislamientos colombianos SARM-AC muestran que estos han adquirido el elemento *SCCmec* tipo IVc, y en su mayoría poseen los genes *lukF-PV/lukS-PV* que codifican para la toxina de Panton-Valentine (PVL), presentan los genes *seq*, *sek* y *bsaA*, que codifican para las enterotoxinas Q, K y bacteriocina A, respectivamente, con una frecuencia superior al 88% ³⁶⁻⁴¹.

Por su parte, en la ciudad de Cartagena no disponemos de datos epidemiológicos publicados sobre las características clínicas y epidemiológicas de las cepas SARM-AC causantes de infecciones en nuestro medio, y mucho menos de sus características moleculares, lo cual es el principal objetivo de este estudio.

1.3. Factores de riesgo para la infección pediátrica por *Staphylococcus aureus* adquirido en la comunidad

En general, las infecciones por SARM-AC afectan principalmente la piel y el tejido subcutáneo, siendo la presentación clínica más común una foliculitis o un absceso ⁴² reportándose como factores predisponentes para su adquisición el trauma, picaduras de insectos, uso de drogas intravenosas y bajo nivel de higiene ^{30, 31, 43}.

La capacidad de estas cepas SARM-AC para causar infecciones de piel y tejidos blandos se atribuye a la presencia de diversos factores de virulencia codificados en el genoma bacteriano y a su regulación coordinada por sistemas sensores de dos componentes ¹⁶. Entre estos factores de virulencia se destacan las exotoxinas superantigénicas, la toxina-1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), y la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL)^{44 45-47}.

Con menor frecuencia, las cepas SARM-AC también se han asociado a infecciones invasivas graves como neumonías y fascitis necrotizantes. En particular, se ha reportado que la alta tasa de mortalidad asociada con la neumonía necrotizante causada por cepas SARM-AC se debe a la acción tóxica de PVL sobre los leucocitos ⁴⁸. La asociación entre cepas de SA PVL-positivas y el desarrollo de neumonías adquiridas en la comunidad fue reportada inicialmente en 1999 por Lina et al. ⁴⁷. En la actualidad existe un interés creciente en el estudio de aislamientos clínicos de SA PVL-positivos debido a brotes recientes de infecciones severas por este tipo de cepas en niños y adultos jóvenes previamente sanos en Estados Unidos y Europa ^{35, 49, 50}.

Los estudios de laboratorio muestran que los efectos tóxicos de PVL son consecuencia de la acción sinérgica de dos exo-proteínas separadas, LukS-PV y LukF-PV, las cuales están codificadas por dos genes contiguos que se transcriben simultáneamente (*lukS*-PV y *lukF*-PV) y que están contenidos en la secuencia de un bacteriófago temperado ⁴⁹. Esta leucocidina de dos componentes, formadora de poros, tiene actividad citolítica específica contra granulocitos, monocitos y macrófagos ⁵¹. Aunque actualmente la importancia de PVL en la patogénesis de las infecciones por SA es controversial, se ha establecido que sí existe una asociación epidemiológica entre las infecciones por

SARM-AC y la presencia de PVL, la cual es infrecuente en los aislamientos SARM-AH⁸,⁵². De igual forma, en los aislamientos SARM-AC es característica la presencia del elemento SCCmec tipo IV o V.

Una revisión de la literatura nos muestra que en Colombia existen pocos estudios sobre la prevalencia o las características moleculares de cepas clínicas SARM-AC. Entre estos se destaca un estudio retrospectivo en el que se analizaron los aislamientos de SA obtenidos de pacientes ambulatorios atendidos en 22 hospitales de Bogotá en el periodo 2001-2005⁴⁰. En este estudio se encontró que de 2,308 aislamientos de SA analizados, 618 (26,8%) correspondieron a cepas SARM, sugiriéndose que la prevalencia de cepas SARM-AC es más alta de lo que se pensaba. Por su parte, en la ciudad de Cartagena no se dispone de datos epidemiológicos publicados sobre la prevalencia de cepas SARM-AC causantes de infecciones en nuestro medio, y mucho menos de sus características moleculares.

1.4. Infecciones pediátricas causadas por Staphylococcus aureus adquirido en la comunidad

SARM-AC se disemina a través del contacto directo con la piel y está asociado principalmente a infecciones adquiridas en la comunidad y que afectan principalmente la piel y tejidos blandos en niños y adolescentes previamente sanos. El primer caso de infecciones causadas por aislamientos SARM-AC fue reportado en Australia en 1990, en una comunidad aborígen sin ningún contacto con el sistema de salud nacional¹⁷. Luego en 1997 el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades¹⁸ reportó en Minnesota, Estados Unidos, la muerte de 4 niños saludables por neumonías necrotizantes y sepsis en ocasionadas por SARM-AC¹⁸. Desde esa fecha se ha visto una diseminación mundial de este tipo de aislamientos y un incremento de las infecciones asociadas.

SARM-AC es una causa principal de infecciones de piel y tejidos blandos en pacientes pediátricos que se presentan al área de urgencias de clínicas y hospitales en diversas áreas geográficas del mundo⁵³⁻⁵⁵. Aunque la mayoría de las infecciones por SARM-AC

son relativamente menores, en ocasiones se producen manifestaciones serias incluyendo fascitis necrotizantes, piomiositis, infecciones osteoarticulares, y neumonías que en ocasiones pueden llegar a ser severas y fatales como las neumonías necrotizantes ⁵⁴. Algunos estudios reportan que las infecciones severas causadas por SARM-AC están en aumento, y que se asocian a una alta tasa de mortalidad, lo cual ha elevado la inquietud sobre el tratamiento empírico inicial apropiado para tratar estas infecciones ^{54, 56}. Es así que algunos estudios sugieren que la monoterapia con vancomicina pudiera no ser el tratamiento adecuado para tratar estas infecciones severas por SARM-AC ⁵⁴.

De otra parte, la epidemiología y las manifestaciones clínicas causadas por las cepas SARM-AC han sufrido cambios importantes que representan un reto para el reconocimiento, diagnóstico, y tratamiento por parte del personal médico ^{54, 57}. Aunque inicialmente SARM-AC se asociaba a infección localizada en niños previamente saludables, los reportes más recientes muestran un aumento en enfermedades más invasivas y severas que en ocasiones han tenido desenlaces fatales ⁵⁴. El patrón de resistencia a antibióticos también está cambiando, con aumento en las clases de antibióticos a los cuales estas cepas son resistentes ^{22, 54}. Por lo tanto, la elección de antibióticos se ha tornado aún más problemática para los médicos, los cuales de por sí cuentan con un armamento limitado de antibióticos. El manejo clínico de infecciones leves de piel como forúnculos y abscesos ahora requiere de la colaboración estrecha entre el médico general y el especialista en enfermedades infecciosas ⁵⁷.

Ya que la carga de infecciones pediátricas por SARM está en franco aumento, el médico pediatra debe tener un alto grado de sospecha y debe instaurar una terapia antibiótica apropiada basada en los perfiles locales o regionales de resistencia a antibióticos de los aislamientos SARM-AC. Por lo tanto, existe la urgente necesidad de implementar un programa de control de infecciones que incluya componentes de vigilancia activa para ayudar a manejar adecuadamente la epidemia ⁵⁷.

2. METODOLOGIA

2.1. Diseño metodológico, población estudio y recopilación de la información

El presente fue un estudio retrospectivo, descriptivo, de corte transversal, del tipo serie de casos. Previo consentimiento informado de los padres o guardianes de los pacientes, se procedió a revisar las historias clínicas y a analizar los aislamientos clínicos de pacientes con diagnóstico de infección por SARM-AC atendidos en el Hospital Infantil Napoleón Franco Pareja- HINFP de la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia, durante el período comprendido entre Octubre a Diciembre de 2009. Se consideró la adquisición de la infección como comunitaria si el aislamiento de SARM fue obtenido de un paciente hospitalizado estrictamente dentro de las primeras 48 horas de ingreso, de un paciente proveniente del servicio de guardia o de uno atendido en consulta externa, sin factores de riesgo hospitalarios.

Las historias clínicas se revisaron para definir los factores de riesgo predisponentes a la infección y a los aislamientos clínicos se les determinó la resistencia a antibióticos mediante el método de difusión por disco según los estándares del CLSI. El estudio contó con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Cartagena.

2.2. Análisis microbiológicos de los aislamientos

2.2.1. Toma y procesamiento de muestras clínicas

Para la identificación de pacientes con infección por SA durante el período de estudio se estableció un sistema de vigilancia basado en el laboratorio clínico de la institución hospitalaria. La revisión retrospectiva de las historias clínicas de los pacientes con infección confirmada mediante cultivo por el laboratorio clínico fue realizada al final del período de estudio para recolectar los datos de edad, género, procedencia geográfica, diagnóstico inicial y final, sitio de infección, terapia antibiótica empírica y definitiva, procedimientos asociados al tratamiento, duración de la estancia hospitalaria, y desenlace al momento del alta hospitalaria.

SARM-AC se definió como un aislamiento de SA recuperado de un paciente con infección que se desarrolló en la comunidad o dentro de las 48 horas de la admisión hospitalaria, en la ausencia de factores de riesgo establecidos para la infección por SARM ^{43 58, 59}.

La identificación microbiológica de cada uno de los aislamientos a estudiar se realizó mediante métodos convencionales ⁶⁰, y la sensibilidad a los antimicrobianos se determinó por el método de difusión en agar con discos, según las normas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁶¹. Los antibióticos ensayados fueron: oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), trimetoprima-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg), rifampicina (5 µg), y vancomicina (30 µg). La caracterización fenotípica de la resistencia a macrólidos se hizo mediante la prueba de doble disco, eritromicina (15 µg) y clindamicina (2 µg) ⁶¹. Como control se utilizó la cepa de SA ATCC-25923. Después de 24 horas de incubación en aerobiosis a 35°C, se determinó el diámetro de los halos de inhibición⁶¹.

2.2.2. Pruebas microbiológicas para la confirmación de *Staphylococcus aureus*

Para todos los ensayos microbiológicos y moleculares descritos en este estudio se utilizaron como controles las cepas ATCC-25923 la cual es MSSA (*mecA* -, *nuc*+) y ATCC-33591 la cual es SARM (*mecA*+; *nuc*+). Los aislamientos que fueron identificados como SA por el laboratorio clínico del HINFP, fueron enviados al laboratorio de microbiología del grupo de investigación para su reconfirmación y análisis posterior. Cada uno de estos aislamientos fue subcultivado en agar manitol-sal y sometido a pruebas microbiológicas para su reconfirmación. Los aislamientos reconfirmados como SA fueron luego almacenados en caldo tripticasa de soya (TSB) con 20% de glicerol a -40°C.

2.2.2.1. Tinción de gram

La morfología microscópica para cada aislamiento bacterial fue establecida mediante la coloración de gram usando objetivo de inmersión 100X. Para esto, los extendidos bacteriales fueron preparados sobre portaobjetos, fijados con calor, teñidos con cristal violeta, fijados con lugol, decolorados con alcohol y tratados con el contracolorante safranina. Los preparados se observaron con microscopio óptico usando objetivo de inmersión 100X.

2.2.2.2. Prueba de la catalasa

La capacidad de producción de la enzima catalasa para cada aislamiento bacterial fue establecida mediante la prueba de la catalasa usando peróxido de hidrógeno. Para esto, se prepararon extendidos bacteriales sobre portaobjetos a los cuales se les agregó una gota de H₂O₂ al 3% y se observó la producción de burbujas de gas.

2.2.2.3. Prueba de la coagulasa

Cada aislamiento bacterial fue inoculado en un tubo con plasma de conejo, resuspendido en el plasma e incubado por 4-24 horas en baño de agua a 37°C. La presencia de coagulación se determinó cada hora durante las primeras 4 horas. Si a estas cuatro horas el resultado fue negativo, se hizo una observación final a las 24 horas de incubación.

2.2.2.4. Prueba de aglutinación en látex

Como método complementario para la confirmación de SA se utilizó una prueba de aglutinación en látex (*Staphaurex*) para las colonias presuntivas, que de acuerdo a las pruebas anteriores resultaron ser cocos gram positivos, productores de catalasa y que dieron prueba positiva para la coagulasa en tubo.

2.2.3. Pruebas de susceptibilidad *in vitro* a antibióticos

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* de los aislamientos confirmados de SA se realizaron con el método de difusión en disco, siguiendo las guías de la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), anteriormente denominado NCCLS ⁶¹. Para esto, cada aislamiento identificado positivamente como SA se subcultivó en agar nutritivo por 18 horas a 37°C al cabo de las cuales se suspendieron cinco colonias en agua destilada hasta alcanzar una turbidez equivalente al patrón 0,5 en la escala de Mac Farland. La suspensión se usó para inocular la totalidad de la superficie de una placa de Agar Mueller-Hinton (diámetro 90 mm); después de 15 min de la inoculación, se colocaron los discos sobre la superficie y se incubaron por 18-24 h a 37°C. Las pruebas de sensibilidad fueron realizadas para oxacilina, cefoxitina, vancomicina, gentamicina, eritromicina, clindamicina, trimetoprim/sulfametoxazol y rifampicina. La resistencia inducible a clindamicina se determinó con el método del doble disco eritromicina/clindamicina según método reportado previamente ⁶².

2.3. Pruebas moleculares

2.3.1. Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico se realizó siguiendo el protocolo descrito por *Millar et al.*⁶³ con algunas modificaciones. Específicamente, cada aislamiento puro de SA a investigar se subcultivó en agar nutritivo por 24h a 37°C. Alrededor de 5 colonias fueron resuspendidas en 1ml de Tris 0.5M, se centrifugaron a 13,000 rpm x 5min. El sobrenadante se descartó y el botón de células se resuspendió en 500 ul de buffer TE (10mM Tris; 1mM EDTA, pH:8.0) y se llevó a ebullición a 100°C durante 30min, e inmediatamente se incubó a -35°C durante 20 minutos, se descongeló a 65°C y finalmente se centrifugó a 13.000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano se recolectó en un nuevo tubo y se almacenó a -20°C para ensayos posteriores de PCR múltiple.

2.3.2. Amplificación por PCR múltiple de los genes *nuc*, *mecA*, y *PVL*

Se realizaron ensayos moleculares para determinar la presencia de los genes *nuc*, *mecA*, y *PVL* en cada uno de los aislamientos obtenidos. La amplificación de un fragmento específico del gen *nuc* se utilizó como prueba confirmatoria para la especie *S. aureus*, ya que este gen codifica una termonucleasa extracelular específica para esta especie.

ADN genómico de cada uno de los aislamientos estudiados fue sometido a ensayo de PCR múltiple siguiendo un protocolo previamente establecido en nuestro laboratorio utilizando tres juegos de oligonucleótidos:

- a. MecA1F – MecA2R ⁶⁴ que amplifica un fragmento de 147 pb del gen *mecA*
- b. Nuc1F – Nuc2R ⁶⁵ que amplifica un fragmento de ~300 pb del gen *nuc* que codifica la termonucleasa extracelular específica de *S. aureus*
- c. LukPV1F - LukPV2R ⁴⁷ que amplifica un fragmento de 437 pb del gen *PVL*.

El ADN se sometió a amplificación en un volumen de reacción de 25uL constituido por 12.5 uL de la mezcla de PCR (PCR master Mix; Promega®), 0.2 uM de cada primer y 5 uL de la solución de ADN genómico. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, y 72°C por 2 min, con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min.

Como controles de la reacción PCR múltiple se utilizaron las cepas de SA ATCC-33591 (*mecA*+; *nuc*+) y ATCC-25923 (*mecA*-; *nuc*+). Al final de la reacción PCR, los productos se visualizaron en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio 0.5 ug/ml, usando un transiluminador de luz UV.

2.3.3. Tipificación del casete cromosomal SCCmec en los aislamientos

A los aislamientos de SA resistentes a meticilina se les determinó el tipo SCCmec por medio de la amplificación de fragmentos específicos en la región que codifica para las recombinasas y el complejo *mecA* según protocolos publicados⁶⁶. A un subgrupo de los aislamientos portadores del elemento SCCmec tipo IV se le determinó el subtipo amplificando fragmentos específicos de la región J1, utilizando la metodología descrita⁶⁶.

2.4. Procesamiento de la información y análisis estadístico

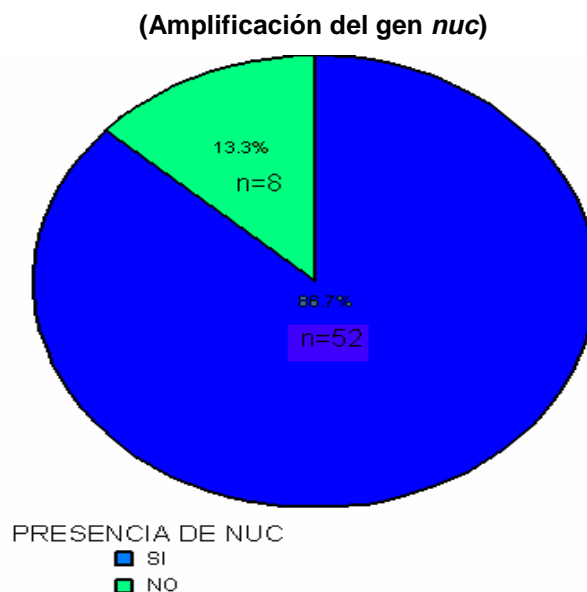
Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa SPSS 13.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL). Se calculó la frecuencia del gen *MecA* y la de los otros factores de virulencia analizados en el total de aislamientos clínicos de SA. Los aislamientos se dividieron en dos grupos: MSSA (*Mec* negativos) y SARM (*Mec* positivos) y se correlacionaron con los datos clínicos, microbiológicos, y moleculares. La información recopilada de las historias clínicas se utilizó para determinar la frecuencia de los diferentes tipos de infecciones estafilocócicas presentadas en el período de estudio, identificar los factores predisponentes de la infección, el tratamiento instaurado, y el desenlace. La diferencia entre los grupos se calculó mediante la prueba exacta de Fisher. Se usó un valor $P < 0.05$ para la significancia estadística.

3. RESULTADOS

Entre octubre y diciembre de 2009 se documentaron en el HINFP un total de 60 casos clínicos de infección por SA de adquisición comunitaria, los cuales requirieron manejo intrahospitalario entre 1 y 22 días. Las infecciones por SA fueron confirmadas inicialmente mediante cultivo por el laboratorio clínico de la institución hospitalaria, obteniéndose un aislamiento por paciente. Posteriormente, un repique puro de cada uno de los aislamientos fue enviado al laboratorio de microbiología del grupo de Genética y Biología Molecular para su reconfirmación mediante análisis microbiológicos y moleculares. El presente estudio contó con la aprobación de los comités de ética de la Universidad de Cartagena y del HINFP y con los consentimientos informados de los padres o guardianes de los pacientes.

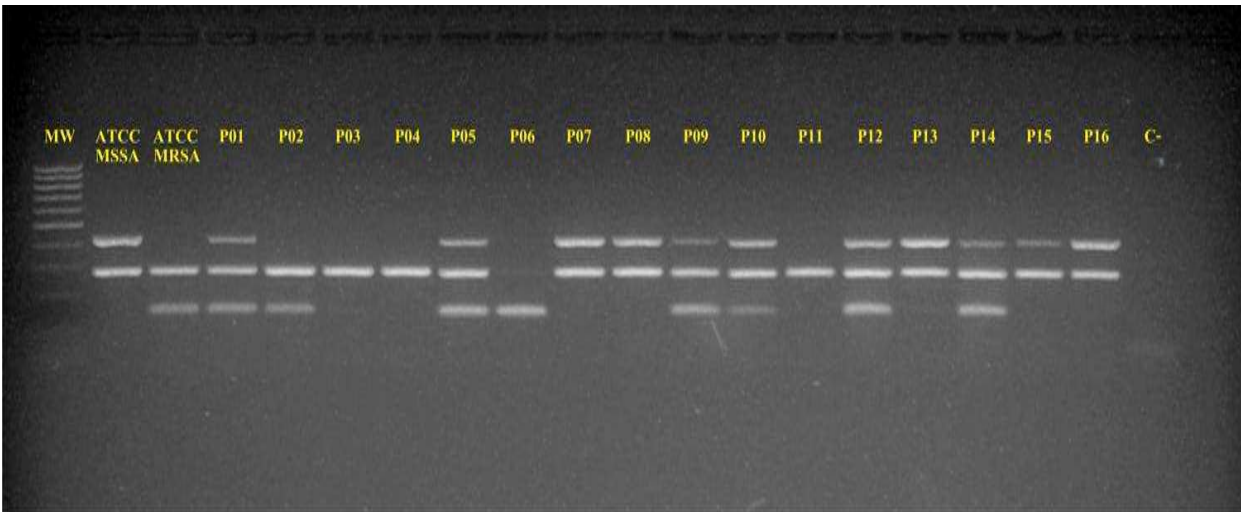
Para confirmar la especie *Staphylococcus aureus* (gen *nuc*), resistencia a meticilina (gen *mecA*) y la presencia de genes para PVL se utilizó un ensayo de PCR múltiple, lo que permitió determinar que un total de ocho aislamientos no correspondían a *S.aureus*, ya que en estos aislamientos no se amplificó el gen *nuc* específico para la especie *S. aureus* (Figura 1).

Figura 1. Confirmación Molecular de los Aislamientos



Los 52 aislamientos restantes fueron confirmados microbiológica y molecularmente como *S.aureus*, de los cuales 26 fueron *mecA* positivos (SARM, 50%) y 26 fueron *mecA* negativos (MSSA, 50%) (Figura 2).

Figura 2. PCR Múltiple para Detección de los Genes *nuc*, *mecA*, y PVL



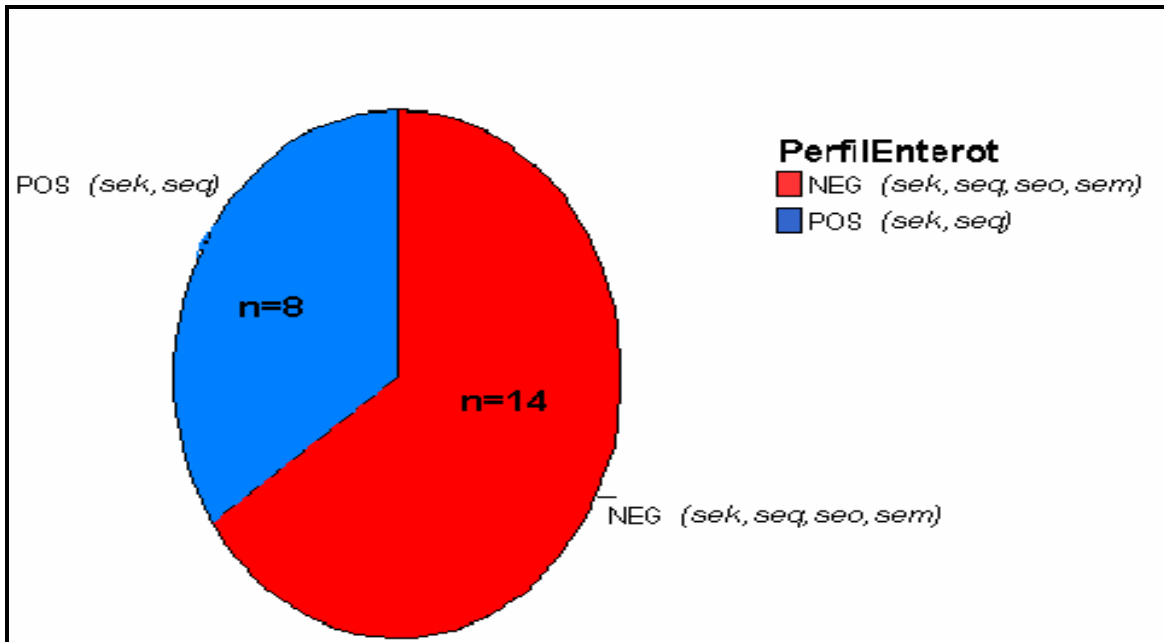
PCR múltiple fue realizada para detectar la presencia de los genes *nuc*, *mecA* y PVL en aislamientos de SA causantes de infecciones pediátricas atendidas en el HINFP de Cartagena durante el periodo Octubre a Diciembre de 2009. Carril 1: MW (Marcador de peso molecular). Carril 2: Cepa de referencia ATCC-25923 (*nuc+*, *mecA-*, PVL+). Carril 3: Cepa de referencia ATCC-33591 (*nuc+*, *mecA+*, PVL-). Carriles 4 a 19: Aislamientos de SA representativos del estudio. Carril 20: Control negativo para la reacción de PCR.

Las pruebas moleculares indicaron además que 45 de los aislamientos confirmados como *S. aureus* fueron PVL positivos (86.5%) mientras que los 7 restantes fueron PVL-negativos (13.5%). Un total de 24 aislamientos PVL positivos fueron además resistentes a meticilina (SARM PVL positivos) y los 21 aislamientos PVL positivos restantes fueron sensibles a meticilina (MSSA PVL positivos).

Un subgrupo de 21 aislamientos SARM fueron sometidos a análisis adicionales para determinar el perfil de genes de enterotoxinas (*sek*, *seq*, *seo*, *sem*) (Figura 3), el tipo de elemento SCC*mec* (Figura 4), y el perfil de electroforesis en campos pulsados (PFGE) (Figura 5).

La Figura 3 muestra el perfil de enterotoxinas (*sek*, *seq*, *seo*, *sem*) para 22 de los aislamientos SARM. Un total de ocho de estos aislamientos presentaron los genes para las enterotoxinas estafilocócicas *k* (*sek*) y *q* (*seq*).

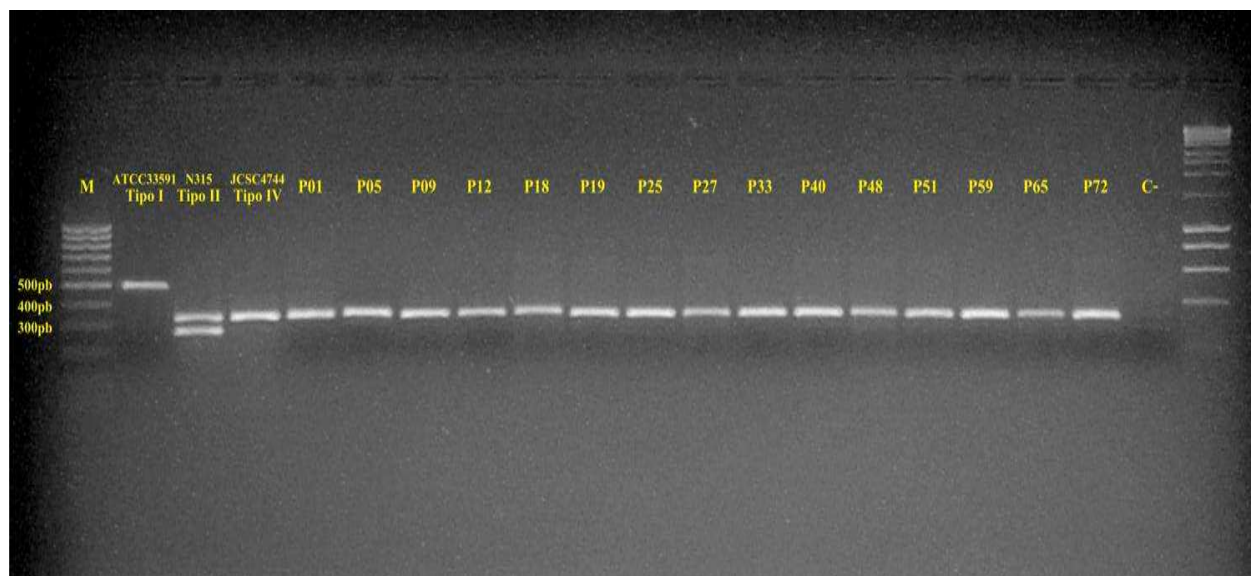
Figura 3. Perfil de Enterotoxinas de los Aislamientos SARM (n = 22)



Perfil de enterotoxinas (*sek*, *seq*, *seo*, *sem*) para 22 de los aislamientos SARM. La detección de la presencia de los genes *sek*, *seq*, *seo*, y *sem* se realizó mediante PCR múltiple. Un total de ocho de estos aislamientos presentaron los genes para las enterotoxinas estafilocócicas *k* (*sek*) y *q* (*seq*).

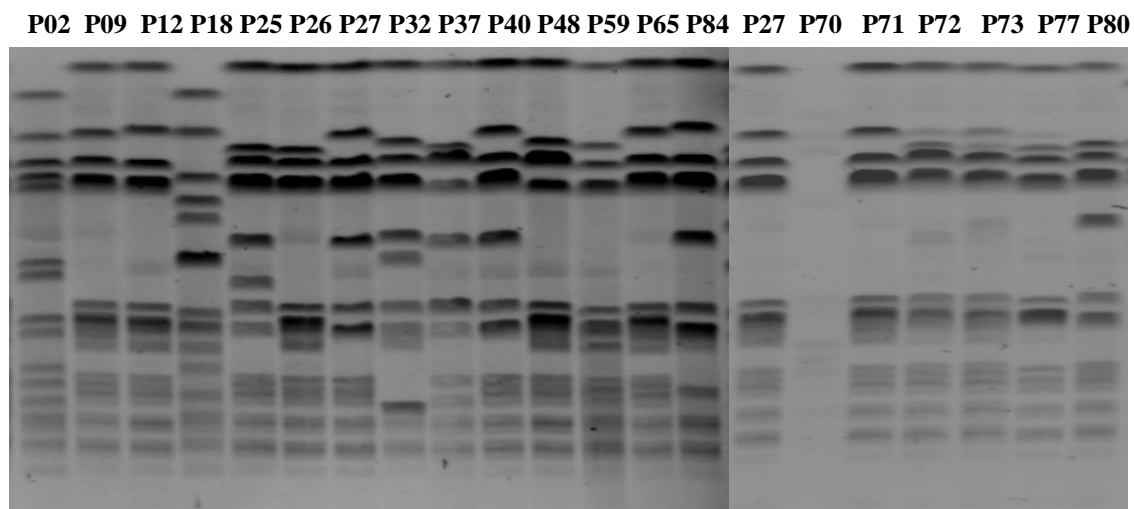
Los análisis moleculares mostraron que el tipo predominante de casete *SCCmec* en los aislamientos SARM fue el IV (Figura 4). Adicionalmente, el análisis de sus perfiles electroforéticos en campos pulsados muestra que estos aislamientos SARM presentan heterogeneidad clonal (Figura 5).

Figura 4. Tipificación SCCmec de Aislamientos SARM (n = 15)



ADN genómico de los aislamientos SARM fue sometido a PCR múltiple para determinar el tipo de casete SCCmec. Carril 1: M (Marcador de Peso Molecular. Carril 2: Cepa de referencia ATCC-33591 (SCCmec tipo I). Carril 3: Cepa de referencia N315 (SCCmec tipo II). Carril 4: Cepa de referencia JCSC4744 (SCCmec tipo IV). Carriles 5 a 19: Aislamientos SARM representativos del estudio causantes de infecciones pediátricas portadores del casete tipo IV. Carril 20: Control negativo para el ensayo PCR.

Figura 5. Patrones PFGE de aislamientos SARM (n = 21)



Patrones PFGE de 21 aislamientos de *S. aureus* representativos del estudio. ADN genómico de los aislamientos fue digerido con la enzima *Sma*I para generar los patrones de bandas electroforéticas en el campo pulsado. Se observó heterogeneidad clonal entre los aislamientos.

La Tabla 1 muestra las características moleculares de los aislamientos de SA meticilino resistentes (SARM). Se encontró que 24 de los aislamientos SARM fueron PVL positivos. La tipificación molecular del elemento *SCCmec* demostró que el tipo predominante fue el tipo IV ya que este estuvo presente en el total de 21 aislamientos tipificados, de los cuales 15 fueron subtipo IVc y 2 fueron subtipo IVa.

Tabla 1. Características Moleculares de los Aislamientos SARM

No. Aislamientos SARM caracterizados	Variable analizada	No. Aislamientos SARM positivos (%)
26	PVL	24 (92.3%)
21	Tipo <i>SCCmec</i>	
	Tipo IV	21 (100%)
	Subtipo IVc	15 (71.4%)
	Subtipo IVa	2 (9.5%)
	No tipificados	4 (19%)
22	Enterotoxinas (<i>sek, seq, seo, sem</i>)	
	<i>sek, seq</i>	8 (36%)

Las características demográficas de los casos de infección por SARM y MSSA se resumen en la Tabla 2. De los 52 casos confirmados de infección por *S.aureus*, 23 fueron del sexo femenino (44%) y 29 fueron del sexo masculino (56%). El rango de edad estuvo entre 8 días y 16 años (Figura 6). El 65% de los pacientes fueron de procedencia urbana y 35% de procedencia rural. El 13.9% de estos paciente requirió manejo en UCI y un manejo intrahospitalario entre 1 y 22 días. El 66.7% de las infecciones fueron a nivel de piel y tejidos blandos y 33.3% fueron de tipo invasivo. En nueve pacientes se identificaron factores de riesgo asociados al cuidado de la salud. El análisis estadístico no encontró asociación significativa entre las diferentes variables analizadas y la infección por cepas resistentes o sensibles a meticilina ni por cepas portadoras de genes para PVL.

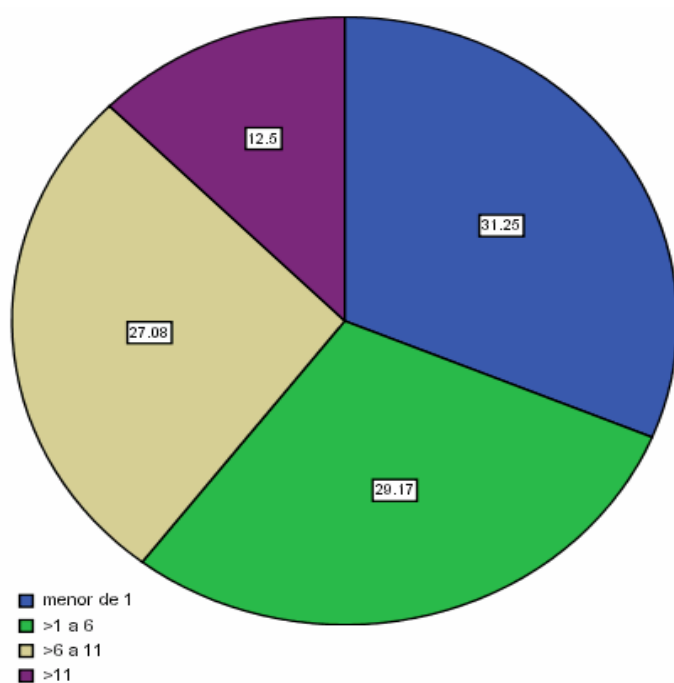
Tabla 2. Comparación de los casos de infección por SARM versus MSSA

Número de casos (n)	Variables analizadas	SARM	MSSA	p value *
n = 52	Sexo (Masculino/Femenino)	15/11	14/12	NS
n = 43	Promedio de Edad ⁶⁷	4.5 años (8 días-16 años)	5,5 años (30 días- 15 años)	NS
n = 43	Procedencia (Urbana/Rural)	15/7	13/8	NS
n = 36	Requerimiento de UCI durante manejo hospitalario (Si/No)	3/16	2/15	NS
n= 42	Promedio Dias Estancia Hosp ⁶⁷	9 (2 – 21)	9 (1 – 22)	NS
n = 42	Tipo de infección (Piel y Tejidos Blandos/ Invasiva)	13/10	15/4	NS
n = 46	Factor de Riesgo para la Infección (Si/No)	3/21	6/16	NS

* Se usó la prueba exacta de Fisher en los análisis estadísticos. NS = No significativo

La Figura 6 muestra la distribución de los rangos de edad de los casos. No hubo diferencias significativas entre los diferentes rangos de edades en los cuales se presentaron las infecciones.

Figura 6. Distribución del Rango de Edades de los Casos



Edad (Categoría)	Frecuencia	Porcentaje (%)
menor de 1 año	15	31.3
>1 a 6 años	14	29.2
>6 a 11 años	13	27.1
>11 años	6	12.5
Total	48	100

Las características clínicas de los aislamientos de *S. aureus* se resumen en la Tabla 3. Aunque las principales manifestaciones clínicas fueron a nivel de piel y tejidos blandos (63.8%), un porcentaje importante de las infecciones fueron de tipo invasivo (36.2%). Las infecciones invasivas estuvieron asociadas con mas frecuencia a los aislamientos SARM. El trauma estuvo asociado significativamente a la infección por *S. aureus* meticilino resistentes.

Tabla 3. Características Clínicas de los aislamientos de *S. aureus*

No. Aislamientos caracterizados	Características	No. Aislamientos SARM	No. Aislamientos MSSA	P value*
47	Tipo de Infección			NS
30	Piel y tejidos blandos	14 (46.7%)	16 (53.3%)	
17	Invasiva	12 (70.6%)	5 (29.4%)	
27	Antecedente de la infeccion			0.041
23	Trauma	14 (61%)	9 (39%)	
4	Otro	0	4 (100%)	

* Se usó la prueba exacta de Fisher en los análisis estadísticos. NS = No significativo.

La Tabla 4 muestra los perfiles de resistencia de los aislamientos de *S. aureus* a los antibióticos ensayados. La mayoría de los aislamientos fueron susceptibles a los antibióticos ensayados. No hubo resistencia a rifampicina ni vancomicina. De los aislamientos SARM, tres fueron resistentes a gentamicina, dos a eritromicina, uno a clindamicina y uno a trimetoprim sulfa. De los aislamientos meticilino sensibles, tres fueron resistentes a eritromicina.

Tabla 4. Perfiles de Resistencia a Antibióticos de los Aislamientos de *S. aureus*

Antibiótico Ensayado	Número de Aislamientos Resistentes	
	SARM (n = 26)	MSSA (n = 26)
Oxacilina (1 µg)	26	0
Cefoxitina (30 µg)	26	0
Gentamicina (10 µg)	3	0
Eritromicina (15 µg)	2	3
Clindamicina (2 µg)	1	0
TMS* (1,25/23,75 µg)	1	0
Rifampicina (5 µg)	0	0
Vancomicina (30 µg)	0	0

* Trimetoprim/sulfametoxazol

La Tabla 5 muestra el manejo clínico instaurado a los pacientes de infecciones por SA. La mayoría de las infecciones causadas por SARM fueron inicialmente manejadas con oxacilina (14 casos; 63.6%) y el cambio de tratamiento a un antibiótico efectivo contra SARM se hizo solo en 28.5% de estos (4 casos).

Tabla 5. Manejo Clínico de las Infecciones por *S. aureus*

	MANEJO ANTIBIOTICO INICIAL				
	OXA	CLIN	VAN	OTRO	TOTAL
No. Aislamientos SARM / %	14 / 63.6%	3 / 13.6%	3 / 13.6%	2 / 9.1%	22
Cambio de Tratamiento SI	4	0	2	0	6
NO	10	3	1	2	16
No. Aislamientos MSSA	12	2	1	3	18
Cambio de Tratamiento SI	4	0	0	2	6
NO	8	2	1	1	12

Del total de 26 casos manejados inicialmente con oxacilina, 14 fueron ocasionados por SARM. En 24 de estos casos manejados inicialmente con oxacilina se practicó tratamiento quirúrgico, principalmente incisión y drenaje de la lesión, lo que pudiera

explicar el desenlace favorable de las infecciones en 10 de los casos producidos por SARM en los que no se instauró terapia definitiva adecuada contra SARM⁶⁸ (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencia de Drenaje de Abscesos de Casos Clínicos

		MANEJO ANTIBIOTICO INICIAL					
		OXA	CLIN	VAN	OTRO	Total	Pvalue*
TTO QUIRURGICO	DRENAJE	24	4	0	1	29	0.002
	OTRO	2	1	4	0	6	
Total		26	5	4	1	35	

* Se usó la prueba exacta de Fisher en los análisis estadísticos.

La Figura 7 muestra fotografías representativas de algunos de los casos clínicos documentados en el presente estudio. Las áreas anatómicas más afectadas fueron las extremidades (manos y piernas).

Figura 7. Fotografías de casos clínicos de infección por SA



A. Absceso en mano.



B. Absceso en dedo meñique.



C. Forúnculos en rodilla.



D. Absceso en pierna



E. Niña en UCI.



F. Niño en UCI

4. DISCUSION

Las infecciones causadas por *S. aureus* son una causa significativa de morbilidad y mortalidad en pacientes pediátricos^{30, 69}. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que un alto porcentaje de infecciones por *S. aureus* de adquisición comunitaria en la ciudad de Cartagena de Indias y poblaciones aledañas son causadas por cepas SARM-AC, ya que de 52 aislamientos obtenidos en el período de estudio, un total de 26 (50%) fueron meticilino resistentes (SARM) y 26 (50%) fueron meticilino sensibles (MSSA). Los datos moleculares sobre la presencia de genes para PVL y el tipo y subtipo del casete *SCCmec* fueron consistentes con el origen comunitario de estos aislamientos.

En los últimos años se han observado cambios en la práctica de prescripción en las áreas donde la infección por SARM-AC se ha tornado endémica, con una disminución en el uso de antibióticos beta-lactámicos como terapia empírica para las infecciones de piel y tejidos blandos y un aumento en el uso de antibióticos de segunda línea^{70, 71}. Consistente con esto, los aislamientos SARM-AC obtenidos durante el estudio tuvieron una baja tasa de resistencia a varios de los antibióticos orales comúnmente usados para tratar infecciones moderadas adquiridas en la comunidad por *S. aureus*. Por esta razón, resulta pertinente recomendar que ante una infección sospechosa de ser causada por *S. aureus* se inicie como terapia empírica antibióticos que sean efectivos contra SARM-AC.

La presentación clínica de las infecciones pediátricas por SA atendidas en esta institución en el periodo de estudio es comparable al espectro descrito en otras áreas geográficas, con preponderancia de manifestaciones a nivel de piel y tejidos blandos⁵³²² y con menor frecuencia infecciones invasivas. Entre los pacientes con infecciones invasivas, los aislamientos de *S. aureus* fueron mas frecuentemente resistentes a meticilina [SARM 12/17 (70.6%) vs MSSA 5/17 (29.4%)]. Por su parte, las infecciones de piel y tejidos blandos fueron producidas a frecuencias comparables tanto por aislamientos sensibles como resistentes a meticilina [SARM 14/30 (46.7% vs MSSA

16/30 (53.3%)]. La mayor frecuencia de infecciones se encontró en niños menores de 6 años.

Similar a lo que ocurre con las cepas SARM-AC circulantes en otras áreas geográficas del mundo, especialmente en Europa y Estados Unidos ⁷², una gran mayoría de las cepas de SA aisladas en nuestro estudio fueron PVL-positivas. Específicamente, del total de 52 aislamientos obtenidos, 45 fueron PVL-positivos y 7 fueron PVL-negativos. De los 45 PVL-positivos, 24 fueron SARM y 21 fueron MSSA. Por lo tanto, nuestro estudio no encontró asociación entre la presencia de genes para PVL y el gen *MecA* de resistencia a meticilina, ya que los genes para PVL se encontraron a frecuencias similares tanto en cepas SARM como MSSA.

Este estudio revela la diseminación de cepas SARM-AC en nuestra área geográfica, lo cual constituye una amenaza seria para la salud pública que requiere investigación urgente. Por tal motivo, se hace necesario que se definan con mayor detalle las características clínicas, microbiológicas y moleculares de las infecciones causadas por *S. aureus* en nuestra comunidad, tanto resistente como sensible a meticilina. Para esto resulta adecuado ampliar este estudio a otras instituciones y por un tiempo más prolongado y en forma prospectiva.

Un importante hallazgo de este estudio es que MSSA sigue siendo un patógeno común causante de infecciones adquiridas en la comunidad en la población pediátrica de nuestra área. Similar a lo encontrado en este estudio, otros han reportado características similares para los pacientes con infecciones por SARM-AC, incluyendo la susceptibilidad de los organismos a clindamicina y TMS, la ausencia de factores de riesgo predisponentes en la mayoría de las infecciones y una gran predominancia de infecciones de piel y tejidos blandos.

Actualmente se desconoce si SARM-AC ha emergido *de novo* o si por el contrario se ha ido extendiendo a través de la comunidad después de su transmisión inicial desde un centro de salud, guardería infantil, o instituciones al cuidado de individuos a largo

termino (asilos, orfanatos, etc.)³⁰. Lo que es cierto es que las oportunidades de diseminación hacia y a través de la comunidad están en aumento debido a que mas pacientes están siendo dados de alta médica de los hospitales después de ser tratados por una infección con SARM. De igual forma, hay un mayor potencial para un contacto mas estrecho debido a las condiciones de hacinamiento de los individuos, principalmente niños procedentes de familias numerosas y que asisten a guarderías y jardines infantiles con un número elevado de individuos.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Hasta hace pocos años las infecciones por SA meticilino resistentes generalmente se adquirían dentro de los hospitales; sin embargo, a finales de los años 90, emergieron cepas SARM causantes de infecciones en adultos y niños sanos en las comunidades, cuya prevalencia ha ido aumentando en forma significativa en los últimos años. Las infecciones causadas por estas cepas no están asociadas a los tradicionales factores de riesgo de las cepas SARM hospitalarias, son susceptibles a pocos antibióticos y presentan factores de virulencia específicos. Las cepas de *S. aureus* que causan estas infecciones se han denominado cepas SARM adquiridas en la comunidad.

El presente estudio realizado en el Hospital Infantil Napoleón Franco Pareja de Cartagena nos permitió determinar que la frecuencia de infecciones adquiridas en la comunidad y causadas por SARM en población pediátrica previamente sana es elevada. Similar a lo encontrado en este estudio, en otras áreas geográficas del mundo se ha reportado que las infecciones por SARM-AC están afectando cada día con mayor frecuencia a individuos sanos y sin factores de riesgo aparentes, personas de la comunidad sin contacto reciente con instituciones de salud. Por esta razón las investigaciones se han dirigido a establecer las características epidemiológicas, genéticas y moleculares de los aislamientos que circulan fuera del ambiente hospitalario para así tener una aproximación a la dinámica evolutiva que tienen, pues su nicho ecológico y presiones medioambientales son totalmente diferentes a las experimentadas por sus contrapartes hospitalarios.

Expertos en el control y manejo de infecciones insisten en que para prevenir la emergencia y diseminación de las cepas SARM resulta prioritario que se establezcan estrategias más efectivas que abarquen tanto el ámbito hospitalario como el comunitario. En los hospitales, el control de infecciones debe jugar un papel importante, mientras que en la comunidad las estrategias pueden enfatizar la detección oportuna, el tratamiento adecuado de las infecciones y la optimización de las medidas básicas de higiene. Una estrategia adicional que no se ha establecido es eliminar la colonización de

SA en portadores sanos, ya que podrían aplicarse estudios epidemiológicos a poblaciones y condiciones específicas para prevenir focos de infección.

Independientemente del origen de estas cepas SARM-AC, su diseminación en la comunidad es una enorme amenaza con implicaciones clínicas importantes. Por ejemplo, con frecuencia el tratamiento antibiótico resulta fallido dando como resultado complicaciones que pueden terminar con la muerte del paciente.

Está demostrado que las infecciones causadas por cepas resistentes a la meticilina son más difíciles de manejar y ocasionan un costo mayor. Por lo tanto, el disminuir la utilización de los antibióticos que favorecen la selección de cepas resistentes es un paso esencial para controlar su surgimiento y diseminación en los hospitales y en la comunidad.

Ya que la infección por SARM-AC se ha convertido en un problema emergente en muchas partes del mundo, cuya dimensión real aún no se conoce, es esencial que el personal médico y científico esté alerta a su cambio epidemiológico, sus manifestaciones clínicas y características moleculares para tratar de lograr su control y evitar que se convierta en un problema de salud pública global en un futuro cercano.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alvarez CA, Yomayusa N, Leal AL, Moreno J, Mendez-Alvarez S, Ibanez M, *et al.* Nosocomial infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombia. *Am J Infect Control.* 2010. 38(4): 315-8.
2. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998. 339(8): 520-32.
3. Yao D, Yu FY, Qin ZQ, Chen C, He SS, Chen ZQ, *et al.* Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections (SSTIs). *BMC Infect Dis.* 2010. 10: 133.
4. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2001. 9(10): 486-93.
5. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000. 44(6): 1549-55.
6. Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisner W, Maslow JN, McGeer A, *et al.* Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science.* 1993. 259(5092): 227-30.
7. Lim D, Strynadka NC. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol.* 2002. 9(11): 870-6.
8. Fitzgerald JR, Sturdevant DE, Mackie SM, Gill SR, Musser JM. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001. 98(15): 8821-6.
9. Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. The origin and molecular evolution of the determinant of methicillin-resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010.
10. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, *et al.* Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001. 45(5): 1323-36.
11. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2007. 13(3): 222-35.
12. Carvalho KS, Mamizuka EM, Gontijo Filho PP. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2010. 14(1): 71-6.
13. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Mol Med.* 2009. 9(2): 100-15.
14. Deleo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2010. 375(9725): 1557-68.
15. 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.
16. Schlievert PM, Strandberg KL, Lin YC, Peterson ML, Leung DY. Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2010. 125(1): 39-49.
17. Udo EE, Pearman JW, Grubb WB. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect.* 1993. 25(2): 97-108.
18. CDC. From the Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *Jama.* 1999. 282(12): 1123-5.

19. Rodriguez-Bano J, Angeles Dominguez M, Blas Millan A, Borraz C, Pau Gonzalez M, Almirante B, *et al.* Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2009. 15(12): 1111-8.
20. Hisata K K-AK, Yamanoto M, Ito T, Nakatomi Y, CuiL ea. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. . *J Clin Microbiol* 2005. 43: 3364–72.
21. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, *et al.* Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2001. 32 Suppl 2: S114-32.
22. Magilner D, Byerly MM, Cline DM. The prevalence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) in skin abscesses presenting to the pediatric emergency department. *N C Med J.* 2008. 69(5): 351-4.
23. Tenover FCG, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* 2009. 64(3): 441-6.
24. Coombs GW, Nimmo GR, Bell JM, Huygens F, O'Brien FG, Malkowski MJ, *et al.* Genetic diversity among community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing outpatient infections in Australia. *J Clin Microbiol.* 2004. 42(10): 4735-43.
25. Huang YH, Tseng SP, Hu JM, Tsai JC, Hsueh PRT, Teng LJ. Clonal spread of SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between community and hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2007. 13(7): 717-24.
26. Reyes J, Rincon S, Diaz L, Panesso D, Contreras GA, Zurita J, *et al.* Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. *Clin Infect Dis.* 2009. 49(12): 1861-7.
27. Rezende NA, Blumberg HM, Metzger BS, Larsen NM, Ray SMM, McGowan JE, Jr. Risk factors for methicillin-resistance among patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia at the time of hospital admission. *Am J Med Sci.* 2002. 323(3): 117-23.
28. Jernigan JA, Pullen AL, Partin CJ, Jarvis WR. Prevalence of and risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an outpatient clinic population. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003. 24(6): 445-50.
29. Campbell KM, Vaughn AF, Russell KL, Smith B, Jimenez DL, Barrozo CP, *et al.* Risk factors for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in an outbreak of disease among military trainees in San Diego, California, in 2002. *J Clin Microbiol.* 2004. 42(9): 4050-3.
30. Fergie J, Purcell K, Pharmd R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in South Texas children. *Pediatr Infect Dis J.* 2001. 20: 860–3.
31. Lo WT, Lin WJ, Tseng MH, Wang SR, Chu ML, Wang CC. Risk factors and molecular analysis of panton-valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in healthy children. *Pediatr Infect Dis J.* 2008. 27(8): 713-8.
32. Harbarth S. Control of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-recent advances and future challenges. *Clin Microbiol Infect.* 2006. 12(12): 1154-62.
33. Struelens MJ, Hawkey PM, French GL, Witte WT, Tacconelli E. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. *Clin Microbiol Infect.* 2009. 15(2): 112-9.
34. Nygaard TK, DeLeo FR, Voyich JM. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: advances toward identifying the key virulence factors. *Curr Opin Infect Dis.* 2008. 21(2): 147-52.

35. Sax H, Posfay-Barbe K, Harbarth S, Francois P, Touveneau S, Pessoa-Silva CL, *et al.* Control of a cluster of community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatology. *J Hosp Infect.* 2006. 63(1): 93-100.
36. Chavarro Bea. Determinación de la presencia y transcripción de factores de virulencia en aislamientos colombianos de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad. *Facultad de Medicina.* . 2009.
37. Alvarez-Olmos MI, Enriquez SP, Perez-Roth E, Mendez-Alvarez S, Escobar J, Vanegas N, *et al.* Pediatric cases from Colombia caused by a Pantone-Valentine Leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST8-SCCmecIVc clone. *Pediatr Infect Dis J.* 2009. 28(10): 935.
38. Buitrago G CJ, Castillo JS, Leal AL, Sanchez R, Alvarez CA. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Community-acquired phenotype spread in hospitals in Bogota, Colombia. *Clin Microbiol Infect.* 2008. 14(S7): S411.
39. Arias CA, Rincon S, Chowdhury S, Martinez E, Coronell W, Reyes J, *et al.* MRSA USA300 clone and VREF--a U.S.-Colombian connection? *N Engl J Med.* 2008. 359(20): 2177-9.
40. Cortes JA, Gomez CA, Cuervo S, Leal AL. [Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Bogota, Colombia: Public Health implications]. *Rev Salud Publica (Bogota).* 2007. 9(3): 448-54.
41. Alvarez CA, Barrientes OJ, Leal AL, Contreras GA, Barrero L, Rincon S, *et al.* Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2006. 12(12): 2000-1.
42. Elston DM. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Am Acad Dermatol.* 2007. 56(1): 1-16; quiz 17-20.
43. Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Engl J Med.* 2005. 352(14): 1436-44.
44. Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chem Immunol Allergy.* 2007. 93: 24-41.
45. Durand G, Bes M, Meugnier H, Enright MC, Forey F, Liassine N, *et al.* Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. *J Clin Microbiol.* 2006. 44(3): 847-53.
46. Diep BA, Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol.* 2008. 16(8): 361-9.
47. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, *et al.* Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1999. 29(5): 1128-32.
48. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, *et al.* Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet.* 2002. 359(9308): 753-9.
49. Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Pantone-Valentine leukocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol.* 2005. 43(5): 2384-90.
50. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, *et al.* Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med.* 2006. 355(7): 666-74.

51. Kaneko J, Kimura T, Kawakami Y, Tomita TKamio Y. Panton-valentine leukocidin genes in a phage-like particle isolated from mitomycin C-treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC 49775). *Biosci Biotechnol Biochem*. 1997. 61(11): 1960-2.
52. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest*. 2007. 87(1): 3-9.
53. Geng W, Yang Y, Wang C, Deng L, Zheng Y, Shen X. Skin and soft tissue infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among children in China. *Acta Paediatr*. 2010. 99(4): 575-80.
54. Creel AM, Durham SH, Benner KW, Alten JAWinkler MK. Severe invasive community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in previously healthy children. *Pediatr Crit Care Med*. 2009. 10(3): 323-7.
55. Kaplan SL, Hulten KG, Gonzalez BE, Hammerman WA, Lamberth L, Versalovic J, et al. Three-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. *Clin Infect Dis*. 2005. 40(12): 1785-91.
56. 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.
57. Paintsil E. Pediatric community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection and colonization: trends and management. *Curr Opin Pediatr*. 2007. 19(1): 75-82.
58. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol*. 2002. 40(11): 4289-94.
59. Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis*. 2002. 35(7): 819-24.
60. Bettin A, Suarez P, Bedoya A, Reyes N. [*Staphylococcus aureus* in residents from a nursing-home in Cartagena]. *Rev Salud Publica (Bogota)*. 2008. 10(4): 650-7.
61. CLSI, CLSI, *Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth informational supplement, M100-S20, Vol 30, 2010*. 2010. M100-S20, Vol 30, 2010.
62. Fiebelkorn KR, CS, McElmeel ML, Jorgensen JH. . Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. . *J Clin Microbiol* 2003. 41: 4740-4.
63. Millar BC, Jiru X, Moore J, Earle JA. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J Microbiol Methods*. 2000. 42(2): 139-47.
64. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002. 46(7): 2155-61.
65. Brakstad OG, Aasbakk KM, Aeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J Clin Microbiol*. 1992. 30(7): 1654-60.
66. Milheirico C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007. 51(9): 3374-7.
67. Daeschlein G, Assadian O, Rangoos I, Kramer A. Risk factors for *Staphylococcus aureus* nasal carriage in residents of three nursing homes in Germany. *J Hosp Infect*. 2006. 63(2): 216-20.
68. Rogers RL, Perkins J. Skin and soft tissue infections. *Prim Care*. 2006. 33(3): 697-710.
69. Mongkolrattanothai K, Aldag J, Mankin P, Gray B. Epidemiology of community-onset *Staphylococcus aureus* infections in pediatric patients: an experience at a Children's Hospital in central Illinois. *BMC Infectious Diseases*. 2009. 9: 112-119.

70. Gupta K, Macintyre A, Vanasse GDembry LM. Trends in prescribing beta-lactam antibiotics for treatment of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *J Clin Microbiol.* 2007. 45(12): 3930-4.
71. Hersh AL, Chambers HF, Maselli JHGonzales R. National trends in ambulatory visits and antibiotic prescribing for skin and soft-tissue infections. *Arch Intern Med.* 2008. 168(14): 1585-91.
72. Martinez-Aguilar G, Avalos-Mishaan A, Hulten K, Hammerman W, Mason EO, Jr.Kaplan SL. Community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2004. 23(8): 701-6.

7. ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN INVESTIGACION

Yo, _____, persona responsable por el paciente _____, autorizo la utilización con fines de investigación de las muestras clínicas y sus derivados que fueron obtenidas durante los procedimientos rutinarios que conllevaron al cuerpo médico de esta institución a identificar al agente infeccioso que causó la infección del paciente referenciado. También autorizo que estas muestras y sus derivados sean enviadas a otros laboratorios, tanto nacionales como internacionales para la realización de análisis relacionados.

Además, también estoy de acuerdo en que se revise la Historia Clínica y se analice la información contenida en ella, guardando la debida CONFIDENCIALIDAD de los nombres y apellidos del paciente. Se nos ha explicado que este estudio tiene como objetivo determinar la frecuencia y las características microbiológicas y moleculares de la bacteria *Staphylococcus aureus* causante de infecciones que se adquieren en la comunidad y que son atendidas en instituciones al cuidado de la salud en la ciudad de Cartagena de Indias.

Los investigadores me han explicado que no se otorgará ningún beneficio personal por la participación en este estudio. Que la participación puede ser de beneficio para la comunidad en general expuesta a infectarse con esta bacteria, ya que los resultados pueden contribuir al diseño de programas dirigidos a disminuir la frecuencia de estas infecciones y a otorgar un mejor tratamiento, con lo cual se puede contribuir a disminuir la carga de enfermedad asociada con las infecciones causadas por esta bacteria en nuestra población.

Me han explicado que esta bacteria puede causar infecciones que pueden llegar a ser muy graves y que aún no se conocen con claridad todos los factores implicados en el desarrollo de estas infecciones.

Además, autorizo a los investigadores responsables a publicar la información obtenida como resultado de la participación en este estudio, en revistas u otros medios legales, guardando siempre la debida CONFIDENCIALIDAD de los nombres y apellidos del paciente.

Entiendo que todos los documentos que revelen mi identidad serán confidenciales, salvo que sean proporcionados tal como se menciona líneas arriba ó requeridos por Ley.

AUTORIZO : SI _____ NO _____

Firma del Paciente
Edad del paciente: _____

Firma de la Persona Responsable
C.C.
Parentesco:

Fecha: __ / __ / __

=====

Investigadores: Niradiz Reyes Ramos Firma : _____

Hernando Pinzón Redondo Firma: _____

Este estudio ha sido aprobado por : Comité de Ética de la Universidad de Cartagena.

Para cualquier queja acerca de los derechos de usted como participante de este estudio, contactar al Comité de Ética de la Universidad de Cartagena, teléfono 6642663 con el Dr. Álvaro Olivera Díaz en ésta ciudad.