



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Infecciones nosocomiales por bacterias multirresistentes

Ana Isabel Higuera Fernández

Septiembre, 2014



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Infecciones nosocomiales por bacterias multirresistentes

Ana Isabel Higuera Fernández

Septiembre, 2014

ÍNDICE

Resumen	5
Abstract	6
1. ANTECEDENTES	7
1.1. Infecciones asociadas a ambientes hospitalarios.....	7
1.2. Bacterias multirresistentes	9
<i>1.2.1. Tipos de resistencia</i>	<i>9</i>
<i>1.2.2. Mecanismos de resistencia</i>	<i>10</i>
<i>1.2.3. Prevención de la resistencia bacteriana.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.4. Especies resistentes más frecuentes</i>	<i>11</i>
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM)	15
2. HIPÓTESIS Y PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	19
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
4.1. Reaislamiento de las muestras.....	20
<i>4.1.1. Agar manitol salado</i>	<i>21</i>
<i>4.1.2. Agar Vogel Johson (V-J).....</i>	<i>22</i>
4.2. Caracterización de las cepas.....	23
<i>4.2.1. Coagulasa</i>	<i>23</i>
<i>4.2.1. DNasa</i>	<i>25</i>

4.3. Determinantes genéticos	26
5. PLAN DE TRABAJO A DESARROLLAR.....	27
6. MEDIOS DISPONIBLES Y REQUERIDOS PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO	27
7. PRESUPUESTO SOLICITADO	28
7.1. Gastos de ejecución.....	28
7.2. Desglose del presupuesto solicitado	28
8. PLAN DE DIFUSIÓN DE RESULTADOS Y REPERCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	29
9. BIBLIOGRAFÍA.....	30

RESUMEN

Se estima que las infecciones nosocomiales prolongan la estancia hospitalaria entre 1 y 30 días y se puede cuantificar la mortalidad atribuible entre un 7% y un 35%. Estas infecciones constituyen un motivo de preocupación para las instituciones sanitarias a escala mundial, especialmente aquellas causadas por microorganismos multirresistentes con escasa respuesta a los tratamientos antimicrobianos empleados habitualmente.

La capacidad de *Staphylococcus aureus* para adaptarse a presiones selectivas ha facilitado el desarrollo de resistencia a antimicrobianos y la propagación de cepas resistentes a meticilina en los ambientes hospitalarios. El presente proyecto pretende evaluar la incidencia de infecciones nosocomiales asociadas a *Staphylococcus aureus* en el centro hospitalario colaborador e identificar los determinantes genéticos responsables de la resistencia o multirresistencia de las cepas aisladas. En base a los datos obtenidos se recomendarán al centro hospitalario pautas de modificación de los tratamientos antimicrobianos aplicados, de acuerdo con los perfiles de resistencia detectados.

ABSTRACT

Hospital-acquired infections often result in longer stays at hospital and they are responsible for about 7% to 35% associated mortality. These infections have traditionally been an important health-related problem and cause of concern all over the world, especially those associated to multi-resistant microorganisms, as they account for low rates of success in antimicrobial therapy.

The ability of *Staphylococcus aureus* to adapt to selective pressures has also facilitated the development of antimicrobial resistance and particularly the spread of methicillin-resistant strains (MRSA) among hospitals. This study has been designed to estimate the prevalence of MRSA among human pathogens causing hospital-acquired infections at the collaborating health center and to identify the genetic determinants responsible for the resistance or multi-resistance profiles of the studied strains.

According to data obtained from this study, we will provide appropriate guidelines about antibiotic therapy to be used against these resistant pathogens.

1. ANTECEDENTES

1.1. Infecciones asociadas a ambientes hospitalarios

Las infecciones nosocomiales (IN) o también llamadas intrahospitalarias, son aquellas que ocurren durante el ingreso y estancia hospitalaria, y también las que se relacionen con cuidados sanitarios. Se estima que las infecciones nosocomiales prolongan la estancia hospitalaria entre 1 y 30 días, según el tipo de infección, y se puede cuantificar la mortalidad atribuible entre un 7 % y un 35 %. Estas infecciones históricamente han acompañado al ambiente hospitalario con mayor o menor incidencia, y constituyen un importante problema de salud y un motivo de preocupación para las instituciones y organizaciones de la salud a escala mundial, por las implicaciones económicas, sociales y humanas que éstas tienen (Pérez et al., 2010). Los informes que se publican en todo el mundo muestran que entre el 5 y 10% de los enfermos que se hospitalizan, sufren por lo menos un episodio de infección durante su estancia hospitalaria (Navarrete-Navarro et al., 1999).

Las infecciones nosocomiales corresponden a un subconjunto de las infecciones asociadas a un tratamiento (IAT) y son favorecidas por la presencia de dispositivos invasivos o por procedimientos invasivos. Las bacterias representan el 75% de los microorganismos aislados, con el serio inconveniente que plantean de la multirresistencia a los antibióticos (Astagneau et al., 2014).

Estas infecciones son uno de los problemas más importantes que ocurren en las unidades de cuidados intensivos, por lo que es necesario conocer la epidemiología y el impacto que estas infecciones tienen en el paciente crítico (Olaechea et al., 2010). La prevención de éstas se basa en el cumplimiento de las normas de higiene, la aplicación de protocolos de antibioticoterapia y la instrumentación de programas de vigilancia dentro del hospital, ya que la principal expectativa de un enfermo al recibir cuidados médicos es la solución de sus problemas de salud (Astagneau et al., 2014); (Navarrete et al., 1999).

Desde 1990 se han realizado estudios de ámbito nacional. El proyecto EPINE (Estudio de Prevalencia de la Infección Nosocomial en España) que cuenta ya con 17 años de seguimiento y una media de más de 50.000 enfermos/año procedentes de la mayoría de hospitales españoles, constituye el estudio de prevalencia más amplio del mundo. Las cifras que suministra este estudio oscila en los últimos 5 años entre el 6 y 7% de infectados, similar a otros estudios multicéntricos.

Actualmente se sabe que la infección intrahospitalaria más frecuente es la infección urinaria hasta en un 40% de pacientes que adquieren este tipo de infecciones, ésta es seguida por la infección de heridas quirúrgicas que representan hasta un 25%, las infecciones respiratorias se alcanzan un 15-20%, y las infecciones asociadas al cateterismo representan un 10% del total, otras infecciones (en piel, infecciones gastrointestinales, etc.) constituyen solo el 10% de infecciones adquiridas en el hospital (Pérez et al., 2010).

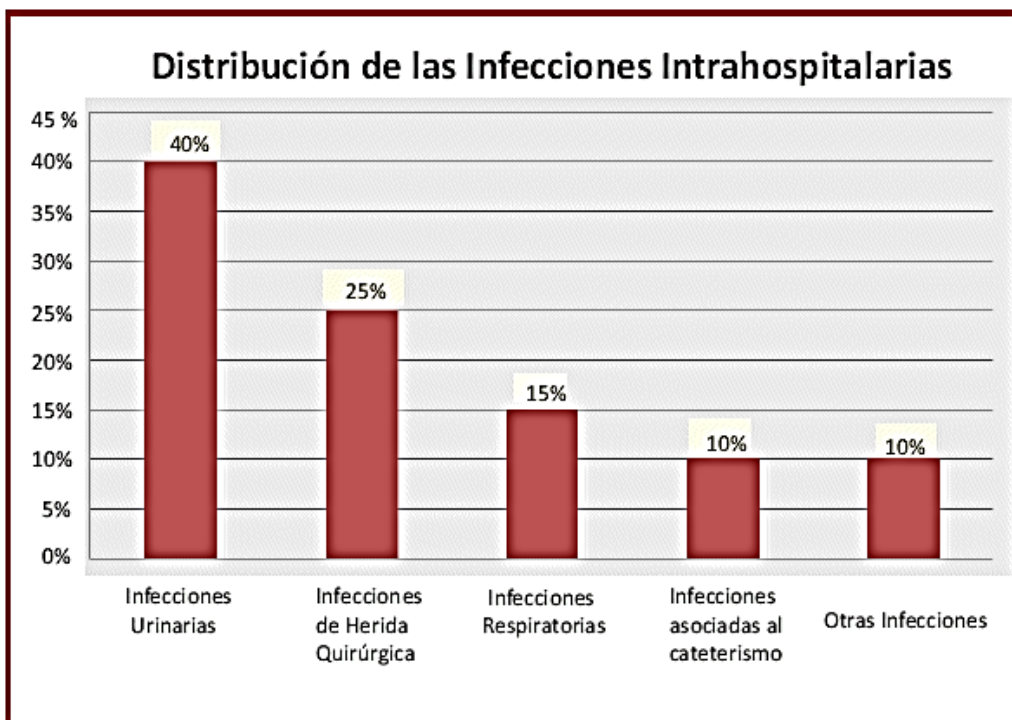


Figura 1: Distribución de las Infecciones Intrahospitalarias²

(Pérez et al., 2010)

1.2. Bacterias multirresistentes

Las bacterias multirresistentes son microorganismos que han desarrollado mecanismos defensivos con el fin de evadir la acción destructiva de los antibióticos; su crecimiento sólo puede ser inhibido a concentraciones superiores a las que el fármaco puede alcanzar en el lugar de infección (Fernández et al., 2003; Daza, 1998).

El problema de la resistencia y su incremento a nivel mundial han sido estudiados en profundidad, siendo España un país con una alta prevalencia de resistencia y uno de los países con mayor consumo de antibióticos por habitante. El uso innecesario de los antibióticos influye en las resistencias, no sólo de las bacterias patógenas, sino también de las saprofitas y oportunistas (Daza, 1998).

1.2.1. Tipos de resistencia

Existen dos tipos de resistencia, la llamada natural o intrínseca y la resistencia adquirida.

- La resistencia natural o intrínseca es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de los antibióticos, como lo demuestra el aislamiento de bacterias resistentes a los antimicrobianos, de una edad estimada de 2000 años encontradas en las profundidades de los glaciares de las regiones árticas de Canadá. En el caso de esta resistencia, todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico. La resistencia se transmite de forma vertical de generación en generación (Fernández et al., 2003).
- La resistencia adquirida constituye un problema en clínica y la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético móvil como integrones y transposones; esto

último no sólo permite la trasmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con éstos.

1.2.2. Mecanismos de resistencia

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos (Fernández et al., 2003):

- El primero de ellos es por la presencia de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba de exporte que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos.
- El segundo, se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas).
- El tercer tipo es la producción de enzimas inactivantes de los antibióticos. De esta forma son inhibidos los aminoglucósidos, el cloranfenicol por la acetil-transferasa, y la beta-lactamasa, para el grupo de los beta-lactámicos.
- Algunos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una proteína esencial para la supervivencia de éstas. La resistencia bacteriana se produce cuando el microorganismo modifica la proteína diana, y cambia su función o produce enzimas distintas.

1.2.3. Prevención de la resistencia bacteriana

En la actualidad existen varias estrategias con el fin de minimizar la resistencia de las bacterias a la acción de los antibióticos (Fernández et al., 2003).

- Uso racional de los antibióticos mediante campañas destinadas a los médicos y la población.
- Incremento en los planes de estudios de medicina de pregrado y posgrado del estudio de las enfermedades infecciosas, el uso de los agentes antimicrobianos y su prescripción basada en la evidencia.
- Establecimiento de programas de vigilancia para detectar la aparición de cepas resistentes, y mejora de la calidad de los métodos de susceptibilidad para guiar la terapéutica empírica contra los patógenos que producen las enfermedades infecciosas comunes.
- Racionalización del empleo de los antibióticos en la medicina veterinaria para la producción de alimentos de origen animal.
- Rotación cíclica de antibióticos en las instituciones sanitarias para reducir la resistencia.
- Cumplimiento estricto de las medidas de prevención y control de la infección intrahospitalaria.
- Empleo más frecuente de vacunaciones. En la actualidad se buscan nuevas opciones contra microorganismos con alta virulencia y multirresistencia, causantes de procesos infecciosos graves en los seres humanos.

1.2.4. Especies resistentes más frecuentes

Las infecciones nosocomiales producidas por los microorganismos Gram-positivos (35%) continúan siendo un problema importante en el manejo de los pacientes hospitalizados. Según un reciente estudio, *Escherichia coli* (*E. coli*) (15,9%) es el patógeno más importante en la infección nosocomial, siendo el segundo y tercero *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (15,9%) y *Enterococcus spp.* (9,6%). En toda Europa, el 41,2% de los aislados de *S. aureus* fueron resistentes a la meticilina (SARM) y el 10,2% de los enterococos fueron resistentes a la vancomicina (ERV) (Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2013).

Aparte de éstos, hay otros agentes muy importantes implicados en dichas infecciones como son: de los bacilos Gram-negativos, *Pseudomonas aeruginosa*, Enterobacterias (*Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, y la anteriormente citada *Escherichia coli*). Entre los bacilos Gram-positivos destacan los clostridios (*Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, *C. tetani*). En el grupo de cocos gram-positivos cabe mencionar a los estreptococos β -hemolíticos, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus*. También es relevante mencionar a los hongos (*Candida albicans* y *Tulolopsis glabrata*) y algunos virus, si bien las que presentan mayor importancia clínica son las bacterias (Pérez et al., 2010).

Escherichia coli es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, género *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de la microbiota normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez-Ángeles, 2002). Las principales infecciones que produce *E. coli* son gastrointestinales, respiratorias y urinarias (Pérez et al., 2010).

Staphylococcus aureus es miembro de la familia *Micrococcaceae*, es un coco Gram-positivo agrupado en racimos, en parejas o aislados. Se distingue de otras especies de estafilococos por presentar una coloración dorada en sus colonias y ser positivo para las pruebas de coagulasa, catalasa, fermentación del manitol y desoxiribonucleasa (Marcano-Lozada et al., 2008). Las principales infecciones que produce *S. aureus* son de heridas quirúrgicas, respiratorias y asociadas a vías intravenosas (Pérez et al., 2010).

Las especies del género *Enterococcus* son cocos Gram-positivos, catalasa negativo, anaerobios facultativos que aparecen solos, en pares o formando cadenas y eventualmente pueden tener una morfología cocobacilar. No producen gas a partir de la fermentación de la glucosa, son pirrolidonil β -naftilamida positivos, leucemia amino peptidasa positivos, bilis esculina positivos, crecen en caldos con NaCl al 6.5% y pueden ser alfa, beta o gamma hemolíticos (Herrera et al., 1998). Las principales infecciones que produce

Enterococcus sp. son infecciones asociadas a vías intravenosas y urinarias (Pérez et al., 2010).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la rama γ (gamma) de las proteobacterias, la misma a la que pertenece *E. coli* que es la bacteria más estudiada a nivel molecular. *P. aeruginosa* se puede aislar de muestras de suelo, aguas prístinas y contaminadas, así como de plantas y animales. Todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre y algunas pueden infectar también a plantas y a algunos invertebrados. *P. aeruginosa* representa un problema importante de salud en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer, grandes quemados o pacientes internos en terapia intensiva. Una vez que se establece la infección, *P. aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso, sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Esta situación se ve agravada por la dificultad para tratar las infecciones por *P. aeruginosa*, ya que esta bacteria presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos y a desinfectantes (Soberón-Chávez, 2001). Las principales infecciones que produce *P. aeruginosa* son infecciones asociadas a vías intravenosas y urinarias (Pérez et al., 2010).

Clostridium spp. aparece como bacilos Gram-positivos, sin embargo, muchas cepas pueden aparecer como Gram-variable o Gram-negativas. *Clostridium perfringens* es la más importante de las especies y representa el 20-40% de todos los aislamientos. La especiación se basa principalmente en la morfología celular, esporas de localización (terminal central, terminal o secundario), las reacciones bioquímicas, cromatografía de gas para los productos de fermentación; y la demostración de la producción de lecitinasa (o alfa toxina) por *C. perfringens* y lipasa por *Clostridium sporogenes*, *C. novyi* y *C. botulinum*. Las principales infecciones que producen los clostridios son infecciones asociadas a heridas y gangrena (Pérez et al., 2010).

Streptococcus pneumoniae es una cocácea Gram positiva, capsulada. Las células bacterianas tienen una forma lanceolada, miden 0,5 a 1,2 μm de diámetro y se disponen en pares o diplos. Son anaerobias facultativas. Para su

crecimiento y multiplicación tiene requerimientos específicos, como aportes de proteínas y suplementos hematológicos, por lo que es considerada una bacteria fastidiosa. Por su ubicación en el tracto respiratorio superior, *S. pneumoniae* se transmite con facilidad de persona a persona a través de las gotitas de saliva. La difusibilidad aumenta durante el curso de infecciones respiratorias con presencia de tos y aumento de las secreciones (Prado, 2001). Las principales infecciones que produce *S. pneumoniae* son infecciones respiratorias (Pérez et al., 2010).

Grupo	Agente	Infecciones que Produce
Bacilos Gram -	<i>Pseudomona Aeruginosa</i>	- Urinaria. - Asociadas con vías intravenosas.
	<i>Salmonella</i>	- Gastrointestinales
	<i>Shigella</i>	- Gastrointestinales
	<i>Klebsiella</i>	- Respiratorias - Urinarias - Asociadas a vía intravenosas
	<i>Enterobacter</i>	- Respiratorias
	<i>Escherichia Coli</i>	- Gastrointestinales - Respiratorias - Urinarias
Bacilos Gram +	<i>Clostridios</i>	- De heridas. - Gangrena
Cocos Gram +	<i>Streptococo B hemolítico</i>	- Heridas quirúrgicas
	<i>Estreptococcus Pneumoniae</i>	- Respiratorias
	<i>Estafilococcus Aureus</i>	- De herida quirúrgica - Respiratorias - Asociadas a vías intravenosas
	<i>Enterococcus</i>	- Urinarias - Infecciones asociadas a vías intravenosas
Hongos	<i>Candida / Turolopsis</i>	- Respiratoria - Asociada a nutrición parenteral

Tabla 1: Agentes etiológicos y las infecciones que producen ^{5,6}.

(Pérez et al., 2010)

1.3. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

Staphylococcus aureus, está reconocido como uno de los patógenos humanos más importantes, responsable de gran número de infecciones, y es una de las bacterias más frecuentes en las Unidades de Cuidados Intensivos, responsable entre otras sepsis de la neumonía asociada a la Ventilación Mecánica (VM) y las bacteriemias; es importante sospecharlo fundamentalmente después de una epidemia de gripe, en pacientes con desórdenes neuroquirúrgicos, pacientes sometidos a un proceder invasivo o en casos con largo tiempo de ventilación mecánica.

Esta bacteria produce tres toxinas con síndromes clínicos específicos:

- Enterotoxina termoestable preformada, que produce la intoxicación alimentaria estafilocócica.
- Toxina exfoliativa, responsable del síndrome de la piel escaldada.
- Toxina del Shock Tóxico (TSST-I).

Los portadores asintomáticos constituyen el 20-40% de los adultos sanos, siendo su localización más frecuente en la porción anterior de las fosas nasales, la nasofaringe, la vagina y el recto (Padkin et al., 2003).

Las situaciones que facilitan el estado de portador son: (Martin et al., 2003)

- Pacientes que utilizan agujas de forma sistemática (diabéticos, drogadictos, alérgicos con tratamientos de desensibilización, hemodiálisis).
- Enfermedades agudas o crónicas de la piel (quemaduras, dermatitis atópica, eccema, psoriasis y úlceras de decúbito).
- Personal de salud sobre todo que trabaje en hospitales.

Las infecciones causadas por *S. aureus* se muestran en la tabla siguiente:

MÁS COMUNES	MENOS FRECUENTES	RARAS
Forúnculo o Absceso cutáneo	Celulitis	Neumonía de la comunidad
Impétigo buloso	Neumonía nosocomial	Sepsis urinaria
Infección de las heridas quirúrgicas	Absceso cerebral	Meningitis
Bacteriemia hospitalaria	Empiemia	Enterocolitis
Osteomielitis hematógena		
Artritis séptica		
Carbúnculo renal		
Síndrome de la piel escaldada		
Síndrome del Shock Tóxico (TSST-I)		
Gastroenteritis alimentaria		

(Gordon, 1998)

Uno de los patógenos emergentes de mayor relevancia clínica en las últimas décadas es sin duda *S. aureus* resistente a meticilina (SARM).

La resistencia a la meticilina de *S. aureus* fue comunicada en 1961 pero no fue hasta los años ochenta en los que la prevalencia de SARM alcanzó cifras alarmantes, siendo en la actualidad un patógeno relevante en la infección nosocomial, como se ha comentado anteriormente (Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2013).

En Asia, la prevalencia de SARM en los hospitales es muy elevada, con cifras que superan el 60% de los aislados. En el norte de Europa (Noruega, Suecia, Dinamarca y Holanda), las cifras son muy bajas (<1%); en otros países como Malta, Portugal y Rumanía se supera el 45% de los aislados y en otros países

como España, Irlanda, Francia, Bélgica, Alemania y Reino Unido su incidencia ha disminuido de forma importante. El proyecto EPINE del año 2012 confirma la importancia de SARM en nuestro país. *S. aureus* fue el segundo patógeno en frecuencia (7,6%) por detrás de *E. coli* (28,1%). Un 43,1% de los aislados de *S. aureus* fueron además resistentes a la meticilina (Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2013).

La resistencia a la meticilina de *S. aureus* se debe a la presencia de una proteína alterada de unión a la penicilina (PBP2a), codificada por el gen *mecA*. El gen *mecA* se encuentra en un elemento genético móvil conocido como casete cromosómico (Staphylococcal chromosome cassette mec, SCCmec), que se inserta en un sitio específico del cromosoma bacteriano, cerca del origen de replicación de *S. aureus*. Esta característica es de gran relevancia porque le permite replicarse en forma temprana y transcribir los genes de resistencia (Jiménez y Correa, 2009).

El SCCmec tiene tres componentes genéticos esenciales; el complejo de genes *mec*, el complejo *ccr*, que codifica para recombinasas, y una región conocida como J (Junkyard), que comprende tres fragmentos denominados J1, J2 y J3. El complejo *ccr* está compuesto por genes que codifican para recombinasas responsables de la movilización del SCCmec, éstas median su integración y escisión del cromosoma. Se ha descrito que el SCCmec no está restringido a la movilidad del gen *mecA*; posee elementos adicionales, denominados no *mec*, que contribuyen a la supervivencia y al potencial patogénico de *S. aureus*. No se ha descrito el elemento SCCmec en bacterias de otros géneros y su origen es aún desconocido (Jiménez y Correa, 2009).

Los métodos de tipificación han permitido confirmar la introducción del gen *mecA* en diferentes clones de *S. aureus* sensibles a meticilina y su posterior dispersión a nivel mundial, además de conocer las diferencias entre los clones hospitalarios, los comunitarios y los relacionados con animales. Una de las técnicas de mayor éxito es el *spa*-typing que consiste en la secuenciación de la región variable del gen *spa* que codifica la proteína A de superficie de *S. aureus*; una segunda técnica es el multilocus sequence typing que consiste en

la secuenciación de regiones de ADN definidas de 7 genes conservados (*arc, aro, glp, gmk, pta, tpi e yqi*). Esta técnica es útil en estudios poblacionales y de comparación de aislados entre diferentes centros. Por último, una de las técnicas más importantes es la electroforesis en campo pulsante (PFGE) que continúa siendo el método de referencia a nivel local y consiste en el análisis de fragmentos generados por enzimas de restricción en el ADN total bacteriano. Esta técnica tiene un elevado poder de discriminación, útil en la investigación de brotes (Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2013).

Los clones hospitalarios (Hospital associated-methicillin resistant *S.aureus* (HA-MRSA)) fueron los primeros que surgieron y los responsables del gran aumento de SARM en los hospitales durante los años ochenta y noventa. Durante la década de los 2000 se observó en EE.UU un rápido aumento de cepas de SARM en la comunidad, con lo que se demostró que la totalidad de los aislados pertenecían al clon USA3090 SCCmec de tipo IV productor de PVL (leucocidina de Panton-Valentine) y sensible a rifampicina, cotrimoxazol, clindamicina y tetraciclina. Se asociaba a infecciones de piel y tejidos blandos, además de causar neumonías necrosantes severas. En Europa, este clon no se ha identificado con frecuencia y las cepas de SARM productoras de PVL encontradas en la comunidad tienen una estructura policlonal, siendo el ST80 el mayoritario. En estudios recientes se ha demostrado la invasión de clones con SSCmec de tipo IV, típico de los community associated-methicillin resistant *S.aureus* (CA-MRSA) en el compartimento hospitalario, dejando ver la separación entre clones comunitarios y hospitalarios.

Más recientemente, en 2003, se describieron aislados de SARM pertenecientes al clon ST398 en cuidadores de granjas de cerdos en Holanda. Estos aislados representan los denominados livestock associated-methicillin resistant *S.aureus* (LA-MRSA). A pesar de su rápida y amplia difusión, se ha visto una baja incidencia en hospitales (Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2013).

SARM se aísla en una gran variedad de infecciones nosocomiales, entre ellas las de localización quirúrgica, bacteriemias y en infecciones urinarias. Los pacientes infectados por SARM requieren mayor número de pruebas

diagnósticas y antimicrobianos y se asocian a estancias hospitalarias prolongadas. Además, se relaciona a SARM con una elevada tasa de mortalidad (Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2013).

El tratamiento de las infecciones producidas por SARM tiene grandes limitaciones por el perfil multirresistente que presenta. Los glucopéptidos, esencialmente vancomicina, han sido considerados tradicionalmente tratamiento de elección, sin embargo, en los últimos años se han descrito fracasos tras el tratamiento con ésta. La elección del tratamiento depende del tipo de infección. El linezolid sería de elección en la infección respiratoria, mientras que la daptomicina y el linezolid en la infección de piel y tejidos blandos, la infección quirúrgica y la bacteriemia, incluyendo la asociada a catéter. La tigeciclina también se ha utilizado como alternativa en infecciones de piel y tejidos blandos e intraabdominales. Recientemente, se ha aprobado el uso de ceftarolina, cefalosporina con actividad frente a SARM, en la neumonía adquirida en la comunidad y en la infección de piel y tejidos blandos. Presenta una buena actividad frente a SARM debido a su gran afinidad por la PBP2a (Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2013).

SARM coloniza con facilidad la mucosa nasal y la epidermis, así como las úlceras y heridas quirúrgicas. La transmisión hospitalaria de SARM se suele producir con facilidad a través de las manos contaminadas del personal sanitario, de superficies o el instrumental médico contaminado o del contacto entre los pacientes. Al igual que para otros microorganismos multirresistentes, el riesgo de que un paciente se colonice por SARM es mayor al aumentar el número de pacientes colonizados en una determinada área hospitalaria y el tiempo de ingreso hospitalario. Este último favorece el contacto con el resto de los pacientes y los trabajadores sanitarios (Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2013).

2. HIPÓTESIS Y PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

Dada la creciente prevalencia de infecciones nosocomiales asociadas a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y las grandes limitaciones que presenta el tratamiento de estas infecciones por el perfil multirresistente

que presentan a menudo las cepas responsables, se plantea la pertinencia de evaluar la incidencia de infecciones nosocomiales debidas a este microorganismo en el hospital colaborador en este proyecto, así como analizar e identificar los determinantes genéticos responsables de esta resistencia. Este estudio permitirá definir la antibioterapia más adecuada en cada caso, en base al perfil de resistencia definido en cada una de las cepas aisladas.

3. OBJETIVOS

- Evaluar la incidencia de infecciones nosocomiales asociadas a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en el hospital colaborador.
- Estudiar los mecanismos responsables de la resistencia a meticilina en cepas hospitalarias identificadas como *S. aureus*.
- Realizar un informe en base a los datos obtenidos para orientar a los facultativos del hospital en cuanto a las alternativas de tratamiento más oportunas a aplicar en estas infecciones.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

En primer lugar se recogerán las muestras con la anterior aprobación del hospital colaborador, el cual nos informará de las infecciones intrahospitalarias para la elaboración del estudio estadístico de la incidencia de infecciones por SARM durante el año de desarrollo del proyecto.

4.1. Reaislamiento de las muestras

Cuando llegan las muestras provenientes del hospital al laboratorio se reaislan las muestras en medios selectivos V-J y manitol salado.

4.1.1. Agar manitol salado

El medio agar manitol salado es un medio de cultivo selectivo debido a su alta concentración salina y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos a partir de alimentos y otros materiales de importancia sanitaria y clínica. Las colonias sospechosas, se repicarán en un medio sin exceso de cloruro de sodio para efectuarles, posteriormente, la prueba de la coagulasa.

Composición:

Concentración (en gramos por litro)		Instrucciones
Extracto de carne	1.0	Suspender 111g de polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos
Pluripeptona	10.0	
d-Manitol	10.0	
Cloruro de sodio	75.0	
Agar	15.0	
Rojo de fenol	0.025	
pH final: 7,4 ± 0,2		

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripeptona, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, el manitol es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, y el rojo fenol es el indicador de pH.

Los estafilococos crecen en altas concentraciones de sal, y pueden o no fermentar el manitol.

Los estafilococos coagulasa positiva fermentan el manitol y se visualizan como colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color.

Los estafilococos que no fermentan el manitol, se visualizan como colonias rojas, rodeadas de una zona del mismo color o púrpura.

Se procede a sembrar la muestra en placas de Petri con agar manitol salado y posteriormente se incuban durante 24-48h a 37°C, en aerobiosis.

Resultados:

Microorganismos fermentadores de manitol: colonias de color amarillo rodeadas o no de un halo amarillo.

Microorganismos no fermentadores de manitol: colonias del color del medio, rojas rodeadas o no de un halo rojizo-púrpura.

4.2. Agar Vogel Johnson

El agar Vogel Johnson (V-J) es un medio utilizado para la rápida detección de estafilococos coagulasa positivo fermentadores de manitol, a partir de alimentos y otros materiales de importancia sanitaria y clínica.

Composición:

Concentración (en gramos por litro)		Instrucciones
Tripteína	10.0	Se suspenden 61g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Distribuir, esterilizar 15 minutos a 121°C, enfriar a 45-50°C y agregar 20ml de una solución de telurito de potasio al 1%. Mezclar suavemente y distribuir en placas de petri
Extracto de levadura	5.0	
Manitol	10.0	
Fosfato dipotásico	5.0	
Cloruro de litio	5.0	
Glicina	10.0	
Agar	16.0	
Rojo de fenol	0.025	

pH final: 7.2 ± 0.2

En el medio de cultivo, la tripteína y el extracto de levadura, aportan los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano. El manitol es el hidrato de carbono fermentable. El telurito, el cloruro de litio y la alta concentración de glicina, son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de la flora acompañante y el rojo fenol es el indicador de pH.

Se procede a sembrar la muestra en placas de Petri con agar Vogel Johnson y posteriormente se incuban durante 24-48h a 37°C, en aerobiosis.

Resultados:

Los estafilococos coagulasa positivo, fermentan el manitol, produciendo la acidificación del medio y el viraje del indicador de pH al color amarillo, y también reducen el telurito a telurio. Debido a esto, se observan colonias de color negro, rodeadas de un halo amarillo.

4.2. Caracterización de las cepas

Una vez que se ha realizado el aislamiento hay que caracterizar las cepas, mediante las pruebas bioquímicas de la DNasa y la coagulasa, para comprobar que efectivamente las bacterias reaisladas son *S. aureus* y después se conservan éstas a -80 °C en medio TSB con un 20% de glicerol para estudios posteriores.

4.2.1. Coagulasa

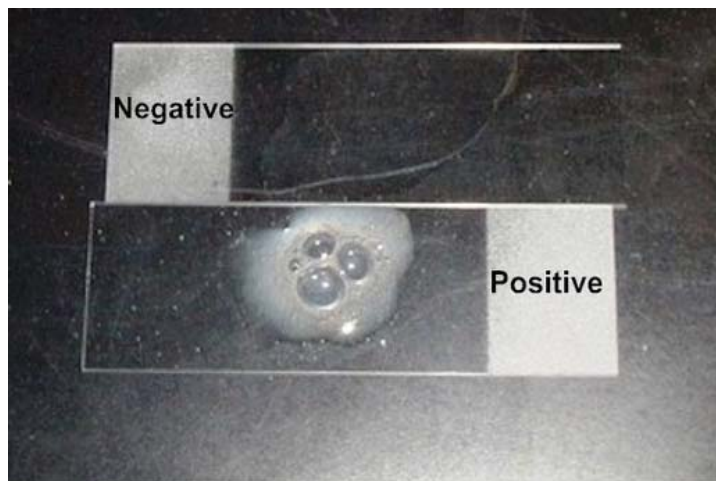
Prueba bioquímica en la que la enzima responsable estimula la conversión del fibrinógeno en fibrina, comprueba la facultad de un microorganismo de coagular el plasma.

Recomendado usar plasma de conejo EDTA, no se debe usar el plasma citratato porque las especies de *Enterococcus* pueden usar citrato y producir resultado falsos positivos confundiendo con *Staphylococcus*.

La prueba de la coagulasa es usada específicamente para diferenciar las especies del género *Staphylococcus*.

Resultados en placa y en tubo:

Placa → la prueba positiva ocurre entre 5-20 segundos y la prueba es negativa si la aglutinación no ocurre dentro de 3-4 minutos.



Tubo → la prueba es positiva cuando aparece un coágulo en el fluido y la prueba es negativa si no hay formación de coágulo, la suspensión permanece homogénea.



4.2.2. DNasa

El medio DNasa Agar sirve para demostrar la presencia de la enzima desoxirribonucleasa (DNasa) producida por *Staphylococcus aureus* patógenos (coagulasa positivos). La presencia de esta enzima se correlaciona con la liberación de toxina por parte de la bacteria. Tras el proceso de incubación, se añade HCl 1N que hace que precipite el ADN, apareciendo una zona clara alrededor del crecimiento de las bacterias que producen esta enzima.

Se recomienda incluir un control negativo (*Staphylococcus epidermidis*) y un control positivo (*S. aureus*). Tras sembrar las placas con las cepas a estudiar se incuban durante 18-24 h en atmósfera aerobia a 35-37°C. Después de la incubación, se vierte sobre las placas suficiente ácido clorhídrico 1N (HCl). Se deja que el ácido penetre en toda la superficie del medio durante 2 minutos.

Composición:

Concentración (en gramos por litro)		Instrucciones
Ácido desoxirribonucleico	2.0	Suspender 42g de medio en 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición durante 1 minuto agitando constantemente. Esterilizar en autoclave a 117°C durante 30 minutos. Enfriar el medio a 55-60°C y repartir en placas de Petri estériles
Bio-Trypticase	15.0	
Bio-Soyase	5.0	
Cloruro Sódico	5.0	
Agar	15.0	
pH final: 7.3 ± 0.2		

Resultados:

Después de la aplicación y penetración del ácido clorhídrico en el medio, los organismos positivos a la DNasa, tal como *S. aureus* estarán rodeados de

zonas transparentes de ADN despolimerizado y las colonias de organismos con resultado negativo a la DNasa no presentarán zonas transparentes alrededor de las colonias.



4.3. Determinantes genéticos

Una vez reisladas las cepas en medios selectivos y diferenciales y confirmada su identificación como *S. aureus* se procede al estudio de los determinantes genéticos responsables de la resistencia en estas cepas.

La presencia de determinantes genéticos responsables de la resistencia o multirresistencia se pondrá de manifiesto mediante amplificación por PCR empleando los cebadores y condiciones específicas descritos para cada uno de ellos. Tras la extracción del ADN de las cepas incluidas en el estudio, los determinantes específicos que se analizarán son los siguientes:

- Beta-lactamasas y PBP2a, regulado por los sistemas *blaZ-blaI-blaR1* y *mecA-mecI-mecR*.
- *murE* y *femA* (genes que aportan resistencia mediante un mecanismo aún no definido).
- Gen plasmídico *cfr* que contribuye a la multirresistencia de estas cepas y a su transmisión.

Tras amplificación por PCR de los genes objeto de estudio, se analizarán los resultados de las bandas obtenidas en gel de agarosa para clasificar las cepas como positivas o negativas en cuanto a la presencia de cada uno de estos determinantes de resistencia.

Por último, en base a los resultados obtenidos se elaborará un informe para el centro hospitalario en que se hará constar la incidencia de SARM detectada en las muestras analizadas, así como los determinantes de resistencia identificados en las cepas estudiadas y una orientación en cuanto a la modificación de los tratamientos antibióticos que deberían aplicarse frente a estos patógenos en base a los perfiles de resistencia detectados.

5. PLAN DE TRABAJO A DESARROLLAR

- Recogida de muestras para la elaboración del estudio estadístico de la incidencia de infecciones por SARM
- Reaislamiento en medios selectivos (agar manitol salado y V-J)
- Caracterización de las cepas (Coagulasa y DNasa)
- Conservación de las cepas reaisladas a -80°C en medio TSB con un 20% de glicerol para estudios posteriores
- Estudio de los elementos genéticos clave en las cepas de SARM
- Elaboración de un informe en el que consta la incidencia de SARM detectada en las muestras analizadas

6. MEDIOS DISPONIBLES Y REQUERIDOS PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

En el laboratorio de investigación del área de Microbiología se dispone de todo el equipo inventariable necesario para llevar a cabo el plan de trabajo establecido, contamos con estufas de incubación, centrifugas, congeladores para la conservación de las muestras termocicladores y equipamiento necesario para preparación e interpretación de geles de agarosa para detección de genes de resistencia.

7. PRESUPUESTO SOLICITADO

7.1. Gastos de ejecución

- Material inventariable: no es necesario adquirir ningún equipo
- Material fungible:
 - Medios de cultivo: agar Vogel Johnson (V-J), agar manitol salado y DNasa agar
 - Tubos de vidrio y plástico
 - Reactivos para las pruebas bioquímicas
 - Reactivos y kits para extracción de ADN
 - Reactivos y cebadores específicos para amplificación del ADN
 - Reactivos y material para preparación de geles de agarosa
- Material bibliográfico: libros o artículos de revistas específicos del tema y gastos de publicación de los resultados obtenidos
- Inscripciones a congresos, viajes y dietas

7.2. Desglose del presupuesto solicitado

MATERIAL FUNGIBLE	7500€
MATERIAL BIBLIOGRÁFICO	700€
INSCRIPCIONES A CONGRESOS, VIAJES Y DIETAS	1200€
OTROS GASTOS	---
TOTAL SOLICITADO	9400€

8. PLAN DE DIFUSIÓN DE RESULTADOS Y REPERCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se publicarán en revistas de alto impacto a nivel internacional en el ámbito de la Microbiología Médica, como “Journal of Antimicrobial Chemotherapy”, “International Journal of Antimicrobial Agents”, “Antimicrobial Agents and Chemotherapy”, así como se expondrán en congresos específicos del ámbito clínico, tanto a nivel nacional como internacional.

En cuanto a la respercusión de los resultados, se podrá modificar el protocolo de tratamiento antibiótico a aplicar frente a infecciones causadas por SARM en el centro hospitalario en base a los perfiles de resistencia detectados en las cepas a lo largo del desarrollo de este proyecto.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Astagneau P, Ambrogi V. 2014. Infecciones nosocomiales e infecciones asociadas al tratamiento médico. Tratado de Medicina. Volumen 18: 1-7.
- Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. 2013. Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus spp.*). Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1-9.
- Daza R.M. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Inf Ter Sist Nac Salud. Volumen 22: 59.
- Fernández F, López J, Ponce L.M, Machado C. 2003. Resistencia bacteriana. Revista Cubana de Medicina Militar. Volumen 32 (1): 45-47.
- Gordon L Archer. 1998. Infecciones *Staphylococcus*. En: CECIL. Tratado de Medicina Interna. 20 ed. P.1855-1859.
- Hernández M, Rodríguez Z.R, González S, Cruz C.R, Fernández J.E. 2005. *Staphylococcus aureus*, una causa frecuente de infección nosocomial. Revista Médica Electrónica. Volumen 27 (5)
- Herrera M.L, Vargas A, Campos M. 1998. Aislamientos de *Enterococcus spp.*, resistentes a la vancomicina, en muestras de heces de niños costarricenses. Revista Médica del Hospital Nacional de Niños (Costa Rica). Volumen 33: 1-2.
- Jiménez J.N, Correa M.M. 2009. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. Volumen 22 (2): 149-150.

- Marcano-Lozada M.J, Velazco R, Vázquez G, Suárez N, Quintana M.E, Peña J.K, Núñez I. 2008. Staphylococcus aureus y alergias ¿Mito o realidad? VITAE Academia Biomédica Digital. Pag. 3.
- Martin G.S, Mannino D.M, Eaton S, Moss M. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 348:1546-1554.
- Navarrete-Navarro S, Rangel-Frausto MS.1999. Las infecciones nosocomiales y la calidad de la atención médica. Salud pública de México. Volumen 41 (1): 64-65.
- Olaechea P.M, Insausti J, Blanco A, Luque P. 2010. Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales. Medicina Intensiva. Volumen 34: 256.
- Padkin A, Goldfrad C, Brady A.R, Young D, Black N, Rowan K. 2003. Epidemiology of severe sepsis in the first 24 hours in intensive care units in England, Wales and Northern Ireland. Crit Care Med 31(3): 2332-2338.
- Pérez L.H, Zurita I.M, Pérez N, Patiño N, Calvimonte O.R. 2010. Infecciones Intrahospitalarias: Agentes, Manejo Actual y Prevención. Revista Científica Ciencia Médica. Volumen 13 (2). 94-98.
- Prado V. 2001. Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. Rev Chil Infect. Volumen 18 (1): 6.
- Rodríguez-Ángeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud pública de México. Volumen 44 (5): 464-465.

- Soberón-Chávez G. 2001. *Pseudomonas aeruginosa*. En: Microbios en línea, capítulo 3. Martínez Romero E. y Martínez Romero J. (eds). DGSCA, UNAM.