



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

“ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE *Staphylococcus aureus* METICILINO RESISTENTE (MRSA) E IDENTIFICACIÓN DEL GEN *mecA* POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL EMPLEANDO EL EQUIPO: GeneXpert Cepheid”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

TORRES ESCOBAR ILSE

DIRECTOR DE TESIS:

DR. EN C. JONNATHAN GUADALUPE SANTILLÁN BENÍTEZ

ASESOR EXTERNO

Q. F. B. EDELMIRA MEJÍA GARCÍA

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, OCTUBRE 2014

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. en C. Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez

Por su apoyo y entusiasmo para la elaboración de este trabajo; agradeceré siempre sus consejos y conocimientos compartidos.

A la Q.F.B. Edelmira Mejía García

Por la oportunidad y disposición de realizar este proyecto en el laboratorio de Centro Médico ISSSEMyM.

DEDICATORIAS

A mis padres, sabiendo que no existen palabras para agradecer toda una vida de lucha y sacrificio, sólo quiero que sientan que este logro no es solo mío, sino suyo también. Les dedico este trabajo con mi más grande admiración y respeto. A ti mamá, porque eres la fuerza que siempre me impulsa, te quiero mucho. A ti papá, porque me has enseñado lo más importante, qué con trabajo y esfuerzo se logran las cosas, eres mi héroe.

A mi hermano y a mis primas que son también mis hermanas, les dedico esto por su cariño, paciencia y apoyo incondicional.

A Isaac Israel, te dedico con amor todos mis proyectos de vida, por ser mi mejor amigo, mi cómplice y todo.

ÍNDICE

	Páginas
INTRODUCCION	1
RESUMEN	2
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	
1.1 AGENTE ETIOLÓGICO: <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i> A ANTIBIOTICOS.	4
1.2.1 Generalidades e historia	4
1.2.2 Resistencia mediada por Betalactamasas	5
1.2.3 Fenómeno de Tolerancia	5
1.2.4 Resistencia Intrínseca	5
1.3 MULTIRESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.	9
1.4 MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A METICILINA	
1.4.1 Difusión en disco de Oxacilina y Cefoxitina	11
1.4.2 Prueba de dilución	11
1.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	12
1.4.4 Otros Métodos	14
1.5 EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA	
1.5.1 Sensibilidad	16
1.5.2 Especificidad	16
1.5.3 Valores predictivos	16
ANTECEDENTES	17
PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
JUSTIFICACIÓN	22
OBJETIVOS	23
HIPÓTESIS	24

CAPITULO II: METODOLOGIA

2.1 TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO

2.1.1 Criterios de exclusión e inclusión 25

2.1.2 Variables 25

2.2 DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL 26

2.3 MATERIAL Y MÉTODOS

2.3.1 Identificación de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente 27

2.3.2 Toma y transporte de muestras de hisopado nasal 27

2.3.3 Identificación del gen *mecA* por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real. 28

2.3.4 Confirmación de resistencia a meticilina por el método de difusión en disco de oxacilina y cefoxitina. 33

2.3.5 Límite de Detección 33

CAPITULO III: RESULTADOS 34

CAPITULO IV: DISCUSIÓN DE RESULTADOS 44

CAPITULO V: CONCLUSIONES 52

ANEXOS 53

BIBLIOGRAFÍA 55

INTRODUCCIÓN

En el laboratorio clínico uno de los microorganismos Gram positivos que se aísla con mayor prevalencia es el *Staphylococcus aureus* en gran variedad de muestras, además de ser un patógeno nosocomial. En el año de 1959 después del descubrimiento de la producción de β -lactamasas por *Staphylococcus aureus*, se introduce una penicilina sintética llamada meticilina; para los años setenta ya se habían identificado las primeras cepas resistentes a esta penicilina. El componente genético del mecanismo de esta resistencia es la incorporación del gen *mecA*, el cual codifica una proteína transpeptidasa, que mantiene la integridad de la pared celular (Gil 2000, Cepheid 2007). La gran inquietud es que usualmente el *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente (MRSA) se asocia a resistencia a otros antibióticos, diferentes de los de la familia de los β -lactámicos; reduciendo con ello las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones asociadas al MRSA (Gil 2000, Gerald, John et al. 2002).

En un intento por limitar la extensión de estas infecciones causadas por MRSA, se están desarrollando e implementando estrategias y políticas de control en instalaciones médicas. El control del MRSA es uno de los principales objetivos de la mayoría de los programas de control de infecciones hospitalarias. Actualmente, el método de vigilancia estándar para detectar el MRSA es el cultivo, aunque éste método es bastante laborioso y consume mucho tiempo (Mainous, Hueston et al. 2006).

La prueba Xpert MRSA de Cepheid llevado a cabo en el sistema GeneXpert, es una prueba de diagnóstico *in vitro* cualitativa, donde se utiliza una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real con el objeto de detectar el gen *mecA* del MRSA.

Por lo tanto, este trabajo pretende contribuir a la búsqueda de un método más rápido y efectivo para el control del MRSA, el cual representará una ventaja definitiva para los programas de control de la infección. Además del estudio de la resistencia a varios grupos de antibióticos y su posible relación con la presencia/expresión del gen *mecA*.

RESUMEN

Staphylococcus aureus Meticilino Resistente (MRSA) es uno de los patógenos nosocomiales más aislados en hospitales. Debido al gran problema que representa, se han desarrollado nuevas metodologías para su identificación, siendo una de ellas la prueba Xpert MRSA de Cepheid, que pretende un diagnóstico rápido.

El objetivo de este trabajo es estudiar la resistencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) e identificar el gen *mecA* por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real empleando el equipo: GeneXpert Cepheid.

Se recolectaron 67 muestras, 58 cultivos positivos para *Staphylococcus aureus* del laboratorio de Centro Médico ISSEMyM y 9 muestras tomadas directamente de pacientes internos. Las muestras fueron analizadas para la identificación del gen *mecA* por PCR en el sistema cerrado del equipo GeneXpert en un estudio estadísticamente descriptivo.

De los 58 aislamientos de *S. aureus*, fueron identificados 96.55% (56/58) con presencia del gen *mecA* y con ello resistencia a antibióticos β -lactámicos y de otras familias. Se observa que el 59% se obtuvo de muestras de pacientes de sexo masculino y el restante 41% de sexo femenino. Mientras que para servicio médico, se aisló con mayor frecuencia en Cirugía General y Nefrología, con un 28.6% para ambos servicios. Con respecto al tipo de muestras, el 37.5% corresponde a heridas quirúrgicas, seguido por hemocultivos con 14.3% y líquido de diálisis con un 12.5%. La Tecnología del equipo GeneXpert para la identificación del gen *mecA*, presenta una sensibilidad, especificidad, de 100.0%, 68.8%, respectivamente, comparado con el equipo VITEK 2.

La Identificación del gen *mecA* empleando el equipo GeneXpert Cepheid, es una alternativa para el diagnóstico rápido de MRSA, ya que identificando la presencia del gen se implementa la terapia más adecuada al paciente. Además, cuando se confirma la presencia del gen *mecA* en pacientes pre-quirúrgicos se previene una infección invasiva posterior a la cirugía.

CAPITULO I

Marco Teórico

MARCO TEÓRICO

1.1 AGENTE ETIOLÓGICO: *Staphylococcus aureus*

Los *Staphylococcus aureus* fueron observados por primera vez por Koch y Pasteur. Hacia 1880 Ogston los nombró con el termino griego *staphylé*, «racimo de uvas». Los estafilococos pertenecen a la familia *Micrococcaceae*. El género *Staphylococcus* consta de más de 25 especies, siendo las principales *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* y *S. aureus* (García, Alcaraz et al. 2005).

Son cocos Gram positivos, inmóviles que permanecen aislados o se agrupan en pares, cadenas o racimos; tienen un diámetro de entre 0,5 y 1 μ m, son anaerobios facultativos, fermentan el manitol, son capaces de crecer en un medio con una elevada concentración de sal y a temperaturas desde 18 a 40°C. Su Pared está compuesta por peptidoglucano asociado a ácidos teicoicos, mientras que la superficie está recubierta de la proteína A. Son colonias opacas, circulares, lisas, enteras y doradas, debido a los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento, de ahí el nombre de la especie. En Ágar sangre las colonias son grandes presentando una actividad hemolítica variable (Figura 1) (Murray, Rosenthal et al. 2009, Pahissa 2009).

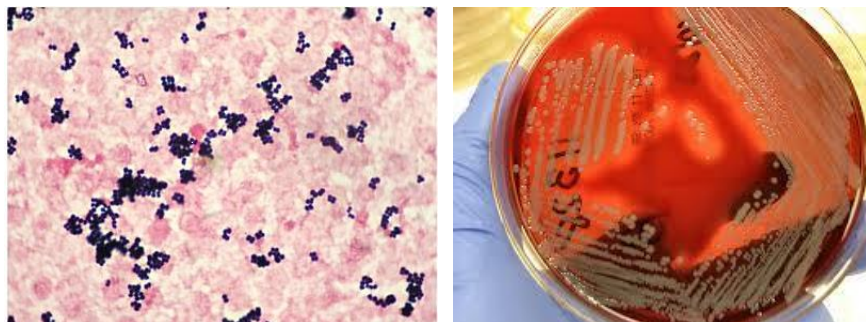


FIGURA 1. Tinción Gram y colonias β -hemolíticas de *Staphylococcus aureus* en medio Ágar sangre (Fuente: Albert Pahissa, 2009).

Los factores de virulencia más importantes que poseen son: adhesina, catalasa, coagulasa, lipasas, hialuronidasa, estafilosinasa, nucleasa y betalactamasas; y toxinas como: la toxina alpha o hemolisina alpha, toxina beta o esfingomielinasa, toxina delta o

hemolisina delta, toxina gamma o hemolisina gamma, leucocidina, enterotoxinas, exfoliatina y exotoxinas pirógenas (Murray, Rosenthal et al. 2009).

Staphylococcus aureus es un agente etiológico de diversas patologías, incluyendo infecciones de piel y tejidos blandos, bacteremia, endocarditis, infección del SNC y del tracto genitourinario. Los individuos sanos poseen riesgo de contraer infecciones invasivas, ya que *Staphylococcus aureus* coloniza las narinas anteriores, que pueden transferir los microorganismos a su piel (Mainous, Hueston et al. 2006, Murray, Rosenthal et al. 2009).

1.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA DE *Staphylococcus aureus* A ANTIBIÓTICOS

1.2.1 Generalidades e Historia

Staphylococcus aureus desarrolla Resistencia con gran facilidad. El 90% de las cepas hospitalarias son resistentes a penicilinas, en el año de 1980 casi el 5% de las cepas eran resistentes a meticilina y ha ido en aumento. El incremento de la prevalencia de MRSA implica un serio problema terapéutico en el ámbito hospitalario.

TABLA 1. Breve historia de la Resistencia de *Staphylococcus aureus*.

AÑO	RESISTENCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i>
1928	La penicilina es descubierta por Alexander Fleming.
1941	Se introduce la penicilina en el tratamiento de enfermedades infecciosas.
1944	<i>Staphylococcus aureus</i> penicilina resistente.
1959	Se introduce la meticilina (penicilina semisintética resistente a penicilinas) como antibiótico de elección para <i>S. aureus</i> .
1961	Jevons, en Londres, hizo el primer reporte de <i>S. aureus</i> resistente a meticilina (MRSA), destacándolo como importante causa de infección nosocomial en Europa.
De los años '70 en adelante	MRSA se extiende a todo el mundo provocando graves infecciones intrahospitalarias.

AÑO	RESISTENCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i>
1984	Mc Douglas y Thornsberry descubrieron la aparición de cepas de <i>S. aureus</i> con susceptibilidad intermedia, definidas como <i>S. aureus</i> con sensibilidad "Bordline" o bajo nivel de resistencia BORSA.
1996	<i>S. aureus</i> aparece con resistencia intermedia a vancomicina (VISA).
2002	<i>S. aureus</i> aparece con resistencia a vancomicina (VRSA).

Se han descrito tres mecanismos de Resistencia de MRSA a los β -lactámicos: Mediada por β -lactamasas, fenómeno de Tolerancia y Resistencia Intrínseca (Gil 2000, Gerald, John et al. 2002).

1.2.2 Resistencia mediada por Betalactamasas.

Staphylococcus aureus produce una enzima mayormente codificada por plásmidos, que inactiva el antibiótico mediante la apertura de su anillo betalactámico. Estas cepas producen altas cantidades de betalactamasa (Resistencia *Borderline*), que hacen la acción de la oxacilina y meticilina sea lenta. No contienen la PBP 2a, proteína transpeptidasa codificada por gen *mecA* (Gil 2000, Gerald, John et al. 2002).

1.2.3 Fenómeno de tolerancia

Staphylococcus aureus presenta una tolerancia a la acción bactericida de los antibióticos betalactámicos, corresponde a una modificación mínima de las PBPs (Proteínas transpeptidasas) 1, 2 y 4 con baja afinidad por este grupo de antibióticos. Al igual que el mecanismo anteriormente descrito, no contienen la PBP 2a (Gil 2000, Gerald, John et al. 2002).

1.2.4 Resistencia intrínseca.

Este mecanismo de resistencia también conocida como "Resistencia a la Meticilina", se debe a la incorporación del gen *mecA* al ADN bacteriano del *S. aureus*, muy

probablemente por la transferencia horizontal de las especies estafilococos coagulasa negativos, es determinante de la resistencia que agrupa a todos los betalactámicos. El gen *mecA* se localiza en un gran elemento genético de 30 a 40 kb, conocido como casete cromosómico (*SCCmec*), que codifica a una proteína ligadora de penicilina transpeptidasa PBP 2a (Chambers 1997, Gil 2000, de Lencastre, Oliveira et al. 2007).

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

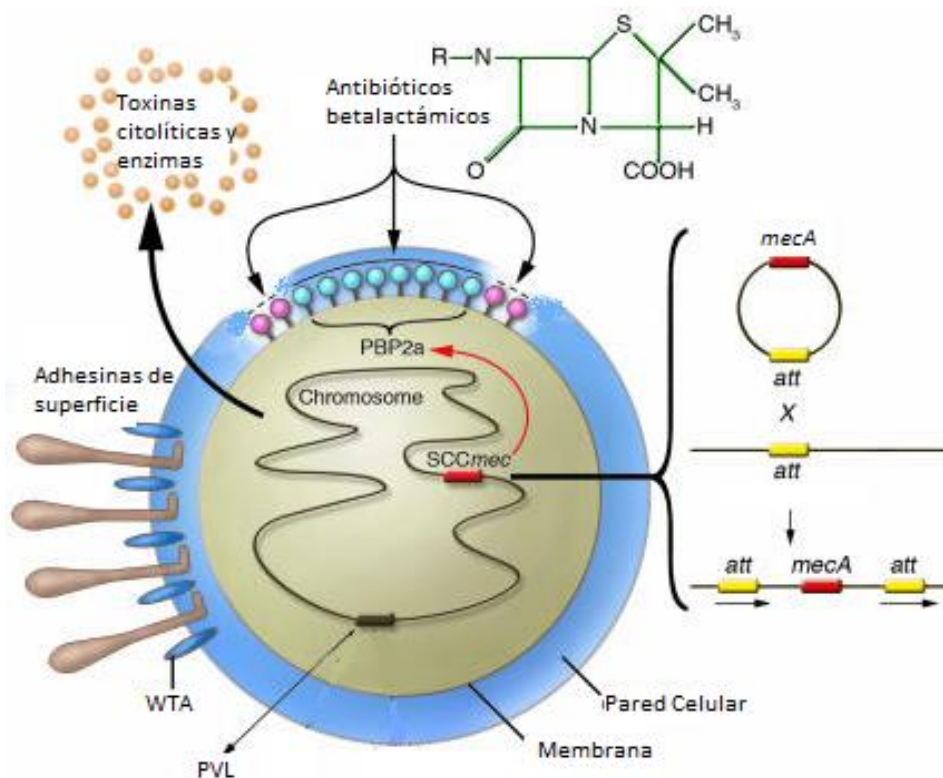


FIGURA 2. Diagrama esquemático que ilustra la forma en *S. aureus* adquiere resistencia a la meticilina y su capacidad para expresar diferentes factores de virulencia. La bacteria expresa adhesinas de proteínas de superficie y de la WTA y también segrega muchas toxinas y enzimas por la activación de genes cromosómicos. El gen *mecA* codifica una nueva proteína β -lactama insensible a la penicilina vinculante, PBP2a. (Fuente: Timothy J. Foster, 2004).

El *Cassette* en el cromosoma *mec* de *Staphylococcus aureus* (*SCCmec*), se sitúa en un sitio específico del cromosoma bacteriano (*attB_{scc}*), cerca del grupo de genes *pur-nov-his*. Existen genes regulatorios para el gen *mecA*, el *mecI* y *mecR*, el primero reprime la expresión del gen y el otro la conduce. Además de la existencia de cinco factores *fem* (factor esencial para la resistencia a la meticilina), que también regulan la expresión (Figura 3) (Chambers 1997, Gil 2000).

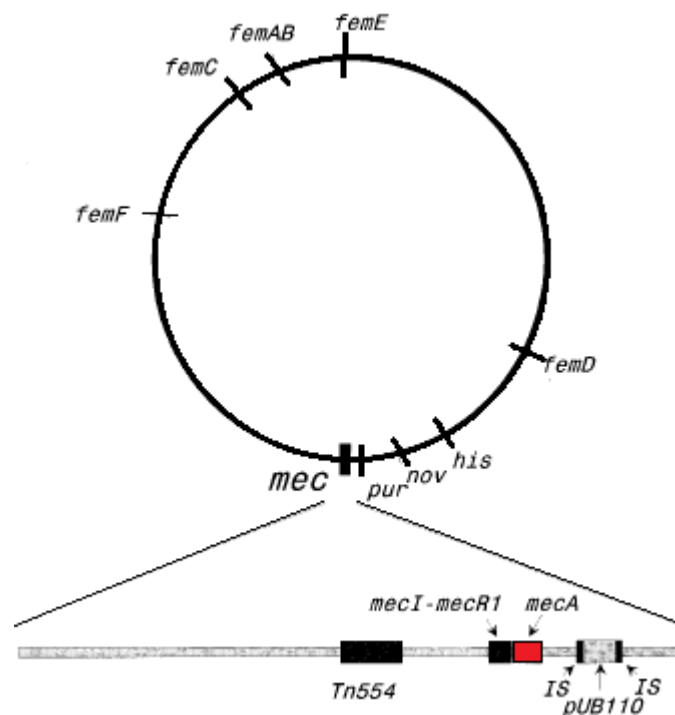


FIGURA 3. Organización molecular de la región *mec* en el cromosoma de *S. aureus* (Fuente: Chambers HF, 1997).

El *SCCmec* es capaz de liberar una variedad de diferentes determinantes de resistencia y virulencia, posee tres componentes genéticos esenciales: el complejo de genes *mec* compuesto por el gen *mecA* y sus genes reguladores *mecR1* y *mecI*, el complejo de genes *ccr*, que codifica para recombinasas responsables de la movilización de *SCCmec*, y una región conocida como *J* (*Junkyard*), que puede contener plásmidos o transposones portadores de genes de resistencia a antibióticos no betalactámicos y a metales pesados (de Lencastre, Oliveira et al. 2007).

Diferentes combinaciones de las clases del complejo y los alotipos del complejo *ccr* generan varios tipos de *SSCmec*, además de variaciones en la región J. Se describen 6 tipos de *SSCmec*, nombrados del I al VI. Los tipos I, II y III se han asociado con infecciones nosocomiales; siendo los tipos II y III portadores de muchos determinantes de resistencia a antibióticos no betalactámicos. Los tipos I, IV y V solo contienen genes para recombinasas, genes estructurales y reguladores de la resistencia a meticilina, carecen de elementos transponibles y de genes que codifiquen a resistencia a antibióticos no betalactámicos (Figura 4) (Zhang, McClure et al. 2005).

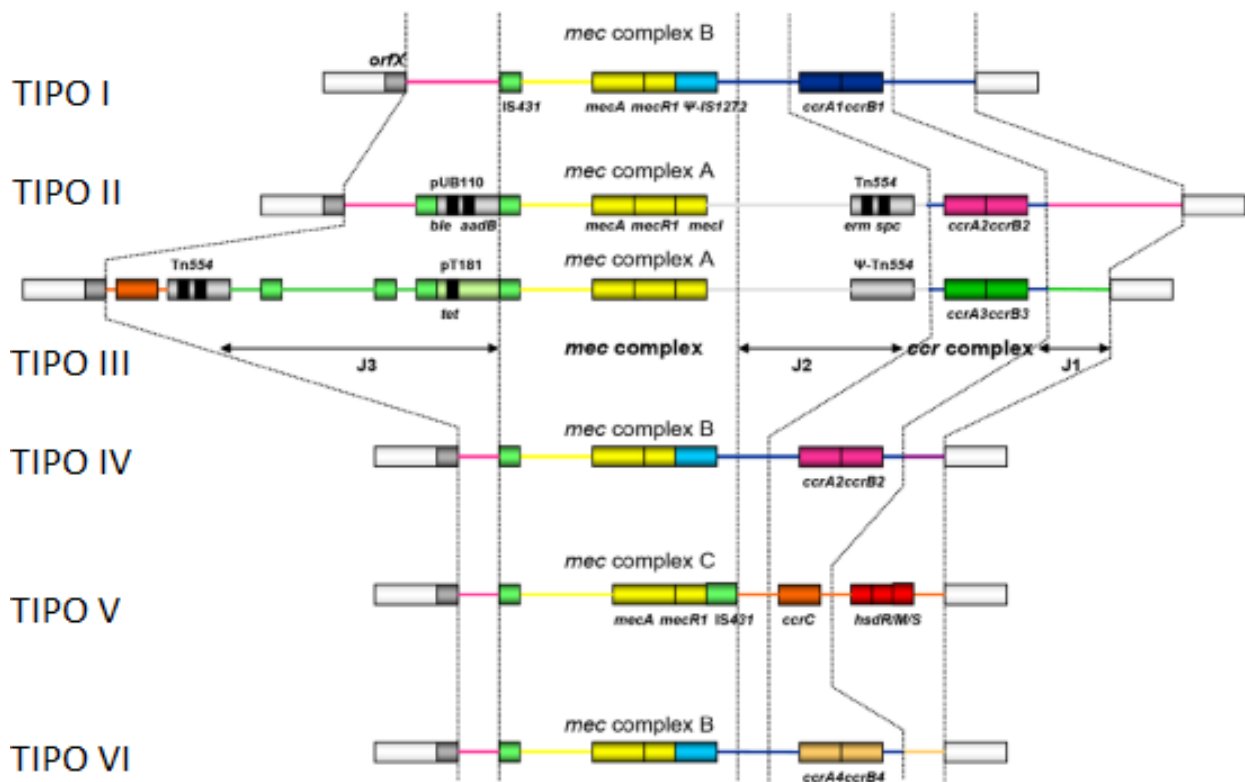


FIGURA 4. Organización genética del Cassette en el cromosoma *mec* de *Staphylococcus aureus* (*SSCmec*). (Fuente: De Lencastre, Oliveira et al. 2007).

1.3 MULTIRESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.

La presión de los antibióticos ha favorecido la evolución genética de *S. aureus*, con la consecuente aparición de cepas con diferentes determinantes de virulencia y patrones variables de susceptibilidad.

La resistencia a la Meticilina incluye resistencia a derivados de β -Lactámicos, pero en general, poseen resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos y se describen cepas de MRSA con sensibilidad sólo a glucopéptidos, siendo la vancomicina el antibiótico de elección, aunque ya son reportados casos de resistencia (Figura 5) (Londoño JF, Ortiz GM et al. 2008, Thati, Shivannavar et al. 2011).

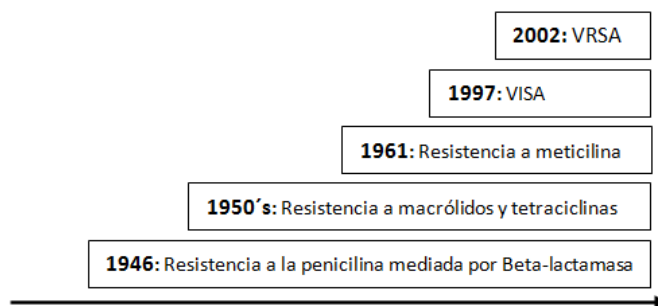


FIGURA 5. Evolución de la resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus aureus*. (Abreviaturas: MRSA: *S. aureus* meticilino resistente, VISA: *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina y VRSA *S. aureus* con resistencia total a vancomicina) (Fuente: Rodríguez CA, 2005).

Su gran potencial de adquirir elementos exógenos por transferencia horizontal, tanto dentro de la especie como con otras especies, le permite ser un patógeno exitoso, mediante la adquisición de factores de resistencia a antibióticos codificados por plásmidos, secuencias de inserción y transposones (Baba, Takeuchi et al. 2002, de Lencastre, Oliveira et al. 2007).

El *Cassette en el cromosoma mec de Staphylococcus aureus (SCCmec)*, esta flanqueado por elementos o secuencias de inserción de secuencia similar. Estos elementos de inserción parecen ser adquiridos mediante transferencia genética horizontal, con determinantes genéticos de resistencia a fármacos no relacionados y que llevan a una resistencia múltiple (Tabla 2) (Gil 2000, Gerald, John et al. 2002).

TABLA 2. Elementos, secuencias de inserción y genes que proveen la Resistencia de *Staphylococcus aureus*.

ELEMENTOS	RESISTENCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i>
Gen <i>blaZ</i>	Producción de penicilinasas.
IS431	Resistencia a Cadmio, Mercurio y Tetraciclina.
IS257	Resistencia a Amikacina, Kanamicina, Tobramicina y Neomicina.
Tn 554	Contiene <i>erm A</i> , que provee la resistencia a Eritromicina.
Tn 1546	Contiene genes <i>van</i> , que proveen resistencia a vancomicina.
Tn 4001	Contiene genes que codifican para enzimas, AAC(6') y APH(2''), que inactivan a la Gentamicina, Tobramicina y kanamicina.
Tn 5405	Contiene el gen que codifica a la enzima APH(3')-III, responsable de la resistencia a la Neomicina y Kanamicina.
SCC <i>MSSA 476</i>	Resistencia a ácido fusídico.
SCC <i>cap 1</i>	Secuencias para biosíntesis capsular.
SCC <i>CI</i>	Secuencias para la protección del ADN por sistemas de modificación- restricción.
<i>ACME</i> (Arginine Catabolic Mobile Element)	Catabolismo de la Arginina.
Mutaciones en <i>GyrA</i> , <i>GyrB</i>	Estos genes codifican las subunidades A y B de la ADN girasa, cuando existen mutaciones provocan resistencia a Fluoroquinolonas.
Mutaciones en <i>GrlA</i> , <i>GrlB</i>	Genes responsables de codificar las subunidades A y B de la Topoisomerasa IV, en presencia de mutaciones provocan resistencia a Fluoroquinolonas.
Gen <i>mecA</i>	Codifica a una proteína ligadora de penicilina transpeptidasa PBP 2a, que posee baja afinidad y por consiguiente, resistencia a prácticamente todos los antibióticos betalactámicos.
Genes <i>msr (msrA y mrsB)</i>	Confieren resistencia a Macrólidos y Estreptograminas B. Sin embargo, el <i>mrsA</i> también es responsable de la resistencia a Estreptograminas A.
SCC <i>mer</i>	Resistencia a mercurio

1.4 MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A METICILINA

1.4.1 Difusión en disco de Oxacilina y Cefoxitina.

La detección de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) es potencialmente un problema usando la técnica de difusión en disco, debido a la expresión heterogénea de la resistencia a metilina en varias cepas y a que la resistencia depende de las condiciones de crecimiento (Sakoulas, Gold et al. 2001, Skov, Smyth et al. 2003).

La oxacilina ha sido el antibiótico recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para los test fenotípicos de la predicción de la resistencia a las penicilinas por su estabilidad y sensibilidad. Sin embargo, la Cefoxitina, una cefamicina, es un mayor potente inductor del sistema del gen *mecA*, ya que induce la producción de PBP2a y por tanto, los resultados reportados de la prueba de disco de difusión tienen mejor correlación con la presencia del gen *mecA*, que los resultados de la prueba de disco de difusión usando Oxacilina (Swenson and Tenover 2005).

Según las normas CLSI, para la técnica de difusión en disco, debe ser en ágar Mueller-Hinton, con una suspensión de colonias equivalente a 0,5 de McFarland e incubación de 24 horas. Para oxacilina, es sabido que la temperatura de incubación afecta los resultados, por tanto, como máximo la temperatura es de 35°C, se considera que *S. aureus* es sensible a la oxacilina cuando el halo de inhibición es mayor de 13 mm para un disco de oxacilina de 1 µg. Mientras que para cefoxitina se ha encontrado alta precisión a temperaturas de incubación de 35°C a 37°C, se considera que *S. aureus* es sensible a la cefoxitina cuando el halo de inhibición es mayor de 20 mm para un disco de oxacilina de 30 µg (Anand, Agrawal et al. 2009).

1.4.2 Prueba de dilución.

Bajo condiciones apropiadas, el 95% de las cepas resistentes son detectadas por el método de dilución. De acuerdo a las recomendaciones de la CLSI, debe usarse Ágar Mueller-Hinton suplementado con 2% de NaCl y un inóculo de 5×10^5 UFC/ml y 24 horas de incubación por 24 horas. La heterorresistencia de *Staphylococcus aureus*, han

también plantea problemas cuando se utiliza la técnica de la dilución las pruebas de sensibilidad (Chambers 1997).

1.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR es una reacción química que permite la amplificación de un gen o de un fragmento de ADN, con los objetivos de disponer de la cantidad suficiente para utilizarlo con fines diversos, o bien, para detectar cantidades de ADN diana en diversas muestras (Cabrera and Sanchez 2001).

Involucra ciclos de calor de la muestra para la desnaturalización, que es la separación de las dos cadenas sencillas que forman la doble cadena de ADN; hibridación de los cebadores o primers, se acoplan y se alinean al ADN diana en la secuencia específica; y elongación de los cebadores por una ADN polimerasa termoestable, copiando idénticamente la secuencia específica determinada. En teoría, cada ciclo de amplificación da el doble del número de moléculas diana del ADN (Fluit, Visser et al. 2001, Murray and Baron 2007).

Entre las modalidades de la PCR, se encuentran principalmente la PCR de punto final y la PCR en TIEMPO REAL. La diferencia entre ambas se debe a que la PCR en tiempo real, genera un amplicón que se puede observar conforme la amplificación progresa, lo que elimina el análisis post PCR; mientras que en la PCR de punto final, el producto generado no se detecta sino hasta que la amplificación se ha llevado a cabo y posteriormente el amplicón es visualizado en un gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio (Figura 6) (Biosystems).



FIGURA 6. A: PCR de Punto Final. **B:** PCR en Tiempo Real (Fuente: Applied Biosystems).

La adición de sondas permite que la reacción de la PCR en tiempo real, sea cuantitativa y emita una señal fluorescente por cada ciclo, es decir, la cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo es proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado (Fluit, Visser et al. 2001, Murray and Baron 2007).

Se distinguen en la cinética de amplificación tres fases (Figura 8):

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

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

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

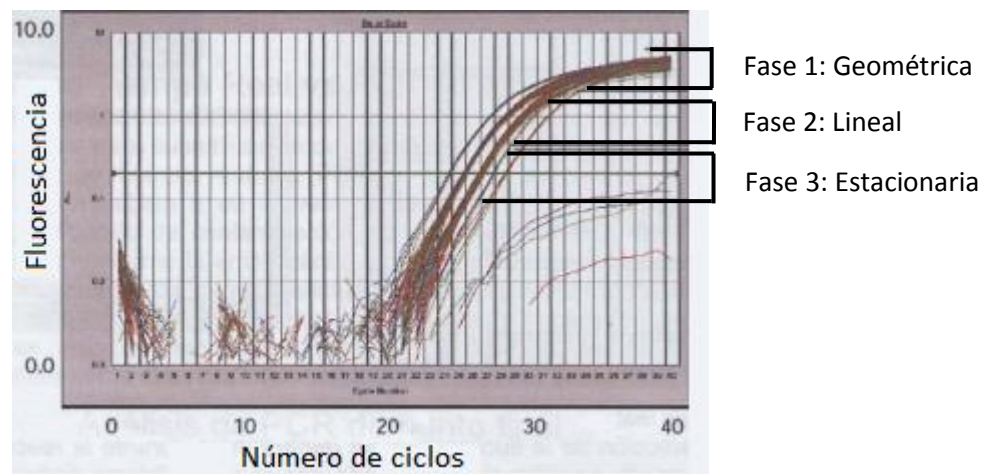


FIGURA 8. Fases de la Reacción de PCR (Fuente: Applied Biosystems).

Para efectuar los ensayos de cuantificación dentro de la fase geométrica es necesario definir un umbral de detección, en el cual todas las muestras puedan ser comparadas entre sí. Al ciclo en el cual cada muestra consigue, llegar a este umbral de detección, se le conoce como **Ct** (threshold cycle), el cual es un número que indica los ciclos que le tomo a cada muestra generar la cantidad suficiente de fluorescencia para ser detectada. A mayor cantidad de ADN que se encuentre en una muestra, menor número de ciclos requerirá para alcanzar el umbral de detección (Figura 9) (Murray and Baron 2007).

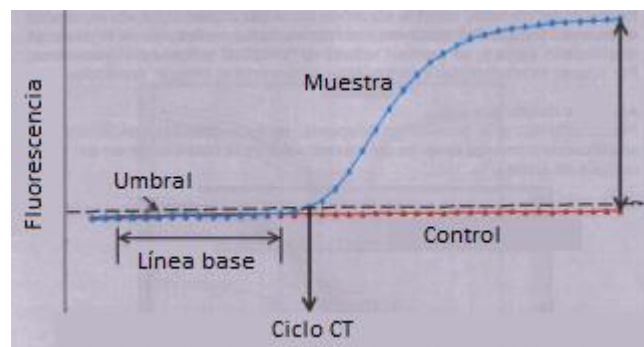


FIGURA 9. Características de una gráfica de amplificación en Tiempo Real (Fuente: Applied Biosystems).

La detección de los genes de resistencia a antibióticos por métodos de amplificación resultan ser los métodos de referencia, para el caso de *Staphylococcus aureus* la detección de gen *mecA* por PCR es el estándar de oro, pues es un método rápido y eficaz, que no está sujeto a condiciones de crecimiento de la cepa y que identificara siempre correctamente la existencia del gen. Sin embargo, no está disponible en la mayoría de laboratorios clínicos (Skov, Smyth et al. 2006, Datta, Gulati et al. 2011).

1.4.4 Otros métodos.

Una prueba rápida, sencilla, y barata, es la aglutinación en látex para la identificación de resistencia a la meticilina en *Staphylococcus aureus*, con la detección de la PBP 2a (Qian, Venkataraman et al. 2010).

Debido al alto costo que implican los métodos de una PCR, se han creado alternativas como la de un ágar cromogénico, selectivo, diferencial y rápido; debido a la resistencia a

antibióticos en el ágar, las colonias de MRSA crecen y producen cambios de distinto color causados por la ruptura del sustrato cromogénico por una enzima específica de *Staphylococcus aureus* (Figura 10) (Malhotra-Kumar, Abrahantes et al. 2010).



FIGURA 10. Ágar cromogénico (Fuente: Malhotra-Kumar S, 2010).

1.5 EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA

1.5.1 Sensibilidad

La sensibilidad se define como aquella capacidad de la prueba para clasificar correctamente al enfermo como enfermo, es decir, detectar a los individuos con la enfermedad que presentan un resultado positivo (verdaderos positivos). Indica qué tan buena es una prueba para identificar las personas enfermas (Sánchez 2002, Ruiz and Morillo 2004).

1.5.2 Especificidad

La especificidad se define como aquella capacidad de la prueba para clasificar correctamente al sujeto sano como sano, es decir, catalogar a los individuos sin la enfermedad que presentan un resultado negativo (verdaderos negativos). Indica en qué medida es buena la prueba para identificar a los individuos sanos (Sánchez 2002, Ruiz and Morillo 2004).

1.5.3 Valores Predictivos

El valor predictivo positivo indica la proporción de individuos enfermos que son identificados como positivos por la prueba diagnóstica, y el valor predictivo negativo indica cuál es la proporción de individuos sanos que la prueba identifica como tales (Sánchez 2002, Ruiz and Morillo 2004).

		Condición de interés	
		Positivo	Negativo
Resultado de la prueba	Positivo	a	b
	Negativo	c	d

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + c}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{b + d}$$

$$\text{VPP} = \frac{a}{a + b}$$

$$\text{VPN} = \frac{d}{c + d}$$

FIGURA 11. Evaluación de la Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos mediante tabla tetracórica (Fuente: Ruiz MA, 2004).

ANTECEDENTES

TABLA 3. Aportaciones de estudios de investigación acerca de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y su identificación.

Referencia	ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN
Sakoulas et al, 2001	La prueba MRSA-Screen de aglutinación en látex para la detección de PBP 2a, es superior a cualquiera de las pruebas de susceptibilidad basadas en fenotipo (sensibilidad a Oxacilina, sistemas VITEK-1 y VITEK-2), con una exactitud de 100% y una especificidad de 99.1%. Además de que se aproxima a la exactitud de la PCR (Sakoulas, Gold et al. 2001).
Boyce et al, 2008	La PCR en tiempo Real de BD GeneOhm MRSA tuvo una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, y negativo de 100%, 98.6%, 95.8% y 100%, respectivamente; en comparación con ensayo CHROMagar MRSA. La media de PCR en tiempo de respuesta fue del 14.5 horas (Boyce and Havill 2008).
Rossney AS et al, 2008	La evaluación del ensayo Xpert MRSA, determinó el promedio de Límite de detección (LoD) de MRSA que fue de 610 UFC/ml (58 UFC/hisopado). Se comprobó la habilidad de detectar aislamientos de MRSA de una colección de MRSA de Irlanda desde 1974; así como, la habilidad para detectar cepas control con tipos de SCCmec IV, V y VI. Además de analizar el rendimiento en la identificación de muestras directas y de cultivos enriquecidos, obteniendo una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de 90%, 97%, 86% y 98%, respectivamente (Rossney, Herra et al. 2008).
Batista DN et al, 2008	El método de difusión en disco de Cefoxitina de 30 μ es eficiente para la detección de resistencia a meticilina y permite una clara definición de aquellos aislamientos de <i>S. aureus</i> , incluidos aquellos con características poco frecuentes de resistencia (Batista, Gutierrez et al. 2008).
Wolk DM et al, 2009	El uso de caldo de enriquecimiento seguido de subcultivo en MS ofrece un método de bajo costo y sensible para la detección de MRSA, con un rendimiento similar a la de Xpert MRSA PCR (Wolk, Marx et al. 2009).
Parta M et al, 2009	La comparación de la PCR de Xpert MRSA que identifica MSSA y MRSA con las técnicas microbiológicas estándares en muestras de hemocultivos y de secreción de herida., evaluaron que la tecnología de PCR tiene alta sensibilidad y especificidad para la identificación de MRSA y MSSA (Parta, Goebel et al. 2009).

Referencia	ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN
Wolk DM et al, 2009	La sensibilidad de Xpert MRSA/SA Skin y Soft Tissue and Blood Culture, fue de 97.1% y 98.3% para MRSA en muestras de heridas y hemocultivos, respectivamente. La sensibilidad fue de 100% para <i>S. aureus</i> en ambos tipos de muestra (Wolk, Struelens et al. 2009).
Wolk DM et al , 2009	El ensayo Xpert MRSA es simple, rápido y preciso para la vigilancia de MRSA en una variedad de poblaciones(Wolk, Picton et al. 2009).
Kato A et al, 2011	Un nuevo complejo anti-MRSA antibiótico, WAP-8294A II, fue aislado a partir del caldo de fermentación de <i>Lysobacter</i> sp (Kato, Hirata et al. 2011).

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El sistema GeneXpert Dx automatiza e integra la purificación de muestras, la amplificación de los ácidos nucleicos y la detección de la secuencia diana en muestras sencillas o complejas mediante ensayos PCR en tiempo real. El sistema consta de un instrumento, un ordenador personal con un software previamente instalado para la realización de pruebas y la visualización de los resultados y de un escáner de código de barras (Cepheid , Rossney, Herra et al. 2008).

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

CÁMARAS DE PROCESO	Mantienen las muestras, reactivos, muestras procesadas, soluciones de desecho.
TUBO DE REACCIÓN	Permite ciclo térmico rápido, excitación óptica y detección de los contenidos del tubo.
CUERPO DE LA VÁLVULA	Gira y permite el movimiento a diferentes cámaras y al tubo de reacción. La muestra es aislada y lisada ultrasónicamente; para su mezcla con los reactivos y ser movida al tubo de reacción.

Se inserta la muestra y los reactivos dentro del cartucho y entonces el cartucho se carga en uno de los módulos disponibles del instrumento. El sistema GeneXpert realiza una PCR en tiempo real, donde el ADN de muestras es extraído, amplificado y detectado en cámaras separadas de cartuchos desechables de un solo uso y cerrados, lo cual elimina el riesgo de contaminación cruzada entre muestras (Rossney, Herra et al. 2008, Baron 2010).

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

1. Reactivos líquidos en el cartucho.
2. Adicionar suspensión de muestra.
3. Los microorganismos son mezclados en el filtro.

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

Para la identificación de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina son distintos los ensayos, dependiendo de la muestra que se haya sido recolectada. El ensayo Xpert MRSA, cuya muestra se toma con hisopados nasales, incluye reactivos para la detección del MRSA., los iniciadores y las sondas en el ensayo Xpert MRSA detectan una secuencia propietaria para analizar la presencia de un casete insertado en el cromosoma del *Staphylococcus aureus* (Cepheid 2007). Mientras que, el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI, que es para muestras de tejido blando o bien secreciones de heridas postquirúrgicas, incluye reactivos para la detección del MRSA y el SA. Los iniciadores y sondas del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI detectan secuencias exclusivas de la proteína A del estafilococo (*spa*), el gen resistente a la meticilina (*mecA*), y el cromosoma con casete de estafilococo (*SCCmec*) insertado en el sitio cromosómico (*attB*) del SA (Cepheid 2009).

Cada cartucho de ambos ensayos, incluyen también Controles de calidad, que son:

- Control de procesamiento de muestra (SPC, siglas en inglés). Garantiza el procesamiento adecuado, ya que contiene esporas de *Bacillus globigii* en forma de "pastel" de spora seca. El SPC comprueba si se ha producido la lisis del microorganismo, en caso de su existencia en la muestra. Además de supervisar la presencia de inhibidores en la PCR y asegurar que las condiciones de la reacción de PCR (temperatura y tiempo) sean las adecuadas para la reacción de amplificación y que los reactivos PCR sean funcionales.
- Control de comprobación de sonda (PCC). Antes de iniciar la reacción en cadena de la polimerasa, el sistema GeneXpert mide la señal de fluorescencia de las sondas para controlar la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de PCR en el cartucho, la integridad de la sonda y la estabilidad del fluorocromo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* metilino resistente (MRSA) ha ido en aumento en las últimas dos décadas, siendo el principal microorganismo patógeno nosocomial y oportunista en hospitales de muchos países, repercutiendo en altas tasas de morbilidad y mortalidad.

Además de que MRSA posee una especular capacidad de adaptación, asociada a la resistencia a tratamientos empíricos empleados por los tratantes de dichas infecciones. La descripción de estas cepas multiresistentes, conducen a la necesidad de detectar y controlar este tipo de aislamientos.

JUSTIFICACIÓN

Se demuestra que el gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* es determinante para la resistencia a antibióticos β -lactámicos y que el cassette que lo incluye en el cromosoma, posee gran número de determinantes de resistencia antimicrobiana. Hoy en día *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) es aislado con frecuencia en numerosas muestras de pacientes como lo son Líquido de diálisis, heridas quirúrgicas y hemocultivos, por mencionar algunas.

La aplicación de técnicas moleculares ha sido un importante avance en la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas y genes de resistencia a antibióticos. El ensayo en el sistema GeneXpert, utiliza una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para la identificación rápida de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), mediante la detección del gen *mecA*.

Al realizar una detección temprana y precisa de MRSA en muestras de pacientes, es posible enfocar la terapia y evitar una infección invasiva en aquellos individuos sanos portadores de MRSA. Además de que el aumento de resistencia a antibióticos dificulta el tratamiento y control a nivel mundial de este microorganismo, por esta razón resulta interesante estudiar la resistencia de MRSA de muestras de pacientes incluidos en este estudio.

Por lo tanto, la elaboración de esta tesis comprende demostrar la utilidad de identificar el gen *mecA* de MRSA, lo que puede ayudar a dirigir la terapia con antibióticos y a evitar infección invasiva en pacientes portadores.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

- Identificar el gen *mecA* por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real empleando el equipo: GeneXpert Cepheid.
- Estudiar la resistencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA).

Objetivos Específicos

- Identificar el gen *mecA* del ADN de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (MRSA), utilizando Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
- Estudiar la resistencia asociada a otros grupos antibióticos diferentes a los antibióticos β -lactámicos (Quinolonas, Eritromicina, Tetraciclina, Sulfametoxazol) de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes.
- Comprobar la sensibilidad y especificidad del método in vitro, Prueba Xpert MRSA de GeneXpert Cepheid, para el diagnóstico de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.
- Realizar un ensayo de Límite de Detección para el kit Xpert MRSA en el equipo GeneXpert.

HIPOTESIS

En este estudio se encontrará el 98% de aislamientos de *Staphylococcus aureus* con presencia del gen *mecA*

El ensayo de PCR en el equipo GenXpert Cepheid, tendrá una sensibilidad del 86.3% y una especificidad del 94.9%.

El *Staphylococcus aureus* metilino resistente se asociará a la resistencia frente a antibióticos β -lactámicos y a otros grupos de antibióticos, con la posibilidad de que existirá una relación entre la presencia/expresión del gen *mecA* y la susceptibilidad microbiana a antibióticos del MRSA.

CAPITULO II

Metodología

METODOLOGÍA

2.1 TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO

Estudio prospectivo, transversal, a realizarse en el laboratorio clínico, en el área de Biología Molecular del Centro Médico ISSEMyM (Hospital de tercer nivel). Número de muestras para procesar, tamaño de muestra por conveniencia 50 – 100.

2.1.1 Criterios de exclusión e inclusión.

Criterios de inclusión

- ❖ Cultivos positivos para *Staphylococcus aureus*, recolectados de muestras de pacientes de Centro Médico ISSEMyM.
- ❖ Hisopados nasales de individuos con riesgo de colonización nasal, con cirugía programada.

Criterios de exclusión

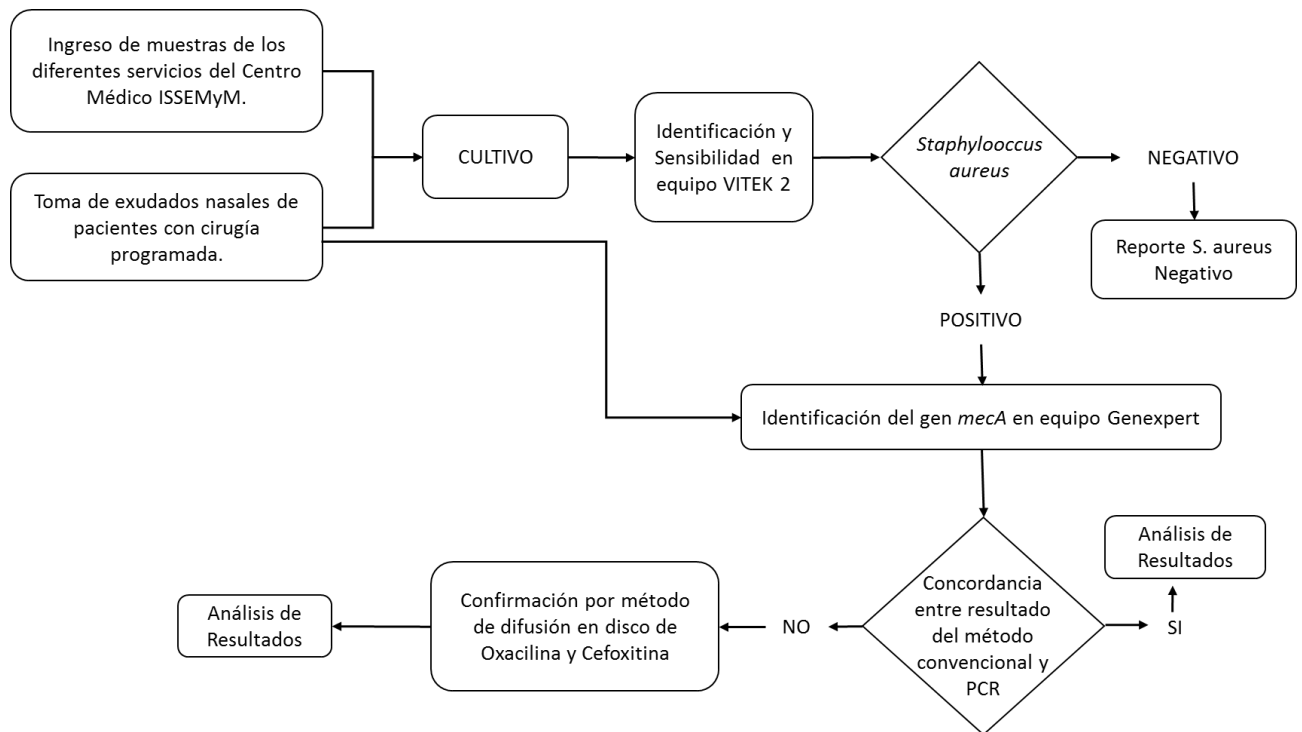
- ❖ Pacientes politratados.

2.1.2 Variables

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN
Gen <i>mecA</i>	Gen determinante de la resistencia que agrupa a todos los betalactámicos, codifica a una proteína ligadora de penicilina transpeptidasa PBP 2a.	Dependiente	Presencia Ausencia	Cualitativa, Nominal
Sensibilidad de una prueba diagnóstica	Capacidad de la prueba para clasificar a los individuos con la enfermedad que presentan un resultado positivo.	Dependiente	%	Cuantitativa, Continua

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN
Especificidad de una prueba diagnóstico	Capacidad de la prueba para clasificar a los individuos sin la enfermedad que presentan un resultado negativo.	Dependiente	%	Cuantitativa, Continua
Multirresistencia a antibióticos	Consecuencia del uso de los antibióticos, surge por mutación del microorganismo o adquisición de genes de resistencia.	Independiente	Resistente Sensible	Cualitativa, Nominal

2.2 DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL



2.3 MATERIAL Y MÉTODOS

2.3.1 Identificación de *Staphylococcus aureus* de muestras de pacientes.

El proceso para esta identificación, se realizó en el área de Bacteriología del laboratorio de Centro Médico ISSEMyM.

1. Ingreso de muestras de pacientes de los diferentes servicios de Centro Médico ISSEMyM.
2. Cultivo en los medios de enriquecimiento y selectivos: Ágar sangre, Chocolate, Sal y Manitol, Mc Conkey, Biggy y CHROMagar Orientador.
3. Identificación y pruebas de sensibilidad en el equipo VITEK 2 (BIOMÉRIEUX).
4. Imprimir reporte de antibiograma y genotipo.

2.3.2 Toma y transporte de muestras de hisopado nasal.

Para obtener una muestra adecuada, seguir las indicaciones siguientes:

1. Abra el dispositivo de recogida de muestras de Cepheid retirando el embalaje exterior (Figura 12).



FIGURA 12. Dispositivo de recogida de muestras de Cepheid. (Fuente: LEGACY, MRSA PCR Specimen Collection Guide).

2. Inserte los hisopos secos aproximadamente 1 – 2 cm en cada fosa nasal (Figura 13).
3. Gire los hisopos contra el interior de la fosa nasal durante 3 segundos. Aplique una ligera presión con el dedo en el exterior de la nariz para ayudar a garantizar un buen contacto entre el hisopo y el interior de la nariz (Figura 13).
4. Usando los mismos hisopos, repita la operación con la otra fosa nasal, intentando no entrar en contacto con nada que no sea el interior de la fosa nasal (Figura 13).



FIGURA 13. Toma de muestra. (Fuente: LEGACY, MRSA PCR Specimen Collection Guide).

5. Retire el tubo de transporte de plástico. Quite el tapón del tubo y deséchelo. Coloque los hisopos en el tubo de transporte de plástico (Figura 14).



FIGURA 14. Tubo de transporte (Fuente: LEGACY, MRSA PCR Specimen Collection Guide).

6. Etiquete el tubo de transporte de plástico con el número de identificación del paciente y envíelo al laboratorio.
7. Mantenga la muestra del hisopo a temperatura ambiente (15 – 30 °C) si va a procesarse en las 24 horas siguientes; en caso contrario, mantenga el hisopo a una temperatura de 2 – 8 °C. La muestra del hisopo permanecerá estable hasta 5 días si se almacena a una temperatura de 2 – 8 °C.

2.3.3 Identificación del gen *mecA* por Reacción en cadena de la polimerasa en Tiempo real.

El proceso para esta identificación, se realizó en el área de Biología Molecular del laboratorio de Centro Médico ISSEMyM.



FIGURA 15. Proceso identificación del gen *mecA* por PCR.

PREPARACIÓN DEL CARTUCHO: Adición de muestra y reactivos.

1. Saque el cartucho y los reactivos del envase.
2. Tomar muestra del cultivo positivo para *Staphylococcus aureus* con un hisopo. O bien, sacar el hisopo del recipiente de transporte, para el caso de los exudados nasales de los pacientes con cirugía programada.
3. Inserte el hisopo en el tubo que contiene el reactivo de dilución (tapón negro).
4. Sujete el hisopo cerca del borde del tubo y presione para romperlo.
5. Cierre el tapón y agite con el vortex a alta velocidad durante 10 segundos.
6. Abra la tapa del cartucho. Utilice una pipeta de transferencia estéril y transfiera todo el contenido del reactivo de dilución (tapón negro) al compartimento "S" del cartucho GeneXpert® (Figura 16).
7. Añada el reactivo 1 al compartimento 1 del cartucho. Apriete la ampolla hasta vaciar todo el contenido en el cartucho (Figura 16).
8. Añada el reactivo 2 al compartimento 2 del cartucho. Apriete la ampolla hasta vaciar todo el contenido en el cartucho (Figura 16).
9. Cierre la tapa del cartucho.

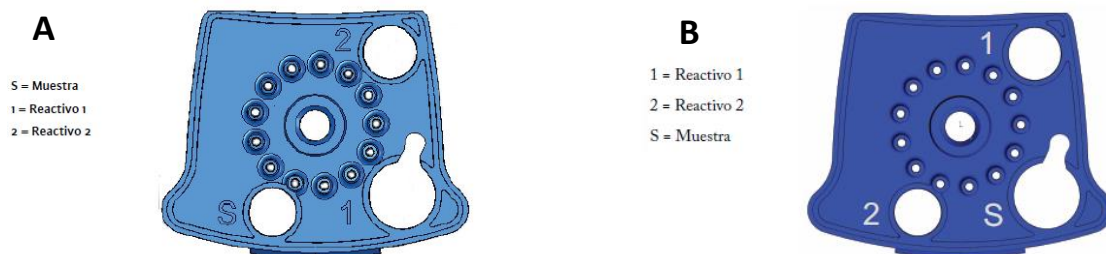


FIGURA 16. A: Vista superior del Cartucho Xpert MRSA, **B:** Vista superior del Cartucho del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI (Fuente: Cepheid, Xpert MRSA: Instruction manual).

INICIO DE LA PRUEBA: Uso del software e introducción del cartucho al instrumento.

1. Encienda el equipo y el instrumento GeneXpert® Dx.
2. Haga clic en el icono de acceso directo a GeneXpert® Dx e inicie sesión.
3. En la ventana del sistema GeneXpert® Dx, haga clic en Crear prueba. Aparece el cuadro de diálogo de Escanear código de barras de cartucho.

4. Escanee el código de barras del cartucho Xpert MRSA y el software rellenará automáticamente los cuadros de los siguientes campos: Ensayo, Lote del reactivo y Fecha de caducidad.
5. En el cuadro ID de la muestra, escanee o escriba el código correspondiente (Figura 17).

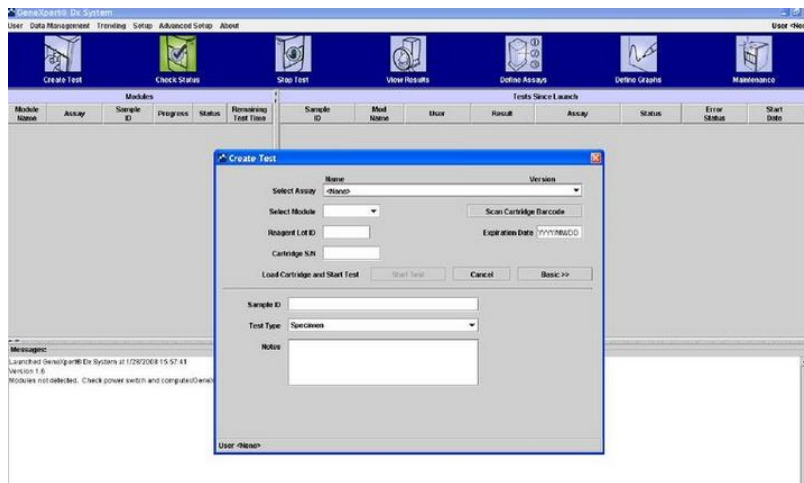


FIGURA 17. Cuadro de diálogo Escanear código de barras de cartucho (Cepheid, Manual del operador del sistema GeneXpert® Dx).

6. Haga clic en Iniciar prueba.
7. Abra la puerta del módulo del instrumento que tenga la luz verde parpadeando y cargue el cartucho.
8. Cierre la puerta. La prueba se inicia y la luz verde deja de parpadear.
9. Espere hasta que el sistema desbloquee la puerta para abrir la puerta del módulo y retirar el cartucho.
10. Deseche los cartuchos usados en los contenedores de residuos de muestras apropiados de acuerdo con las prácticas estándar de su centro.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El sistema GeneXpert® Dx interpola los resultados a partir de las señales de fluorescencia medidas y los algoritmos de cálculo integrados y se mostrarán en la ventana View Results (Ver resultados), representados por una tabla y una gráfica (Tabla 4 y 5) (Figura 18 y 19).

TABLA 4. Interpretación de resultados de Xpert MRSA.

RESULTADOS Xpert MRSA		
	MRSA POSITIVO	MRSA NEGATIVO
MRSA (SCC)	Detección de secuencia diana de ADN (C _T).	NO detección de secuencia diana de ADN.
SPC	NA	PASS
Probe Check	PASS	PASS
	Presencia del gen <i>mecA</i>	

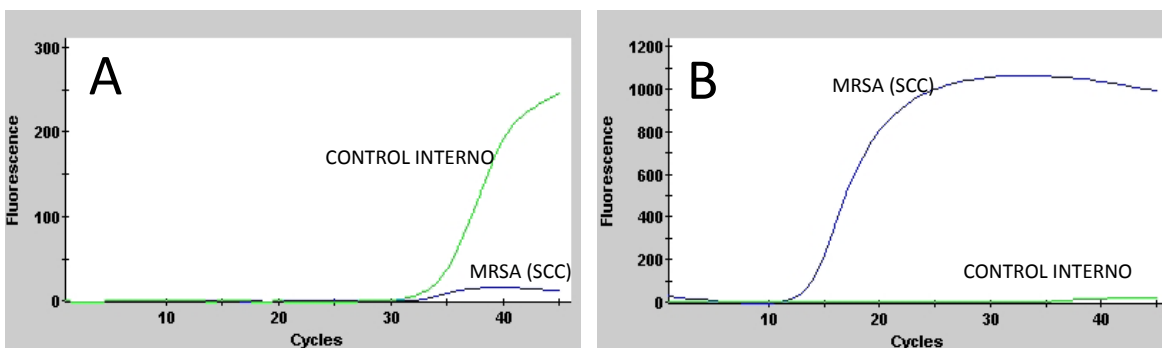


FIGURA 18. **A:** Ejemplo de resultado Negativo, **B:** Ejemplo de resultado Positivo de Xpert MRSA.

TABLA 5. Interpretación de resultados de Xpert MRSA/SA SSTI.

	RESULTADOS Xpert MRSA/SA SSTI		
	MRSA POSITIVE/SA POSITIVE	MRSA NEGATIVE/SA POSITIVE	MRSA NEGATIVE/SA NEGATIVE
SPA	Detección de secuencia diana de ADN (C _T).	Detección de secuencia diana de ADN (C _T).	NO detección de secuencia diana de ADN.
mecA, SCC	Detección de secuencia diana de ADN (C _T).	NO detección de secuencia diana de ADN.	NO detección de secuencia diana de ADN.
SPC	NA	NA	PASS
Probe Check	PASS	PASS	PASS
	Presencia del gen <i>mecA</i>		

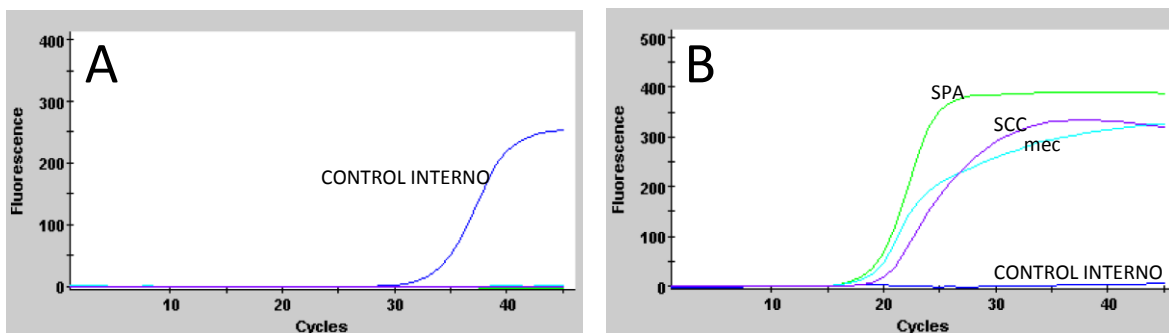


FIGURA 19. A: Ejemplo de resultado Negativo, B: Ejemplo de resultado Positivo de Xpert MRSA/SA SSTI.

2.3.4 Confirmación de resistencia a meticilina por el método de difusión en disco de Oxacilina y Cefoxitina.

La confirmación de resistencia a la meticilina, se realiza únicamente a los aislamientos cuya presencia del gen *mecA* no coincidiera con los resultados emitidos por el VITEK 2.

1. Efectuar una suspensión de colonias equivalente a 0,5 de McFarland.
2. En ágar Mueller-Hinton, con ayuda de un hisopo inocular la suspensión de bacterias sobre la superficie del medio.
3. Aplicar discos de Oxacilina y Cefoxitina, con ayuda de unos fórceps, en la superficie del ágar y presionar para asegurar el contacto. Cuidando la distancia entre los discos.
4. Incubar 24 horas a una temperatura de entre 35°C-37°C.
5. Interpretar las zonas de inhibición de acuerdo a los criterios de la CSLI:

<i>RESISTENCIA A OXACILINA (disco de 1μ)</i>	$\leq 13 \text{ mm}$
<i>RESISTENCIA A CEFOXITINA (disco de 30μ)</i>	$\leq 20 \text{ mm}$

2.3.5 Límite de detección

Se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, confirmada con la presencia del gen *mecA* en el equipo GeneXpert.

1. Realizar una suspensión bacteriana 0.5 McFarland (1.0 UFC/ml x 10⁸) de la cepa.
2. A partir de la suspensión efectuada, llevar a cabo las diluciones como se muestra en la siguiente tabla:

TABLA 6. Diluciones efectuadas para el ensayo de límite de detección.

Dilución	[UFC/ml x 10 ⁸]
1:1	1.0
1:2	0.75
1:4	0.375
1:8	0.1875
1:16	0.09375

3. Tomar 1 ml de cada dilución y verter en el reactivo diluyente del Kit Xpert MRSA en el equipo GeneXpert.
4. Investigar la presencia del gen *mecA*, de acuerdo las instrucciones del fabricante.

CAPITULO III

Resultados

CAPITULO III: RESULTADOS

En este estudio se recolectaron 67 muestras, 58 cultivos positivos para *Staphylococcus aureus* identificados mediante la tarjeta GP del equipo VITEK 2 (BIOMÉRIEUX) y 9 muestras tomadas directamente de pacientes internos, de las cuales 2 fueron heridas quirúrgicas y 7 hisopados nasales de pacientes pre-quirúrgicos.

Los 58 aislamientos, fueron estudiados para la identificación del gen *mecA* mediante PCR en tiempo real en el equipo GeneXpert de Cepheid, donde fueron encontrados 56/58 MRSA (gen *mecA* positivo) y 2/58 MSSA. Mientras que usando la tarjeta AST-GP67 del VITEK 2 para sensibilidad microbiana, se identificaron 51/56 MRSA y 7/2 MSSA, encontrando discrepancia de 5 aislamientos identificados como MSSA, pero que contienen el gen *mecA* (Tabla 7).

Cabe señalar que las 9 muestras tomadas directamente de pacientes internos y mencionadas anteriormente, se reportaron sin crecimiento de *S. aureus* y negativo para gen *mecA* por PCR.

TABLA 7. Genotipo y fenotipo de los aislamientos de *S. aureus*.

Identificación por PCR <i>mecA</i>	Núm. de aislamientos	VITEK 2			
		CEFOXITINA		OXACILINA	
		Positivo	Negativo	≤ 2	≥ 4
POSITIVO	56	51	5	51	5
NEGATIVO	2	0	2	0	2

En relación a la discrepancia existente en los 5 aislamientos identificados como MSSA por el VITEK 2, pero que contienen el gen *mecA*, se decide realizar una confirmación por el método de difusión en disco de oxacilina y cefoxitina. Los resultados se observan en la tabla 7, que fueron halos de inhibición mayores a 13 para Oxacilina y 19 para Cefoxitina (Tabla 8).

TABLA 8. Genotipo y fenotipo de los aislamientos de *S. aureus* que mostraron discrepancia entre resultados de PCR y VITEK 2.

Aislamiento	<i>mecA</i> por PCR	VITEK-2		Método de difusión en disco	
		Oxacilina MIC (µg/mL)	Cefoxitina	Oxacilina 1 µg	Cefoxitina 30 µg
2747	+	≤ 0.25 (S)	-	-	-
3114	+	≤ 0.25 (S)	-	-	-
1558	+	1 (S)	-	-	-
3364	+	0.5 (S)	-	-	-
3688	+	≤ 0.25 (S)	-	-	-

A partir de los datos obtenidos y utilizando el método convencional como referencia, se calcula la sensibilidad y especificidad del ensayo en el equipo GeneXpert con ayuda del programa estadístico SPSS, mediante la elaboración de una tabulación cruzada. La Tecnología del equipo GeneXpert para la identificación del gen *mecA* de MRSA presenta una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de 100.0%, 68.8%, 100.0% y 28.57%, respectivamente (Tabla 9 y 10) (Figura 20).

TABLA 9. Resultados obtenidos para identificación de MRSA por PCR y por método convencional en el VITEK 2.

VITEK*GENEXPERT tabulación cruzada

		GENEXPERT		Total	
		NEGATIVO	POSITIVO		
VITEK 2	POSITIVO	Recuento	0	51	51
		% dentro de VITEK	0.0%	100.0%	100.0%
	NEGATIVO	Recuento	11	5	16
		% dentro de VITEK	68.8%	31.3%	100.0%
Total		Recuento	11	56	67
		% dentro de VITEK	16.4%	83.6%	100.0%

TABLA 10. Sensibilidad, Especificidad y algunos Valores predictivos de la PCR en tiempo real en equipo GeneXpert.

Identificación por PCR	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)	VPP (%)	VPN (%)
MRSA	100.00 (51/51)	68.8 (11/16)	91.1 (51/56)	100.0 (11/11)

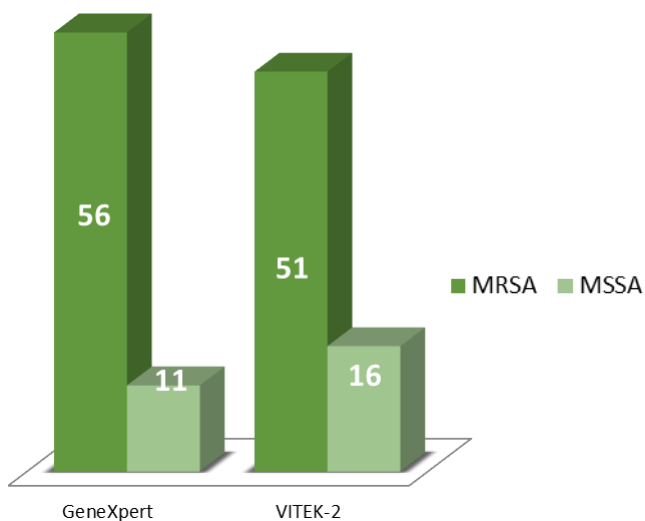


FIGURA 20. Identificación de *MRSA* por PCR en el equipo GeneXpert y por método convencional en el Vitek-2.

El tiempo de análisis para la identificación de *MRSA* por el método convencional (VITEK 2) y por PCR (GeneXpert) presentan medias de 8.59 hr y 1.18 hr respectivamente. Los datos se estudian en el programa estadístico SPSS 21, donde se comprueba que existe una diferencia significativa entre los tiempos promedio, con un 95% de confianza (Tabla 11 y 12).

TABLA 11. Tiempo de análisis para la identificación de *MRSA* por el método convencional (VITEK-2) y por PCR (GeneXpert).

		Estadísticas de grupo			
METODOS		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
TIEMPO (hr)	GENEXPERT	58	1.1828	.20246	.02658
	VITEK 2	21	8.5952	1.14694	.25028

TABLA 12. Resultados de la prueba T para comparación de medias del tiempo de análisis.

		Prueba de muestras independientes						
		prueba t para la igualdad de medias						
		t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
							Inferior	Superior
TIEMPO	Se asumen varianzas iguales	-47.719	77	.000	-7.41248	.15534	-7.72180	-7.10316
	No se asumen varianzas iguales	-29.451	20.453	.000	-7.41248	.25169	-7.93675	-6.88821

Ho: No existe diferencia significativa entre medias
Se rechaza Ho $p=0.00 \leq 0.05$

H₁: Existe una diferencia significativa entre medias.

Como parte de la evaluación del equipo GeneXpert, se realiza un ensayo de límite de detección, a partir de una suspensión 0.5 McFarland de MRSA se obtuvieron datos de amplificación favorables que se pueden observar en la gráficas de la figura 21. La cuarta dilución correspondiente a la concentración de 9.375×10^6 UFC/ml, es detectada por el equipo sin presentar interferencias, con un CT de 21.2 como se muestra en la Tabla 13.

TABLA 13. Datos para el ensayo de límite de detección del sistema GeneXpert para la identificación de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

[UFC/ml x 10 ⁸]	Ln(UFC/ml)	C _T
1.0	18.4206807	16.1
0.75	18.1329987	16.3
0.375	17.4398515	18.2
0.1875	16.7467043	18.9
0.09375	16.0535571	21.2

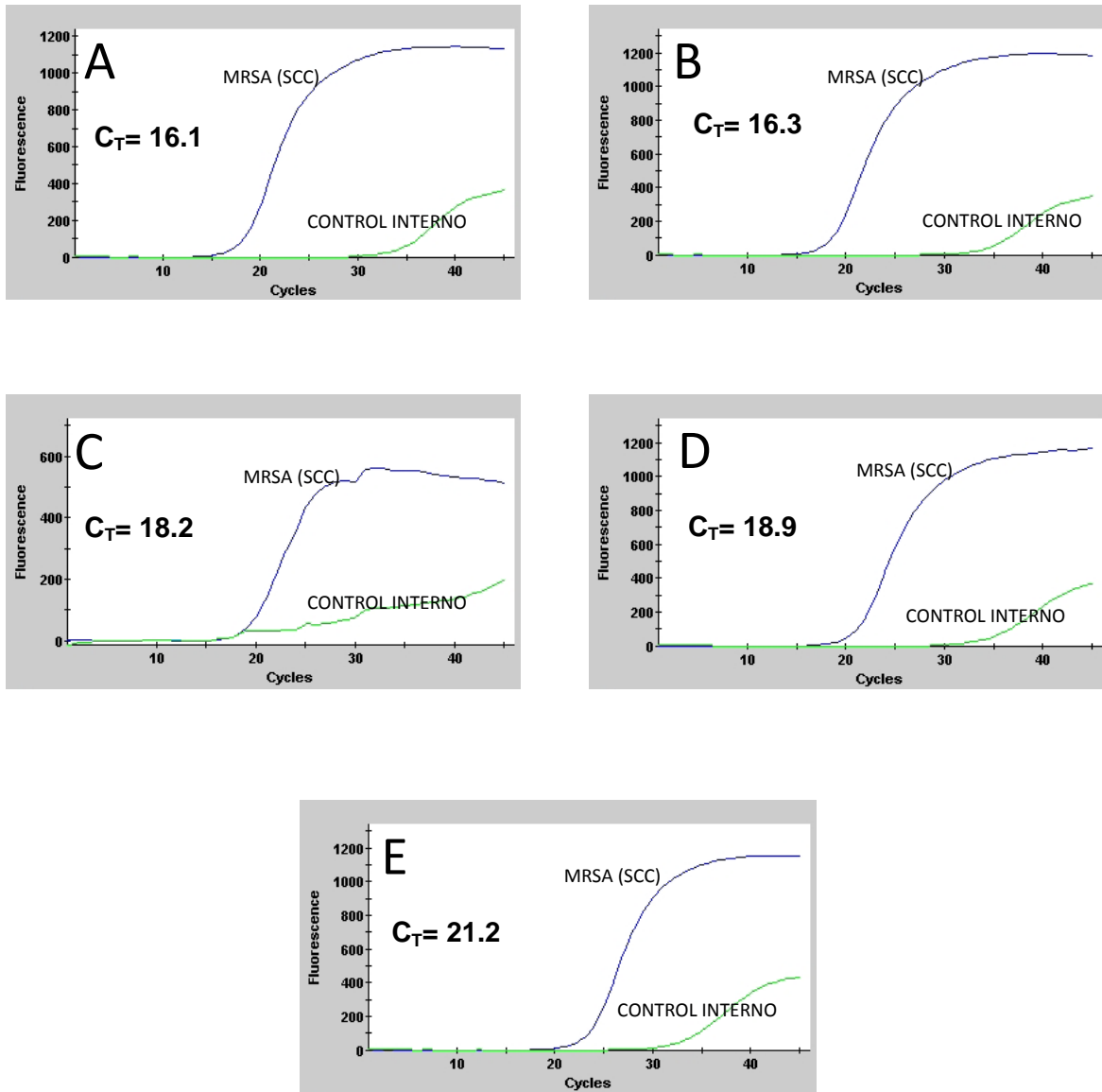


FIGURA 21. Datos de Amplificación obtenidos con el Kit Xpert MRSA en los ensayos de LoD. **A:** $[1.0 \text{ UFC/ml} \times 10^8]$, **B:** $[0.75 \text{ UFC/ml} \times 10^8]$, **C:** $[0.375 \text{ UFC/ml} \times 10^8]$, **D:** $[0.1875 \text{ UFC/ml} \times 10^8]$, **E:** $[0.09375 \text{ UFC/ml} \times 10^8]$.

Existe una relación importante entre la concentración de bacterias y el CT que presenta cada dilución, las curvas de amplificación muestran un aumento exponencial de la emisión de fluorescencia (Figura 22 y 23).

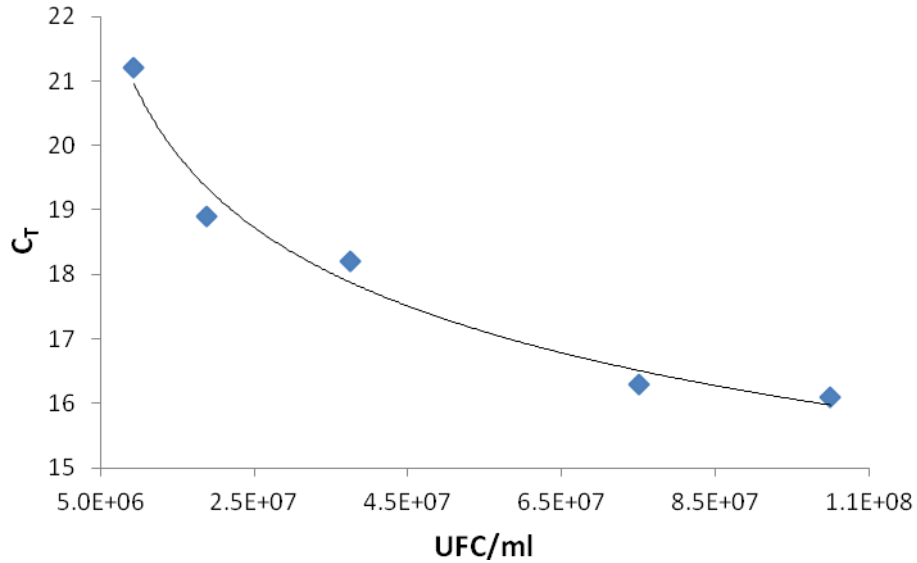


FIGURA 22. Evaluación del equipo GeneXpert para la identificación de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (Ct vs UFC/ml).

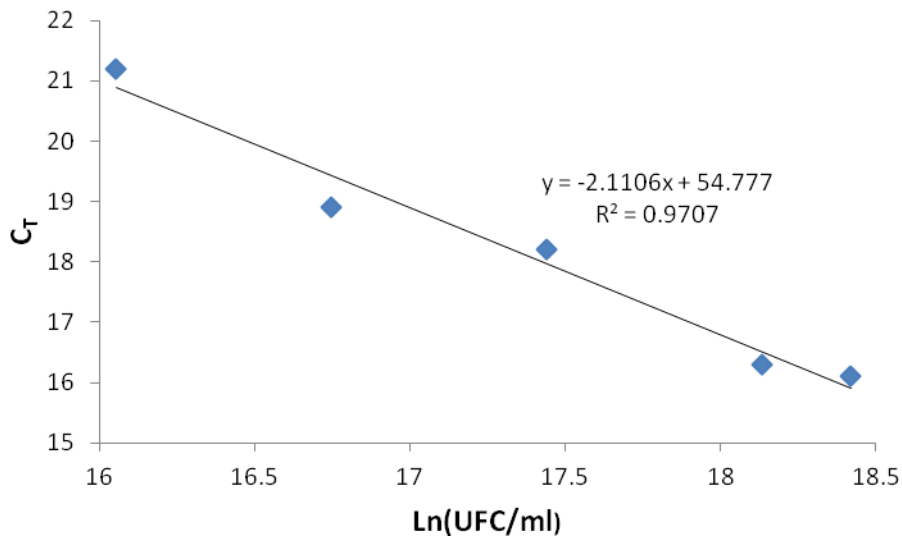


FIGURA 23. Evaluación del sistema GeneXpert para la identificación de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (Ct vs Ln UFC/ml).

De los 56 aislamientos de *Staphylococcus aureus* metilino resistente confirmados con la presencia del gen *mecA* por el equipo GenXpert, se observa que el 59% se obtuvo de muestras de pacientes de sexo masculino y el restante 41% de pacientes de sexo femenino (Figura 23).

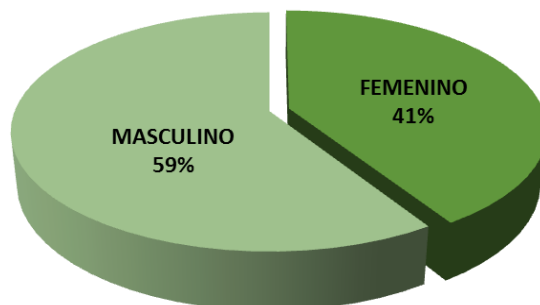


FIGURA 23. Clasificación por Género

Mientras que en la clasificación por servicio médico, el MRSA se aisló con mayor frecuencia en Cirugía General y Nefrología, con un 28.6% (16/56) para ambos servicios (Figura 24).

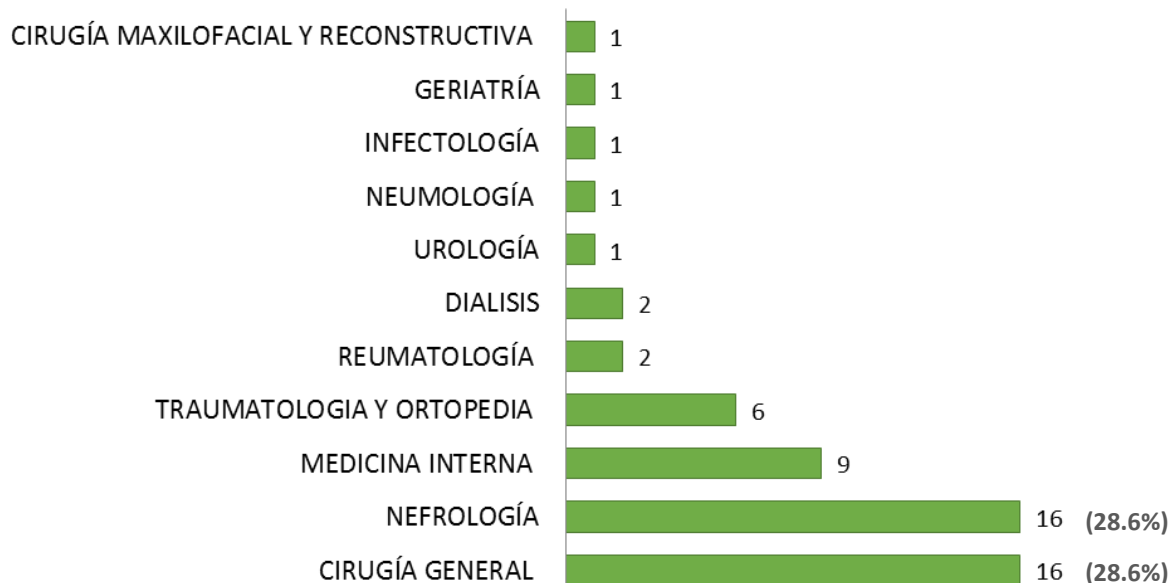


FIGURA 24. Clasificación por Servicio Médico.

Con respecto al tipo de muestras ingresadas en el laboratorio, el mayor porcentaje de aislamiento de MRSA en este estudio fue en heridas quirúrgicas con un porcentaje de 37.5% (21/56), seguido por hemocultivos con 14.3% (8/56) y líquido de diálisis con un 12.5% (7/56) (Figura 25).

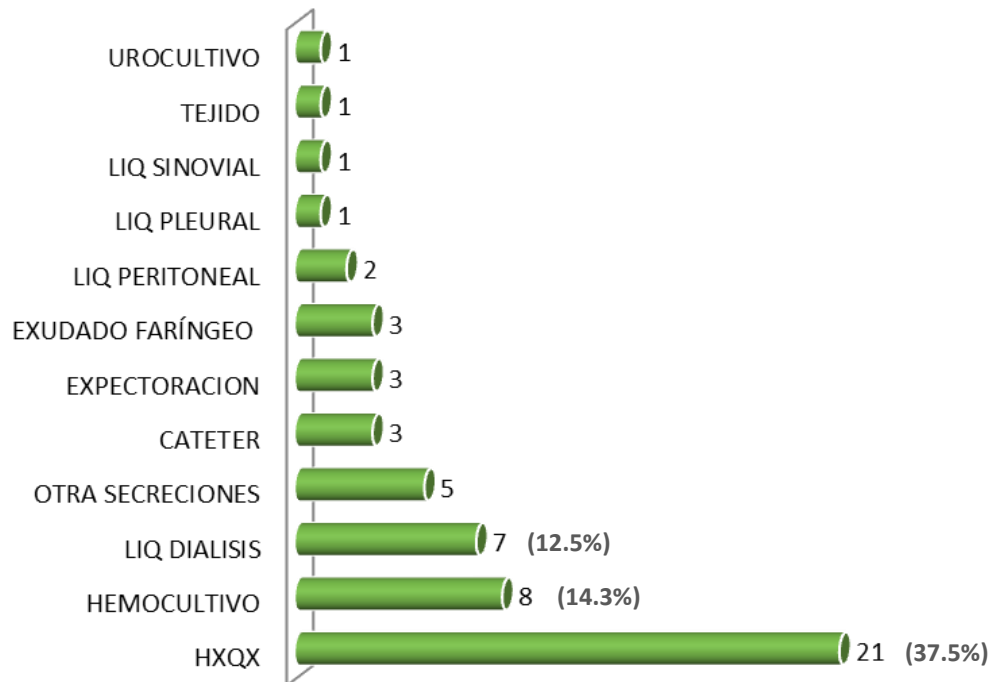


FIGURA 26. Clasificación por Tipo de Muestra.

Las características de resistencia de aislamientos de *Staphylococcus aureus* portadores y no portadores del gen *mecA*, frente a antibióticos betalactámicos y de otras familias se muestran en la tabla 14.

TABLA 14. Características fenotípicas de resistencia a antibióticos β-lactámicos y otros.

<i>mecA</i>	N	OX	FOX	BP	ANTIBIÓTICOS NO BETALACTÁMICOS													
					GM	CIP	LVX	MFX	ER	CD	QN	LIN	VAN	TE	TGC	NIT	RA	SXT
POSITIVO	56	51	51	51	2	52	49	11	52	52	0	0	0	0	0	0	7	0
NEGATIVO	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Abreviaturas de antibióticos: Betalactámicos (FOX: Cefoxitina, OX: Oxacilina y BP: Bencilpenicilina), Aminoglucósidos (GM: Gentamicina), Fluoroquinolonas (CIP: Ciprofloxacino, LVX: Levofloxacino y MFX: Moxifloxacino), Macrólidos (ER: Eritromicina), Lincomicina (CD: Clindamicina), Estreptogramina (QN: Quinupristina), Oxazolidinonas (LIN: Linezolid), Glucopeptidos (VA: Vancomicina), Tetraciclinas (TE: Tetraciclina), Gliciliclinas (TGC: Tigeciclina), Nitrofuranos (NIT: Nitrofurantoína), Rifamicinas (RA: Rifampicina) y SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol.

Los aislamientos de *Staphylococcus aureus* con ausencia del gen *mecA*, presentaron un porcentaje del 100% para Bencilpenicilina, fueron sensibles para el resto de antibióticos.

Mientras que los aislamientos de *Staphylococcus aureus* portadores del gen *mecA*, poseen un porcentaje de resistencia mayor al 50% para Cefoxitina, Oxacilina, Bencilpenicilina, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Moxifloxacino; Eritromicina y Clindamicina; para Gentamicina, Vancomicina, Nitrofurantoína y Rifampicina muestran un porcentaje menor al 25% de resistencia; siendo sensibles, para Quinupristina, Linezolid, Tetraciclina, Tigeciclina y Trimetoprim/Sulfametoxazol (Tabla 15) (Figura 27).

TABLA 15. Porcentajes de Resistencia de aislamientos de *Staphylococcus aureus*.

<i>mecA</i>	PORCENTAJES DE RESISTENCIA (%)		
	>50	<25	0
POSITIVO	FOX, OX, BP, CIP, LVX, MFX, ER, CD	GM, VAN, NIT, RA	QN, LIN, TE, TGC, SXT
NEGATIVO	BP		

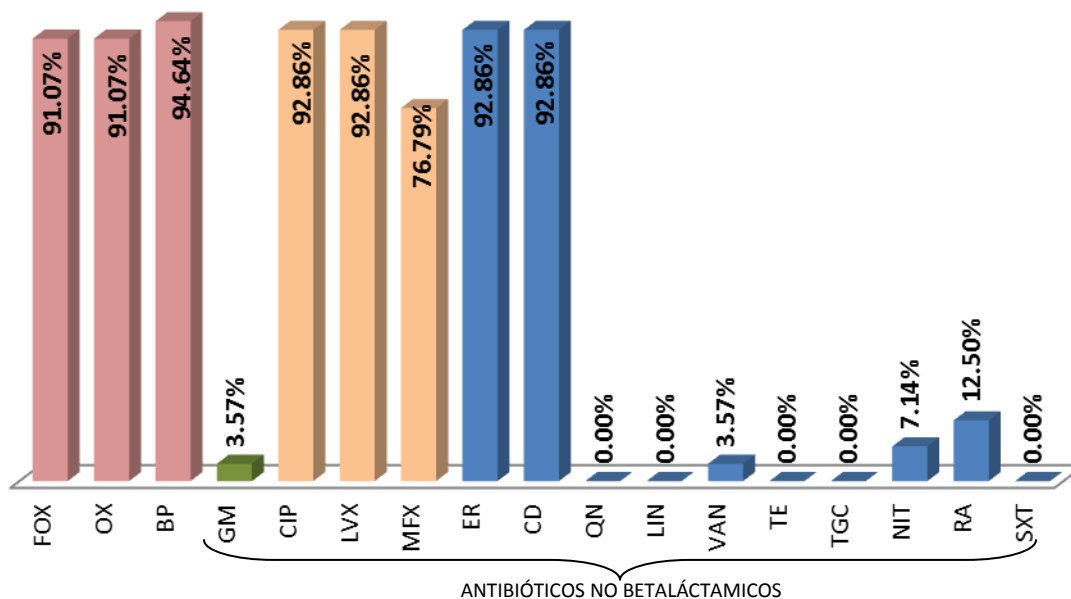


FIGURA 27. Porcentajes de resistencia a antibióticos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Se observa que existe una correlación importante entre la presencia o ausencia del gen *mecA*, con la resistencia o sensibilidad frente a antibióticos de diferentes familias a los de los betalactámicos, ya que los aislamientos con presencia del gen *mecA* poseen mayor porcentaje de resistencia a todos los que un aislamiento *mecA* negativo.

CAPITULO IV

Discusión de Resultados

CAPITULO IV : DISCUSIÓN DE RESULTADOS

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

En este trabajo se encontró, que el 96.55% (56/58) de los aislamientos de *S. aureus* tienen presencia del gen *mecA*; un estudio reciente reporta la identificación del gen *mecA* en el 65.5% de sus aislamientos (Sakoulas, Gold et al. 2001).

Los resultados de la PCR en el equipo GeneXpert fueron comparados con el fenotipo obtenido por el equipo VITEK 2, usando la tarjeta AST67 para sensibilidad microbiana. Al no contar con otro método en el laboratorio, el equipo VITEK 2 fue utilizado como método de referencia, puesto que se reporta que posee sensibilidades y especificidades satisfactorias (Winstanley and Courvalin 2011). Es importante indicar que 58 muestras corresponden a cultivos positivos de *S. aureus*, está razón se debe a que se quiso utilizar muestras enriquecidas, donde se aseguraba la presencia del microorganismo y la posibilidad de aumentar la sensibilidad como lo reportan otros estudios; cabe señalar que el kit de PCR está validado para el proceso directo de muestras (Rossney, Herra et al. 2008).

En el presente estudio, el ensayo de PCR para la identificación del gen *mecA* tiene sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de 91.8%, 68.8%, 91.1% y 100%, respectivamente; el fabricante nos indica que con respecto al método convencional de laboratorio, el cultivo, se tiene una sensibilidad y especificidad de 86.3% y 94.9%. Se observa que el valor de la sensibilidad es superior a la reportada por el fabricante, mientras que la especificidad se va muy por debajo, esto se debe a la existencia de 5 muestras clasificadas como MSSA por el equipo VITEK 2 y que fueron confirmadas mediante el método de difusión en disco de cefoxitina y oxacilina, pero que contienen el

gen *mecA*, para lo cual existen dos posibles explicaciones: (1) La expresión fenotípica de resistencia depende de las condiciones de crecimiento (temperatura, osmolaridad del medio, etc.) y (2) Se han reportan cepas heteroresistentes de *S. aureus* que son susceptibles a bajas concentraciones de β -lactámicos, el mecanismo aún es poco comprendido, pero involucra la interacción de PBP 2a y los factores fem (factor esencial para la resistencia a la meticilina) que regulan la expresión del gen *mecA* (Sakoulas, Gold et al. 2001, Batista, Gutierrez et al. 2008).

La detección del gen *mecA* por PCR o de la PBP2a, son considerados los métodos estándar de oro para la detección de MRSA (Fluit, Visser et al. 2001). En el presente estudio, el ensayo de PCR en el equipo GeneXpert identifico los 51 MRSA detectados por el VITEK 2, pero además logra detectar el 9.8% más de MRSA, por la identificación del gen *mecA*.

En la tabla 16 se muestran algunos estudios recientes relacionados a la sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la PCR en el equipo GeneXpert (Patel, Schora et al. , Rossney, Herra et al. 2008, Wolk, Struelens et al. 2009).

TABLA 16. Comparación de sensibilidad y especificidad de la PCR en tiempo real en el equipo GeneXpert.

Referencia	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)	VPP (%)	VPN (%)
Rossey, 2008	90.0	97.0	86.0	98.0
Wolk, 2009	97.1	96.2	91.9	98.7
Patel, 2014	89.3	97.9	79.8	99.0

Se realizaron 7 tomas de hisopado nasal de pacientes con cirugía programada para identificar portadores de MRSA, ya que es bien conocido que individuos sanos tienen riesgo de sufrir una infección invasiva cuando son portadores, el hábitat principal de *Staphylococcus aureus* es el epitelio escamoso húmedo de los orificios nasales y la densidad puede alcanzar de 10^3 a 10^4 microorganismos. Aproximadamente el 30% de los adultos son portadores de *Staphylococcus aureus* en piel y narinas (Mainous, Hueston et

al. 2006). Las 7 muestras fueron negativas para el gen *mecA*, se asume que el número de muestras afectó los resultados, ya que un número mayor nos hubiese permitido saber si en población local se encuentran individuos portadores de MRSA.

La tecnología de GeneXpert permite que el DNA de MRSA sea extraído, amplificado y detectado en cámaras separadas de un cartucho desechable, que contienen los reactivos necesarios. Durante el estudio no se presenta ningún resultado inválido o inhibición de la PCR, los controles internos amplifican adecuadamente y no existe necesidad de repetir alguna muestra. El tiempo promedio de proceso es de 1.18 hr, significativamente menor que el proceso en el VITEK 2 (8.58 hr) y parecido a las 1.25 hr reportadas por el fabricante (Cepheid 2007). El tiempo resulta un factor vital para este tipo de infecciones, ya que con este diagnóstico rápido, el médico pueda indicar el tratamiento más adecuado a su paciente.

Con respecto al ensayo de límite de detección, se muestra que la concentración más baja de 9.375×10^6 UFC/ml de MRSA, es detectada por el equipo sin presentar interferencias, con un C_T de 21.2. Un estudio reciente describe un límite de detección promedio de 610 UFC/ml, que si se compara con el análisis realizado en este estudio, resulta que a concentraciones muy bajas el equipo GeneXpert es capaz de detectar el ADN del MRSA y así evitar falsos negativos (Rossney, Herra et al. 2008).

Se debe de considerar que la interpretación del fabricante se basa en un valor de corte de C_T de 36 ciclos, en un estudio reciente se reporta que con estos valores de C_T la curva de amplificación aún indica un aumento exponencial de la emisión de fluorescencia y por tanto, existe la posibilidad de que se este dando un resultado negativo cuando todavía existe amplificación (Rossney, Herra et al. 2008). Las curvas de los resultados negativos reportados en este estudio, no presentan amplificación y los valores de C_T son iguales a cero, por lo que se excluyen los falsos positivos.

La clasificación por género de las 56 muestras de MRSA con la confirmación del gen *mecA* por PCR, revelan que el 59% corresponde a pacientes de sexo masculino, en la literatura encuentran dos estudios describen el 71% y 62% de pacientes hombres con infección causada por MRSA (Miller, Perdreau-Remington et al. 2005, Moran, Krishnadasan et al. 2006).

Con respecto al servicio médico, el 28.6% de los aislamientos de MRSA corresponde a Cirugía General y otro 28.6% a Nefrología; en cuanto al tipo de muestras, el 37.5% es de heridas quirúrgicas, seguido por el 14.3% de hemocultivos y 12.5% de líquido de diálisis. La literatura nos indica que *S.aureus* es el patógeno nosocomial principal de infecciones de piel y tejidos blandos, esta es la posible explicación de porque el servicio de cirugía general y las muestras de heridas quirúrgicas presentan un porcentaje mayor de aislamientos de MRSA (Cepheid 2009). El líquido de diálisis es un líquido obtenido del tratamiento en pacientes con enfermedad renal, con una complicación importante que es la peritonitis en estos pacientes inmunocompetentes. Una causa frecuente de bacteriemia es *S. aureus*, más del 50% de los casos de bacteriemia por *S. aureus* se adquieren en el hospital después de una intervención quirúrgica, o como consecuencia del uso continuado de un catéter intravascular contaminado (Murray, Rosenthal et al. 2009).

La infecciones por MRSA se presentan con mayor frecuencia entre pacientes con sistemas inmunitarios debilitados, además se conoce que existen condiciones y factores de riesgo, entre ellos, la diabetes, hospitalización reciente o cirugía, residencia a largo plazo en hospitales, diálisis, dispositivos médicos percutáneos y cateter (Naimi, LeDell et al. 2003).

La tabla número 17 muestra una comparación de estudios recientes donde se reporta el porcentaje de aislamientos correspondientes a un tipo de infección causada por MRSA (Naimi, LeDell et al. 2003, Miller, Perdreau-Remington et al. 2005, Huang, Flynn et al. 2006, Moran, Krishnadasan et al. 2006).

TABLA 17. Comparación de porcentajes de tipos de infecciones por MRSA.

Referencia	Naimi, 2003	Miller, 2005	Moran, 2006	Huang, 2006
Piel y tejidos blandos	37	86	78	42
Tracto respiratorio	22			32
Hemocultivos	9			11
Tracto Urinario	20			8

Los aislamientos de este estudio con ausencia del gen *mecA* (MSSA) fueron 100% resistentes a Bencilpenicilina, pero sensible al resto de antibióticos, se describe que un bajo nivel de resistencia es generalmente el resultado de la sobreproducción de β -lactamasa, dando como resultado la reducción de la unión.

Con respecto a los aislamientos de MRSA con presencia del gen *mecA*, se tiene que mayor al 50% poseen resistencia para Cefoxitina, Oxacilina, Bencilpenicilina, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Moxifloxacino, Eritromicina, Clindamicina; menor al 25% para Gentamicina, Vancomicina, Nitrofuratoína y Rifampicina; y son sensibles, para Quinuisitrina, Linezolid, Tetraciclina, Tigeciclina y Trimetropima/Sulfametoxazol. Sí se comparan los resultados de resistencia se tiene que los aislamientos de MRSA poseen mayor resistencia a antibióticos β -láctamicos y de otras familias, que los MSSA.

En la tabla 18 se muestra una comparación de estudios recientes donde se reporta el porcentaje de resistencia de aislamientos de MRSA (Naimi, LeDell et al. 2003, Miller, Perdreau-Remington et al. 2005, Huang, Flynn et al. 2006, Moran, Krishnadasan et al. 2006).

TABLA 18. Comparación de características fenotípicas de aislamientos de MRSA.

ANTIBIÓTICO	Características fenotípicas de resistencia (%)			
	Naimi, 2003	Miller, 2005	Moran, 2006	Huang, 2006
OX	100			
GM	20	0		2
CIP	84		40	86
LVX		64	40	
MFX			40	
ER	91	86	94	92
CD	79	0	5	52
VAN	0	0		0
TE	8	29		12
RA	6	0	0	2
TMP-SXT	10	0	0	2

Es bien conocido que MRSA es un patógeno humano fascinante y peligroso que evoluciona continuamente, su mecanismo de resistencia se trata de la adquisición del gen *mecA*, determinante de una proteína de unión a la penicilina PBP2a que tiene una baja afinidad para antibióticos beta-lactámicos (de Lencastre, Oliveira et al. 2007). Lo anterior nos ayuda a entender porque mayor al 50% de los aislamientos son resistentes a Cefoxitina, Oxacilina y Bencilpenicilina.

Además que el gen *mecA* se incorpora a *S. aureus* mediante un vector molecular llamado *Cassette en el cromosoma mec de Staphylococcus aureus (SCCmec)*, que tiene su propia historia evolutiva y que es capaz de contener una variedad de diferentes determinantes de resistencia o virulencia; lo cual explica porque los aislamientos de *S. aureus* con presencia del gen *mecA* poseen resistencia a antibióticos diferentes a los de la familia de los β -lactámicos (de Lencastre, Oliveira et al. 2007).

El 3.57% de los aislamientos de este estudio tuvieron resistencia intermedia a vancomicina, antibiótico de elección para el tratamiento de infecciones por MRSA, sin embargo, ya se han reportado cepas existentes con resistencia (Fluit, Visser et al. 2001).

Se detecta sensibilidad del total de aislamientos de MRSA para Trimetropima/Sulfametoxazol y linezolid. El uso de Trimetropima/Sulfametoxazol ha sido exitoso y se sugiere en pacientes que no toleran o que ha fallado la terapia de vancomicina (Fluit, Visser et al. 2001). Sin embargo, recientemente el tratamiento con Linezolid, miembro de la familia de las oxalidionas, ha tomado mayor importancia pues es también recomendado para infecciones de MRSA resistentes a vancomicina (Kato, Hirata et al. 2011).

El desarrollo de nuevos antibióticos resulta de vital importancia para el tratamiento de infecciones de MRSA. En el año 2011 se reporta un nuevo antibiótico anti-MRSA, WAP-8294A II, que fue aislado de la fermentación de *Lysobacter sp* y que posee un efecto terapéutico excelente sobre las enfermedades infecciosas por bacterias Gram-positivas, en particular, el MRSA (Kato, Hirata et al. 2011).

Con los resultados obtenidos, se demuestra que MRSA es uno de los microorganismos más aislados en Centro Médico ISSEMyM y que la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, especialmente con el aumento de la resistencia como lo es MRSA, resulta crucial para la terapia de los pacientes infectados. La rápida detección de MRSA junto con la pronta aplicación de la terapia más adecuada, ayudaría a reducir la prevalencia de infecciones.

El método de rutina del laboratorio es laborioso, requiere tiempos de incubación y los resultados pueden tardar varios días; el ensayo de PCR en el equipo GeneXpert de Cepheid se considera una alternativa que pretende un diagnóstico rápido. Sin embargo, estos ensayos moleculares tienen limitaciones, como nuevos mecanismos de resistencia, que sea costoso para competir con ensayos fenotípicos y que necesite cultivo concomitante para recuperar microorganismos destinados a pruebas de sensibilidad.

El control de MRSA es uno de los principales objetivos de la mayoría de los programas de control de infecciones hospitalarias, por lo que se recomienda a Centro Médico ISSEMyM la implementación de medidas de control importantes: vigilancia de cultivo, refuerzo de reglas de lavado de manos y procedimientos de desinfección, identificación de portadores y anotación en historia clínica, revisión de procesos de esterilización y técnicas de enfermería.

CAPITULO V

Conclusiones

CONCLUSIONES

- La Identificación del gen *mecA* por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real empleando el equipo GeneXpert Cepheid, es una alternativa para el diagnóstico rápido de MRSA en Centro Médico ISSEMyM de Toluca.
- El ensayo de PCR en el equipo GeneXpert para la identificación del gen *mecA* presenta una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de 100.0%, 68.8%, 100.0% y 28.57%, respectivamente.
- Los resultados obtenidos demuestran una asociación de la presencia/expresión del gen *mecA* y la susceptibilidad microbiana a antibióticos del MRSA.
- Este estudio expone la importancia de la identificación de confirmar el gen *mecA*, ya que de manera rápida puede implementarse la terapia más adecuada al paciente. Además, cuando se confirma la presencia del gen *mecA* en pacientes pre-quirúrgicos se previene una infección invasiva posterior a la cirugía.

ANEXOS

ANEXO 1. MATERIAL Y REACTIVOS

kit de Ensayo Xpert MRSA contienen suficientes reactivos para procesar 10 muestras recolectadas y muestras de control de calidad.


PERLAS LIOFILIZADAS

- 1 Polimerasa, dNTPs, BSA (albúmina sérica bovina) y Sonda.
- 2 Iniciadores, Sondas y BSA.
- 3 Control de procesamiento de muestras: 2000 esporas de control de preparación de muestras no infecciosas.


REACTIVOS

- 1 Tampón Tris, EDTA y surfactantes.
- 2 Hidróxido de sodio

ANEXO 2. TRABAJO EN MODALIDAD DE CARTEL EN EL 8º CONCURSO DE CARTELES, DE TRABAJOS LIBRES DE INFORMACIÓN E INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO CLÍNICO, ORGANIZADO POR EL COPLACEM.




ISSEMUM

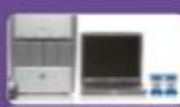


Ilie Torres Escobar¹, Santillán Benítez Jonathan², Q. F. B. Edelmirá Mejía García³.
Centro Médico ISSEMyM.
E-mail: issemum@hotmail.com.

Introducción
En el laboratorio clínico uno de los microorganismos Gram positivos que se aísla con mayor prevalencia es el *Staphylococcus* sp. El componente genético del mecanismo de esta resistencia es la incorporación del gen *mecA*, el cual codifica una proteína transpeptidasa, que mantiene la integridad de la pared celular.



La prueba Xpert MRSA de Cepheid llevado a cabo en el sistema GeneXpert (Xpert MRSA), es una prueba de diagnóstico donde se utiliza una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con el objeto de detectar el gen *mecA* del MRSA y tiene una sensibilidad del 90% y una especificidad del 98%.



Objetivo


Identificar el gen *mecA* del ADN de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA), utilizando Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (GeneXpert cepheid) y comprobar la sensibilidad y especificidad del método in vitro.

IDENTIFICACIÓN DEL GEN *mecA*


DE *Staphylococcus aureus* meticilina resistente
POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL
EMPLEANDO EL EQUIPO: GeneXpert Cepheid™

Desarrollo


Recolección de muestras




Identificación y Sensibilidad



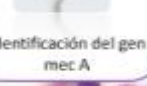
Identificación del gen *mecA*



Exudados nasales




Identificación del gen *mecA*




Resultados

Se analizaron 41 muestras, de las cuales 7 fueron exudados nasales de pacientes del servicio de Cuidados Coronarios y las restantes de muestras con cultivo positivo de *Staphylococcus aureus*.

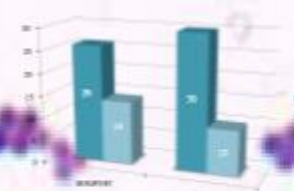
Clasificación por Servicio Médico




Clasificación por Tipo de Muestra




Microorganismo Detectado	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)
MRSA	83.3 (25/30)	98.0 (9/10)



Reporte Xpert MRSA de Cepheid





Conclusiones

- Fueron correctamente identificados 25/30 MRSA y 5 MSSA aislados como MRSA.
- El equipo: GeneXpert Cepheid presentó una sensibilidad del 83.3% y una especificidad del 90%.
- El tipo de muestra donde se identificó MRSA con mayor frecuencia fue en Heridas Quirúrgicas (40 %) y el servicio fue Cirugía General (45%).

Bibliografía

1. C. Sánchez-Solis, C. Antonio-Alvarez, A. Brenner (2005). Método para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina en el laboratorio de microbiología clínica.
2. Nakano AD, Hoshino WJ, Cavalli, C, Watanabe A, Sato VA. Rapid Diagnosis of *Staphylococcus aureus* and *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* in the United States, 2011-2012. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 2014;4(2):113-117.
3. National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 2007 through June 2014. *Infect. Control* 2014. doi:10.1016/j.ic.2014.02.018.
4. Ochiai C, Jermolovskis L, Albert C, Saloner B. Control of Outbreaks of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *MMWR* 2013;62(1):1745-51.
5. Shojadi S, Shojadi M, Mousavi S. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases* 2012;18(1):14-4.
6. Salgado C, et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-analysis of Prevalence and Risk Factors. *Clin Infect Dis* 2013;56(1):1.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Orbitas de Cultivos Clínicos y de Laboratorio* [Internet]. Instituto Nacional de Control de Calidad de Laboratorio. Clinical Laboratory Standards. www.clinical-labstandards.com.
8. M. Torts, M. Gual, M. Morillas, C. Sagar, D. M. Nadal. Identificación de *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* in Blood Culture by Real-time PCR. *Emerging Infectious Diseases* 2010;16(1):140-142.

BIBLIOGRAFIA

Anand, K. B., et al. (2009). "Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA." *Indian J Med Microbiol* 27(1): 27-29.

Baba, T., et al. (2002). "Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA." *Lancet* 359(9320): 1819-1827.

Baron, E. J. (2010). "Dealing with the complexity of a living target " *CEPHEID* 3(3): 11.

Batista, D. N., et al. (2008). "Evaluación del método de difusión en disco de 30 µg de cefoxitina en la detección de resistencia a meticilina en aislamientos seleccionados de *Staphylococcus aureus*." *Revista Española de Quimioterapia* 21(4): 213-216.

Biosystems, A. "Curso PCR en tiempo real: Generalidades y su uso en diferentes aplicaciones."

Boyce, J. M. and N. L. Havill (2008). "Comparison of BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) PCR versus the CHROMagar MRSA assay for screening patients for the presence of MRSA strains." *J Clin Microbiol* 46(1): 350-351.

Cabrera, J. L. and M. A. H. Sanchez (2001). *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética : conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Barcelona, Elsevier.

Cepheid Manual del operador del sistema GeneXpert® Dx. Sunnyvale, CA., Cepheid.

Cepheid (2007). *Xpert MRSA: instruction manual*. Sunnyvale, CA., Cepheid.

Cepheid (2009). *Xpert MRSA/SA SSTI: instruction manual*. Sunnyvale, CA., Cepheid.

Chambers, H. F. (1997). "Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications." *Clin Microbiol Rev* 10(4): 781-791.

Datta, P., et al. (2011). "Evaluation of various methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and susceptibility patterns." *J Med Microbiol* 60(Pt 11): 1613-1616.

De Lencastre, H., et al. (2007). "Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power." *Curr Opin Microbiol* 10(5): 428-435.

Fluit, A. C., et al. (2001). "Molecular detection of antimicrobial resistance." *Clin Microbiol Rev* 14(4): 836-871, table of contents.

García, C. S., et al. (2005). "Técnicas para la identificación de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el Laboratorio de Microbiología Clínica." *Asociación Española de Farmacéuticos Analistas*: 74-78.

Gerald, L. M., et al. (2002). *Enfermedades infecciosas: Principios y práctica*. Buenos Aires, Argentina, Médica Panamericana.

Gil, M. (2000). "*Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina." *Revista Chil Infectología* 17: 145-152.

- Hiramatsu, K., et al. (2002). "Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Int J Med Microbiol* 292(2): 67-74.
- Huang, H., et al. (2006). "Comparisons of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Hospital-Associated MRSA Infections in Sacramento, California." *J Clin Microbiol* 44(7): 2423-2427.
- Kato, A., et al. (2011). "A new anti-MRSA antibiotic complex, WAP-8294A II. Structure characterization of minor components by ESI LCMS and MS/MS." *J Antibiot (Tokyo)* 64(5): 373-379.
- Londoño JF, et al. (2008). "Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina en personal de la unidad de terapia intensiva de la Clínica Universitaria Bolivariana, Medellín 2004." *Revista INFECTIO* 10(3): 160-166.
- Mainous, A. G., 3rd, et al. (2006). "Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S aureus* in the United States, 2001-2002." *Ann Fam Med* 4(2): 132-137.
- Malhotra-Kumar, S., et al. (2010). "Evaluation of chromogenic media for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J Clin Microbiol* 48(4): 1040-1046.
- Miller, L. G., et al. (2005). "Necrotizing Fasciitis Caused by Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles." *New England Journal of Medicine* 352(14): 1445-1453.
- Moran, G. J., et al. (2006). "Methicillin-Resistant *S. aureus* Infections among Patients in the Emergency Department." *New England Journal of Medicine* 355(7): 666-674.
- Murray, P. R. and E. J. Baron (2007). *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C., ASM Press.
- Murray, P. R., et al. (2009). *Microbiología médica*. España, ELSEVIER.
- Naimi, T. S., et al. (2003). "Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *staphylococcus aureus* infection." *JAMA* 290(22): 2976-2984.
- Pahissa, A. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*, Marge Medica Books.
- Parta, M., et al. (2009). "Identification of methicillin-resistant or methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in blood cultures and wound swabs by GeneXpert." *J Clin Microbiol* 47(5): 1609-1610.
- Patel, P. A., et al. "Performance of the Cepheid Xpert® SA Nasal Complete PCR assay compared to culture for detection of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.
- Qian, Q., et al. (2010). "Direct detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* in blood culture broth by use of a penicillin binding protein 2a latex agglutination test." *J Clin Microbiol* 48(4): 1420-1421.

Rossney, A. S., et al. (2008). "Evaluation of the Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay using the GeneXpert real-time PCR platform for rapid detection of MRSA from screening specimens." *J Clin Microbiol* 46(10): 3285-3290.

Ruiz, M. A. and Z. Morillo (2004). *Epidemiología clínica : investigación clínica aplicada*. Bogotá, Colombia, Médica Panamericana.

Sakoulas, G., et al. (2001). "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains." *J Clin Microbiol* 39(11): 3946-3951.

Sánchez, N. A. (2002). "¿Son la sensibilidad y la especificidad medidas obsoletas para determinar la bondad de una prueba diagnóstica?" *Revista Facultad Nacional de Salud Pública* 20(1): 149-159.

Skov, R., et al. (2003). "Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J Antimicrob Chemother* 52(2): 204-207.

Skov, R., et al. (2006). "Phenotypic detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion testing and Etest on Mueller-Hinton agar." *J Clin Microbiol* 44(12): 4395-4399.

Swenson, J. M. and F. C. Tenover (2005). "Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp." *J Clin Microbiol* 43(8): 3818-3823.

Thati, V., et al. (2011). "Vancomycin resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from intensive care units of tertiary care hospitals in Hyderabad." *Indian J Med Res* 134(5): 704-708.

Winstanley, T. and P. Courvalin (2011). "Expert Systems in Clinical Microbiology." *Clin Microbiol Rev* 24(3): 515-556.

Wolk, D. M., et al. (2009). "Comparison of MRSASelect Agar, CHROMagar Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Medium, and Xpert MRSA PCR for detection of MRSA in Nares: diagnostic accuracy for surveillance samples with various bacterial densities." *J Clin Microbiol* 47(12): 3933-3936.

Wolk, D. M., et al. (2009). "Multicenter evaluation of the Cepheid Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) test as a rapid screening method for detection of MRSA in nares." *J Clin Microbiol* 47(3): 758-764.

Wolk, D. M., et al. (2009). "Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in wound specimens and blood cultures: multicenter preclinical evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA skin and soft tissue and blood culture assays." *J Clin Microbiol* 47(3): 823-826.

Zhang, K., et al. (2005). "Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J Clin Microbiol* 43(10): 5026-5033.