



**Instituto Nacional de Salud Pública
Escuela de Salud Pública de México**

ESPECIALIDAD EN SALUD PÚBLICA Y MEDICINA PREVENTIVA

**Caracterización molecular de cepas de *S. aureus* meticilino
resistentes (MRSA) aisladas en pacientes del Hospital General
“Dr. Manuel Gea González”**

*Tesis para obtener el grado de Especialista en
Salud Pública y Medicina Preventiva*

PRESENTA

M.C. Sofía de Fátima Hernández Gasca

DIRECTOR DE TESIS

Dra. María Elena Velázquez Meza

ASESORES

Dra. Gabriela Echániz Avilés
Dr. Ricardo Valdés Castro
Mtro. Rafael Figueroa Moreno

Noviembre 2013

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Elena Velázquez Meza

Directora de tesis. Por su gran profesionalismo, ética y entrega hacia la investigación. Por el amor con el que comparte sus conocimientos y experiencias para guiar a los alumnos. Por su paciencia infinita.
Y sobre todo por hacer que este proyecto fuera posible.

A mis Asesores

Dra. Gabriela Echániz Avilés, Dr. Ricardo Valdés Castro y Dr. Rafael Figueroa Moreno. Por compartir sus conocimientos y por ser una guía invaluable durante el desarrollo de este proyecto.

A mi familia

Porque sin ellos no podría haber conseguido este logro, por su apoyo infinito, por su cariño y comprensión y porque por ellos soy la persona que soy.

A mi esposo

Víctor, por acompañarme durante todo este proceso, por ser mi soporte, mi mano derecha, por su fé en mí y por siempre motivarme para seguir adelante.



ÍNDICE

RESUMEN	4
ANTECEDENTES	7
MARCO TEÓRICO.....	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVOS	20
Objetivo General.....	20
Objetivos específicos.....	21
MATERIALES Y MÉTODO.....	21
Diseño.....	21
Universo de estudio	21
Tamaño de la muestra.....	22
Definición de variables.....	23
Descripción de procedimientos.....	25
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	26
RECURSOS MATERIALES Y FINANCIEROS.....	26
VALIDACIÓN DE DATOS	26
CONSIDERACIONES ÉTICAS	26
CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD	27
RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN	38
ANEXOS	41
REFERENCIAS.....	45



RESUMEN

Introducción. El surgimiento del MRSA-CA en la comunidad y la presencia del MRSA-HA en el hospital es una enorme amenaza con implicaciones clínicas importantes. Los tratamientos con antibióticos pueden no ser eficaces dando como resultado complicaciones que pueden terminar con la muerte del paciente. Las infecciones causadas por cepas resistentes a la metilina pueden ser más difíciles de manejar y con un costo mayor, por lo que el disminuir la utilización de los antibióticos que favorecen la selección de cepas resistentes es un paso esencial para controlar el surgimiento de estas cepas en los hospitales y en la comunidad.

La tipificación molecular, permite determinar si un grupo de cepas de una especie en particular es clonal, es decir, provienen de un precursor común. Este proceso desempeña un importante rol en la comprensión de la epidemiología de los MRSA y la evaluación de la efectividad de las medidas de control de las infecciones y prescripción de antimicrobianos

Objetivo. Determinar las características moleculares de cepas de MRSA aisladas en pacientes del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Metodología. Las cepas de MRSA incluidas en este estudio fueron colectadas previamente por la sección de Microbiología del Laboratorio Clínico del Hospital “Dr. Manuel Gea González” en el periodo de Agosto 2011- Agosto 2012.

Las cepas de MRSA fueron aisladas en pacientes hospitalizados en los diferentes servicios de este hospital, en líquidos biológicos y secreciones corporales a excepción de aquellos aislados en exudados faríngeos o nasales y orina. Solo se tomó en cuenta un aislamiento por paciente.

El perfil de susceptibilidad a antibióticos de las cepas de MRSA colectadas, se determinó de acuerdo con las guías del CLSI 2012. Se hizo la prueba de Kirby Bauer con el disco de cefoxitina de 30ug, las cepas resistentes a oxacilina fueron procesadas por el método automatizado de Microscan para determinar el perfil de susceptibilidad a antimicrobianos.

El perfil clonal fue determinado a través de electroforesis de campos pulsados (PFGE) por métodos ya descritos; la interpretación de los patrones de PFGE se realizó siguiendo los criterios de Tenover; el casete cromosomal



estafilocócico (*SCCmec*) y la presencia del gen *pvl* se realizó por PCR.

Resultados. Las cepas analizadas fueron aisladas en 38 pacientes de los cuales 19 (50%) fueron de sexo femenino y 19 (50%) masculino. La mediana de edad de los pacientes se encontró en los 49 años, con un valor mínimo de 0 y máximo de 82 años.

Los servicios del Hospital Gea González en los que se encontraron los aislamientos fueron la Unidad de Terapia Intensiva 28.9 (n=11) y Medicina Interna 23.7% (n=9). El 63.2% (n=24) de los aislamientos se realizaron en secreción bronquial, 31.58% (n=12) en secreción de heridas, uno en hemocultivo y otro más en líquidos biológicos. Los pacientes en los que se realizaron los aislamientos de MRSA presentaron con mayor frecuencia Ventilación mecánica como medio invasivo con el 71.5% (n=27),

La media de días de estancia intrahospitalaria de los pacientes fue de 25.9, con una desviación estándar de 12.6. Se observó un promedio de días de uso de antibiótico total de 19.9 con una desviación estándar de 10 días.

A través del análisis por Electroforesis de Campos Pulsados, se identificó un único

tipo clonal denominado NY, con 10 subtipos (NY1-NY10). La clona NY mostró un alto grado de similitud con la clona York / Japón y se encontró un patrón relacionado con el casete clonal tipo II. No se encontró presencia de este en ninguna de las cepas representantes de la clona NY y subtipos.

Los resultados mostraron que la clona NY y sus subtipos tienen un 97% de similitud con la clona New York/ Japón (BK2464).

Los perfiles de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas mostraron que los 38 aislamientos fueron resistentes a 12 diferentes antibióticos. No se encontraron cepas resistentes a vancomicina, tetraciclina, gentamicina, linezolid, quinupristina y dalfopristina. Solo cuatro de las cepas fueron resistentes a TMP/SMX y tres a rifampicina.

Conclusión: Las cepas de *S. aureus* aisladas en pacientes del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” pertenecen a un mismo tipo clonal y presentan un 97% de similitud con la clona pandémica denominada New York/ Japón que ha sido identificada en otros hospitales de nuestro país.

Está comprobado que el control y la eventual eliminación del desarrollo de



MRSA en los hospitales es posible si se llevan a cabo medidas estrictas, incluyendo educación continua del personal de salud, aislamiento por contacto de los pacientes con aislamiento de MRSA, detección sistemática de personal expuesto a

MRSA, y seguimiento de pacientes positivos y expuestos a MRSA en situación de epidemia,.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, resistencia antimicrobiana, resistencia a meticilina, MRSA, tipificación molecular, epidemiología.



ANTECEDENTES

Staphylococcus aureus es un microorganismo de gran importancia médica debido a que posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. ⁽¹⁾ Desde hace muchos años se le ha reconocido como uno de los principales agentes patógenos para el humano. ⁽²⁾

S. aureus forma parte de la familia *Micrococaceae*, género *Staphylococcus*, el cual contiene más de 30 especies diferentes y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y de las membranas mucosas de los seres humanos. Es un coco Gram-positivo, no móvil, no forma esporas, puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. Este microorganismo produce catalasa, coagulasa y crece rápidamente en agar sangre ^(2,3).

S. aureus produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Es causa de infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis. Es causante también de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales. Provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del choque tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo. Además, causa septicemia, impétigo y fiebre ⁽²⁾.

Las cepas de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) son cepas resistentes a todos los β -lactámicos y otros antibióticos disponibles; de forma inicial se encontraban confinados en gran parte a hospitales, centros de salud y a los pacientes en contacto estrecho hospitalario; este tipo de aislamientos se conocen como MRSA adquiridos en el Hospital (MRSA-HA).



Los MRSA se han vuelto comunes y han creado una crisis de salud pública en varias partes del mundo. Estudios realizados en varios países de América Latina, incluyendo México, han informado una alta incidencia de MRSA en general, y una marcada variación geográfica en los patrones de multiresistencia.⁽³⁾

Existe un número limitado de estudios sobre la prevalencia de cepas de MRSA en nuestro país. De acuerdo a algunos estudios realizados, se ha visto que la prevalencia de cepas de MRSA se ha incrementado rápidamente en los hospitales durante los últimos años, se estima que ha cambiado del 7% al 30% ⁽³⁾.

Desde mediados de la década de los 90, ha habido un aumento en el número de infecciones por MRSA en poblaciones que carecen de factores de riesgo y exposición al sistema de salud. ⁽¹⁾ Este aumento se ha asociado con el reconocimiento de nuevas cepas de MRSA, adquiridas en la comunidad (MRSA-CA), y han sido responsables de una gran proporción de las infecciones observada en la última década.

Factores de virulencia

S. aureus produce una gran variedad de proteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el ser humano. Casi todas las cepas de *S. aureus* producen un grupo de enzimas y citotoxinas. Dentro de estas hay cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. La función principal de estas proteínas es la de ayudar a degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias. Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome del choque tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SE), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina ^(3,4).



Los factores de virulencia de *S. aureus* participan en la adhesión y adquisición de nutrientes para el microorganismo y sirven también para evadir la respuesta inmune del huésped. En base a esto los factores se han clasificado en tres categorías: 1) los involucrados en la adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; 2) aquellos que están involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), proteína A, lipasas, y polisacáridos capsulares; 3) los involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la toxina α , hemolisinas β , γ y δ ^(3,4,5,6,7).

La coagulasa producida por *S. aureus* existe en dos formas, una forma unida (llamada también factor de aglomeración) y una forma libre. La coagulasa unida a la pared celular del estafilococo se une a la protrombina, este complejo transforma el fibrinógeno en fibrina insoluble y esto provoca la aglomeración de los estafilococos. La coagulasa libre reacciona con el factor reactivo de la coagulasa (CRF), presente en el plasma, dando lugar a un complejo análogo a la trombina que reacciona con el fibrinógeno formando el coagulo de fibrina. La coagulasa se utiliza como marcador de la virulencia y permite diferenciar a *S. aureus* (coagulasa positivo) de otras especies estafilocócicas (coagulasa negativas). La importancia de la coagulasa en la patogenia de la enfermedad radica en que esta enzima causa la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, localizando la infección y protegiendo a la bacteria de la fagocitosis ⁽⁴⁾.

PVL está presente en menos del 5% de las cepas de *S. aureus*. La leucocidina es citotóxica para los monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares del humano. La leucocidina es una proteína que forma poros en la membrana plasmática de los leucocitos, lo cual provoca un aumento en la permeabilidad y eventualmente produce la lisis de la célula. La lisis de los leucocitos produce la liberación de mediadores de la inflamación, con una consecuente respuesta inflamatoria grave ^(5,6).



Resistencia Antimicrobiana

En años recientes han reemergido las infecciones por *S. aureus*; esto debido en parte a que la bacteria se ha vuelto resistente a los antibióticos con los que normalmente se le combate ⁽³⁾.

En la actualidad las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes y multiresistentes. La adquisición de esta resistencia se debe principalmente al intercambio de manera horizontal de genes que son transportados por elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones (Tn) y secuencias de inserción (IS).

La introducción de la penicilina a principios de los años 40 como tratamiento en las infecciones causadas por *S. aureus* abatió de manera importante las infecciones ocasionadas por este microorganismo. Sin embargo, para 1946, en Inglaterra se observó que aproximadamente 60% de los aislamientos de estafilococos fueron resistentes a penicilina, y para mediados de 1950, los aislamientos de *S. aureus* mostraron niveles más elevados de resistencia.

Debido a la resistencia a la penicilina de *S. aureus*, a finales de los años 50 se introdujeron cefalosporinas estables a penicilinasas y penicilinas semisintéticas. Entre éstas estuvo la meticilina, como antibiótico de elección en el tratamiento de *S. aureus* resistente a penicilina. Esta droga fue introducida en Europa en 1959 y un año después se detectó la primera cepa de *S. aureus* meticilino resistente. Más tarde, en 1963, se reportó el primer brote nosocomial causado por cepas de MRSA, desde entonces se han notificado cepas de *S. aureus* multiresistentes en todo el mundo. ⁽³⁾

El elemento central de la resistencia a meticilina en *S. aureus* es la adquisición del gen *mecA*, el cual no es endógeno de esta bacteria y está integrado en el cromosoma.



El gen *mecA* codifica para una proteína de unión a penicilina (PBP) de 78KDa (PBP2A), la cual presenta baja afinidad para los antibióticos β -lactámicos ⁽⁷⁾ Un estudio llevado a cabo en 1996 utilizando cepas prototipo aisladas en diferentes continentes, aportó las primeras evidencias de la existencia de tres tipos de casetes cromosomales estafilocócicos (*SCCmec*), I-III.⁽⁸⁾ Posteriormente se describió un cuarto tipo de *SCCmec* (IV).⁽²⁾ y hasta la fecha se han descrito ocho diferentes tipos de *SCCmec* . Estudios recientes indican que los tipos II y IV se encuentran circulando en cepas de MRSA en México. ⁽³⁾

El fenotipo que se ha visto asociado más frecuentemente con persistencia de cepas de *S. aureus* en el hospital es el de resistencia a meticilina. La gran mayoría de los MRSA no sólo son resistentes a todos los β -lactámicos, sino también a múltiples antibióticos. Estos patrones de resistencia limitan las opciones terapéuticas contra las infecciones causadas por los MRSA; la vancomicina, teicoplanina, tigeciclina y daptomicina son algunas alternativas terapéuticas.⁽⁹⁾

Sin embargo, las primeras cepas de *S. aureus* con susceptibilidad disminuida a vancomicina fueron reportadas en Japón y en Estados Unidos (E.U) en los años 90, a partir de entonces han aparecido más informes en la literatura ⁽¹⁰⁾. En 1997 se encontraron cepas con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) ⁽¹¹⁾ y en el 2002 se detectaron las primeras cepas resistentes a este antibiótico "vancomycin resistant *S. aureus*", (VRSA) ⁽¹²⁾.

La resistencia a la vancomicina se debe a la adquisición del gen *van*, el cual se transfiere a través de un plásmido. Para que la vancomicina ejerza su acción debe llegar a la membrana citoplásmica y unirse a las moléculas precursoras nacientes de la pared celular. Esta unión inhibe la incorporación de los precursores a la pared celular en formación. La resistencia a la vancomicina se debe a cambios en la biosíntesis del peptidoglucano.⁽¹³⁾



El surgimiento de cepas de *S. aureus* multiresistentes representa una respuesta secuencial a la presión selectiva impuesta por la terapia antimicrobiana. Sin embargo, se ha observado que la acumulación y la diseminación de resistencia en *S. aureus* es producto del intercambio de determinantes de resistencia preexistente portados por elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones.⁽¹⁴⁾

Epidemiología de MRSA

Más del 50% de los aislamientos de *S. aureus* de las unidades de cuidados intensivos en los E.U. son resistentes a meticilina.⁽¹⁵⁾ La prevalencia de MRSA es variable, un informe europeo indica que los hospitales de Islandia presentan una prevalencia de 0.5%, mientras que en Grecia es de 44.4%.⁽¹⁶⁾ Actualmente *S. aureus* meticilino resistente es reconocido como uno de los más importantes patógenos causantes de infecciones nosocomiales en todo el mundo. Los MRSA causaron en 2005 más de 94,000 infecciones potencialmente mortales y casi 19,000 muertes en los E.U.; la mayoría de estas muertes estuvieron vinculadas al entorno médico.⁽¹⁷⁾

Datos del 2004 al 2005 obtenidos del *Antimicrobial European Resistance Surveillance System (EARSS)*, *Programa SENTRY*, y *Programa Nacional de Resistencia Bacteriana*, muestran tasas de MRSA en diferentes regiones: Canadá: 5%, E.U.: 38%, México: 36%, América Latina: 36%, Europa: 1- 40%, Asia: Japón 60%.⁽¹⁸⁾

En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) notificó que los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *S. aureus* varían entre 5 y 70% y que los porcentajes de mortalidad atribuibles pueden ser elevados (50%). Esta misma red reportó que en el periodo de 1997-2003, *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y el cuarto lugar en mortalidad.⁽¹¹⁾



En un estudio de la Red Nacional de Resistencia Bacteriana en México, en el que participaron 11 centros en toda la república, se analizaron 641 aislados de *S. aureus* de junio a diciembre del 2004, encontrando 41.3% de resistencia a meticilina en los aislados nosocomiales y 32.4% en los aislados de la comunidad.

(19)

En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) durante 1981 a 1992 se analizó la tendencia de las bacteremias (n= 3428) y los factores de riesgo de muerte, encontrando que 8% de los aislados fueron *S. aureus* con una prevalencia de resistencia a meticilina menor a 20%. Posteriormente, al analizar 1,584 bacteremias diagnosticadas de 1995 al 2000, se encontró una tasa de aislamiento de *S. aureus* de 9% y de MRSA de 26%. Los resultados de un estudio realizado durante 2000-2004 en el INCMNSZ en 1,326 bacteremias mostraron una prevalencia de *S. aureus* del 17% y la tasa de MRSA fue de 45%. En el mismo hospital, un estudio observacional realizado entre enero del 2004 y julio del 2005, indicó una prevalencia de MRSA superior a 50% en aislados de bacteremias y de neumonías, la cual se mantuvo constante durante todo el periodo del estudio y encontraron una tasa de resistencia a meticilina del 100% en áreas hospitalarias de riesgo (UTI).⁽²⁰⁾

De enero de 1998 a diciembre del 2003, en el Instituto Nacional de Cancerología, se realizó un estudio retrospectivo en el cual se obtuvieron cepas de cultivos de sangre y se determinó la tendencia anual de la resistencia de cada organismo a diferentes antibióticos. Durante el periodo de estudio se detectaron 2 071 episodios de bacteremia, con una tasa promedio de 43.1/1 000 egresos. Los principales microorganismos aislados en orden de frecuencia fueron: *E.coli*, *S. epidermidis*, *Klebsiella spp*, *S. aureus* y *Enterobacter spp*. *S. aureus* se aisló con una frecuencia de 8.9%, con una sensibilidad promedio a oxacilina de 96% y a vancomicina de 100%. Se considera que los patrones de resistencia encontrados en este hospital son el resultado del control en el uso de antimicrobianos, del



programa de vigilancia de infecciones nosocomiales y de la utilización de terapia combinada en todos los pacientes con bacteremia. ⁽²¹⁾

Infecciones Nosocomiales por MRSA

Las infecciones asociadas a los cuidados de la salud son un problema relevante de salud pública de gran trascendencia económica y social. Son de importancia clínica y epidemiológica debido a que presentan altas tasas de morbilidad y mortalidad. Las infecciones nosocomiales se definen como aquellas infecciones que no estaban presentes ni en periodo de incubación al momento en que el paciente ingresó al hospital. En E.U. se reporta una incidencia promedio del 3 al 5%. ⁽²²⁾ En México se tiene reportado un promedio del 10 al 15%. El impacto más importante de este problema en nuestro país es la mortalidad, la cual, en 1993, se estimaba en promedio de un 5%. ⁽²³⁾

El área hospitalaria con mayor frecuencia de infecciones introhospitalarias es la unidad de terapia intensiva. Las infecciones más frecuentes son en vías urinarias, seguidas por las de herida quirúrgica, bacteremias y neumonías. Otro factor que se relaciona con el desarrollo de infecciones nosocomiales es la edad, en personas de edad avanzada se presenta un mayor número de muertes debido a infecciones severas. El tiempo de estancia hospitalaria se ha descrito como un factor determinante para el desarrollo de las infecciones nosocomiales. ⁽²⁴⁾

Las infecciones nosocomiales por *S. aureus* representan un gasto elevado. En los años 2000-2001, el costo promedio por hospitalizaciones en 994 hospitales de E.U. de pacientes con infecciones por *S. aureus* fue de \$48,834 dólares, mientras que el costo de los pacientes sin esas infecciones fue de \$14,141 dólares. Además del sustancial gasto económico, existe una morbilidad y una mortalidad significativas asociadas con las infecciones estafilocócicas, particularmente con las infecciones invasivas, donde el rango de mortalidad en E.U. se encuentra entre el 19 y 34% ⁽²⁵⁾.



En un estudio realizado en hospitales pediátricos, se encontró que *S. aureus* ocupa el cuarto lugar de microorganismos causantes de infecciones nosocomiales ⁽¹⁴⁾. Diversos estudios de vigilancia de las infecciones nosocomiales en México indican que del 8.3 al 36% de estas infecciones se debe a *S. aureus* ⁽³⁾.

De acuerdo a la Unidad de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria en el Hospital “Dr. Manuel Gea González” se tiene documentado que la tasa de infección nosocomial para el año 2011 fue de 2.8 por cada 100 egresos. Para este mismo año las principales bacterias causantes de infecciones nosocomiales en este hospital fueron, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Burkholderia sp* y *Klebsiella pneumoniae*. En los primeros lugares se encontró a *E. coli* con 33.3% de aislamientos, *Acinetobacter baumannii* con 27.04%, *P. aeruginosa* con 15.9% y *S. aureus* con el 13.2%.

MRSA-HA y MRSA-CA

El dramático aumento en las infecciones causadas por los MRSA-HA, se debe a varios factores, que incluyen el uso de antibióticos de amplio espectro, un mayor número de pacientes inmunocomprometidos y una mayor utilización de dispositivos invasivos, como catéteres y sondas, que facilitan la entrada y colonización de cepas de MRSA a la sangre y tejidos ⁽²⁶⁾

A finales de los años 90, emergieron cepas MRSA en adultos y niños sanos en la comunidad (MRSA-CA). La prevalencia de estas infecciones ha aumentado significativamente en los últimos años. La adquisición de estas cepas se realiza fuera de los tradicionales factores de riesgo de las cepas de MRSA hospitalarias, son susceptibles a pocos antibióticos y presentan la inclusión de factores de virulencia específicos. ⁽¹⁾



Para clasificar una cepa de *S. aureus* como MRSA-CA se debe cumplir con la condición de que sea una cepa aislada en la comunidad, en pacientes que no tienen los factores de riesgo de una infección nosocomial por MRSA. Estos factores son: hospitalizaciones frecuentes y recientes, vivir por largos periodos en salas de cuidados especiales, estar expuesto a dispositivos invasivos como sondas o catéteres, haber tenido cirugías recientes o diálisis, emplear drogas intravenosas o una prolongada exposición a los antibióticos. ⁽²⁷⁾

Desde el punto de vista microbiológico las cepas de MRSA-CA son genéticamente diferentes del clásico *S. aureus* meticilino resistente que se conoce del ámbito hospitalario, ya que poseen atributos de virulencia específicos. Primero, existe una exotoxina, la leucocidina de Pantón-Valentine, asociada con procesos inflamatorios severos en piel y partes blandas, así como en la neumonía necrotizante. Segundo, poseen mayor rapidez de duplicación celular y una alta capacidad de diseminación. Tercero, los genes de resistencia a meticilina se encuentran en una región de reciente identificación (SCC*mec* IV o V) distinta a la que poseen los MRSA hospitalarios clásicos, que no contienen los genes de resistencia a antibióticos adicionales que son típicos de las cepas de MRSA-HA; debido a esto sólo son susceptibles a los antibióticos β -lactámicos y ocasionalmente a la eritromicina. Por lo tanto, se piensa que el origen de estas cepas no lo constituye la diseminación desde el hospital hacia la comunidad, sino que este nuevo agente nace de la asociación de dos genotipos: el genotipo resistente de un *S. epidermidis* y el genotipo de un *S. aureus* meticilino sensible más virulento. ⁽²⁸⁾



MARCO TEÓRICO

En la actualidad la tipificación molecular ha aportado nuevos datos que han dado origen a la epidemiología molecular. En el caso de *S. aureus* en años recientes, después de analizar una colección amplia de cepas de MRSA que circulan en diferentes áreas geográficas del mundo y en diferentes periodos de tiempo, se encontró que las cepas de MRSA tienen una estructura clonal conservada y que se cuenta con un número reducido de clonas con capacidad de diseminación global. Éstas se conocen como clonas de MRSA pandémicas. Se han identificado cinco clonas pandémicas: Ibérica, Brasileña, Húngara, Nueva York/Japón y Pediátrica ⁽³⁾.

La clona Ibérica se describió primeramente en España en 1989 y posteriormente se reportó en Portugal, Italia, Reino Unido, Alemania, Bélgica, Suiza, Francia, Polonia, República Checa y E.U. La clona Húngara se encontró por primera vez en hospitales de Hungría en 1998 y después se localizó en Tailandia. La clona Nueva York/Japón se determinó como una clona dominante en hospitales de Nueva York en 1998 y posteriormente se encontró en Japón. La clona Pediátrica se identificó en 1992 en un hospital pediátrico de Portugal y después se ha localizado en Polonia, E.U., Argentina, Colombia y Brasil.

La clona Brasileña descrita en un principio en Brasil en 1995, se ha diseminado en Portugal, Argentina, Uruguay, Chile y República Checa ⁽²⁹⁾. La determinación de las clonas de MRSA en América Latina es reciente, se encontró que la clona Brasileña es la que predomina y persiste en Brasil (97%), Argentina (86%), Uruguay (100%) y Chile (56%). Sin embargo, en México se encontró una clona diferente denominada M ⁽³⁰⁾. La clona M, detectada en 1997, en un hospital pediátrico de la Ciudad de México fue desplazada completamente en 2002 por la clona Nueva York/Japón, que se introdujo en el hospital en 2001 ⁽³¹⁾.

En otro estudio realizado con cepas aisladas en un hospital de Guadalajara se encontró el predominio de la clona Nueva York-Japón que apareció en 1997 y que



se ha diseminado de tal manera que actualmente está presente en la mayoría de las unidades del hospital ⁽³²⁾. En un hospital de tercer nivel de atención oncológica de la Ciudad de México en el 2010, se aisló la clona Nueva York/Japón como causante de un brote de infección nosocomial surgido a partir de un caso índice ⁽²³⁾. La presencia de la clona Nueva York Japón y la clona EMRSA-16 fue descrita recientemente en el Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez, de la Ciudad de México. ⁽³³⁾

La diseminación de las clonas de MRSA en amplias zonas geográficas, es probablemente reflejo de su habilidad para causar infecciones, persistir y diseminarse de una región a otra, y en diferentes continentes. Debido a la habilidad de las clonas de MRSA para causar infecciones, persistir y diseminarse, desde hace muchos años se han reportado brotes epidémicos de *S. aureus* por todo el mundo. Estos se han detectado en una gran variedad de lugares, tales como hospitales, centros de atención y clínicas y, en años recientes, en la comunidad ⁽³⁾.

Son pocas las clonas de MRSA-CA que se han diseminado a través del mundo, principalmente son dos, la USA300 y la USA400. La clona USA300 se ha localizado en jugadores de fútbol y presos, mientras que la clona USA400 se ha encontrado en varias poblaciones étnicas ⁽²²⁾. La clona USA300 ha causado brotes epidémicos de infecciones de la piel y tejidos blandos en individuos sanos en 21 estados de E.U., Canadá y Europa. Además del gen *pvl* y del *SCCmec* tipo IV, cuenta con un nuevo elemento genético móvil que codifica una vía para la desaminación de la arginina. Se le denomina elemento genético móvil para el catabolismo de la arginina ("arginine catabolism mobile element", ACME), y puede contribuir al crecimiento y supervivencia de la clona USA300. Este elemento se encuentra normalmente en *S. epidermidis*, por lo que se sugiere una transferencia a partir de estos estafilococos a la clona USA300 ⁽³⁴⁾. La presencia de la clona USA 300 en México fue reportada en 2011 en cepas colectadas en un hospital de Monterrey, NL. ⁽³⁵⁾



La introducción de técnicas de tipificación molecular en investigaciones epidemiológicas ha proporcionado nuevas herramientas para investigar el origen y las vías de difusión de las cepas de MRSA no sólo entre los pacientes en un hospital, sino también entre hospitales de diferentes países o incluso a través de diferentes continentes. Una de las conclusiones interesantes que han surgido de estudios internacionales de vigilancia al utilizar esas técnicas de tipificación molecular es que relativamente pocas de las clonas de MRSA han sido responsables de una fracción desproporcionadamente grande de todas las enfermedades causadas por cepas de MRSA en todo el mundo. Además, estos estudios también indican un alto grado de especificidad geográfica en la propagación de diversos linajes de MRSA ⁽³⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las características moleculares de las cepas de *S. aureus* meticilino resistentes (MRSA) aisladas en pacientes del Hospital General “Dr. Gea González”?

JUSTIFICACIÓN

El surgimiento del MRSA-CA en la comunidad y la presencia del MRSA-HA en el hospital es una amenaza con implicaciones clínicas importantes. Los tratamientos con antibióticos pueden no ser eficaces dando como resultado complicaciones que pueden condicionar la muerte del paciente. Las infecciones causadas por cepas resistentes a la meticilina pueden ser más difíciles de manejar y con un costo mayor, por lo que el disminuir la utilización de los antibióticos que favorecen la selección de cepas resistentes es un paso esencial para controlar el surgimiento de estas cepas en los hospitales y en la comunidad.



Por otra parte, ante la aparición simultánea en tiempo y lugar de infecciones causadas por los MRSA, resulta de suma importancia determinar si se trata de la misma cepa en todos los casos, lo que representaría un brote, o por el contrario, se trata de cepas diferentes con una coincidencia temporo-espacial casual.

En el Hospital “Dr. Manuel Gea González”, las infecciones por MRSA ocupan un lugar importante (4º lugar) y se desconocen las características genéticas de las cepas aisladas, por lo que resulta importante realizar un análisis epidemiológico-molecular para conocer dichas características.

La tipificación molecular, permite determinar si un grupo de cepas de una especie en particular es clonal, es decir, provienen de un precursor común. Este proceso desempeña un importante rol en la comprensión de la epidemiología de los MRSA y la evaluación de la efectividad de las medidas de control de las infecciones y prescripción de antimicrobianos

Se deben establecer las estrategias más efectivas para prevenir la emergencia y diseminación de cepas de MRSA-CA y MRSA-HA. El control de infecciones en los hospitales juega un papel importante.

Las estrategias en la comunidad deben enfatizar la detección oportuna, el tratamiento antimicrobiano adecuado y la optimización de las medidas básicas de higiene.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar las características moleculares de cepas de MRSA aisladas en pacientes del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”



Objetivos específicos

1. Detectar la presencia del gen *pvI* en los aislamientos de MRSA colectados para diferenciar entre MRSA-HA y MRSA-CA.
2. Determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas
3. Determinar si las cepas estudiadas se encuentran relacionadas con clonas de distribución mundial
4. Describir los factores de riesgo presentes en los pacientes en los que se aislaron las cepas de MRSA-HA y MRSA-CA

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño

Se trata de un estudio descriptivo, abierto, observacional y transversal

Universo de estudio

El Hospital General “Dr. Manuel Gea González” es un hospital de segundo nivel de atención ubicado en la zona sur de la Ciudad de México, que presta atención médica a población no asegurada tanto del Distrito Federal y zona metropolitana como del interior de la república. Cuenta con 212 camas censables y 89 no censables, 13 quirófanos, unidades de urgencias, de terapia intensiva, tócología, planificación familiar, endoscopia diagnóstica y terapéutica y los auxiliares de diagnóstico y tratamiento, patología clínica, radiología e imagen, medicina nuclear, anatomía patológica, citología, medicina transfusional y genética con área clínica y de laboratorio, rehabilitación con áreas de fonoaudiología y terapia física.

Las actividades sustantivas se proporcionan en tres áreas básicas, medicina preventiva, atención curativa y rehabilitación. El hospital cuenta en el área asistencial con 160 médicos, 430 enfermeras, 239 técnicos y 28 profesionales paramédicos.



Las cepas incluidas en este estudio fueron colectadas previamente por la sección de Microbiología del Laboratorio Clínico del Hospital “Dr. Manuel GEA González” en el periodo de Agosto 2011- Agosto 2012 bajo la autorización de la Jefa del Departamento del Laboratorio Clínico y el conocimiento del Jefe del Departamento de Epidemiología del hospital (se anexa copia) y fueron utilizadas para el análisis molecular, una vez autorizado el protocolo de estudio por los comités del hospital.

Tamaño de la muestra

Universo de cepas de MRSA colectadas en el periodo de Agosto 2011- Agosto 2012. Se aislaron un total de 109 cepas de MRSA de secreción de heridas, tejidos blandos, hemocultivos, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, hueso etc. de pacientes hospitalizados. El tamaño de muestra para el presente estudio incluyó solo las cepas de MRSA que se lograron guardar en el Laboratorio de Microbiología del Hospital, durante este mismo periodo (Agosto 2011-Agosto 2012); n=50 que representó el 45.8% del universo de MRSA aislados.

Población de estudio: 50 cepas MRSA, que fueron identificadas y guardadas por el Laboratorio de Microbiología del Hospital “Dr. Manuel GEA González”, aisladas de procesos invasores.

Criterios de Inclusión.

Cepas puras de MRSA, aisladas de pacientes hospitalizados en Hospital “Dr. Manuel Gea González”, consideradas como potenciales patógenos y no contaminantes, resistentes a oxacilina, solo se incluyó una cepa por paciente.

Criterios de exclusión.

Cepas de MRSA aisladas en exudados faríngeos, nasales y en orina.



Criterios de eliminación.

Todas aquellas cepas identificadas inicialmente en el laboratorio del Hospital “Dr. Manuel Gea González” como MRSA y que durante la re identificación en el laboratorio del INSP no fueron MRSA.

Definición de variables

Nombre de Variable	Definición de Variable	Tipo	Medición
HA-MRSA	Infección adquirida durante la hospitalización, producida por MRSA hospitalario	Cualitativa Nominal	Si / No
CA-MRSA	Infección presente al momento de ingreso al hospital, producida por MRSA comunitario.	Cualitativa Nominal	Si/No
Clona	Célula perteneciente a un grupo idéntico ó descendiente de un antepasado común.	Cualitativa Categórica	HA-MRSA: Ibérica, Brasileña, Húngara, New York-Japón, Pediátrica CA-MRSA: USA300 , USA400
Resistencia antimicrobiana	Resistencia generada por las cepas de MRSA a la acción de uno o varios antibióticos	Cualitativa Categórica	HA-MRSA: Resistente a múltiples antibióticos CA-MRSA: Resistente a algunos β -lactámicos y eritromicina
SCC _{mec}	Tipos de casetes cromosomales estafilocócicos elemento central de la resistencia a metilina en <i>S. aureus</i>	Cualitativa Categórica	HA-MRSA: Tipos I, II, III CA-MRSA: Tipos IV, V



<i>pvl</i>	Factor de virulencia de <i>S. aureus</i> que participa en la adhesión y adquisición de nutrientes para el microorganismo y sirve también para evadir la respuesta inmune del huésped.	Cualitativa Dicotómica	Sí = CA-MRSA No= HA-MRSA
Sexo	Característica, clase o estilo que distinguen a una persona	Cualitativa	Hombre / Mujer
Edad	Años de vida cumplidos a la fecha	Cuantitativa continua	1,2,3,4,5.....
Servicio	Lugar del hospital donde se encuentra internado el paciente	Cualitativa	Medicina interna Cirugía Gral. Ortopedia Cirugía Plástica Ginecología Pediatria Urgencias Adultos Urgencias Pediatria Tococirugia
Días de estancia hospitalaria (DEH)	Días que ha permanecido el paciente en hospitalización	Cuantitativa continua	1,2,3,4,5...
Diagnósticos principales	Diagnósticos principales del paciente al momento del aislamiento del MRSA	Cualitativa Politómica	Neumonía, Diabtetes, Hipertensión, Sepsis...
Tratamiento antibiótico	El paciente se encuentra con tratamiento a base de algún antibiótico	Cualitativa Politómica	ceftriaxona, amikacina, eritromicina, etc...
Medios Invasivos	Presencia de uno o varios medios que invaden el cuerpo con fin terapéutico, por lo general punzan o cortan la piel o se insertan dentro del cuerpo	Cualitativa Politómica	Sonda vesical Catéter periférico Catéter central Ventilación mecánica
Sitio de aislamiento	Lugar en el que fue aislado el MRSA	Cualitativa Politómica	Secreción bronquial, sangre, secreción de herida, etc...



Descripción de procedimientos

Las 50 cepas de MRSA que se incluyeron durante el periodo de estudio fueron transportadas al Laboratorio 1 Planta alta del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública por el investigador principal.

En el Laboratorio de Evaluación de Vacunas del CISEI se determinó el perfil de susceptibilidad a antibióticos de las cepas de MRSA colectadas, de acuerdo con las guías del CLSI 2012. Se hizo la prueba de Kirby Bauer con el disco de cefoxitina de 30ug, las cepas resistentes a oxacilina fueron procesadas por el método automatizado de Microscan® para determinar el perfil de susceptibilidad a penicilina, oxacilina, amikacina, amoxicilina, cefotaxima, cefalotina, cefazolina, imipenem, cotrimoxazol, eritromicina, claritromicina, clindamicina, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, rifampicina, tetraciclina y vancomicina.

El perfil clonal fue determinado a través de electroforesis de campos pulsados (PFGE) por métodos ya descritos⁽³⁵⁾; la interpretación de los patrones de PFGE se realizó siguiendo los criterios de Tenover⁽³⁶⁾ el casete cromosomal estafilocócico (*SCCmec*) y la presencia del gen *pvl* se realizó por PCR^(37,38)

Se realizó un dendrograma de distancia genética para comparar los patrones clonales encontrados con clones internacionales. Los patrones fueron agrupados por el método del grupo de pares no ponderados con medias aritméticas, y los coeficientes de similitud fueron generados a partir de una matriz de similitud calculada con el coeficiente de Jaccard.

Se llenó un formato de recolección de datos y factores de riesgo (se anexa formato) con la información clínica epidemiológica para cada cepa colectada.



La información fue capturada para la generación de una base de datos en Excel y posteriormente fue complementada y analizada con los resultados del análisis molecular de las cepas.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Debido al limitado número de cepas de *S. aureus* metilino resistente recolectadas para su análisis en el periodo estipulado no se pudieron hacer inferencia de los resultados hacia otras poblaciones.

RECURSOS MATERIALES Y FINANCIEROS

El trabajo se realizó en el laboratorio 1 planta alta del CISEI-INSP en donde se contó con el equipo y reactivos necesarios para que el estudiante cumpliera con los objetivos planteados. Equipo de electroforesis de campos pulsados, baño María, centrifuga, incubadora de O^2 , pipetores automáticos, ultracongeladores - $70^{\circ}C$, refrigeradores de $4^{\circ}C$, congeladores de $-20^{\circ}C$. Medios de cultivos para microbiología, reactivos y soluciones de biología molecular.

La directora de tesis contó con el financiamiento del proyecto UCP/CISEI/1110 en la apertura programática del INSP. Todos los insumos y recursos necesarios para el desarrollo del proyecto fueron proporcionados por el Departamento de Evaluación de Vacunas del CISEI-INSP.

VALIDACIÓN DE DATOS

Se utilizó estadística descriptiva: medidas de tendencia central y dispersión: rango, media, mediana, moda, desviación estándar y proporciones.



CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos estuvieron de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección I, investigación sin riesgo, no requiere consentimiento informado.

En la presente investigación no se obtuvieron datos sensibles ni confidenciales del paciente. El permiso que se solicitó a la institución es la utilización de las cepas de MRSA previamente colectadas por el Laboratorio de Microbiología del Hospital “Dr. Manuel Gea González” y la recolección de los datos clínico-epidemiológicos presentados en el formato de recolección de datos, adjunto a este proyecto (hoja de captura de datos).

El proyecto fue sometido a la Comisión del Ética del INSP; la Dra. Maria Elena Velazquez Meza directora de tesis de la estudiante Sofía Hernández cuenta con la aprobación del curso Citi Program solicitado por la Comisión de Ética del INSP.

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

Los desechos biológicos Infecciosos: cultivos bacterianos en medios sólidos y líquidos y los desechos CRETI (corrosivos, reactivos, explosivos, tóxicos e inflamables) generados en el transcurso de la investigación, fueron registrados y dispuestos en el laboratorio 1 P.A de acuerdo a los lineamientos de bioseguridad del INSP. La Dra. María Elena Velázquez Meza directora de tesis del estudiante Sofía Hernández, cuenta con la aprobación del curso de Bioseguridad solicitado por la comisión de Bioseguridad del INSP.



Manejo y medidas de seguridad para el traslado de cepas.

Las 50 cepas incluidas en este estudio fueron transportadas en criotubos de 2ml con tapón de rosca, los cuales contienen 1ml de agar de soya tripticasa (TSA) (medio sólido). Los tubos fueron previamente rotulados con el número de cepa. En este medio se inoculó con una asa bacteriológica de calibre 10ul una asada de bacterias en el centro del agar; una vez inoculado el tubo este se cerro y se selló con papel Parafilm (**Imagen 1**).

Los tubos una vez inoculados se colocaron en una bolsa de plástico sellada y en un contenedor rígido de plástico diseñado para el transporte de muestras biológicas, mismo que fue contenido dentro de una caja de cartón rígida diseñada para el empaquetamiento y transporte aéreo, terrestre y marino de sustancias infecciosas: *IATA packing intruccion 650* esta caja fue debidamente rotulada (**Imagen 2**). Una vez cerrada la caja, esta fue transportada vía terrestre por la Médico Residente y responsable del proyecto Sofía de Fátima Hernández Gasca al laboratorio 1 planta alta del CISEI. El uso de medios sólidos (TSA) para el transporte de las cepas, impide que existan derrames de la muestra biológica.

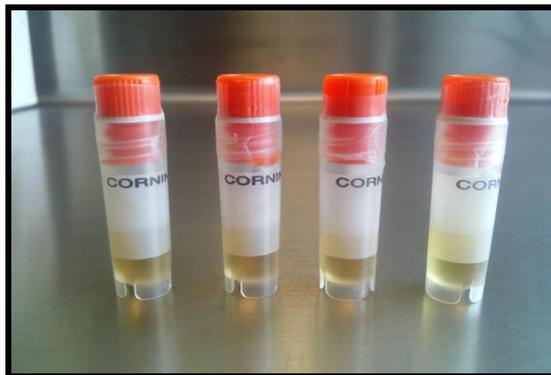


Imagen 1. Criotubos de 2ml con tapón de rosca





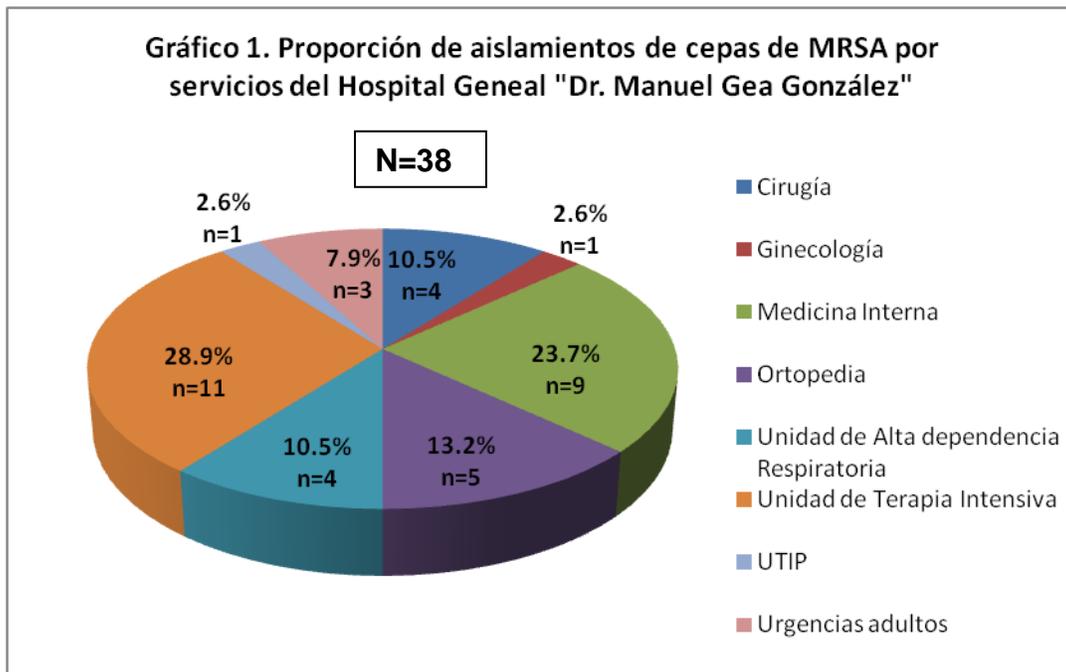
Imagen 2. Contenedor rígido de plástico para el transporte de muestras biológicas y caja de cartón rígida para el empaquetamiento y transporte aéreo, terrestre y marino de sustancias infecciosas: *IATA packing instruction 650*



RESULTADOS

De las 50 cepas recolectadas, 12 fueron eliminadas ya que al ser analizadas en el laboratorio del CISEI no fueron coagulasa positivas. Las cepas analizadas fueron aisladas en 38 pacientes de los cuales 19 (50%) fueron de sexo femenino y 19 (50%) masculino. La mediana de edad de los pacientes se encontró en los 49 años, con un valor mínimo de 0 y máximo de 82 años.

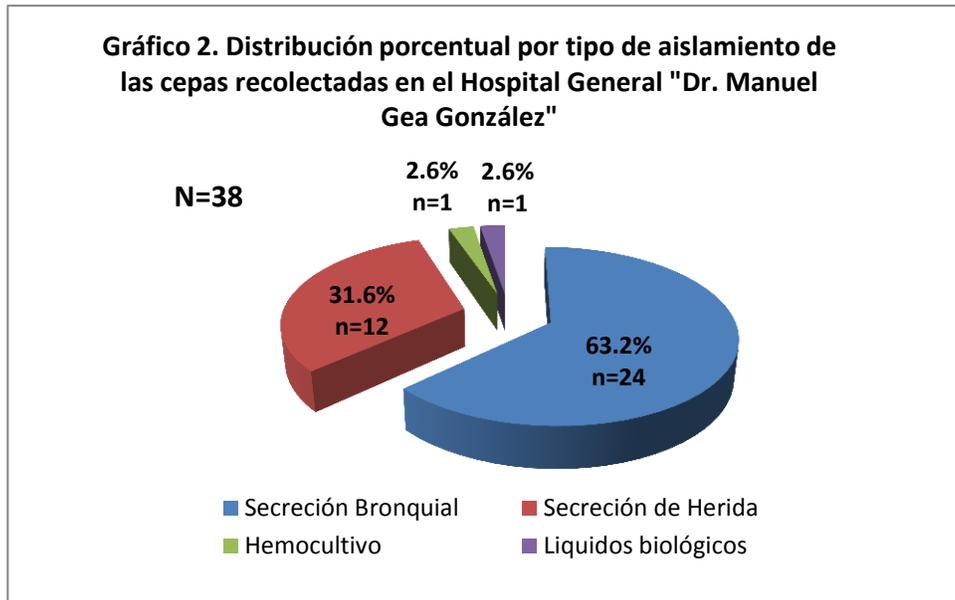
Los servicios de hospitalización en los que se encontró el mayor número de aislamientos fueron la Unidad de Terapia Intensiva con el 29% (n=11); seguida por el servicio de Medicina Interna con 23.7%. La proporción de aislamiento en los diferentes servicios del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" se muestran en el **Gráfico 1**.



Fuente: Expedientes clínicos de pacientes del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



Del total de los aislamientos (n= 38), 24 fueron de secreción bronquial y 12 de secreción de heridas, sólo un aislamiento fue de hemocultivo y otro más de líquidos biológicos. Las proporciones por tipo de aislamiento de presentan el **Gráfico 2.**



Fuente: Expedientes clínicos de pacientes del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

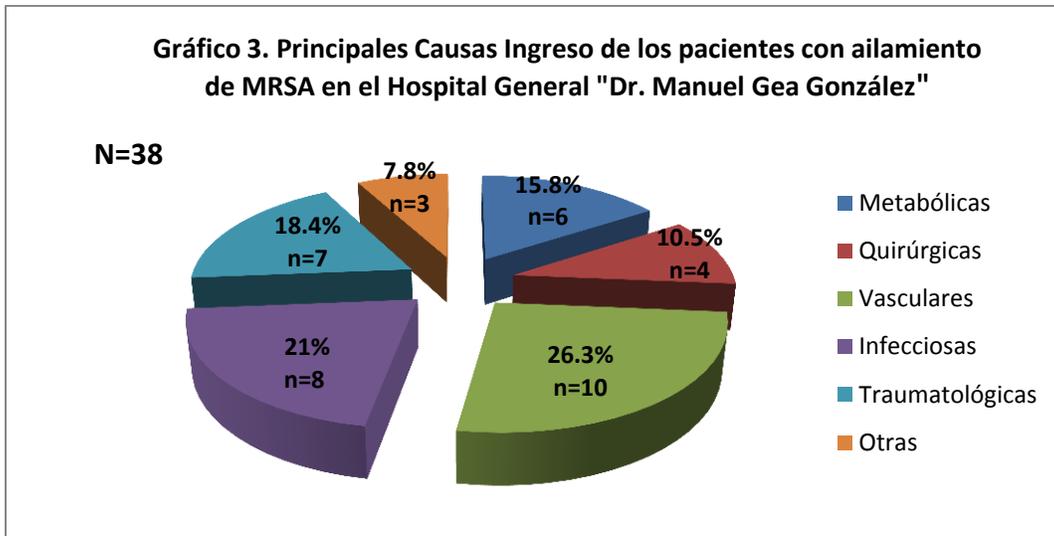
Dentro de los dispositivos invasivos, se encontró ventilación mecánica 71.5% (n=27), sonda vesical 68.4% (n=26), el 57.8% (n=22) tuvieron catéter venoso central y el 31.5% (n=12) fueron intervenidos quirúrgicamente.

Es importante mencionar que casi el 80% de los pacientes presentaban más de un medio invasivo y el 50% de ellos contaban hasta con 3 medios invasivos a la vez.

La media de días de estancia hospitalaria de los pacientes fue de 25.9, con una desviación estándar de 12.6. Se observó una media de días de uso de antibiótico total de 19.9 y una desviación estándar de 10 días

Los diagnósticos principales de ingreso de los pacientes fueron muy variados por lo que fueron clasificados en 6 categorías como se presenta en el siguiente gráfico.





Fuente: Expedientes clínicos de pacientes del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Se encontró que las principales causas de ingreso hospitalario fueron los problemas vasculares con el 26.3% (n=10) seguidas por 8 pacientes ingresaron por alguna causa de tipo infeccioso 21%.

En la tabla 1 se resumen las características demográficas y clínicas de pacientes con aislamiento de *S. aureus* resistentes a meticilina



Tabla 1. Características demográficas y clínicas de pacientes con aislamiento de *S. aureus* resistentes a meticilina (n=38)

CARACTERÍSTICA	PACIENTES CON MRSA
Media de edad (años) ± D.E	52 ± 19.3
Sexo	
Femenino, n (%)	19 (50)
Masculino, n (%)	19 (50)
Sitio de aislamiento, n (%)	
Secreción Bronquial	24 (63.1)
Secreción de herida	12 (31.5)
Hemocultivo	1 (2.6)
Líquidos biológicos	1 (2.6)
Pacientes con medio invasivo, n (%)	
Ventilación mecánica	27 (71)
Catéter venoso central	22 (57.8)
Sonda Vesical	26 (68.4)
Cirugía previa	12 (31.5)
Días de Estancia hospitalaria, media (D.E)	25.9 (12.6)
Media días tratamiento Antibiótico (D.E)	19.9 (10)

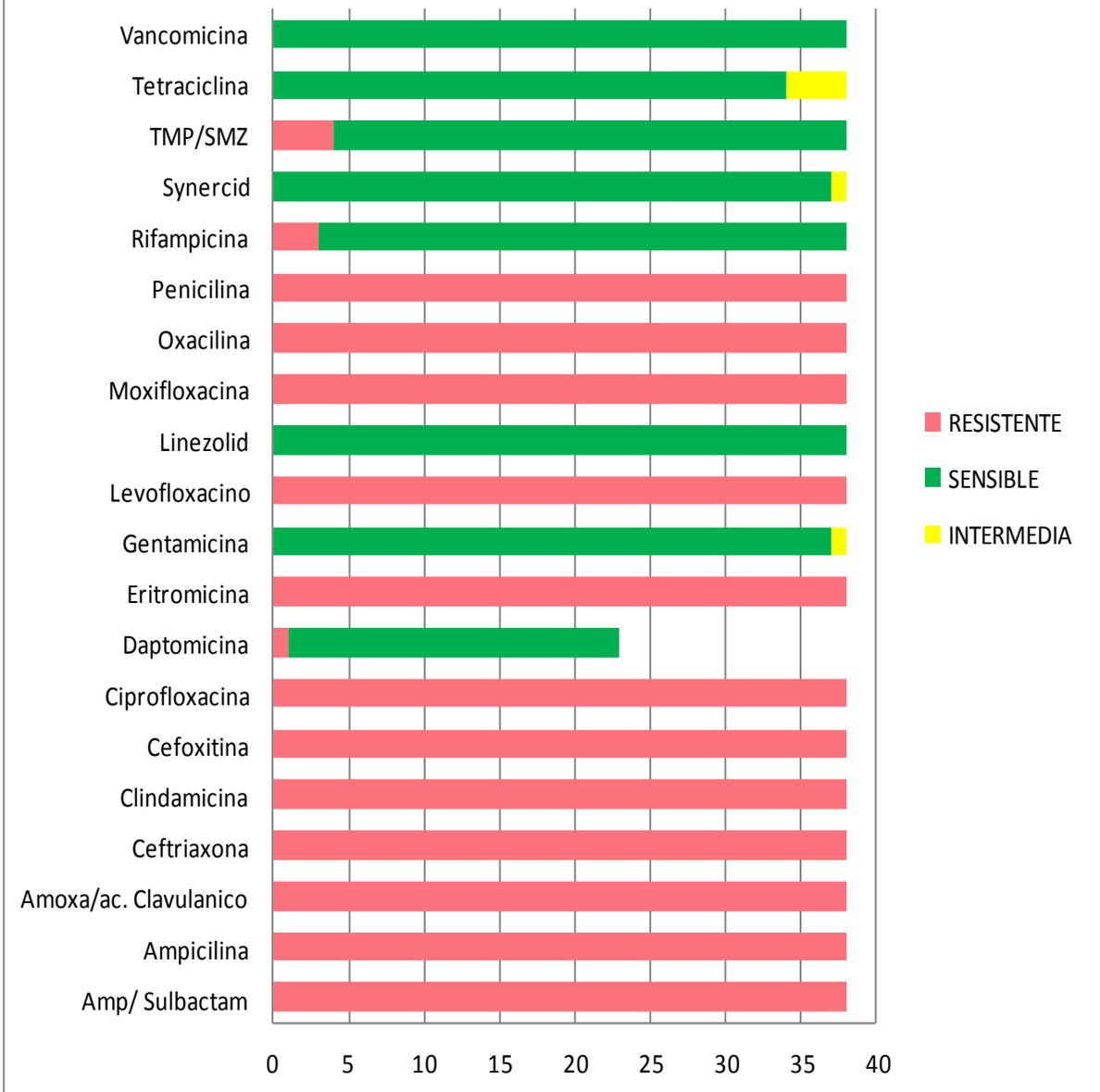
n (número), D.E (Desviación estándar)

Fuente: Expedientes clínicos de pacientes del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Los perfiles de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas, mostraron que los 38 aislamientos fueron resistentes a 12 diferentes antibióticos. No se encontraron cepas resistentes a vancomicina, tetraciclina, gentamicina, linezolid, quinupristina y dalfopristina. Solo cuatro de las cepas fueron resistentes a TMP/SMX y tres a rifampicina. **Grafico 4.**



Gáfico 4. Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de MRSA aislada en el Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



Fuente: Reportes de Microbiología de los registros clínicos Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



ANÁLISIS MOLECULAR

A través del análisis por electroforesis de campos pulsados de las 38 cepas aisladas, se identificó un único tipo clonal denominado clona Nueva York-Japón (NY) (n=16), con 10 subtipos (NY1 (n=1), NY2 (n=1), NY3 (n=5), NY4 (n=4), NY5 (n=1), NY6 (n=2), NY7 (n=2), NY8 (n=1), NY9 (n=4), NY10 (n=1), los cuales fueron diferenciados de acuerdo a los criterios de Tenover ⁽³⁶⁾ y que difirieron hasta en 3 posiciones de sus bandas.

Representantes de la clona NY y subtipos, se compararon con cepas que pertenecen a clonas internacionales de MRSA caracterizadas previamente; control interno NCTC 8325, cepa BK2464 (clona Nueva York / Japón), cepa HPV107 (clona Ibérica). La clona NY descrita en este trabajo mostró un alto grado de similitud con la clona Nueva York / Japón BK2464. **Fig. 1**

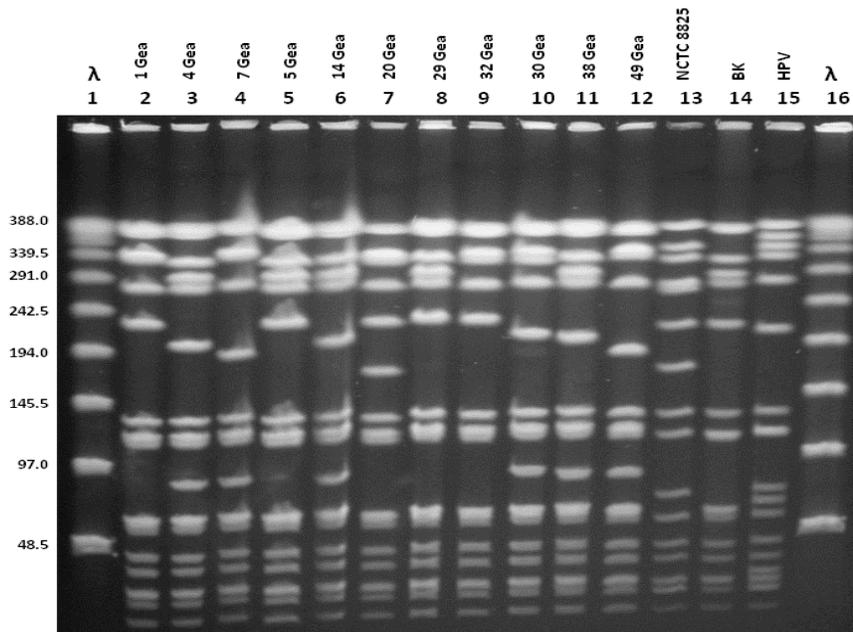


Fig. 1. Gel de electroforesis de campos pulsados de las cepas de MRSA aisladas en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. Carriles 2-12. Carril 1 y 16 marcador de peso molecular lambda ladder, carril 13 cepa control NCTC8325; carriles 14 y 15 cepas representativas de clonas de MRSA internacionales BK2464 (clona Nueva York/Japón) y HPV107 (clona Ibérica).



Para la identificación del casete cromosomal *SCCmec*, se selecciono una cepa representativa de la clona NY y de los 10 subtipos encontrados; todas ellas mostraron un patrón relacionado con el *SCCmec* tipo II. **Fig. 2.**

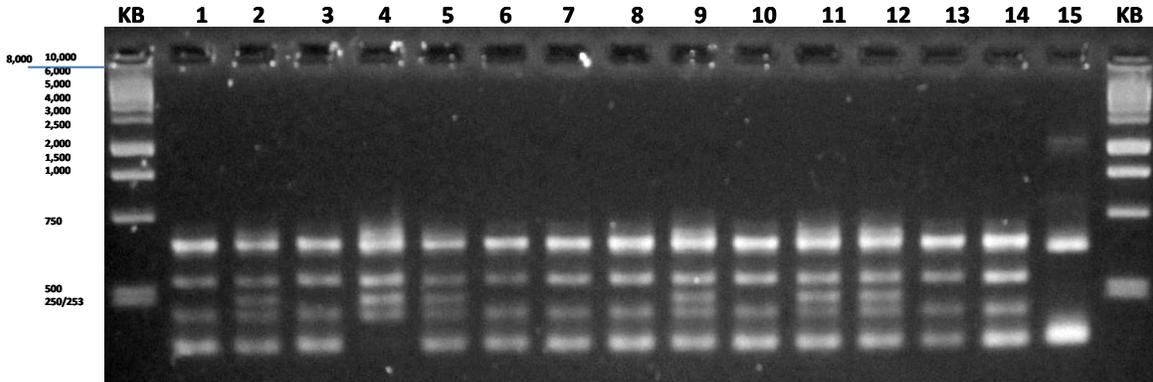


Fig. 2 Gel de PCR para *SCCmec*. Carriles 1-14 (Cepas de MRSA aisladas en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”); 15 control (USA300); KB (Marcador de peso molecular).

Como se observa en la figura 2, ninguna de las cepas de MRSA aisladas del Hospital Gea González se encontró relacionada con el *SCCmec* tipo IV; representado en el gel por la cepa USA 300 (carril 15).

Al realizar el gel de PCR para búsqueda del gen de *pvl*, no se encontró presencia de este en ninguna de las cepas representantes de la clona NY y sus subtipos.

Fig. 3.

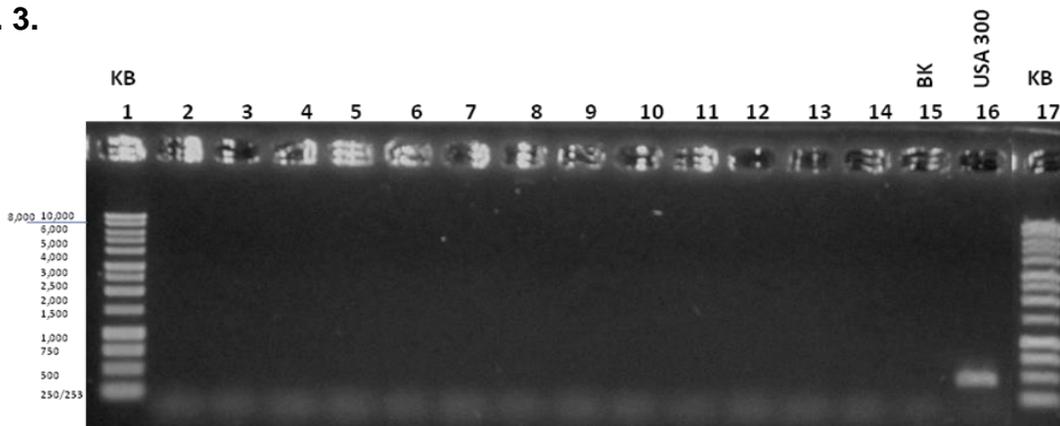
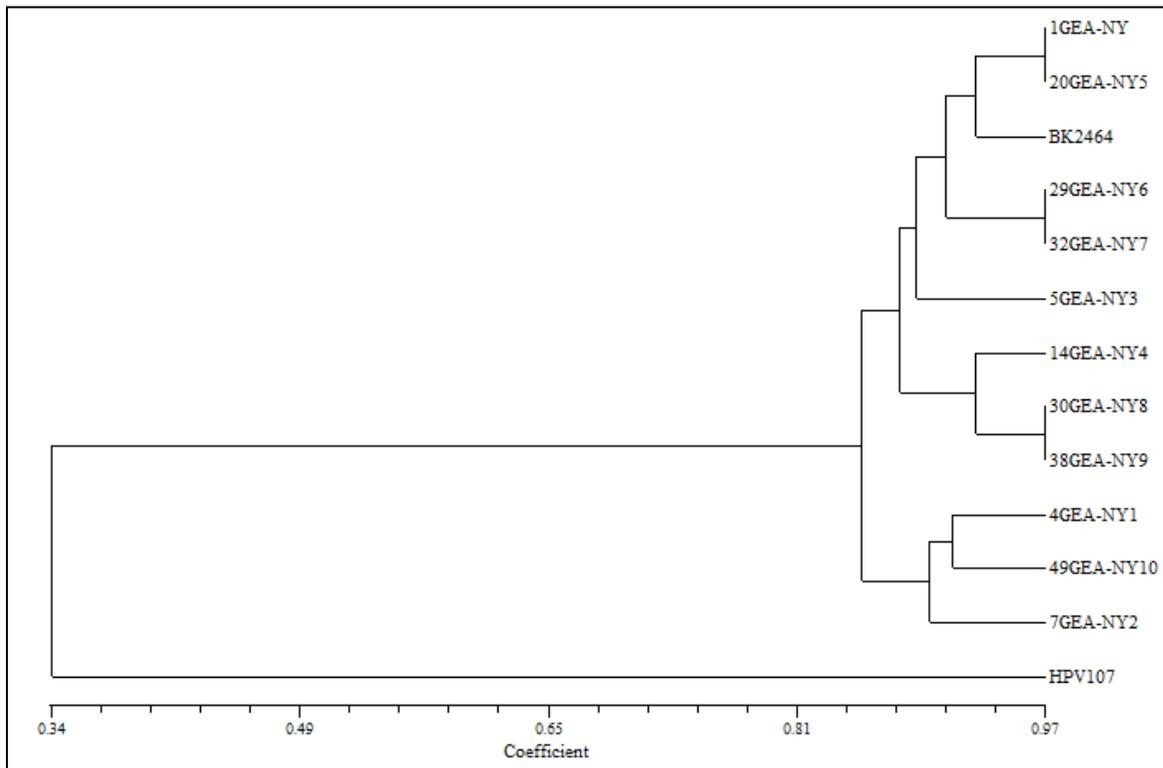


Fig. 3 Gel de PCR para *pvl*. Carriles 2-14 (Cepas MRSA aisladas en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”); carril 15 (BK control negativo); carril 16 (USA300 control positivo); carriles 1 y 17 marcador de peso molecular 1Kb.





Los resultados mostraron que la clona NY y sus subtipos tuvieron un 97% de similitud con la clona Nueva York/ Japón (BK2464) y un coeficiente de similitud de 34% con la clona Ibérica (HPV107). **Fig. 4.**



DISCUSIÓN

El presente estudio describe las características epidemiológicas y moleculares de las cepas de MRSA aisladas en pacientes hospitalizados en los diferentes servicios del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. Un solo fenotipo multiresistente predominó en las cepas de MRSA aislada en el periodo de estudio.

Casi el 30% de los pacientes en los que fueron aisladas las cepas de MRSA en el Hospital Gea González, estuvieron hospitalizados en el área de terapia intensiva de adultos, 70% del total de pacientes con MRSA requirieron ventilación mecánica. El tiempo promedio de estancia hospitalaria fue de casi 26 días.

En coincidencia se ha reportado que el área hospitalaria con mayor frecuencia de infecciones nosocomiales es la unidad de terapia intensiva. El tiempo de estancia hospitalaria se ha descrito como un factor determinante para el desarrollo de las infecciones nosocomiales. ⁽²⁵⁾. Las infecciones más frecuentes son en vías urinarias, seguidas por las de herida quirúrgica, bacteriemias y neumonías, sin embargo en este estudio la neumonía asociada a ventilación fue la más frecuente (63.1%).

Las cepas aisladas se caracterizaron por presentar una resistencia antimicrobiana a varios antibióticos, incluidos los β -lactámicos. Un perfil similar de multiresistencia en este microorganismo, ha sido reportado en otros estudios ^(39, 40). A diferencia de otros países en los que se han reportado cepas resistentes a vancomicina (VRSA) ^(10, 11,12), en este estudio no se encontró tal resistencia.

En este estudio se detectó una única clona multiresistente en 48 aislamientos que representan el 46% del total (n=109) de MRSA aisladas en el hospital en el periodo de un año. Esta clona predominante llamada Nueva York-Japón (NY) presentó 10 diferentes subtipos, de manera similar 40 subtipos fueron reportados



en 132 aislamientos de MRSA pertenecientes a la clona Nueva York/Japón que fueron recolectadas en un año en un hospital en Tokio, Japón ⁽³²⁾. Esta exitosa adaptación de las clonas pandémicas a los ecosistemas de muchos diferentes hospitales puede explicar la gran tendencia para generar la variabilidad genética observada en esta clona.

Cuando comparamos la clona (NY) descrita en este trabajo con clonas internacionales caracterizadas previamente, se encontró una alta similitud con el patrón de PFGE y tipo de SCC*mec* de la cepa prototipo Nueva York / Japón BK2464, descrita inicialmente en hospitales de Nueva York en 1998 y posteriormente encontrada en Japón. ⁽³⁾

Otras cepas de MRSA relacionadas con la clona Nueva York /Japón han sido descritas en nuestro país. En un hospital pediátrico de la Ciudad de México se encontró una clona de MRSA denominada “C”, esta clona surge en el 2001 y reemplaza totalmente a una clona de MRSA más susceptible que predominó en el hospital desde 1997 hasta el 2001. ⁽³¹⁾. En otro estudio realizado con cepas aisladas en un hospital de Guadalajara se encontró el predominio de la clona Nueva York-Japón que apareció en 1997 y que se ha diseminado de tal manera que actualmente está presente en la mayoría de las unidades del hospital ⁽³³⁾. En un hospital de tercer nivel de atención oncológica de la Ciudad de México en el 2010, se aisló la clona Nueva York/Japón como causante de un brote de infecciones nosocomiales que surgió a partir de un caso índice ⁽²¹⁾. La presencia de la clona Nueva York Japón y la clona EMRSA-16 fue descrita recientemente en el Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez, de la Ciudad de México. ⁽³²⁾

Los resultados de la detección de *pvl* mostraron que ninguno de los aislamientos recolectados en el Hospital Gea González amplificó este producto. En Estados Unidos, dos clonas, denominadas por el CDC como USA 300 y USA 400, fueron identificadas como los primeros tipos clonales causantes de infección por MRSA



adquirida en la comunidad. Estas clonas frecuentemente se encuentran asociadas con el gen de *pvl* y con la presencia de *SCCmec* tipo IV ^(21, 34).

Esta comprobado que el control y la eventual eliminación del desarrollo de MRSA en los hospitales es posible si son tomadas medidas estrictas que incluyan la educación continua del personal de salud, aislamiento por contacto de los pacientes positivos a MRSA, detección sistemática de personal expuesto a MRSA, y estudio y seguimiento de pacientes positivos y expuestos a MRSA en situación de epidemia. ⁽³²⁾

Sin embargo, instituciones como el hospital del presente estudio, sufren de una gran sobrecarga de trabajo, escasez de personal y pobre adherencia a los lineamientos sobre lavado e higiene de manos, lo que dificulta el control de las clonas de MRSA endémicas. Más aún, estos intentos de control, deben tomar en consideración la presión causada por el inapropiado uso de antibióticos en los hospitales de México, y los esfuerzos deben ajustarse estrictamente a las recomendaciones para la prevención y control de infecciones intrahospitalarias que son publicadas a nivel nacional e internacional.



ANEXOS 1

Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Hoja de captura de datos y factores de riesgo

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN:

Caracterización molecular de cepas de *S. aureus* meticilino resistentes (MRSA) aisladas en pacientes del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Numero de Cepa: _____

Reporte Elaborado por: _____

Fecha de Aislamiento : _____

Información del Paciente (FACTORES DE RIESGO)

Edad (años): _____

Sexo: Masculino Femenino

Servicio de Hospitalización _____

Diagnósticos Principales: _____

Días de Estancia Hospitalaria: _____

Antibiótico Si ___ No _____

Especifique:

_____ Día _____

_____ Día _____

_____ Día _____

Medios Invasivos

Ventilación Mecánica Catéter Central Catéter Periférico Sonda Vesical

Sitio de Aislamiento: _____

Información Microbiológica

Microorganismo (Género y Especie) _____

Métodos de Identificación Empleados: Bioquímicos Sistema (especifique) _____

Otro Especifique: _____

Resistencia: _____



ANEXO 2. CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA RECOLECCIÓN DE CEPAS

México D.F. a 15 de Noviembre de 2012

A QUIEN CORRESPONDA

Por medio de la presente se hace contar que la recolección de cepas de *S. aureus* meticilino resistente realizada en la Sección de Microbiología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" en el mes de agosto del 2011 y concluida en agosto del presente año, fue autorizada por la Jefa del Departamento de Laboratorio Clínico y con conocimiento del Jefe de División de Epidemiología Clínica y Medicina Preventiva para la realización del protocolo de investigación titulado: **Caracterización molecular de cepas de *S. aureus* meticilino resistentes (MRSA) aisladas en pacientes del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"** que será realizado por la residente de tercer año de la Especialidad en Salud Pública y Medicina Preventiva Sofía de Fátima Hernández Gasca. Es importante mencionar que estas cepas serán autorizadas para su análisis molecular, una vez que el proyecto de investigación haya sido aprobado por los Comités del Hospital.

Atentamente:



Q.F.B. Silvia Villanueva Recillas

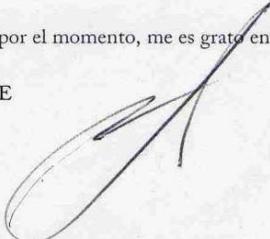
Jefa del Departamento de Laboratorio Clínico

ccp. Residente.- Sofía de Fátima Hernández Gasca

ccp. Q.F.B. Silvia Villanueva Recillas



ANEXO 3. CARTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO HOSPITAL GEA GONZÁLEZ

 <p>SALUD SECRETARÍA DE SALUD</p>		<p>Hospital General Dr. Manuel Gea González Dirección de Enseñanza e Investigación Subdirección de Investigación Biomédica Comités de Investigación y de Ética en Investigación</p>
<p>16 enero de 2013. Oficio No. CIEI/06/13.</p>		
<p>DR. RAFAEL FIGUEROA MORENO INVESTIGADOR RESPONSABLE PRESENTE.</p>		
<p>Comunicamos a usted que el protocolo “Caracterización molecular de cepas de <i>S. Aureus</i> meticilino resistentes (MRSA) aisladas en pacientes del Hospital General Dr. Manuel Gea González”, fue presentado en la Primera Sesión Ordinaria de los Comités de Investigación y de Ética en Investigación, y los integrantes de las mismas le han otorgado el dictamen de:</p>		
<p>Aprobado</p>		
<p>Solicitándole que las variables correspondientes a los factores de riesgo que presenta en su hoja de captura de datos se incorporen en el cuadro de variables de estudio.</p>		
<p>El cambio sugerido deben ser entregados en impreso y electrónico con carta respuesta a este oficio, en la Dirección de Enseñanza con la Srita. Irma Cano Mendieta o en la Subdirección de Investigación, en un período no mayor a diez días hábiles a partir de la entrega de esta notificación, para poder asignarle número de registro. De no ser así el protocolo tendrá que ser sometido a los Comités, realizando nuevamente todo el trámite correspondiente y en espera de asignación de fecha para presentación.</p>		
<p>Sin otro particular por el momento, me es grato enviarle un cordial saludo.</p>		
<p>ATENTAMENTE</p>		
		
<p>DR. JORGE ANDRÉS PEÑA ORTEGA PRESIDENTE</p>		
<p>c. c. p. , Sofía De Fátima Hernández Gasca – Investigador Principal M. SR*ioem</p>		
		
<p>Calzada de Tlalpan 4800, Col. Sección XVI, C.P. 14080, Delegación Tlalpan, México, D.F., Tel. Comutador (55) 4000-3000, ext. 3050, directo 4000-3050, correo electrónico: direnseinves@yahoo.com.mx www.hospitalgea.salud.gob.mx</p>		



ANEXO 4. CARTA DE APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA INSP



Instituto Nacional
de Salud Pública

Generación de conocimiento
para el desarrollo de políticas de salud

Comisión de Ética

Cuernavaca, Morelos, a 25 de marzo de 2013

CI Tesis: 555

Sofía de Fátima Hernández Gasca
Especialidad en Salud Pública y Medicina Preventiva
Presente

En relación a su protocolo de tesis titulado *“Caracterización molecular de cepas de S. aureus meticilino resistentes (MRSA) aisladas en pacientes del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”*, me permito informarle que los miembros de esta Comisión han acordado otorgarle el dictamen de:

Aprobado

Le informamos que esta aprobación tiene vigencia **hasta el 24 de marzo del 2014.**

Renovación anual: Si su estudio se extiende por un periodo mayor, favor de presentar el formato de *Renovación anual* con 45 días de anticipación a su fecha de vencimiento. Favor de solicitar vía electrónica el formato correspondiente a esta Comisión. **Nota: Es responsabilidad de usted como Investigador Responsable de este proyecto solicitar la renovación anual de su estudio con suficiente anticipación.**

Consentimiento: Para obtener el consentimiento de los sujetos humanos de su estudio únicamente se deberán utilizar los materiales que han sido aprobados y sellados por esta Comisión.

Addenda/Modificaciones: Le recuerdo que cualquier cambio o actualización en los procedimientos de este estudio deberá ser enviado a esta Comisión previo a su implementación.

Le solicito atentamente que en caso de ocurrir algún cambio o actualización de datos que afecten el planteamiento actual de su protocolo de tesis, lo comunique oportunamente para someterlo a consideración de esta Comisión.

Atentamente

Dra. Julieta Ivone Castro Romero
Presidenta Comisión de Ética

ccp. Mtra. Janet Real Ramírez – Coordinador Especialidad en Salud Pública y Medicina Preventiva
Mtro. Miguel Ángel Reyes – Depto. Asuntos Escolares

Avenida Universidad 655
Cerrada Los Pinos y Caminera
Colonia Santa María Ahuacatitlán
62100 Cuernavaca, Morelos, México
com.: (777) 329 3000

www.insp.mx



REFERENCIAS

- 1 David, M. Z., Daum, R., S. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev. 2010 4: 616-687
- 2 Howe RA, Brown NM, Spencer RC. The new threats of Gram positive pathogens: re-emergence of things past. J Clin Pathol 1996; 49:444-9.
- 3 Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* metilino-resistente. Salud Pública Méx 2005; 47:381-7.
- 4 Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000; 13:16-34.
- 5 Herzer CM. Toxic shock syndrome: broadening the differential diagnosis. J Am Board Fam Pract 2001; 14:131-6
- 6 Saïd-Salim B, Mathema B, Braughton K, Davis S, Sinsimer D, Eisner W, et al. Differential distribution and expression of Panton-Valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 2005; 43:3373-9
- 7 Enright MC, Ashley AD, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:7687-92.
- 8 Johnson DRP, Howden PB, Bennett CM. *Staphylococcus aureus*: a guide for the perplexed. Med J Aust 2006; 184:374-5.
- 9 Mensa J, Barberán J, Linares P, et. al. Guía de tratamiento de la infección producida por *Staphylococcus aureus* resistente a metilina. Rev Esp Quimioter 2008; 21 (4): 234-258
- 10 Oliveira DC, Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemoter 2002; 46:2155-61
- 11 Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogenously resistant to vancomycin. Lancet 1997; 350:1670-1673.
- 12 Centers for Disease Control. Public health dispatch: Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*, Pennsylvania. Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51:902-903.
- 13 Kuroda M, Kuwahara-Arai K, Hiramatsu K. Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. Biochem Biophys Res Commun 2000; 269: 485-490.
- 14 Ávila Figueroa C, Casta Cruz M, Aranda Patrón E, León RA, Justiniano N, Pérez Ricárdez L, et al. Prevalencia de infecciones nosocomiales en niños: encuesta de 21 hospitales en México. Salud Pública Méx 1999; 41 (Supl 1):S18-S25.



-
- 15 Navarro-Navarro M, Moreno-Ibarra G, Castellón-Campaña, L. Sánchez-Maríñez, R. Rodríguez-Pesqueira, F. Sánchez-Padilla A.. Baja prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en cepas aisladas en el laboratorio clínico del hospital infantil del estado de Sonora. Bol Clin Hosp Infant Edo Son 2008; 25: 3-7.
- 16 Tiemersma EW, Bornzwaer LAM, Lyytikäinen O, Degener JE, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. Emerg Inf Dis 2004; 10: 1627-34.
- 17 R. Monina Klevens, Morrison, MA. Nadle J. ; et al. Invasive methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA. 2007; 298: 1763 - 1771.
- 18 Salvatierra G, Yehuda B. Resistencia antimicrobiana en las Américas. Magnitud del problema y su contención. Washington , D.C. OPS, 2000. XII, 268p.
- 19 Rolón AL, Reyes-Mar J, Sifuentes-Osornio J, et al. Red Nacional de Resistencia Bacteriana en México. Características epidemiológicas de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (SARO) en México. 2004. poster C34. XXX Congreso de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, AC. Mérida, Yucatán, México, 6-9 Julio, 2005.
- 20 Sifuentes-Osornio, J. Pérez-Patrigéon, S. Sepsis por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: la sombra de una amenaza permanente. Rev Invest Clin 2006; 58: 598-607.
- 21 Cornejo-Juárez P, Velásquez-Acosta C, Díaz-González A, Volkow-Fernández P. Tendencia del perfil de sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de sangre en un hospital oncológico (1998-2003). Salud Publica Mex 2005;47:288-293.
- 22 Ponce de León S. The needs of developing countries and the sources required. J Hosp Infect 1991;18 suppl A:376-381.
- 23 Ponce de León S, Rangel S. Organizing for infection control with limited resources. En: Wenzel RP, ed. Prevention and control of nosocomial infections. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993:82-88.
- 24 Ponce de León S, Rangel-Frausto M, Elías-López JI, Romero-Oliveros C, Huertas-Jiménez M. Infecciones nosocomiales: tendencias seculares de un programa de control en México. Salud Pública Méx 1999; 41
- 25 National Nosocomial Infectious Surveillance System (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004; 32:470-85.
- 26 Enright MC. Genome of an epidemic community-acquired MRSA. Lancet 2006; 367:705-6.
- 27 Centers for Disease Control and Prevention. 1981. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections—Michigan. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 30:185–187.
- 28 Saïd-Salim B, Mathema B, Kreiswirth BN. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. Infect Control Hosp Epidemiol 2003; 24:451-5



-
- 29 Marcos Vivoni A, Meurer Moreira B. Application of molecular techniques in the study of *Staphylococcus aureus* clonal evolution – A review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100:693-8.
- 30 Aires de Sousa M, Miragaia M, Santos SI, Avila S, Adamson I, Casagrande ST, et al. Three-Year assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. J Clin Microbiol 2001; 39:2197-205.
- 31 Velázquez-Meza ME, Aires de Sousa M, Echaniz AG, Solórzano SF, Miranda NG, Silva SJ, de Lencastre H. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City a 7 year period (1997 to 2003): Clonal evolution and impact of infection control. J Clin Microbiol 2004; 42: 3877-80.
- 32 Echániz Aviles G, Velázquez Meza ME, Aires de Sousa M, Morfín Otero R, Rodríguez Noriega E, Carnilla Barajas N, et al. Molecular characterization of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in a Mexican hospital (1999-2003). Clin Microbiol Infect 2006; 12:22-8.
- 33 Velazquez-Meza Maria Elena, Vázquez-Larios Rosario, Hernández Dueñas Ana Maria and Rivera Martínez Eduardo. Pulsed Field Gel Electrophoresis in Molecular Typing and Epidemiological Detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Gel Electrophoresis - Advanced Techniques, Ed. Dr. Sameh Magdeldin. ed. Intech Open Access Publisher, Rijedka, Croatia. 2012. ISBN: 978-953-51-0457-5. Pp.179-192
- 34 Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2006; 367:731-9.
- 35 Soares S, Kristinsson KG, Musser JM, Tomasz A. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. J Infec Dis, 1993. 168: 158-163
- 36 Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33:2233-2239.
- 37 Duarte C. Oliveira and Hermínia de Lencastre. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, July 2002, Vol. 46, No. 7. p. 2155–2161.
- 38 Jarraud, S., Mougél, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nèsmé, X., Etienne, J., and Vandenesch, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factor, agr groups (Alleles), and human disease. Infect. Immun. 2002. 70(2): 631-641.



39 David MZ, Medvedev S, Hohmann SF, et al. Increasing burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospitalizations at US academic medical centers, 2003e2008. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012;33:782e789.

40 Aires de Sousa M, de Lencastre H, Santos S_anches I, et al. Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokyo, Japan. *Microb. Drug. Resist.* 2000;3:253-258.

