

BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA AL CONTROL DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS

DRA. ELIZABETH PALAVECINO R.
ASSISTANT PROFESSOR OF PATHOLOGY.
DIRECTOR OF CLINICAL MICROBIOLOGY.
WAKE FOREST UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL.
WINSTON-SALEM, NC. USA.
EMAIL: EPALAVECINO@HOTMAIL.COM

RESUMEN

*La prevalencia de resistencia antimicrobiana en patógenos que causan infecciones intrahospitalarias ha seguido aumentando, particularmente en pacientes de Unidades de Cuidado Intensivo (UCI). Información reciente proporcionada por el Center for Disease Control (CDC) muestra que en Estados Unidos la prevalencia de resistencia a meticilino en *S. aureus* es de un 60% y que la prevalencia de enterococos resistente a vancomicina es cercana a un 30%. Las infecciones intrahospitalarias causadas por *S. aureus* meticilino resistente (SAMR) y enterococo resistente a vancomicina (EVR) están asociadas con una alta morbilidad, mortalidad y grandes costos de hospitalización. Organizaciones gubernamentales y profesionales han recomendado programas de vigilancia activa para identificar, prevenir y controlar infecciones causadas por SAMR y EVR dentro de los hospitales. Con el fin de identificar rápidamente aquellos pacientes que deben ser puestos en aislamiento de contacto se necesitan métodos de screening que sean rápidos y precisos. Los objetivos de esta presentación son discutir la significancia clínica de las infecciones intrahospitalarias y describir los métodos de biología molecular disponibles para la detección de SAMR y su aplicación en el control de estas infecciones.*

SUMMARY

*The prevalence of antimicrobial resistance among pathogens causing healthcare associated infections continues to increase, particularly in Intensive care unit (ICU) patients. Recent data from the Centers for Disease Control (CDC) show that in United States the prevalence of methicillin resistance among clinical isolates of *S. aureus* is now 60%*

*and the prevalence of vancomycin resistance among isolates of *Enterococcus* isolates is nearly 30%. Healthcare associated infections caused by methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) and vancomycin resistant enterococci (VRE) are associated with high morbidity and mortality rates and excess hospitalizations costs. Government and professional organizations are increasingly recommending more proactive procedures to identify, prevent, and control MRSA and VRE infections. Rapid and accurate screening tests are needed to quickly identify patients who are candidates for contact precautions. The objectives of this presentation are to discuss the clinical significance of the healthcare associated infections and describe the molecular-based assays currently available for detection of MRSA and their utility in the control of these infections.*

INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas ha habido un aumento dramático de las infecciones intrahospitalarias causadas por cepas de SAMR (1). En la actualidad las infecciones causadas por este patógeno están presentes en hospitales de todos los países alrededor del mundo. El aumento de la resistencia a vancomicina en enterococos es también un problema asociado con ambientes hospitalarios (2). De hecho, SHEA (Society for Healthcare and Epidemiology of America) identificó a los SAMR y a los EVR como los dos patógenos más importantes asociados con infecciones intrahospitalarias en Estados Unidos (3). Pacientes colonizados o infectados con SAMR o VRE contribuyen a la transmisión de estos organismos resistentes dentro del hospital, particularmente en las unidades de cuidado intensivo (UCIs) (4). La propia naturaleza del ambiente en UCIs hace que este sector del hospital sea un centro importante para la

emergencia y diseminación de patógenos multiresistentes como SAMR y EVR. Pacientes hospitalizados en UCIs por un periodo mayor a siete días aumentan dos o tres veces el riesgo de tener una infección por un patógeno resistente. Sin embargo existen varias oportunidades para prevenir la diseminación de estos patógenos a través del uso de medidas de control de infecciones y cuidadoso manejo, y uso de antibióticos dentro de un hospital (5).

STAFILOCOCCUS AUREUS METICILINO RESISTENTE (SAMR)

S. aureus es uno de los patógenos más importantes que causa desde infecciones superficiales de la piel hasta severas infecciones asociadas con una alta mortalidad. Además *S. aureus* se ha vuelto resistente a varias clases de antibióticos, particularmente a las beta lactamasas resistentes penicilinas como metililino y oxacilino. Por varias décadas cepas de SAMR se han establecido en nuestros hospitales y son una de las causas más frecuentes de infecciones intrahospitalarias. Estudios publicados recientemente muestran que las infecciones intrahospitalarias causadas por SAMR son una de las infecciones más comunmente reportadas al sistema de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales en Estados Unidos (NNIS). Aproximadamente 60% de todas las infecciones causadas por *S. aureus* en pacientes admitidos a las UCI son causadas por SAMR (6). Basado en la información recibida por NNIS, se estima que entre el año 1999 y 2000 ocurrieron 125.969 hospitalizaciones con el diagnóstico de infección por SAMR en Estados Unidos. De estas infecciones aproximadamente 31.440 fueron septicemias, 29.823 fueron neumonías y 64.706 fueron otro tipo de infecciones. En general, este análisis estimó que las infecciones por SAMR representaron 3.95 casos por cada 1.000 egresos (1). En general se estima que uno de cinco pacientes colonizados al momento del ingreso desarrollan una infección y que cerca de 25% de pacientes que adquieren una infección por SAMR en el hospital desarrollan una infección que es potencialmente fatal.

ENTEROCOCCO VANCOMICINA RESISTENTE (EVR)

Los enterococos son parte de la flora normal del tracto gastrointestinal, pero también pueden causar infecciones invasivas como septicemias, infecciones intrabdominales e infecciones urinarias. Desde la emergencia de resistencia a vancomicina en 1988, el porcentaje de infecciones intrahospitalarias causadas por EVR ha tenido un aumento dramático. De acuerdo a información reportada por el NNIS en Estados Unidos, el porcentaje de infecciones causadas por EVR dentro del total infecciones por enterococos aumentó de 0.3% a 7.9% entre 1993 y 1998 y a 14.7% en 1994 (6). La mayoría de estas infecciones ocurrieron en pacientes en UCIs, ya que en estas áreas del hospital se encuentran los pacientes de mayor riesgo. Sin embargo, infecciones causadas por EVR son también detectadas en otras áreas del hospital, así como también en instituciones dedicadas al cuidado de pacientes por largo tiempo (7).

Las especies de enterococos que presentan resistencia a vancomicina son *E. faecium* y *E. faecalis*. Existen otras especies de enterococos

que pueden tener resistencia intrínseca a la vancomicina pero que no representan un riesgo desde el punto de vista de infecciones intrahospitalarias (8).

¿SON LAS INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS CAUSADAS POR SAMR UN PROBLEMA CLÍNICAMENTE SIGNIFICATIVO?

Para evaluar el impacto en la mortalidad de pacientes con bacteremia causadas por cepas de SAMR, investigadores realizaron un metanálisis de la mortalidad basado en publicaciones previas y compararon mortalidad en bacteremias causadas por cepas susceptible y por cepas resistente a oxacilino. Este análisis demostró que bacteremias causadas por SAMR estaban asociadas con una mortalidad mayor que aquella asociada con bacteremias causadas por cepas de *S. aureus* metililino susceptible (9).

Otras publicaciones que compararon infecciones causadas por *S. aureus* metililino susceptible (SAMS) con infecciones causadas por SAMR mostraron que aunque factores como el porcentaje de transmisión intrahospitalaria, el sexo del paciente y el tipo de cirugía son similares, la edad del paciente, comorbilidad y severidad de la enfermedad son diferentes. Infecciones causadas por SAMR ocurren en pacientes de mayor edad, con mayor comorbilidad, son más severas y contribuyen significativamente e independientemente al riesgo de muerte que aquellas infecciones causadas por SAMS (10).

COSTO ASOCIADO A INFECCIONES CAUSADAS POR SAMR

Las infecciones intrahospitalarias causadas por SAMR son muy perjudiciales tanto para el paciente como para el hospital debido a su asociación con una alta mortalidad y un gran costo de hospitalización. Varios estudios han demostrado que las infecciones por SAMR son más costosas y resultan en mayor días de hospitalización que las infecciones causadas por SAMS (11 Lodise 2005, 12 Shorr 2006). La Vancomicina ha sido por muchos años el agente antimicrobiano de elección para tratar infecciones causadas por SAMR. Sin embargo tratamiento con vancomicina ha sido asociado con fallas clínicas particularmente en casos de endocarditis. En años recientes, otros agentes como el linezolid, daptomicina y quinopristin-dalfopristin han sido introducidos en la práctica clínica para el tratamiento de infecciones causadas por SAMR, pero la eficacia clínica de estos antimicrobianos necesita todavía ser evaluada en estudios controles. Hasta el momento, estudios que han comparado la eficacia clínica de algunos de estos agentes, han encontrado que la eficacia parece ser similar a vancomicina.

LA COLONIZACIÓN CON SAMR NO ES SÓLO UN PROBLEMA DURANTE LA HOSPITALIZACIÓN

Ya hemos discutido que aproximadamente un cuarto de pacientes que adquiere una infección por SAMR durante la hospitalización desarrolla una infección que puede ser fatal, pero la colonización es también un problema después que el paciente egresa del hospital. Estudios que

han evaluado los riesgos de secuela han determinado que el 29% de pacientes identificados en previas hospitalizaciones como infectados o colonizados con SAMR, presentaron una nueva infección, generalmente en un sitio diferente de la infección primaria, durante un periodo de seguimiento de 18 meses después de ser dados de alta (13). Las infecciones desarrolladas después del egreso fueron a menudo infecciones severas incluyendo bacteremias, neumonías, osteomielitis, artritis séptica e infecciones de piel y tejido subcutáneos (13).

Con respecto a las infecciones intrahospitalarias causadas por EVR sabemos que ocurren principalmente en pacientes en UCIs, pero estas cepas se están aislando cada vez más a menudo de pacientes hospitalizados en otras áreas u otras instituciones. Pacientes colonizados que no son detectados son una fuente de transmisión dentro y fuera del hospital. Aunque la asociación de una mayor mortalidad en infecciones causadas por EVR comparada con infecciones causadas por EVS es controversial, investigadores que han analizado estudios publicados previamente tratando de aclarar si existe o no una diferencia, llegaron a la conclusión de que resistencia a vancomicina está independientemente asociada con un riesgo de mortalidad mayor (14). Además, así como describimos más arriba con respecto a infecciones causadas por SAMR, infecciones causadas por EVR están también asociadas con más días de hospitalización y un costo mayor, comparado con infecciones causadas por enterococcus susceptible a vancomicina (EVS) (15).

PREVENCIÓN Y CONTROL DE SAMR Y EVR

El CDC en Estados Unidos ha publicado varios boletines con recomendaciones para los hospitales en un esfuerzo de tratar de controlar las infecciones intrahospitalarias. Otras asociaciones profesionales y gubernamentales también han incluido guías y recomendaciones para confrontar el grave problema de las infecciones intrahospitalarias causadas por organismos resistentes, lo cual demuestra que este problema es un problema generalizado y que necesita un esfuerzo multidisciplinario.

En 1996, CDC/HICPAC recomendó el uso de aislamiento de contacto en pacientes colonizados o infectados con organismos epidemiológicamente importantes. En 2002 las recomendaciones del CDC incluyó sugerencias para el uso adecuado de antibióticos, destacó la importancia de identificar y aislar aquellos pacientes colonizados o infectados y de usar un tratamiento oportuno y adecuado. En 2003, SHEA, publicó también recomendaciones urgiendo a los hospitales a controlar infecciones por SAMR y EVR con la implementación de un sistema de vigilancia activa para identificar pacientes colonizados y proveer precauciones de contacto (3). Más recientemente, el CDC/HICPAC revisó las guías para el control de organismos multiresistentes agregando también la recomendación de desarrollar e implementar protocolos de vigilancia activa en pacientes de alto riesgo de desarrollar infecciones con organismos resistentes. Estas guías incluyen recomendaciones de acuerdo a sitio de infección y también contienen sugerencias con respecto a los métodos de cultivo que se pueden usar para detectar SAMR y EVR (16).

VIGILANCIA PASIVA VERSUS VIGILANCIA ACTIVA

Vigilancia pasiva es aquella basada en cultivos positivos informados por el laboratorio de microbiología en pacientes hospitalizados. Estas muestras son enviadas al laboratorio por razones clínicas, lo cual significa que el paciente ya está presentando una infección por organismos multiresistentes. En contraste, la vigilancia activa es aquella vigilancia en la cual cada paciente de riesgo es evaluado por colonización con SAMR o EVR. Aunque pacientes detectados por vigilancia pasiva o vigilancia activa reciben aislamiento de contacto, numerosos estudios han demostrado que la disminución de infecciones por SAMR es más significativa cuando existe un programa de vigilancia activa (5,17,18).

Pacientes asintomáticos, pero colonizados con SAMR representan un reservorio dentro del hospital y un foco de posible diseminación debido a transmisión a través de las manos del personal hospitalario. Existe muchos hospitales que no tienen un programa de vigilancia activa y basan sus medidas de control en los cultivos positivos ordenados por razones clínicas. Salgado y colaboradores analizaron el porcentaje de pacientes que presentaron cultivo positivo durante la hospitalización dentro del grupo que estaban colonizados con SAMR al momento de ingreso al hospital (17). Estos investigadores encontraron que sólo 15% de los pacientes colonizados fueron identificados por vigilancia pasiva basada en cultivo positivo por SAMR por razones clínicas. Este hallazgo es de vital importancia porque demuestra que 85% de pacientes colonizados no son detectados, lo que significa que estos pacientes no fueron puestos en aislamiento. Este estudio calculó que el número de días sin aislamiento fue de 3.247 ó 7 días/paciente. Otro estudio estableció que en las condiciones del hospital estudiado el promedio de días sin aislamiento fue de 11 días/paciente (19). Estos estudios demuestran claramente que la vigilancia pasiva no es capaz de detectar a todos los pacientes colonizados y que estos pacientes permanecen en el hospital aumentando, en teoría, el riesgo de transmisión intrahospitalaria de estas cepas resistentes.

¿ES LA VIGILANCIA ACTIVA CAPAZ DE CONTROLAR EL NÚMERO DE BACTEREMIAS CAUSADAS POR SAMR?

Ya hemos discutido que la vigilancia activa detecta más casos de pacientes colonizados y también infectados con SAMR. Pero la pregunta más importante es si la detección de pacientes colonizados seguido de medidas de aislamiento logran reducir el número de bacteremias por SAMR. Huang y colaboradores estudiaron la frecuencia de bacteremia en pacientes en UCIs después de poner en práctica algunas medidas para controlar este tipo de infecciones (20). Ellos encontraron que aunque el número de bacteremias disminuyó un poco después de poner un programa de estricto lavado de manos, el número de infecciones siguió aumentando. Una disminución permanente fue alcanzada sólo después de implementar un programa de vigilancia activa. Sin embargo otros investigadores han expresado que el impacto de la vigilancia activa depende de la situación de cada centro hospitalario y puede que no siempre sea exitosa.

Debido al gran costo de la vigilancia activa, los hospitales tratan de enfocar el sistema de vigilancia activa en pacientes de alto riesgo: pacientes con hospitalizaciones previas, hospitalización por periodos prolongados, traslados de otros hospitales con tasa alta de SAMR, previo tratamiento con antibióticos y previa colonización con SAMR o EVR. Es también importante hacer vigilancia activa en pacientes admitidos en UCIs, unidades de diálisis y otras áreas de especializados dentro del hospital, porque estas unidades tienen un número mayor de pacientes con factores de riesgo de infecciones por SAMR y EVR (5, 17).

Peterson y su grupo de investigadores en Evanston Northwestern Healthcare han sido uno de los primeros centros en usar un sistema de vigilancia universal, el que incluye screening de todos los pacientes ingresados al hospital. Estos investigadores han demostrado que este tipo de vigilancia es mucho más efectiva que la vigilancia pasiva o vigilancia activa en pacientes de riesgo. Además de usar vigilancia universal, los investigadores implementaron simultáneamente un programa de decolonización de pacientes positivos por SAMR. Los resultados muestran que los pacientes se pueden colonizar de nuevo y por ello enfatizan la importancia de volver a screen a todos los pacientes (21). La implementación de un programa de vigilancia universal es prohibitivo para muchos hospitales, debido al costo e infraestructura necesarias. Pero se recomienda que vigilancia activa de pacientes de riesgo es una alternativa aceptable que ayuda a disminuir la diseminación de patógenos resistentes dentro de un hospital.

INFECCIONES POR SAMR ADQUIRIDAS EN LA COMUNIDAD

Hasta el momento hemos discutido las infecciones intrahospitalarias causadas por SAMR, pero en los últimos años hemos visto con mayor frecuencia infecciones por SAMR adquiridas en la comunidad, fuera del ambiente intrahospitalario. Aunque estas infecciones pueden ocurrir en pacientes con SIDA, diabetes y otras enfermedades crónicas, en general ocurren en pacientes jóvenes y sin factores de riesgo. Es importante hacer notar que estas cepas de SAMR son principalmente resistentes a beta-lactámicos pero susceptibles a otras clases de antibióticos. Cepas de SAMR adquiridas en la comunidad presentan factores de virulencia

con mayor frecuencia que cepas asociadas con infecciones intrahospitalarias. Severas infecciones y fatalidades causadas por cepas de SAMR adquiridas en la comunidad han sido reportadas en varios países. La influencia de estas cepas en el ambiente hospitalario está todavía por verse y dependerá de la prevalencia de estas cepas en la localidad. La presentación clínica y los aspectos genéticos y de laboratorio han sido discutido en una presentación previa (22).

MECANISMOS DE RESISTENCIA A OXACILINA EN S AUREUS

Aunque *S. aureus* puede ser resistentes a oxacilina debido a una producción extremadamente alta de beta-lactamasas, por modificaciones en las proteínas que normalmente se unen a las penicilinas, el mecanismo más importante clínicamente es la resistencia basada en la presencia de una única proteína denominada PBP2a (22,23) Esta proteína es codificada por el gen *mecA*, el cual está presente en cepas de *S. aureus* que son resistente a oxacilino pero no en cepas susceptibles. Por lo tanto se deduce que la PBP2a es una proteína extraña al *S. aureus* y que fue adquirida probablemente de otro organismo. El gen *mecA* se encuentra dentro de un cassette denominado SSC, del cual existen varios tipos (23). Es importante destacar que esta PBP2a y el gen *mecA* están también presentes en cepas de coagulasa negativa staphylococcus (CoNS) que son resistentes a oxacilino. Es por ello de importancia fundamental que los métodos rápidos usados para detectar cepas resistentes sean capaces de discriminar entre *S aureus* y CoNS.

MÉTODOS FENOTÍPICOS PARA DETECTAR CEPAS DE SAMR

Esta es una breve discusión de los métodos de cultivo usados en el laboratorio de microbiología clínica. Ver Tabla 1 por descripción de métodos y tiempo requerido para obtener resultados.

- *Cultivo tradicional:* La mayoría de los hospitales usan el método de cultivo tradicional para detectar cepas de SAMR. Si el cultivo se solicitó por razones clínicas, la muestra puede provenir de varios sitios (hemocultivo, expectoración, líquidos estériles, etc). Si el propósito es detectar pacientes colonizados, la muestra requerida es un hisopado nasal y/o

TABLA 1. TIEMPO NECESARIO PARA DETECTAR CEPAS DE MRSA EN MUESTRAS NASALES DE ACUERDO AL MÉTODO			
	Cultivo y estudio de susceptibilidad tradicional	Cultivo seguido de un método rápido de detección	Detección de MRSA directamente de muestras nasales
Tiempo hasta el resultado	48-72 horas	24 horas	2-6 horas
Organismo disponible para otros tests	Si	Si	NO
Métodos		Agar Cromogénico. PCR para detectar resistencia (ej. <i>mecA</i>)	Real Time PCR: 1. BD GenOhm MRSA 2. Xpert MRSA

rectal. Las muestras son inoculadas en una placa de agar sangre e incubadas por 18 a 24 horas. Al día siguiente las placas se examinan por crecimiento de colonias características de *S. aureus*. La confirmación de la identificación se hace con el uso de aglutinación por latex que detecta en forma rápida la presencia de coagulasa o con la prueba de coagulasa en tubo. La susceptibilidad a la oxacilina es evaluada con el uso de un sistema automatizado de susceptibilidad o por otro método de susceptibilidad como difusión por disco, por microdilución en caldo o por E test. Todos estos métodos de susceptibilidad necesitan un periodo de incubación de 24 horas para detectar con precisión la resistencia a oxacilina en *S. aureus*.

- **Uso de Placas de agar cromogénico:** Actualmente existen varios medios selectivos para detectar la presencia de SAMR. El medio más evaluado hasta el momento es el BBL CHROMagar MRSA (BD Diagnostics, Spark, MD) pero hay varias compañías que ofrecen o que están desarrollando variaciones de este medio. El agar contiene una sustancia cromogénica para seleccionar el crecimiento de *S. aureus* y un agente antimicrobiano que permite el crecimiento de sólo cepas de *S. aureus* que son resistente a oxacilina. Los fabricantes recomiendan incubar estas placas por 24 horas. Si después de la incubación no se observan colonias de SAMR, las placas deben ser incubadas por otras 24 horas antes de reportar el cultivo como negativo. Estudios que han evaluado estos medios cromogénicos con propósitos de screening de pacientes por colonización han reportado que la mayoría de SAMR pueden ser detectados en 24 horas y que el rendimiento es similar al obtenido con cultivo tradicional seguido de estudio de susceptibilidad (24-26).

Detección de PBP2a en SAMR. Como discutimos más arriba, PBP 2a (Penicillin Binding Protein 2a) está presente en *S. aureus* que son resistentes a oxacilina. Esta proteína puede ser detectada por un test rápido denominado PBP2a latex (Remel, Lenexa, AK). Este test permite la detección de SAMR en aproximadamente 20 minutos. Varios estudios han evaluado este test y han reportado una excelente correlación con métodos de estudio standard de susceptibilidad para detectar resistencia a oxacilina en *S. aureus*. Para usar este test se necesita tener la colonia de *S. aureus* en un medio de cultivo. Este test no está aprobado para ser usado directamente en muestras clínicas.

MÉTODOS FENOTÍPICOS PARA DETECTAR EVR

La detección de EVR es a menudo más laboriosa que la detección de SAMR, porque a menudo se obtiene crecimiento de colonias sugerentes de enterococo en muestras perianales, las que pueden tener otros organismos con morfología similar a los EVR, pero que representan enterococos que son intrínsecamente resistentes a vancomicina, y por lo tanto se debe hacer una confirmación de la identificación. El medio más usado para detectar EVR en muestras perianales es el BBL Enterococcosel (BD Diagnostics, Spark, MD), que contiene esculina y otras sustancias inhibitorias. Las placas son incubadas por 18-24 horas y las colonias sospechosas de enterococos son analizadas para confirmar el diagnóstico y posteriormente se hace el estudio de sus-

ceptibilidad para confirmar la presencia de EVR (normas CDC).

MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE SAMR

En los últimos años y debido en parte a las recomendaciones de sociedades profesionales y gubernamentales, la mayoría de los hospitales están tratando de implementar un sistema de vigilancia para SAMR. Por lo tanto, laboratorios de microbiología son presionados para obtener resultados rápidos y precisos. Los métodos moleculares son atractivos porque permiten un resultado rápido y tienen una alta sensibilidad. Aunque métodos de amplificación desarrollados en un hospital particular pueden ser usados, en general se recomienda usar métodos comerciales aprobados por el FDA, los cuales han sido evaluados extensivamente por el fabricante y que permiten una mayor estandarización.

MÉTODOS DE REAL-TIME PCR APROBADOS PARA LA DETECCIÓN DE SAMR EN MUESTRAS DE HISOPADO NASAL

Los métodos de amplificación que usan Real-Time PCR tienen varias ventajas comparados con métodos de PCR tradicional. Real-Time PCR usa sistemas cerrados, lo cual disminuye la posibilidad de contaminación. Además el proceso de amplificación y detección ocurre en un mismo instrumento, lo cual evita la manipulación y acorta el tiempo de procesamiento, y por lo tanto el resultado es disponible en menor tiempo que con PCR tradicional o con métodos de cultivo (Ver Tabla 1). Varios estudios han evaluado el uso de métodos moleculares en el control de infecciones intrahospitalarias causadas por MRSA (26-30). En la actualidad existen dos kits en Estados Unidos aprobados por el FDA para la detección de SAMR en muestras nasales:

1- BD GeneOhm™ MRSA (BD Diagnostics, San Diego CA) anteriormente denominado IDI-MRSA. Este test está diseñado para ser usado en el instrumento Smart Cycler (Cepheid Diagnostic, Sunnyvale, CA).

2- Xpert™ MRSA (Cepheid Diagnostic) para ser usado en el instrumento GeneXpert, un sistema que combina la preparación de la muestra y amplificación por real time PCR.

Estos dos tests detectan específicamente *S. aureus* que son resistente a oxacilina. Para lograr la detección de SAMR y evitar la detección de *Staphylococcus coagulasa* negativo meticilino resistente (CoNS-MR) o evitar obtener un resultado positivo cuando existe una mezcla de SAMS y CoNS-MR, el test es diseñado para detectar una secuencia molecular específica que confiere doble especificidad: la mitad de la secuencia detecta una sección del cromosoma del *S. aureus*; y la otra mitad detecta la presencia del cassette SSC, el cual contiene el elemento de resistencia. La amplificación se produce sólo si estas dos secuencias están presentes. Si sólo uno de estas secuencias está presente, la amplificación no ocurre.

Ambos tests permiten la detección de SAMR en aproximadamente dos horas después de obtener la muestra. El test BD GeneOhm MRSA con el uso del instrumento Smart Cycler necesita varias etapas de preparación

de la muestra incluyendo concentración de la muestra, transferencia a una solución de lisis, centrifugación y aspiración del sobrenadante antes de lograr la amplificación. El test Xpert MRSA con el uso del instrumento GeneXpert es muy fácil de implementar ya que el procesamiento de la muestra es mínimo, sólo se necesita agregar la muestra y dos reactivos adicionales a un cartridge y luego introducir el cartridge en el instrumento. La simplicidad del procesamiento permite un entrenamiento rápido del personal. Detalles respecto a la sensibilidad y especificidad de tests de Real-Time PCR están descritos en Tabla 2.

AMPLIFICACIÓN DEL GENE mec A POR PCR

La amplificación del *mec A* puede realizarse usando PCR tradicional y también por Real-Time PCR. En la actualidad no existen tests comerciales aprobados por el FDA para la detección del *mecA* por PCR, pero algunos investigadores usan este método para confirmar la resistencia a oxacilino en *S. aureus*. Estos métodos deben ser validados «in house» antes de ser usados por razones clínicas.

En la actualidad no existen métodos moleculares aprobados para la detección de EVR. Sin embargo, muchos hospitales usan métodos desarrollados y validados “in house”, lo cual hace difícil la comparación entre diferentes estudios. BDGenOhm está en estos momentos evaluando un test molecular para la detección de EVR y esperamos obtener información con respecto a la sensibilidad de este test en los próximos meses.

¿CUÁL ES LA VENTAJA DE USAR TESTS MOLECULARES EN EL CONTROL DE SAMR?

Los métodos moleculares son métodos rápidos y específicos, pero de alto costo. Además, para realmente tener los resultados en un tiempo corto, el laboratorio debe correr el test más de una vez al día, lo que puede significar que personal de diferentes turnos debe ser capacitado para correr el test. Estas son consideraciones importantes cuando se evalúa la implementación de métodos moleculares.

Investigadores que han evaluado métodos moleculares para la detección de SAMR han demostrado varias ventajas comparado con el uso de cultivo tradicional. Cunningham y colaboradores analizaron el efecto en la transmisión de SAMR en 1305 pacientes admitidos a la UCI con el uso de Real-Time PCR. Los resultados del PCR estaban disponibles en el mismo día en que la muestra era obtenida. Los hallazgos publicados muestran que la incidencia de transmisión de SAMR disminuyó de 13.89 a 4.9 por 1.000 pacientes días al reemplazar el uso de cultivo tradicional con Real-Time PCR (31).

Rajan y co-investigadores, también evaluaron el uso de PCR comparado al cultivo en pacientes en UCIs y encontraron que Real-Time PCR permite la identificación de casos nuevos mucho antes que el cultivo, facilitando tanto la prevención de la transmisión como la selección de una terapia apropiada (32). Sin embargo los investigadores sugieren que el uso de agar cromogénico parece ser más específico y más barato que el Real-Time PCR (32).

CONCLUSIONES

Infecciones causadas por SAMR y EVR representan un problema tanto para los pacientes como para los hospitales. Es claro que pacientes que están colonizados con cepas resistentes tienen un riesgo mayor de desarrollar una infección severa y potencialmente fatal. Existen varias medidas para prevenir la diseminación de infecciones dentro del ambiente hospitalario y test moleculares de Real-Time PCR representan una ayuda invaluable en la identificación rápida de nuevos casos. Sin embargo, el costo y la necesidad de personal especializado impide a los hospitales su uso en forma rutinaria. Pero como hemos discutido en esta presentación, la implementación de un programa de vigilancia activa con el uso de Real-Time PCR es capaz de disminuir el porcentaje de infecciones causadas por patógenos resistentes, y de disminuir costos asociados con infecciones intrahospitalarias. Pero por sobre todo ayudan a disminuir la mortalidad causada por estas infecciones.

TABLA 2. RENDIMIENTO DE LOS TESTS DE REAL-TIME PCR PARA DETECTAR MRSA EN MUESTRAS NASALES					
Test	Sensibilidad	Especificidad	VPP1	VPN2	Referencias
IDI3-MRSA	90	97	92	97	27
IDI-MRSA	90	91.7	56.3	98.8	30
IDI-MRSA	94	94	94	94	26
BDGeneOhm	94	64	71	92	28
BD GeneOhm	98	96	77	99.7	29

1. Valor predictivo positivo. 2. Valor predictivo negativo. 3. IDI test es ahora BD GenOhm.

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece al Dr. Guillermo Acuña por la invitación a participar en el Simposio y a la Dra. Tobi Karchmer por la valiosa información entregada en relación a esta presentación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kuehnert MJ, Hill HA, Kupronis BA, Tokars JI, Solomon SL, Jernigan DB. Methicillin-resistant-Staphylococcus aureus hospitalizations, United States. *Emerging Infect Dis* 2006; 11:868-872.
2. Treitman AN, Yarnold PR, Warren J, Noskin GA. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). *J Clin Microbiol.* 2005; 43:462-3.
3. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and enterococcus. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24(5):362-86.
4. Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, et al. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin Infect Dis* 2006; 42:389-391.
5. Fridkin SK, Gaynes RP. Antimicrobial resistance in intensive care units. *Clin Chest Med* 1999;20:303-16.
6. NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32:470-85.
7. Lai KK, Fontecchio SA, Kelley AL, Baker S, Melvin ZS. The changing epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24:264-8.
8. Palavecino E. Puesta al día en enterococos año 2001. Identificación de especies y estudio de susceptibilidad antimicrobiana. *Rev Chil Infect* 2001; 18: 95-100.
9. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2003; 36:53-59.
10. Whitby M, McLaws ML, Berry G. Risk of death from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Med J Aust* 2001; 175:264-67.
11. Lodise TP, McKinnon PS. Prediction model to identify patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia at risk for methicillin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003 Sep; 24: 655-61.
12. Shorr AF, Tabak YP, Gupta V, Johannes RS, Liu LZ, Kollef MH. Morbidity and cost burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in early onset ventilator-associated pneumonia. *Crit Care.* 2006;10-R97.
13. Huang SS, Platt R. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after previous infection or colonization. *Clin Infect Dis* 2003; 36:281-285.
14. Diazgranados CA, Zimmer SM, Klein M, Jernigan JA. Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2005; 41:327-333.
15. Song X, Srinivasan A, Plaut D, Perl TM. Effect of nosocomial vancomycin-resistant enterococcal bacteremia on mortality, length of stay, and costs. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24:251-256.
16. CDC guidelines at <http://www.cdc.gov/incidod/dhqp/pdf/ar/mdroGuideline2006.pdf>
17. Karchmer TB, Durbin LJ, Simonton BM, Farr BM. Cost-effectiveness of active surveillance cultures and contact/droplet precautions for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Inf* 2002; 51:126-132.
18. Salgado CD, Farr BM. What proportion of hospital patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are identified by clinical microbiological cultures? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27:116-121.
19. Lucet JC, Grenet K, Armand-Lefevre L, Harnal M, Bouvet E, Regnier B, Andremonet A. High prevalence of carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission in elderly patients: implications for infection control strategies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 121-126.
20. Huang SS, Yokoe DS, Hinrichsen VL, Spurchise LS, Datta R, Miroshnik I, Platt R. Impact of routine intensive care unit surveillance cultures and resultant barrier precautions on hospital-wide methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2006; 43:971-978.
21. Robicsek A, O'Connor K, Hacek DM, Peterson LR. Impact of universal inpatient surveillance and decolonization on rates of healthcare associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection [abstract]. In: 2006 Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; October 12-15, 2006; Toronto. Arlington: IDSA; 2006. p. 57.
22. Palavecino E. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Lab Med* 2004; 403-418.

23. Palavecino E. Epidemiologic, clinical and laboratory diagnosis of MRSA infections. In MRSA Protocol 2007. Y. Yu (ed). Humana Press. 1-21.
24. Compennolle V, Versachraegen G, Claeys G. Combined use of Pastorex Staph-Plus and either of two new chromogenic agars, MRSA ID and CHROMagar MRSA, for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J clin Microbiol 2007; 45:154-158.
25. Flayhart D, Hindler JF, Bruckner DA, Hall G, Shrestha RK, Vogel SA, Ritcher SS, Howard W, Walther R, Carroll KC. Multicenter evaluation of BBL CHROMagar medium for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from surveillance cultures of the anterior nares. J Clin microbial 2005; 43:5536-5540.
26. Van Hal SJ, Stark D, Lockwood B, Marriott D, Harkness J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) detection: comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and Genotype MRSA Direct PCR assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSA SELECT, and CHROMagar MRSA) for use with infection-control swabs. J Clin Microbiol 2007; 45:2486-2490.
27. Rossney AS, Herra CM, Fitzgibbon MM, Morgan PM, Lawrence MJ, O'Connell B. Evaluation of the IDI-MRSA assay on the Smart Cycler real-time PCR Platform for rapid detection of MRSA from screening specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007; 26 :459-466.
28. Francois P, Bento M, Renzi G, Harbarth S, Pittet D, Schrenzel J. Evaluation of three molecular assays for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2007 ; 45 :2011-2013.
29. Paule SM, Haceck DM, Kufner B, Truchon K, Thomson RB Jr, Kaul KL, Robicsek A, Peterson LR. Performance of the BD GeneOhm™ MRSA test before and, during high high-volume clinical use. J Clin Microbiol 2007; 11 : J. Clin. Microbiol. doi:10.1128/JCM.00670-07.
30. Bishop EJ, Grabsch EA, Ballard SA, Mayall B, Xie S, Martin R, Grayson ML. Concurrent analysis of nose and groin swab specimens by the IDI-MRSA PCR assay is comparable to analysis by individual-specimen PCR and routine culture assay for detection of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2006; 44:2904-2908.
31. Cunningham R, Jenk P, Northwood J, Wallis M, Ferguson S, Hunt S. Effect on MRSA transmission of rapid PCR testing of patient admitted to critical care. J Hosp Infect 2007; 65: 24-28.
32. Rayan L, Smyth E, Humphreys H. Screening for MRSA in ICU patients. How does PCR compare with culture ? J Infect 2007 ; doi :10.1016/j.jinf.2007.06.005.