

UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA



Presencia de cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina de pacientes hospitalizados en el “Hospital Vicente Corral Moscoso (HVCM)”.

Tesis previa a la obtención del Título de Bioquímico Farmacéutico.

AUTORES:

CUESTA CORONEL CECILIA ANDREINA
C.I. 0302338165
PÉREZ ULLAGUARI JAIRO JAVIER
C.I. 0103991253

DIRECTORA:

DRA. MARÍA DE LOURDES JERVES ANDRADE. MGT.
C.I. 0101660579

ASESORAS:

DRA. CARMEN LUCÍA LÓPEZ CISNEROS
C.I. 0102173952
DRA. ANGÉLICA MARÍA OCHOA AVILÉS PHD
C.I. 0104452693

CUENCA - ECUADOR
2016



RESUMEN

Antecedentes: Las infecciones por *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes han ido en aumento alrededor del mundo, debido al desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de las bacterias y además por el uso indiscriminado de antibióticos por la población. La clindamicina es una alternativa de tratamiento contra este tipo de bacterias, sin embargo, también es probable que se presente resistencia inducible, lo que puede llevar al fallo terapéutico.

Objetivo: Determinar la presencia de cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina aislados de muestras de secreciones, exudados y sangre de pacientes internados en el “Hospital Vicente Corral Moscoso” en el período junio – agosto 2016.

Métodos: Se llevó a cabo un estudio descriptivo y de corte transversal. Se incluyeron cepas provenientes de muestras de secreciones, exudados y sangre de 122 pacientes hospitalizados a las cuales se les realizó la prueba D según el manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2016, se emplearon cepas de referencia para el control de calidad.

Resultados: Se recolectaron 122 cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes, de las cuales 21 (17.21%) fueron *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina y de estas 13 (14.28%) fueron *Staphylococcus coagulasa negativa* y 8 (25.81%) fueron *Staphylococcus coagulasa positiva*. Estos microorganismos procedían de muestras de sangre 13 (14.44%), secreciones 8 (28.57%). Además se observó la frecuencia de acuerdo a las dependencias del hospital: Pediatría 6 (12.24%), Clínica 6 (22.22%), Neonatología 5 (20.83%), Cirugía 4 (30.77%).

Conclusiones: Este estudio contribuye con información sobre la frecuencia de resistencia inducida a clindamicina en cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes, el cual podría servir como base para estudios posteriores ya que en el país no existen investigaciones sobre este tipo de resistencia por su trascendencia epidemiológica.

Palabras clave: *Staphylococcus coagulasa positivo*, *Staphylococcus coagulasa negativo*, Resistencia inducible a la clindamicina.



ABSTRACT

Background: *Staphylococcus spp.* infection resistant to methicillin has increased worldwide. This tendency is the consequence of bacteria developing new resistance mechanisms together with the indiscriminate use of antibiotics by the population. Although clindamycin is an alternative treatment against *Staphylococcus spp.*, it is also likely to develop inducible resistance, which could lead to a therapeutic failure.

Objective: To determine the existence of *Staphylococcus spp.* methicillin resistant strains with inducible resistance to clindamycin isolated from secretions, exudates and blood samples of patients in the "Vicente Corral Moscoso Hospital" from June to August 2016.

Methods: A descriptive cross-sectional study was conducted. Strains from samples of secretions, exudates and blood from 122 hospitalized patients were included. The samples were tested for *Staphylococcus spp.* methicillin resistance with inducible resistance to clindamycin by applying a D-test. The test was performed according to the recommendations of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2016, reference strains were used for quality control.

Results: In total, 122 strains of *Staphylococcus spp.* methicillin resistant were analyzed, of which 21 (17.21%) were *Staphylococcus spp.* methicillin resistant with inducible resistance to clindamycin. From the strains with inducible resistance to clindamycin, 13 (14.28%) were coagulase negative and 8 (25.81%) were coagulase positive. The distribution of the strains with inducible resistance to clindamycin according with the type of sample was: 13 (14.44%) originated from blood samples and 8 (28.57%) from secretions. According with the dependencies of the hospital: 6 (12.24%) samples correspond to Pediatrics, 6 (22.22%) to Internal Medicine, 5 (20.83%) to Neonatology and 4 (30.77%) to Surgery.

Conclusions: This study provides information on the distribution of induced resistance to clindamycin in *Staphylococcus spp.* methicillin resistant. The last could be used as a basis for further research. Currently, in Ecuador, there is not much research on this topic with epidemiological significance.

Keywords: Coagulase positive *Staphylococcus*, coagulase negative *Staphylococcus*, inducible resistance to clindamycin.



ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CLÁUSULA DE DERECHOS AUTOR	7
CLÁUSULA DE DERECHOS AUTOR	8
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	9
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	10
DEDICATORIA	11
DEDICATORIA	12
AGRADECIMIENTOS	13
INTRODUCCIÓN	14
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
CAPÍTULO 1	17
MARCO TEÓRICO	17
1.1 ESTAFILOCOCOS	17
1.1.1 Características generales	17
1.1.2 Estructura antigénica	18
Proteínas antigénicas y polisacáridos	18
1.1.3 Patogenia	19
1.1.4 Factores determinantes de patogenicidad	20
1.1.5 Factores predisponentes del huésped	23
1.1.6 Secuencia patogénica	23
1.1.7 Enfermedades causadas por los estafilococos	24
1.1.8 Epidemiología	27
1.1.9 Clasificación	28
1.1.10 Resistencia a la meticilina (oxacilina)	32
1.1.11 Resistencia inducible a la clindamicina	33
CAPÍTULO 2	35
METODOLOGÍA	35
2.1 Tipo de investigación	35
2.2 Tamaño de la muestra	35



2.3 Criterios de inclusión	35
2.4 Criterios de exclusión	35
2.5 Localización geográfica	35
2.6 Consideraciones éticas	36
2.7 Variables	36
2.8 Análisis estadístico	39
2.9 Técnicas	40
2.9.1 Siembra y cultivo de microorganismos	40
2.9.1.1 Siembra: en agar sangre de cordero y agar manitol	40
2.9.1.1.1 Agar sangre de cordero	40
2.9.1.1.2 Agar manitol salado	40
2.9.1.1.3 Transporte y almacenamiento	41
2.9.2 Tinción de Gram.....	41
2.9.3 Prueba de la catalasa.....	42
2.9.4 Prueba de la coagulasa.....	43
2.10 Pruebas de sensibilidad	43
2.10.1 Método utilizado: difusión en agar (técnica de bauer & kirby	44
2.10.1.1 Método de inoculación a partir de colonias aisladas.....	44
2.10.1.2 Interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos....	44
2.10.2 Procedimiento para la determinación de la resistencia a la penicilina, meticilina y resistencia inducible a la clindamicina	45
2.10.3 Discos de antibióticos empleados	47
2.10.4 Control de calidad	49
2.10.4.1 Cepas de control de calidad utilizadas según el manual CLSI 2016	52
2.11 Materiales y equipos	53
2.11.1 Materiales	53
2.11.2 Reactivos	53
2.11.3 Equipos	53
2.12 Medios de cultivo	54
CAPÍTULO 3	56
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
3.1 Condiciones de los pacientes según la edad y procedencia	56
3.2 Resistencia inducible a la clindamicina en cepas de <i>staphylococcus spp.</i> Meticilino resistentes	56



3.2.1 Presencia de <i>Staphylococcus spp.</i> meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina mediante d test, según las áreas estudiadas del HVCM	58
3.2.2 Presencia de <i>Staphylococcus spp.</i> meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina mediante d test, según el tipo de muestra	59
4 CONCLUSIONES	61
5 RECOMENDACIONES	62
6 BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS	63
7 ANEXOS	69
Anexo 1.....	69
Esquema de procedimiento	69
Anexo 2.....	70
Flujograma de trabajo	70
Anexo 3.....	71
Tinción de Gram	71
Prueba de la catalasa	71
Prueba de la coagulasa	71
Anexo 4.....	72
ILUSTRACIONES	72
Anexo 5.....	75
Do file del programa Stata 13.0 (College Satation, TX, USA)	75



CLÁUSULA DE DERECHOS AUTOR



Universidad de Cuenca
Cláusula de derechos de autor

CECILIA ANDREINA CUESTA CORONEL, autora del trabajo de titulación “**Presencia de cepas de *Staphylococcus spp.* metilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina de pacientes hospitalizados en el Hospital Vicente Corral Moscoso (HVCM)**”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, noviembre de 2016

Cecilia Andreina Cuesta Coronel
C.I: 0302338165



CLÁUSULA DE DERECHOS AUTOR



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

JAIRO JAVIER PÉREZ ULLAGUARI, autor del trabajo de titulación “Presencia de cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina de pacientes hospitalizados en el Hospital Vicente Corral Moscoso (HVCM)”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, noviembre de 2016

Jairo Javier Pérez Ullaguari
C.I: 0103991253



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

CECILIA ANDREINA CUESTA CORONEL, autora del trabajo de titulación “Presencia de cepas de *Staphylococcus spp.* metilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina de pacientes hospitalizados en el Hospital Vicente Corral Moscoso (HVCM)”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, noviembre de 2016

Cecilia Andreina Cuesta Coronel
C.I: 0302338165



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

JAIRO JAVIER PÉREZ ULLAGUARI, autor del trabajo de titulación "**Presencia de cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina de pacientes hospitalizados en el Hospital Vicente Corral Moscoso (HVCN)**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, noviembre de 2016

Jairo Javier Pérez Ullaguari
C.I: 0103991253



DEDICATORIA

Esta tesis dedico a mi familia quienes por ellos soy lo que soy. Para mis padres por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi perseverancia para conseguir mis objetivos.

A mis hermanos, principalmente a mi hermana mayor quien con su ayuda y palabras de aliento me daba la fuerza para continuar adelante y no decaer.

A mi amado esposo por su sacrificio y esfuerzo, por apoyarme a continuar con mis estudios, por darme una carrera para nuestro futuro y por creer en mi capacidad, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre ha estado brindándome su comprensión, cariño y amor.

A mí amado hijo por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor.

Andreina Cuesta



DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia por haberme brindado su apoyo incondicional y dado las fuerzas necesarias para poder cumplir una meta más en mi vida ya que sin ellos no habría podido lograrlo.

Especialmente dedico esta tesis a mi madre Francisca Zambrano por haber creído en mí, haberme apoyado siempre y guiado con sus consejos y sus valores para poder día a día salir adelante, pero más que nada por su amor.

Jairo Pérez



AGRADECIMIENTOS

Agradecemos principalmente a Dios por habernos permitido llegar hasta este punto y darnos salud para lograr nuestros objetivos, y por haber puesto en nuestro camino a aquellas personas que han sido nuestro soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A la universidad por habernos aceptado ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar nuestra carrera, así como también a los diferentes docentes que brindaron sus conocimientos.

Agradecemos también a nuestra Directora de tesis Dra. Lourdes Jerves Mgt., por habernos brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también habernos tenido toda la paciencia para guiarnos durante todo el desarrollo de la tesis.

A nuestras asesoras de tesis Dra. Angélica Ochoa PhD. y Dra. Carmen Lucía López por el apoyo brindado, por sus conocimientos, esfuerzos y orientación para la realización de esta tesis.

Al personal del laboratorio del Hospital Vicente Corral Moscoso quienes nos abrieron las puertas para poder realizar el presente estudio, y de manera especial al Lcdo. Juan Narváez el cual siempre nos apoyó y ayudo de manera incondicional.

Andreina Cuesta

Jairo Pérez



INTRODUCCIÓN

Las infecciones causadas por microorganismos son la primera causa de morbimortalidad a nivel mundial, sobre todo en países subdesarrollados, por lo mismo un tratamiento adecuado y oportuno, tiene un impacto importante en los índices de salud. En la actualidad uno de los grandes problemas que se enfrenta es la creciente emergencia de resistencia de los microorganismos a los antibióticos convencionales. (Echevarria Zarate & Iglesias Quilca, 2003).

La incidencia de infecciones sistémicas, respiratorias, de la piel y tejidos blandos, entre otras, causada por microorganismos grampositivos ha aumentado, tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad. Los microorganismos grampositivos de mayor trascendencia clínica pertenecen al género *Staphylococcus*, principalmente *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) pero también diferentes especies de estafilococos coagulasa negativa (CoNS) como *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), los cuales presentan resistencia a una variedad de antibióticos. (Ardanuy, Cercenado, Morosini, & Torres, 2011).

El aumento de las infecciones por *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes como el *S. aureus* meticilino resistente (SAMR), que fue primero resistente a la penicilina en 1947 y luego a la meticilina, han disminuido las alternativas de antimicrobianos efectivos. (Yamilia et al., 2014).

La clindamicina por su buena absorción oral, excelente penetración, así como también a que no necesita ajustarse la dosis en insuficiencia renal, es un antibiótico usado como alternativa contra *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes, pero puede llegar a presentar resistencia inducible que no se detecta con antibiogramas habituales. (Merino-Díaz, de la Casa, Torres-Sánchez, & Aznar-Martín, 2007).

Es de gran importancia la detección temprana de la resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes a nivel hospitalario especialmente en SAMR, debido a que la utilización de clindamicina en pacientes con infección por estafilococos con este tipo de resistencia podría conducir a un posible tratamiento ineficaz, como se ha reportado desde el año 1968 por Me Gehee y colaboradores. (Merino-Díaz et al., 2007) (Castellano, Perozo, Molero, Montero, & Primera, 2015).



JUSTIFICACIÓN

Al ser la clindamicina uno de los antibióticos más usados en infecciones causadas por *Staphylococcus spp.* metilino resistentes, se ha visto la necesidad de realizar estudios para así poder conocer la efectividad de este antibiótico, ya que las cepas de *Staphylococcus spp.* metilino resistentes pueden presentar resistencia inducible no detectable con pruebas de sensibilidad habituales, pudiendo no ser efectivo por lo que se debería adoptar, dependiendo del caso, una terapéutica diferente.

La técnica D-test que permite detectar esta condición de los microorganismos es un método fácil de realizar, obteniéndose con el mismo resultados eficaces para una adecuada terapéutica aplicada en pacientes con infecciones estafilocócicas.

Además, en nuestro medio no existen reportes sobre la resistencia inducible a la clindamicina en cepas de *Staphylococcus spp.* metilino resistentes, por tal razón también es importante conocer la tendencia de las cepas circulantes en relación a su perfil de sensibilidad.

HIPÓTESIS

Existen cepas de *Staphylococcus spp.* metilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina obtenidas de muestras de sangre, secreciones y exudados de pacientes internados en el “Hospital Vicente Corral Moscoso”, durante el período junio – agosto 2016.

OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de cepas de *Staphylococcus spp.* metilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina aislados de muestras de sangre, secreciones y exudados de pacientes internados en el “Hospital Vicente Corral Moscoso” en el período junio – agosto 2016.



OBJETIVO ESPECIFICOS:

- Verificar las cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes procedentes de muestras de sangre, secreciones y exudados de pacientes internados en el “Hospital Vicente Corral Moscoso”.
- Identificar resistencia inducible a la clindamicina en cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes.



CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 ESTAFILOCOCOS

1.1.1 Características Generales

Los estafilococos son un grupo de bacterias heterogéneas, grampositivas de forma esférica con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , no formadoras de esporas, pilis ni flagelos y por su proceso de división celular se parecen a racimos de uvas, sin embargo los microorganismos presentes en muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares o en cadenas cortas; algunas cepas pueden formar cápsulas en condiciones especiales. (Cervantes-García, García-González, & Salazar-Schettino, 2014).

Los estafilococos producen catalasa, enzima utilizada para diferenciar de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos. (Cervantes-García et al., 2014).

Son capaces de crecer con rapidez sobre muchos tipos de medios de cultivo como el agar manitol o agar sangre de cordero y son metabólicamente activos, pueden fermentar carbohidratos y producir pigmentos que varían desde el color blanco hasta el amarillo intenso, por lo general causan hemólisis y coagulación del plasma; además tienen la capacidad de producir enzimas y toxinas extracelulares. (F. Brooks, S. Butel, & A. Morse, 2011).

Estos microorganismos poseen una amplia distribución en la naturaleza y no son esencialmente parásitos humanos, pudiendo también ser encontrados en alimentos, objetos inanimados u otros animales. (de Carvalho, de Araújo Lima, dos Santos Pereira, & Lima, 2011).

Algunos se encuentran formando parte de la flora normal de la piel y mucosas de los humanos; otros causan supuración, formación de abscesos, varias infecciones piógenas e incluso septicemia mortal; además son fabricantes de toxinas que provocan cuadros clínicos de muy diversas manifestaciones. (F. Brooks et al., 2011) (Cabello, 2007).



En pacientes hospitalizados, recién nacidos, mayores o inmunológicamente comprometidos, esas manifestaciones tienden a ser de mayor importancia. (de Carvalho et al., 2011).

Las especies del género *Staphylococcus* de importancia clínica son: *S. epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*) y *S. aureus* el cual se diferencia de los dos anteriores por producir coagulasa (que hace que la fibrina se aglomere y forme un coágulo). (F. Brooks et al., 2011).

Además es muy importante mencionar la facilidad con que los estafilococos adquieren resistencia a una variedad de antimicrobianos, lo que significa que la colonización en el hombre es un gran peligro, sobre todo en enfermos hospitalizados e infectados por cepas hospitalarias, altamente resistentes. La forma de obtener energía es por medio de la fermentación así como también de la respiración. Desde el punto de vista nutricional, estas bacterias no son exigentes, creciendo en medios pobres y simples. En su relación con el oxígeno son aerobios-anaerobios facultativos. (Cabello, 2007) (Seija, 2008).

Este microorganismo es muy resistente a las condiciones ambientales normales. Es capaz de sobrevivir alrededor de tres meses en un cultivo a temperatura ambiente y muere a temperaturas mayores de 60 °C por una hora. En cuanto a los agentes químicos, es sensible a la mayoría de los desinfectantes y antisépticos, que lo matan en pocos minutos. (Seija, 2008).

1.1.2 Estructura antigénica

Proteínas antigénicas y polisacáridos

Peptidoglucano: Es un polímero polisacárido que contiene subunidades ligadas, proporciona el exoesqueleto rígido de la pared celular, tiene actividad de endotoxina y activa el complemento. (Cabello, 2007).

Ácidos teicoicos: Son polímeros de fosfato de glicerol o ribitol, vinculados al peptidoglucano y pueden ser antigénicos. *S. aureus* posee predominantemente ácidos de ribitol fosfato, mientras que en los CoNS son de glicerol fosfato. Permiten la unión de estafilococos a las superficies de las mucosas mediante uniones específicas a la fibronectina. (Cervantes-García et al., 2014).

Proteína A: Componente específico de cepas de *S. aureus* y es además una proteína de la superficie bacteriana. Une la IgG por la porción Fc funcionando como factor de



virulencia impidiendo la opsonización y la acción del complemento, es quimiotáctica, antifagocítica, antiplaquetaria, mitógena y activadora de los linfocitos NK. (Castro, 2014) (Seija, 2008).

Cápsula mucoide (Slime): Es un polisacárido el cual facilita la adherencia de las bacterias a diversas células. Se han identificado 11 serotipos capsulares, de los cuales los tipos 1 y 2 producen grandes cantidades de polisacárido, dándole a la bacteria apariencia mucoide en los medios de cultivos, pero estos son poco frecuentes en las muestras clínicas, a diferencia de los serotipos 5 y 8 que son responsables de más de 75% de las infecciones clínicas. Los polisacáridos capsulares en conjunto con las adhesinas intercelulares incrementan el desarrollo de la biopelícula, aumentando la unión a superficies. La cápsula protege del complemento, de los anticuerpos y evade la fagocitosis. Algunas cepas capsuladas de *S. aureus* se forman de ácido glucosaminourónico o manosaminourónico. (Cervantes-García et al., 2014).

Biofilm (biopelícula): Es una capa polisacárida extracelular que ayuda a la comunidad bacteriana a adherirse a diferentes superficies, está implicada en la colonización y persistencia de la bacteria en catéteres, prótesis, injertos y sondas; a la vez dificultan la quimiotaxis y la fagocitosis y la protege de los antibióticos. La biopelícula podría prolongar la infección y colonización, así como la diseminación de diferentes sitios del cuerpo humano, presente en cepas de hospitales y comunidad. (Cervantes-García et al., 2014).

1.1.3 Patogenia

Los estafilococos no puede penetrar las capas profundas de la piel o mucosas a menos que estas sufran una alteración o lesión, cuando las barreras mecánicas se rompen, esta bacteria puede alcanzar los tejidos más profundos y producir enfermedad. Los daños más frecuentes en la piel que permiten su entrada son: quemaduras, heridas accidentales, laceraciones, picaduras de insectos, intervenciones quirúrgicas o enfermedades asociadas a la piel. Una vez que entran a los tejidos su sobrevivencia depende del número de bacterias, del sitio involucrado, de la velocidad para provocar una respuesta inflamatoria y de los antecedentes inmunológicos de la personas. (Castro, 2014).



En inóculos bacterianos pequeños y personas inmunológicamente competentes, la infección se puede detener; sin embargo, algunas cepas de *S. aureus* poseen importantes estrategias de evasión. (Castro, 2014).

Los pacientes que tienen procesos infecciosos por *S. aureus* generalmente se infectan con la misma cepa que coloniza sus fosas nasales, la colonización también permite la transmisión entre individuos del hospital y en la comunidad. Para que la bacteria pueda sobrevivir e invadir al huésped todo los factores de virulencia deben estar dentro de un sistema de comunicación célula-célula conocido como quorum sensing (QS), el cual está mediado por pequeñas proteínas producidas por bacterias conocidas como autoinductoras, y dependiendo de factores ambientales, pueden activar un gran número de genes que contienen los factores de virulencia. El sistema QS más estudiado es el de *S. aureus*, denominado regulador de genes accesorios (agr). (Cervantes-García et al., 2014).

1.1.4 Factores determinantes de patogenicidad

Enzimas:

- Adhesinas: Sustancias proteicas que permiten el anclaje de las bacterias a la membrana citoplasmática de las células de los tejidos. (Cabello, 2007).
- Catalasa: Podría funcionar inactivando algunos sistemas de ingestión de los polimorfos nucleares (PMN). Los estafilococos producen catalasa que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. (Cabello, 2007) (Seija, 2008).
- Coagulasa: Esta correlacionada con el 97% de las cepas de *S. aureus* y se considera la prueba tipo para identificar esta especie. Actúa transformando el fibrinógeno en fibrina, formando una capa sobre la bacteria que la protege de la fagocitosis y de la opsonización. (Cabello, 2007).
- Estafiloquinasa: Es una fibrinolisisina que activa el plasminógeno, lo transforma en plasmina y este actúa sobre la fibrina, rompiendo enlaces peptídicos que lisan la fibrina y contribuyen a la invasión de tejidos vecinos. (Cabello, 2007).
- Hialuronidasa: Actúa sobre el ácido hialurónico, presente en el pegamento de las células de los tejidos, hidroliza la matriz intracelular de mucopolisacáridos de los tejidos y por tanto contribuye a la diseminación a tejidos adyacentes. (Cabello, 2007).



- Lipasas: Hidrolizan lípidos que ayudan al microorganismo a diseminarse por los tejidos cutáneo y subcutáneo lo que es esencial para la supervivencia bacteriana en zonas sebáceas, por otra parte, muchas de estas tienen acción antibacteriana y su destrucción disminuye las defensas de la piel.

Son varias enzimas que actúan sobre diferentes sustratos (aceites, grasas, ceras, etc.) que le permiten colonizar áreas de la piel donde se encuentran en altas concentraciones. (Cabello, 2007) (Seija, 2008).

- Fosfolipasa C: Está asociada con cepas recuperadas de pacientes con distrés respiratorio del adulto y coagulación intravascular diseminada (eventos que ocurren durante la sepsis). Al parecer los tejidos afectados por la fosfolipasa C se vuelven más susceptibles al daño y destrucción por componentes bioactivos del complemento y sus productos durante su activación. (Seija, 2008).

- Nucleasas: Tienen propiedades endonucleolíticas y exonucleolíticas. *S. aureus* produce toda una serie de enzimas como las DNAsas, proteasas y fosfatasa que colaboran en el proceso infeccioso y en la producción de lesiones tisulares. (Cabello, 2007).

Toxinas:

Se producen toxinas de acción general como las hemolíticas (α , β , γ y δ) y la leucocidina; además toxinas especializadas como las exfoliatinas, toxina del shock tóxico y enterotoxinas. Las hemolisinas son importantes toxinas citolíticas sobre una variedad de células. (Seija, 2008).

– α hemolisina o α toxina: Tóxicas para diversas células, lesiona las plaquetas, tiene efecto letal sobre una variedad de membranas celulares eucariotas, incluyendo la de PMN humanos. (Seija, 2008) (Cabello, 2007).

Es dermonecrótica si se inyecta en forma subcutánea. Es responsable de la zona de hemólisis observada alrededor de las colonias de *S. aureus* debido a su acción hemolítica sobre los eritrocitos. (Seija, 2008) (Cabello, 2007).

– β hemolisina: Es una esfingomielinasa, actúa sobre la membrana de los eritrocitos produciendo hemólisis en frío y calor. (Cabello, 2007).



– γ y δ hemolisinas: Se encuentran en algunas cepas de *S. aureus*. La γ hemolisina produce lisis de eritrocitos mientras que δ hemolisina además de ser hemolítica también lesiona linfocitos, plaquetas y neutrófilos. (Cabello, 2007).

– Leucocidina o leucotoxina: Tiene efecto tóxico directo sobre las membranas de los PMN y macrófagos, causando degranulación del citoplasma, hinchamiento celular y lisis. El modo de acción de esta toxina comprende la formación de poros que alteran la permeabilidad celular para el potasio y otros cationes. (Cabello, 2007) (Seija, 2008).

– Exfoliatinas o toxinas epidermolíticas: Consisten en dos proteínas, bioquímica e inmunológicamente diferentes, pero con funciones biológicas similares.

La exfoliatina A es un producto de genes cromosómicos, termoestable y es inactivada por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

La exfoliatina B es de origen plasmídico, es termolábil y estable frente al EDTA.

Estas toxinas actúan como superantígenos, tienen actividad proteolítica y disuelven la matriz mucopolisacárida de la epidermis produciendo separación del estrato granuloso, desprendiéndose la piel en colgajos. Las cepas productoras de una o ambas proteínas son responsables del síndrome de piel escaldada. (Cabello, 2007) (Seija, 2008).

– Enterotoxinas: Se conocen siete tipos (A, B, C1, C2, D, E y F), se trata de moléculas termoestables responsables de la intoxicación alimentaria producida por algunas cepas *S. aureus* (aproximadamente el 30%). El modo de acción de estas toxinas no es aún conocido pero se sabe que aumentan el peristaltismo intestinal, bien por inhibición simpática o por una acción irritante directa, y tiene además un efecto sobre el sistema nervioso central (SNC) que se traduce en la aparición del vómito. (Cabello, 2007) (Seija, 2008).

– Toxina del shock tóxico (TSST-1): Llamada también enterotoxina F. Actúa como un superantígeno estimulando la producción de interleucina 1 y 2 y el factor de necrosis tumoral alfa por los macrófagos. Está implicada en la patogenia del síndrome del shock tóxico. (Seija, 2008) (Castro, 2014).

– Exotoxinas pirógenas: Existen tres diferentes sustancias pirógenas que se denominan A, B, y C; las tres producen fiebre de diferente intensidad. (Cabello, 2007).



– ADNasa y la β lactamasa: La primera actúa sobre el ADN celular y la segunda rompe el anillo betalactámico de los antimicrobianos. (Cabello, 2007).

1.1.5 Factores predisponentes del huésped

Las infecciones no solo dependen de los factores de agresión que el microorganismo posee, sino también de alteraciones en los mecanismos de defensa del huésped. Dentro de los factores predisponentes del huésped tenemos:

- Defectos de quimiotaxis leucocitaria congénitos o adquiridos (diabetes mellitus, artritis reumatoide).
- Defectos de opsonización por anticuerpos (hipogamaglobulinemia).
- Defectos en la muerte intracelular luego de la fagocitosis (enfermedad granulomatosa crónica).
- Heridas de piel (quemaduras, incisiones quirúrgicas, eczema).
- Presencia de cuerpos extraños (suturas, vías venosas, prótesis).
- Infecciones por otros agentes, particularmente virus (influenza).
- Enfermedades crónicas como alcoholismo, falla renal crónica, enfermedades malignas, etc. (Seija, 2008).

1.1.6 Secuencia patogénica:

La infección estafilocócica generalmente progresa según una secuencia determinada:

- La colonización es el paso previo indispensable. Puede preceder a la infección en apenas horas (infección exógena) o en años (infección endógena).
- La puerta de entrada es generalmente cutánea.
- Infección superficial (forúnculo, impétigo, etc.).
- Tromboflebitis séptica.
- Invasión del torrente sanguíneo.
- Focos profundos: endocarditis, osteomielitis.
- Bacteriemia.
- Focos metastáticos parenquimatosos: pulmonar, renal, cerebral.
- Shock séptico: Fallas de grandes sistemas.
- Muerte: La progresión a las formas más graves depende de la importancia del foco inicial, del estado del huésped, y del tratamiento. Por otro lado, también se puede obviar alguna etapa. Por ejemplo, en la sepsis por catéter, puede haber



inoculación bacteriana directa al torrente sanguíneo, sin infección superficial ni tromboflebitis séptica. (Chans, 2002).

1.1.7. Enfermedades causadas por los estafilococos

Debido a su amplia versatilidad esta bacteria es capaz de colonizar e infectar todos los tejidos, causando enfermedades de amplio espectro como infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias. (Cervantes-García et al., 2014).

INFECCIONES

1. Infecciones superficiales.- No se dan frecuentemente, y la mayoría de las veces son autolimitadas, no prosiguiendo la secuencia patogénica más allá. (Chans, 2002).

- Cutáneas:

Panadizo: inflamación aguda a nivel latero subungueal. (Chans, 2002).

Impétigo: se trata de una lesión caracterizada por maceración de la piel, formación de una pápula eritematosa, dolorosa, que evoluciona para formar una costra con eritema periférico, con lesiones satélites y adenitis regional. (Cabello, 2007).

Forúnculo: es un pequeño absceso que se localiza en la piel y el tejido celular subcutáneo; presenta forma abultada o puntiaguda, color rojo y es doloroso, la piel que lo cubre es lisa y eritematosa, y puede romperse y drenar secreción purulenta. (Cabello, 2007).

Celulitis: es un proceso infeccioso inflamatorio de los tejidos blandos que se inicia en un foco y se disemina progresivamente por los tejidos más laxos en tejido celular subcutáneo, y generalmente drena en forma tardía. (Cabello, 2007).

Abscesos: es la formación localizada de un proceso inflamatorio en el que se acumula secreción purulenta a manera de un saco de diferentes tamaños. Estas lesiones deben drenarse quirúrgicamente para extraer el contenido purulento. (Cabello, 2007).

Antrax estafilocócico: Se observa en la región de la nuca, es la infección de varios forúnculos con extensión a la capa más profunda del tejido subcutáneo, que puede producir bacteriemia en un tercio de los casos. (Cervantes-García et al., 2014).



- Mucosas:

Conjuntivitis: Es una infección de la conjuntiva. Produce una respuesta papilar, asociadas en ocasiones a petequias y con secreción mucopurulenta, amarillenta, que pega los párpados por las mañanas. (Miralles, Baeza, & Barreras, 2015)

Otitis: Infección severa que afecta al conducto auditivo externo o interno y a los tejidos blandos adyacentes, la cual produce dolor intenso, fiebre y trastornos en la audición. (Alcántara, 2014).

Sinusitis: Se debe a un proceso inflamatorio o infeccioso de la mucosa de los senos paranasales. (García Rodríguez et al., 2003).

- Subcutáneas:

Hidrosadenitis: infección de las glándulas sudoríparas, que se localiza principalmente en axilas e ingles. (Chans, 2002).

2. Infecciones profundas.- Representan la progresión natural de la infección a partir de focos superficiales. (Chans, 2002).

Tenosinovitis: proceso inflamatorio agudo o crónico de tendones y sus vainas sinoviales. (Chans, 2002)

Fascitis: Infección de las fascias aponeuróticas, el tejido fibroso que recubre los músculos y huesos. (Chans, 2002).

Flemones: Infección por decolamiento de los espacios del tejido celular. (Chans, 2002).

3. Focos metastásicos.- Al encontrarse los estafilococos en el torrente sanguíneo, pueden establecerse en cualquier órgano profundo; con la probabilidad de causar: endocarditis, neumonía, osteomielitis, artritis, y abscesos parenquimatosos, en especial a nivel renal y cerebral. (Chans, 2002).

Endocarditis aguda: Es una de las infecciones más graves causada por *S. aureus*, con alta morbimortalidad, frecuentes complicaciones y problemático tratamiento debido al incremento en la complejidad de esta patología por el desarrollo de resistencias a los antibióticos. Se produce por la invasión del endocardio de las válvulas cardíacas, con formación de verrugosidades por depósito de fibrina y plaquetas.



Es común y característico en personas que usan drogas intravenosas, aunque en estos pacientes el cuadro suele ser menos dramático que en los no drogadictos, en los que afecta sobre todo válvulas izquierdas, con una evolución fulminante.

El shock cardiogénico por falla valvular aguda es la complicación más temible; otras complicaciones son los abscesos metastásicos parenquimatosos, el shock séptico, y el tromboembolismo pulmonar en el caso de endocarditis tricuspídea. (Chans, 2002).

Osteomielitis: Infección a nivel de los huesos largos (fémur, tibia y húmero), por microembolias sépticas. Ocurre generalmente en los primeros 5 años de vida siendo más frecuente en niños que en niñas. Puede tener dos formas clínicas, agudas o crónicas. En la primera predomina la inflamación y la fiebre, en la segunda el cuadro tórpido, con recidivas y fistulización. (Chans, 2002) (Matos et al., 2011).

Neumonía: Es un proceso infeccioso inflamatorio agudo del parénquima pulmonar. Afecta a pacientes inmunocompetentes o inmunodeprimidos y puede ser nosocomial o comunitario. El mecanismo habitual de producción de esta enfermedad es la colonización previa de las vías aéreas superiores por microorganismos patógenos y la aspiración posterior de secreciones orofaríngeas contaminadas. (Gutiérrez, Baquero, Gallardo, & Falcón, 2010).

Sepsis por catéter: El uso de catéteres centrales constituye una de las principales causas de infección por complicaciones y la primera causa de bacteriemia nosocomial. Casos especiales son la cateterización para nutrición parenteral (NP) y para hemodiálisis (HD).

La infección se produce por la vía periluminal, a partir de la propia piel del paciente. Recientemente se ha descrito infección desde la conexión a través de las manos contaminadas del personal manipulador, en especial en NP y HD, donde los cuidados de la piel son extremos. Los gérmenes colonizan el catéter, y a partir de allí pueden pasar directamente a la sangre, dando bacteriemia. (Chans, 2002) (García et al., 2003).

Bacteriemia y sepsis por *S. aureus*: Se define como bacteriemia la infección con el hallazgo de al menos dos hemocultivos positivos, con clínica compatible; y sepsis al cuadro de falla de grandes sistemas del organismo causado por la diseminación bacteriana. *S. aureus* ocupa el segundo lugar como agente de bacteriemia o sepsis, después de *Escherichia coli*.



La bacteriemia o sepsis de origen nosocomial se produce en la mayoría de los casos a partir de un catéter o una flebitis séptica, también de la infección de una herida quirúrgica. Es menor el porcentaje de origen desconocido y de endocarditis.

Al agravarse el cuadro clínico, se presentan fallas de los grandes sistemas reguladores del organismo. Pueden observarse, aisladamente o asociadas, insuficiencia renal aguda, distrés respiratorio agudo, coagulación intravascular diseminada, o shock. Muchas veces ante estas situaciones y la sospecha de infección, se hace diagnóstico clínico de sepsis, aun con hemocultivos negativos. (Chans, 2002).

El síndrome de choque tóxico (SST-1): Es un cuadro grave debido a la producción de la toxina TSS-1 que se desarrolla repentinamente después de una infección bacteriana, inicialmente se describió en niños y posteriormente en mujeres jóvenes que usaban tampones, además las toxinas pueden entrar al torrente sanguíneo a través de una herida en la piel, incluidas las heridas quirúrgicas.

En la actualidad, la mayor parte de los casos son secundarios a infecciones estafilocócicas diversas. Puede afectar rápidamente diversos órganos, entre ellos el hígado, los pulmones y los riñones. (Cervantes-García et al., 2014).

Artritis séptica: infección del espacio articular debido a una complicación en el curso de una bacteriemia. La respuesta inflamatoria e infecciosa que se produce a ese nivel es muy rápida, detectándose degradación del cartílago articular en las primeras 8 horas de haber empezado la infección. Se afecta con mayor frecuencia las extremidades inferiores: cadera, rodilla y tobillo. (Matos et al., 2011).

1.1.8. Epidemiología

Las infecciones ocasionadas por estafilococos son un problema de salud importante en todo el mundo debido a que en los últimos tiempos se ha observado en diferentes países un aumento en la prevalencia de SAMR en infecciones de piel y partes blandas en pacientes ambulatorios y hospitalarios. (Bermejo et al., 2012).

Este microorganismo causa infecciones de diversa gravedad en niños y adultos. Su frecuencia es alta y se estima en 28,4 casos por cada 100.000 personas de todas las edades. (Paganini et al., 2006)

La resistencia a la meticilina fue comunicada en 1961 pero no fue hasta los años ochenta en los que SARM alcanzaron cifras alarmantes, siendo en la actualidad un



patógeno relevante en la infección nosocomial cuya prevalencia en los hospitales llegó al 50%. (Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2013) (Paganini et al., 2006).

La colonización por *S. aureus* se da preferentemente por: heridas traumáticas, intervenciones quirúrgicas, instrumentación, drogadicción parenteral, enfermedades dermatológicas, úlceras isquémicas, etc. También se puede dar complicaciones graves de la bacteriemia estafilocócica como el shock séptico y las infecciones metastásicas graves, como meningitis. (Camarena & Sanchez).

Los CoNS, son bacterias que se encuentran en la piel y mucosas sanas del ser humano y constituyen entre el 65 al 90% de los *Staphylococcus* aislados de la piel, siendo uno de los más frecuentes el *Staphylococcus hominis* (*S. hominis*). Otros CoNS como *S. epidermidis* han asumido mayor importancia como agentes patógenos verdaderos. Las infecciones por CoNS están siendo causadas por el aumento de cuerpos extraños insertados a través de la piel como los catéteres y dispositivos artificiales. (Sanchis Bayarri, 2004).

La resistencia de los estafilococos a los antibióticos es reportada desde hace varios años. Más del 95 % de los aislamientos hospitalarios de *S. aureus* son resistentes a penicilina y las cepas multirresistentes de ese germen han crecido en importancia. (Nodarse Hernández, 2001).

La resistencia que presentan los CoNS a múltiples antibióticos es mayor que *S. aureus* por lo que puede llegar a complicar el tratamiento, por eso la importancia de éstos microorganismos recuperados como agentes patógenos intrahospitalarios ha despertado un mayor interés en su caracterización. (Sanchis Bayarri, 2004) (Nodarse Hernández, 2001).

1.1.9. Clasificación

El género *Staphylococcus* incluye actualmente más de 39 especies y 17 subespecies, las cuales son huéspedes naturales del humano o de otras especies. (Ortega Miranda, 2010).

- *Staphylococcus* coagulasa positiva: *S. aureus*

Es el microorganismo patógeno más común, frecuentemente lo encontramos en la nasofaringe, región perineal y piel, aunque puede colonizar superficies epiteliales y mucosas. Es una de las bacterias conocidas como “piógenas”, esta produce una gran cantidad de productos extracelulares como son hemolisinas, hialuronidasa,



leucocidina, estafilocinasa, penicilinas, desoxirribonucleasa y fibronilina que contribuyen a la patogenicidad y virulencia de la bacteria. Así mismo, algunas cepas pueden producir toxinas exfoliativas y enterotoxinas que causan una amplia variedad de enfermedades infecciosas. (Ortega Miranda, 2010).

Staphylococcus coagulasa positiva presenta colonias de 1 a 3 mm de diámetro, lisas, levemente elevadas y convexas, de bordes enteros, y de color amarillo el cual se debe a la producción de carotenoides; sin embargo, se presentan frecuentemente variantes no pigmentadas en muchas cepas. Además convierte el fibrinógeno en fibrina formando un coágulo en el plasma. (Seija, 2008) (Velázquez-Meza, 2005).

Esta bacteria puede causar enfermedad produciendo lesiones inflamatorias con contenido purulento, el cual puede avanzar a estructuras más profundas, y al llegar a torrente sanguíneo diseminarse y producir el mismo tipo de lesión en cualquier lugar del organismo. (Echevarria Zarate & Iglesias Quilca, 2003).

- *Staphylococcus coagulasa* negativa:

Las especies más frecuentemente involucradas en patología humana (80% de los casos) son: *Staphylococcus haemolyticus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*; el resto se debe a *Staphylococcus lugdunensis*, *S. hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus cohnii* y otras. La capacidad de CoNS de causar infección varía entre las diferentes especies; así, Thean Yen Tan y cols., identificaron a *S. lugdunensis* como la especie más virulenta, con 91% de los aislados asociados con infecciones clínicamente significativas. (Fariña et al., 2013).

Los *Staphylococcus coagulasa* negativo son de gran importancia actualmente, debido a que se encuentran con una alta frecuencia en los aislamientos clínicos. Forman parte normal de la microbiota de la piel, mucosas y glándulas de los mamíferos. (Ortega Miranda, 2010).

Es necesario saber distinguir en el laboratorio si los aislados de CoNS son cepas con significado clínico, es decir, cepas productoras de infección nosocomial o simplemente cepas que son parte de la piel normal del ser humano. (Ortega Miranda, 2010).

Los CoNS han sido reconocidos como causantes de las infecciones nosocomiales en una gran variedad de situaciones clínicas. Así en 1958, Smith y col. descubrieron el



potencial patógeno de los CoNS, al analizar datos procedentes de pacientes con septicemia. (Ortega Miranda, 2010).

S. epidermidis puede infectar la piel, las mucosas y las heridas, y *S. saprophyticus* es el responsable de infecciones en vías urinarias. (Ortega Miranda, 2010).

CoNS presenta colonias generalmente de menor tamaño en comparación con *S. aureus*, y estas no presentan pigmentación. (Seija, 2008).



Tabla 1. Especies de Estafilococos encontradas en el hombre. (Ortega Miranda, 2010).

<i>Especie</i>	<i>Comentario</i>
<i>S. aureus</i>	Es el patógeno más importante entre los estafilococos.
<i>S. epidermidis</i>	Es el estafilococo coagulasa negativo más frecuente en los aislados clínicos.
<i>S. saprophyticus</i>	Causa infecciones urinarias agudas sobre todo en mujeres jóvenes sanas, sexualmente activas.
<i>S. haemolyticus</i>	Recientemente se ha informado de la existencia de cepas resistentes a vancomicina en el contexto clínico de tratamiento prolongado con dicho antibiótico, lo que sugiere una selección de clonas resistentes.
<i>S. warneri</i>	Es una causa reconocida de bacteriemia relacionada con catéteres, de endocarditis de válvulas naturales, de osteomielitis vertebral hematógena y de meningitis asociada con derivaciones ventrículo peritoneal.
<i>S. hominis</i>	Se encuentra en la piel humana y ha sido aislada como causa de bacteriemia en pacientes cancerosos.
<i>S. simulans</i>	Ha sido identificado como causa de septicemia, osteomielitis y artritis séptica. Posee una cápsula que inhibe la fagocitosis <i>in vitro</i> y contribuye a su virulencia <i>in vivo</i> .
<i>S. lugdunensis</i>	Descrito por primera vez en 1988, se ha establecido rápidamente como patógeno humano importante. Se le ha asociado como endocarditis de válvulas naturales y protésicas, con celulitis de la piel y tejido subcutáneo, con peritonitis, con prótesis de cadera infectadas, con osteomielitis, con infecciones de guías vasculares y con abscesos mamarios.
<i>S. capitis</i>	Desde 1992, esta especie ha sido comunicada como agente causal de endocarditis en válvulas naturales.
<i>S. schleiferi</i>	Descrito por primera vez en 1988, ha sido aislado a partir de varias infecciones humanas, entre ellas empiema cerebral, infecciones de heridas e infecciones de catéteres permanentes.
<i>S. pasteurii</i>	Como especie de reciente descripción que se encuentra en muestras clínicas, animales y en alimentos todavía no ha sido asociada con procesos infecciosos y es fenotípicamente similar a <i>S. warneri</i> .
<i>S. auricularis</i>	Esta especie se encuentra en el conducto auditivo externo de seres humanos y raramente ha sido implicada en infecciones.
<i>S. cohnii</i>	Esta especie ha sido subdividida en dos subespecies denominadas <i>S. cohnii</i> subesp. <i>cohnii</i> y <i>S. cohnii</i> subesp. <i>urealyticum</i> .
<i>S. xylosum</i>	Se encuentra tanto en seres humanos como en primates y ha sido implicado como causa de infecciones de las vías urinarias superior e inferior y de endocarditis asociada con la adición de drogas intravenosas.
<i>S. saccharolyticum</i>	Esta especie anaerobia, denominada anteriormente <i>Peptococcus saccharolyticus</i> , fue transferido al género <i>Staphylococcus</i> sobre la base del análisis del RNA ribosómico 16S.



1.1.10. Resistencia a la meticilina (oxacilina).

Las cepas de *Staphylococcus* resistentes a la meticilina se encuentran fundamentalmente a nivel hospitalario, en particular en las unidades de cuidados intensivos, donde su prevalencia puede llegar a ser elevada, siendo además habitualmente multirresistentes. (Galiana Villar, 2003).

El fenotipo de resistencia a la meticilina es más frecuente entre las diferentes especies de CoNS (con la excepción de *S. lugdunensis* y *S. saprophyticus*) que en *S. aureus*. La resistencia a la meticilina (oxacilina, meticilina, cloxacilina, nafcilina) en estos microorganismos se debe a la adquisición de ADN exógeno (gen *mecA*) que codifica la producción de una proteína fijadora de penicilina (PBP) de baja afinidad por los betalactámicos y que no es inhibida por estos antimicrobianos, incluyendo cefalosporinas de primera a cuarta generación, y los carbapenems; extendiéndose la utilización de otras familias antibióticas como las quinolonas y lincosamidas. Esta PBP impide que la meticilina pueda adherirse al lugar donde va a ejercer la acción de bloquear la enzima transpeptidasa (cuya función en el ciclo de vida bacteriana es sintetizar la pared bacteriana). (Echevarria Zarate & Iglesias Quilca, 2003) (Ardanuy et al., 2011) (Tamariz et al., 2009).

S. aureus normalmente contiene 4 PBPs, de las cuales las PBPs 1, 2 y 3 son esenciales. La PBP de baja afinidad denominada PBP2a o PBP2', de 78 kDa, está codificada por el gen cromosómico *mecA*. La expresión fenotípica de la resistencia mediada por el gen *mecA* es compleja y se afecta por diferentes factores como la temperatura, el pH, la osmolaridad, la presencia de secuencias cromosómicas reguladoras y de otros genes cromosómicos no relacionados. (Ardanuy et al., 2011).

La cefoxitina al ser un inductor más potente del sistema regulatorio de *mecA* que las penicilinas es un marcador alternativo de la presencia de *mecA*, mejorando la expresión de este gen y en consecuencia también la detección de la resistencia a la meticilina. (Ardanuy et al., 2011).

El disco de cefoxitina tiene mayor utilidad y es de preferencia sobre el disco de oxacilina para detectar la resistencia a oxacilina mediada por el gen *mecA* y se debe utilizar siempre en cepas de CoNS. Además, no presenta problemas de estabilidad como la oxacilina durante su conservación. (Ardanuy et al., 2011).



El fenotipo de resistencia a la meticilina en *Staphylococcus spp.* se puede detectar en el laboratorio mediante la técnica de difusión con discos de oxacilina (1 µg) y/o cefoxitina (30 µg) o por dilución en caldo o en agar. (Ardanuy et al., 2011).

Factores de riesgo para adquirir meticilino resistencia

Los factores de riesgo que se han demostrado en la mayoría de estudios, con relación a infección nosocomial son: estancia prolongada hospitalaria, uso de antibióticos de amplio espectro, estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) o unidad de quemados, infecciones quirúrgicas, úlceras de decúbito, pobre estado funcional, proximidad a otro paciente con *Staphylococcus* meticilino resistentes. (Echevarria Zarate & Iglesias Quilca, 2003).

1.1.11. Resistencia inducible a clindamicina.

Las infecciones estafilocócicas, tanto a nivel comunitario como nosocomial, ha aumentado en los últimos 20 años y de igual manera se han incrementado a nivel mundial las infecciones causadas por SAMR. En este microorganismo se han descrito múltiples mecanismos de resistencia, entre éstos, existen 3 mecanismos de resistencia para los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLSB): modificación del sitio de acción (codificado por el gen *erm*), bomba de eflujo (codificado por el gen *msr A*) e inactivación (codificado por el gen *mph*). (Montoya et al., 2009).

La mayor parte de las cepas de *S. aureus* resistentes a la eritromicina lo son también a las lincosamidas. Esto es codificado por el gen *erm* (erythromycin ribosome methylation) que induce la metilación de la subunidad 23S ribosomal lo que conlleva a la modificación del sitio de unión de estos antibióticos. (Montoya et al., 2009).

La elevada capacidad del germen de generar resistencia a los antimicrobianos, se ve reflejada en la resistencia al grupo MLSB, la cual presenta dos variables, la resistencia constitutiva (MLSBC) y la inducible (MLSBI), ambas están relacionadas con la expresión de los genes *erm*. La variable constitutiva presenta elevado nivel de resistencia a cualquier antimicrobiano del grupo MLSB, a diferencia de la resistencia inducida que presenta únicamente resistencia a los macrólidos de 14 átomos (eritromicina) y 15 átomos (azitromicina) y sensibilidad “*in vitro*” a macrólidos de 16 átomos, lincosamidas (clindamicina) y estreptograminas B. En las cepas MLSBI la



expresión del gen *erm* es inducida por algunos compuestos, como la eritromicina por concentraciones sub-inhedorias (0,01 a 0,1 $\mu\text{g/mL}$) un potente inductor para la resistencia MLSBi; mientras que la clindamicina es un inductor débil que actúa lentamente. (Tamariz et al., 2009).

Las cepas con resistencia MLSBi aparentan susceptibilidad “*in vitro*” a clindamicina, pero al ser usado clínicamente, ocurre “*in vivo*” la inducción de la resistencia con el consiguiente fracaso terapéutico. Ello se explica porque la clindamicina al ser un inductor débil, provoca que a largo plazo, se induzca resistencia a sí misma. Por otra parte, la característica de la eritromicina de ser un potente inductor de la resistencia nos permite utilizarla en pruebas de detección de cepas MLSBi. (Tamariz et al., 2009).

Los macrólidos, las lincosamidas y las estreptograminas de tipo B (antibióticos MLSB) son antibióticos químicamente distintos pero con un mecanismo de acción similar, inhibiendo la síntesis proteica de las bacterias al unirse al sitio P en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano usándose habitualmente en el tratamiento de las infecciones estafilocócicas. (Merino-Díaz et al., 2007).

La resistencia inducible para macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B no se detecta usando las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana estándar, lo que puede conducir a falla del tratamiento con clindamicina, como ha sido reportado desde el año 1968 por Mc Gehee y col. Por otra parte, si consideramos como clindamicina resistente a toda cepa de *Staphylococcus spp* eritromicina resistente, se perdería la posibilidad de utilizar la clindamicina como tratamiento de las infecciones por este microorganismo que suelen ser susceptibles a este antimicrobiano. (Castellano et al., 2015).

Para identificar “*in vitro*” las cepas de *Staphylococcus spp* que poseen una resistencia inducible a la clindamicina el CLSI 2016 recomienda el método de difusión de doble disco (D-test). Este método consiste en colocar en un cultivo de *Staphylococcus spp*. un disco de clindamicina y uno de eritromicina a una distancia de 15 mm; aquellas cepas con resistencia inducible a clindamicina forman una letra D en la zona circular de inhibición alrededor del disco de clindamicina hacia el lado que enfrenta al disco de eritromicina. El D-test es un método que ha demostrado una sensibilidad y especificidad cercana al 100% al ser comparado con el estudio de genotipificación, el cual constituye el estándar de oro para la identificación de las cepas que presentan resistencia inducible a clindamicina. (Castellano et al., 2015).



CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1. Tipo de investigación.

Se desarrolló un estudio observacional, descriptivo y de corte transversal.

2.2. Tamaño de la muestra.

En el estudio se incluyeron todas las cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes obtenidas de muestras clínicas de exámenes solicitados por los médicos tratantes de todos los pacientes ingresados en el Hospital “Vicente Corral Moscoso”, en cualquiera de sus dependencias, durante el periodo junio – agosto 2016, cumpliendo con los criterios de inclusión y exclusión.

2.3. Criterios de inclusión.

Se trabajó con todas las cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes procedentes de muestras de secreciones, exudados y sangre de pacientes hospitalizados en el “Hospital Vicente Corral Moscoso” de todas las dependencias en el período junio - agosto 2016.

2.4. Criterios de exclusión.

Fueron excluidas las muestras de pacientes ambulatorios atendidos en consultorios externos, muestras a las cuales no se llegó a realizar un cultivo, muestras con infección por cualquier agente patógeno diferente al *Staphylococcus spp.* meticilino resistente y muestras contaminadas.

2.5. Localización Geográfica

- Se receptaron cepas aisladas de muestras de sangre, secreciones y exudados de pacientes hospitalizados en el HVCM, las cuales fueron estudiadas en el laboratorio de microbiología clínica del lugar antes mencionado, ubicado en la calle de los Arupos y Avenida 12 de Abril.
- Los medios de cultivo (Agar sangre de cordero, Agar manitol salado, Agar Mueller Hinton) se prepararon en el Laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas en el área de Microbiología Clínica de la Universidad de Cuenca a cargo de la Dra. Carmen Lucía López, localizado en la Avenida 12 de Abril entre Avenida Loja y Agustín Cueva.



- Los controles positivos (ATCC BAA-977) y negativo (ATCC BAA-44) de SARM con resistencia inducible a la clindamicina se prepararon en la Facultad de Ciencias Químicas en el área de Laboratorio de Microbiología del Proyecto Vllir de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca a cargo de la Dra. Lourdes Jerves localizado en la Avenida 12 de Abril entre Avenida Loja y Agustín Cueva.

2.6. Consideraciones éticas.

El estudio se realizó en el HVCM con autorización del Departamento de Docencia e Investigación, de la Jefa responsable del Laboratorio Clínico y además con la tutoría de la persona encargada del área de Microbiología Clínica.

Los datos de edad y procedencia de los pacientes fueron proporcionadas por el personal de Laboratorio del área de Microbiología Clínica.

2.7. Variables.

Tabla 2. Operacionalización de variables.

Variabes	Definición	Dimensión	Escala	Tipo de variable
Presencia de <i>Staphylococcus spp.</i> con tinción de Gram de muestras clínicas	Coloración azul de cepas con tinción Gram y presencia de microorganismos con formas redondeadas, dispuestas en racimo al observar microscópicamente	Identificación de Cocos Gram positivos en forma de racimos	Presencia	Categórica
Presencia de <i>Staphylococcus</i>	Formación de colonias de	Colonias pequeñas,	Presencia	Categórica



<p><i>spp.</i> en Agar manitol</p>	<p>estafilococos al sembrar las cepas en medio manitol salado luego de 18-24h a 35°C en aerobiosis.</p> <p>Capacidad de los estafilococos de fermentar o no el manitol en un periodo de 18-24h a 35°C en aerobiosis.</p>	<p>cremosas, de forma circular, bordes redondeados superficie lisa y convexa.</p> <p>Cambio de color del indicador Rojo de Fenol a amarillo</p>	<p>Manitol: Positivo Negativo</p>	
<p>Presencia de <i>Staphylococcus spp.</i> en Agar sangre de cordero</p>	<p>Formación de colonias de estafilococos al sembrar las cepas en medio Agar sangre de cordero al cabo de 18-24h a 35°C en aerobiosis</p>	<p>Colonias pequeñas, blanquecinas cremosas, de forma circular, bordes redondeados, superficie lisa y convexa que pueden o no presentar β hemólisis.</p>	<p>Presencia o ausencia de β hemólisis.</p>	<p>Categórica</p>
<p>Diferenciación entre</p>	<p>Respuesta de las cepas ante la</p>	<p>Desprendimiento de</p>	<p>Catalasa (+): <i>Micrococcus</i></p>	<p>Categórica</p>



<p><i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i> <u><i>Streptococcus</i></u> <i>spp.</i> <i>Micrococcus</i> <i>spp.</i> <i>Enterococcus</i> <i>spp.</i></p>	<p>presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).</p>	<p>burbujas indica la presencia de la enzima catalasa capaz de descomponer el H₂O₂ en agua y oxígeno</p>	<p><i>spp.</i> y <i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i> Catalasa (-): <i>Streptococcus</i> <i>spp</i> <i>Enterococcus</i> <i>spp.</i></p>	
<p>Diferenciación de <i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i></p>	<p>Respuesta de las cepas para coagular o no el plasma</p>	<p>Formación del coágulo indica la presencia de la enzima coagulasa (conversión del fibrinógeno en fibrina)</p>	<p>Coagulasa (+): <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivo. Coagulasa (-): CoNS</p>	<p>Categoría</p>
<p>Resistencia de <i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i> a la metilina</p>	<p>Respuesta de la bacteria frente a los antibióticos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Penicilina • Cefoxitina <p>El microorganismo debe ser resistente a los dos antibióticos para que sea definido como metilino resistente.</p>	<p>Tamaño del halo en mm</p>	<p>Cefoxitina: CoNS:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ≤ 24 mm = resistente • ≥ 25 mm = sensible <p>S. aureus:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ≤ 21 mm = resistente • ≥ 22 mm = sensible 	<p>Numérica y categórica</p>



			Penicilina: <i>S. aureus</i> y CoNS: <ul style="list-style-type: none"> • $\leq 28\text{mm}$ = resistente • $\geq 29\text{mm}$ = sensible 	
Resistencia a la clindamicina inducida por la meticilina	Respuesta de la bacteria frente a la clindamicina	Formación de una letra D en la zona circular de inhibición alrededor del disco de clindamicina hacia el lado que enfrenta al disco de eritromicina.	Presencia o ausencia	Categórica

2.8. Análisis Estadístico

Los datos de laboratorio, tanto los proporcionados por el personal del Hospital así como los obtenidos como resultado de esta tesis, se ingresaron utilizando el software Microsoft Excel. Las bases de datos finales fueron analizadas posteriormente en el programa Stata 13.0 (College Station, TX, USA).

Las variables categóricas se expresaron mediante tablas de distribución de frecuencias. Se determinaron las diferencias de resistencia a antibióticos de acuerdo al tipo de muestra biológica, a la dependencia y a la clasificación de los *Staphylococcus spp.* (CoNS/*Staphylococcus coagulasa* positivo) mediante la prueba del Chi cuadrado. Todos los test estadísticos fueron reportados con un nivel de significancia del 5%.

Los datos de la edad de los pacientes de los cuales se obtuvieron las cepas se reportaron como: mediana, valor mínimo y valor máximo debido a la asimetría en la distribución de la variable.

2.9. Técnicas

2.9.1. Siembra y cultivo de microorganismos

Al cultivar un microorganismo se promueve intencionalmente el desarrollo de éste en medios de cultivo y condiciones de laboratorio controladas.(Conalepfelixtovar, 2012).

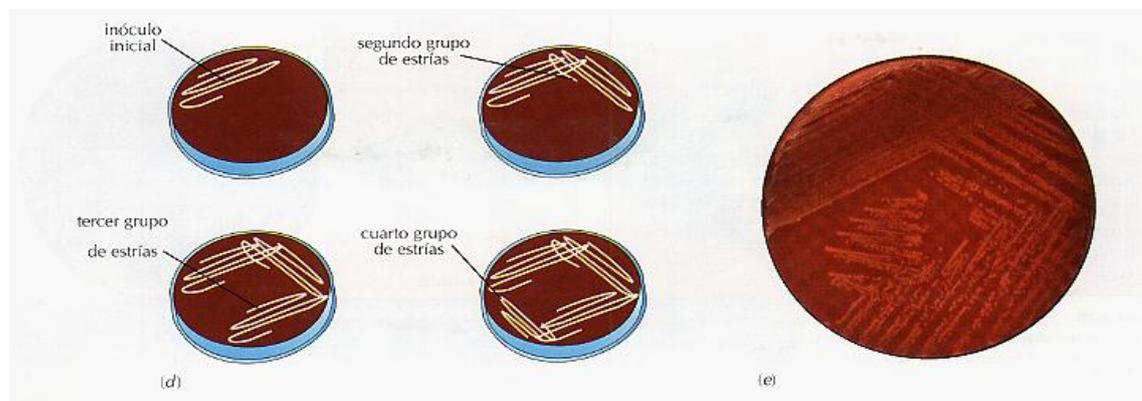
Cuando se realiza una siembra de un cultivo a otro se obtiene un “subcultivo” o “repique”. (Flores, 2013).

2.9.1.1. Siembra: En Agar sangre de cordero y Agar Manitol

2.9.1.1.1. Agar sangre de cordero

Aislamiento por agotamiento: Se utiliza una asa previamente esterilizada por calentamiento hasta el rojo vivo en el mechero y se deja enfriar, se toma una a dos colonias del medio de cultivo que contiene la bacteria, a continuación se inocula la muestra sobre un extremo de la placa con un asa y se extiende formando estrías sobre la superficie en varios sentidos, cada célula aislada se multiplicara formando una colonia independiente, cada colonia representa un cultivo puro.(Fig.1)(Chavarri, 2014).

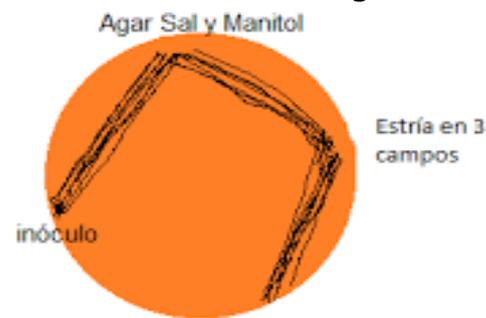
FIGURA 1. Técnica de siembra en Agar sangre.



(Jiménez, 2011)

2.9.1.1.2. Agar manitol salado

Estriado: Se calienta el asa de inoculación hasta que quede de color rojo intenso para eliminar cualquier microorganismo. Dejar que se enfríe por unos segundos. Recoge una muestra del cultivo bacteriano a partir de una caja Petri y se realiza la siembra por medio de la técnica de estría cruzada en tres campos. (Fig. 2) (Quistián, 2014).

FIGURA 2. Técnica de siembra en Agar manitol salado.

(Jesica, 2015).

2.9.1.1.3. Transporte y Almacenamiento

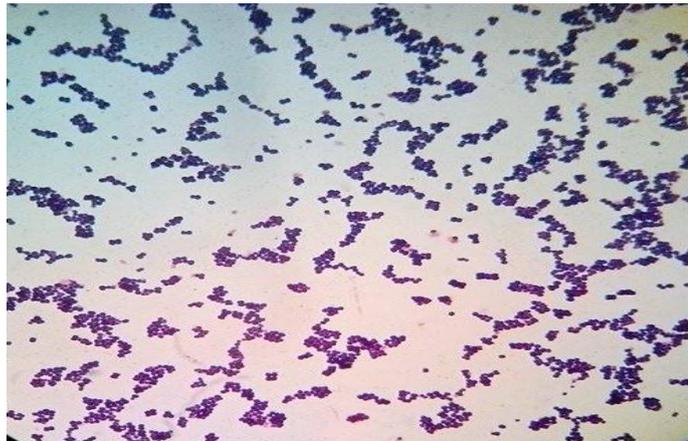
Los medios de cultivo fueron transportados hacia el HVCM en cajas cooler, previamente sellados herméticamente con papel film y etiquetados correctamente; además fueron almacenados en refrigeración a una temperatura de 2 – 8 °C y conservados por hasta 15 días para su uso.

Las cepas aisladas de *Staphylococcus spp.* metilino resistentes fueron almacenadas en refrigeración a una temperatura de 2 – 8 °C y fueron procesadas dentro de las 24 horas.

2.9.2. Tinción de Gram

Método de tinción diferencial más importante usada en bacteriología el cual permite dividir las bacterias en dos grandes grupos, las Gram-negativas y las Gram-positivas. Esto es esencial para la clasificación y diferenciación de microorganismos. La reacción a la tinción de Gram está basada en la diferencia en la composición química de la pared celular bacteriana.

La pared de la célula bacteriana sirve para determinar el tamaño, forma y resistencia al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano y algo de ácido teicoico, mientras que la pared de la célula gram-negativa contiene una capa mucho más delgada de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. (Fig. 3) (Santambrosio, Ortega, & Garibaldi, 2009).

FIGURA 3. Tinción de Gram.

FUENTE: Registro de Laboratorio

2.9.3. Prueba de la catalasa

La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. De esta manera las bacterias se protegen del efecto tóxico del H_2O_2 , que es un producto final del metabolismo aerobio de los azúcares. (Fig. 4).

El principal objetivo de esta prueba es separar *Micrococcus spp.* y *Staphylococcus spp.* (positiva) de *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.* (negativa). (Olmos, de la Fuente, Nieto, & Ramos)

FIGURA 4. Prueba de la catalasa.

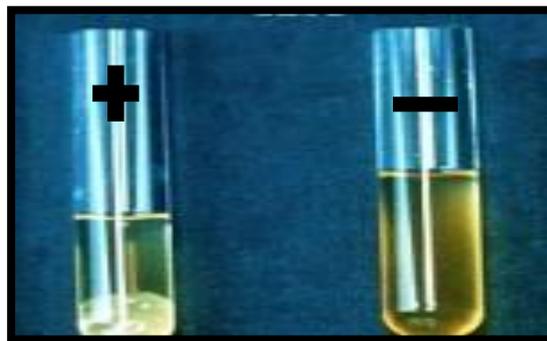
FUENTE: Registro de Laboratorio

2.9.4. Prueba de la coagulasa

La enzima coagulasa tiene la capacidad de coagular el plasma y está presente en varios microorganismos. Esta prueba es utilizada para diferenciar *S. aureus* (coagulasa positiva) de otras especies de *Staphylococcus spp.* que son coagulasa negativa. La prueba de la coagulasa en tubo puede leerse tras una incubación de 4h, pero si es negativa debe incubarse hasta 24h.(Olmos et al.)

La coagulasa reacciona con la sangre formando un complejo llamado staphylotrombina permitiendo que la enzima proteasa convierta el fibrinógeno en fibrina llevando a la coagulación de la sangre.(Fig 5) (J. Valle, N. Miranda, A. Orozco, L. García, & J. Rodríguez).

Figura 5. Coagulasa positiva / Coagulasa negativa.



(Telemedicina, 2009)

2.10. Pruebas de sensibilidad

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. El principal objetivo es evaluar la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, lo que permite conocer la eficacia clínica de los mismos. El antibiograma define la actividad "*in vitro*" de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Estas pruebas se realizan según el manual CLSI. (García-Rodríguez et al., 2000).



2.10.1. Método utilizado: Difusión en agar (Técnica de Bauer & Kirby)

Es uno de los métodos que el CLSI recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Es una técnica cualitativa y sus resultados se pueden interpretar únicamente como sensible, intermedio o resistente.

En esta técnica, el inóculo bacteriano llevado a una concentración igual a la del estándar 0,5 de Mc. Farland, se aplica sobre la superficie de una placa seca de agar Mueller-Hinton, con la ayuda de un hisopo estéril se siembra sobre la superficie del medio solidificado de forma tal que se logre un crecimiento confluyente. Posteriormente, en un plazo no mayor de 15 minutos, se procede a colocar los discos que contienen el antibiótico con una pinza estéril aplicando una ligera presión. Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar.

Luego la placa se incuba a 35°C y por un periodo no mayor a las 18 horas excepto para los aislamientos de *Staphylococcus spp.* y *Enterococcus spp.*, para los cuales se recomienda una incubación de 24 horas.

Cada halo de inhibición es medido utilizando una regla graduada en la forma adecuada. En el caso de que no se presente un halo, se debe reportar 6 mm, ya que ese es el diámetro del disco.

Los diámetros alrededor de cada disco son medidos y su interpretación se basa en la guía CLSI 2016 y el organismo es reportado como sensible, intermedio o resistente al antibiótico testado. (Herrera, 1999).

2.10.1.1. Método de inoculación a partir de colonias aisladas:

A partir de una placa de cultivo con Agar sangre de cordero e incubada por 18 - 24 h, seleccionar colonias aisladas y preparar una suspensión directa en solución salina. La suspensión debe ser inmediatamente ajustada a la escala 0,5 de Mc. Farland con la ayuda de un turbidímetro. (Sacsquispe, 2002).

2.10.1.2. Interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos:

Clasificación basada en la respuesta “*in-vitro*” de un microorganismo a un antibiótico en los niveles que este alcanza en sangre o tejidos con una dosificación habitual.



Sensible (S).- Implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubiera contraindicaciones.

Intermedio (I).- Incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones más elevadas de antibiótico, siempre que las dosis normalmente usadas puedan ser aumentadas o que la droga concentra fisiológicamente en el tejido infectado. Indica también una "zona buffer" que debería evitar que pequeños factores técnicos difíciles de controlar causen mayores discrepancias de interpretación.

Resistente (R).- Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia microbiana y la eficacia clínica no ha sido comprobada.(Malbrán, 2012).

2.10.2. Procedimiento para la determinación de la resistencia a la penicilina, meticilina y de resistencia inducible a la clindamicina.

Se procedió de acuerdo a las tablas 3, 4 y 5 tomadas del Manual CLSI 2016.

Tabla 3. Prueba para la detección de resistencia a la penicilina para *Staphylococcus spp.* (Manual CLSI 2016)

Condiciones de prueba	
Medio	Agar Mueller Hinton
Concentración de Antimicrobiano	disco de penicilina de 10 unidades
Inóculo	suspensión directa de colonias a obtener 0,5 McFarland turbidez
Condiciones de incubación	33 a 35 ° C; aire ambiente
Tiempo de incubación	16 – 18 horas
Resultados	Sensible: ≥ 29 mm Resistente: ≤ 28 mm

Fuente: Manual de CLSI, Edición Enero 2016, Número M100, 26th ed. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016)



Tabla4. Prueba para la detección de la resistencia a la meticilina (resistencia a oxacilina) en especies de *Staphylococcus spp.* (Manual CLSI 2016)

Prueba	mecA mediada por la resistencia a oxacilina usando cefoxitina
Método de ensayo	Difusión en disco
Medio	Agar Mueller Hinton
Concentración de Antimicrobiano	disco de cefoxitina 30 ug
Inóculo	suspensión directa de colonias a obtener 0,5 McFarland turbidez
Condiciones de incubación	33 a 35 ° C; aire ambiente
Tiempo de incubación	16 – 18 horas
Resultados	<i>S. aureus</i> : ≤ 21 mm = <i>mecA</i> positivo ≥ 22 mm = <i>mecA</i> negativo CoNS: ≤ 24 mm = <i>mecA</i> positivo ≥ 25 mm = <i>mecA</i> negativo

Fuente: Manual de CLSI, Edición Enero 2016, Número M100, 26th ed. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016)



Tabla 5. Prueba para la detección de resistencia inducible a clindamicina en especies de *Staphylococcus* (Manual CLSI 2016)

Prueba	Resistencia inducible a la clindamicina
Método de ensayo	Prueba zona D
Medio	Agar Mueller Hinton
Concentración de Antimicrobiano	15 ug de eritromicina y 2 ug de clindamicina discos espaciados 15 - 26 mm de separación
Inóculo	suspensión directa de colonias a obtener 0,5 McFarland turbidez
Condiciones de incubación	35 ° C± 2°C
Tiempo de incubación	16 – 18 horas
Resultados	Aplanamiento de la zona de inhibición adyacente al disco de eritromicina (referido como un D- zona) = resistencia inducible a la clindamicina. Crecimiento nebuloso dentro de la zona de inhibición alrededor de clindamicina = resistencia a la clindamicina.

Fuente: Manual de CLSI, Edición Enero 2016, Número M100, 26th ed. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016)

2.10.3. Discos de antibióticos empleados

Penicilina:

Es un antibiótico betalactámico que tiene una acción principalmente bactericida. Al unirse a determinadas proteínas de la pared celular bacteriana inhibe su síntesis.

La actividad intrínseca de las penicilinas frente un organismo particular depende de su capacidad para poder llegar a la pared de la célula y poder formar estas proteínas.



La capacidad que tienen las penicilinas para interferir en la síntesis de la pared lleva a la lisis celular, que está mediada por enzimas autolíticos de la pared celular (autolisinas)

El espectro de actividad de la familia de las penicilinas es amplio. Son activas contra bacterias gram positivas, negativas y anaerobias; pero poseen mayor actividad contra las bacterias gram positivas.

Cefoxitina:

Antibiótico semisintético, de amplio espectro, de la familia de las cefamicinas. La cefoxitina tiene acción bactericida, inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana. Tiene actividad en presencia de ciertas betalactamasas, tanto penicilinasas como cefalosporinasas que son producidas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

La resistencia a la cefoxitina está mediada principalmente mediante la hidrólisis por betalactamasa, la alteración de las proteínas de unión a penicilina (PBP), y la disminución de la permeabilidad a través de la pared celular.

Eritromicina:

Antibiótico macrólido producido por el *Streptomyces erythraeus* siendo el primero de la familia de los macrólidos. La eritromicina al unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano inhibe la síntesis de proteínas.

La eritromicina tiene actividad bacteriostática. Esta es efectiva frente a un amplio espectro de microorganismos con una actividad mayor en gram-positivos que en gram-negativos.

Clindamicina:

La clindamicina se une a las subunidades 50S de los ribosomas bacterianos e inhibe la síntesis de proteínas. Dependiendo de su concentración en el lugar de su actividad y de la susceptibilidad del microorganismo, la clindamicina tiene acción bacteriostática o bactericida. La clindamicina es activa frente a una amplia variedad de microorganismos.

En particular, muchas cepas de *Streptococcus* y *Staphylococcus* son extremadamente susceptibles a este antibiótico. (VADEMECUM, 2014).



NOTA: los antibióticos se deben guardar en refrigeración a 4°C y dejarlos a temperatura ambiente 2 horas antes de su utilización. Los discos se ponen en congelación si son antimicrobianos betalactámicos y si transcurren más de una semana hasta su utilización.

El deterioro de los discos puede darse si son sometidos a la humedad o a frecuentes fluctuaciones de temperatura.(García-Rodríguez et al., 2000).

2.10.4. Control de calidad

Para proceder a la lectura de los antibiogramas debe haber un estricto control de calidad para supervisar la exactitud y fiabilidad de la metodología.

Existe un gran número de factores que pueden afectar los resultados dentro de las que se destacan:

- a) Actividad de los discos (verificar su fecha de vencimiento o que pierdan su carga por almacenamiento incorrecto).
- b) Inadecuada composición y espesor del medio.
- c) Alteraciones en más o en menos en el inóculo (patrón de turbidez 0.5 de la escala de Mc Farland).
- d) Problemas con el tiempo o temperatura de incubación.

Para llevar a cabo eficientemente este control de calidad al mismo tiempo que se realiza el procedimiento para la cepa en estudio, se realiza para una cepa control.

Las cepas control utilizadas son las recomendadas por el CLSI 2016 denominadas ATCC, éstas son cepas conocidas, de las cuales se sabe su patrón de resistencia o sensibilidad. Se debe verificar que los diámetros de inhibición del crecimiento bacteriano de los discos de antibióticos estén dentro de los establecidos en las tablas, de lo contrario podremos concluir que existe alguna variable que está cambiando las condiciones en que debe ser realizado el procedimiento. (Taroco, Seija, & Vignoli, 2006).

Las cepas pueden clasificarse en tres tipos:

- Cepas de referencia
- Cepas de reserva
- Cepas de trabajo

Cepas de referencia:

Las cepas ATCC o de referencia son cepas certificadas que contiene un único cultivo puro con convenientes características morfológicas y bioquímicas definidas y son almacenadas entre 2-8 °C hasta su uso. (Fig. 6).

Para la reconstitución y siembra de las cepas ATCC se utiliza medios de cultivo de enriquecimiento y se procede a su incubación y almacenamiento según el microorganismo.(Balleza et al.) (J. Valle, N. Miranda, A. Orozco, L. García, & J Rodríguez)

Figura 6. Cepa liofilizada de *S. aureus* BAA-977



FUENTE: Registro de Laboratorio

Cepas de reserva:

Son las cepas idénticas obtenidas a partir de un único subcultivo de una cepa de referencia. Esta se conserva en leche descremada y en congelación. Son potencialmente peligrosas.

Cada vial debe estar identificado con el nombre de la cepa y fecha de congelación a una temperatura de -86°C en biofreezer y en nitrógeno líquido a -195,8 °C. (Fig. 7) (Balleza et al.).

Figura 7. Cepa de *S. aureus* BAA-977 en leche descremada



FUENTE: Registro de Laboratorio

Cepas de trabajo:

Se obtiene por subcultivo de las cepas de reserva en medios de cultivo de enriquecimiento apropiados para el microorganismo (agar sangre de carnero, manitol y Mueller Hinton). Se verifica la calidad, pureza y morfología típica del subcultivo con las pruebas correspondientes para así poder servir de comparación con las muestras clínicas. No se subcultiva para sustituir a las cepas de reserva. (Fig. 8) (Balleza et al.).

Transporte de la cepa de trabajo: para su transporte lo realizamos en cajas cooler, previamente sellado herméticamente con papel film.

Figura 8. Cepa de *S. aureus* BAA-44 /Cepa de *S. aureus* BAA-977 en Agar Mueller Hinton



FUENTE: Registro de Laboratorio

Utilidad de los cultivos de las cepas control:

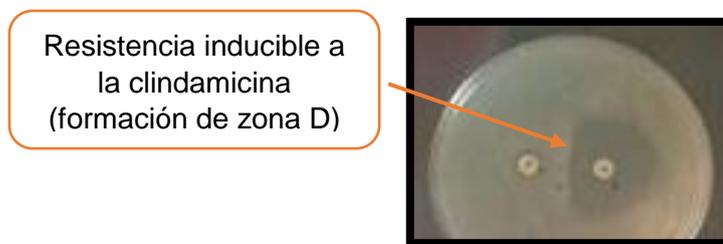
- Para evaluar la calidad de los medios de cultivo.
- Para asegurar la calidad de los resultados de ensayos de laboratorio.
- Para validar métodos microbiológicos (pruebas de sensibilidad).(Balleza et al.).

2.10.4.1. Cepas de control de calidad utilizadas según el manual CLSI 2016

Staphylococcus aureus ATCC® BAA-977

- Utilizado para realizar la prueba D-Test para evidenciar resistencia inducible a clindamicina, control positivo. (Fig. 9).

Figura 9. Cepa de *S. aureus* BAA-977 (control positivo)



FUENTE: Registro de Laboratorio

Staphylococcus aureus ATCC® BAA-44

- Utilizado para realizar la prueba D-Test para evidenciar resistencia inducible a clindamicina, control negativo. (Fig. 10)

Figura 10. Cepa de *S. aureus* BAA- (control negativo)



FUENTE: Registro de Laboratorio



2.11. Materiales y equipos

2.11.1. Materiales

- Recipiente para transporte de muestras
- Lámparas de alcohol
- Asa
- Cajas Petri
- Placas Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Gradillas para tubos
- Guantes de examinación
- Papel aluminio
- Algodón
- Varillas
- Probetas
- Matraz de Erlenmeyer de 1000ml (PYREX)

2.11.2. Reactivos

- Violeta cristal para tinción de Gram
- Solución de yodo para tinción de Gram
- Alcohol cetona para tinción de Gram
- Fucshina para tinción de Gram
- Aceite de inmersión
- Peróxido de hidrógeno al 3%
- Solución salina
- Plasma sanguíneo

2.11.3. Equipos

- Autoclave (Trident, EA 632, D005-F0033)
- Cámara de flujo laminar (BIOBASE, BSC-1100IIA2-X,DXA201588)
- Estufa (NAPCO, 322-10, 6-76-0352)
- Baño María (MEMMERT, W-B7, LE-209)



- Refrigeradora (Mabe, In-genious, W19GTDX)
- Cocineta eléctrica de 2 quemadores (Mantua, 110V.2kwts.84-4-B, 222004000092040)
- Balanza electrónica de precisión (Metter, PC440, 222004000092041)
- Microscopio (OLYMPUS, CX31RBSFA, 8J06174)
- Turbidímetro (BIOMERIEUX, DENSIMAT, M007230)
- Vortex Mixer (K, VM-300, 1504796)

2.12. Medios de cultivo

Agar sangre de cordero

Es un medio enriquecido, combinación de un agar base (agar nutritivo) con fuente proteica (digeridos trópticos, digeridos proteicos de soja) el cual tiene un agregado de 5% de sangre ovina, con una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales y cloruro sódico.

Aporta muchos factores de enriquecimiento y se utiliza también para ver la capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos (que es un factor de virulencia). Observando los halos hemolíticos alrededor de las colonias se determina el tipo de hemólisis que posee:

- Alfa: halos verdosos
- Beta: halos incoloros
- Gamma: inexistencia de halos.(Casado, Torrico, & Medina, 2012)

Agar manitol salado

Es un medio de cultivo de gran utilidad en microbiología debido a que es capaz de distinguir los microorganismos patogénicos en un corto periodo de tiempo. Permite el crecimiento de un determinado grupo de bacterias mientras que inhibe el crecimiento de otras. Contiene una alta concentración de sal (NaCl), haciéndolo selectivo para estafilococos debido a que el nivel de NaCl es inhibitorio para la mayoría de las bacterias. (Casado et al., 2012).

El agar manitol salado incluye en su composición el indicador de pH: rojo fenol. Este indicador es de color rojo a pH 8,2 y cambia a amarillo a pH por debajo de 6,8. Cuando se desarrollan las colonias de *Staphylococcus aureus* fermentadoras de manitol, se



produce ácido en el medio, el cual reacciona con el indicador y forma las áreas de color amarillo alrededor de las colonias, reacción característica de los estafilococos patógenos. (Durán Vila, Zhurbenko, & Viera Oramas, 2004).

Agar Mueller Hinton

Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el CLSI, para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma debido a su buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su bajo contenido de sustancias inhibitoras y el crecimiento satisfactorio que presentan la mayoría de los patógenos no fastidiosos. Además cumple con los requerimientos de la Organización Mundial de la Salud y está especificado en la FDA. (Casado et al., 2012).

Con este medio se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios sobre susceptibilidad antimicrobiana. En este medio la infusión de carne y la peptona de caseína proveen la fuente de nitrógeno, vitaminas, carbón y aminoácidos. El almidón es agregado para absorber cualquier metabolito tóxico y el agar es adicionado como agente solidificante. (Casado et al., 2012).

El pH del medio debe ajustarse entre 7,2-7,4, debe almacenarse a 2-8°C y utilizarse dentro de los 7 días siguientes a su preparación. El medio debe dejarse a temperatura ambiente unas dos horas antes de utilizarlo. Si existe agua en la superficie del agar, las placas pueden colocarse en la incubadora a 35°C durante unos 30 minutos con la tapa ligeramente entreabierta. (García-Rodríguez et al., 2000).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Condiciones de los pacientes según la edad y procedencia de muestras.

Durante el periodo de estudio se analizaron 122 cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes las cuales provenían de sangre, secreciones y exudados de distintas áreas estudiadas del HVCM (Pediatría, Clínica, Neonatología, Cirugía, Gineco-Obstetricia y UCI). Las cepas fueron obtenidas de pacientes con una mediana de la edad de 21.52 años, edad mínima 0.04 años y máxima de 99.66 años; los datos de la edad no fueron analizados debido a la asimetría en la distribución de la variable.

3.2. Resistencia inducible a la clindamicina en cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes.

De las 122 cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes analizadas, el 17.21% presentaron resistencia inducible a la clindamicina. (Gráfico 1).

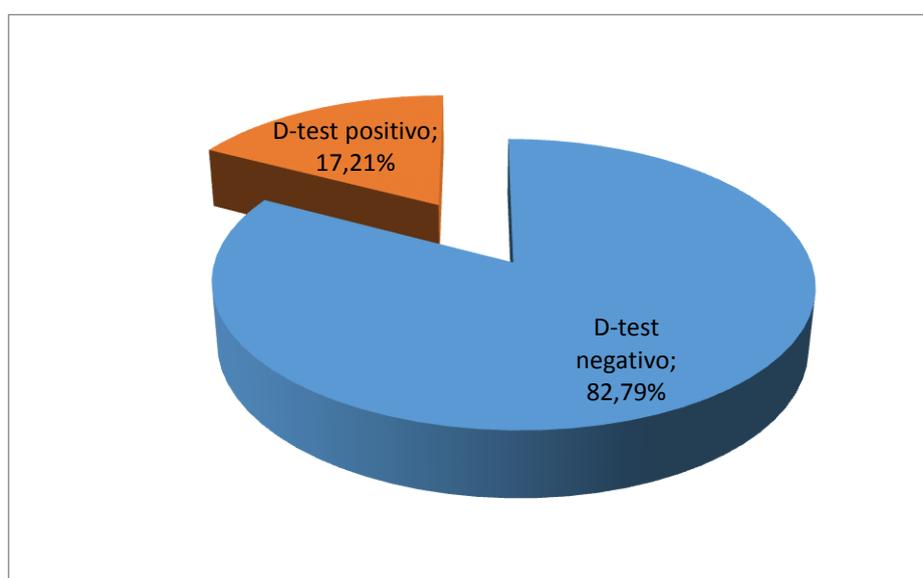


Gráfico 1. Distribución de cepas *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina mediante D-test



Tabla 6. Presencia de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina mediante D test.

	Resistencia inducible a la Clindamicina			
	Positivo		Negativo	
	N	(%)	N	(%)
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	13	14.29	78	85.71
<i>Staphylococcus coagulasa positivo</i>	8	25.81	23	74.19
Todas las cepas	21	17.21	101	82.79
Prueba Chi cuadrado $P \leq 0.05$				
*Valor P = 0.142				

La Tabla 6 muestra la distribución de *Staphylococcus spp.* meticilino resistente con resistencia inducible a la clindamicina mediante D test (N=21). El 14.29% de las cepas de *Staphylococcus coagulasa negativa* dieron un resultado positivo en comparación con el 25.81% de las cepas de *Staphylococcus coagulasa positiva*; sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (P=0.142).

Al comparar los resultados con un estudio realizado en Bolivia, 2009 (Padilla Chumacero) en el cual se analizaron 42 cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes y de éstas, 5 presentaron resistencia inducible a la clindamicina, resultando el 6.3% para *Staphylococcus coagulasa negativa* y el 15.4% para *Staphylococcus coagulasa positiva*, se puede observar que en el presente estudio los resultados son superiores, lo que podría deberse a la diferencia en la cantidad de cepas estudiadas y en el período de tiempo en el que se realizó.

Otro estudio en Turquía (Azap et al., 2005) donde se analizaron 199 cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes, dio como resultado 35 cepas con resistencia inducible a la clindamicina y de éstas el 30.8% fueron *Staphylococcus coagulasa negativa* y 5.7% fueron *Staphylococcus coagulasa positiva*. En la presente investigación el porcentaje de *Staphylococcus coagulasa negativa* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina fue aproximadamente la mitad del obtenido en Turquía y para *Staphylococcus coagulasa positiva* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina fue aproximadamente 5 veces mayor. Esta gran diferencia podría deberse a que el antimicrobiano clindamicina es utilizado con frecuencia en nuestro medio y esto podría haber marcado con resistencia



a las cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva por tratamientos incompletos o automedicación; además del tiempo diferente en el que se realizó el estudio.

En Estados Unidos se realizaron estudios en 2 hospitales diferentes a partir de 203 cepas de SAMR en el Centro Médico de la Universidad de Illinois y de 249 cepas de SAMR en el Elmhurst Memorial Hospital, de las cuales el 7% y 12% presentaron resistencia inducible a la clindamicina, respectivamente. (Schreckenberger, Ilendo, & Ristow, 2004). Por otro lado en la India, (Prabhu, Rao, & Rao, 2011) se llevó a cabo un estudio similar con 60 cepas de SAMR, de los cuales el 20% mostró resistencia inducible a la clindamicina. Si comparamos estos resultados con los del presente trabajo se puede observar que conforme han ido pasando los años se ha ido incrementando este tipo de resistencia inducible; esto podría deberse a un uso excesivo de antibióticos, incumplimiento del tratamiento establecido por el médico, prescripciones innecesarias, diagnósticos incorrectos, mutaciones en los genes bacterianos; aunque no se pudiera hacer una afirmación contundente, debido a la diferencia en las características de las poblaciones de estudio y de los sistemas de control sanitarios en los países en los cuales se realizaron las investigaciones.

3.2.1. Presencia de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina mediante D test, según las áreas estudiadas del HVCM.

Tabla 7.

	Resistencia inducible a la Clindamicina			
	Positivo		Negativo	
	N	(%)	N	(%)
Neonatología	5	20.83	19	79.17
Pediatría	6	12.24	43	87.76
Clínica	6	22.22	21	77.78
Gineco Obstetricia	-	-	1	100.00
Cirugía	4	30.77	9	69.23
UCI	-	-	8	100.00
Todas las cepas	21	17.21	101	82.79
Prueba Chi cuadrado	P ≤ 0.05			
*Valor P = 0.405				



La Tabla 7 muestra la distribución de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina mediante D test (N=21) de acuerdo a las áreas de estudio del HVCM; resultando en Neonatología un 20.83%, Pediatría 12.24%, Clínica 22.22%, Cirugía 30.77% y, en Gineco Obstetricia y UCI no hubieron cepas con este tipo de resistencia inducible; sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (P=0.405).

En un estudio realizado en Colombia se analizaron cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes que procedían de Cirugía, Médica y UCI, encontrándose una sola cepa de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina con un porcentaje de 1.33% (Morales, Yaneth, & Chávez, 2012). Con respecto al presente estudio se puede notar un incremento de esta resistencia inducible en la mayoría de las áreas del HVCM, debido a que: el género *Staphylococcus* es parte de la flora normal de la piel, es ubicuo, el personal de salud puede ser portador sano en su nasofaringe y se puede transmitir por vía aérea o por instrumentos y dispositivos contaminados.

3.2.2. Presencia de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina mediante D test., según el tipo de muestra.

Tabla 8.

	Resistencia inducible a la Clindamicina			
	Positivo		Negativo	
	N	(%)	N	(%)
Sangre	13	14.44	77	85.56
Secreción	8	28.57	20	71.43
Exudado	-	-	4	100.00
Todas las cepas	21	17.21	101	82.79
Prueba Chi cuadrado		P ≤ 0.05		
*Valor P = 0.146				

La Tabla 8 muestra la distribución de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina mediante D test (N=21) de acuerdo al tipo de muestra; siendo estas sangre, secreciones y exudados en los cuales se mostraron



porcentajes de 14.44%, 28.57% y 0%, respectivamente. Es estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P=0.146$).

No fue posible realizar un análisis comparativo de acuerdo al tipo de muestras debido a que no se encontraron estudios similares.



4. CONCLUSIONES

- En este estudio realizado se analizaron un total de 122 cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes de las cuales 21 (17.21%) dieron Dtest positivo, cumpliendo con la hipótesis propuesta inicialmente donde se demuestra que existen cepas de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina que se recuperaron de muestras de secreciones, exudados y sangre de pacientes hospitalizados en el “Hospital Vicente Corral Moscoso”.
- De estas 21 cepas 13 (14.29%) correspondieron a *Staphylococcus coagulasa* negativa y 8 (25.81%) a *Staphylococcus coagulasa* positiva.
- De acuerdo a las áreas estudiadas en el HVCM se observaron los siguientes porcentajes de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina: Neonatología 20.83%, Pediatría 12.24%, Clínica 22.22%, Cirugía 30.77% y, en Gineco-Obstetricia y UCI 0%
- El porcentaje de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina según el tipo de muestra fue en sangre 14.44%, secreciones 28.57% y exudados 0%.



5. RECOMENDACIONES

- Realizar de forma rutinaria en todos los laboratorios clínicos la prueba del D test para brindar un diagnóstico y tratamiento adecuado.
- Se recomienda realizar más estudios sobre este tipo de resistencia en otras regiones del país, para así poder dar a conocer la frecuencia de *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes con resistencia inducible a la clindamicina y poderlos comparar entre ellos.
- Desarrollar periódicamente estudios similares para observar si existen variaciones en la prevalencia y comportamiento de los *Staphylococcus spp.* ante los antibióticos.



6. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Alcántara, Y. L. R. (2014). Otitis externa maligna. *Rev Esp Méd Quir*, 19, 104-109.
- Ardanuy, C., Cercenado, E., Morosini, M. I., & Torres, C. (2011). Procedimientos en Microbiología Clínica *DETECCIÓN FENOTÍPICA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA EN GRAMPOSITIVOS*. Retrieved from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia39.pdf>
- Aquihuatl, M., Volke, T., Prado, L., Shirai, K., Ramírez, F., & Salazar, M. (2004). Manual de prácticas de laboratorio microbiología general. *Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología*.
- Azap, Ö., Arslan, H., Timurkaynak, F., Yapar, G., Oruc, E., & Gağır, Ü. (2005). Incidence of inducible clindamycin resistance in staphylococci: first results from Turkey. *Clinical microbiology and infection*, 11(7), 582-584.
- Balleza, D., Balderas, A., Hernández, I., Reséndiz, C., Sarabia, A., & Villegas, F. CEPAS ATCC. Retrieved from <http://controlcmicrobiologia5203c.blogspot.com/p/cepas-atcc.html>
- Bermejo, V., Spadaccini, V., Elbert, G. R., Duarte, A. I., Erbin, M., & Cahn, P. (2012). Prevalencia de Staphylococcus aureus resistente a meticilina en infecciones de piel y partes blandas en pacientes ambulatorios. *Medicina (B. Aires)*, 72(4), 283-286.
- Cabello, R. R. (2007). *Microbiología y parasitología humana/Microbiology and Human Parasitology: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias/Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases* (3ra edición ed.): Ed. Médica Panamericana.
- Camarena, J., & Sanchez, R. INFECCIÓN POR Staphylococcus aureus RESISTENTE A METICILINA Retrieved from <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>
- Cantón, R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2013). Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (Staphylococcus aureus y Enterococcus spp.). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(8), 544.
- Casado, C., Torrico, G., & Medina, M. (2012). Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología. *Revista de Internet*.



- Castellano, M., Perozo, A., Molero, M., Montero, S., & Primera, F. (2015). Resistencia a la clindamicina inducida por eritromicina en cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico. Retrieved from <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/kasmera/article/download/20069/19995>
- Castro, A. M. (2014). *Bacteriología médica basada en problemas: Editorial El Manual Moderno*.
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev. Latin. Patología Clínica Med. Lab.*, 61(1), 28-40.
- Chans, G. R. (2002). Estafilococos.
- Chavarri, E. (2014). Métodos de siembra y aislamiento de microorganismos. Retrieved from <http://es.slideshare.net/ELVISCHAVARRICHOLAN/metodos-de-siembra-y-aislamiento-de-microorganismos>
- Conalepfelixtovar. (2012). Técnicas y métodos de aislamiento y selección de microorganismos. Retrieved from <https://conalepfelixtovar.wordpress.com/2012/09/26/tecnicas-y-metodos-de-aislamiento-y-seleccion-de-microorganismos/>
- de Carvalho, C. H. P., de Araújo Lima, E. d. N., dos Santos Pereira, J., & Lima, K. C. (2011). Papel de los *staphylococcus* spp. en la mucositis oral: revisión de la literatura. *Acta Odontológica Venezolana*, 49(3).
- Durán Vila, A., Zhurbenko, R., & Viera Oramas, D. R. (2004). Propuesta de una modificación en la formulación del medio agar manitol salado utilizado en el aislamiento de estafilococos de importancia clínica. *Rev. Cub. Med. Trop.*, 56(3).
- Echevarria Zarate, J., & Iglesias Quilca, D. (2003). Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Rev. Med. Hered.*, 14(4), 197.
- F. Brooks, G., S. Butel, J., & A. Morse, S. (2011). Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg* (pp. 219). México: El Manual Moderno, S.A. de C.V.
- Fariña, N., Carpinelli, L., Samudio, M., Guillén, R., Laspina, F., Sanabria, R., . . . de Kaspar, H. M. (2013). *Staphylococcus* coagulasa-negativa clínicamente significativos: Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Rev. chil. infect.*, 30(5), 480-488.



- Flores, C. (2013). TECNICAS DE CULTIVO DE MICROORGANISMOS. Retrieved from <https://es.scribd.com/doc/186726490/Tecnica-de-cultivo-de-microorganismos-7-pdf>
- Galiana Villar, A. (2003). Infección por *Staphylococcus aureus* metilino resistente adquirido en la comunidad. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 74(1).
- García, C., Payá, G., Olivares, C., Cotera, F., Rodríguez, T., & Sanz, R. (2003). Diagnóstico de las infecciones asociadas a catéteres vasculares centrales. *Rev. chil. infect.*, 20(1), 41-42.
- García Rodríguez, J. A., García Sanchez, J. E., Gobernado Serrano, M., Lorente Guerrero, J., Ortega del Álamo, P., & Tomás Barberán, M. (2003). Diagnóstico y tratamiento antimicrobiano de las sinusitis. *Rev Esp Quimioterap*, 16(2).
- García-Rodríguez, J., Cantón, R., García-Sánchez, J., Gómez-Lus, M., Martínez-Martínez, L., & Rodríguez-Avial, C. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Espanola de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Sociedad Espanola de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1a Edición (11)*.
- Gutiérrez, F. Á., Baquero, A. D., Gallardo, J. M., & Falcón, A. R. (2010). Neumonías adquiridas en la comunidad. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(67), 4573-4575.
- Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Rev. Méd. Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34, 33-41.
- Jesica. (2015). Tipo de estría para realizar la siembra en cada uno de los medios. Retrieved from <http://bacteriasenelcuerpohumano.blogspot.com/>
- Jiménez, A. (2011). Métodos de siembra. Retrieved from <http://metodosdsiembras.blogspot.com/>
- Malbrán, C. (2012). METODO DE DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSION. Retrieved from http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-METODO_DE_DETERMINACION_DE_SENSIBILIDAD_ANTIMICROBIANA_POR_DIFUSION_2012.pdf



- Matos, T. H. S., Fernández, S. Z., Gómez, M. N., Sebastián, M. S., Martínez, F. G., & Lozano, J. S. (2011). Osteomielitis y artritis séptica *Sociedad Española de Infectología Pediátrica (eds). Protocolos de infectología* (pp. 205-206): Ergon Madrid.
- Merino-Díaz, L., de la Casa, Á. C., Torres-Sánchez, M. J., & Aznar-Martín, J. (2007). Detección de resistencia inducible a clindamicina en aislados cutáneos de *Staphylococcus* spp. por métodos fenotípicos y genotípicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 25(2).
- Miralles, S. J., Baeza, M., & Barreras, J. C. (2015). PATOLOGIA OCULAR.
- Montoya, I., Mira, M., Álvarez, I., Cofre, J., Cohen, J., Donoso, G., & Torres, J. P. (2009). Resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Retrieved from <http://www.scielo.cl/pdf/rcp/v80n1/art06.pdf>
- Morales, G. I., Yaneth, M. C., & Chávez, K. M. (2012). Caracterización de la resistencia in vitro a diferentes antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus* spp. en una institución hospitalaria de la ciudad de Valledupar entre enero y julio de 2009. *Rev. Cien. Sal.*, 10(2), 5-13.
- Nodarse Hernández, R. (2001). Estafilococos multirresistentes: uso del disco de oxacilín como marcador de resistencia a antibióticos. *Rev. Cub. Med. Mil.*, 30(1), 7-10.
- Olmos, A. F., de la Fuente, C. G., Nieto, J. A. S., & Ramos, S. V. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.
- Ortega Miranda, L. (2010). ANALISIS FENOTIPICO Y GENOTIPICO DE GENES INDUCIBLES QUE CONFIEREN RESISTENCIA MLSB EN CEPAS DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVA.
- Padilla Chumacero, M. Mecanismo de Resistencia MLSB: Macrolidos, Lincosaminas y Estreptogramina B en Estafilococos Coagulasa" Negativa y *Staphylococcus Aureus*. Hospital" Jaime Mendoza". Sucre, 2009. *Archivos Bolivianos de Medicina*, 05.
- Paganini, H., Verdaguer, V., Rodríguez, A., Della Latta, P., Hernández, C., Berberian, G., . . . Rosanova, M. T. (2006). Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en niños provenientes de la comunidad en niños de la Argentina. *Arch Argent Pediatr*, 104(4), 296.
- Prabhu, K., Rao, S., & Rao, V. (2011). Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *Journal of laboratory physicians*, 3(1), 25.



- Quistián, G. (2014). Técnicas y Métodos de estriado en caja y tubo (medios de cultivo) Retrieved from <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/tecnicas-y-metodos-de-estriado-en-caja.html>
- Sacsquispe, R. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión.
- Sanchis Bayarri, V. (2004). Contribución al estudio de las infecciones por estafilococos. Retrieved from <http://www.ramcv.com/Sesinas/2004%20Dr.%20Sanchis%20%20Bayarri.pdf>
- Santambrosio, E., Ortega, M., & Garibaldi, P. (2009). Tinción y observación de microorganismos: Santa Fe, Argentina.
- Schreckenberger, P. C., Ilendo, E., & Ristow, K. L. (2004). Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in a community and a tertiary care hospital. *Journal of clinical microbiology*, 42(6), 2777-2779.
- Seija, V. (2002). Cocos gram positivos: aspectos prácticos. *Instituto de Higiene. Facultad de Medicina Universidad de la República. Uruguay*, 19, 1-5.
- Seija, V. (2008). Género *Staphylococcus*. *Etiopatogenia microbiológica*.
- Tamariz, J., Cruz, J., Atencia, A., Figueroa, J., Horna, G., & Guerra, H. (2009). Resistencia a clindamicina inducida por eritromicina en *Staphylococcus aureus* aislados de tres hospitales de Lima, Perú. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172859172009000100006&script=sci_arttext
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Chapter*, 36, 663-671.
- Telemedicina, C. d. I. M. y. (2009). Prueba de la Coagulasa para *Staphylococcus*.
- VADEMECUM. (2014). CLINDAMICINA. Retrieved from <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c073.htm>
- Valle, J., Miranda, N., Orozco, A., García, L., & Rodríguez, J. Fenotipo y Genotipo de Cepas ATCC. Retrieved from <http://controlcmicrobiologia5203c.blogspot.com/p/blog-page.html>
- Valle, J., Miranda, N., Orozco, A., García, L., & Rodríguez, J. Utilización De Cepas ATCC En La Prueba De Coagulasa. Retrieved from <http://controlcmicrobiologia5203c.blogspot.com/p/utilizacion-de-cepas-atcc-en-de-cepas.html>



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Velázquez-Meza, M. E. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. *Salud pública de México*, 47(5), 381-382.

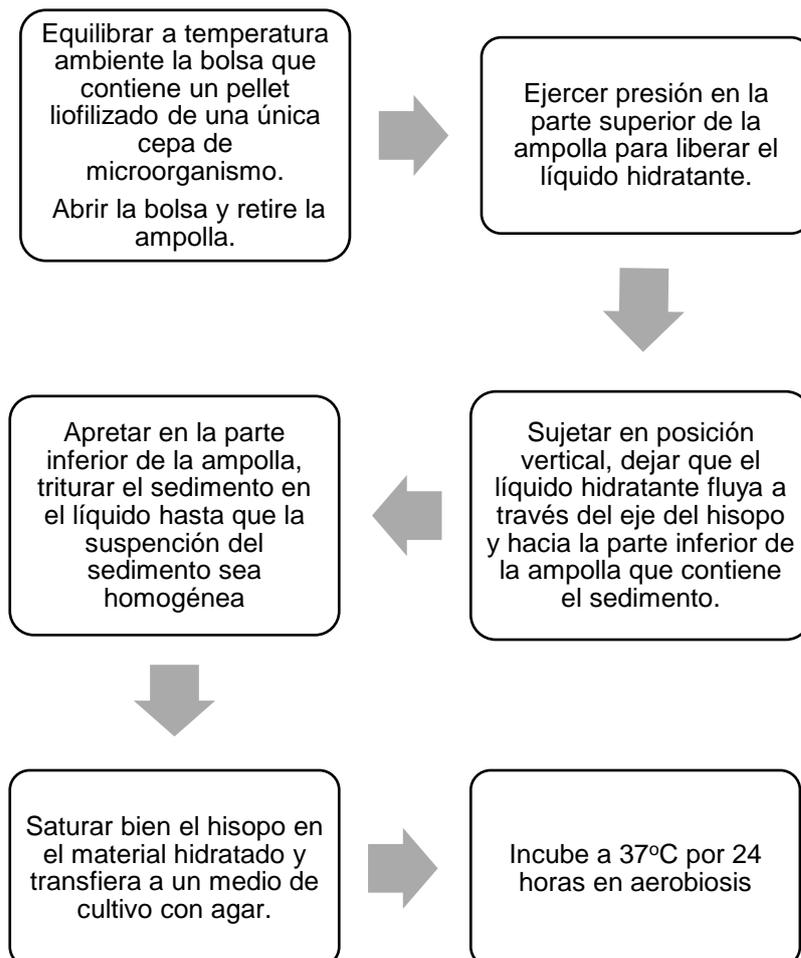
Yamilia, R. S., Arnaldo, Z. I., Rosana, C. Y., Maria Victoria, C. N., Gloria Irma, Z. M., & Carelis, C. T. (2014). *DETECCIÓN DE RESISTENCIA INDUCIBLE A CLINDAMICINA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE A METICILINA*. Paper presented at the 8th Cuban Congress on Microbiology and Parasitology, 5th National Congress on Tropical Medicine and 5th International Symposium on HIV/aids infection in Cuba.

7. ANEXOS

Anexo 1

Esquema de procedimiento.

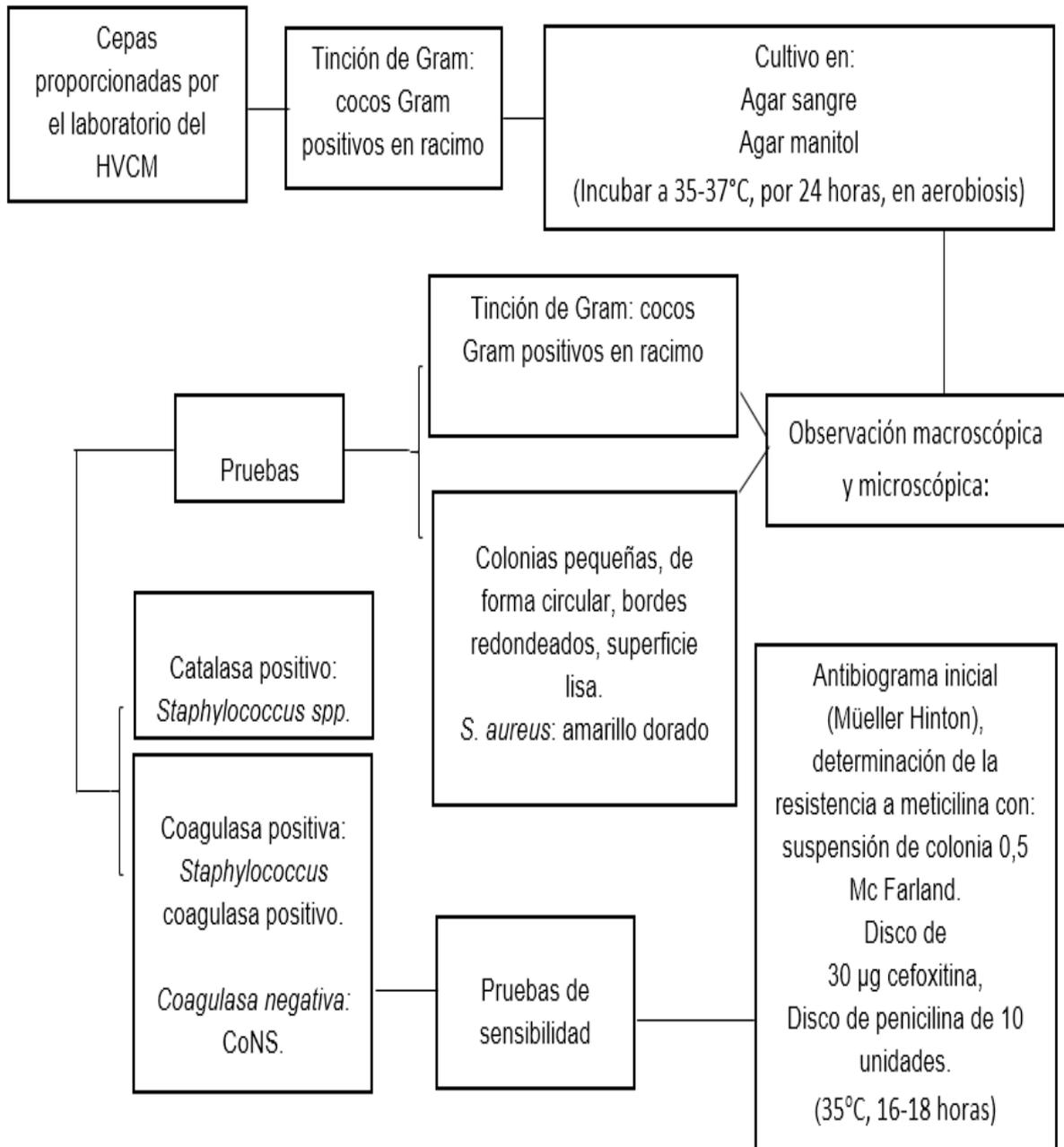
En este estudio se trabajó con la cepa control: *Staphylococcus aureus* subsp. aureus (ATCC BAA-977) utilizada como control de calidad según CLSI 2016.





Anexo 2

Flujograma de trabajo





Anexo 3

Tinción de Gram

- Realizar y fijar los frotis bacterianos en un portaobjetos.
- Teñir con cristal violeta por 1 minuto y lavar con agua.
- Cubrir con Lugol por 1 minuto y lavar con agua.
- Decolorar con alcohol-acetona e inmediatamente lavar con abundante agua.
- Teñir con Fucsina/Safranina por 30 segundos y lavar con abundante agua.
- Quitar el exceso de agua y dejar secar al ambiente.
- Observar al microscopio óptico con objetivo 100x, empleando aceite de inmersión.

(Aquiahuatl et al., 2004)

Prueba de la catalasa

- Colocar una pequeña muestra bacteriana a partir de una colonia aislada sobre un portaobjetos
- Añadir una o dos gotas de agua oxigenada.
- Observar la formación de burbujas.
- En lo posible debe tomarse la colonia a partir de un medio sin sangre ya que los eritrocitos tienen actividad de catalasa y pueden falsear los resultados.

(Seija, 2002)

Prueba de la coagulasa en tubo

- Se emulsionan varias colonias en un tubo de vidrio con 0,5ml de plasma.
- Incubar a 35° -37°C por 4 horas.
- Observar la formación de coágulo inclinando suavemente el tubo. Si es negativo se reincuba y se procede a su lectura a las 18 horas.
- La lectura a las 4 horas, es fundamental porque en alguna oportunidad puede suceder que las fibrinolisinias de *S.aureus* lisen el coágulo luego de 18 horas de incubación y de esta manera se produzcan un test falso negativo.
- Interpretación de resultados: Si se observa la formación de un coágulo total o parcial la prueba es positiva.

(Seija, 2002)

Anexo 4

Ilustraciones

Ilustración 1: Sangre de cordero para el medio agar sangre



FUENTE: Registro de laboratorio

Ilustración 2: Colonias de *S. áureus* en Agar sangre de cordero y Agar manitol



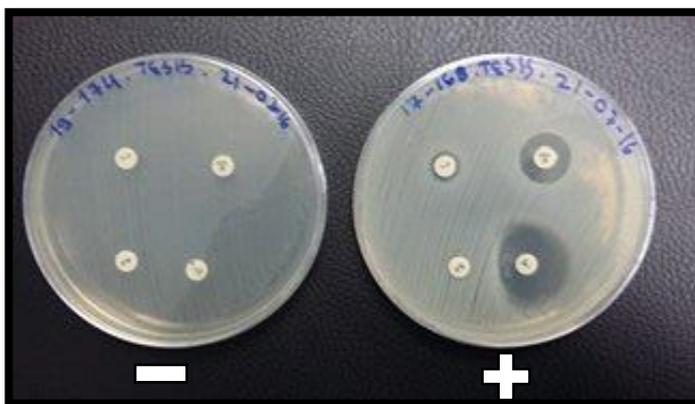
FUENTE: Registro de laboratorio

Ilustración 3: Colonias de CoNS en Agar sangre de cordero y Agar manitol



FUENTE: Registro de laboratorio

Ilustración 4: D-Test en *Staphylococcus spp.* metilino resistente en Agar Mueller Hinton



FUENTE: Registro de laboratorio

Ilustración 5: Área de trabajo en el Laboratorio Microbiológico del HVCM



FUENTE: Registro de laboratorio



Anexo 5. Do file del programa Stata 13.0 (College Satation, TX, USA).

```
clear
***abrir la base de datos
insheet using "C:\Users\Angy Cuesta\Desktop\DATOS LISTOS.csv"
***Estadística descriptiva
*variable numérica
sum edad
***gráfico para evaluar simetría
hist edad
***es asimétrica reportar mediana, mínimo y máximo
****Tablas de resistencia a la clindamicina según prueba de la coagulasa
. bysort coagulasa_tesis: tab dtest
***generar etiquetas
label define coagulasa_tesis 0"Negativo" 1"Positivo"
label values coagulasa_tesis coagulasa_tesis
. bysort coagulasa_tesis: tab dtest
****Tablas de resistencia a la clindamicina según dependencias
. bysort dependencia: tab dtest
***generar etiquetas
label define dependencia 0"Neonatología" 1"Pediatría" 2"Clinica" 3"Gineco Obstetricia"
4"Cirugia" 5"UCI"
label values dependencia dependencia
. bysort dependencia: tab dtest
****Tablas de resistencia a la clindamicina según tipo de muestras
. bysort tipodemuestra: tab dtest
***generar etiquetas
label define tipom 0"Sangre" 1"Secreción" 2"Exudado"
label values tipodemuestra tipom
. bysort tipodemuestra: tab dtest
*** Valor P según dependencias
tab dependencia dtest, chi
```



*** Valor P según tipo de muestras

tab tipodemuestra dtest, chi

*** Valor P según prueba de la coagulasa

tab coagulasa_tesis dtest, chi