



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

“Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca (Noviembre 2014 – Febrero 2015)”

**TESIS PREVIA A LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTORES:

CHRISTIAN SANTIAGO ARÉVALO POLO.

BRYANT STEPHEN SARMIENTO ABRIL.

DIRECTORA:

DRA. MARÍA DE LOURDES JERVES ANDRADE. MSC

CUENCA - ECUADOR

2014 - 2015



RESUMEN

El *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SAMR) es una cepa de la bacteria de *Staphylococcus aureus* que se ha vuelto resistente a varios antibióticos, siendo primero resistente a la penicilina en 1947 y luego a la meticilina.

Los estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca constituyen una población que ha estado en contacto con *Staphylococcus aureus* meticilino resistente durante las prácticas de Bacteriología Clínica por lo que podrían ser un reservorio ideal para dicho microorganismo, lo que implicaría un potencial riesgo para su familia y otras personas cercanas, por tratarse de un agente patógeno causante de múltiples cuadros clínicos tales como: neumonía, infecciones quirúrgicas y bacteriemia nosocomial.

Este estudio sobre la Prevalencia de SAMR en la nasofaringe de estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia, fue realizado en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, ubicada en la Avenida 12 de Abril y Agustín Cueva. La muestra estudiada fue de 100 estudiantes, que cumplieron con los criterios de inclusión. Se encontró que el 29% de los estudiantes fueron portadores de *Staphylococcus aureus*.

Al realizar la prueba de sensibilidad en disco usando los antibióticos Cefoxitina de 30 µg y Penicilina de 10 unidades para determinar la resistencia a meticilina, conforme al Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2014) se encontró que el 10% de los estudiantes albergan en su nasofaringe cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina.

Palabras Clave: *Staphylococcus aureus*, SAMR



ABSTRACT

Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* or MRSA is a kind of strain of *Staphylococcus* and has become resistant to different kinds of antibiotics, which has been penicillin the first antibiotic to be resistant, and methicillin.

The students of the Biochemistry and pharmacy career at Universidad de Cuenca College, a population which has been in a constantly contact with Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*, could be an excellent storage for this bacterium and it could be a potential risk for the family and other people, knowing this bacterium is the cause of different clinical pictures.

This research about the MRSA prevalence was carried out at the microbiology laboratory at the chemistry science faculty at Universidad de Cuenca College, located in Avenida 12 de Abril Street and Agustin Cueva Street. The number of persons who cooperated in this research was 100 students of the faculty, which they all assisted to the laboratory for sampling, and fulfill with the inclusion criteria. In this research we could notice that the 29% of the student samples were bearer of *Staphylococcus aureus*.

Performing the disc sensibility test, using different antibiotics as cefoxitin (30 µg) and penicillin (10 units), to determine the methicillin resistance, and we could establish that the 10% of the students had methicillin *Staphylococcus aureus* in the nasopharynx.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, SAMR



CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	14
CAPÍTULO 1.....	16
MARCO TEÓRICO.....	16
1.1. ANATOMÍA DE LA NARIZ Y FOSAS NASALES.....	16
1.2. ANATOMÍA DE LA FARINGE	17
1.2.1. ANATOMÍA DE LA NASOFARINGE	18
1.3. FISIOLÓGÍA DE LA NARIZ Y FOSAS NASALES	18
1.4. FLORA NORMAL DE NARIZ, FOSAS NASALES, NASOFARINGE, GARGANTA Y AMÍGDALAS.....	19
1.4.1. FLORA NORMAL DE NARIZ Y FOSAS NASALES	19
1.4.2. FLORA NORMAL DE NASOFARINGE, GARGANTA Y AMÍGDALAS. .	20
1.5. ESTAFILOCOCOS.....	22
1.5.1. RESEÑA HISTÓRICA.....	22
1.5.2 GENERALIDADES.....	23
1.5.3. HÁBITAT	24
1.5.4. MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	24
1.5.5. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA.....	25
1.5.6. METABOLISMO.....	25
1.5.7. RESISTENCIA A AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS	26
1.5.8. <i>Staphylococcus aureus</i>	26
1.5.8.1. DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD	27
1.5.8.2. FACTORES PREDISPONENTES DEL HUÉSPED	30
1.5.8.3. PATOGENIA	31
1.5.8.3.1. INFECCIONES POR INVASIÓN	32
1.5.8.3.2. RESPUESTA DEL HUÉSPED	33
1.5.8.4. RESISTENCIA ANTIBIÓTICA.....	34
1.5.8.4.1. RESISTENCIA A B-LACTÁMICOS	34
1.5.9. ESTAFILOCOCOS RESISTENTE A METICILINA	35
1.5.9.1. DETECCIÓN DE LABORATORIO	36
1.5.9.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	36
1.5.9.3. TRATAMIENTO	36



CAPÍTULO 2.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS	38
2.1 METODOLOGÍA DE TRABAJO	38
2.1.1 TIPO DE ESTUDIO.....	38
2.1.2 POBLACIÓN, MUESTREO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA	38
2.1.2.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA.	38
2.1.2.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.	38
2.1.2.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	38
2.1.3 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	40
2.1.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	41
2.1.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	41
2.1.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	41
2.2 EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES	41
2.2.1 EQUIPOS.....	41
2.2.2 REACTIVOS	42
2.2.3 MATERIALES	43
2.3 TÉCNICAS	44
2.3.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA.....	44
2.3.2 MUESTRA NASOFARÍNGEA	45
2.3.3 TINCIÓN DE GRAM.....	45
2.3.4 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN	46
2.3.4.1 PRUEBA DE LA CATALASA	46
2.3.4.2 PRUEBA DE LA COAGULASA.....	46
2.3.5 FUNDAMENTOS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	48
2.3.5.1 AGAR SANGRE DE CORDERO.....	48
2.3.5.2 AGAR MANITOL SALADO	48
2.3.5.3 AGAR MUELLER-HINTON	49
2.3.5.4 CALDO DE TRIPTICASA SOYA.....	49
2.3.6 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD EN DISCO	50
2.3.6.1 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SAMR	50
CAPÍTULO 3.....	52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52



3.1. Prevalencia de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente (SAMR) en los estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia que ya cursaron la asignatura de Bacteriología Clínica.	52
3.2 Relación entre cultivos positivos para <i>S. aureus</i> con respecto a los cultivos meticilino resistentes.	54
3.3 Relación de la prevalencia de SAMR con respecto al género de la población estudiada.....	57
3.4. CONCLUSIONES.....	61
3.5 RECOMENDACIONES	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63
ANEXOS.....	66



Cláusula de Derechos de Autor

Yo Christian Santiago Arévalo Polo, autor de la tesis “**Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca**”, 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 hiciera de este trabajo, no implicara afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca 19 de Abril del 2015



CHRISTIAN SANTIAGO ARÉVALO POLO
CI: 0106033210

Cláusula de Derechos de Autor

Yo Bryant Stephen Sarmiento Abril, autor de la tesis **“Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca”**, 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 implicara afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca 19 de Abril del 2015



BRYANT STEPHEN SARMIENTO ABRIL

CI: 0104796107



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo Christian Santiago Arévalo Polo, autor de la tesis **“Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca 19 de Abril del 2015



CHRISTIAN SANTIAGO ARÉVALO POLO

CI: 0106033210



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo Bryant Stephen Sarmiento Abril, autor de la tesis "**Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca 19 de Abril del 2015

BRYANT STEPHEN SARMIENTO ABRIL

CI: 0104796107



DEDICATORIA

Esta investigación va dedicada primero a Dios por guiar día a día mis pasos y dotarme de la sabiduría suficiente para llegar a culminar con éxito una etapa importante en mi vida, a mis padres por la incondicional confianza puesta en mí desde el primer día que afronte este reto, a la mujer de mi vida por estar conmigo y apoyarme durante toda la carrera.

Christian



DEDICATORIA

Esta investigación va para aquellas personas que siempre estuvieron alentando y haciendo lo posible para que saliera adelante, con una especial mención a mi familia principalmente mis padres que siempre con un gran amor y cariño me apoyaron, por lo que esto va dedicado a ellos.

Stephen



AGRADECIMIENTOS

Primeramente un especial agradecimiento a Dios por dotarnos de sabiduría y salud, a nuestros padres por guiar nuestros caminos a lo largo de toda la carrera y estar en todo momento junto a nosotros.

Nuestro más sincero agradecimiento a la Dra. Lourdes Jerves por la asesoría y soporte científico que nos ha brindado a lo largo de nuestra investigación así como durante toda la carrera. Asimismo, un agradecimiento muy especial a la Dra. Carmen Lucia López por asesorarnos en cada momento durante la parte práctica de nuestra investigación.

Finalmente al Dr. Johnny Narváez a través del Proyecto Nero y al estudiante de Veterinaria David Polo, por ayudarnos en la recolección de muestras de sangre de cordero para preparar el medio Agar Sangre y a la Bioquímica Farmacéutica Priscila Herrera Jefa de Calidad del laboratorio de la Dra. Sonia Domínguez, por donarnos plasma para realizar la prueba de Coagulasa.



INTRODUCCIÓN

El *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina o SAMR es una cepa de la bacteria de *Staphylococcus* que se ha vuelto resistente a algunos betalactámicos.

El *S. aureus* resistente a meticilina (SAMR) comprende a las cepas que han adquirido un gen que les otorga resistencia a meticilina y esencialmente a todos los demás antibióticos betalactámicos. En la actualidad es de gran interés el aumento de dicha resistencia ya que esta bacteria ha llegado a convertirse en un gran problema epidemiológico comunitario y nosocomial. SAMR es endémico en muchos hospitales, los cuales fueron los primeros en informar la presencia de SAMR como un agente patógeno hospitalario, donde puede ser el agente causal de cerca del 50% de infecciones nosocomiales, los pacientes infectados y colonizados son el reservorio principal para SAMR.

Otros tipos de población importantes para adquirir SAMR en la comunidad son:

- Sujetos que no tienen el dato de haber estado internados previamente, pero tienen el antecedente de haber visitado en un hospital a un paciente infectado por SAMR, o de haber recibido a un familiar portador de SAMR en casa, luego de su alta hospitalaria. Aquí se debe considerar persona de riesgo al familiar de un personal de salud.
- Pacientes que asisten a los hospitales y requieren terapias parenterales intravenosas (diabéticos insulino dependientes y hemodiálisis); así mismo los usuarios de drogas intravenosas.
- Niños y ancianos que son institucionalizados, en guarderías o casas de reposo. A diferencia de las cepas provenientes del hospital, que suelen ser multirresistentes, las cepas de SAMR que afectan a este grupo de pacientes, suelen ser resistentes a los betalactámicos, pero guardan susceptibilidad a otras familias de antibióticos



La motivación a realizar este proyecto se basó en la afinidad por el campo de Microbiología específicamente en Bacteriología, a fin de determinar la prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente en una población que está más expuesta a adquirir dicho microorganismo, como lo son estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia que frecuentemente pueden estar en contacto con el microorganismo.

Este organismo se propaga por lo general de paciente a paciente por las manos del personal, por lo que se espera que exista un aumento de riesgo de colonización entre trabajadores del área de la salud, como en este caso los estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia, debido a la exposición ocupacional. La mayoría de las personas que desarrollan infecciones asintomáticas con SAMR asociada a hospital también portan el organismo en las fosas nasales. De ahí la importancia de establecer la prevalencia del microorganismo en este tipo de pacientes puesto que se ha convertido en muchos lugares como el primer agente causal implicado en neumonía nosocomial, infecciones quirúrgicas y bacteriemia nosocomial, debido a la diversidad de factores de virulencia que posee, tanto bioquímicos como estructurales, se lo considera como un patógeno perfecto, equipado para colonizar, invadir y diseminarse.

Las muestras fueron obtenidas mediante un hisopado nasofaríngeo de los estudiantes que cursaron o estuvieron cursando la asignatura de Bacteriología de la Carrera de Bioquímica y Farmacia en la Universidad de Cuenca.

El tipo de estudio fue descriptivo no experimental, de laboratorio y de corte transversal, ya que se hizo un estudio de prevalencia de la exposición y del efecto en una muestra poblacional en un solo momento temporal.



CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. ANATOMÍA DE LA NARIZ Y FOSAS NASALES

La nariz es la parte superior del sistema respiratorio y varía en tamaño y forma según la persona. Se proyecta hacia adelante desde la cara, a la que está unida su raíz, por debajo de la frente, y su dorso se extiende desde la raíz hasta el vértice o punta. (Palacios, 2009)

En la parte interna de la nariz se encuentra el tabique nasal que es parcialmente óseo y parcialmente cartilaginoso, dividiendo la cavidad nasal en dos partes llamadas las fosas nasales. Las fosas nasales se abren al exterior por dos aberturas llamadas los orificios o ventanas nasales, limitados por fuera por las alas de la nariz, comunicándose con la nasofaringe por dos orificios posteriores (coanas). (Palacios, 2009)

Las fosas nasales en su parte más exterior están recubiertas por piel que contiene un determinado número de pelos gruesos cortos o vibrisas y en su parte restante, por una membrana mucosa con epitelio pseudoestratificado columnar ciliado. Las vibrisas atrapan las partículas más grandes que se encuentran suspendidas en el aire inspirado antes de alcanzar la mucosa nasal, mientras que el resto de partículas es atrapado por una fina capa de moco segregada por las glándulas mucosas del epitelio. (Palacios, 2009)

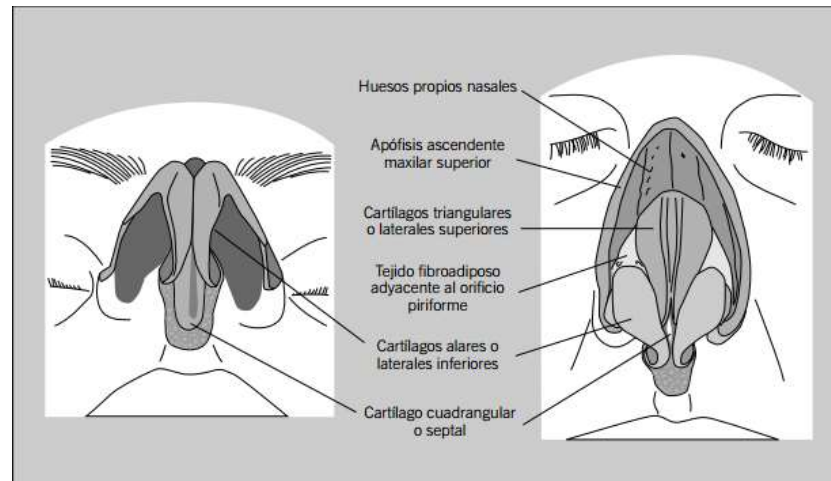


Figura 1: Anatomía de las fosas Nasales (Carceller, 1994)

1.2. ANATOMÍA DE LA FARINGE

La faringe es un tubo que continúa a la boca y constituye el extremo superior común de los tubos respiratorio y digestivo. En su parte superior desembocan los orificios posteriores de las fosas nasales o coanas, en su parte media desemboca el istmo de las fauces o puerta de comunicación con la cavidad oral. Para una mejor descripción se divide en 3 partes:

- Nasofaringe, situada por detrás de la nariz y por encima del paladar blando
- Orofaringe, situada por detrás de la boca.
- Laringofaringe, situada por detrás de la laringe.

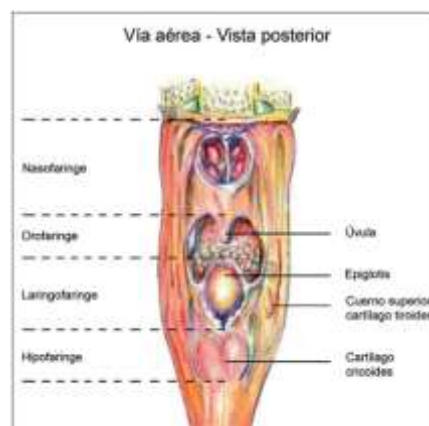


Figura 2: Anatomía de la Faringe (Sologuren, 2009)

1.2.1. ANATOMÍA DE LA NASOFARINGE

Es considerada la parte nasal de la faringe como una extensión hacia atrás de las fosas nasales, la misma que está recubierta de una mucosa similar a la mucosa nasal y tiene una función respiratoria.

Hay varias agrupaciones de tejido linfóide llamadas amígdalas, así, en su techo y pared posterior la amígdala faríngea, también llamada popularmente adenoides. (Palacios, 2009)

En caso de aumento de tamaño de este tejido, se produce una obstrucción parcial de la vía aérea y dificulta el paso de tubos nasotraqueales. (Sologuren, 2009)



Figura 3: Anatomía Nasofaríngea. (Instituto Nacional del Cancer, 2014)

1.3. FISIOLÓGÍA DE LA NARIZ Y FOSAS NAALES

La nariz funciona como un órgano creador de la resistencia que modifica el flujo nasal y la resistencia de las presiones respiratorias y su repercusión en el tórax y las variaciones en la atmósfera, así como su influencia en el intercambio broncopulmonar gaseoso y la fisiología circulatoria de la respiración. (Vásquez, 2014)

Las funciones de la nariz y de las fosas nasales son:

- **Función Respiratoria:** ligada a la regulación del débito aéreo para favorecer el intercambio gaseoso pulmonar, y al acondicionamiento del aire inspirado: filtración, calentamiento y humidificación. La capacidad de humidificación es



regulada de forma activa por la producción de secreciones y de forma pasiva por la condensación del vapor de agua durante la espiración y evaporación en la inspiración.

- **Función defensiva:** protección frente al ambiente mediante el transporte mucociliar, en el cual los cilios, moco y el transporte de agua e iones contribuyen a su correcto funcionamiento, así como también la flora bacteriana comensal.
- **Función olfatoria:** protección frente a tóxicos, comportamiento social, alimentario y sexual. Los estímulos olfativos pertenecen a numerosas familias químicas, que por lo general son moléculas orgánicas producidas por el metabolismo de animales, vegetales o degradadas por microorganismos.
- **Función Fonatoria:** Las fosas nasales intervienen en la formación de los armónicos y, por tanto, en el timbre del lenguaje junto con la epifaringe permanecen más o menos abiertos según si los distintos sonidos son más o menos resonantes. (Carceller, 1994)

1.4. FLORA NORMAL DE NARIZ, FOSAS NASALES, NASOFARINGE, GARGANTA Y AMÍGDALAS.

1.4.1. FLORA NORMAL DE NARIZ Y FOSAS NASALES

En esta zona se puede encontrar una gran variedad de microorganismos predominando así la especie de estafilococos, principalmente *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. En ocasiones también se puede encontrar *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*, así como especies no patógenas de *Neisseria*, pero siempre tomando todas ellas como flora no residente sino ocasional o contaminante. (Departamento de Microbiología Microclínica, 2006)

Estos aspectos de residencia o no son particularmente importantes y difíciles de apreciar en la flora de la nariz. Igualmente, la presencia de especies típicamente fecales en niños no es infrecuente y debe tomarse como de contaminación.

En cuanto a niños prematuros, pueden aparecer infecciones por *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, generalmente como indicación de una infección más generalizada. La ozena, una infección que puede provocar la



atrofia de la mucosa nasal, está causada por bacterias gram negativas, como varias especies de *Klebsiella*. (Departamento de Microbiología Microclínica, 2006)

1.4.2. FLORA NORMAL DE NASOFARINGE, GARGANTA Y AMÍGDALAS.

Aquí se llegan a determinar con más frecuencia los micrococcos, que vienen a ser los más representativos. Uno de los microorganismos más aislados es el *S. aureus* el mismo que se encuentra frecuentemente en nasofaringe y amígdalas. Las amígdalas por otro lado pueden albergar estreptococos y enterococos. En la garganta de un adulto normal podemos encontrar especies de *Neisseria* (incluyendo *N. meningitidis*) y *Streptococcus pneumoniae* sin necesidad de correlacionar su presencia con enfermedad alguna.

A nivel de garganta *Streptococcus pyogenes* es el agente causal más importante de faringitis bacteriana, y su detección debe seguirse con terapia antimicrobiana para evitar sus posibles secuelas (fiebres reumáticas postestreptocócicas). Sin embargo, el hallazgo de *Streptococcus pneumoniae* (pneumococos) debe tomarse como parte de la flora normal de los adultos. (Departamento de Microbiología Microclínica, 2006)

El papel de *S. aureus* es más controvertido ya que se encuentra en pequeño número en la garganta normal, aunque su aislamiento repetido y en número elevado puede sugerir que se trata del agente causal de diversos cuadros clínicos como son: neumonía nosocomial, infecciones quirúrgicas y bacteriemia nosocomial por la diversidad de factores de virulencia que posee, siendo así un patógeno perfecto, equipado para colonizar, invadir y diseminarse. (Seija, 2010)



Tabla 1: Microorganismos integrantes de la Flora Normal de Piel, Boca, Faringe y Fosas Nasales.

Microorganismos	Localización Anatómica			
	Piel	Boca	Faringe	Fosas Nasales
a. Bacterias Gram Positivas				
Aerobias:				
<i>Staphylococcus spp.</i>	+++	++	-	+++
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+++
<i>S. epidermidis</i>	+++	+++	++	+++
Streptococcus α hemolíticos	+	+++	+++	+
B hemolíticos (No es grupo A)	+	+	+	-
<i>S. pneumoniae</i>	-	+	++	++
<i>Corynebacterium spp.</i>	+++	+	++	++
b. Bacterias Gram Positivas				
Anaerobias				
Peptococcus	+	++	++	+
Peptostreptococcus	+	++	++	+
<i>Bifidobacterium spp.</i>	+	++	++	+
<i>Actinomyces spp.</i>	+	++	+	+
c. Bacterias Gram Negativas				
Aerobias				
<i>Neisseria spp.</i>	+	+	+	+
<i>Haemophilus spp.</i>	-	-	+	+
d. Bacterias Gram Negativas				
Anaerobias				
Fusobacterium	-	+	+	-
Bacteroides	-	+	+	-



e. Otros Treponemas no patógenos (<i>T. scoliodontum</i> , <i>T. refringens</i> , <i>T. minutum</i> , <i>T. phagedenis</i> , <i>T. succinifaciens</i> , <i>T. bryantii</i>)	-	++	-	-
--	---	----	---	---

Fuente: (Leonor Lopez Teves, 2006)

- + Presencia del microorganismo
- ++ Aumento del microorganismo
- +++ Abundancia del microorganismo
- Ausencia del microorganismo

1.5. ESTAFILOCOCOS

1.5.1. RESEÑA HISTÓRICA

Los cocos se asociaron por primera vez a enfermedades humanas cuando se observaron en materiales purulentos provenientes de abscesos humanos. En 1880 el cirujano escocés Sir Alexander Ogston demostró que cocos agrupados en forma de racimo eran la causa de ciertos abscesos piógenos en humanos.

Louis Pasteur llegó a una conclusión similar al mismo tiempo, pero en París. En el año 1882, Ogston llamó a estos cocos “Staphylococcus”, derivando el nombre de los términos griegos *staphile* (racimo de uvas) y *kokkus* (frutilla).

Morfológicamente, Ogston propuso este término de manera de poder diferenciarlos de los estreptococos, formadores de cadenas. Ogston demostró que la inyección a ratones de pus conteniendo estos cocos producía los mismos síntomas observados en el humano. También observó que si calentaba el pus y lo trataba con fenol, la enfermedad se prevenía. (Seija, 2010)



1.5.2 GENERALIDADES

El género Estafilococo pertenecía a los miembros de la familia Micrococcaceae. Estudios genéticos recientes han determinado que los miembros del género *Staphylococcus* y *Micrococcus* no están relacionados. Tentativamente el género *Staphylococcus* se colocó dentro de la familia *Bacillaceae* junto a otros géneros, *Bacillus*, *Gamella*, *Listeria*, *Planococcus*, etc. (Seija, 2010)

Los estafilococos pueden ser encontrados en la superficie de los primates y otros mamíferos. Su presencia como flora endógena en ciertas circunstancias proporciona a muchas especies la oportunidad de causar infecciones.

El *Staphylococcus aureus* (Coagulasa Positiva) ha sido reconocido históricamente como un patógeno humano virulento e importante; en cuanto a su capacidad de producir enfermedades no ha disminuído con la introducción de los antibióticos. El *Staphylococcus intermedius* y el *Staphylococcus hyicus*, son dos especies igual coagulasa positiva, pero hasta el momento no se conoce la patogenicidad en el ser humano. Durante los últimos años los estafilococos coagulasa negativos han surgido como patógenos importantes, principalmente de huéspedes deficientes.

El *Staphylococcus aureus* es el agente de diferentes patologías como son las infecciones de piel, tejidos blandos, endocarditis, infecciones del Sistema Nervioso Central e infecciones del tracto urinario. (Hurtado, 2002)

S. aureus se recupera de una gran variedad de infecciones, que incluyen lesiones de la piel como furúnculos, diversos abscesos, heridas infectadas, neumonía y endocarditis. Desde estas localizaciones los microorganismos pueden invadir la sangre y diseminarse metastásicamente.

El germen puede ser recuperado de fosas nasales, perineo y otras áreas de la piel hasta un 15% en personas sanas. *S. aureus* también es un agente importante en intoxicaciones alimentarias.

Los estafilococos coagulasa negativos son una causa común de bacteriemia en pacientes neutropénicos. Los microorganismos pueden actuar como patógenos si



son introducidos por accidente en un huésped susceptible, pudiendo causar endocarditis y otros síndromes. (Bailey, 2009)

1.5.3. HÁBITAT

Staphylococcus epidermidis es integrante de la flora normal de la superficie corporal donde sobrevive gracias a sus lipasas, mientras *S. aureus* se encuentra habitualmente a nivel de la nasofaringe y de zonas húmedas como pliegues inguinales y axilas. A nivel del vestíbulo nasal anterior la adherencia parece estar mediada por el contenido en ácidos teicoicos.

Se estima que el índice de portadores nasales adultos es de alrededor del 20-30%; expresado longitudinalmente, cerca del 30% de la población puede ser portador permanente, el 50% portador intermitente y el 20% no es colonizado. Algunas poblaciones pueden tener una tasa de colonización mayor como el personal de salud, los pacientes en hemodiálisis, diabéticos, adictos a drogas intravenosas, etc. (Bailey, 2009)

A pesar que *S. aureus* posee numerosos factores de virulencia, puede convivir con el huésped humano formando parte de su flora normal sin causar ningún daño. Existen ocasiones en que este equilibrio se puede romper. Desde las narinas, los portadores pueden transferir bacterias a diferentes sectores de la piel, aunque habitualmente existe resistencia a la colonización de la piel intacta. Sin embargo, un traumatismo (muchas veces desapercibido) puede dar una puerta de entrada al microorganismo. En caso de infección, por tanto, *S. aureus* puede ser muchas veces de origen endógeno. (Bailey, 2009)

1.5.4. MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA

En base al aislamiento en caja Petri, se podrán observar las características de las colonias. En medios no selectivos, *S. aureus* presenta colonias de 1 a 3 mm de diámetro, lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, levemente convexas y generalmente pigmentadas con un color que puede ir desde el crema al amarillo. La producción de pigmento se ve favorecida si se incuban los cultivos por 24 a 48 horas adicionales a temperatura ambiente.



En crecimiento en agar sangre de cordero se puede observar una zona de β -hemólisis alrededor de las colonias. *S. epidermidis* presenta colonias generalmente de menor tamaño y estas no presentan pigmentación. (Seija, 2010)

1.5.5. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA

Se trata de cocos Gram positivos con tendencia a agruparse en racimos, dividiéndose en tres planos formando grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas inmóviles. Tienen una forma esférica y un diámetro de alrededor de una micra. (Bailey, 2009)

En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas. Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas. Unas pocas cepas producen una cápsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo. *S. aureus* es un microorganismo gram positivo pero las células viejas y los microorganismos fagocitados se tiñen como gramnegativos. (Murray, 2009)

La pared celular está constituida por péptidoglucano y ácido teicoico, y uniones fuertemente entrecruzadas que protegen al microorganismo y evitan su lisis en condiciones osmóticas rigurosas y es probable que intervengan en la fijación de la bacteria a los receptores mucosos celulares. Ciertas cepas producen una capsula polisacárida que las protege de la fagocitosis de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN). (Bailey, 2009)

1.5.6. METABOLISMO

En cuanto a los requerimientos de cultivo *Staphylococcus aureus*, no es exigente desde el punto de vista nutricional, se desarrolla rápidamente en todos los medios, fermenta lentamente los carbohidratos, como el manitol, pero no produce gas.

La actividad proteolítica varía mucho de una cepa a otra. *S. aureus* produce pigmentos que varían desde un color blanco hasta un amarillo intenso.



S. aureus tiene un metabolismo anaerobio facultativo, con excepción de las subespecies *Staphylococcus aureus anaerobius* y *Staphylococcus aureus saccharolyticus* que crecen de forma anaerobia y a menudo son catalasa-negativas. (Brooks, 2011)

1.5.7. RESISTENCIA A AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS

Es un microorganismo muy resistente a las condiciones ambientales normales, con capacidad de sobrevivir hasta tres meses en un cultivo a temperatura ambiente. Muere expuesto 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, 2010)

1.5.8. *Staphylococcus aureus*

De todas las especies de *Staphylococcus*, el género de *S. aureus* es el patógeno más importante.

La pared celular está compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano. Se trata de un polímero polisacárido compuesto por cadenas con uniones de tipo β (1-4) no ramificadas, que contienen subunidades alternantes de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina.

Las cadenas laterales de pentapéptidos se hallan conectadas al residuo de ácido murámico y tienen unión cruzada por un puente pentaglicina fijado a la L-lisina de una cadena y la D-alanina de la otra cadena. El polímero polisacárido básico se halla también en muchos otros microorganismos, mientras la cadena de unión cruzada de pentaglicina parece ser específica de *S. aureus*. Tiene como función mantener la rigidez de la pared bacteriana y su resistencia osmótica. En la patogenia coadyuvaría al desencadenamiento de la inflamación por activación del complemento, es capaz de atraer leucocitos polimorfonucleares, estimula la producción de anticuerpos opsonizantes y tiene actividad similar a las endotoxinas de Gram negativos. El otro componente mayor de la pared son los ácidos teicoicos, que constituyen alrededor del 40% del peso de la pared. Estos ácidos son polímeros



de glicerol o ribitol fosfato, azúcares y algunas veces, D-alanina. Están unidos en forma covalente al peptidoglicano.

Cuando están unidos a la membrana citoplasmática se les llama ácidos lipoteicoicos. *S. aureus* posee predominantemente ácidos de ribitol fosfato, mientras que en los estafilococos coagulasa negativos estos son de glicerol fosfato. (Seija, 2010)

La presencia de cápsula es variable pero es importante a nivel patogénico, ya que tiene propiedades antifagocíticas. Las cepas de *S. aureus* que poseen cápsula son más virulentas en modelos animales. No es claro que la cápsula de *S. aureus* juegue un papel importante en la adherencia. Lo que si se conoce es que la adherencia de este germen a la válvulas cardíacas y cuerpos extraños esta mediada, en parte, por receptores de fibronectina en su superficie. La fibronectina es una glicoproteína importante en varias funciones de adherencia. Las cepas de *S. aureus*, que muestran grandes cantidades de receptores para la fibronectina, parecen ser más invasivas y más hábiles para adherirse. Además *S. aureus* puede presentar en su superficie receptores para el colágeno.

La pared celular de *S. aureus* posee una proteína característica llamada proteína A; esta tiene la habilidad de unirse a la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina G (IgG), y por tanto funciona como factor de virulencia, ya que interfiere con la opsonización y la ingestión de los microorganismos por los Polimorfonucleares (PMN), activando el complemento y dando lugar a reacciones de hipersensibilidad inmediata y tardía. Esta proteína es inmunogénica y se hallan anticuerpos contra ella en sujetos con infecciones graves por *S. aureus*. (Seija, 2010) (Bailey, 2009)

1.5.8.1. DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD

Cualquier enfermedad infecciosa es el resultado de la interacción entre el microorganismo causal y el huésped. Los factores de patogenicidad con que cuenta *S. aureus* pueden ser divididos en tres grupos: (Seija, 2010)

a) Componentes de la pared celular: peptidoglicano y ácido teicoico.

b) Enzimas:



- Catalasa: podría funcionar inactivando algunos sistemas de ingestión de los PMN.
- Coagulasas: tanto la coagulasa libre como el llamado “clumping factor” actúan cubriendo a la célula de fibrina y por tanto haciéndola más resistente a la opsonización y fagocitosis.
- Estafiloquinasas: degradan la fibrina y contribuyen a la invasión de tejidos vecinos.
- Hialuronidasa: hidroliza la matriz intracelular de mucopolisacáridos de los tejidos y por tanto contribuye a la diseminación a tejidos adyacentes.
- Lipasas: las cepas de *S. aureus* productoras de forunculosis crónica son potentes productoras de lipasas que ayudan al microorganismo a diseminarse por los tejidos cutáneo y subcutáneo.
- Fosfolipasa C: esta enzima está asociada con cepas recuperadas de pacientes con distrés respiratorio del adulto y coagulación intravascular diseminada (eventos que ocurren durante la sepsis). Aparentemente los tejidos afectados por esta enzima se vuelven más susceptibles al daño y destrucción por componentes bioactivos del complemento y sus productos durante su activación.
- *S. aureus* produce además, toda una serie de enzimas como las DNAsas, proteasas y fosfatasas que colaboran en el proceso infeccioso y en la producción de lesiones. (Seija, 2010)

c) Toxinas: *S. aureus* puede producir toxinas de acción general como las hemolíticas (α , β , γ y δ) y la leucocidina, y también toxinas especializadas como las exfoliatinas, toxina del shock tóxico y enterotoxinas. Las hemolisinas son importantes toxinas citolíticas sobre una variedad de células. (Seija, 2010)

- α hemolisina o α toxina: tiene efecto letal sobre una variedad de membranas celulares eucariotas, incluyendo la de PMN humanos, así como también la de eritrocitos de diferentes especies animales. Es dermonecrótica si se inyecta en forma subcutánea y es letal para animales si se administra en forma



intravenosa. Es responsable de la zona de hemólisis observada alrededor de las colonias de *S. aureus*.

- β hemolisina: es una esfingomielinasa activa sobre diferentes células: leucocitos, eritrocitos, fibroblastos.
- γ y δ hemolisinas: se encuentran en algunas cepas de *S. aureus* y lisan una variedad de células diferentes.
- Leucocidina: es una exotoxina con efecto tóxico directo sobre las membranas de los PMN humanos, 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. Una inyección de esta toxina en modelos animales produce una disminución severa del número de leucocitos.
- Exfoliatinas o toxinas epidermolíticas: son producidas por algunas cepas de *S. aureus* y 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 EDTA, mientras la exfoliatina B es de origen plasmídico, es inactivada por el calor y estable frente al EDTA. Ambas tienen actividad proteolítica, actúan como superantígenos y disuelven la matriz mucopolisacárida de la epidermis, resultando en la separación intraepitelial de las uniones en el estrato granuloso. Las cepas productoras de una o ambas proteínas son responsables del síndrome de piel escaldada.
- Enterotoxinas: se trata de moléculas termoestables responsables de la intoxicación alimentaria producida por algunas cepas *S. aureus*. El modo de acción de estas toxinas no es aún conocido pero se sabe que aumentan el peristaltismo.
- Toxina del shock tóxico (TSST-1): Es también denominada como enterotoxina F, está implicada en la patogenia del síndrome del shock tóxico. Aunque su rol es poco claro tiene una gran cantidad de actividades biológicas. En modelos animales potencia la actividad letal de pequeñas cantidades de endotoxina. (Seija, 2010)

Tabla 2: Determinantes de patogenicidad *S. aureus*

Determinante de patogenicidad	Propiedades
Componentes de la pared celular <ul style="list-style-type: none">• Peptidoglicano• Ácidos Teicoicos• Proteína A• Cápsula Mucoide	Activación del complemento Antifagocítica Antifagocítica Adherencia
Enzimas <ul style="list-style-type: none">• Coagulasa• Estafiloquinasas• Hialuronidasa• Lipasas	Formación de absceso Destrucción del coagulo Invasión hística Colonización
Toxinas <ul style="list-style-type: none">• Hemolisinas• Leucocidina • Toxina exfoliatina• Toxina del shock toxico• Enterotoxinas	Rotura de la membrana celular Alteración de la permeabilidad celular de fagocitos Epidermólisis Shock Intoxicación alimentaria

Fuente: (Seija, 2010)

1.5.8.2. FACTORES PREDISPONENTES DEL HUÉSPED

Las infecciones causadas por *S. aureus*, no solo dependen de los factores de agresión que este 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, 2010)

1.5.8.3. PATOGENIA

S. aureus produce infecciones de dos maneras:

1. En forma directa, por invasión y posterior destrucción tisular local (proceso supurado), o luego de haberse diseminado por vía sanguínea.

Tabla 3: Infecciones producidas por *S. aureus*.

Invasión directa
Superficial
<ul style="list-style-type: none">• Piodermas, incluyendo impétigo y paroniquia• Infecciones de piel y tejidos blandos, forúnculos, celulitis, linfangitis, linfadenitis, etc.
Profunda
<ul style="list-style-type: none">• Artritis séptica• Osteomielitis• Piomiositis
Diseminación por vía sanguínea
<ul style="list-style-type: none">• Bacteriemia con o sin shock o falla multiorgánica• Formación de abscesos metastásicos (cerebro, pulmón, hígado, bazo, retroperitoneo, riñón, tracto genital, etc.)
Enfermedades mediadas por toxinas
<ul style="list-style-type: none">• Síndrome de piel escaldada• Intoxicación alimentaria• Síndrome del shock tóxico

Fuente: (Seija, 2010)



2. A través de efectos producidos por Toxinas

Tabla 4: Secuencia de eventos patogénicos en infecciones serias causadas por *S. aureus*

Colonización, portador, producción de toxina
Rotura de barrera cutaneomucosa
Invasión <ul style="list-style-type: none">• Celulitis, linfangitis• Formación de absceso• Eventual invasión de la sangre
Bacteriemia
Síndrome de sepsis <ul style="list-style-type: none">• Componentes de la pared• Toxina del shock tóxico• Rol de los mediadores disparados
Complicaciones <ul style="list-style-type: none">• Abscesos supurados metastásicos, endocarditis, etc.• Shock séptico o falla multiorgánica
Muerte

Fuente: (Seija, 2010)

1.5.8.3.1. INFECCIONES POR INVASIÓN

En cuanto a este tipo de infecciones pueden ser originadas tanto por cepas de *S. aureus* residentes como no residentes. El primer paso de la infección es la adherencia y colonización de las células del huésped, se pueden describir tres tipos de adherencia; por un lado, la adherencia a las células de la mucosa nasal mediada por los ácidos teicoicos y también es importante la adherencia a la mucina de la mucosa nasofaríngea. Por otro, la adherencia a piel traumatizada o pequeñas disrupciones de piel, así como también a objetos extraños y estructuras subendoteliales. Esta adherencia envuelve muchas proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, fibrinógeno, elastina, colágeno y otras. Las proteínas interaccionan con diferentes receptores de *S. aureus*, antes mencionados. Por



último, la adherencia de *S. aureus* a las células endoteliales durante los eventos de sepsis es un proceso complejo donde están involucrados la fibronectina, el fibrinógeno y la laminina. (Seija, 2010)

Los microorganismos al atravesar la barrera cutaneomucosa, posteriormente llegan al tejido subcutáneo o submucoso y se diseminan rápidamente, llegando a formar abscesos. Esta es la lesión típica producida por este microorganismo. Los mecanismos de la invasión son poco conocidos pero a este nivel se desencadena la respuesta inflamatoria del huésped que contribuye a la formación de los abscesos. La respuesta defensiva más importante por parte del huésped son los polimorfonucleares (PMN). Algunas veces el germen puede seguir invadiendo, buscando áreas más profundas y avasculares. Al encontrarse estos microorganismos alrededor o dentro de los huesos, o protegidos dentro de coágulos, se hacen bastante resistentes al ataque y erradicación por los mecanismos defensivos del huésped. (Seija, 2010)

Sólo la mayor intensidad de los factores bacterianos junto al fracaso de los mecanismos defensivos del huésped puede llevar a que las bacterias puedan llegar a la corriente sanguínea, diseminarse y producir focos de infección a distancia llamados abscesos metastásicos. Los eventos que llevan a la sepsis y muerte aún no son del todo conocidos. Aparentemente los ácidos teicoicos y el peptidoglicano podrían actuar como la endotoxina de los bacilos Gram negativos. Además de infecciones de piel y partes blandas, *S. aureus* puede producir infecciones invasivas como neumonía, osteomielitis, bursitis, artritis y otras.

1.5.8.3.2. RESPUESTA DEL HUÉSPED

La integridad de la barrera cutánea y un sistema fagocítico intacto son los principales mecanismos de defensa contra las infecciones estafilocócicas. La primera línea de defensa luego de atravesar las barrera cutánea son los PMN y el sistema monocito-macrófago. La movilización de las células fagocíticas hacia el sitio de crecimiento bacteriano requiere la elaboración de señales microbianas y específicas del huésped. El reconocimiento de *S. aureus* por los fagocitos está mediado por sus receptores para el fragmento Fc de la IgG, por sus receptores para la subunidad C3b del complemento, y posiblemente por otros receptores del complemento. Para ser



fagocitado, por tanto, *S. aureus* debe estar recubierto por C3b o IgG, proceso que se llama opsonización. En cepas con cápsula se necesitan anticuerpos anticápsula para la opsonización.

La proteína A tiene, como ya vimos, una importante función antifagocítica. Luego de ser fagocitados, la mayoría de los estafilococos intracelulares son destruidos rápidamente y degradados dentro de la vacuola fagocítica, pero puede demostrarse la sobrevivencia de una minoría, lo que podría explicar el índice de recurrencia de algunas infecciones por *S. aureus*.

Durante la infección estafilocócica se producen algunos anticuerpos contra distintos antígenos de la pared celular, así como contra varias toxinas. En la actualidad ninguno ha logrado inducir una protección completa contra la infección por *S. aureus*. (Seija, 2010)

1.5.8.4. RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

S. aureus puede poseer resistencia para diferentes antimicrobianos. En general los estafilococos aislados de infecciones comunitarias, hasta hace poco tiempo, no poseían muchos genes de resistencia salvo por la producción de penicilinas. Sin embargo, actualmente asistimos a la emergencia de cepas comunitarias resistentes a metilina u oxacilina. En cuanto a los aislamientos de origen nosocomial, un elevado porcentaje de los mismos tienen varios determinantes de resistencia y fundamentalmente resistencia a metilina, asociada a resistencia a aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas. (Seija, 2010) (Murray, 2009)

1.5.8.4.1. RESISTENCIA A B-LACTÁMICOS

Existen variados mecanismos que intervienen en la resistencia a β -lactámicos. La producción de β -lactamasa inactiva ciertos β -lactámicos por medio de la hidrólisis del anillo β -lactámico.

Estas enzimas atacan a la penicilina G, ampicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas. El producto de hidrólisis carece de actividad antibacteriana. Más del 90% de los aislamientos de *S. aureus* produce este tipo de enzimas, también



llamadas penicilinasas. Parte de la enzima que se produce es excretada al medio externo y parte permanece adherida a la membrana celular.

Se han reconocido cuatro variantes de β -lactamasa llamadas A, B, C y D. En la mayoría de los aislamientos esta enzima es codificada por plásmidos, pero también se puede encontrar a nivel cromosómico como parte de un elemento transponible. (Seija, 2010) (Murray, 2009)

Por otro lado tenemos la resistencia a metilina u oxacilina. Ésta consiste en la producción de una nueva proteína fijadora de penicilina (*penicillin-binding protein*) PBP, llamada PBP2a o PBP2', no presente en las cepas sensibles. Esta nueva PBP tiene una afinidad disminuida por la mayoría de los β -lactámicos y cefalosporinas. Se trata de una transpeptidasa, la cual se encarga de la síntesis de la pared cuando las otras PBPs están inactivas por estar ligadas al beta lactámico. Esta nueva PBP está codificada por un gen llamado *mecA* que está presente en el cromosoma de todas las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina.

Presumiblemente la región *mec* se originó en estafilococos coagulasa negativos y luego se transfirió a *S. aureus*. (Murray, 2009). Cuando una cepa es resistente a metilina significa que la cepa es resistente a todos los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenems). (Seija, 2010)

1.5.9. ESTAFILOCOCOS RESISTENTE A METICILINA

Las cepas de *S. aureus* que expresan el gen *mecA* se denominan *Staphylococcus aureus* metilino resistente (SAMR). La trascendencia clínica de este microorganismo radica en que dificulta el tratamiento de las infecciones que produce y obliga a establecer una serie de medidas de control en el ámbito nosocomial.

SAMR es un *S. aureus* resistente a todos los betalactámicos (incluyendo cefalosporinas y carbapenems) y usualmente a aminoglucósidos, eritromicina, clindamicina, tetraciclinas, sulfamidas, quinolonas y rifampicina. Aun así, muestra cierta sensibilidad a los glucopéptidos. (Seija, 2010)



1.5.9.1. DETECCIÓN DE LABORATORIO

Los métodos utilizados para la detección de SAMR en el laboratorio se basan en la modificación de las condiciones de cultivo para facilitar la expresión de las cepas con resistencia a meticilina. La temperatura de incubación se reduce a 35 °C, se aporta NaCl al medio de cultivo y se prolonga el tiempo de incubación a 24 h. En la actualidad también se dispone de métodos de diagnóstico rápido fenotípicos, como la aglutinación con anticuerpos monoclonales específicos, o genómicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que detecta el gen *mecA*. (Murray, 2009)

1.5.9.2. EPIDEMIOLOGÍA

SAMR se presenta habitualmente en el ámbito hospitalario causando brotes nosocomiales o, con menos frecuencia, de forma esporádica. La introducción del SAMR en el hospital se produce generalmente a través del denominado caso índice. Una vez en el centro, SAMR puede transmitirse de forma limitada, dando lugar a una situación de endemia, o diseminarse rápidamente por todo el hospital, ocasionando un brote epidémico.

Las medidas de control del SAMR se basan en la epidemiología de esta infección y tienen por objeto limitar la diseminación nosocomial del microorganismo. (Murray, 2009)

1.5.9.3. TRATAMIENTO

Existe una guía para manejo de infecciones por SAMR que ha sido publicada por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA). Brevemente, en el caso de abscesos cutáneos, la incisión y drenaje debe ser el tratamiento primario. En caso de abscesos más extensos o asociados a cuadros de celulitis, sepsis, presencia de diabetes u otras comorbilidades, edades extremas de la vida, entre otros, se recomienda utilizar terapia antimicrobiana. Para pacientes que serán manejados de manera ambulatoria con celulitis purulenta, los antimicrobianos que se pueden utilizar como terapia empírica por vía oral son: clindamicina, cotrimoxazol, tetracilicina (doxiciclina o minociclina) y linezolid.



En caso de celulitis no purulenta, en la que se sospeche de una infección por estreptococo β -hemolítico y se intente cubrir ambas opciones, clindamicina sola o cotrimoxazol/ tetracilicina asociada a un β -lactámico sería lo indicado. En caso de que el paciente presente una infección de piel y partes blandas severa que requiera ser hospitalizado, los antimicrobianos que pueden usarse por vía endovenosa son vancomicina, linezolid, clindamicina, daptomicina o telavancina. (Murray, 2009)



CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 METODOLOGÍA DE TRABAJO

2.1.1 TIPO DE ESTUDIO

El tipo de estudio fue descriptivo no experimental, de laboratorio y de corte transversal, ya que se hizo de un estudio de prevalencia de la exposición y del efecto en una muestra poblacional en un solo momento temporal, en el cual las variables fueron medidas en una sola ocasión; es decir, se permitió estimar la magnitud y distribución de una enfermedad o condición en un momento dado. En nuestro caso, la Prevalencia de *S. aureus* resistente a la meticilina en los estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia.

2.1.2 POBLACIÓN, MUESTREO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

2.1.2.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA.

La toma de muestra así como el procesamiento y cultivo de las mismas, se llevaron a cabo en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, ubicada en la avenida 12 de Abril y Agustín Cueva.

2.1.2.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Estudiantes de la Carrera de Bioquímica Farmacia de la Universidad de Cuenca que hayan aprobado o estén cursando la asignatura de Bacteriología Clínica.

2.1.2.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Fórmula para el Cálculo del Tamaño de la Muestra:

$$n = \frac{N\sigma^2Z^2}{(N-1)e^2 + \sigma^2Z^2}$$



Dónde:

- n = el tamaño de la muestra.
- N = tamaño de la población.
- δ = Desviación estándar de la población que, por lo general si no tiene su valor, suele utilizarse un valor constante de 0,5.
- Z = Valor obtenido mediante niveles de confianza. Es un valor constante que, si no se tiene su valor, se lo toma en relación al 95% de confianza equivale a 1,96 (como más usual) o en relación al 99% de confianza equivale 2,58, valor que queda a criterio del investigador.
- e = Límite aceptable de error muestral que, generalmente cuando no se tiene su valor, suele utilizarse un valor que varía entre el 1% (0,01) y 9% (0,09), valor que queda a criterio del encuestador o investigador. (Fernández, 2001)

Datos:

- $n = x$
- $N = 126$ (Alumnos de la Carrera de Bioquímica y Farmacia, desde 7mo ciclo)
- $\delta = 0,5$
- $Z = 1,96$
- $e = 0,05$

$$n = \frac{(126)(0,5)^2(1,96)^2}{(126 - 1)(0,05)^2 + (0,5)^2(1,96)^2}$$

$n = 95.06$



2.1.3 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Tabla 5: Operacionalización de las variables

VARIABLES	CONCEPTO	DIMENSION	INDICADOR	ESCALA
DEPENDIENTES				
Prevalencia de <i>S. aureus</i> resistente a la meticilina en estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca.	Número de casos de una enfermedad o evento en una población y en un momento dado.	Constante o no	%	0-100
Temperatura	Grado de la medida térmica medida en una escala definida. Medida de la energía cinética de las partículas que componen un sistema.	Constante o no	Grados Centígrados (°C)	35°C.
Tiempo	Período durante el que tiene lugar una acción, acontecimiento o dimensión que representa una sucesión de dichas acciones.	Constante o no	Horas	18-24 horas
INDEPENDIENTES				
Sexo	Es el conjunto de características físicas, biológicas, anatómicas y fisiológicas de los seres humanos, que los definen como hombre o mujer.	-	Masculino Femenino	-



2.1.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

2.1.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia que hayan cursado o estén cursando la asignatura de Bacteriología en la Universidad de Cuenca.
- Estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia que hayan cursado o estén cursando la asignatura de Bacteriología en la Universidad de Cuenca que hayan aceptado voluntariamente participar en el estudio y hayan firmado el consentimiento informado.

2.1.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia que estén sujetos a un tratamiento con antibióticos.

2.2 EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

2.2.1 EQUIPOS

Tabla 6: Equipos de laboratorio empleados en el estudio “Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca

Cantidad	Equipos de Laboratorio	Marca	Número de Serie
1	Incubadora	Memmert® DE	66812464
2	Microscopio	Olympus® CX21-FS1	7B13824
1	Cámara de Flujo Laminar	Labconco® clase II tipo A2	071076933
1	Autoclave	Trident® EA 632	0005-FA-0033
1	Autoclave	Fanem® 415/3	FG9302
1	Baño María	Memmert® LE-209	---
1	Balanza digital	Mettler® PC440	20049614
1	Refrigeradora	Indurama® No Frost	---
1	Cocineta (2 quemadores)	Haceb® EM2	---

Fuente: Registro de laboratorio



2.2.2 REACTIVOS

Tabla 7: Reactivos de laboratorio empleados en el estudio “Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca”

Cantidad	Reactivos
1	Agar Sangre Base (500g) Merck®
1	Manitol Salado (500g) Merck®
1	Agar Mueller-Hinton (500g) Merck®
6	Discos para Antibiograma (cartuchos x 50 discos impregnados): Cefoxitina (30ug) Penicilina (10 unidades)
2	Agua oxigenada 10 volúmenes (Frasco x 50ml)
	<i>Reactivos para tinción de Gram</i>
20ml	Violeta de cristal (Merck®)
20ml	Ioduro de potasio (Merck®)
20ml	Alcohol cetona (Merck®)
20ml	Fucsina (Mallinckrodt®)
2	Alcohol al 70% (Frasco 500ml)
2	Alcohol al 95% (Frasco x 500ml)

Fuente: Registro de laboratorio



2.2.3 MATERIALES

Tabla 8: Materiales empleados en el estudio “Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca”

Cantidad	Material de Laboratorio	Marca
6	Cajas Petri estériles (Paquete por 20 unidades)	Fisherbrand®
3	Vasos de precipitación 250ml	Pyrex®
4	Erlenmeyer 500ml	Boeco®
120	Tubos de ensayo con tapa rosca 10ml	---
4	Varillas de vidrio	---
2	Hisopos estériles flexibles para muestras nasofaríngeas (Paquete por 100 unidades)	Copan®
4	Gradillas plásticas	---
3	Lámparas de alcohol	RS®
2	Guantes de Examinación (cajas x 100 unidades)	Semperguard®
1	Mascarillas desechables (Caja por 50 unidades)	Prehma®
1	Cofias (Caja por 50 unidades)	M3®
4	Portaobjetos (Caja por 50 unidades)	Inlab®
2	Palillos de Madera (50 unidades)	Caricia®
1	Papel Aluminio	Drocaras®
1	Suero Fisiológico 100ml	Baxter®
10	Gasa (unidades)	Prehma®



Tabla 9: Materiales de oficina empleados en el estudio “Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca”

Cantidad	Material de Oficina
1	Cinta masking
1	Marcador permanente
1	Lápiz graso
1	Paquete papel bond Xerox office A4 x 500 hojas
1	Tijera
4	Cajas de fósforos
1	Cuaderno universitario de 50 hojas cuadros
40	Pliegos de papel periódico
20	Pliegos de papel empaque
2	Carpetas plásticas

2.3 TÉCNICAS

Para este proyecto de investigación se partió de un hisopado nasofaríngeo para el posterior aislamiento e identificación de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, considerando la morfología de la colonia, examen microscópico, producción de catalasa, producción de coagulasa, y fermentación de manitol.

2.3.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Se dio la explicación adecuada, así como las ventajas en caso de ser partícipes de la investigación mediante un consentimiento informado. (ANEXO 1)

La toma de muestra se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Cuenca, tomando en cuenta todas las medidas de higiene y asepsia para así asegurar la calidad de la muestra obtenida y su procesamiento. (ANEXO 2)



2.3.2 MUESTRA NASOFARÍNGEA

Las muestras de hisopado se obtuvieron de la zona nasofaríngea posterior. Dichas muestras fueron tomadas de cada fosa nasal derecha e izquierda; a parte de éstas se tomó una muestra más a partir de un hisopo estéril con el cual se hizo una estría en placa, para la tinción de Gram.

Para la toma del hisopado nasofaríngeo también se necesitaron tubos con medio de enriquecimiento (Caldo de Trypticase Soya).

Las muestras se tomaron los días lunes a jueves de 8 am a 12 pm en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Cuenca.

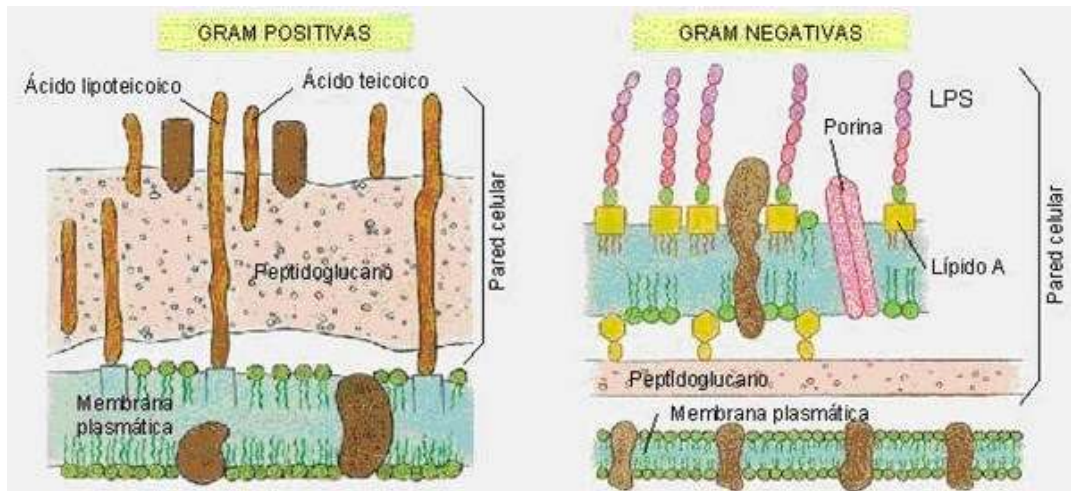
2.3.3 TINCIÓN DE GRAM

Esta técnica se fundamenta en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo.

La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa (constituida por fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas), solo el 10% - 20% de la pared de la célula gram-negativa es peptidoglicano. (Santambrosio, 2009)

Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano (80-90%), pero no cuentan con membrana celular externa y además contienen ácido teicoico; así pues, la composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas y Gram positivas explica y determina las características tintoriales. (Lopez L. E., 2014) (ANEXO 4)

Figura 4: Diferencias estructurales entre bacterias Gram positivas y Gram negativas

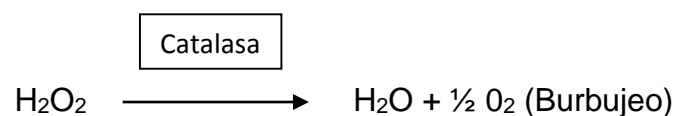


Fuente: (Microbiología, 2012)

2.3.4 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

2.3.4.1 PRUEBA DE LA CATALASA

Es una enzima (Oxidorreductasa), cataliza la descomposición del peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2). El desprendimiento de oxígeno origina un burbujeo el mismo que es producido por el Estafilococo, que da como resultado Catalasa positivo. (ANEXO 5)

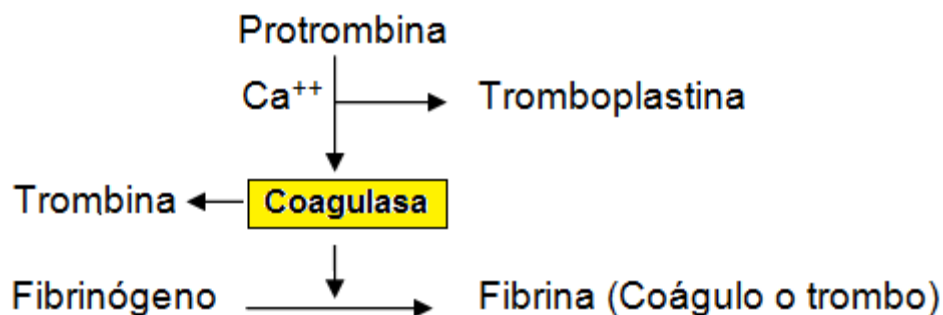


2.3.4.2 PRUEBA DE LA COAGULASA

Esta prueba sirve para determinar la capacidad de un microorganismo para coagular el plasma, mediante la enzima coagulasa que es un activador de la protrombina, la misma que está presente en la mayoría de cepas de *Staphylococcus aureus*.

La coagulasa se encuentra en dos formas: la coagulasa ligada (unida a la célula) y coagulasa libre. La coagulasa ligada, se detecta por el procedimiento en portaobjetos y no está presente en los filtrados de cultivo.

El coágulo de fibrina es formado por la interacción de la coagulasa libre con el factor de reacción de coagulasa (CRF), un factor similar a la trombina, que actúa de manera indirecta para convertir el fibrinógeno en fibrina. No requiere calcio para la formación del coágulo. (Faddin, 2003)



El papel de la coagulasa estafilocócica consiste en desplazar a la protrombina. Primero, la coagulasa se combina con el factor de reacción con la coagulasa (FRC):



Este complejo reemplaza a la trombina en la formación de fibrina



El *S. aureus* produce la coagulasa, una proteína enzimática que coagula el plasma oxalatado y citratado en presencia de un factor contenido en muchos sueros. Esto proviene de la destrucción metabólica del citrato que entonces libera el Ca^{2+} (esencial para la coagulación) del citrato quelatado CaCl_2

La coagulasa positiva es indicativa de *S. aureus*; siendo un método diferencial con respecto a *S. epidermidis*, que da un resultado negativo. (Brizuela, 2007)(ANEXO 5)



2.3.5 FUNDAMENTOS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

2.3.5.1 AGAR SANGRE DE CORDERO

Fundamento

El extracto de músculo de corazón y la peptona, proporcionan al medio un elevado valor nutritivo, permitiendo el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. El cloruro de sodio permite mantener el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. Al agregar de 5-10 % de sangre ovina desfibrinada estéril se promueve el desarrollo de bacterias exigentes debido a que aporta factores de crecimiento y neutraliza efectos tóxicos de metabolitos y radicales libres por las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa presentes en los glóbulos rojos (compuestos tóxicos pueden ser formados durante el tratamiento térmico de los medios de cultivo), así como la observación de las reacciones de hemólisis.

En microbiología se usa sangre ovina desfibrinada estéril obtenida de animales sanos sin el uso de anticoagulantes, los cuales pueden interferir en el desarrollo microbiano afectando la disponibilidad de nutrientes. No es recomendable usar sangre humana debido a posibles interferencias en el diagnóstico al procesar muestras clínicas por la presencia de factores inmunológicos. (Murray, 2009) (Forbes, 1998)(ANEXO 6)

2.3.5.2 AGAR MANITOL SALADO

Fundamento

Los componentes extracto de carne y peptona de caseína, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, los cuales promueven el desarrollo microbiano. El manitol es el hidrato de carbono fermentable. El cloruro de sodio es el agente selectivo e inhibitorio de la flora acompañante, el rojo fenol es el indicador de pH y el agar es el agente solidificante. Es un medio altamente selectivo por la elevada concentración salina y diferencial debido a la capacidad de fermentación del manitol por los microorganismos.



Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, modificando el pH del medio y virando el indicador de pH de rojo al amarillo. Los estafilococos crecen en altas concentraciones de sal, y puede no fermentar el manitol. Los estafilococos coagulasa positiva fermentan el manitol y se observan como colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color. Los estafilococos que no fermentan el manitol, se visualizan como colonias rojas, rodeadas de una zona del mismo color o púrpura. Este medio de cultivo es recomendado para el aislamiento de estafilococos patogénicos a partir de muestras clínicas, alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos y otros materiales de importancia sanitaria. (Britania, 2010) (ANEXO 6)

2.3.5.3 AGAR MUELLER-HINTON

Fundamento

Se trata de un medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para ser empleado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, ya que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crecen satisfactoriamente en este medio de cultivo. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014) (ANEXO 6)

2.3.5.4 CALDO DE TRIPTICASA SOYA

Fundamento:

Es un medio de enriquecimiento idóneo para facilitar el crecimiento de diversos microorganismos. El digerido pancreático de caseína aporta nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. El digerido papaínico de soja contiene alta cantidad de hidratos de carbono que estimulan el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El fosfato dipotásico otorga capacidad búffer y



la dextrosa es la fuente de energía. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014) (Faddin, 2003) (ANEXO 6)

2.3.6 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD EN DISCO

Una vez en contacto el disco impregnado de antibiótico con la superficie húmeda del agar con la bacteria previamente inoculada, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración.

Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S) o resistente (R) según las categorías establecidas por el CLSI. (Picazo, 2000)

2.3.6.1 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SAMR

En la actualidad, el CLSI recomienda el uso del disco de cefoxitina para las pruebas de sensibilidad, debido a que detecta mejor la resistencia a meticilina mediada por el gen *mecA*, además se determina la sensibilidad a penicilina. La oxacilina sigue siendo una segunda opción, pero en diversas publicaciones se ha demostrado que cefoxitina es más confiable que la oxacilina. Así se determina si la bacteria aislada *S. aureus* es o no resistente a meticilina. En el caso de ser *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SAMR) se debe tomar en cuenta los siguientes criterios:

Penicilinas estables a la penicilinasas

Los resultados de la Oxacilina o (cefloxitina) pueden ser aplicados a otras penicilinas estables a la penicilinasas (meticilina, dicloxacilina). A los agentes con una eficacia clínica establecida y considerando el sitio de infección y una apropiada dosificación. Oxacilina (cefloxitin) estafilococo susceptible puede considerarse susceptible a:



- Combinaciones inhibitorios de B- lactamasas. (amoxicilina + clavulanato, ampicilina + sulbactam, piperaciclina + tazobactam)
- Cefalosporinas orales (cefuroxime, cefaclor, cefprozil)
- Cefalosporinas de vía parenteral (I, II, III, IV): cefepime, cefazolina, cefonicid, cefotaxime, ceftriaxona, cefuroxima)
- Carbapenems(doripenem, imipenem, meropenem)

Estafilococo oxacilina resistente son resistentes a todos los agentes microbiales B-lactámicos disponibles, a excepción de las nuevas cefalosporinas con actividad anti-SAMR. La sensibilidad o resistencia se puede deducir solo a partir de penicilina, cefoxitina u oxacilina. (Clinical and Laboratory Standars Institute, 2014)

Interpretación de resultados:

Una vez transcurrido el tiempo de Incubación, se observara un halo de inhibición alrededor del disco antimicrobiano, por lo que los resultados se interpretaran a partir del siguiente cuadro:

Tabla 10: Criterios de Interpretación según el diámetro del halo de inhibición para la Sensibilidad a Penicilina y cefoxitina.

Agente Antimicrobiano	Contenido del disco	Criterios de Interpretación según su diámetro de inhibición (milímetros;mm)	
		Sensibilidad (mm)	Resistencia (mm)
Penicilina	10 unidades	≥29	≤28
Cefoxitina	30ug	≥22	≤21

Fuente: (Clinical and Laboratory Standars Institute, 2014)

Nota: Al obtener una resistencia en ambos discos antimicrobianos (penicilina, cefoxitina), dará como resultado resistencia a la meticilina (SAMR). (Clinical and Laboratory Standars Institute, 2014)



CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación se obtuvieron los resultados, a partir de los criterios antes expuestos los mismos que serán expresados mediante tablas y gráficos, clasificándolos de la siguiente manera:

3.1. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) en los estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia que ya cursaron la asignatura de Bacteriología Clínica.

3.1. Relación entre cultivos positivos para *S. aureus* con respecto a los cultivos meticilino resistentes.

3.1. Relación de la prevalencia de SAMR con respecto al género de la población estudiada.

3.1. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) en los estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia que ya cursaron la asignatura de Bacteriología Clínica.

Mediante los cultivos realizados, se obtuvieron los siguientes resultados expresados en la siguiente tabla

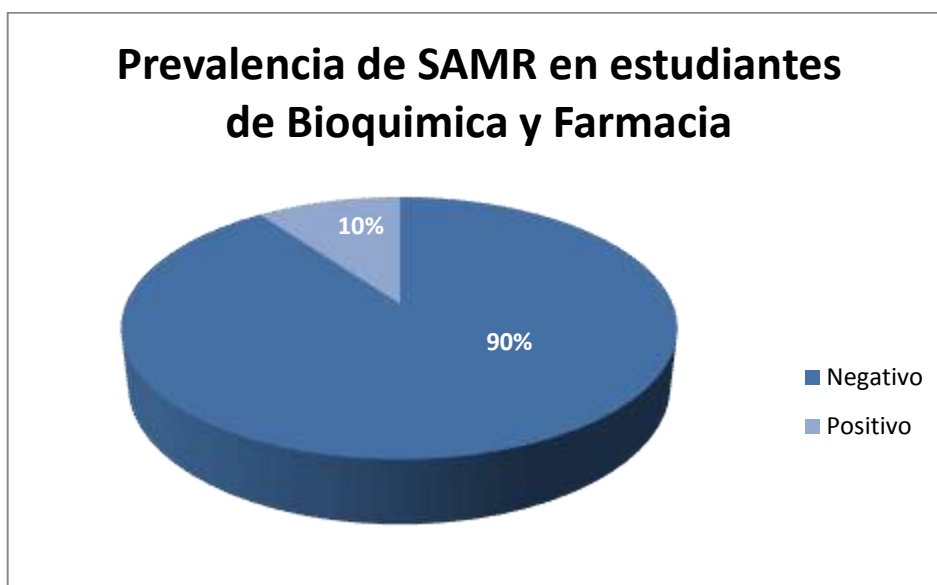
Tabla 11: Prevalencia de SAMR en los estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia que cursaron la asignatura de Bacteriología Clínica.

NÚMERO DE MUESTRAS	RESULTADO	PORCENTAJE DE SAMR RECUPERADO (%)
10	POSITIVO	10
90	NEGATIVO	90
100	TOTAL	100

Fuente: Registro de laboratorio

Se puede observar que de un total de 100 estudiantes que colaboraron en la presente investigación, se obtuvieron 10 cultivos positivos para SAMR de dichos estudiantes, es decir, que la prevalencia fue de un 10%.

Gráfico 1: Prevalencia de SAMR en estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia.



Según la Tesis: “*Frecuencia de Staphylococcus aureus Meticilino Resistente en la Flora Nasofaríngea del Personal Médico del Hospital Vicente Corral Moscoso del Año 2013*” realizado por Raquel Zhumi, Daniel Torres, Jonathan Vivar; la prevalencia de *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente fue de 26,09%. (Raquel Zhumi y Colaboradores, 2013)

Según otro trabajo de investigación similar: “Prevalencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* en el personal del Hospital Vicente Corral Moscoso y Hospital Militar, patrón de sensibilidad antimicrobiana. Cuenca, 2010” realizado por Mónica Alao, la prevalencia de *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente fue 5,5% en personal paramédico. (Alao, 2010)

Según el estudio: “Portación Nasal de *Staphylococcus aureus* en personal hospitalario de cuidados Intensivos. Asunción-2008” Dávalos y colaboradores, se revelo que la prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente fue de 33.3% (Dávalos y colaboradores, 2008)



Cabe destacar que los estudios realizados en dichas investigaciones fueron desarrollados en un ambiente hospitalario, los mismos que presentaron una prevalencia mayor al presente estudio, siendo éstos de 26,09% y 33,3%; resultados elevados debido probablemente al constante contacto con el microorganismo. En otro estudio afín realizado en personal paramédico, el porcentaje fue menor (5,5%).

La prevalencia que se obtuvo en esta investigación fue 10%, la misma que no es tan elevada en relación a los estudios realizados a nivel hospitalario, debido posiblemente a que la población correspondiente a los estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia, accede con menor frecuencia al laboratorio en relación con el personal que labora dentro de un ambiente hospitalario y a su contacto continuo con los pacientes.

3.2 Relación entre cultivos positivos para *S. aureus* con respecto a los cultivos meticilino resistentes.

Tomando en cuenta la cantidad de muestras recolectadas se obtuvieron 29 que dieron como resultado positivo a *S. aureus*, de las cuales el 34.48% fueron positivas para SAMR. Los resultados se pueden observar en la siguiente tabla:

Tabla 12: Relación entre cultivos positivos para *S. aureus* con respecto a los cultivos meticilino resistentes

Numero de Muestras	Porcentaje	Cultivos Positivos para <i>S. aureus</i>	Porcentaje	Cultivos Meticilino Resistentes	Porcentaje
100	100%	29	100%	10	34.48%

Fuente: Registro de laboratorio

El porcentaje para cultivos de *S. aureus* positivo, en relación con el número de muestras tomadas fue de 29%.

El porcentaje de SAMR, a partir de cultivos positivos de *S. aureus* fue de 34.48%.

Gráfico 2: Porcentaje de SAMR a partir de cultivos positivos de *S. aureus*.

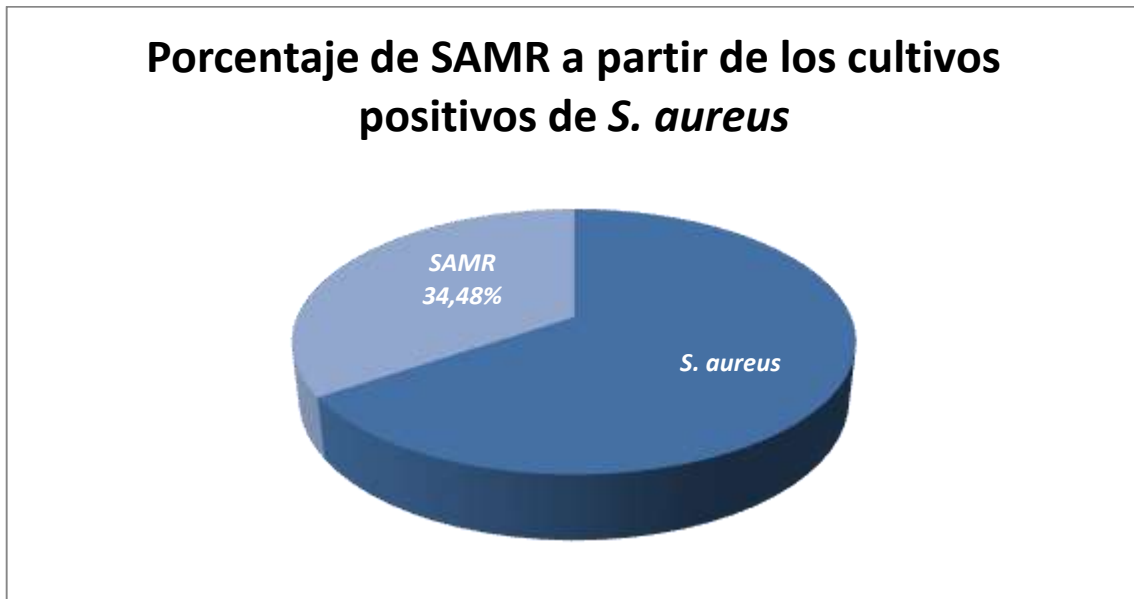
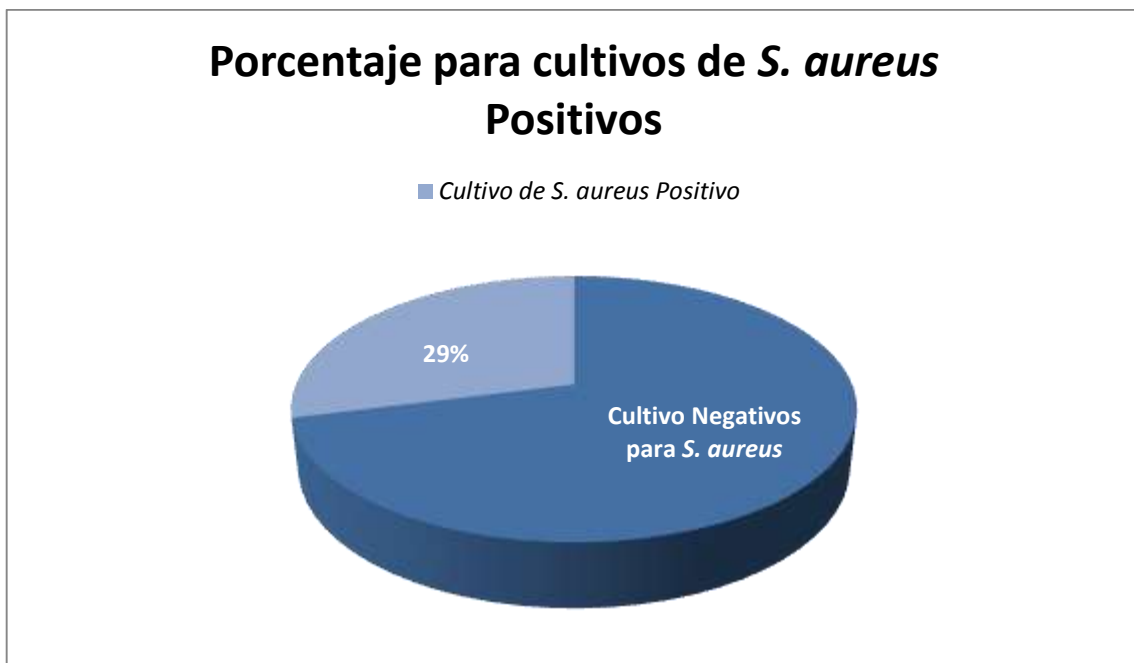


Grafico 3: Porcentaje para cultivos de *S. aureus* Positivos



Según el estudio: “*Portación nasal de Staphylococcus aureus en personal hospitalario. Frecuencia y patrón de sensibilidad antimicrobiana. Asunción- 2003*” realizado por Sanabria R. y colaboradores se incluyeron a 141 trabajadores, de los



cuales 45 trabajadores dieron positivo para *Staphylococcus aureus*, resultando una prevalencia de 31%. Asimismo la prevalencia de *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente en relación a los cultivos positivos de *S. aureus* fue de 21%. (Sanabria, 2003)

Según la Tesis: “*Frecuencia de Staphylococcus aureus Meticilino Resistente en la Flora Nasofaríngea del Personal Médico del Hospital Vicente Corral Moscoso del Año 2013*” realizado por Raquel Zhumi, Daniel Torres, Jonathan Vivar; en la que la frecuencia de cultivos positivos para *S. aureus* en relación a la población estudiada fue de 30%. En cuanto que al porcentaje de *S. aureus* Meticilino resistente, en relación a los cultivos positivos de *S. aureus* fue de 36.1% (Raquel Zhumi y Colaboradores, 2013)

Según la tesis: “*Prevalencia de portadores nasales de Staphylococcus aureus en el personal del Hospital Vicente Corral Moscoso y Hospital Militar, patrón de sensibilidad antimicrobiana. Cuenca, 2010*” realizado por Mónica Alao la prevalencia de cultivos positivos para *Staphylococcus aureus* fue de 37% en personal paramédico. (Alao, 2010)

Según el estudio: “*Portación Nasal de Staphylococcus aureus en personal hospitalario de cuidados Intensivos. Asunción-2008*” Dávalos y colaboradores, que a partir de 142 individuos, el 42,3% dio como resultado positivo a la cepa de *Staphylococcus aureus*. (Dávalos y colaboradores, 2008)

En las investigaciones anteriormente citadas, los cultivos positivos para *Staphylococcus aureus* variaron según los diferentes estudios llegando a tener una prevalencia de 30%, 31%, 37% y 42.3%, y que en relación a la presente investigación con una prevalencia de 29%, no hay mayor diferencia en comparación con las 2 primeras investigaciones citadas, a pesar de ser realizadas en personal hospitalario

En las mismas investigaciones anteriormente citadas se dio a conocer que el porcentaje de SAMR a partir de los cultivos positivos de *S. aureus* fue de 21% y 36,1%, que en relación con el resultado de esta investigación que fue de 34,48%, no



resultan ser muy diferentes, valor que llama bastante la atención por tratarse de una población de portadores a nivel comunitario.

3.3 Relación de la prevalencia de SAMR con respecto al género de la población estudiada.

Tomando en cuenta el género de los estudiantes objeto de la investigación se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 13: Relación de la prevalencia de SAMR con respecto al género de la población estudiada.

GÉNERO	NÚMERO DE MUESTRAS	Porcentaje	RESULTADOS	
			SAMR Positivos	Porcentaje (%)
Masculino	28	100%	3	10,71
Femenino	72	100%	7	9,72
TOTAL	100	100%	10	10

Fuente: Registro de laboratorio

De las muestras obtenidas, se observó en un porcentaje mayor de mujeres siendo este del 72%; el porcentaje en hombres fue el restante 28%.

Al obtener los resultados se observó que el porcentaje de muestras metilino resistentes en hombres fue de 10,71%, es decir, que de 28 muestras de hombres, 3 fueron metilino resistentes.

En las mujeres se observó que el porcentaje de muestras metilino resistentes fue de 9,72%, es decir, que de 72 muestras de mujeres, 7 de ellas fueron metilino resistentes.

Se realizó el análisis estadístico mediante diferencia de proporciones de acuerdo a la siguiente fórmula (Lopez W. , 2010):



$$z = \frac{P1 - P2}{\sqrt{\frac{p(1-p)}{n1} + \frac{p(1-p)}{n2}}}$$

Dónde:

- z = Valor obtenido mediante niveles de confianza. Es un valor constante que, si no se tiene su valor, se lo toma en relación al 95% de confianza equivale a 1,96 (como más usual) o en relación al 99% de confianza equivale 2,58, valor que queda a criterio del investigador.
- $P1$ = Porcentaje de SAMR en la población masculina
- $P2$ = Porcentaje de SAMR en la población femenina
- $n1$ = población masculina
- $n2$ = población femenina

$$z = \frac{0,1071 - 0,0972}{\sqrt{\frac{0,1071(1 - 0,1071)}{28} + \frac{0,0972(1 - 0,0972)}{72}}}$$

z calculado = 0,029

95% de Confianza ----- $z = 1,96$ (z crítico)

De acuerdo a los valores de z calculado con respecto a z crítico se tomó en cuenta:

- Si z calculado $<$ z crítico \rightarrow Rechazo; no es estadísticamente significativo
- Si z calculado $>$ z crítico \rightarrow Acepto; es estadísticamente significativo

Según el valor de z calculado:

$0,029 < 1,96 \rightarrow$ se rechazó

Si para el cálculo del tamaño se manejó un valor de confianza del 95%, el valor obtenido para la relación de la prevalencia de SAMR respecto al género, no representó una variación estadísticamente significativa.

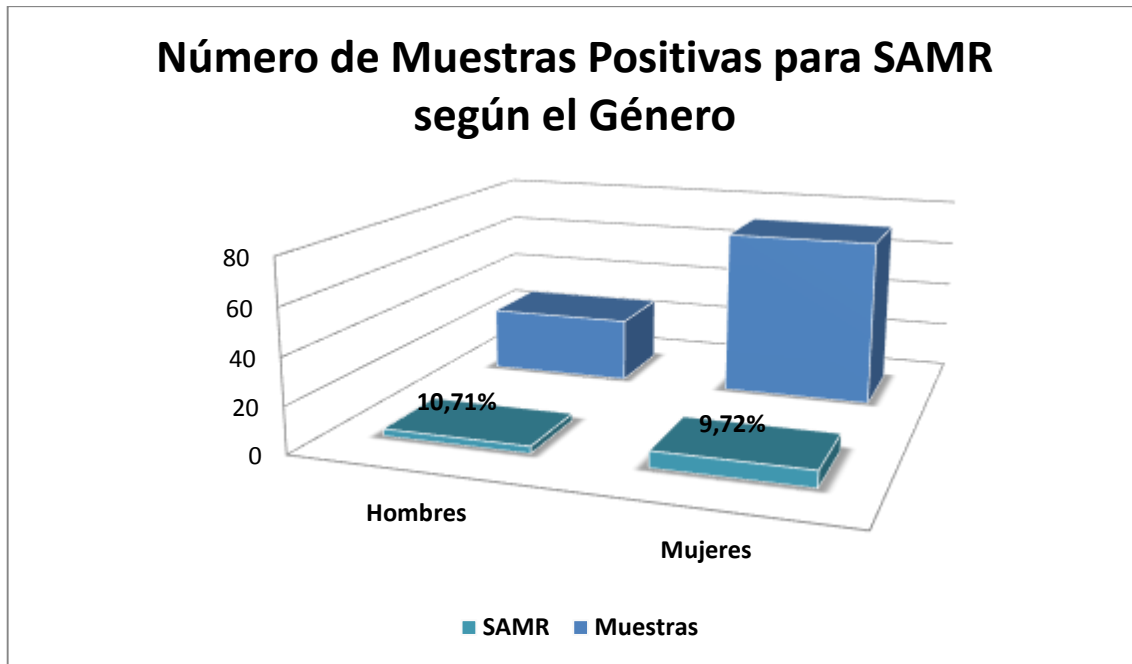


Gráfico 2: Relación de SAMR con respecto al género.

Según el estudio: “Pacientes de sexo masculino ¿Mayor susceptibilidad a infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina?, Mexico-2013” realizado por Andrea Rivas y colaboradores, se incluyeron 80 pacientes, de los cuales 30 (37.5%) eran del sexo femenino y 50 (62.5%) del sexo masculino, en el mismo que se observó que los pacientes del sexo masculino presentaron una probabilidad cuatro veces mayor de padecer infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina que los pacientes del sexo femenino. (Andrea Rivas y Colaboradores, 2013)

Según la revista de salud Pública: “*Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente en Niños Escolares en Cartagena-2 de mayo del 2010”, el género de los estudiantes no presentó asociación estadísticamente significativa en relación con los portadores de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes. (Raymundo Castro y Colaboradores, 2010)

En los estudios anteriormente citados se pudo observar que la prevalencia, en relación al género de la población motivo de dichos estudios, fue mayor en el género masculino en una de las investigaciones, mientras que en la otra investigación no se observó mayor variación de la prevalencia en relación al género.



En esta investigación se observó un ligero aumento en la prevalencia en el género masculino con un valor del 10,71% con respecto al género femenino con un valor del 9,72%, sin presentarse una diferencia estadísticamente significativa vinculante entre la prevalencia obtenida y el género de la población estudiada.



3.4. CONCLUSIONES

De la presente investigación se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- Se partió de una población motivo de estudio, de la cual se obtuvo una prevalencia de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente correspondiente al 10%. Mediante esta investigación se cumplió la hipótesis planteada.
- De los 100 estudiantes que se obtuvo la muestra, 29 dieron resultado positivo a *S. aureus*, es decir que su prevalencia fue de 29. A partir de las muestras positivas de *S. aureus*, el 34,48% de estas fueron resistentes a la meticilina. Es decir, uno de cada tres estudiantes portadores de *S. aureus*, albergan en la nasofaringe cepas meticilino resistentes.
- De las muestras obtenidas, la población mayoritaria en cuanto al género fue femenina, siendo ésta de un 72%. De esta población la prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente correspondió al 9,72% (7/72). En cuanto al género masculino, éste tuvo un porcentaje menor en relación al género femenino siendo este de 28%, pero una prevalencia mayor de SAMR: 10,71% (3/28). En ambos casos no se observó una amplia diferencia por lo que se puede concluir que el género va a ser independiente de los valores obtenidos, lo que se comprobó estadísticamente mediante el cálculo de Diferencia de Proporciones.



3.5 RECOMENDACIONES

- Para reducir de cierta manera un incremento en cuanto al valor obtenido de prevalencia, sería ideal trabajar en el laboratorio siempre teniendo en cuenta normas de bioseguridad (Equipo de Protección Personal), con el fin de prevenir complicaciones en el estado de salud de los estudiantes o sus familiares, por la capacidad que tiene el microorganismo de diseminar, invadir y producir cuadros clínico graves.
- En la práctica profesional el Bioquímico Farmacéutico está en contacto directo con pacientes, por cuanto debe tomar las medidas de cuidado para evitar que estas cepas se propaguen en poblaciones susceptibles



BIBLIOGRAFÍA

1. Alao, M. A. (2010). *Prevalencia de Portadores nasales de staphylococcus aureus en el personal del hospital Vicente Corral Moscoso y Hospital Militar, Patron de sensibilidad antimicrobiana*. Cuenca.
2. Andrea Rivas y Colaboradores. (2013). *amimc*. Recuperado el 01 de 2015, de amimc: <http://www.amimc.org/pdf>
3. Bailey, S. (2009). *Diagnostico Microbiologico*. New York: Medica Panamericana.
4. Britania. (21 de Octubre de 2010). *Agar Manitol Salado*. Recuperado el 15 de Enero de 2014, de Hoja Técnica : http://www.britanialab.com/productos/246_hoja_tecnica_es.pdf
5. Brizuela, A. Y. (2007). Portadores nasales asintomáticos de Staphylococcus aureus coagulasa. *Portadores nasales asintomáticos de Staphylococcus aureus coagulasa*, 1-26.
6. Brooks, G. (2011). *Capitulo 13: Staphylococcus*. EEUU: Mc. Graw Hill.
7. Carceller, M. A. (1994). *Imedicinas*. Recuperado el 7 de Enero de 2015, de Practica en ORL: http://www.imedicinas.com/pfw_files/cma/pdffiles/Sarandeses/C01751186.pdf
8. Clinical and Laboratory Standars Institute. (2014). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. EEUU.
9. Colaboradores, S. R. (s.f.). *scielo*.
10. Dávalos y colaboradores. (2008). Portacion Nasal de Staphylococcus aureus en personal hospitalario de ciudadanos intensivos adultos. *Salud Asuncion*, 1-12.
11. Departamento de Microbiologia Microclinica. (2006). *UIB*. Recuperado el 09 de 01 de 2015, de UIB: http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/microclinica_old/TEMA2.html



12. Faddin, M. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Medica Panamericana.
13. Forbes, S. W. (1998). *Manual de clínica Microbiológica*. St Louis: Mosby.
14. Instituto Nacional del Cancer. (21 de Octubre de 2014). *Cáncer*. Recuperado el 7 de Enero de 2015, de Cáncer: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/nasofaringe/Patient/page1>
15. Instituto Nacional del CVanc. (s.f.).
16. Leonor Lopez Teves, C. T. (2006). *Biología.edu*. Recuperado el 10 de 1 de 2015, de Biología.edu: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp10.pdf>
17. Lopez, L. E. (2014). Tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Medigraphic*, 10-16.
18. Lopez, W. (2010). Estadística Inferencial . *Estadística II* , 1-8.
19. Microbiología, P. d. (2012). *La Batalla de los Microorganismos*. Recuperado el 10 de Febrero de 2015, de Blogger: <http://microbiologiaujap2012.blogspot.com/2012/03/la-tincion-de-gram-normal-0-21-false.html>
20. Murray. (2009). *Capítulo 21. Estafilococos u cocos gram positivos relacionados*. Madrid: Elsevier.
21. Palacios, J. R. (2009). *infirmiera virtual*. Recuperado el 5 de Enero de 2015, de enfermera virtual: <https://www.infermeravirtual.com/files/media/file/97/Sistema%20respiratorio.pdf?1358605430>
22. Picazo, J. J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. España.
23. Raquel Zhumi y Colaboradores. (2013). *Frecuencia de Staphylococcus aureus meticilino resistente*. Cuenca.
24. Raymundo Castro y Colaboradores. (2010). *scielo*. Recuperado el 01 de 2015, de scielo: <http://www.scielosp.org/pdf/rsap/v12n3/v12n3a11>



25. Sanabria, R. (2003). *scielo*. Recuperado el 01 de 2015, de scielo:
http://scielo.iics.una.py/scielo.php?pid=s1812-95282003000100003&script=sci_arttext
26. Santambrosio, E. (2009). *UTN.edu*. Recuperado el 15 de 12 de 2014, de UTN.edu:
http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf
27. Seija, V. (11 de 5 de 2010). *Higiene.edu*. Recuperado el 10 de 01 de 2015, de Higiene.edu: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>
28. Sologuren, N. (2009). Anatomía de la Vía Aérea. *Rev Chil Anest*, 78 - 83.
29. Vásquez, D. H. (21 de Abril de 2014). *Unmsm*. Recuperado el 08 de Enero de 2015, de Bybvirtualdata:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/libros/medicina/cirugia/Tomo_V/archivos%20PDF/7Rinologia.pdf



ANEXOS

ANEXO 1



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____ alumno/a de la Carrera de Bioquímica Farmacia, con Cédula de Identidad N° _____ autorizo la toma de una muestra nasofaríngea y su posterior utilización para la participación en el estudio: **“Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca”**, tomando en cuenta que dicho microorganismo es el primer agente causal implicado en neumonía nosocomial, infecciones quirúrgicas y bacteriemia nosocomial, debido a la diversidad de factores de virulencia que posee, tanto bioquímicos como estructurales, se lo considera como un patógeno perfecto, equipado para colonizar, invadir y diseminarse; que se propaga por lo general de paciente a paciente por las manos del personal, por lo que se espera que exista un aumento de riesgo de colonización entre trabajadores del área de la salud, como en este caso nosotros como estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia, debido a la exposición ocupacional. Además, cabe resaltar que para ser parte de este estudio, tengo conocimiento que se usaran técnicas generales de laboratorio como son los medios de cultivo para el aislamiento e identificación de *S. aureus*, así como pruebas de sensibilidad microbiana como el método de difusión en disco, todo esto supervisado por la Dra. Lourdes Jerves docente de la Carrera de Bioquímica y Farmacia.

Tomando en consideración la información antes expuesta, con el fin de evitar posibles riesgos de lesiones o contaminación, sé que obtendré beneficios, ya que una vez concluido dicho estudio seré informado/a de los resultados.



Al firmar este documento reconozco que lo he leído o que me ha sido explicado y que comprendo claramente su contenido. Teniendo así la oportunidad de realizar preguntas, las cuales han sido respondidas en forma satisfactoria.

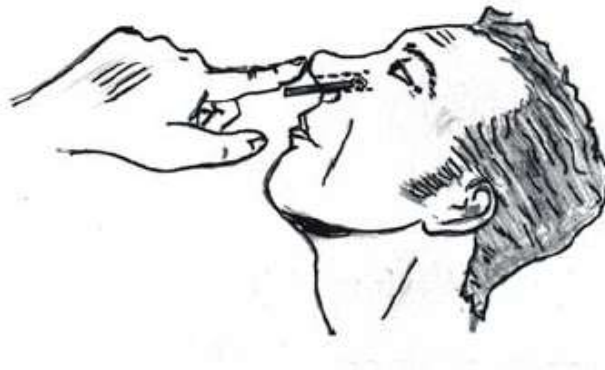
FIRMA DEL ALUMNO/A

ANEXO 2

PROTOCOLO PARA LA TOMA DE MUESTRA

MUESTRA NASOFARINGEA:

1. Para ello se debe realizar un escobillonado (frotado) con el hisopo en la nasofaringe para recoger células de descamación de la mucosa faríngea. (No se debe recoger moco o saliva, ya que se contamina demasiado la muestra con bacterias comensales de la boca). La muestra fue tomada tanto de la fosa izquierda como el de la fosa derecha.

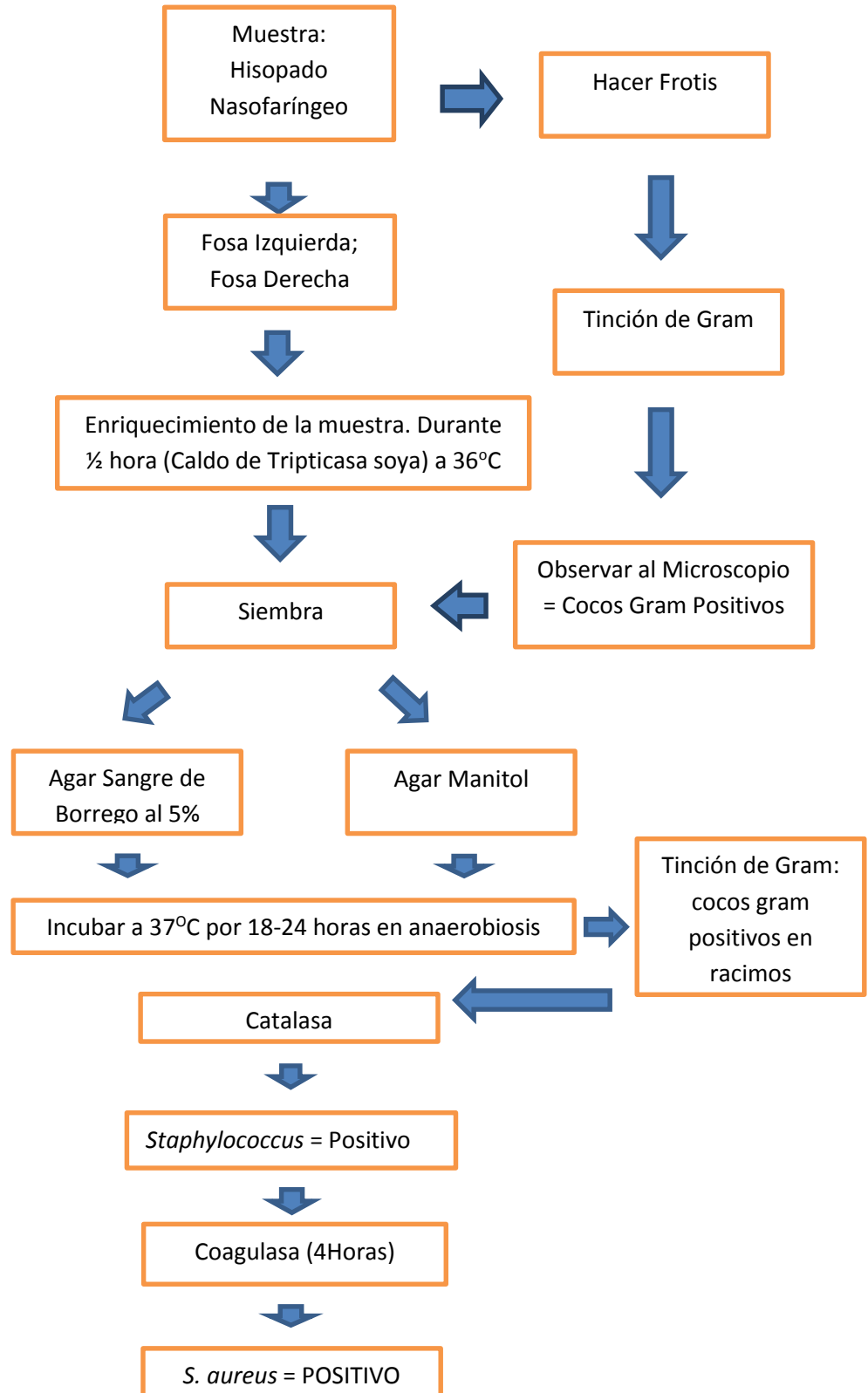


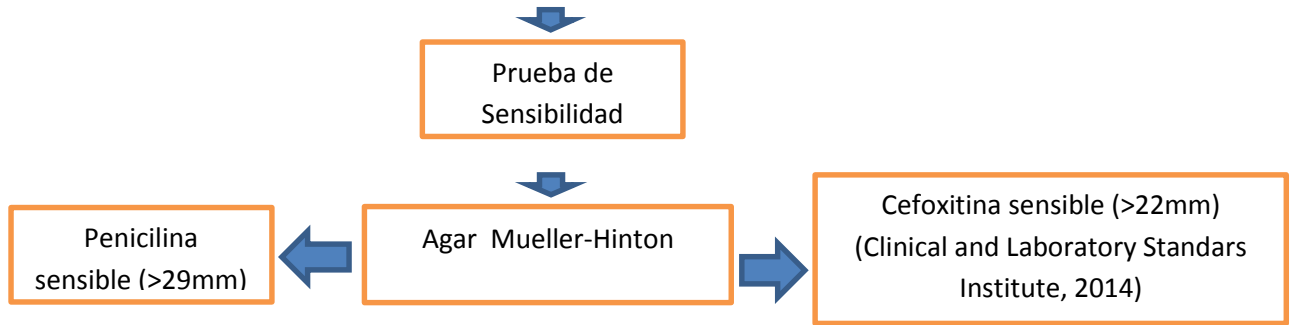
2. Una vez realizado el frotis, se debe introducir en el tubo con medio de enriquecimiento, removiéndola bien en su interior para conseguir una buena emulsión del exudado y cerrando bien el tubo al finalizar toda la operación.
3. También se realizó un frotis a partir del hisopado nasal para determinar la presencia de cocos Gram positivos.



ANEXO 3

FLUJOGRAMA DE TRABAJO





ANEXO 4

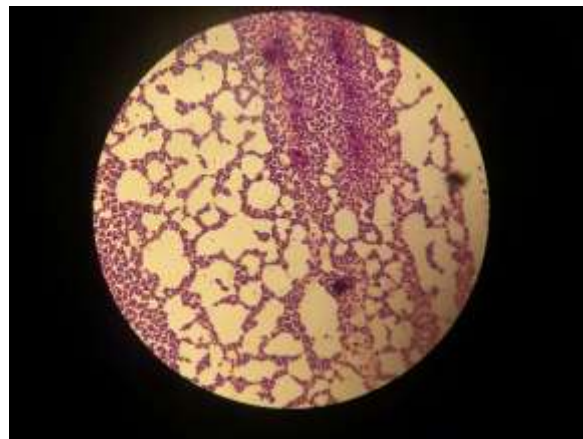
Procedimiento de la Tinción de Gram

1. Realizar un frotis en un portaobjetos a partir de la muestra tomada
2. Fijar la placa y posteriormente añadir los colorantes
3. Añadir el colorante violeta de cristal por 1 minuto, posterior lavado con agua corriente y evitando que la fuerza del agua desprenda la muestra.
4. Añadir el yodo de Gram por 1 minuto para permitir la unión a la pared por enlaces químicos, lavado posterior con agua corriente.
5. Decolorar por medio de alcohol acetona (15 segundos) y lavar
6. Añadir el colorante de fucsina durante 1 minuto, lavar y secar.

Observación al Microscopio

Una vez realizada la tinción se observaron las bacterias gram positivas y gram negativas en la muestra, siendo más prevalente las bacterias gram positivas (cocos).

Foto 1: Observación al microscopio (lente 100X) de Cocos Gram positivos en racimos.



Fuente. Registro de laboratorio

ANEXO 5

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

PRUEBA DE LA CATALASA

Procedimiento:

1. Con la ayuda de un palillo de madera, tomar una colonia obtenida del medio de cultivo Manitol.
2. Colocar la colonia sobre un portaobjetos.
3. Añadir una gota de Agua Oxigenada de 10 volúmenes.
4. Visualizar la presencia de burbujeo.

Resultados:

- ❖ Presencia de Burbujeo: Catalasa Positiva
- ❖ Ausencia de Burbujeo: Catalasa Negativa

Foto 2: Prueba Positiva de Catalasa.



Fuente: Registro de laboratorio

Precauciones:

La colonia idónea para realizar la prueba de la catalasa sería a partir del medio de cultivo del Manitol; no es recomendable realizar esta prueba partiendo de colonias obtenidas en el medio de cultivo de Agar sangre de Cordero, debido a que la enzima

catalasa se la puede encontrar dentro de las células rojas, por lo que podría dar un falso Positivo.

PRUEBA DE LA COAGULASA

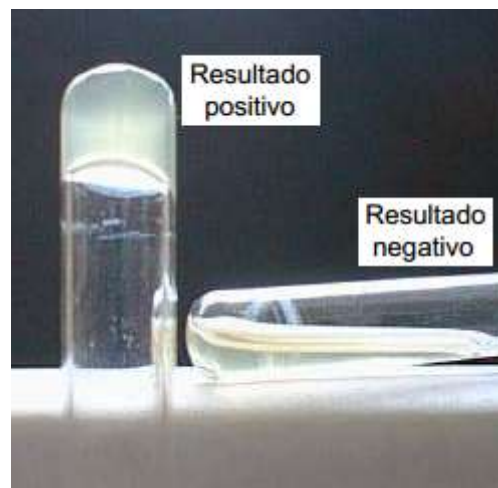
Procedimiento:

1. Con la ayuda de un asa estéril, tomar una colonia obtenida del medio de cultivo manitol.
2. Agregar en un tubo estéril aproximadamente 0,5ml de plasma humano.
3. Colocar la colonia en el tubo con plasma.
4. Dejar en incubación durante 4 horas a una temperatura de 35-37 °C.

Resultados:

En una prueba de coagulasa positiva se deberá evaluar cualquier grado de coagulación, desde un coagulo flojo o suave suspendido en el plasma hasta un coagulo totalmente firme e inmóvil.

Figura 5: Interpretación de la Prueba de Coagulasa



Fuente: (Bailey, 2009)

Precauciones: La determinación de la coagulasa positiva se verá coadyuvada a partir de las colonias obtenidas en el medio de cultivo de manitol, por lo que las colonias amarillas, y el medio tornado a amarillo, tendrán un peso en el resultado final.

ANEXO 6

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR SANGRE DE CORDERO

Composición:

- Sustrato nutritivo (extracto de corazón y Peptona) ----- 20,0 g.
- Cloruro Sódico ----- 5,0 g.
- Agar agar ----- 15,0 g.

Preparación

Se requirió sangre de cordero para la preparación de este medio, la cual se obtuvo gracias a la colaboración del proyecto NERO de la Universidad de Cuenca, ubicado en el sector Nero, cuyo director el Dr. Johnny Narváez, facilitó el ingreso a la granja para la toma de sangre de dichos corderos. Así como también la importante colaboración por parte del estudiante de la Carrera de Veterinaria de la Universidad de Cuenca David Polo.

Fotos 3 y 4: Izquierda, corderos a los cuales se les tomo la muestra de sangre.
Derecha, toma de la muestra de sangre



1. Disolver 40 g del polvo en 1000 ml de agua desmineralizada.
2. Calentar con agitación frecuente y hervir hasta disolución total.
3. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

4. Enfriar a 45°-50°C y agregar 5% de sangre de cordero desfibrinada.
5. Distribuir en cajas bipetri estériles, en volumen apropiado (16 ml) hasta cubrir la superficie horizontal.

Procedimiento:

1. La siembra se realiza por inoculación directa de la muestra, mediante estriamiento por agotamiento sobre la superficie del medio de cultivo.
2. Incubación en aerobiosis, a 35-37 °C durante 18-24 horas (1)

Resultados:

Observar las características de las colonias. En el caso de *S. aureus* las colonias se presentan de un color blanquecino de aspecto liso y redondeado.

Foto 5: Colonias características de Estafilococos.



Fuente: Registro de laboratorio

Para el medio de cultivo conteniendo sangre, observar las reacciones de hemólisis:

- *Hemólisis alfa*: lisis parcial de los glóbulos rojos. Se observa un halo de color verdoso alrededor de la colonia en estudio a consecuencia de la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina (compuesto de color verdoso) debido al peróxido de hidrógeno generado por los microorganismos.
- *Hemólisis beta*: lisis total de los glóbulos rojos. Se observa un halo claro, brillante alrededor de la colonia en estudio.



- *Hemólisis gamma*: ausencia de lisis de los glóbulos rojos. El medio de cultivo no presenta modificaciones de color y aspecto alrededor de la colonia en estudio.

AGAR MANITOL SALADO

Composición:

- Peptona de Caseína ----- 5,0 g.
- Tejido de origen animal digerido por vía enzimática ----- 5,0 g.
- Extracto de carne ----- 1,0 g.
- Cloruro sódico ----- 75,0 g.
- D (-) – Manitol ----- 10,0 g.
- Rojo de Fenol ----- 0,025 g.
- Agar agar ----- 12,0 g.

Preparación: Disolver 108 g de Agar Manitol en 1000 ml de agua desmineralizada, autoclavar y atemperar el medio de cultivo.

Procedimiento:

1. Sembrar en superficie un inóculo denso de la muestra por estría.
2. Incubación en aerobiosis, a 35-37 °C durante 18-24 horas. Si a las 24 horas las placas presentan resultado negativo, incubar otras 24 horas (3)

Foto 6: Colonias características de *S. aureus* con viraje del medio de manitol de rojo a amarillo, por fermentación de lactosa con acidificación del medio.



Fuente: Registro de laboratorio

AGAR MUELLER-HINTON

Composición:

- Infusión de Carne ----- 2,0 g.
- Caseína hidrolizada ----- 17,5 g.
- Almidón ----- 1,5 g.
- Agar agar ----- 13.0 g.

Preparación:

1. Disolver 37 g del polvo en 1000 ml de agua desmineralizada..
2. Calentar con agitación frecuente y hervir hasta disolución total.
3. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
4. Enfriar a 45°-50°C y distribuir en placas de Petri estériles, en volumen apropiado para que el espesor sea de 4 mm sobre una superficie horizontal.



Procedimiento:

1. A partir de un cultivo puro, fresco, realizado en medio de agar, preparar una suspensión con una opacidad equivalente al estándar 0,5 de Mac Farland. El protocolo de estandarización del inóculo se describe en las diversas directrices publicadas por el CLSI 2014 y el CA-SFM y el EUCAST para el método de difusión en agar y el método de dilución en agar.
2. Si el medio se conserva a 4°C, dejar que se ajuste a la temperatura ambiente (18-30°C).
3. Inoculación en líneas (Método de Kirby-Bauer recomendado por el CLSI 2014 y CA-SFM, y EUCAST): A partir de un inóculo estandarizado, seguir las directrices del CLSI, CA-SFM, EUCAST para inocular la placa:
 - a. Sumergir un hisopo estéril, no tóxico, en la suspensión.
 - b. Eliminar el exceso de suspensión rotando suavemente el hisopo contra las paredes del tubo.
 - c. Inocular la placa con el hisopo hasta obtener un cultivo de las colonias confluyentes.
 - d. Aplicar discos de sensibilidad (Cefoxitina, Penicilina) usando pinzas estériles, presionando suavemente. (5)
4. Incubación a 37°C por 18 -24 horas.

Resultados:

- Cefoxitina 30 µg:
 - Resistente: halo de inhibición ≤ 21 mm
 - Sensible: halo de inhibición ≥ 22 mm
- Penicilina de 10 unidades:
 - Resistente: halo de inhibición ≤ 28 mm
 - Sensible: halo de inhibición ≥ 29 mm

Fotos: Prueba de sensibilidad correspondiente a SAMR.



Fuente: Registro de laboratorio

Limitaciones

La evaluación de *Staphylococcus* a temperaturas mayores a 37 °C puede no detectar cepas meticilino resistentes.

CALDO DE TRIPTICASA SOYA

Composición

Digerido pancreático de Caseína ----- 17g.

Digerido papaínico de Soja ----- 3g.

Cloruro Sódico ----- 5g.

Fosfato Dipotásico ----- 2,5g.

Dextrosa ----- 2,5g.



Preparación:

1. Disolver 30g en 1000ml de agua desmineralizada.
2. Mezclar bien hasta disolución total del polvo.
3. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos y enfriar a 45-50°C.

Procedimiento:

1. A partir del hisopado nasofaríngeo, colocar la muestra obtenida en un tubo estéril con aproximadamente 1-2ml de caldo de Tripticasa Soya.
2. Llevar a incubación durante 30 minutos a temperatura de 35-37 °C.
3. Realizar la siembra en los medios de cultivo Agar Sangre de Cordero al 5% y Manitol.



ANEXO 7

Presencia de *Staphylococcus aureus*.

Séptimo Ciclo

Código	Tinción de Gram (Frotis Directo)	Pruebas Químicas			
		Catalasa		Coagulasa	
		Fosas Nasales		Fosas Nasales	
		Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
Grupo A					
7-2A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-3A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
7-4A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-5A	Ausencia	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-6A	Ausencia	-	-	-	-
7-7A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-8A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-9A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-10A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-11A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-12A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-14A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-15A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Positivo	Negativo
7-16A	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-17A	Diplococos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-18A	Diplococos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-19A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
7-20A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-21A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo



Grupo B					
7-1B	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Negativo	Positiva	Negativo
7-2B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-4B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-5B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-6B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-7B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-8B	Ausencia	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-9B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-10B	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
7-11B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-12B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-13B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
7-14B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-16B	Ausencia	-	-	-	-
7-19B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-22B	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
7-5C	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Positiva

Fuente: Registro de laboratorio



Octavo Ciclo

Código	Tinción de Gram (Frotis Directo)	Pruebas Químicas			
		Catalasa		Coagulasa	
		Fosas Nasales		Fosas Nasales	
		Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
Grupo A					
8-2A	Cocos Gram +	Ausencia	Positiva	Ausencia	Negativo
8-3A	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Negativo	Positiva
8-4A	Diplococos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
8-5A	Diplococos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
8-6A	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
8-7A	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
8-8A	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
8-9A	Ausencia	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
8-12A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
8-15A	Diplococos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Positiva
8-18A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
8-26A	Diplococos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
Grupo B					
8-1B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
8-2B	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Negativo	Positiva
8-3B	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
8-4B	Ausencia	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
8-6B	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
8-7C	Cocos Gram + en	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo



	racimos				
8-7B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
8-8B	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
8-9B	Cocos Gram +	Negativo	Positiva	Negativo	Negativo
8-11B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
8-13B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
8-14B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
8-15B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
8-16B	Diplococos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo

Fuente: Registro de laboratorio

Noveno Ciclo

Código	Tinción de Gram (Frotis Directo)	Pruebas Químicas			
		Catalasa		Coagulasa	
		Fosas Nasales		Fosas Nasales	
		Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
Grupo A					
9-4A	Diplococos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Positiva
9-6A	Diplococos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
9-9A	Cocos Gram +	Positiva	Negativo	Positiva	Negativo
9-12A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
9-13A	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
9-15A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Grupo B					
9-5B	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Negativo	Positiva
9-6B	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
9-7B	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
9-8B	Cocos Gram +	-	Positiva	-	Negativo
9-9B	Diplococos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo

Fuente: Registro de laboratorio



Décimo Ciclo

Código	Tinción de Gram (Frotis Directo)	Pruebas Químicas			
		Catalasa		Coagulasa	
		Fosas Nasales		Fosas Nasales	
		Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
Grupo A					
10-4A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
10-7A	Ausencia	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
10-9A	Cocos Gram +	Positiva	Ausencia	Negativo	Ausencia
10-10A	Bacilos Gram -, Cocos Gram +, Diplococos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
10-12A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
10-15A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
10-22A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
10-23A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
10-30A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva

Fuente: Registro de laboratorio

Décimo Primer Ciclo

Código	Tinción de Gram (Frotis Directo)	Pruebas Químicas			
		Catalasa		Coagulasa	
		Fosas Nasales		Fosas Nasales	
		Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
Grupo A					
11-13A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
11-14A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Positiva
11-17A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
11-24A	Cocos Gram +	Positiva	Ausencia	Positiva	Ausencia
11-29A	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
11-30A	Diplococos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
11-31A	Ausencia	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo


Fuente: Registro de laboratorio



Egresados

Código	Tinción de Gram (Frotis Directo)	Pruebas Químicas			
		Catalasa		Coagulasa	
		Fosas Nasales		Fosas Nasales	
		Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
E-1	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
E-2	Cocos Gram +	Positiva	-	Positiva	Negativo
E-3	Diplococos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Negativo
E-4	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
E-5	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
E-6	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
E-7	Cocos Gram + en racimos	Positiva	Ausencia	Negativo	Negativo
E-8	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
E-9	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Positiva	Negativo
E-10	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
E-11	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo
E-12	Cocos Gram +	Positiva	Positiva	Negativo	Negativo

Fuente: Registro de laboratorio

 Muestras positivas para *Staphylococcus aureus*.



PRUEBAS DE SENSIBILIDAD PARA SAMR

Código	Fosa Nasal	Penicilina (mm)	Cefoxitina (mm)	Resultados
7-13B	Izquierda	9	16	SAMR
	Derecha	9	15	SAMR
8-15B	Izquierda	10	26	Sensible
	Derecha	6	19	SAMR
7-10B	Izquierda	14	24	Sensible
	Derecha	13	22	Sensible
7-3A	Izquierda	16	25	Sensible
	Derecha	15	25	Sensible
7-19A	Izquierda	41	22	Sensible
	Derecha	8	8	SAMR
7-5C	Derecha	10	26	Sensible
7-15A	Izquierda	19	28	Sensible
7-1B	Izquierda	16	21	SAMR
8-3A	Derecha	15	26	Sensible
8-5A	Izquierda	10	10	SAMR
	Derecha	13	13	SAMR
8-2B	Derecha	29	32	Sensible
8-7B	Izquierda	11	31	Sensible
	Derecha	8	26	Sensible
8-14B	Izquierda	12	28	Sensible
	Derecha	12	20	SAMR
8-15A	Derecha	11	26	Sensible
9-5B	Derecha	17	18	SAMR
9-12A	Izquierda	21	23	Sensible
	Derecha	37	25	Sensible
9-4A	Derecha	19	20	SAMR
9-9A	Izquierda	34	25	Sensible
9-7B	Izquierda	15	26	Sensible



	Derecha	28	25	Sensible
9-15A	Izquierda	14	30	Sensible
	Derecha	13	26	Sensible
10-4A	Izquierda	11	26	Sensible
	Derecha	13	27	Sensible
10-30A	Izquierda	13	26	Sensible
	Derecha	12	25	Sensible
11-14A	Derecha	13	18	SAMR
11-24A	Izquierda	17	30	Sensible
E-1	Izquierda	11	24	Sensible
	Derecha	15	24	Sensible
E-2	Izquierda	12	23	Sensible
E-3	Izquierda	21	35	Sensible
E-6	Izquierda	13	23	Sensible
	Derecha	11	22	Sensible
E-9	Izquierda	13	13	SAMR

Fuente: Registro de laboratorio

■ Portadores nasales para *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR)