

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA MENCIÓN MICROBIOLOGIA**



**PREVALENCIA DE PORTADORES NASALES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN  
EL PERSONAL DE LIMPIEZA DEL HOSPITAL OBRERO N° 1 DE LA CIUDAD DE  
LA PAZ DURANTE LA GESTION 2005**

**ELABORADO POR : Univ. Olfa Zulema Sarmiento Quispe.**

**ASESOR: Msc. Dr. Juan Edgar Callisaya Huahuamullo**

**Tesina de Pre- Grado para optar al Grado de Licenciatura en Bioquímica**

**LA PAZ BOLIVIA**

**2005**

## TABLA DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	MARCO TEORICO .....	3
	A. Generalidades.....	3
	B. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
	1. Morfología Microscópica.....	3
	2. Características .....	3
	3. Metabolismo.....	4
	4. Comportamiento ante agentes físicos.....	4
	C. Estructura.....	4
	1. Pared Celular.....	4
	2. Membrana Celular.....	5
	3. Cápsula.....	6
	D. Productos Extractable.....	6
	1. Toxinas.....	6
	2. Enzimas.....	7
	E. Mecanismos de Defensa.....	8
	1. Barrera cutánea.....	8
	2. Reacción Inflamatoria.....	9
	3. Fagocitosis.....	9
	F. Patogenia.....	10
	G. Infección causada por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
	1. Infecciones superficiales .....	11
	2. Infecciones Profundas .....	11
	3. Focos Metastásicos .....	11
	4. Endocarditis aguda .....	11
	5. Osteomielitis .....	12
	6. Neumonía .....	12
	H. <i>Staphylococcus aureus</i> como Patógeno Hospitalario .....	12
	1. <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente (SARM) ..	13
	I. Estafilococos coagulasa negativa .....	14
	1. <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	16
	2. <i>Staphylococcus saprophyticus</i> .....	17

J.	Antimicrobianos .....	17
	1. Sulfamidas.....	17
	2. Penicilinas.....	18
	3. Cefalosporinas.....	19
	4. Aminoglicosidos.....	21
	5. Quinolonas.....	22
	6. Tetraciclinas .....	22
	7. Cloranfenicol .....	23
	8. Macrólidos .....	23
	9. Glucopeptidos.....	24
	10. Rifampicina.....	24
K.	Diagnóstico de Laboratorio .....	24
	1. Muestra .....	24
	2. Frotis .....	24
	3. Cultivo .....	25
	4. Prueba de la Catalasa .....	25
	5. Prueba de la Coagulasa .....	26
	6. Fermentación del manitol .....	26
	7. Prueba de la DNAasa .....	27
L.	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.....	27
	1. Ensayo de difusión en disco.....	28
	2. Método base de dilución en caldo.....	32
	3. Prueba en agar (test Screening).....	33
III.	ANTECEDENTES .....	34
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	37
V.	JUSTIFICACIÓN .....	38
VI.	OBJETIVOS .....	39
	A. Objetivo General.....	39
	B. Objetivos Específicos .....	39
VII.	DISEÑO METODOLOGICO .....	40
	A. Tipo de Investigación .....	40
	B. Universo .....	40
	C. Materiales .....	40
	D. Equipos .....	40

E. Reactivos .....	41
F. Métodos .....	41
1. Toma de Muestra .....	41
2. Frotis y Tinción Gram .....	42
G. Cultivo.....	42
1. Cultivo e Identificación .....	42
H. Antibiograma.....	45
I. Prueba de susceptibilidad a la oxacilina .....	47
VIII. RESULTADOS .....	49
IX. DISCUSIÓN .....	53
X. CONCLUSIONES .....	56

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

## INDICE DE TABLAS

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINAS</b>
<b>TABLA N° 1</b>	
Frecuencia de portacion nasal de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	50
<b>TABLA N° 2</b>	
Perfil de resistencia de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	51

## INDICE DE GRAFICAS

<b>GRAFICA N° 1</b>	
Prevalencia de portadores nasales de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	49
<b>GRAFICA N° 2</b>	
Frecuencia de portacion nasal de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	50
<b>GRAFICA N° 3</b>	
Perfil de resistencia de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	51
<b>GRAFICA N° 4</b>	
Porcentaje de sensibilidad antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	52

## RESUMEN

En la actualidad el género *Staphylococcus* y, en especial, la especie tipo *Staphylococcus aureus* tiene una alta incidencia como agente de infección, tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. Es la primera como agente de infecciones, desde superficiales como el forúnculo, a profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. A nivel intrahospitalario se destaca como primer agente de infección de heridas operatorias y de prótesis. Además cabe destacar la gran capacidad de adaptación y supervivencia de esta bacteria, su aumento progresivo de resistencia a los antimicrobianos, en especial en el medio hospitalario, que plantea serios problemas epidemiológicos y terapéuticos. Desde el punto de vista de sus factores de virulencia, tanto bioquímicos como estructurales, se lo puede definir como un "patógeno perfecto", magníficamente equipado para colonizar, invadir, diseminarse y causar enfermedad grave. No obstante, normalmente convive en armonía con el huésped humano o animal, formando parte de su flora sin causar daño. Inclusive en algunos casos se encuentran personas sanas pesadamente colonizadas, definiéndose como "portadores" y pudiendo en ocasiones ser reservorio y fuente de infección.

El *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (*SARM*) es un microorganismo resistente a diferentes antibióticos además tiene la capacidad de sobrevivir a condiciones ambientales adversas como al calor, y la desecación, colonizan con mayor frecuencia al personal de salud, llegando a desarrollarse Infecciones Intrahospitalarias tal como se reporta en nuestro centro, por ello se plantea una investigación descriptiva, longitudinal y prospectiva con el propósito de realizar la determinación de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* en el personal de Salud del Hospital Obrero N°1 de la Ciudad de La Paz, de manera que permita conocer la prevalencia de portación en el personal de salud manuales de limpieza y así establecer los posible focos de infección y tomar medidas preventivas dirigidos a reducir los riesgos de infección intrahospitalaria

El Universo estuvo constituida por 36 personas, trabajadores manuales del Hospital personal de salud. La variables que se manejaron fueron: servicio (cirugía, traumatología, terapia intensiva, urología y limpieza externa), y el perfil de sensibilidad a los antimicrobianos.

La identificación del microorganismo se realizó de acuerdo a las normas y recomendaciones establecidas por la NCCLS .

## I. INTRODUCCIÓN

El estafilococo es un microorganismos de la flora normal del ser humano; lo que sucede es que las infecciones tienen lugar cuando se debilitan las barreras naturales que les impone el sistema inmunológico. Las variedades principales son los *Staphylococcus aureus*, *epidermidis*, y *saprophyticus*.<sup>1</sup>

El *Staphylococcus aureus* ha comenzado a ser el género más importante en las infecciones hospitalarias siendo un patógeno importante para los humanos, casi toda persona padece algún tipo de infección por este microorganismo durante su vida, que varía en gravedad desde intoxicación alimentaria o infecciones cutáneas menores hasta infecciones graves potencialmente mortales.<sup>2</sup>

Los gérmenes patógenos más frecuentemente asociados a infecciones intrahospitalarias son *Streptococcus hemoliticus*, *Staphylococcus aureus*, cepas de *Escherichia coli* patógeno y otros. Las cepas de *Staphylococcus aureus* metilino resistentes (SARM) se identificaron de forma casi inmediata tras la introducción de la metilina en terapéutica. La variabilidad de *Staphylococcus aureus*, en su rápida respuesta adaptativa frente a cambios del medio, y su continua adquisición de determinantes de resistencia antibiótica, han hecho de éste un residente habitual del hábitat hospitalario, donde origina problemas de multi-resistencia, ocasionalmente importantes. Aunque el término resistencia a metilina incluye resistencia a derivados  $\beta$ -lactámicos, las cepas de SARM presentan, en general, resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos. A través de diversos mecanismos, estos aislados presentan resistencia al cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, lincosaminas, aminoglucósidos e, incluso, quinolonas, describiéndose cada vez con mayor frecuencia brotes SARM sensibles sólo a los glucopéptidos<sup>3</sup>

La tendencia en los últimos años parece orientarse hacia el mantenimiento de los casos de aislados SARM en hospitales de menos de 500 camas, con un aparente descenso en aquellos de gran tamaño. Algo preocupante es que se detecta un incremento significativo de casos de origen comunitario y principalmente en los trabajadores de salud. Esto, junto con la reciente descripción de cepas SARM con disminución de sensibilidad a los glucopéptidos, que en la práctica significa la pérdida de posibles alternativas terapéuticas, conduce a la necesidad de la

detección y control de este tipo de aislados que, por fortuna, no han sido descritos por el momento en nuestro medio.<sup>3</sup>

El *Staphylococcus aureus*, se encuentra formando parte de la flora normal de la piel y principalmente a nivel de fosas nasales siendo este el reservorio primario de este microorganismo y por tanto representa un factor de riesgo muy importante de infección intrahospitalaria.<sup>4</sup> El grado de portación varia en función a la población estudiada es así que en un estudio realizado en 1997 en un hospital encontró una tasa de portación de 16,8 a 56,1%, en pacientes externos y en pacientes internos fue de 10,2 a 85,0%. Según estos estudios existen grados de portación que pueden ser: persistentes, intermitentes y no portadores.<sup>5</sup> Por otro lado, las manos representan un factor importante en la transmisión de *Staphylococcus aureus* de la piel y mucosas a los pacientes, según investigaciones, el nivel de portación en el personal hospitalario es mayor que en la población en general<sup>5</sup>

El *Staphylococcus aureus* es el patógeno hospitalario mas frecuentemente aislado (21,3%) en el Hospital Obrero después de *Escherichia coli*<sup>6</sup> uropatógeno, a nivel mundial igualmente es considerado un patógeno intrahospitalario frecuente, destacándose principalmente *Staphylococcus aureus* oxacilino resistente, donde aproximadamente el 69% de las cepas son metililino u oxacilino resistentes<sup>5</sup>, en nuestro hospital en el 2005 hubo solo un 35,3% de oxacilino resistencia<sup>6</sup>.

## II. MARCO TEORICO

### A. GENERALIDADES

La Familia *Micrococcaceae* comprende cocos Gram positivos, no exigentes, catalasa positivos, con agrupación en racimos, aerobios o anaerobios facultativos. De los tres géneros que la integran, *Micrococcus*, *Planococcus* y *Staphylococcus*, este último es el único de importancia médica. Se caracteriza por ser aerobio anaerobio facultativo, capaz de fermentar la glucosa en anaerobiosis; poseer ácidos teicoicos en su pared, y ser sensible a la enzima lisostafina. Dentro del género *Staphylococcus* se conocen más de 20 especies, de las cuales *Staphylococcus aureus* es la más importante. Otras especies como *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* son actualmente reconocidas como capaces de actuar como patógenos bajo determinadas circunstancias.<sup>7</sup>

### B. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

**1 . Morfología microscópica** Se ven como cocos Gram positivos, de 0,8 a 1 micra, inmóviles, no esporulados, típicamente agrupados en racimos, aunque en muestras clínicas pueden verse aislados o en diplo o cadenas. <sup>2,7</sup>

#### 2 . Características

- **Requerimientos:** Son no exigentes en lo nutricional, aerobios-anaerobios facultativos en su relación con el O<sub>2</sub>, mesófilos con un amplio rango de tolerancia, y tolerantes a concentraciones medianas de sal (NaCl 7,5%).
- **Morfología:** En medios líquidos, dan un enturbiamiento homogéneo. En medios sólidos, colonias redondas, opacas, de bordes netos, de superficie lisa y brillante, convexas, de 1-2 mm de diámetro, con "olor rancio", consistencia mantecosa y pigmento característico.
- **Pigmento:** Se observa mejor en medios ricos: agar sangre, agar suero coagulado de Loeffler. Las condiciones óptimas para su producción son: aerobiosis y temperatura de 22°C Soluble en cloroformo y solventes orgánicos (alcohol, éter, acetona), e insoluble en agua. Suele perderse en resiembras o por tratamiento con antibióticos.
- **Hemólisis:** En agar sangre se observa un halo de hemólisis completa alrededor de las colonias. Es producido por las hemolisinas estafilocócicas. Estas son cinco, denominadas con las letras griegas alfa, beta, gamma, delta y epsilon, siendo  $\alpha$  la más importante. <sup>7</sup>

### 3. Metabolismo

Es básicamente fermentativo, sin embargo, la presencia de enzimas desdobladoras de peróxidos como la catalasa, le permite desarrollarse en presencia de oxígeno y utilizar la cadena respiratoria como fuente de energía. En anaerobiosis (test de OF) es capaz de utilizar fermentativamente la glucosa (por definición del género *Staphylococcus*) y el manitol (por definición de especie *Staphylococcus aureus*). Fermenta también en general otros azúcares, pero en forma variable, por lo que no se emplean para la clasificación.<sup>7</sup>

### 4. Comportamiento ante agentes físicos y químicos Tiempo de sobrevivencia.

Es muy resistente a las condiciones ambientales normales. A temperatura ambiente, los cultivos pueden sobrevivir hasta 3 meses, y en la estufa hasta 1 mes. En la heladera, se les puede conservar indefinidamente, con repiques cada 2-3 meses.

- **Temperatura:** Tolera un rango de 2 a 55 °C. Por encima de eso, muere en 1 hora a 62°C.
- **Agentes químicos:** Es muy sensible a la mayoría de los antisépticos más comunes, que lo matan en pocos minutos.
- **Tolerancia al Cloruro de Sodio:** La tolerancia al NaCl al 7,5% es característica de *Staphylococcus aureus*, y sirve para hacer medios selectivo diferenciales (medio Chapman).

## C. ESTRUCTURA

### 1. Pared celular

Como en todos los Gram positivos, la pared está formada por una gruesa capa de peptidoglicano, a la que están unidas moléculas de proteínas y otros compuestos. El peptidoglicano es, como sabemos, un polímero formado por un esqueleto glucídico y cadenas tetrapeptídicas que se unen formando una red o malla. En *Staphylococcus aureus* las uniones entre las cadenas tetrapeptídicas están formadas por puentes de pentaglicina que le dan la sensibilidad a la lisostafina característica del género *Staphylococcus*. El rol biológico del Peptidoglicano es mantener la rigidez de la pared bacteriana y su resistencia osmótica. En la patogenia, al parecer coadyuvaría al desencadenamiento de la inflamación por activación del complemento.<sup>8</sup>

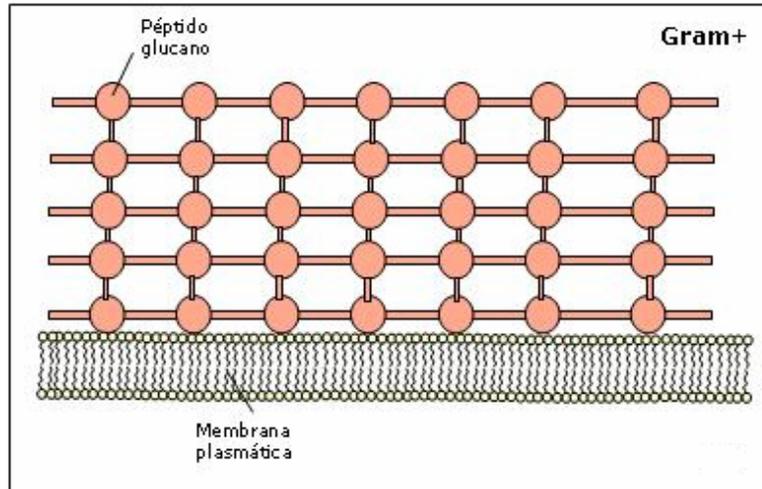


Imagen N°1 Pared Bacteriana Gram (+)

- a. **Ácidos Teicoicos:** Son compuestos característicos del género *Staphylococcus*. Los de *Staphylococcus aureus* son polímeros de ribitol fosfato con sustituyentes D alanina y N acetil glucosamina. Son antígenos especie específicos. Los anticuerpos son positivos en las infecciones profundas, por lo que su determinación puede ser útil en establecer el diagnóstico, el pronóstico, la evolución y la duración del tratamiento. En la patogenia actúan de modo similar a las endotoxinas de los Gram negativos, activando los mecanismos de la inflamación, pudiendo llegar a producir un cuadro de shock séptico.<sup>8</sup>
- b. **Proteína A:** Específica de *Staphylococcus aureus*, esta proteína se encuentra unida al peptidoglicano, haciendo saliencia en la superficie bacteriana. Tiene la propiedad de unirse al segmento Fc de la IgG en forma inespecífica. Esto ha posibilitado una variedad de aplicaciones prácticas en Inmunología, desde técnicas de coagulación hasta purificación de inmunoglobulinas por cromatografía. Inoculada a animales de experimentación, tiene propiedades inflamatorias. Se especula además que podría favorecer la diseminación impidiendo la opsonización y el reconocimiento inmune.<sup>8</sup>
- c. **Clumping factor:** Es otra proteína superficial, antihigiénicamente relacionada con la Proteína A, pero con una función distinta. Como vimos, determina la formación de fibrina sobre la superficie bacteriana, en una reacción importante para el diagnóstico, pero que también tiene implicancias en la patogenia.

## 2. Membrana Celular

Es una estructura trilaminar convencional, cuya capa más externa está parcialmente sustituida por ácidos lipoteicoicos. Estos son compuestos similares a los ácidos teicoicos, es decir,

polímeros de glicerol fosfato, que están unidos por un puente disacárido a un glicolípido. Mientras éste constituye la unión a la membrana, el polímero penetra en la pared y la atraviesa, sobresaliendo en la superficie. En la patogenia, podría cumplir un rol de adherencia.<sup>8</sup>

### 3. Cápsula

Si bien los estafilococos no poseen cápsula visible, se ha determinado que algunas cepas son encapsuladas. Estas cepas son: fagoresistentes, clumping factor negativas, virulentas en el ratón, y con un crecimiento difuso en suero agar blando. La cápsula está compuesta de ácido manosamín urónico y es antigénica, habiéndose determinado 4 serotipos capsulares. Por inmunofluorescencia, es posible además comprobar la presencia de material capsular superficial en un gran porcentaje de cepas. La cápsula por sus propiedades antifagocíticas determina la mayor invasividad de la bacteria.<sup>8</sup>

## D. PRODUCTOS EXTRACELULARES

El *Staphylococcus aureus* es capaz de producir una muy amplia gama de sustancias, la mayoría de las cuales están implicadas en la génesis de la enfermedad. Toxinas de acción local, enterotoxinas, leucocidinas, exotoxinas, y diversas enzimas forman el arsenal de este "bien equipado patógeno".<sup>8</sup>

### 1. Toxinas

- a. **Hemolisinas:** En agar sangre, el *Staphylococcus aureus* produce una hemólisis que es causada por sustancias que lisan los glóbulos rojos, o hemolisinas. Estas son en realidad potentes toxinas citolíticas, que actúan sobre las membranas de muchas células (no sólo los eritrocitos) y causan gran destrucción tisular.



Imagen N°2 Cepas productoras de Hemólisis <sup>10</sup>

- **ALFA** es la más importante, clásicamente conocida por su triple acción: citolítica *in vitro*, dermonecrótica en conejo y letal en ratón. Es una proteína de PM 40000, termolábil. Por desnaturalización se transforma en toxoide, que ha sido empleado como inmunoterapia. Su potente citólisis se debe a la formación de canales o poros en las membranas.
- **BETA** sólo está presente en algunas cepas humanas, siendo más común en las de origen animal. Se caracteriza por dar un doble halo de hemólisis en agar sangre. A diferencia de alfa, actúa sobre las membranas como una fosfolipasa de acción esfingomielinasa.
- **GAMMA** también es una fosfolipasa, pero de acción sobre el fosfatidil inositol. Es termoresistente.
- **DELTA** es escasa y está poco estudiada.

**b. Leucocidina de Pantón Valentine (PV):** ataca los polimorfonucleares y los destruye, interfiriendo así un importante mecanismo de defensa del huésped. Es una proteína oxígeno lábil, que altera la permeabilidad de los PMN.

**c. Enterotoxinas:** Son la causa del Síndrome de intoxicación alimentaria estafilocócica. Son proteínas termoresistentes, y su producción está codificada en plásmidos, en el cromosoma o en fagos temperados. Se conocen 5 tipos antigénicos llamados A, B, C, D, y E, siendo el A el más importante.

**d. Exfoliatinas:** Son verdaderas exotoxinas. Identificadas en 1971 como causa del Síndrome de Piel Escaldada del lactante. Son dos proteínas diferentes antigénicamente, llamadas exfoliatina A (termoestable) y exfoliatina B (termolábil). Solamente las producen los estafilococos del fagotipo II, y dentro de este sólo el 20% de las cepas. En la patogénesis del Síndrome de piel escaldada parece existir una acción sinérgica entre la exfoliatina y la alfa toxina.

**e. Toxina del shock tóxico:** Es otra auténtica exotoxina, que actúa como superantígeno. Es capaz de causar un shock sin bacteriemia, por difusión a partir de un foco.<sup>10</sup>

## 2. Enzimas

**a. Coagulasa:** Enzima específica de *Staphylococcus aureus* y definitoria de esta especie, como ya vimos. Es lógico pensar que sea importante en la patogenia. Se postula que a nivel del foco infeccioso formaría una barrera de fibrina que dificultaría la llegada de los fagocitos, favoreciendo la sobrevivencia del germen. Sin embargo, esto nunca ha podido ser demostrado. El 50% de la población tiene anticuerpos anticoagulasa, pero estos no son protectores.

**b. Desoxirribonucleasa:** la DNAsa termoestable también es específica de *Staphylococcus aureus*, incluso más que la coagulasa. Su papel a nivel de los procesos infecciosos consiste en destruir el ADN de las células muertas, haciendo el pus más fluido.

**c. Lipasas:** También son específicas de *Staphylococcus aureus*: las producen el 96% de las cepas, contra 0% de *Staphylococcus epidermidis*. Se pueden estudiar en agar yema de huevo, donde producen una zona de aclaramiento y otra de opacidad alrededor de las colonias. Son un factor de virulencia importante, al favorecer la diseminación de la infección por los planos adiposos. Hay dos clases de lipasas: trigliceridasas, que dan la reacción de aclaramiento, y fosfolipasas, de las que existen tres: fosfatidil colinesterasa, que da la opacidad; esfingomielinasa, que es la beta hemolisina, e inositol fosfolipasa, la delta hemolisina.

**d. Hialuronidasa:** También es factor de virulencia al licuar el ácido hialurónico, sustancia fundamental de los tejidos conjuntivos, favoreciendo la difusión. No todas las cepas la producen.

**e. Estafilokinasa:** Acción fibrinolítica, antagoniza la coagulasa.

## **E. MECANISMOS DE DEFENSA**

La principal defensa contra la infección estafilocócica son las barreras inespecíficas: la barrera cutánea y los mecanismos de la inflamación, el complemento y la fagocitosis. El sistema inmune interviene muy poco en forma directa, pero los linfocitos sensibilizados interactúan con los monocitos y los PMN, modulando la acción de estos.<sup>7</sup>

### **1. Barrera cutánea**

El estafilococo está ampliamente distribuido en toda la superficie del cuerpo. La integridad de la piel constituye una barrera mecánica fundamental. La piel no sólo impide la entrada de bacterias, sino que por el mecanismo de la descamación las elimina junto con las células superficiales queratinizadas. Por otra parte, la secreción de las glándulas sebáceas y sudoríparas contiene ácidos grasos inhibidores del crecimiento bacteriano.<sup>7</sup>

### **2. La reacción inflamatoria**

Es una respuesta defensiva constitutiva de gran complejidad, con interacción de factores humorales y celulares, que tiende a la destrucción de los microorganismos invasores. Se caracteriza por vasodilatación con aumento del flujo sanguíneo y de la permeabilidad capilar, lo que a su vez facilita el pasaje de líquido, proteínas y leucocitos al intersticio. Todo este proceso es desencadenado y controlado por complejos mecanismos bioquímicos con múltiples

moléculas mediadoras. El resultado final suele ser la fagocitosis de las bacterias y su destrucción.

- a. **Desencadenantes:** el complemento y la coagulación. Los dos grandes sistemas de vigilancia del organismo son activados por la presencia de microorganismos. En el caso de los estafilococos, esta activación es provocada por el ácido teicoico, y probablemente también la proteína A. El complemento se activa por la "vía alternativa". La coagulación lo hace a través del "factor Hageman".
- b. **Mediadores de la inflamación** La activación del complemento produce las anafilotoxinas C3a, C4a y C5a. Estas estimulan la liberación de histamina de los mastocitos. La activación de la coagulación produce calicreinas, enzimas que clivan los quinínógenos para producir quininas, en especial bradiquinina. La histamina y la bradiquinina actúan directamente sobre los vasos para producir vasodilatación e hiperpermeabilidad. Otros mediadores son las prostaglandinas y los leucotrienos.
- c. **El control del proceso** Las citoquinas secretadas por macrófagos y linfocitos (interleukinas, interferones, factor de necrosis tumoral) juegan un rol importante y complejo en el sostén y la regulación del proceso inflamatorio.<sup>7</sup>

### 3. Fagocitosis

Todos los fenómenos inflamatorios tienden a facilitar que los neutrófilos fagociten y destruyan a las bacterias. Esta es precisamente la principal defensa contra agentes invasores como el estafilococo. La fagocitosis presenta varias etapas:

- a. **Quimiotaxis** El primer paso es la atracción de los neutrófilos y monocitos al foco infeccioso. Las sustancias que hacen esto se denominan quimiotaxinas. Tienen diverso origen: C5a, producto de la activación del complemento; la interleukina 8, de los macrófagos; los leucotrienos, y el producto de la síntesis proteica bacteriana N-formil metionina.
- b. **Opsonización** A continuación, los fagocitos necesitan sustancias que faciliten la unión entre su superficie y la superficie bacteriana, paso previo a la fagocitosis. Las opsoninas cumplen esta función. La principal opsonina es el péptido C3b. Los neutrófilos poseen receptores para C3b en su superficie. También los anticuerpos pueden opsonizar.

- c. **Adhesión a células endoteliales** Quimiotaxinas y opsoninas actúan además en un paso previo muy importante, el cambio de las propiedades superficiales de los leucocitos y células endoteliales que los vuelve pegajosos entre sí. Esta adherencia permite que los leucocitos atraviesen luego el endotelio y migren hacia el foco.
- d. **Digestión intracelular** La bacteria una vez fagocitada es englobada en una vesícula llamada fagosoma, a la cual se van a unir los lisosomas formando el fagolisosoma. Los lisosomas aportan dos tipos de gránulos: específicos y azurófilos. Ambos actúan en dos mecanismos de destrucción bacteriana: O<sub>2</sub> dependiente y O<sub>2</sub> independiente. La destrucción O<sub>2</sub> dependiente es el principal mecanismo de destrucción de las bacterias Gram positivas como el estafilococo. Consiste en un estallido de metabolismo oxidativo que produce peróxido de hidrógeno que es tóxico sobre las bacterias. <sup>7</sup>

## F. PATOGENIA

En general la infección estafilocócica progresa según una secuencia determinada, aunque esto no es obligatorio. <sup>2</sup>

- La colonización es el paso previo indispensable. Puede preceder a la infección en apenas horas (infección exógena) o en años (infección endógena).
- La puerta de entrada generalmente cutánea.
- Infección superficial (forúnculo, impétigo, etc.).
- Tromboflebitis séptica.
- Invasión del torrente sanguíneo.
- Focos profundos: endocarditis, osteomielitis.
- Bacteriemia.
- Focos metastáticos parenquimatosos: pulmonar, renal, cerebral.
- Shock séptico. Fallas de grandes sistemas
- Muerte.

Esta secuencia se puede detener a nivel de cualquiera de sus pasos. La progresión a las formas más graves depende de la importancia del foco inicial, del estado del huésped, y del tratamiento. Por otro lado, también se puede obviar alguna etapa. Por ejemplo, en la sepsis por catéter, puede haber inoculación bacteriana directa al torrente sanguíneo, sin infección superficial ni tromboflebitis séptica. <sup>2</sup>

## G. INFECCIONES CAUSADAS POR EL ESTAFILOCOCO

### 1. Infecciones superficiales

Son como vimos el primer paso en la invasión del organismo, por lo mismo son lejos las más frecuentes, y la mayoría de las veces son autolimitadas, no prosiguiendo la secuencia patogénica más allá.<sup>9</sup>

#### Cutáneas:

- 1) **Forúnculo:** infección del folículo piloso o las glándulas sebáceas.
- 2) **Impétigo:** lesiones costrosas, amarillentas.
- 3) **Panadizo:** A nivel látero subungueal.
- 4) **Mucosas:** Conjuntivitis, otitis, sinusitis.
- 5) **Subcutáneas:** Hidrosadenitis: infección de las glándulas sudoríparas.

### 2. Infecciones profundas

Representan la progresión natural de la infección a partir de focos superficiales. El correcto tratamiento de estos las previene.

- 1) **Tenosinovitis:** Infección de tendones y vainas sinoviales.
- 2) **Fascitis:** Infección de las fascias aponeuróticas.
- 3) **Flemones:** Infección por decolamiento de los espacios del tejido celular.

### 3. Focos metastásicos

Una vez en el torrente sanguíneo, los estafilococos pueden ir a establecerse en cualquier órgano profundo. Tenemos así endocarditis, neumonía, osteomielitis, artritis, y abscesos parenquimatosos, en especial a nivel renal y cerebral.

### 4. Endocarditis aguda

Es la infección más grave causada por *Staphylococcus aureus*, con alta mortalidad, frecuentes complicaciones y problemático tratamiento. Consiste en la invasión del endocardio de las válvulas cardíacas, con formación de verrucosidades por depósito de fibrina y plaquetas. *Staphylococcus aureus* es el 1er agente de la forma aguda, con rápido progreso hacia la destrucción valvular. Puede atacar válvulas sanas, aunque cualquier alteración valvular preexistente constituye un predisponente. Es frecuente y característica en drogadictos intravenosos, asentándose casi siempre en la tricúspide. Sin embargo, en estos pacientes el cuadro suele ser menos dramático que en los no drogadictos, en los que afecta sobre todo válvulas izquierdas, con una evolución fulminante y una mortalidad del 40 al 80% según edad.

La complicación más temible es el shock cardiogénico por falla valvular aguda. Con frecuencia es necesario un recambio valvular de urgencia para prevenirlo. Otras complicaciones son los abscesos metastásicos parenquimatosos, el shock séptico, y el tromboembolismo pulmonar en el caso de endocarditis tricuspídea.<sup>9</sup>

### **5. Osteomielitis**

Infección a nivel de los huesos largos, por microembolias sépticas desde un foco primario aparente o no. Predomina en lactantes, se ve también en niños, mucho menos en adultos. Puede tener dos formas clínicas, aguda o crónica. En la primera predomina la inflamación y la fiebre, en la segunda el cuadro tórpido, con recidivas y fistulización.<sup>9</sup>

### **6. Neumonía**

Puede producirse por tres mecanismos: Vía aérea, generalmente post viral. Metastática, a partir de un foco infeccioso. Por aspiración de contenido bucal (alcohólicos, epilépticos). Es característico de este agente la formación del neumatocele, cavidad insuflada de paredes finas, que puede romperse y dar neumotórax, empiema y/o pnoneumotórax.

## **H. STAPHYLOCOCCUS AUREUS COMO PATÓGENO INTRAHOSPITALARIO**

La OMS define una infección intranosocomial o intrahospitalaria como aquella que se produce durante la internación, o después del alta hasta 1 semana. Algunos autores precisan que sólo se debe considerar como tal si se produce 72 horas después del ingreso sin estar relacionada con la patología que ocasionó el mismo, o bien antes de este período relacionada con una instrumentación hecha durante el ingreso.<sup>15</sup>

El *Staphylococcus aureus* es reconocido como agente de infección intrahospitalaria. Según las estadísticas, ocupa el 2º lugar, después de *E. coli* y antes que *Pseudomonas aeruginosa*. En un estudio de 83 bacteriemias por *Staphylococcus aureus*, se definieron 42 (51%) como de adquisición intrahospitalaria. La infección es en la mayoría de los casos al nivel de la herida quirúrgica o de un catéter intravenoso. Muchas veces la infección inicial se complica con bacteriemia, que puede llevar a la producción de metástasis sépticas, y en una evolución más grave aún, fallas de los grandes sistemas del organismo y shock. La mortalidad en estos casos es muy alta. Vemos aquí una vez más que el factor determinante de la infección es la producción, en este caso iatrogénica, de una solución de continuidad en la barrera cutánea, la cual es abierta (herida quirúrgica) o bypaseada directamente llevando la infección a la sangre (catéter).

Sin embargo, a nivel hospitalario otros factores de riesgo se añaden para hacer más complicada la situación:<sup>15</sup>

- Pacientes debilitados por su enfermedad de fondo, y además agredidos por tratamientos invasores.
- Frecuentemente sometidos a medicaciones inmunosupresoras (cáncer, trasplantes).
- Uso intensivo de antibióticos que suprime en pocos días la flora normal "extrahospitalaria" del paciente (barrera natural de defensa contra patógenos).
- Existencia de una flora "intrahospitalaria" en pacientes y personal, caracterizada por gérmenes inhabituales, o comunes pero con características inhabituales, por ej. resistencia aumentada a antibióticos.
- Frecuente inobservancia de los cuidados mínimos para evitar la transmisión cruzada de *Staphylococcus aureus* (u otros agentes) de pacientes infectados a otros no infectados. El vehículo más habitual son las manos del personal tratante.

Los servicios más afectados son los de Cirugía y Cuidados Intensivos, en menor medida los de Medicina, en especial Hematología y Oncología. El tratamiento es muchas veces difícil, tanto por la pobre condición del paciente, como por la resistencia del agente. Es frecuente la presencia de *Staphylococcus aureus* metilino resistente, con resistencia a múltiples antibióticos.

De los factores determinantes, es imposible actuar sobre algunos de ellos, como la condición del paciente, o los tratamientos invasores o inmunosupresores imprescindibles. Tampoco es efectivo tratar de erradicar los reservorios de la infección, ya que como vimos la "flora intrahospitalaria" está ampliamente extendida. La medida más importante es cortar la transmisión cruzada, y ello se logra fundamentalmente en base al Lavado de manos.

### **1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINA RESISTENTE (SAMR)**

El *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos aislado más frecuentemente en el laboratorio de microbiología a partir de muestras clínicas y es la principal especie patógena de su género. *Staphylococcus aureus* causa infecciones tanto de origen comunitario como intrahospitalario. Actualmente, su interés se debe a su elevada frecuencia de aislamiento y cepas resistentes a metilina (SAMR), una de las causas principales de brotes de infección intrahospitalario. Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilina aparecieron de forma casi inmediata tras la introducción de la misma en el campo terapéutico. Los primeros brotes de infección intrahospitalario por estas cepas fueron descritos a principios de los años sesenta en distintos hospitales europeos. A partir de entonces, su prevalencia ha ido creciendo, causando un verdadero problema epidemiológico en los hospitales. Los SAMR tienen resistencia a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos pero además, en general, presentan

resistencias a otros grupos de antibióticos a través de diferentes mecanismos de acción. Estos antibióticos son: cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos e, incluso, quinolonas. Las técnicas de detección de estos SAMR deben tener una alta sensibilidad y especificidad y ser de detección rápida. Actualmente, existen medios cromogénicos selectivos para detectar SAMR en un solo paso. SAMR presentan, como mínimo, tres mecanismos de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos: producción de  $\beta$ -lactamasa, fenómeno de tolerancia y resistencia por proteínas fijadoras de penicilina (PBP), conocida como resistencia intrínseca a meticilina. Las penicilinas resistentes a penicilasa (oxacilina, meticilina, cloxacilina, etc.) y las cefalosporinas, poseen una estructura molecular que las protege frente a la acción de la  $\beta$ -lactamasa. Sin embargo, el género *Staphylococcus* ha desarrollado mecanismos de resistencia a estos antimicrobianos por la síntesis de una nueva PBP (PBP2a) de 78 KDa con baja afinidad por la meticilina y por el resto de  $\beta$ -lactámicos y con actividad transpeptidasa. En presencia de estos antibióticos, todas las PBP de *Staphylococcus aureus* están inhibidas a excepción de la PBP2a, que sería responsable de seguir adelante con la síntesis de la pared celular bacteriana. El determinante genético de esta proteína es de naturaleza cromosómica (gen *mec*). Este gen contiene *loci* distintos, el *mecA*, que codificaría la PBP2a, y el *mecR* o gen regulador. Las cepas SAMR con resistencia intrínseca a la meticilina poseerían los marcadores *mecA* y PBP2a.<sup>15</sup>

#### **a. Métodos para la detección de resistencia a la meticilina**

El *Staphylococcus aureus* crece en los medios convencionales de cultivo (agar sangre y agar chocolate) tras 18-24 horas de incubación como unas colonias redondeadas de color blanco-amarillento y con  $\beta$ -hemólisis en medios con sangre. Son cocos gram-positivos catalasa y coagulasa positivos. El método de referencia es el antibiograma, según las normas NCCLS, en agar Mueller-Hinton (difusión disco-placa) con una suspensión de colonias equivalente a 0,5 de McFarland. Se incuba a 33-35 °C durante 16-18 horas, y 24 horas para oxacilina, meticilina, nafcilina y vancomicina. Se considera que *Staphylococcus aureus* es sensible a la oxacilina cuando el halo de inhibición es mayor de 13 mm para un disco de oxacilina de 1  $\mu$ g. El estudio de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) mediante prueba de E-test con tira de oxacilina es una alternativa válida en los casos de duda, con una eficacia diagnóstica similar a la del método de referencia de dilución en agar hipersalino, a concentración crítica de 6  $\mu$ g/ml de oxacilina. Estos métodos convencionales de detección de SAMR no son suficientemente sensibles. Diferentes estudios muestran que, para confirmar los SAMR, es preferible detectar directamente el gen codificador de la resistencia a meticilina (*mecA*) o bien su producto de

expresión (proteína PBP2a). Precisamente, es la detección del gen *mecA* por métodos de amplificación mediante PCR, un método relativamente rápido y eficaz, pero no disponible en la mayoría de laboratorios clínicos. Este método poseería la ventaja de no estar sujeto a las condiciones del crecimiento de la cepa, pudiendo aplicarse a gran número de aislados y podría ser aconsejable en casos de duda con valores de CMI cercanos al límite. También se pueden utilizar para la detección de SAMR métodos de hibridación in situ. Son métodos caros cuyos resultados se obtienen en 90 minutos.<sup>15</sup>

Existe una prueba rápida de aglutinación de partículas de látex que permite la detección de SAMR poniendo de manifiesto la PBP2a. Las partículas de látex sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra PBP2a reaccionan después de una extracción específica de la PBP2a presente en los SAMR dando una aglutinación visible a simple vista. Es un test simple, barato y rápido (15 minutos). Hay un test en el mercado que usa un fluoróforo sensible al oxígeno. Se basa en el uso de un indicador fluorescente sensible ante la presencia de oxígeno disuelto en el caldo. Sin embargo, si hay crecimiento de microorganismos, éstos consumen el oxígeno presente en el caldo y la fluorescencia no se detecta. Si se incorpora oxacilina en el caldo se puede distinguir entre *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina y resistente a la meticilina. Si hay crecimiento hay un SAMR y consume el oxígeno presente evitando así la observación de fluorescencia. Necesita cuatro horas para completarse. La detección de SAMR en muestras clínicas mediante medios de cultivo convencionales como el agar sangre es complicado. La mayoría de las veces las muestras proceden de sitios no estériles y en estos medios crecen distintos microorganismos siendo necesarios test confirmatorios para diferenciar *Staphylococcus aureus* de otros estafilococos. Recientemente, han salido al mercado nuevos medios de cultivo cromogénicos para la detección rápida y sencilla de SAMR. Estos medios simplifican el cribado de pacientes mediante la detección directa de SAMR en una placa en 18-24 horas sin necesidad de ninguna prueba adicional. De este modo se consigue una detección, control y aislamiento del paciente más rápido. Además, estos medios proporcionan una lectura sencilla, pues simplemente consiste en ver el color de la colonia. Entre estos medios se encuentra: CHROMagar *Staphylococcus aureus* es un medio en el que tras la adición de oxacilina (4 µg/ml) al medio cromogénico se inhibe el crecimiento de todos los estafilococos meticilina-sensibles. Las colonias aparecen de color rosa-rojo. Los estafilococos coagulasa negativos resistentes a la meticilina aparecen como colonias de color rosa pálido o crema, distinguiéndose de los SAMR. Según estudios realizados su sensibilidad tras 24 horas de incubación es del 95,4%. ORSAB es un medio modificado de MSA (manitol-

salt-agar), se le adiciona oxacilina y polimixina B siendo así más selectivo (inhibe el crecimiento de microorganismos). Se ha adicionado azul de anilina como indicador de pH, de este modo las colonias manitol positivas (colonias de *Staphylococcus aureus*, ya que esta bacteria tiene la capacidad de fermentar el manitol) se ven de color azul. MRSA ID permite una identificación directa de colonias de SAMR basada en la coloración verde espontánea de las colonias productoras de  $\alpha$ -glucosidasa. La cantidad de cefoxitina añadida es de 4 mg/litro. Los MRSA crecen mejor en presencia de cefoxitina que de oxacilina, lo cual puede ser porque la cefoxitina aumenta la inducción de la PBP2a. El medio es altamente selectivo, evita el crecimiento de otras de bacterias y levaduras. Tras 48 horas de incubación las colonias de estafilococos coagulasa negativos pueden aparecer con coloración verde pálido, pero se distinguen bien de los SAMR porque estos presentan una coloración verde intensa. Este medio de cultivo es un medio efectivo, según estudios realizados, incluso cuando el inóculo es pequeño. La especificidad tras 24 horas de incubación es del 99,5% y su sensibilidad del 80%, aumentando hasta el 89% tras 48 horas de incubación.

#### **b. Mecanismo de resistencia**

Todos los  $\beta$ -lactámicos actúan sobre proteínas de la pared llamadas "proteínas fijadoras de penicilina" (PFP, o en inglés PBP). La resistencia consiste en una mutación a nivel cromosómico, que determina la síntesis de una PBP anómala, la PBP2a, por la cual los  $\beta$ -lactámicos tienen menor afinidad que por las PBP "normales".<sup>15</sup>

### **I. ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS**

#### **1. *Staphylococcus epidermidis***

Se caracteriza por ser coagulasa y DNAsa negativo y Novobiocina sensible. También es egativo para otras enzimas, propias de *Staphylococcus aureus* como lipasas, hialuronidasa, etc. No fermenta el manitol ni tolera el cloruro de sodio. Posee una hemolisina diferente de las de *Staphylococcus aureus*, llamada "épsilon." Estructuralmente, su pared se caracteriza por tener ácido glicerol teicoico (en vez de ribitol teicoico) y carecer de Proteína A. Su sensibilidad a antimicrobianos es similar a la de *Staphylococcus aureus*, con producción de  $\beta$ -lactamasas, y cepas meticilino resistentes (bastante más extendidas que en *Staphylococcus aureus*). Es un habitante normal de la flora basal de piel y mucosas, y sólo en situaciones muy especiales puede causar infección. Estas son siempre intrahospitalarias. Las más comunes son las colonizaciones de catéteres. La incidencia es similar a la de *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus epidermidis* posee una propiedad que le facilita este tipo de colonización: la

producción de SLIME o limo extracelular, un polímero mucopolisacárido de composición similar a la de una cápsula, pero de estructura amorfa, formando un "barro" que adhiere al catéter y envuelve las bacterias. Cumple pues una doble función, de adherencia y antifagocítica. También las prótesis valvulares y articulares suelen presentar infecciones por este agente, por la misma razón.<sup>16</sup>

## **2. *Staphylococcus saprophyticus***

Se diferencia de otros coagulasa negativos por ser Novobiocina resistente, además de presentar un pigmento amarillo anaranjado característico (en cultivos de varios días). Es un patógeno primario a nivel urinario, siendo el segundo agente de infección urinaria en la mujer joven, después de *Escherichia coli*. A diferencia de otros estafilococos, es muy sensible a antibióticos.<sup>16</sup>

## **J. ANTIMICROBIANOS**

### **1. SULFAMIDAS**

Las sulfamidas son antibióticos bacteriostáticos sintéticos de amplio espectro. Son eficaces contra la mayoría de las bacterias gram positivas y contra muchas gram negativas. A lo largo de las últimas décadas las bacterias han desarrollado amplios mecanismos de defensa contra las sulfamidas, lo cual ha llevado a que sean usadas en casos concretos, como ser infecciones en la vía urinaria, cepas de meningococos, neumococos, estreptococos y toxoplasmosis.

Las sulfamidas son una gran familia, y se las obtiene por la adición de un radical en sustitución de un hidrógeno de la sulfanilamida, por ejemplo:

- Adición de piridina - SULFAPIRIDINA
- Adición de tiazol - SULFATIAZOL
- Adición de pirimidina - SULFADIAZINA
- Adición de guanidina - SULFAGUANIDINA

Además, la sustitución de un grupo amino de la sulfanilamida proporciona ventajas tales como:

- Disminución de la toxicidad hacia el organismo hospedador.
- Aumento de la solubilidad en agua.
- Aumento de la solubilidad intestinal del fármaco, lo que permite su administración por vía oral.
- Mayor persistencia en el organismo al hacerse más lenta la tasa de excreción. Esto permite la aplicación de dosis menores.<sup>11</sup>

### **a. Modo de acción**

La sulfamida es un análogo del *Ácido para-amino benzoico (PABA)* y actúa como un inhibidor competitivo por el acceso a la enzima *Dihidropteroil sintetasa*. Esta enzima cataliza la reacción en la que se condensan el *PABA* y el *2-Amino 4-Hidroxi 6-Hidroximetil dihidropteroil pirofosfato* para formar *Ácido dihidropteroico*, un producto intermedio de la síntesis del *Ácido tetrafólico (HTF)*, que a la postre origina el *Ácido fólico*.<sup>11</sup>

## **2. PENICILINAS**

Son los primeros antibióticos naturales descubiertos. Son una gran familia que presenta como rasgo común la presencia de un anillo de ácido 6-Amino penicilánico, logrado por la condensación de la L-Cisteína y la L-Valina. La primera penicilina descubierta (penicilina G o benzil-penicilina) tenía muchas limitaciones:

- Espectro de acción reducido. Sólo era efectiva contra estreptococos del grupo A y cocos gram positivos, pero era ineficaz con bacterias gram negativas.
- Demasiado sensible a los ácidos, y se destruía en su pasaje por el estómago, por lo que se hacía imposible su administración por vía oral.
- Era susceptible de ser destruida por las penicilinasas producidas por ciertos grupos de bacterias.
- Se eliminaba demasiado rápido a través de la orina.
- Provocaba hipersensibilidad.

Posteriormente esta penicilina primitiva pudo ser modificada por la sustitución de diferentes elementos de la molécula de penicilina, obteniéndose como resultado:

- Mayor resistencia al pH ácido, lo cual hizo posible su administración por vía oral.
- Mayor espectro de acción.
- Aumento de la resistencia a la penicilinasas.
- Mayor persistencia en el suero sanguíneo y demás fluidos corporales.

### **a. Modo de acción**

Los antibióticos Beta-lactámicos (dentro de los cuales se incluye la familia de las penicilinas) destruyen bacterias sensibles. Actúan sobre la pared de la bacteria. Dicha pared es esencial para la proliferación y el desarrollo del microorganismo. Los peptidoglucanos son componentes heteropoliméricos de la pared, y le confieren estabilidad mecánica y rigidez, gracias a su entramado con innumerables entrecruzamientos (puentes intercatenarios). Las bacterias gram positivas tienen entre 50 y 100 capas de peptidoglucanos en su pared, en tanto que las gram

negativas poseen una pared de tan sólo 2 peptidoglucanos de espesor. La síntesis de los peptidoglucanos puede dividirse en tres etapas:

- Formación de precursores de peptidoglucanos en el citoplasma bacteriano.
- Unión de grupos con Uridina Tri Fosfato (UDP), liberación de los nucleótidos de Uridina y formación de polímeros largos, por ensamblaje de los precursores entre sí.
- Finalización de los puentes intercatenarios.

En este último punto es que actúa la penicilina. Funciona como un inhibidor competitivo de la D-Alanil D-Alanina, uno de los últimos compuestos en sufrir transpeptidación en la síntesis de los peptidoglucanos. La penicilina se une a la enzima transpeptidasa y le provoca un cambio de conformación: la enzima pierde su forma cíclica y deja de ser funcional. De este modo la penicilina inhibe la formación de peptidoglucanos. Es por esto que la penicilina es más efectiva en momentos en que la bacteria está en crecimiento o en división.<sup>11</sup>

Otro modo de acción depende de las proteínas ligadoras de penicilina (PBP) presentes en muchas bacterias. Estas proteínas poseen diferente afinidad por la penicilina, con la que terminan formando enlaces covalentes. Las PBP se encargan de la transpeptidación necesaria para la síntesis de peptidoglucanos, para conservar la forma bacilar y para formar tabiques en las fases de división bacteriana. La penicilina inhibe la actividad de estas proteínas y provoca lisis bacteriana, la cual puede sobrevenir con cierto retardo. La lisis bacteriana puede no ocurrir, en cuyo caso se producen formas filamentosas del microorganismo.

También se ha propuesto que la penicilina actúa inhibiendo las autolisinas de la pared bacteriana. Estas proteínas con actividad enzimática se activan en los procesos de división celular. Permanecen inactivas la mayor parte del tiempo, hasta que reciben una señal química en un momento previo a la división. Se piensa que la penicilina activa estas enzimas provocando el desensamblaje de los componentes de la pared en un momento cualquiera, lo que en definitiva lleva a la lisis bacteriana.

Una vez ingerida la penicilina se absorbe y se distribuye por todo el cuerpo. Se localizan rápido en tejidos y secreciones como el líquido sinovial, pleural, pericárdico y la bilis. Se detectan pequeñas cantidades en secreciones prostáticas, tejidos encefálicos y líquido intraocular. En el Líquido Céfaloraquídeo la concentración no sobrepasa el 1%, pudiendo alcanzar valores de hasta un 5% en casos de inflamación. La penicilina es eliminada rápidamente por filtración glomerular y secreción tubular, y permanece en el cuerpo entre 30 minutos y una hora. Por lo tanto es factible encontrar grandes concentraciones del fármaco en la orina.<sup>11</sup>

### 3. CEFALOSPORINAS

Son una amplia familia que contiene una cadena lateral derivada del ácido D-Alfa aminoadípico condensada a un anillo Beta-lactámico. Todos los compuestos que presentan esta estructura son estables en medio ácido y resisten a las penicilinasas. Se las administra por vía oral, intravenosa o intramuscular.<sup>11</sup>

#### a. Modo de acción

Inhiben la síntesis de la pared bacteriana de manera semejante a como lo hacen las penicilinas. De acuerdo a las modificaciones que presentan los compuestos en comparación con la cefalosporina primitiva, se ha establecido una clasificación basada en "generaciones", es decir, qué tan alejado del compuesto base está el fármaco. Se distinguen así cuatro generaciones:

GENERACIÓN	EJEMPLOS	ACCIÓN ANTIBACTERIANA
Primera	Cefalotina Cefazolina Cefalexina	- Activas contra gram positivas (a excepción de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>epidermidis</i> ), anaerobios de la cavidad oral, <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> y <i>Pseudomonas mirabilis</i> . - Moderadamente eficaces contra gram negativas. - Ineficaces contra enterococos y <i>Listeria</i> .
Segunda	Cefoxitina Cefotetán Cefmetazol Cefaclor Cefuroxima	- Altamente eficaces contra gram negativos, <i>E.coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> . <i>Moraxella catarrhalis</i> y <i>Bacterioides fragilis</i> .
Tercera	Ceftazidimina Cefoperazona Ceftriaxona Cefotaxima	- Poco <u>activos</u> contra gram positivos. - Muy eficaces contra <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Serratia</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Cuarta	Cefepima	Utilizados contra bacilos gram negativos aerobios

Ninguna cefalosporina tiene acción confiable ante *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* y *aureus*, *Enterococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila* y *micdadei*, *C.difficile*, *Pseudomonas maltophilia* y *putida*, *Campylobacter jejuni*, *Acinetobacter* y *Candida albicans*.

#### **b. Mecanismos de resistencia bacteriana a las cefalosporinas**

Depende de la producción de la enzima Beta-lactamasa que hidroliza el anillo principal de las cefalosporinas, de la incapacidad del fármaco de alcanzar el sitio de acción y de alteraciones en la estructura de las PBP. <sup>11</sup>

### **4. AMINOGLUCOSIDOS**

Todos los antibióticos del grupo de los aminoglucósidos contienen aminoazúcares ligados a un anillo de aminociclitol a través de enlaces glucosídicos. Son todos policationes y su polaridad en parte es la que explica sus propiedades farmacocinéticas. Por ejemplo, ninguno se absorbe después de una ingestión adecuada, no se encuentran grandes concentraciones en el líquido céfalo-raquídeo y son excretados bastante rápido. Se usan para combatir bacterias gram negativas aerobias e interfieren en la síntesis proteica. A pesar de que casi todos los inhibidores de síntesis proteínica son bacteriostáticos, los aminoglucósidos son bactericidas. Las mutaciones afectan proteínas de los ribosomas bacterianos. Son utilizados ampliamente pero poseen la gran desventaja de ser altamente tóxicos. Provocan nefrotoxicidad y toxicidad que afectan las porciones auditiva y vestibular del par VIII (ototoxicidad). <sup>11</sup>

#### **a. Modo de acción**

Son bactericidas rápidos. Bloquea la síntesis de proteínas y disminuye la fidelidad en la traducción de ARNm en el ribosoma.

Los aminoglucósidos se ligan a polisomas e interfieren en la síntesis proteica al causar una lectura errónea y terminación prematura de la traducción de ARNm. Estas proteínas defectuosas pueden ser insertadas en la membrana de la bacteria, lo cual facilita el ingreso de los aminoglucósidos. También se produce una fuga de iones que finalmente produce la lisis bacteriana.

#### **b. Modos de resistencia microbiana a los aminoglucósidos:**

Depende del no ingreso del fármaco a la bacteria (esto supone una modificación en las porinas de la membrana externa), de la escasa afinidad del antibiótico por el ribosoma bacteriano o porque el medicamento es inactivado por enzimas de la bacteria.

Ejemplos de aminoglucósidos: Kanamicina, Gentamicina, Netilmicina, Tobramicina; Amikacina, Neomicina, Estreptomina. <sup>11</sup>

## 5. QUINOLONAS

Las quinolonas son análogos sintéticos del ácido nalidixico. El modo de acción de todas las quinolonas implica inhibición de la síntesis del DNA bacteriano mediante el bloqueo de la enzima DNA girasa. <sup>2</sup>

<b>Primera generación</b>	<b>Segunda generación</b>	<b>Tercera y cuarta generación</b>
Ácido nalidixico	Ciprofloxacina	Clinafloxacina
Conoxacina	Enoxacina	Gatifloxacina
Ácido oxolínico	Lomefloxacina	Gemifloxacina
	ofloxacina	Levofloxacina
		Moxifloxacina
		Esparfloxacin

Las primeras quinolonas no alcanzaron concentraciones sistémicas antibacterianas después de la ingestión oral y por tanto solo eran útiles como antisépticos urinarios. Los derivados fluorinados (norfloxacina, ciprofloxacina, enoxanina, pefloxacina, lomefloxacina, y otras) muestran mayor actividad antibacteriana y menor toxicidad y logran concentraciones clínicamente útiles en la sangre y los tejidos. Las fluoroquinolonas inhiben muchos tipos de bacterias aunque su espectro de actividad varía de una a otra. Estos fármacos son altamente activos contra enterobacterias incluyendo aquellas resistentes a cefalosporinas de tercera generación especies de haemophilus, neisserias, chlamydias y otras. <sup>2</sup>

## 6. TETRACICLINAS

Bacteriostáticos policíclicos, de poca utilización puesto que presentan un espectro de acción muy específico, son tóxicos y los microorganismos han aumentado notablemente sus defensas contra estos fármacos.

### a. Modo de acción

Inhiben la síntesis bacteriana porque se ligan a una subunidad ribosomal e impiden la llegada del aminoacil ARNt al sitio aceptor.

Ejemplos de tetraciclinas: Clortetraciclina, Oxitetraciclina, Demeclociclina, Metaciclina, Doxiciclina y Minociclina. <sup>2,11</sup>

## 7. CLORAFENICOL

Es una sustancia obtenida originalmente de cultivos de *streptomyces venezuelae*, pero en la actualidad se elabora por vía síntesis. El cloranfenicol cristalino es un compuesto estable absorbido con rapidez del aparato gastrointestinal distribuido ampliamente en los tejidos y líquidos corporales, incluso el sistema nervioso central y el líquido cefalorraquídeo: penetra bien en las células.

### a. Modo de acción

Inhibe la síntesis proteica mediante inhibición competitiva. Se fija a la subunidad menor ribosomal, impidiendo la unión del aminoacil ARNt.<sup>2,11</sup>

## 8. MACROLIDOS (eritromicina, claritromicina y azitromicina)

La eritromicina se obtiene del *Streptomyces erythreus* y tiene la fórmula química  $C_{37}H_{67}NO_{13}$

Los macrolidos pueden ser fármacos preferidos en las infecciones causados por microorganismos como *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Legionella pneumophila* y *Campylobacter jejuni* y sustituir a la penicilina en las personas hipersensibles a estas.

### a. Modo de acción

Son bacteriostáticos que inhiben la síntesis de proteínas al fijarse a la subunidad 50S de los ribosomas y bloquean la fase de translocación.

Mecanismos de resistencia bacteriana.

Disminución de la penetración del fármaco, producción de una enzima que impide la unión del medicamento al ribosoma y elaboración de enzimas hidrolíticas.<sup>2</sup>

## 9. GLUCOPEPTIDOS

### a. Vancomicina

La vancomicina es producida por el *Streptomyces orientalis*. Se absorbe poco del intestino. Es notablemente bactericida para el estafilococos, algunos clostridios y ciertos bacilos. El fármaco inhibe las etapas iniciales de la síntesis de los peptidoglucanos en la pared celular. La vancomicina se administra por vía intravenosa para las infecciones sistémicas graves por estafilococo, incluso en la endocarditis, y en especial si hay resistencia a la nafcilina.

## **b. Teicoplanina**

La teicoplanina tiene una estructura similar a la vancomicina. Es activa contra estafilococos (incluso los resistentes a la nafcilina) estreptococos, enterococos y muchas otras bacterias grampositivas .<sup>2</sup>

## **10. RIFAMPICINA**

La rifampicina es un derivado semisintético de la rifamicina, un antibiótico producido por el *Streptomyces mediterranei* .Es activa in vitro contra ciertos gram positivos y gramnegativos algunas bacterias entericas, micobacterias, clamidias y poxvirus. Aunque muchos meningococos y micobacterias se inhiben con menos de 1 ug/mL surgen mutantes muy resistentes en todas las poblaciones microbianas con una frecuencia de  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  .

### **a. Modo de acción**

La rifampicina se une fuertemente a la RNA polimerasa dependiente del DNA y de esta manera inhibe la síntesis del RNA en la bacteria . Bloquea una etapa tardía del ensamblado de los poxvirus. La rifampicina penetra bien en la células fagocíticas y puede matar a los microorganismos intracelulares. Los mutantes resistentes a la rifampicina muestran alteración de la RNA polimerasa<sup>2</sup>

## **K. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO**

### **1. Muestra.-**

Frotis superficiales, pus sangre, material aspirado de la traquea o líquido cefalorraquídeo para cultivo, según la localización del proceso.<sup>2</sup>

### **2. Frotis.-**

En los frotis teñidos de pus o esputo se observan los estafilococos típicos. No es posible distinguir los microorganismos saprofitos (*Staphylococcus epidermidis*) de los patógenos (*Staphylococcus aureus*).<sup>2</sup>

### **a. Fundamento.-**

Se basa en la capacidad de diferenciar o clasificar a 2 grandes grupos de bacterias: Gram (+) Positivas, y Gram (-) Negativas con la intervención de 2 colorantes primarios y otro secundario, además utiliza un decolorante que permite diferenciar a los microorganismos de acuerdo a sus afinidades tintoriales. La composición de la pared celular varía según las bacterias G(+) y G (-), sin embargo todas tienen un componente común :el péptido glucano (mureina, glucopeptido, mucopeptido) . En las bacterias G (+) puede haber hasta 40 capas de péptido glucano que

representa el 50 % del material de la pared celular. En las bacterias G(-) parece existir solo 1 a 2 capas de péptido glucano que representa el 5 al 10 % de la pared celular.<sup>2,19</sup>

El fundamento de la Tinción consiste cuando las células se tiñen primero con cristal violeta y una solución de yodo todas ellas se va a teñir, al unirse el decolorante al yodo en la pared celular, luego se lavan con una solución decolorante, las denominadas bacterias G(+) retendrán la coloración, mientras que las bacterias G(-) no retendrán la coloración, pero si a continuación se trata con un colorante de contraste las bacterias G (-) serán teñidas por el, por lo que las bacterias G(+) se tiñen de color violeta y las bacterias G(-) se tornen de rosado.

### **3. Cultivo.-**

Las muestras sembradas a 37°C en placas de agar sangre producen colonias típicas en 18 horas, pero no pueden presentar hemólisis y producción de pigmento sino hasta varios días después y ambos procesos son óptimos a temperatura ambiente. El *Staphylococcus aureus*, pero no otros estafilococos, fermentan el manitol. Las muestras contaminadas con una flora mixta pueden cultivarse en un medio con 7.5 % de NaCl : la sal inhibe la mayor parte de la flora normal pero no al *Staphylococcus aureus* .El agar salado manitol se emplea para detectar portadores nasales de *Staphylococcus aureus*.<sup>2</sup>

### **4. Prueba de la catalasa.-**

#### **a. Fundamento.-**

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contiene citocromo ;la excepción principal es el streptococcus. Por lo general los organismos que no poseen el sistema citocromo carecen también de la enzima catalasa y por lo tanto no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno .

La catalasa es una hemoproteína ,es grupo prostético esta formado por 4 átomos de hierro trivalente por molécula que retiene su estado oxidado durante la actividad enzimática.

El peróxido de hidrógeno se forma como un producto terminal oxidativa de la descomposición aeróbica de los azúcares. La flavoproteína reducida reacciona directamente con el oxígeno gaseoso por medio de la reducción de electrones para formar peróxido de hidrógeno, y no por acción directa entre el hidrógeno y el oxígeno molecular.

El peróxido de hidrógeno si se deja acumular , es toxico para las bacterias y provoca su muerte. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno u oxida los sustratos secundarios, sin embargo no tiene acción contra otros peróxidos.

La descomposición del peróxido de hidrógeno se produce a través de la acción de las enzimas: catalasa (oxidoreductasa del peróxido de hidrógeno) , una peroxidasa , nicotinamida adeninucleotido (NAD) reducido, nicotinamida adeninucleotido fosfato (NADP) reducido , citocromo c , o glutatión .En la descomposición del peróxido de hidrógeno una molécula actúa como el sustrato y la otra como un donador ; el sustrato reducido por los átomos de hidrógeno cedidos por el dador , da como resultado un sustrato reducido y un dador oxidado. <sup>16</sup>

**Interpretación:**

- Prueba positiva : Formación inmediata de burbujas bien visibles (formación de O<sub>2</sub>)
- Prueba negativa : No hay formación de burbujas (no se forma O<sub>2</sub>).

**5. Prueba de la coagulasa.-**

**a. Fundamento.-**

La coagulasa es una enzima de composición química desconocida, con actividad semejante a la protrombina, capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, produciendo un coágulo visible en un sistema de prueba apropiado Se cree que la coagulasa actúa in vivo formando una barrera de fibrina en el sitio de infección estafilocócica . esto tal vez desempeñe un papel en la localización de los microorganismos en abscesos (forúnculos) . En el laboratorio la prueba de coagulasa es la que se emplea con mayor frecuencia para diferenciar *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo) de los otros estafilococos y micrococos. <sup>14</sup>

**6. Fermentación del Manitol.-**

**Fundamento.-**

Se trata de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. Los estafilococos coagulasa positiva hidrolizan el manitol acidificando el medio; las colonias aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante. Los estafilococos coagulasa negativos, presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura. En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripeptona, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, el manitol es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, y el rojo fenol es el indicador de pH. <sup>16</sup>

Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador pH del color rojo al amarillo. Los estafilococos crecen en altas concentraciones de sal, y pueden o no fermentar el manitol. Los estafilococos coagulasa positiva fermentan el manitol y se visualizan 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.<sup>16</sup>

La mayor parte de las cepas de *Staphylococcus aureus* en contraste con *Staphylococcus epidermidis* y la mayoría de otros estafilococos coagulasa-negativos, pueden fermentar manitol y formar ácido. Un medio excelente para la recuperación de estafilococos patógenos de poblaciones bacterianas mixtas es el agar manitol salado. este medio toma ventaja de la capacidad de los estafilococos de crecer en presencia de 7.5 % de NaCl y la incapacidad de *Staphylococcus aureus* de fermentar el manitol.<sup>17</sup>

### **7. Prueba de la desoxirribonucleasa (DNAsa).-**

Además de la capacidad de producir catalasa, coagulasa libre y fermentar manitol , muchas cepas de *Staphylococcus aureus* producen desoxirribonucleasa, una enzima usada desde hace mucho tiempo por los microbiólogos como una prueba adicional para la identificación de *Staphylococcus aureus*. Se utilizan dos formas de la prueba.

En el primer método se incorpora el ácido desoxirribonucleico en agar nutriente. Se inocula el microorganismo en el agar y después de 18 a 24 horas se inoculación se detecta la producción de DNAsa bañando la placa con ácido clorhídrico diluido, que precipita el DNA nativo del medio. Así las colonias que producen DNAsa estarán rodeadas por una zona clara donde el DNA ha sido despolimerizado e hidrolizado. Las áreas de la placa que no contengan DNA hidrolizado se verán opacas.

Una segunda prueba para la detección de DNAsa se basa en el agregado de azul de toluidina O a la base agar nutriente. A medida que el microorganismo crece y produce DNAsa, el agar que rodea las colonias de *Staphylococcus aureus* cambia de color de azul a rosa, lo que indica la hidrólisis del DNA. Aunque esta es una prueba de apoyo útil para identificar productores coagulasa débiles, no se considera tan confiable como la prueba de coagulasa para la identificación de *Staphylococcus aureus*.<sup>16</sup>

## **L. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA**

### **1. Ensayo de difusión en disco**

En 1966, después de los estudios realizados por Bauer, Kirby, Sherris y Turk, ensayando diferentes cepas bacterianas, el empleo de los discos de papel de filtro para las pruebas de sensibilidad fue estandarizado y correlacionado definitivamente con las CMI correspondientes. Durante muchos años, y a pesar de ser una técnica puramente cualitativa, el método de difusión por disco (o método Kirby-Bauer), en función sobre todo de su comodidad, economía y fiabilidad, ha sido, y aun es, uno de los más utilizados en los laboratorios de todo el mundo.<sup>12</sup>

#### **a. Medio Agar Mueller - Hinton**

De los muchos medios disponibles, se considera el Agar Mueller - Hinton como el mejor para pruebas de susceptibilidad de rutina de bacterias no fastidiosas por las siguientes razones:

- Reproducibilidad aceptable lote a lote para ensayos de susceptibilidad.
- Es bajo en inhibidores de sulfonamida, trimetoprim, y tetraciclina.
- Crecimiento satisfactorio para la mayoría de los patógenos no fastidiosos.

Aunque el agar Mueller - Hinton es confiable generalmente para pruebas de susceptibilidad, los resultados obtenidos con algunos lotes, en ocasiones, varían significativamente. Si el lote del medio no soporta un adecuado crecimiento de organismos de prueba, las zonas obtenidas en un disco de difusión usualmente son más grandes que lo esperado y pueden exceder los límites de control de calidad aceptable. Sólo las formulaciones del medio Mueller - Hinton que han sido controladas con la cepa de referencia de acuerdo al NCCLS pueden ser usados.<sup>12</sup>

#### **b. pH**

El pH de cada lote de agar Mueller - Hinton debería ser revisado cuando el medio es preparado. El agar debe tener un pH entre 7,2 y 7,4 después de gelificar a temperatura ambiente. Si el pH es muy bajo, ciertas drogas parecería que pierden potencia (por ej. aminoglicósidos, quinolonas y macrólidos), mientras otros agentes pueden presentar excesiva actividad (por ej. tetraciclinas). Si el pH es muy alto, puede esperarse efectos opuestos.

El pH puede ser controlado por ejemplo macerando una cantidad suficiente de agar para sumergir la punta del electrodo.<sup>12</sup>

#### **c. Humedad**

Un exceso de humedad justo antes del uso se presenta en la superficie del agar, las placas deberían ponerse en un incubador (35°C) o una cámara de flujo laminar con las placas entreabiertas hasta que el exceso de humedad se haya perdido por evaporación (usualmente

10 a 30 minutos). La superficie debe ser húmeda, pero sin gotas de humedad en la superficie del medio o en la tapa de la placa antes de ser inoculada.<sup>12</sup>

#### **d. Estándar de turbidez para preparación del inóculo**

Para estandarizar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad, se utiliza estándar de turbidez de BaSO<sub>4</sub>, equivalente a un estándar 0.5 McFarland o su equivalente óptico. Un estándar de 0.5 McFarland de BaSO<sub>4</sub> se prepara como sigue:

- Una alícuota de 0,5 ml de 0,048 m/L de BaCl<sub>2</sub> (1,175% p/v BaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O) se agrega a 99,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 0,18 mol/L (1% v/v) con agitación constante para mantener la suspensión.
- La densidad correcta del estándar de turbidez debería verificarse usando un espectrofotómetro con una celda de 1 cm de paso de luz con una cubeta de calibración para determinar la absorbancia. La absorbancia a 625 nm debe ser 0,08 a 0,10 para el estándar de 0,5 McFarland.
- La suspensión de Sulfato de Bario debe transferirse en alícuotas de 4 a 6 ml a tubos con tapa atornillada del mismo tamaño que aquellos que se usan para el crecimiento o dilución del inóculo de bacterias.
- Estos tubos deben ser bien sellados y almacenados en la obscuridad a temperatura ambiente.
- El estándar de turbidez debe ser bien agitado en un vortex mecánico antes de usar y se debe revisar que haya una apariencia turbia uniforme. Si aparecen partículas grandes debe ser reemplazado. Suspensiones de partículas de latex pueden agregarse para agitar invirtiendo el tubo suavemente sin usar vortex.
- El estándar de Sulfato de Bario debe ser reemplazado o verificado su densidad mensualmente.

#### **e. Inoculación de las placas**

- En un lapso de tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, una tórula de algodón se sumerge en ella. La tórula debe ser rotada varias veces y presionada firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Esto remueve el exceso de inóculo.
- Se inocula la superficie de una placa de agar Mueller -Hinton por rayado con la tórula sobre toda la superficie. Este procedimiento es repetido rayando dos o más veces, rotando la placa aproximadamente 60° C cada vez para asegurar una distribución constante del inóculo. Como paso final se pasa sobre los bordes del agar.

- La tapas de la placa pueden quedar entreabiertas por 3 a 5 minutos, pero no más de 15, para permitir que un exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar el disco con la droga impregnada.
- Se debe evitar excesos en la densidad del inóculo. Nunca usar caldos de cultivo de la noche anterior sin diluir u otro inóculo no estandarizado.

#### **f. Aplicación de los discos a las placas inoculadas**

- Los sensidiscos se dispensan sobre la superficie del agar. Cada disco debe ser presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar. Ya sea que el disco se ponga individualmente o con un dispensador, deben ser distribuidos en forma constante y no debe quedar a menos de 24 mm de distancia entre centros. No más de 12 discos se deben poner por placa de 150 mm o no más de 5 en placas de 100 mm. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser relocalizado una vez que haya tomado contacto con la superficie del agar.
- Las placas son invertidas y puestas en un incubador a 35°C en el lapso de 15 minutos después de aplicados los discos. Las placas no se deben incubar en un ambiente de CO<sub>2</sub> porque los estándares de interpretación fueron desarrollados usando aire ambiente y el CO<sub>2</sub> alterará significativamente el tamaño de las zonas de inhibición de algunos agentes.<sup>12</sup>

#### **g. Lectura de las placas e interpretación de los resultados**

- Después de 16 a 18 horas de incubación, cada placa es examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento. Si aparecen colonias individuales, el inóculo estaba muy diluido y la prueba debe ser repetida. Los diámetros de la zona de inhibición completa (a ojo desnudo son medidos en mm. pasando por el centro del disco. La placa petri se mantiene a una distancia de pocos centímetros sobre un fondo negro no reflectante y se ilumina con luz reflejada. Si se agregó sangre al agar base (como para *Streptococcus*), las zonas son medidas en la superficie superior del agar iluminado con luz reflejada sacando la tapa. Si el organismo de prueba es un *Staphylococcus* spp. o *Enterococcus* spp., se requieren 24 horas de incubación y luz transmitida (placa se mantiene hacia la luz) se usa para examinar la zona de oxacilina y la zona de vancomicina buscando ligeros desarrollos de colonias resistentes a meticilina o vancomicina.
- El margen de las zonas debe ser tomado como el área donde no se observa crecimiento visible. Un crecimiento pobre de pequeñas colonias, las que se detectan con lente de

aumento al borde de la zona de crecimiento inhibido, son ignoradas. Sin embargo, colonias discretas creciendo dentro de la zona clara de inhibición deben ser identificadas y probadas nuevamente. Con *Proteus* spp., el delgado velo de población en una obvia zona de inhibición debe ser ignorado. Con trimetoprim y las sulfonamidas, pueden aparecer zonas de crecimiento leve; por lo tanto, no se considera y se mide los márgenes más obvios para determinar el diámetro de la zona. Cuando se usa medio suplementado con sangre para probar *Streptococcus* spp., se debe ser cuidadoso en medir la zona de inhibición y no la de hemólisis.<sup>12</sup>

#### **h. Interpretación de los resultados de la prueba de difusión en disco**

Existen tablas específicas NCCLS las que indican los criterios para interpretar los diámetros de zonas para categorizar exactamente los niveles de susceptibilidad de los microorganismos a diferentes agentes antimicrobianos.

Las tablas NCCLS utilizadas deben ser las vigentes, ya que son periódicamente publicadas y pueden contener variaciones.

#### **i. Categorías interpretativas**

##### **- Sensible**

La categoría "sensible" implica que una infección debido a una cepa puede ser apropiadamente tratada con la dosis de agente antimicrobiano recomendado para ese tipo de infección y especie infectante.

##### **- Intermedio**

La categoría "Intermedio" incluye aislamientos con agentes antimicrobianos con un CIM que se aproximan usualmente a nivel de tejido y sangre disponible y para los cuales su velocidad de respuesta puede ser más lenta que la de los aislamientos susceptibles. La categoría "Intermedia" implica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde la droga es fisiológicamente concentrada (por ej. quinolonas y  $\beta$ -lactámicos en orina) o cuando una dosis mayor que lo normal de una droga puede ser usada (por ej.  $\beta$ -lactámicos).

##### **- Resistente**

Las cepas resistentes no son inhibidas por la concentración sistémica usualmente alcanzable de un agente cuando los esquemas de dosificación normal son usados. Pueden tener CIM que caen dentro del rango donde están disponibles mecanismos de resistencia específicos (por ej.  $\beta$ -lactámicos) y la eficacia clínica no ha sido confiable en tratamientos estudiados.<sup>12</sup>

## **2. Metodo base de dilución en caldo.**

En los métodos de dilución en caldo, base de casi todos los métodos utilizados en la actualidad, se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones 1:2, en tubos con un caldo de cultivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. El caldo más comúnmente usado para estas pruebas es el de Mueller-Hinton suplementado con los cationes magnesio y calcio.<sup>13</sup>

Los agentes antimicrobianos se preparan en "soluciones madre" concentradas y luego se diluyen en caldo hasta obtener las concentraciones apropiadas.

Un tubo de caldo se mantiene sin inocular como control negativo de crecimiento. Luego de la incubación adecuada (usualmente de un día para el otro) se observa la turbidez de los tubos que indicará desarrollo bacteriano. El microorganismo crecerá en el tubo control y en todos los otros que no contengan suficiente agente antimicrobiano como para inhibir su desarrollo. La concentración de antibiótico que presente ausencia de crecimiento, detectada por falta de turbidez (igualando al control negativo), se designa como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un microorganismo (CMB) se debe realizar la prueba de actividad bactericida, que emplea el mismo sistema de dilución en caldo que para medir la sensibilidad.<sup>13</sup>

Al mismo tiempo que la suspensión inicial del microorganismo es inoculada en los tubos de caldo, se toma una alícuota del tubo de control de crecimiento, inmediatamente después de ser sembrado, y se inocula también en una placa de agar para determinar el número real de unidades formadoras de colonias (UFC) del inóculo. Este número se obtiene al contar las colonias presentes luego de la incubación de la placa de agar hasta el día siguiente y por multiplicación por el factor de dilución. Por ejemplo, usando un asa calibrada de 0,01 ml para sembrar la placa y contando unas 250 colonias, en 1 ml del tubo original habrá 250/0,01.

Una vez determinada la CMI, se siembra una cantidad conocida de inóculo de cada uno de los tubos de caldo que no presentaban turbidez en placas de agar (la pequeña cantidad del agente antimicrobiano que es llevada junto con el inóculo se elimina por dilución en el agar), y el número de colonias que crece en estos subcultivos, después de incubar durante la noche, se compara con el número de UFC/ml del cultivo original. Dado que incluso las drogas bactericidas no siempre esterilizan totalmente una población bacteriana, la mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0,1 % del inóculo original se denomina concentración bactericida mínima (CBM) o concentración letal mínima (CLM).

Las CMI y las CMB de un agente antimicrobiano pueden ser determinadas, con este método o con alguna variante, para cualquier bacteria que crezca en un medio líquido.

Pero según se pudo disponer de mayor número de agentes antimicrobianos para el tratamiento de una gran variedad de bacterias, se hicieron aparentes las limitaciones del macrométodo de dilución en caldo y se desarrollaron variantes de esta técnica que permitieran, por ejemplo, probar simultáneamente un germen aislado de un paciente frente a más de un agente antimicrobiano.<sup>13</sup>

### **3. Prueba en agar (test Screening)**

La confirmación de la resistencia intrínseca a la oxacilina, puede efectuarse inoculando el microorganismo en una placa de agar Müller-Hinton suplementada con 4% de cloruro de sodio y 6 µg/ml de oxacilina. Se inocula el agar en un cuadrante usando un hisopo que se ha sumergido en una suspensión equivalente al estándar 0.5 de Mc Farland y del cual ha sido eliminado el exceso de líquido. Se debe incubar 24 hs. a 35°C y leer para verificar la presencia de algún desarrollo; el crecimiento implica resistencia intrínseca a la oxacilina. Este método ha sido usado extensivamente con *Staphylococcus aureus* pero la experiencia con estafilococos coagulasa negativo, ha sido similar.<sup>14</sup>

### III. ANTECEDENTES

El *Staphylococcus aureus* es uno de los microorganismos más frecuentemente aislados tanto en infecciones comunitarias como intrahospitalarios. Puede producir desde infecciones banales hasta cuadros muy graves ( septicemias, meningitis, endocarditis, neumonías ) que en no pocas ocasiones conducen a la muerte del enfermo. Además se estima que entre el 20 y 40% de los adultos sanos son portadores nasales.<sup>21</sup>

Los seres humanos son un reservorio natural de *Staphylococcus aureus*. Entre el 30 y el 50% de los adultos sanos están colonizados, y entre el 10 y el 20% se mantienen colonizados persistentemente. Ambos aislados, cepas meticilino-sensibles y meticilino-resistentes, son colonizadores persistentes. Las personas colonizadas con *Staphylococcus aureus* tienen riesgo aumentado de infecciones. Las tasas de colonización por estafilococos son altas entre los pacientes con diabetes tipo 1, usuarios de drogas intravenosas, pacientes en hemodiálisis, pacientes quirúrgicos y aquellos con SIDA.<sup>22</sup>

Las personas colonizadas con cepas de *Staphylococcus aureus* tienen mayor riesgo de infección por estas cepas. La mayor parte de los casos de infecciones intrahospitalarias se adquieren por la exposición a las manos de los trabajadores de salud, una vez que éstas han sido colonizadas transitoriamente con estafilococos de sus propios reservorios o por el contacto con otro paciente infectado.<sup>22</sup>

La virulencia de la infección por *Staphylococcus aureus* es notable, en el sentido de que se trata de un comensal de fosas nasales, axilas, vagina, faringe o de las superficies dañadas de la piel. Las infecciones se inician con una solución de continuidad de la barrera cutánea o mucosa que permite al estafilococo acceder a los tejidos cercanos o a la circulación sanguínea.

No se comprende totalmente la biología de la colonización de las fosas nasales por el estafilococo. La mucina parece ser un factor determinante del hospedador colonizado en el proceso que implica interacciones entre la proteína del estafilococo y el carbohidratos de la mucina. Se desconoce el papel de otros comensales, Ig A secretoria o adhesinas específicas del estafilococo.<sup>22</sup>

La elevada virulencia de *Staphylococcus aureus* fue notificada por primera vez en un estudio publicado en 1941, en donde se identificó 82% de mortalidad asociada a pacientes con bacteremias ocasionadas por este microorganismo en un hospital de la ciudad de Boston. Las

etapas de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* pueden resumirse de la siguiente manera: frecuentemente neonatos, niños y adultos pueden ser colonizados por *Staphylococcus aureus* y portar el microorganismo generalmente en fosas nasales y, en ocasiones, en la piel y la ropa. Desde estos sitios, *Staphylococcus aureus* puede transmitirse a otras regiones en la piel o a las membranas mucosas; si estas barreras son interrumpidas por un trauma o una cirugía, *Staphylococcus aureus*, que es un patógeno oportunista, puede acceder al tejido provocando una lesión local. Debido a su amplia versatilidad, esta bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro: infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y síndrome de choque tóxico.<sup>23</sup>

En Estados Unidos de América (EUA), *Staphylococcus aureus* ocupa el segundo lugar después de los estafilococos coagulasa negativa como causa de bacteriemia adquirida en el hospital y es una causa letal y potencial en las infecciones. En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) notificó que los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *Staphylococcus aureus* varía entre 5 y 70% y que los porcentajes de mortalidad atribuibles pueden ser elevados (50%). Con datos provenientes de hospitales generales, pediátricos, universitarios y de especialidades, esta misma red reportó que en el periodo de 1997-2003, *Staphylococcus aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y el cuarto lugar en mortalidad. Un hospital pediátrico de tercer nivel en México, registró un franco predominio de *Staphylococcus aureus* relacionado con bacteriemias intrahospitalaria. Una revisión retrospectiva de 23 años, sobre las infecciones intrahospitalarias en un hospital pediátrico en Guadalajara-México, reconoce que actualmente el género *Staphylococcus* tiene una prevalencia de 36% en esas infecciones.<sup>24</sup> En México, diversos estudios de vigilancia de las infecciones intrahospitalaria indicaron que de 8.3 a 36% de esas infecciones fueron atribuibles a *Staphylococcus aureus*. Algunas cepas de *Staphylococcus aureus*, denominadas epidémicas, parecen tener la capacidad de distribuirse de manera exitosa dentro de los hospitales y causar infecciones serias en los pacientes. Los factores involucrados en la epidemicidad son poco claros. Los factores que incrementan la probabilidad de adquirir *Staphylococcus aureus* en hospitales incluyen: hospitalización prolongada, procedimientos prequirúrgicos, presencia de catéteres o prótesis y la permanencia en lugares de alto riesgo: unidades de cuidados intensivos, sala de neonatos y unidades prequirúrgicas, entre otras.<sup>24</sup>

El *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (MRSA) es en la actualidad un microorganismo endémico en muchos hospitales de todo el mundo. El primer reporte de MRSA fue hecho en 1961 en Europa, al poco tiempo de ser introducida la meticilina como la primer penicilina semisintética resistente a la penicilinas del *Staphylococcus aureus*. A inicio de los setenta el MRSA se aisló de diferentes hospitales por toda Europa, Australia y Asia. En Estados Unidos su prevalencia aumentó del 2,4%, en 1975, al 29% en 1991. Este incremento se ha producido no sólo en los grandes hospitales docentes del tercer nivel, sino también en los de pequeñas poblaciones e incluso se ha reportado MRSA adquiridos en la comunidad .<sup>25</sup>

El mecanismo de resistencia del MRSA consiste en la síntesis de una nueva proteína fijadora de penicilina (PBP), denominada PBP 2a (o PBP) con afinidad baja para los  $\beta$ -lactámicos. Esta es codificada por un nuevo gen denominado mec A y conserva su acción de transpeptidasa en la síntesis de la pared bacteriana aún cuando las otras PBP del *Staphylococcus aureus* estén inhibidas por  $\beta$ -lactámicos .<sup>25</sup>

Las vías más comunes de adquirir infecciones por MRSA son la autoinfección de portadores nasales y la transmisión a través de las manos del personal luego de ser colonizadas transitoriamente con estafilococos de su propio reservorio (nariz, piel, garganta) o de pacientes (infectados o altamente colonizados) .<sup>25</sup>

En 1995 Cornejo y colaboradores, en el Hospital Nacional del Sur de Arequipa, determinaron una prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la oxacilina (SARO) de 71,4% . Posteriormente, en Lima, se encontró prevalencias entre 50% y 90% de SARO.<sup>25</sup>

*Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (MRSA) es un patógeno importante que ha emergido en las últimas cuatro décadas causando infecciones tanto intrahospitalarias como de la comunidad. Acorde a los datos del Programa WHONET, la prevalencia de MRSA en Argentina oscila entre 40 y 50%. La rápida y exacta detección de MRSA es relevante para guiar una apropiada terapia antibiótica y evitar la diseminación intrahospitalarias de MRSA. El mecanismo responsable de meticilino-resistencia en *Staphylococcus aureus* está basado en la producción de una proteína ligadora de penicilina adicional de baja afinidad (PLP 2a), la cual es codificada por el gen *mecA*. Errores en la detección de la meticilino-resistencia tienen consecuencias graves, un resultado de falsa sensibilidad puede provocar falla de tratamiento, y un resultado de falsa resistencia implica un alto costo por tener al paciente aislado y por el uso innecesario de glicopéptidos, con el consecuente riesgo de selección de resistencia.<sup>25</sup>

#### IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El *Staphylococcus aureus* es en la actualidad un microorganismo endémico en muchos hospitales de todo el mundo. Este incremento se ha producido no sólo en los grandes hospitales docentes del tercer nivel, sino también en los de pequeñas poblaciones y comunidades pequeñas

Hay personas que son mas propensas a la colonización por *Staphylococcus aureus*, como el personal de salud ( manuales de limpieza, médicos, enfermeros, entre otros), siendo portadores naso-faríngeos en un porcentaje mayor que en la población general .

Esta nueva resistencia del *Staphylococcus aureus* enfatiza la importancia del uso prudente de antibióticos y la búsqueda de nuevos antimicrobianos u otras posibilidades terapéuticas, ya que es posible que se desarrolle una mortalidad y morbilidad similar a la de la era pre-antibiótica.

En el Hospital Obrero, según los reportes del laboratorio de microbiología, la mayor incidencia y prevalencia de infecciones intrahospitalarias, está dada por este microorganismo. Los brotes epidémicos se registran principalmente en los servicios de cirugía, traumatología y unidades de terapia intensiva; los focos de los brotes son desconocidos debido a que en el hospital no se realiza una investigación de brotes. Los focos de estas infecciones posiblemente se deban a los portadores nasales de estafilococo en el personal de salud, es por eso que el objetivo de esta investigación es determinar la prevalencia de portación nasal de *Staphylococcus aureus* en el personal de limpieza de esta institución.

## V. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de investigación permitirá determinar la prevalencia de portación nasal de *Staphylococcus aureus* en el personal de limpieza (manuales) con la finalidad de establecer los posible focos de infección por estafilococo, esto permitirá a las autoridades de este centro tomar medidas preventivas y tratamientos de portadores con el objetivo de reducir la frecuencia de portación lo que contribuirá a reducir los riesgos de infección intrahospitalaria

Debido a la existencia de un alto riesgo de transmisión de microorganismos causantes de diversas patologías, producidas por la estrecha relación entre paciente y trabajadores de limpieza de salud es necesario que se ponga en conocimiento de la comunidad de salud la emergencia y diseminación epidémica de estas cepas en infecciones de los pacientes de nuestro hospital, que conllevan una mayor morbimortalidad, así como mayor gasto para el sistema de salud.

## VI. OBJETIVOS

### A. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la prevalencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* en el personal de Limpieza del Hospital Obrero N°1 durante los meses de octubre a diciembre de la gestión 2005.

### B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la frecuencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* en el personal de limpieza de los servicios de Traumatología, Cirugía, Unidad de Terapia Intensiva, Urología.
- Determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* a diferentes antimicrobianos.
- Determinar el porcentaje de resistencia o sensibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* frente a la oxacilina.
- Determinar a que antimicrobiano presenta mayor resistencia las cepas de *Staphylococcus aureus*.

## VII. DISEÑO METODOLOGICO

### A.TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de Investigación fue de Tipo Descriptiva Longitudinal y Prospectivo.

### B.UNIVERSO

El universo de estudio fue 36 personas, trabajadores manuales de limpieza de los servicios : Cirugía, Traumatología, Unidad de Terapia Intensiva y Urología, del Hospital Obrero N° 1 de la ciudad de La Paz durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de la gestión 2005, de quienes se recolectó muestras nasales para la determinación de *Staphylococcus aureus* y SARM.

Los datos del universo de estudio fueron recolectados de acuerdo a la hoja Clínica diseñada para el presente estudio. Ver Anexo N° 1

### C. MATERIALES

- Caja Petri
- Tubos de hemólisis
- Hisopos estériles
- Asa Bacteriológica
- Portaobjetos
- Mechero
- Guantes estériles
- Barbijo
- Gorra

### D. EQUIPOS

- Estufa
- Microscopio

### E. REACTIVOS

- Solución Fisiológica
- Infusión Cerebro Corazón
- Agar Sangre
- Agar Manitol Salado
- Agar Muller Hinton
- Escala 0.5 McFarlan
- Peróxido de Hidrógeno 3%
- Aceite de Inmersión
- Plasma

- Discos para Antibiograma:

Sulfametoxazol-Trimetroprin  
Eritromicina  
Rifampicina  
Oxacilina

Ciprofloxacina  
Gentamicina  
Vancomicina  
Penicilina



Discos de antibiograma

- Oxacilina (6 ug /mL)
- Infusión cerebro- Corazón
- Tinción Gram. :

Solución Violeta de Genciana  
Solución de Lugol  
Solución Decolorante Alcohol-Acetona  
Solución Fucsina Básica  
Agua destilada

## F. METODOS

### 1. Toma de muestra de Secreción Nasal

Se solicitó al paciente no limpiarse la nariz antes de la toma de muestra.

**Secreción Nasal:** Se le introdujo un hisopo estéril unos 2 centímetros dentro la nariz, realizando movimientos rotatorios suaves para obtener la muestra. Inmediatamente se procedió a la siembra en agar sangre. <sup>16</sup>



• Toma de muestra de secreción nasal

**2. Frotis y Tinción Gram.** Se realizó el extendido directo de la muestra en un portaobjetos para su posterior tinción Gram. y observación microscópica.

**b. Procedimiento.** Una vez realizada el frotis se procede a fijar pasando el portaobjetos a través de la llama del mechero con la preparación hacia arriba, luego se cubre la preparación con el colorante primario violeta de genciana (1 a 3 minutos) posteriormente le lava con agua a chorro, cubrir la preparación con la solución de lugol (mordiente) (30 segundos a 1 minuto), lavar, decolorar con alcohol acetona hasta que la preparación pierda color (30 segundos a 2 minutos), lavar, cubrir la preparación con el colorante secundario fucsina básica (1 a 3 minutos ), lavar, secar a temperatura ambiente, observar al microscopio con objetivo de inmersión <sup>2,1</sup>

## **G. CULTIVO.**

**1. Cultivo e identificación.** (Ver anexo 6)

**a. Medio de cultivo.** El medio de cultivo utilizado fueron placas de agar sangre preparada con base agar nutritivo y sangre 7.5%.<sup>2</sup>



Placa de agar sangre

**b. Siembra e inoculación.**

Una vez flameada y el asa se tomó la muestra (cargar), el inóculo se colocó en un extremo de la placa de agar sangre realizando estrías en forma de pentágono se incubó la placa a 37°C, de temperatura durante 24 horas <sup>2</sup>

**c. identificación.**

A las 24 hora de incubación se observó en la placa colonias con estas características: Colonias pequeñas ,esféricas a las cuales realizó dos pruebas.



Colonias de *Staphylococcus aureus*

**1) Tinción de Gram:** se observó cocos gram positivos en forma de racimos de uvas

**2) Prueba de la catalasa :**<sup>18</sup>

**Procedimiento** .- Con una asa flameada se recogió una colonia pura y se puso sobre un portaobjeto limpio, se colocó una gota de agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3 % en los microorganismos colocados en el portaobjeto con un gotero o pipeta Pasteur. Se observó la producción inmediata de burbujeo (liberación de gas) y se registró el resultado.

Es importante no invertir el orden del procedimiento y no mezclar con el asa de inoculación ya que puede ocurrir resultados falsos positivos.<sup>18</sup>

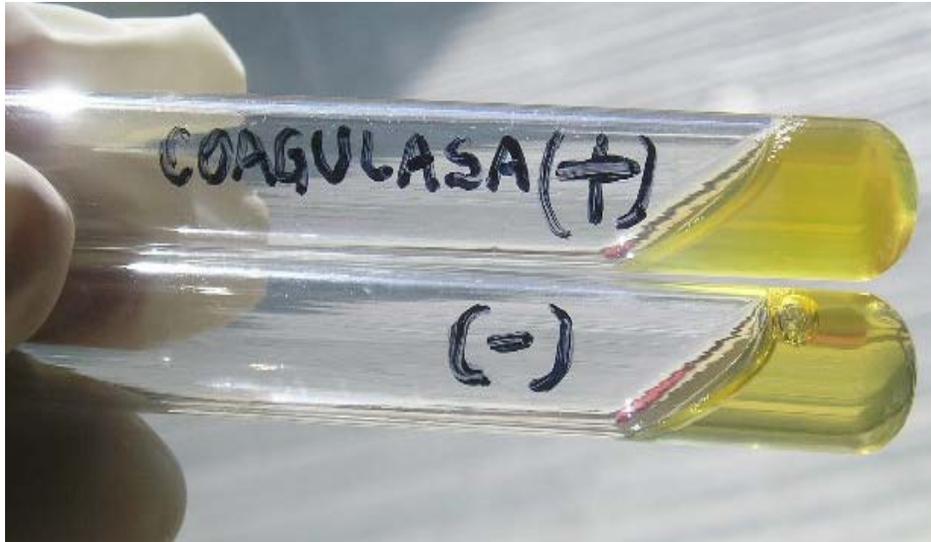


Prueba de la catalasa negativo y positivo

**3) Prueba de la Coagulasa:**

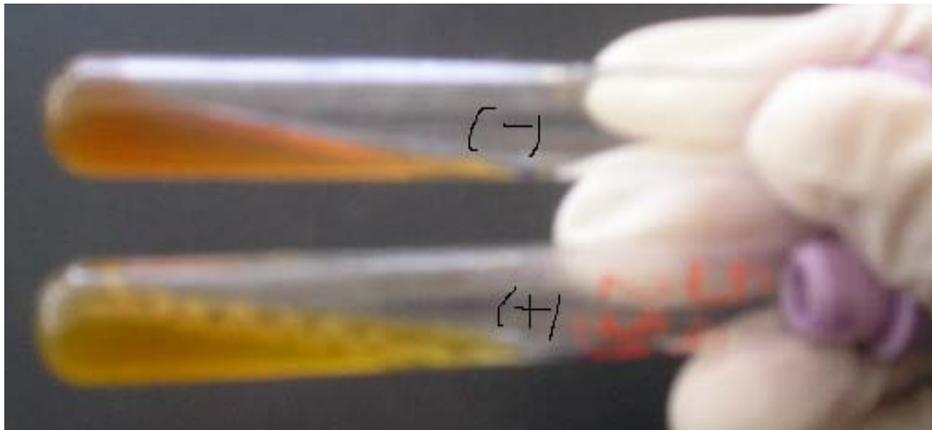
**Procedimiento** .- Con un asa flameada se pasó las colonias elegidas a tubos de Caldo Infusión Cerebro Corazón incubando durante 24 hrs a 37 °C. Luego de este tiempo se colocó vol/vol del cultivo a tubos que contenían plasma fresco y se incubó a 37°C durante 4 horas.

Pasado este tiempo examinamos los tubos a la hora y cada media hora hasta cumplir las 4 horas con el fin de detectar la presencia de coágulos. En casos negativo se incubaron hasta las 18 horas para confirmar la producción de fibrinolisisina. (coagulasa positivo).<sup>18</sup>



Prueba de la coagulasa

**d. Siembra en tubos de Agar manitol Salado.**

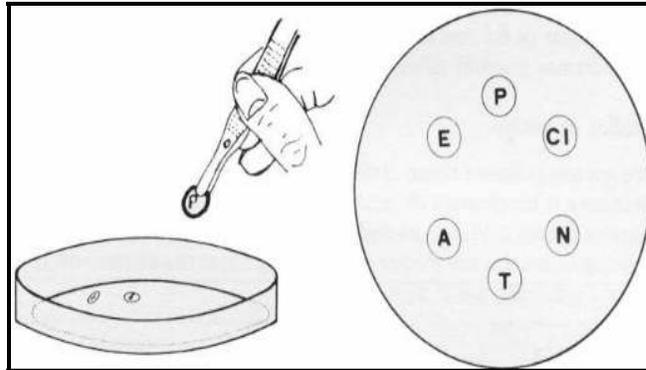


Prueba del agar salado manitol

**H. ANTIBIOGRAMA**

**Procedimiento.-** Se identificó cada caja petri con el código interno de procesamiento. En base al patrón de turbidez equivalente a la escala 0.5 de Mc-Farland (ver anexo 3) se preparó la suspensión del cultivo puro de *Staphylococcus aureus* aislado en solución fisiológica estéril, posteriormente se realizó el sembrado por inundación en Agar Muller Hinton con un hisopo estéril embebido en la suspensión preparada., dejándolo reposar por el lapso de 5 a 10 minutos.<sup>2</sup>

Pasado este tiempo se colocó los discos de antibiograma: Vancomicina, Penicilina, Gentamicina, Eritromicina, Rifampicina, Trimetroprim+Sulfametoxazol, ciprofloxacina, oxacilina, y se incubó a 37° C por el lapso de 24 horas .



Luego se observó los halos de inhibición registrando el diámetro para determinar la Resistencia o Sensibilidad aceptándose en algunas oportunidades el término de Intermedio (de acuerdo a las normas establecidas por la NCCLS ) ver Anexo 4



**Antibiograma con discos :Ciprofloxacina, rifampicina, gentamicina, sulfametoxazol trimetoprim**



Antibiograma con discos : Penicilina, eritromicina, oxacilina, vancomicina

## I. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LA OXACILINA

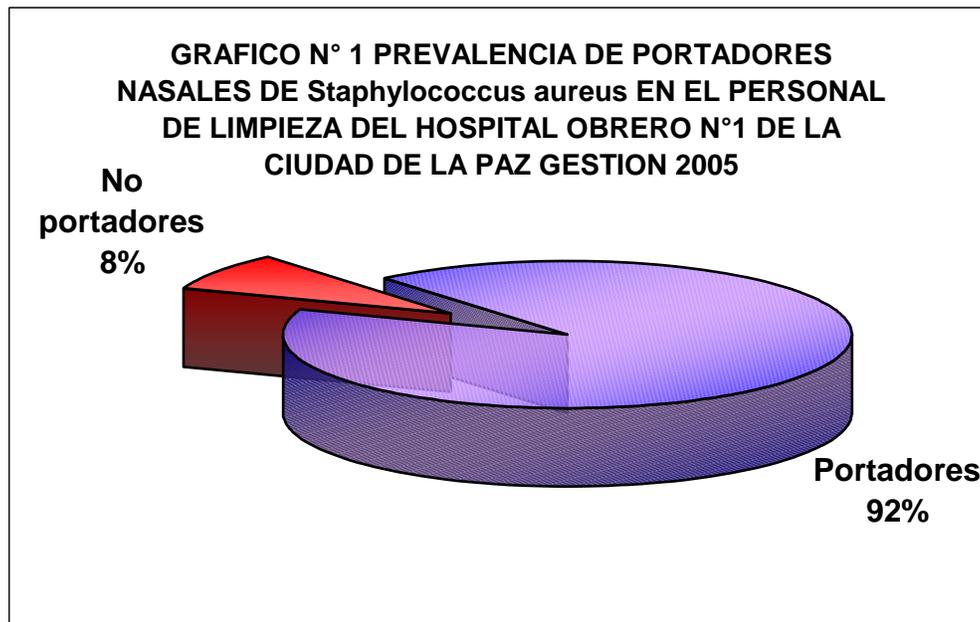
**Procedimiento.-** El método utilizado, fue el recomendado por la NCCLS, donde se empleo tubos de agar Mueller-Hinton suplementado con oxacilina (6 µg/ml) y NaCl (4%). Las placas fueron inoculadas en estría con una torunda impregnada en una suspensión del aislamiento de *Staphylococcus aureus* con una turbidez del 0,5 de McFarland. Las placas se incubaron a 30-35°C durante 24h. La sensibilidad de este método es del 100% ya que la presencia de una sola colonia en el depósito o estría es indicativo de resistencia a la oxacilina<sup>20</sup>



Prueba de la oxacilina en tubo negativo

## VIII. RESULTADOS.

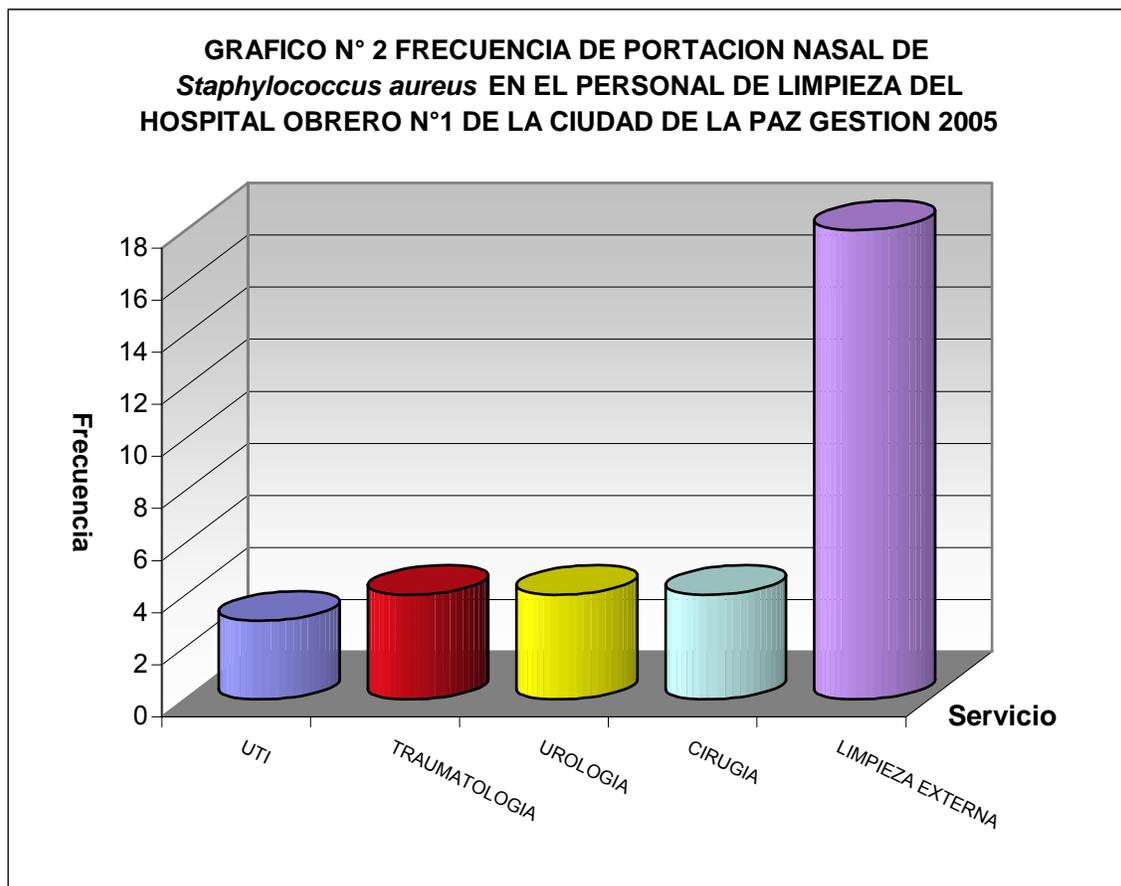
La población de estudio estuvo compuesta por 36 personas manuales de limpieza de diferentes servicios, encontrándose así un porcentaje de portación nasal de *Staphylococcus aureus* de 92 % ( 33 personas ), 8 % No Portadores (3 personas) del total de la población.



La Distribución de la portación nasal de *Staphylococcus aureus* en los diferentes servicios fue de la siguiente manera: 100% (3/3) de portación en el personal de limpieza del servicio de Unidad de terapia Intensiva, 100 % (4/4), en el personal de limpieza del servicio de Traumatología, 80 % (4/5), en el personal de Urología, 100% (4/4), en el personal de Cirugía y 90% (18/20) en el personal de limpieza externo. (Tabla N°1) (Grafico N° 2).

**TABLA N° 1 FRECUENCIA DE PORTACION NASAL DE *Staphylococcus aureus* EN EL PERSONAL DE LIMPIEZA DEL HOSPITAL OBRERO N° 1 DE LA CIUDAD DE LA PAZ GESTION 2005**

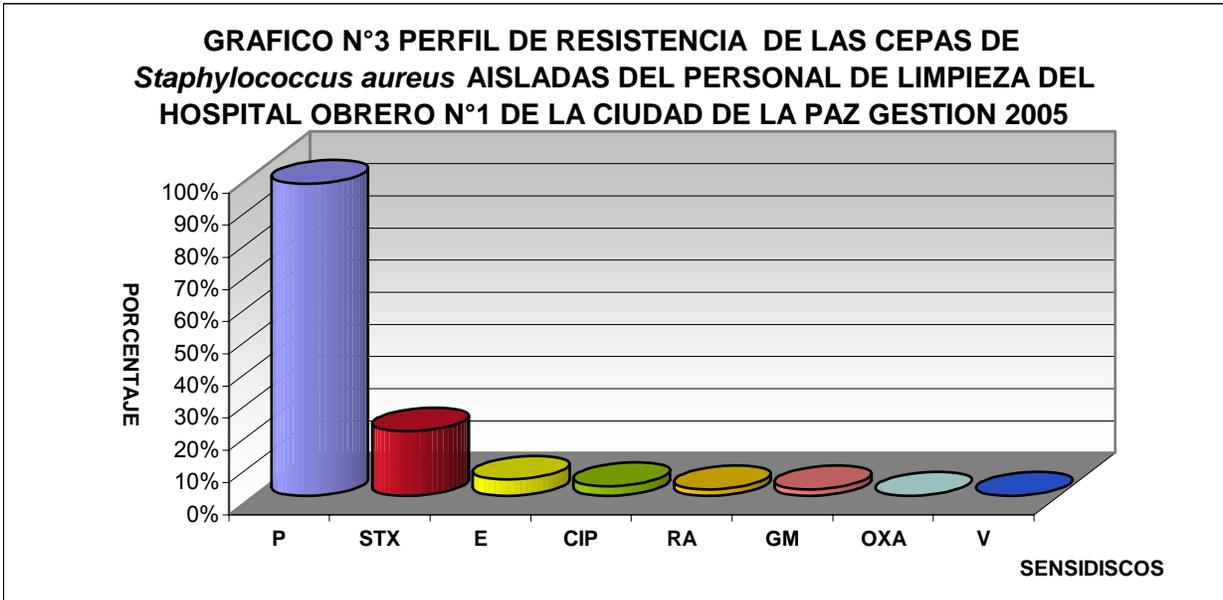
SERVICIOS	N° DE PERSONAS ESTUDIADAS	N° DE PORTADORES DE <i>S. aureus</i>	% de PORTADORES DE <i>S. aureus</i>
Unidad de Terapia Intensiva	3	3	100
Traumatología	4	4	100
Urología	5	4	80
Cirugía	4	4	100
Limpieza externa	20	18	90
TOTAL	36	33	



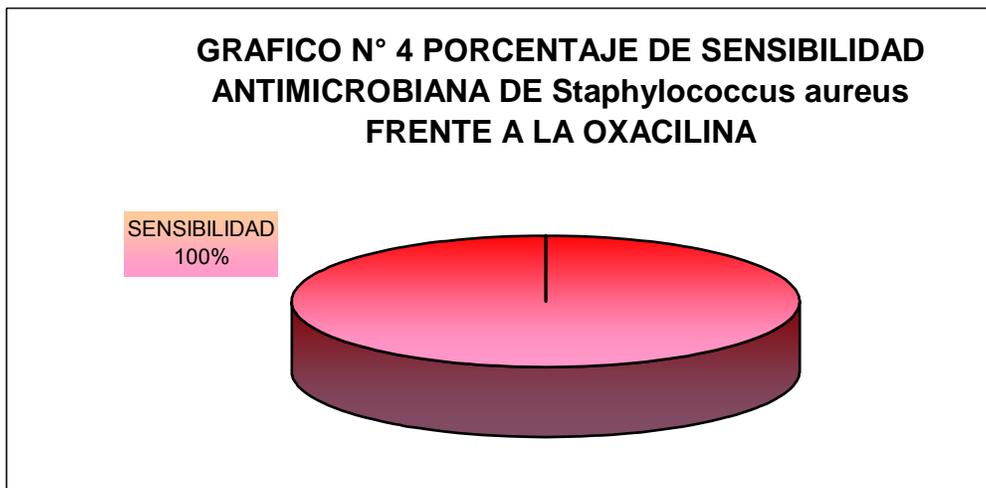
Se realizó el antibiograma a las 33 cepas aisladas encontrándose el siguiente perfil de susceptibilidad: 97% fue resistente a penicilina, 20% fue resistente a trimetoprim+sulfametoxazol, 5% de resistencia a eritromicina, 3% de resistencia a ciprofloxacina, 2% de resistencia a rifampicina, 2% de resistencia a gentamicina y 0% de resistencia a oxacilina (metecilina) y vancomicina respectivamente (Grafico N° 3).

**TABLA N°2 PERFIL DE RESISTENCIA DE LAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS EN EL PERSONAL DE LIMPIEZA DEL HOSPITAL OBRERO N°1 DE LA CIUDAD DE LA PAZ GESTION 2005**

<b>SENSIDISCOS</b>	<b>CEPAS RESISTENTES</b>	<b>% DE RESISTENCIA</b>
Penicilina	32	97
Sulfatrimetroprim	7	20
Eritromicina	2	5
Ciprofloxacina	1	3
Rifampicina	1	2
Gentamicina	1	2
Vancomicina	0	0
Oxacilina	0	0



**Prueba de Susceptibilidad a la Oxacilina:** Mediante la prueba de Susceptibilidad a la Oxacilina se encontró 0 % de Resistencia (100 % de sensibilidad) del total de las 33 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en el personal de limpieza del hospital obrero N° 1 , confirmando el resultado con la ausencia absoluta de colonias en la estría.



## IX. DISCUSIONES

El porcentaje de portacion de *Staphylococcus aureus* como agente patógeno a nivel mundial varia en función a la población estudiada, En México, diversos estudios de vigilancia de las infecciones intrahospitalarias indicaron que de 8.3 a 36% fueron atribuibles a *Staphylococcus aureus*.<sup>20</sup> En ese sentido se han encontrado portaciones de hasta 56 % en Lima Peru<sup>26</sup> durante la vigilancia de resistencia y patrones de corresponsabilidad en muestras provenientes de pacientes que acudieron a ese centro, en nuestro medio durante la gestión 2001 se encontraron un 88 % de portacion de *Staphylococcus aureus* en muestras provenientes de 3 Hospitales de la ciudad de La Paz, durante la gestión 2003<sup>27</sup>, un 34.2 % de portadores en muestras de pacientes hospitalizados en el Hospital Obrero N° 1 de la ciudad de La Paz<sup>28</sup>. Esta diferencia significativa puede deberse a distintos factores como características fenotípicas y genotípicas de las cepas, factores del huésped, esquemas de tratamiento antimicrobiano y medidas de control de las infecciones implementadas en las instituciones. Sin embargo no existen datos publicados respecto a la frecuencia de portadores de *Staphylococcus aureus* en el personal de salud. Nuestro estudio se orientó a determinar la prevalencia de portacion de este microorganismo en el personal de Limpieza, encontrando así un 92 % de portacion, porcentaje relativamente parecida a la encontrada en el Hospital Regional Honorio Delgado de Arequipa en el año 2000 donde muestran valores totales y porcentuales del personal de salud ( 9 médicos) portadores de *Staphylococcus aureus* con 77,8%.<sup>9</sup> Debe tomarse también en cuenta que las muestras procesadas en nuestro estudio fueron solo de secreción nasal y no así de manos, secreción

faríngea y otros donde este microorganismo puede colonizar y de esta manera producir infecciones.

En cuanto al perfil de sensibilidad a los antimicrobianos, el 97% fue resistente a penicilina, 20% resistente a trimetoprim+sulfametoxazol, 5% resistente a eritromicina, 3% a ciprofloxacina, 2% resistente a rifampicina, 2% resistente a gentamicina y no hubo resistencia a vancomicina y oxacilina. Esta baja resistencia a excepción de la penicilina, contrasta con los datos hallados de los pacientes tratados en el Hospital Obrero N° 1 de la ciudad de La Paz, según refiere el reporte de sensibilidad y resistencia del servicio de laboratorio durante la gestión 2005<sup>6</sup> (Anexo 5). Al determinar el perfil de sensibilidad del *Staphylococcus aureus* del personal de limpieza comparados con las muestras de los pacientes que acudieron al Hospital, tienen patrones diferentes con lo que podemos considerarlos como dos variedades diferentes debido principalmente a factores de riesgo asociados a infecciones intrahospitalarias por el microorganismo puede incluir el tiempo de hospitalización prolongado, estancia en unidad de cuidados intensivos, terapia antibiótica previa, procedimientos quirúrgicos y proximidad con un paciente colonizado o infectado por *Staphylococcus aureus*

Al terminar la década de los 50, en Estados Unidos y Francia, como mínimo el 85 % de las cepas de *Staphylococcus aureus* eran ya resistentes a la penicilina<sup>30</sup>; En nuestro estudio se ha observado que, 97 % de las cepas fueron resistentes a la penicilina, esta resistencia viene dada por la producción de una enzima penicilinasas que está bajo control de un plásmido y esto se puede atribuir al uso indiscriminado de antibióticos entre otros. La resistencia de los estafilococos a la penicilina es ya un hecho tan generalizado como se ve en este trabajo, que actualmente se prescinde de este antibiótico para tratar infecciones causadas por este germen. Es importante mencionar que la penicilina, se ha usado para ensayar la sensibilidad de todas las penicilinas susceptibles a la penicilinasas, tales como: ampicilina, amoxicilina, azlocilina, bacampicilina, hetacilina, carbenicilina, mezlocilina, piperacilina y ticarcilina.<sup>18</sup>

Es importante destacar que la metilino-oxacilino resistencia se conoce desde 1961 al poco tiempo de ser introducido los antibióticos denominados "penicilinas penicilinasas resistentes.

Esta resistencia es cruzada y por tanto se la puede extrapolar a todas las cefalosporinas de primera, segunda, tercera generación, aminopenicilinas y a los carbapenemes como el imipenem, esta propiedad se le atribuye a la baja afinidad que presentan las proteínas ligadoras de penicilina (PBP) hacia los antibióticos beta lactámicos y a la síntesis de una PBP adicional

denominada PLP2a, que tienen también baja afinidad a los beta lactámicos.<sup>31</sup> Esta resistencia se puede hacer extensiva también a los macrólidos, aminoglucósidos, quinolonas fluoradas, entre otros antibióticos. Razón por la cual en nuestro estudio no se ha probado la susceptibilidad antimicrobiana de ninguna cepa frente a las cefalosporinas.

El aspecto relevante es que en nuestro estudio el 100 % de las cepas aisladas del personal de limpieza del hospital Obrero N°1 de la ciudad de La Paz, fueron meticilino oxacilino sensible, dato importante ya que en las cuatro últimas décadas la aparición y diseminación del *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) ha convertido este agente patógeno en responsable de un gran número de infecciones intrahospitalarias en todos los continentes aún cuando existan diferencias epidemiológicas importantes entre los diferentes países e incluso entre las diferentes regiones de un mismo país. En un estudio de vigilancia de la resistencia de *staphylococcus aureus* a la oxacilina-vancomicina y patrones de coresistencia en diferentes regiones de las cuales en Latinoamérica, encontraron que la prevalencia de MRSA de los países participantes fue: Argentina, 42,7%; Brasil, 33,7%; Chile, 45,3%; Colombia, 8,6%; y, México 11,4%.<sup>21,26</sup> .Si comparamos los resultados podemos observar que en nuestro estudio hubo 0 % de resistencia a la oxacilina esto se puede deber al grupo de estudio que fue el personal de limpieza del hospital, personal que generalmente se encuentra expuestos de enfermedades pero que son portadores de *Staphylococcus aureus*, por lo que el personal de salud no constituiría un reservorio importante de los MRSA que colonizan a pacientes del mismo servicio. Este dato contrasta con los otros estudios sobre la prevalencia de *Staphylococcus aureus*, donde la población estudiada son enfermos con defensas disminuidas y diferente tipo de tratamiento, también se debe a mecanismos como sobre producción de  $\beta$ -lactamasa mutaciones de las PBP normales que disminuyen su afinidad a los  $\beta$ -lactámicos.

Las cepas de SAMR constituyen un grave problema clínico y epidemiológico en un centro hospitalario<sup>1</sup>, sin embargo parecería que en la población estudiada no fuera un problema pero hasta no realizar el estudio de portación en médicos, enfermeras, personal de laboratorio y auxiliares de enfermería no se puede afirmar este hecho.

En un boletín informativo del año 2001 presentado por el Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA) sobre vigilancia epidemiológica de resistencia a los antimicrobianos (VERA) de cepas provenientes de diferentes hospitales de la ciudad de La Paz indica que el año 1999 se reportó que el microorganismo *Staphylococcus aureus* era resistente a la meticilina en un 3% . Posteriormente en el año 2000 se determinó un porcentaje de resistencia a la meticilina de un

6.9% donde la mayoría de estas cepas presentaban resistencia cruzada y multirresistencia a diferentes antimicrobianos<sup>32</sup>, datos distintos a los encontrados en nuestro estudio donde no se halló SARM ni multirresistencia de las cepas, sin embargo es necesario mencionar que la población estudiada fue de diferentes hospitales y con un total de 2851 cepas procesadas en INLASA. Razón por la cual existen diferencias en los resultados.

## X. CONCLUSIONES

- La Prevalencia de portación nasal de *Staphylococcus aureus* en el personal de limpieza del Hospital Obrero N° 1 de la ciudad de La Paz fue del 92 %.
- Los trabajadores manuales de limpieza del Hospital Obrero N° 1 de los servicios estudiados tienen una elevada tasa de portación nasal de *Staphylococcus aureus* que va desde el 80 al 100 % en cada servicio.
- De acuerdo al perfil de susceptibilidad antimicrobiana no se encontró multiresistencia , y resistencia cruzada en los portadores de *Staphylococcus aureus*.
- No se halló en ninguno de los casos cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-oxacilino resistentes (MRSA)
- Se ha podido determinar que existe un 97 % de resistencia a la penicilina

## RECOMENDACIONES

Para evitar la aparición y diseminación de *Staphylococcus aureus* metilino resistente en el ámbito hospitalario es aconsejable el tratamiento de portadores en caso de brotes con mupirocina que según estudios ha demostrado ser altamente eficaz, lavado de manos (normas de bioseguriad), vigilancia semestral de portadores del personal hospitalario en servicios críticos como Unidades de Terapia Intensiva, Urología, Traumatología, Quirófanos y Hemodiálisis.

Es aconsejable realizar una vigilancia activa de los pacientes desde el ingreso y luego semanalmente, tratándose también a los pacientes portadores con mupirocina endonasal a fin de romper con la cadena epidemiológica de este importante microorganismo.

Para obtener un buen control de las infecciones en los hospitales es necesario que se organicen diversos tipos de actividades. Éstas dependen fundamentalmente del tipo y del tamaño del hospital y de los recursos humanos y técnicos (y, obviamente, económicos) disponibles. Los hospitales deben organizar un sistema de vigilancia que les permita conocer los niveles endémicos de infección, conocer el patrón de los microorganismos responsables de las infecciones y su resistencia a los antimicrobianos. A su vez, la vigilancia sirve para evaluar las tareas de control. Probablemente debería iniciarse una vigilancia por objetivos o áreas y

extenderla a otros lugares o procedimientos cuando sea necesario. La vigilancia de determinadas infecciones (bacteriemia) es esencial y puede establecerse fácilmente en base a los datos proporcionados por el laboratorio de microbiología. Se recomienda que todos los centros obtengan periódicamente los siguientes indicadores: proporción de infección intrahospitalarias global del centro, de infección por áreas o servicios, de infección quirúrgica, de infección en cirugía limpia, distribución porcentual de las infecciones según las principales localizaciones y porcentaje de los principales microorganismos aislados.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Bibliomed. **Estafilococos superbacterias al acecho**. Disponible en URLU <http://www.buenasalud.com/lib/ShowDoc.cfm?LibDocID=3090&ReturnCatID=13>.
2. Jawetz, Mekkink y Adelberg. **Microbiología Médica**. Vigésimo segunda Edición Ed El Manual Moderno. México D.F - Santa Fe de Bogota. 2002
3. Gonzales J, Barreto J, Rodríguez M, Machado R, Mora E, Lesca M, **GLICOPEPTIDOS**. ACTA MEDICA 1998;8(1):54-7
4. Casewell MW, and Hill RLR. **Elimination of nasal carriage of Staphylococcus aureus with mupirocin (pseudomonic acid) a controlled trial**. J Antimicrob Chemother 1986; 17: 365-372.
5. Chow JW, and Yu VL. **Staphylococcus aureus nasal carriage in hemodialysis patients. Its role in infection and approaches to prophylaxis**. Arch Intern Med 1989; 149: 1258-1262.
6. Laboratorio Hosp. "Obrero". **Anuario Estadístico** 2005.

7. Chans. Gerardo. R. **ESTAFILOCOCOS** . 2004
8. Farreras Rozman. **MEDICINA INTERNA; Enfermedades producidas por Estafilococos**. Edición en CD-ROM. Decimotercera edición. Sección 17. Parte II.
9. Mendoza Ticona Carlos Ballón Echegaray Jorge, De Los Ríos Alvarez Juan José, Velásquez Talavera Renato **Staphylococcus aureus): Colonización y susceptibilidad en pacientes y personal de salud de un hospital de referencia Arequipa** ,1996;348:836-37
10. Val. D **Los Antibióticos** <http://www.danival.org./microclin/antibioti/madreantibiotic.html>
11. Goodman y Gilman " **Las Bases Farmacológicas de la terapéutica**" Volumen II Novena Edición Mc. Graw-Hill Interamericana 1996, México D.F.
12. **Boletín Vigilancia epidemiológica de sensibilidad antimicrobiana de algunos agentes bacterianos de importancia clínica, ISP**; 1997, páginas 18 - 35. 5.
13. Dra. Braselli Adelina **ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS** . 2000
14. Bibliomed. **NUEVA DISTRIBUCIÓN DE DISCOGRAMAS BRITANIA** Disponible en URLU [http://www.britanialab.com/espanol/k07\\_01.html](http://www.britanialab.com/espanol/k07_01.html)
15. Mendoza Ticona Carlos Alberto , Velasquez Talavera Renato , Mercado Diaz Ludwig Ballon Echegaray Jorge , **Susceptibilidad antimicrobiana de Staphylococcus aureus sensible, con sensibilidad "BORDERLINE" y resistentes a la meticilina**. Rev Med Hered vol.14 no.4 Lima Oct. 2003 Revista Medica Herediana Print ISSN 1018-130X
16. Koneman M.D.E, Allen S. Dowell V, Janda W, Sommers H. **DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO** 3e. Edi. Panamericana .Madrid España . 1992.
17. Manitol SALT Agar Disponible en UVRL: :  
[http://www.austin.cc.tx.us/microbugz/html/mannitol\\_salt\\_agar.html](http://www.austin.cc.tx.us/microbugz/html/mannitol_salt_agar.html)

18. Torroba L., Rivero M., Otermin I., **Resistencia antimicrobiana y política de antibióticos: MRSA,GISAyVRE**
19. Hurtado, M. P.; de la Parte, M. A. y Brito, A. **Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. Staphylococcus aureus: Revision of the mechanisms of pathogenicity and physiopathology of staphylococcal infections.** Rev. Soc. Ven. Microbiol. v.22 n.2 Caracas jul. 2002
20. Velázquez-Meza Maria Elena, **Surgimiento y diseminación demeticilinoresistente Staphylococcus aureus** México 2003 en C(1)
21. Mendoza Ticona Carlos Ballón Echegaray Jorge, De Los Ríos Alvarez Juan José, Velásquez Talavera Renato **Staphylococcus aureus): Colonización y susceptibilidad en pacientes y personal de salud de un hospital de referencia** 1996;348:836-37.
22. Soloaga R., Corso A., Gagetti P. **Detección de meticilino-resistencia en Staphylococcus aureus: Comparación de métodos convencionales y aglutinación con mrsa-Screen latex**
23. Mac Fadin J. **PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA** Edit Medica Panamericana 1990.
24. Trigos C. **BACTERIOLOGÍA BASICA.** 1992 D. L. :4-1-819-92 Facultad de Medicina-UMSA La Paz Bolivia.
25. Nodarse Hernández R.**Estafilococos multirresistentes: uso del disco de oxacilín como marcador de resistencia a antibióticos** Rev Cubana Med Millit 2001;30(1):7-10
26. Velásquez J. Lizaraso F. Wong W. Alfaro Cliff. Veliz J. Salazar H. Gamarra J **Vigilancia de la resistencia de staphylococcus aureus a la oxacilina-vanconicina y patrones de coresistencia.** Laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Arzobispo Loayza (HNAL) de Lima 2000 – 2001

27. Adamczyk W, Lorena Tesis de grado: **Determinación de la Homoresistencia y heteroresistencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes aislados de muestras de exudados purulentos, heridas, absesos y quemados de pacientes internos en los Hospitales Boliviano Holandes de la Ciudad de El Alto, Hospital Obrero N° 1 y Hospital de Clínicas de la Ciudad de La Paz del mes de Octubre del 2003 al mes de Abril de 2004.**
28. Ticona V. Cecilio J. Tesina de grado. **Determinación de la etiología y el perfil de sensibilidad de *Staphylococcus* sp en muestras clinicas procesadas en el laboratorio de bacteriología del Hospital Obrero N° 1 de la ciudad de La Paz frente a los antimicrobianos disponibles en nuestro medio de junio a octubre del 2004.**
29. ***Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente Comunitario** Disponible en [http://www.femi.com.uy/general/01 temas/040721 samr-com.htm](http://www.femi.com.uy/general/01_temas/040721_samr-com.htm)
30. De La Parte-Pérez MA, Brito A, Hurtado , Landaeta JM, Guzmán M, Carmona . **Cambios en la resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antimicrobianos en centros clínicos del Area Metropolitana de Caracas, Venezuela.** Período 1995-2002. Rev. Soc. Ven. Microbiol. v.23 n.2 Caracas jul. 2003
31. Camarena J. Sánchez R. **INFECCIÓN POR *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA** Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Doctor Peset. Valencia
32. Boletín informativo del **Instituto Nacional de Laboratorio en Salud (INLASA)** agosto año 2001

**ANEXOS**

**ANEXO N° 1**

**HOJA CLINICA DISEÑADA PARA EL ESTUDIO**

ANTECEDENTES PERSONALES	<b>CODIGO</b>
<b>NOMBRE Y APELLIDO</b> .....	
<b>OCUPACIÓN</b> .....	
<b>EDAD</b> .....	
<b>SERVICIO</b> .....	
-----	
DATOS DE LABORATORIO	
<b>CULTIVO</b>	
<b>ANTIBIOGRAMA</b>	
<b>IDENTIFICACIÓN</b>	

## **OBSERVACIONES**

## **ANEXO N° 2**

### **PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO**

#### **PRUEBA DE LA CATALASA**

##### **Composición :**

Peroxido de hidrógeno 3 %

- Buffer fosfato (M/15) , pH:7
  - Fosfato monopotasio anhidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1.361 g
  - Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_3$ ) anhidro 1,420 g
  - Agua destilada 1000 mL.
- Tween 80, 10%. Es un polioxietileno derivado del monooleato de sorbitan , compuesto de actividad en superficie.

#### **AGAR. MANITOL SALADO**

**Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos. Es recomendado para el aislamiento de estafilococos patogénicos a partir de muestras clínicas, alimentos, productos cosméticos y otros materiales de importancia sanitaria.**

composición :

- Extracto de carne 1.0 g/L
- Pluripeptona 10.0 g/L
- d- Manitol 10.0 g/L
- Cloruro de sodio 75.0 g/L
- Agar 15 g/L
- Rojo de fenol 0.025 g/L

Suspender 111 g de polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118 – 121 °C durante 15 minutos. Debe tener un pH final de 7.4 ± 0.2.

### **Incubación**

De rutina: durante 18-24 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.

### **Resultados**

<b>Microorganismos</b>	<b>Crecimiento</b>	<b>Características de las colonias</b>
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Excelente	Amarilla
Staphylococcus epidermidis ATCC 14990	Bueno	Roja
Escherichia coli ATCC 25922	Inhibido	Inhibido
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	Inhibido	Inhibido

### **AGAR MUELLER-HINTON**

**Composición por litro de medio de cultivo:**

- Infusión de carne 300 g
- Acido casamino 17,5 g

- Almidón 1,5 g
- Agar 17 g
- pH 7,2 – 7,4

El NCCLS recomienda el uso del medio agar Mueller-Hinton en la estandarización de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de ciertas bacterias; Mueller-Hinton (Mueller-Hinton sin suplemento), el medio agar Mueller- Hinton no se debe preparar a partir de los ingredientes individuales pues esto puede disminuir la calidad.

- Siga las instrucciones del fabricante para preparar el medio.
- Después de pasar por el autoclave, enfríe el medio a 50°C en un baño de agua.
- Calcule 60–70 ml de medio por placa de 15 x 150 mm, o calcule 25–30 ml por placa de 15 x 100 mm. El agar debe ponerse en cristal de fondo plano o placas de Petri plásticas colocadas sobre una superficie a nivel uniforme para lograr una profundidad uniforme de 3 a 4 mm. El uso de más o menos agar afectará los resultados de la susceptibilidad. Una profundidad de agar mayor de 4 mm puede causar resultados de falsa resistencia, mientras que una menor de 4mm
- puede asociarse con un informe de falsa susceptibilidad.
- Las placas frescas pueden utilizarse el mismo día de haber sido preparadas o guardarse en el refrigerador (a 2°C–8°C) hasta 2 semanas. Si las placas no se utilizan dentro de los 7 días de haberse preparado, se deben envolver en plástico para minimizar la evaporación. Si existiera exceso de humedad en la superficie, estas deben colocarse, antes de utilizarlas, en la incubadora a (35°C–37°C) hasta que la humedad se evapore (por lo general de 10 a 30 minutos.). No deje las tapas entreabiertas porque el medio se contamina fácilmente.

**Control de calidad:** Debe controlarse la calidad de cada nuevo lote de agar Mueller-Hinton antes de que se use, el *S. aureus* ATCC 25923 como una cepa para control de calidad. En cada nuevo lote de Mueller-Hinton, el pH debe estar entre 7,2 y 7,4; si el pH está fuera de este rango, no se debe ajustar el pH del medio añadiéndole ácido o bases; es decir, el lote de placas de Mueller-Hinton se debe eliminar y preparar un nuevo lote. Si el pH de cada lote es muy alto o bajo, se puede devolver al fabricante el lote completo de medio deshidratado, como no

satisfactorio. La excesiva cantidad de timina o timidina en los medios pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprim, produciendo así zonas mas pequeñas, no tan nítidas o sin halo dando una falsa resistencia en la lectura.

Se debe evaluar cada lote de Mueller Hinton en su contenido de timidina utilizando la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 o ATCC 33186 y probándola con discos de cotrimoxazol. Se debe obtener un halo de inhibición claro y definido de 20 mm o más

La variación en cationes divalentes principalmente  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  afectarán los resultados con tetraciclina y aminoglucósidos frente a *P. aeruginosa*. Un exceso de dichos cationes reducirán las zonas de inhibición, y bajas concentraciones aumentarán las zonas de inhibición.

El exceso de zinc podría reducir las zonas de inhibición de los carbapenems.

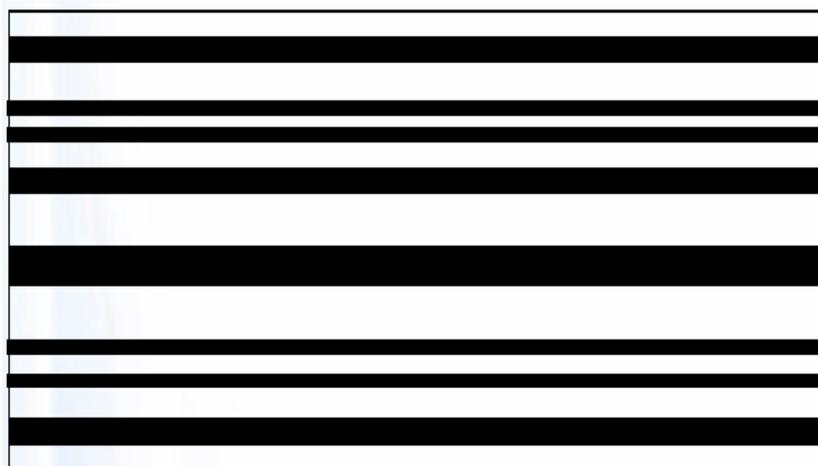
### ANEXO N° 3

#### **PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR (0,5 MC. FARLAND) PARA EL INÓCULO**

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mac Farland) como estándar. Preparación del estándar de turbidez.

- Agregar 0,5 ml de una solución de  $\text{BaCl}_2$  0,048 M ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 1,175% P/V) a 99,5 mL de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,18 M (0,36 N) (1% V/V) en constante movimiento para mantener la suspensión.
- Verificar la densidad correcta del estándar usando un fotocolorímetro ó espectrofotómetro, cuya absorbancia a 625 nm es 0,08 a 0,10 para el estándar 0,5 de Mc. Farland.
- Distribuir de 4 ml a 6 ml en tubos con tapa de rosca o tapón de jebes, similares a los que se usarán para preparar el inóculo.
- Ajustar bien las tapas o tapones y conservarlos en la oscuridad a temperatura ambiente y anotar la fecha de preparación.
- Antes de ser usado agitar vigorosamente dicho estándar de preferencia, en un agitador mecánico.

- Verificar mensualmente la densidad de los estándares de sulfato de bario, y reemplazarlo cuando sea necesario.



**ANEXO N° 4**

**LIMITES DE CONTROL PARA MONITORIZAR LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD  
ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus aureus* . LIMITES DE DIÁMETROS DE ZONA (mm)  
PARA PRUEBAS INDIVIDUALES EN MEDIO DE MUELLER – HINTON SIN SANGRE NI  
OTROS SUPLEMENTOS**

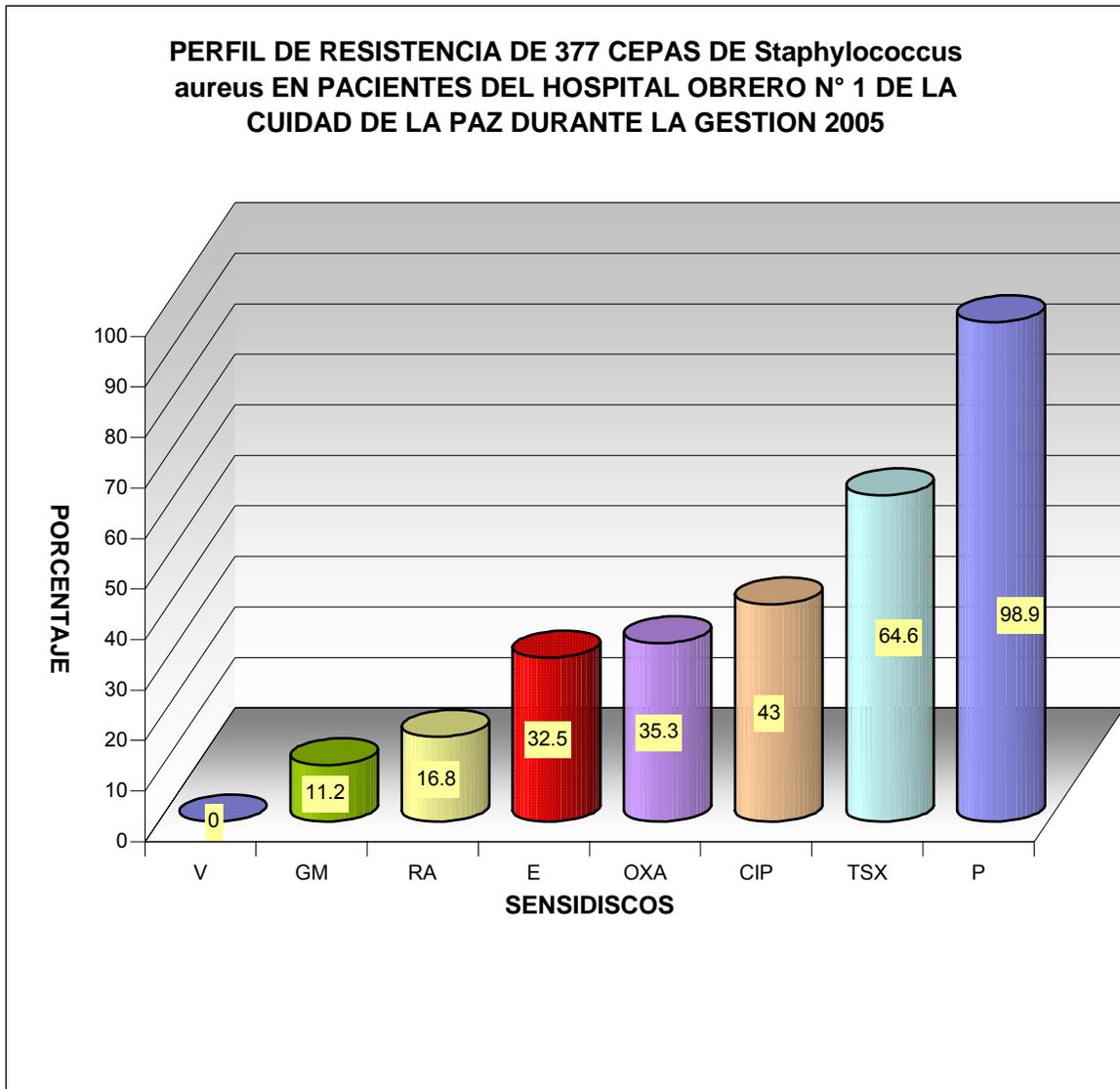
Agente antimicrobiano	Contenido del disco	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Amikacina	30 ug	20 – 26
Amoxicilina + Acido clavulanico	20/30 ug	28 – 36
Ampicilina	10 ug	27 – 35
Ampicilina + Sulvactam	10/10 ug	29 – 37
Azitromicina	15 ug	21 – 26
Cefactor	30 ug	27 – 31
Cefamandol	30 ug	26 – 34
Cefazolina	30 ug	29 – 35
Cefdinir	5 ug	25 – 32

Cefdioren	5 ug	20 – 28
Cefepine	30 ug	23 – 29
Cefmetazole	30 ug	25 – 34
Cefonizida	30 ug	22 – 28
Cefoperazona	74 ug	24 – 33
Cefotaxima	30 ug	25 – 31
Cefotetan	30 ug	17 – 23
Cefoxitina	30 ug	23 – 29
Cefprozil	30 ug	27 – 33
Ceftazidima	30 ug	16 – 20
Ceftizoxima	30 ug	27 – 35
Ceftriaxona	30 ug	22 – 28
Cefuroxima	30 ug	27 – 35
Cefalotina	30 ug	29 – 37
Cloranfenicol	30 ug	19 – 26
Ciprofloxacina	5 ug	22 – 30
Claritromicina	15 ug	26 – 32
Clinafloxacina	5 ug	28 – 37
Clindamicina	2 ug	24 – 30
Daptomicina	30 ug	18 – 23
Diritromicina	15 ug	18 – 26
Doxiciclina	30 ug	23 – 39
Enoxacin	10 ug	22 – 28
Ertapenem	10 ug	24 – 31
Eritromicina	15 ug	22 – 30
Fleroxacin	5 ug	21 – 27
Fosfomicin	200 ug	25 – 33

Garenoxacin	5 ug	30 – 33
Gatifloxacin	5 ug	27 – 33
Gemifloxacin	5 ug	27 – 33
Gentamicina	10 ug	19 – 27
Grepafoxacin	5 ug	26 – 31
Kanamycin	30 ug	19 – 23
Levofloxacin	5 ug	25 – 30
Linezolid	30 ug	25 – 32
Lomefloxacin	10 ug	23 – 29
Loracarbef	30 ug	23 – 31
Meropenem	10 ug	29 – 37
Meticilina	5 ug	17 – 22
Minocycline	30 ug	25 – 30
Moxalactam	30 ug	18 – 24
Moxifloxacin	5 ug	28 – 35
Nafcilina	1 ug	16 – 22
Netilmicina	30 ug	22 – 31
Nitrofurantoina	300 ug	18 – 22
Norfloxacin	10 ug	17 – 28
Ofloxacin	5 ug	24 – 28
Oxacilina	1 ug	18 – 24
Penicilina	10 units	26 – 37
Piperacilina + tazobactam	100/10 ug	27 – 36
Quinupristin – Dalfopristin	15 ug	21 – 28
Rifampicina	5 ug	26 – 34
Sparfloxacin	5 ug	27 – 33

Esterptomicina	10 ug	14 – 22
Sulfisoxazole	250 ug	24 – 34
Teicoplanin	30 ug	15 – 21
Telithromicin	15 ug	24 – 30
Tetraciclina	30 ug	24 – 30
Ticarcilina + Acido clavulanico	75/10 ug	29 – 37
Tobramicina	10 ug	19 – 29
Trimethoprim	5 ug	19 – 26
Trimethoprim + Sulfametoxazol	1.25/ 23.75 ug	24 – 32
Trospectomicina	30 ug	15 – 20
Trovafloxacina	10 ug	29 – 35
Vancomicina	30 ug	17 – 21

## ANEXO N° 5



**ANEXO N° 6**

**ALGORITMO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESTAFILOCOCOS**

