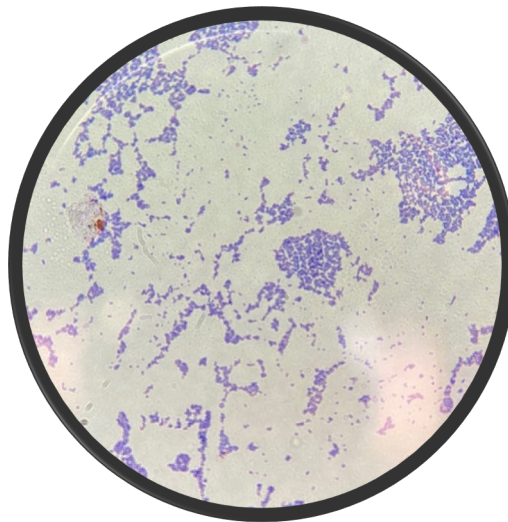


TRABAJO FIN DE GRADO.
GRADO EN FARMACIA.

Determinación fenotípica de
Staphylococcus aureus
resistente a meticilina.



Ana Martín Bermúdez
Tutora: Laila Moujir Moujir
Curso académico: 2019-2020.

INDICE

ABSTRACT	2
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1 TOMA DE MUESTRAS.....	9
3.2 MEDIO DE CULTIVO.....	10
3.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE S. AUREUS	12
3.3.1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	12
3.3.2 SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN COMERCIAL	13
3.4 DETERMINACIÓN FENOTÍPICA DE SARM.....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
5. CONCLUSIÓN.....	21
6. BIBLIOGRAFÍA.....	22

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a type of bacteria that causes a wide variety of infections in humans. The main reservoir is the human being, found in healthy carriers, especially in the nostrils, as well as in infected patients. Colonization can settle on the nasal mucosa, oropharynx, entire epidermis, chronic skin ulcers, wounds in the healing phase or in the urethra of indwelling catheter.

Its main impact is due to the methicillin resistant strains (MRSA) that show resistance to all beta-lactams (penicillins, cephalosporins, carbapenems and monobactams), and other antibiotics, which makes their treatment difficult. These strains were limited to the hospital environment (MRSA-HA), being responsible for the majority of nosocomial bacteremia. However, since the 1990s its epidemiology has changed until it appears more and more in the community environment (MRSA-CO). Community strains can infect healthy individuals and present some toxins such as Pantone-Valentine leukocidin (PVL) and phenol-soluble modulins (PSM) peptide toxins that give them greater virulence than SARM-HA. That is why the rapid detection of the nasal carrier state contributes to adequate control and treatment in order to reduce its transmission.

The objective of this work is to determine the prevalence of CO-MRSA. For this, 65 samples were collected from the nostrils of volunteers from the community environment, for subsequent identification by biochemical tests and phenotypic determination of methicillin.

Keywords:

Staphylococcus aureus, nasal carriage, methicillin resistance

RESUMEN

Staphylococcus aureus es una bacteria que causa una gran variedad de infecciones en humanos. El principal reservorio es el hombre, hallándose en los portadores sanos, especialmente en las fosas nasales, así como en los pacientes infectados. La colonización puede asentar sobre la mucosa nasal, orofaringe, epidermis íntegra, úlceras crónicas cutáneas, heridas en fase de cicatrización o en la uretra de portadores de sonda.

Su principal impacto es debido a las cepas resistentes a la meticilina (SARM) que presentan resistencia a todos los betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas) y a otros antibióticos, lo que dificulta su tratamiento. Estas cepas se limitaban al ambiente hospitalario (SARM-HA) siendo responsable de la mayoría de las bacteriemias nosocomiales. Sin embargo, desde la década de los noventa su epidemiología ha cambiado hasta aparecer cada vez más en el ambiente comunitario (SARM-CO). Las cepas comunitarias pueden infectar a individuos sanos y presentan algunas toxinas como son la leucocidina Pantón-Valentine (PVL) y las toxinas peptídicas de la modulina soluble en fenol (PSM) que las dotan de mayor virulencia que SARM-HA. Por ello, la rápida detección del estado de portador es fundamental en el control y tratamiento con el fin de reducir la transmisión.

El objetivo de este trabajo es determinar la prevalencia de SARM-CO. Para ello, se recolectaron 65 muestras de las fosas nasales de voluntarios del ambiente comunitario, para su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas y la determinación fenotípica de la resistencia a meticilina.

Palabras clave:

Staphylococcus aureus, portador nasal, resistencia a meticilina

1. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es un patógeno bacteriano de gran importancia debido a sus variadas manifestaciones clínicas en humanos. Es conocido como “estafilococo áureo”, o comúnmente estafilococo dorado, proviene del griego *staphylé*, que significa racimo y *coccus*, que significa uva; y del latín *aureus* que significa dorado.⁽¹⁾

Esta bacteria es ubicua y forma parte de la microbiota normal de las personas sanas.⁽²⁾ Aunque habita en la piel, axilas, pliegues inguinales y en la zona nasofaríngea, se caracteriza por generar cuadros clínicos con infecciones de piel, tejidos blandos, endocarditis, infecciones del torrente sanguíneo, osteomielitis, neumonías y ser causa principal de bacteriemia.⁽¹⁻³⁾ Existen algunos factores que aumentan la posibilidad de infección por este microorganismo; los niños menores de dos años, los diabéticos, infecciones pulmonares, de piel, cirugías recientes o usuarios de drogas inyectables.⁽¹⁾

S. aureus presenta numerosos factores de virulencia como son los polisacáridos capsulares, la formación de biopelículas, los componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz, entre los que se encuentran las proteínas de unión a la fibronectina, el factor clumping y toxinas α , β , γ -hemolisinas.⁽¹⁾

La resistencia a los antibióticos es una grave amenaza para la salud mundial que aumenta las estancias hospitalarias complicando el tratamiento de las infecciones y aumentando la mortalidad.⁽⁴⁾ En 1944 se descubrió el primer caso de resistencia a la penicilina debido a un mecanismo enzimático; un plásmido que contenía el gen *bla_Z*, codificaba una betalactamasa, una penicilinas capaz de hidrolizar el anillo betalactámico e inactivar al antibiótico.⁽³⁾ Hacia 1959 surge la meticilina, una penicilina semisintética resistente a las penicilinas producidas por *S. aureus*, por impedimento estérico al ser de mayor tamaño molecular que la penicilina.⁽³⁾ Sin embargo, en 1960 aparece la primera cepa de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM), en el ambiente nosocomial, con un mecanismo que le aportaba resistencia a todos los betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas). No fue hasta 1990 cuando surgen las resistencias en el ambiente comunitario.⁽³⁾

La estructura básica de la pared bacteriana es la capa de peptidoglicano. En su síntesis participan las PBPs (del inglés *penicillin-binding protein*) que son enzimas con función transpeptidasa que mediante el entrecruzamiento con las hebras de peptidoglicano proporcionan resistencia a la bacteria frente a la lisis osmótica. El

antibiótico betalactámico presenta analogía estructural con el sustrato natural de las PBPs, el dipéptido terminal D-alanina-D-alanina, y forma un complejo acil-enzima con las PBP suponiendo así una inhibición irreversible de estas.⁽³⁾

La resistencia a meticilina es un mecanismo intrínseco que se debe a la adquisición de una PBP específica, la superproducción de betalactamasa o la producción de PBP modificadas.⁽⁵⁾ La PBP que adquiere la bacteria es llamada PBP2a que presenta un sitio activo con una hendidura más estrecha lo que la hace menos accesible y, por tanto, presenta menor afinidad por el betalactámico impidiéndose así la unión a éste y la inhibición de la PBP2a (Figura 1). Otra característica de esta enzima es que posee un sitio de regulación alostérico al que se une el peptidoglicano en formación, desencadenando cambios conformacionales que producen la apertura del sitio activo permitiendo la formación del enlace peptídico.⁽³⁾ El gen *mecA* codifica a la PBP2a y se adquiere por transferencia horizontal del cassette estafilocócico cromosoma mec (SCC Mec) del que existen varios tipos.⁽⁶⁾ Hay otros mecanismos de resistencia; borderline, con hiperproducción de betalactamasa, y resistencia modificada (mod-SA) por alteración de otras PBPs. En estos mecanismos están implicados diferentes genes, entre los que se incluyen el gen para betalactamasas (gen *bla_z*) y el factor esencial de resistencia a meticilina (gen *fem*), que son menos frecuentes.^(5,7)

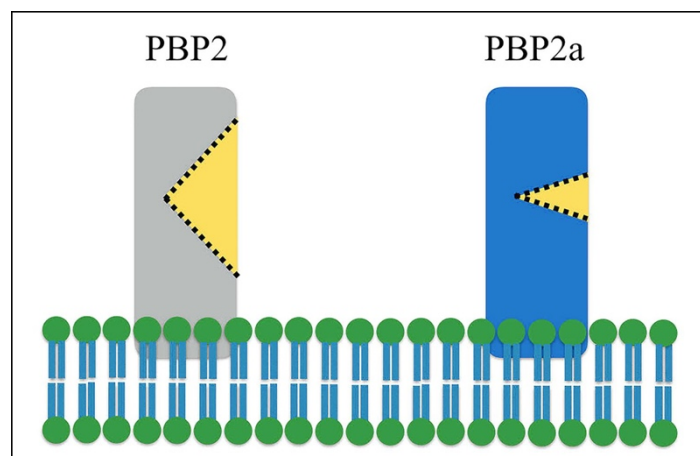


Figura 1: Esquema comparativo de la PBP y la PBP2a. Se muestra la hendidura menos accesible del sitio activo de la PBP2a causa de su resistencia a los betalactámicos.⁽³⁾

El aumento de infecciones por SARM está fomentado por el uso abusivo e incorrecto de los antimicrobianos, la utilización de antibióticos de amplio espectro, el aumento de pacientes inmunocomprometidos y de métodos invasivos que facilitan la

entrada de la bacteria a la sangre y tejidos.⁽⁸⁾ Aunque en los últimos años se han descrito cepas de SARM con sensibilidad reducida a la vancomicina, este glucopeptido, sigue siendo el antibiótico de elección para el tratamiento de cepas de SARM.⁽⁵⁾ Además, estudios *in vitro* han demostrado los efectos sinérgicos o aditivos de ceftarolina combinado con daptomicina, vancomicina o linezolid frente a SARM, siendo mayor estos efectos en la combinación ceftarolina y vancomicina.⁽⁹⁾ Otra opción terapéutica es la mupirocina, que inhibe la síntesis de proteínas y es de uso tópico por la escasa vida media y alta unión a proteínas.⁽¹⁰⁾ Está recomendado en pacientes que presentan *S. aureus* exclusivamente en las fosas nasales ya que se ha demostrado el fracaso terapéutico en aquellos que presentan una colonización en distintos órganos.⁽¹¹⁾ Recientemente, Zipperer et al. han descubierto que *Staphylococcus lugdunensis* produce lugdunina un antibiótico tiazolidínico que inhibe la colonización por *S. aureus*. La presencia de *S. lugdunensis* en las fosas nasales se asocia con una presencia reducida de *S. aureus* por lo que se está valorando utilizar la lugdunina en la prevención de infecciones estafilocócicas.⁽¹²⁻¹³⁾

Alrededor del 60% de la población presenta *S. aureus* en sus fosas nasales de manera intermitente y un 20% son portadores persistentes.⁽¹⁴⁾ El portador nasal asintomático tiene un papel predominante en la transmisión del microorganismo siendo considerado un riesgo para la comunidad y el ambiente hospitalario.⁽¹⁵⁻¹⁶⁾

La epidemiología de SARM ha variado en los últimos años. Las infecciones por SARM se asociaban exclusivamente al ámbito hospitalario (SARM-AH), sin embargo, desde la década de los noventa, existen reservorios asociados al ambiente comunitario (SARM-CO).⁽¹⁶⁾ Se considera de ambiente comunitario cuando se aísla el microorganismo dentro de las primeras 48 horas del ingreso hospitalario o de un paciente que no ha estado ingresado.⁽¹¹⁾

A diferencia de las infecciones por SARM-AH, las cuales requieren factores de riesgo asociados, las infecciones por SARM-CO afectan sobre todo a niños, adultos jóvenes y deportistas sanos sin factores de riesgo.⁽⁸⁾ Los aislados de SARM-CO se caracterizan por presentar el SCCmecIV un elemento móvil de menor tamaño que los de tipo I, II y III característicos de SARM-AH. Presentan también una citotoxina, la leucocidina Pantón-Valentine (PVL), capaz de causar necrosis tisular.⁽⁸⁾ Otro factor de virulencia de SARM-CO son las toxinas peptídicas de la modulina soluble en fenol (PSM) que atraen y lisan los neutrófilos.⁽¹⁷⁾

La mayor problemática de las cepas SARM-CO se asocia a su introducción en el ambiente hospitalario a través de pacientes o visitantes colonizados lo que supone el

desencadenamiento de brotes epidémicos nosocomiales dificultando la diferenciación entre las cepas.⁽¹⁸⁾ Una vigilancia epidemiológica adecuada es esencial para detectar portadores SARM y poder tratarlos.⁽¹⁸⁾

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es determinar la prevalencia de *Staphylococcus aureus* en la comunidad.

Los objetivos específicos son:

- El aislamiento de *S. aureus* de las fosas nasales e identificación.
- La determinación fenotípica de la resistencia a metilina.

Estos son los objetivos que se habían planteado llevar a cabo en este Trabajo Fin de Grado, pero como consecuencia de la situación del COVID-19 que estamos viviendo, estos no se han podido completar en su integridad. No obstante, como Proyecto de Investigación se aborda la metodología por la cual se pretende alcanzar los objetivos planteados y la interpretación de los resultados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 TOMA DE MUESTRAS

Se realizó la toma de muestra de fosas nasales a 65 voluntarios de ambiente comunitario durante el periodo de enero a marzo de 2020. Para ello, se emplearon hisopos humedecidos en solución salina estéril.

Se introduce el hisopo en cada una de las fosas nasales y se gira suavemente contra la mucosa durante unos 10-15 segundos (Figura 2). Posteriormente se descarga cada hisopo en una de las dos partes en las que se ha dividido una placa de Manitol Sal Agar (MSA)¹⁹ (Figura 3).

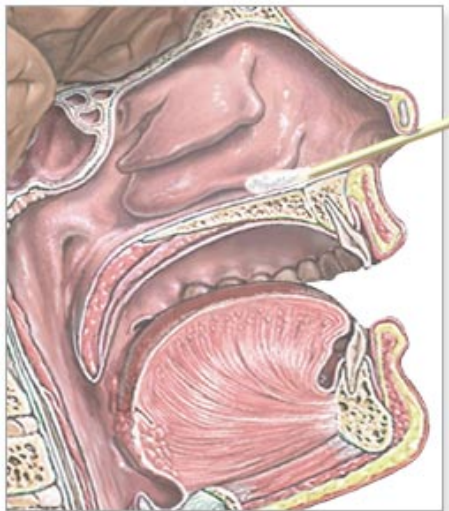


Figura 2: Toma de muestra de la fosa nasal [internet] disponible en: https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/9687.htm

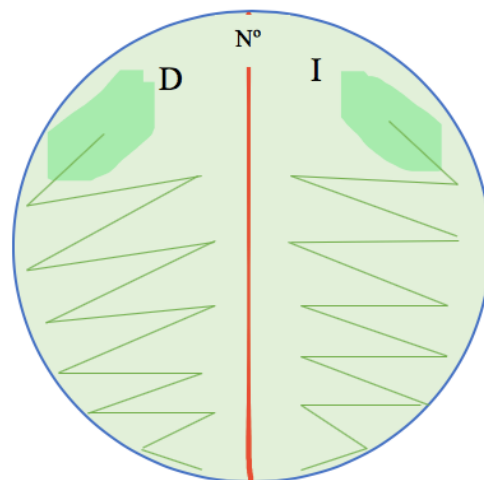


Figura 3: Siembra de la toma de muestra en MSA. El sombreado simboliza la descarga de la muestra que se realiza con un hisopo en el tercio superior de la placa. Posteriormente, se extiende la descarga mediante estrías por el resto de la placa. D: fosa nasal derecha. I: fosa nasal izquierda. N°: número de muestra

3.2 MEDIO DE CULTIVO

Los medios de cultivo empleados en el estudio fueron los siguientes:

- **MANITOL SAL AGAR (MSA, PANREAC)**

Es un medio selectivo y diferencial que permite el aislamiento de bacterias halófilas como son las del género *Staphylococcus* cuya composición es la siguiente:

Composición	(g/L)
Cloruro sódico	75
Manitol	10
Extracto de carne	1
Caseína	5
Digerido péptico de tejido animal	5
Rojo de fenol	0,025
Agar	15

- **AGAR NUTRITIVO (CULTIMED)**

Es un medio nutritivo utilizado para conservar los microorganismos aislados, cuya composición es la siguiente:

Composición	(g/L)
Peptona de gelatina	5,0
Extracto de carne	3,0
Agar	15,0

- **AGAR SANGRE (OXOID)**

Medio de cultivo suplementado con sangre para microorganismos fastidiosos y que permite apreciar la hemolisis. Su composición es la siguiente:

Composición	(g/L)
Peptona de carne	5,0
Tripteína	10,0
Cloruro de sodio	5,0

Agar	15,0
Extracto de levadura	5,0
Extracto de corazón	3,0

- **AGAR DNASA (OXOID)**

Medio utilizado para detectar la presencia de desoxirribonucleasas. Su composición es la siguiente:

Composición	(g/L)
Tripteína	20
Ácido desoxirribonucleico	2
Cloruro sódico	5
Agar	12

- **AGAR MUELLER-HINTON (CULTIMED)**

Medio utilizado para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos. Su composición es la siguiente:

Composición	(g/L)
Almidón	1,5
Infusión de carne	2
Peptona de caseína hidrolizada	17,5
Agar	17

Todos los medios fueron preparados y esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

3.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE *S. aureus*

3.3.1 Pruebas bioquímicas

Catalasa.

Esta enzima está presente en la mayoría de las bacterias que presentan citocromos. La catalasa hidroliza el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, lo que produce la liberación de burbujas de gas (O_2). Para ello, se deposita una colonia del cultivo puro en agar nutritivo sobre un portaobjeto y se añade una gota de H_2O_2 al 30%. La liberación de gas y, por tanto, un burbujeo, indica un resultado positivo.⁽²⁰⁾

Hemólisis.

Colonias en cultivo puro en agar nutritivo se inocularon en placas de agar sangre, siguiendo el esquema mostrado en la Figura 4. Tras la incubación a $37^\circ C$ durante 24-48h se determinó el patrón de hemólisis.⁽²¹⁾



Figura 4: Diseño en que se disponen las colonias de los aislados para determinar el patrón de hemólisis.

Coagulasa

Esta prueba se realiza para distinguir a especies del género *Staphylococcus*. La enzima coagulasa, transforma el fibrinógeno en fibrina y existen en dos formas: clumping factor o coagulasa unida a la pared celular y coagulasa libre o enzima extracelular que solo se produce cuando la bacteria se cultiva en caldo. Ambas se detectan mediante la

prueba en tubo. Para ello, a tubos de hemólisis con 200 µl de plasma de conejo (Biomerieux), se agregan 2 colonias en cultivo puro en agar nutritivo, se agita por rotación y se incuba durante 4h a 37°C. La presencia de un coagulo se considera la prueba positiva. Sin embargo, si éste no se ha formado, se continúa incubando hasta las 24h a 22-25°C. No se realiza a cabo a 37°C porque la fibrinolina de *S.aureus* puede lisar el coagulo.⁽²⁰⁾

DNAsa

El fundamento de la prueba es la hidrólisis del DNA polimerizado en presencia de la DNAsa. Las placas de Petri una vez inoculadas con los aislados se incuban durante 24 horas a 37°C y la presencia de DNAsa se detecta mediante la adición de ácido clorhídrico 1N que precipita al DNA pero no a los fragmentos originados por la actividad hidrolítica de la enzima, observándose la presencia por la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento microbiano.⁽²⁰⁾

3.3.2 Sistema de identificación comercial

Pastorex® Staph-Plus (Bio-Rad).

Es una prueba rápida de aglutinación diseñada para la detección rápida del factor de afinidad para el fibrinógeno, la proteína A y los polisacáridos capsulares de *S. aureus*. La prueba se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories Diagnostics Group).⁽²²⁾

API Staph

Se trata de un sistema estandarizado de identificación de los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria* mediante 20 microtubos con substratos deshidratados en los que se inocula una suspensión bacteriana y se someten a incubación durante 24h según las instrucciones del fabricante (Biomeriux, SA). Después de 24 horas, se leen los resultados traducidos en cambios de color (Figura 5) que se interpretan con las tablas de lectura y posteriormente la identificación se realiza con el catálogo analítico o el software de identificación.⁽²³⁾



Figura 5: Resultados de la prueba de API Staph.

3.4 DETERMINACIÓN FENOTÍPICA DE SARM

Para determinar el perfil de resistencia de los aislados se utilizan placas de Mueller-Hinton agar previamente suplementadas con oxacilina a una concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y NaCl al 4%. Se utiliza oxacilina por su mayor estabilidad en el medio.⁽²⁴⁾

Dichas placas se inoculan, por un lado, con 2, 5 y 10 μL de una suspensión de cada aislado equivalente al 0,5 de la escala MacFarland y, por otro lado, en estría con un hisopo impregnado con la suspensión, como se muestra en la Figura 6. La presencia de crecimiento bacteriano tras la incubación durante 24-48 horas a 30-35°C es indicativo de resistencia a la meticilina.⁽²⁴⁾

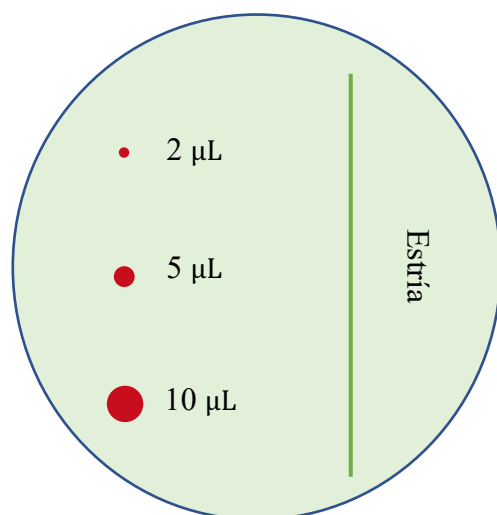


Figura 6: Representación de la placa para la prueba de resistencia a la meticilina.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE *S. aureus*

El medio MSA es idóneo para el aislamiento de especies del género *Staphylococcus* por su carácter selectivo (7,5% NaCl) y diferencial (presencia del manitol). De manera que las colonias fermentadoras del manitol como se observa en la Figura 7, corresponden a colonias amarillas con viraje del medio.⁽²⁵⁾ Las colonias no fermentadoras del manitol se observarían de un color de blanco a rosa. De las 65 muestras que se recogieron para este estudio, 15 resultaron ser fermentadoras del manitol (23%) y, por tanto, consideradas sospechosas de *S. aureus* (Figura 8).

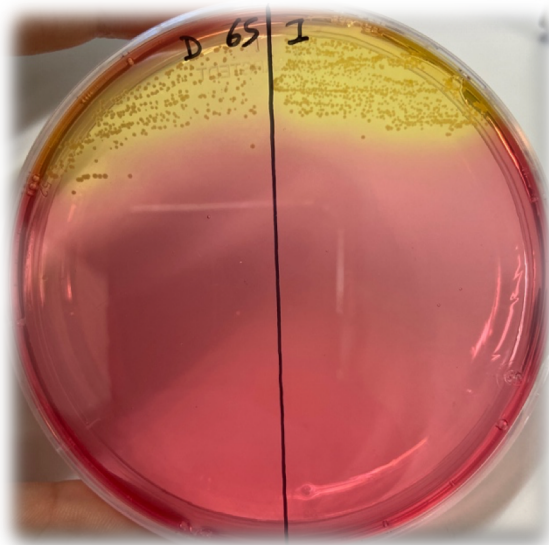


Figura 7: Medio MSA que presenta colonias amarillas con viraje del medio, representa un MSA positivo para *S. aureus*.

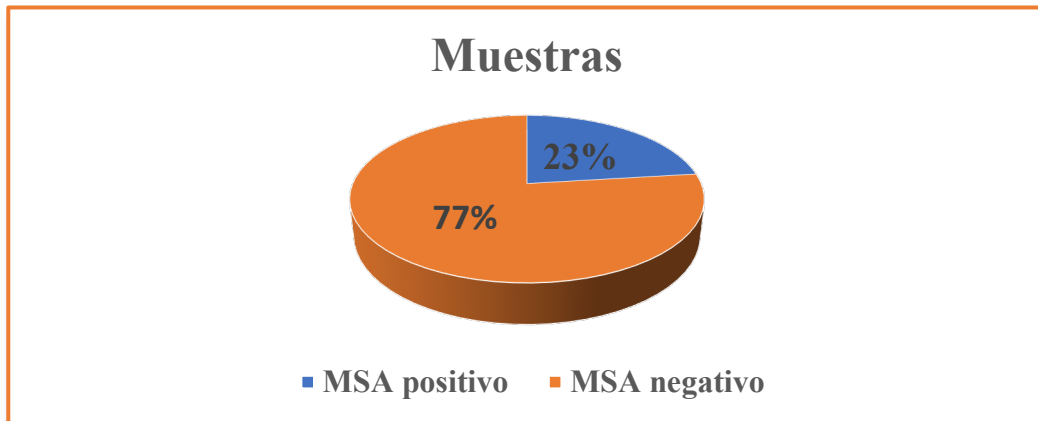


Figura 8: Selección de aislados fermentadores del manitol

Seguidamente fueron sometidas a la tinción de Gram, que permite determinar la forma, tamaño, tipo de agrupación y respuesta a la tinción.

De las 15 muestras sometidas a tinción, 12 de ellas presentaron las características morfológicas y tintoriales del género *Staphylococcus*, es decir, cocos agrupados en racimos y Gram positivos (Figura 9). Las otras tres 3 muestras fermentadoras del manitol resultaron ser Gram positivas, pero al no presentar la morfología en racimo fueron descartadas.

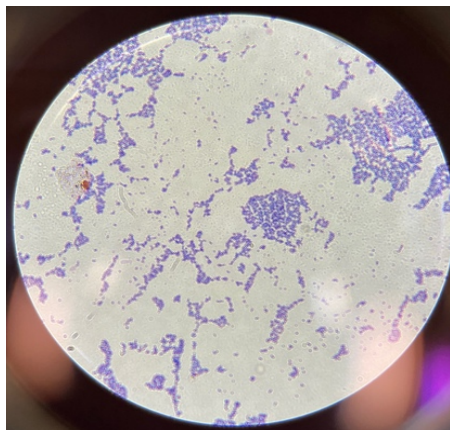


Figura 9: Visualización al microscopio de cocos gram positivos agrupados en racimo.

Posteriormente, los 12 aislados de *S. aureus* se sometieron a la prueba de la catalasa como se indicó en el apartado de Material y Métodos, y resultaron ser catalasa positivas y, por tanto, considerados de manera presuntiva como *S. aureus* (Figura 10).

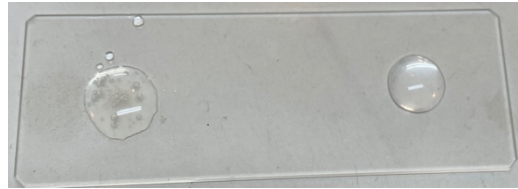


Figura 10: Prueba de la catalasa en un portaobjetos. A la izquierda resultado positivo y a la derecha resultado negativo.

En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos desde la toma de muestra hasta la selección de las muestras sospechosas de *S. aureus*.

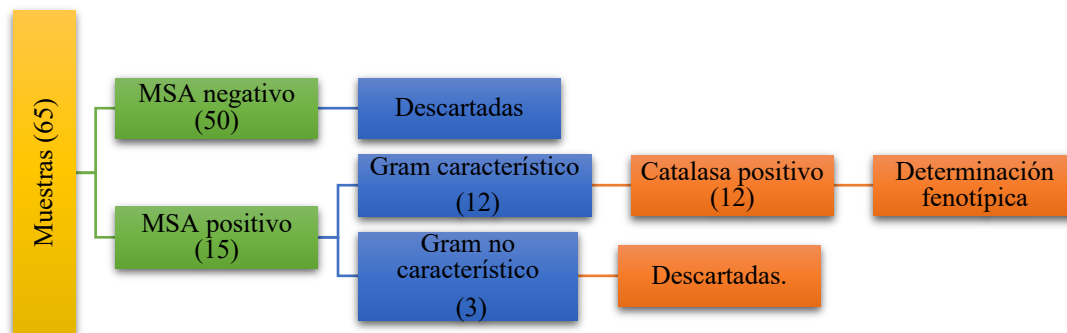


Figura 11: Resultados obtenidos tras el cultivo en placas de MSA de las muestras nasales procedentes de la población comunitaria sometida a estudio.

• IDENTIFICACION FENOTÍPICA

Para la diferenciación fenotípica se analizan tres de los factores de virulencia característicos de *S. aureus* como son las hemolisinas, la coagulasa y la DNasa.

Las hemolisinas de *S. aureus* son toxinas citolíticas que causan una gran destrucción tisular que no se limita a la destrucción de eritrocitos. Esta bacteria puede presentar 5 toxinas citolíticas: alfa, beta, delta, gamma y leucocidina de Pantón- Valentine [PVL].⁽⁸⁾ Según su actuación en agar sangre puede ser una α -hemólisis (parcial), β -hemólisis (total) o γ -hemólisis (no hemólisis), y se visualizarían con un halo verdoso alrededor de la colonia, un halo transparente o la ausencia de halo, respectivamente.⁽²¹⁾ Por lo general, es

considerada una bacteria β -hemolítica.⁽¹⁾ En cambio, en este estudio, de las 12 muestras que se analizaron 7 presentaron un hemólisis β y 5 no hemolítica o γ -hemólisis (Figura 12).

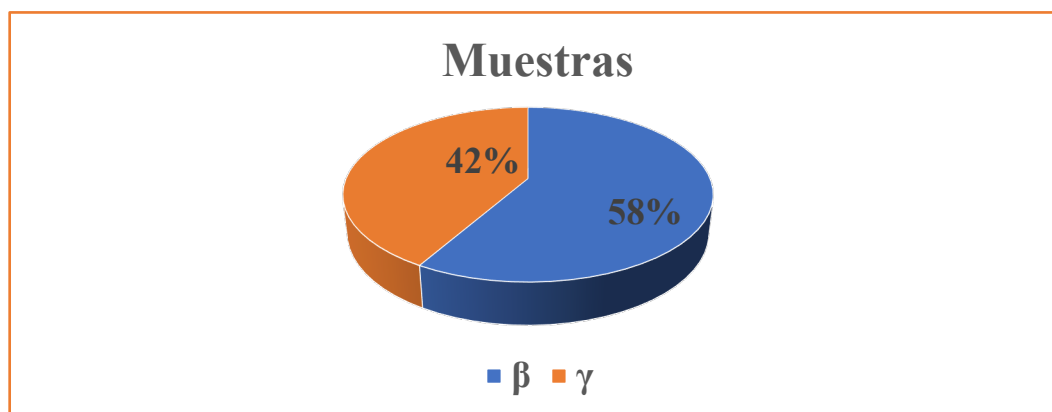


Figura 12: Proporción de aislados que presentan hemólisis β y γ hemólisis.

A partir de este momento no se pudo continuar con la parte experimental (prueba de la coagulasa y DNAsa), por la situación de estado de alarma por Covid-19.

Para diferenciar a *S. aureus* de otras especies como son *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* se determina la prueba de la coagulasa. Como comentamos existen dos tipos de esta enzima: la coagulasa ligada (clumping factor) y la libre. La primera convierte el fibrinógeno en fibrina de manera directa, absorbe el fibrinógeno y lo altera produciendo la agregación de los estafilococos al precipitar sobre ellos cuando entra en contacto con el plasma. La segunda lo hace de forma indirecta, reacciona con una sustancia en el plasma similar a la trombina y forman el coágulo sin requerir calcio y siendo insensible a la heparina.⁽²⁶⁾ El resultado esperado es que los 12 aislados que han resultados ser fermentadores del manitol, catalasa positiva, fuesen coagulasa (+). Esto confirmaría fenotípicamente que se trataría de aislados de *S.aureus*.

Para completar la determinación fenotípica se hace la prueba de la DNAsa ya que la presencia de desoxirribonucleasa es indicadora de la patogenicidad y se considera una prueba confirmatoria diagnóstica.⁽¹⁾ En la Figura 13, se muestra como se apreciaría un resultado positivo (halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano) tras la adición de HCl y la ausencia de halo, como negativo. Con lo que es de esperar que, si los 12 aislados fuesen coagulasa positivos, presentaran la enzima DNAsa.

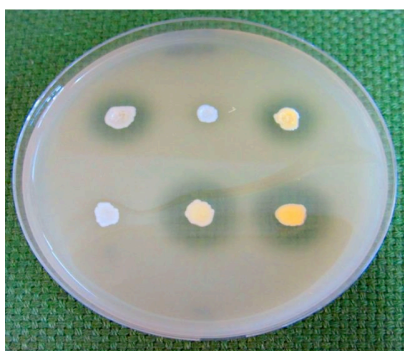


Figura 13: Prueba de la DNasa. Los aislados DNasa positivos se muestran con un halo transparente de hidrólisis del DNA alrededor de la colonia, revelado tras la adición de HCl 1N.

Llegados a este punto, cuando alguna de las pruebas bioquímicas entrase en contradicción con el diagnóstico del aislado como *S. aureus*, se efectuaría su comprobación con las técnicas indicadas en el apartado de material y métodos como son la prueba de aglutinación Pastorex® Staph-Plus y la multiprueba API Staph. De hecho, se tuvo la ocasión de efectuarla a dos de los aislados, confirmándose que se trataba de *S. aureus*.

- **DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA FENOTÍPICA DE *S. aureus* A LA METICILINA (SARM)**

Se considera que una cepa de *S.aureus* es resistente a meticilina (SARM) aquella que sea capaz de crecer en el medio Mueller-Hinton suplementado con NaCl (4%) y oxacilina 6 µg/mL tal y como se observa en la Figura 14.⁽²⁴⁾

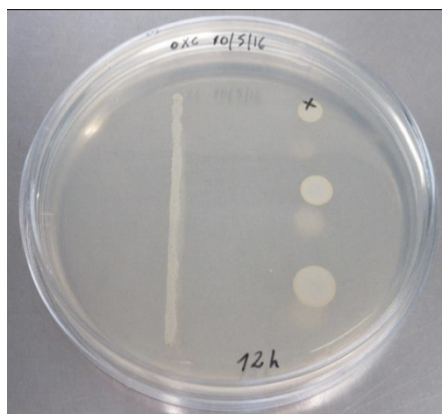


Figura 14: Crecimiento de una cepa en medio Mueller-Hinton suplementado con NaCl (4%) y oxacilina 6 µg/mL.

Hay diferentes expresiones fenotípicas de resistencia a meticilina, una minoría de cepas SARM presentan el mismo grado de resistencia (resistencia homogénea) y la mayoría expresan diferente grado (resistencia heterogénea). Las cepas heterogéneas presentan una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donde menos del 0,1% sobrevive a concentraciones mayores de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la mayor parte no crece a concentraciones entre 1-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.⁽²⁷⁾ La expresión de cepas heterorresistentes se ve favorecida por unas condiciones específicas como son; osmolaridad del 2-4% de NaCl, temperatura entre 30-35° C y tiempo de incubación entre 24-48h.⁽²⁷⁾

5. CONCLUSIÓN

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana es fundamental no solo para instaurar un tratamiento eficaz sino también para detectar las cepas resistentes y con ello reducir la diseminación de los organismos multirresistentes o de genes de resistencia a través de los hospitales y de la comunidad. En este sentido *S.aureus* resistente a meticilina (SARM) es un ejemplo de multirresistencia, es decir se ha hecho no solo resistente a los β -lactámicos, sino también a otros antibióticos

Las medidas más eficaces para el control de las infecciones por *S. aureus* en general y SARM en particular, es la detección y las barreras que limitan su extensión.

- De las 65 muestras recolectadas de fosas nasales del ambiente comunitario, 12 de ellas resultaron ser presuntamente *S. aureus*, fermentador del manitol, catalasa positivo, β o γ -hemolíticos. Esto supondría un 18% del total de las muestras tomadas.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Pasachova Garzón J, Ramirez Martinez S, Muñoz Molina L. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. Nova [Internet] 10 de marzo de 2020 [consultado 5 de abril de 2020]; 17 (32): 25-38. Disponible en: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/3631>
2. Walana W, Bobzah B, Kuugbee E, Acquah S, Ezekiel V, Yabasin I et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage among healthcare workers, inpatients and caretakers in the Tamale Teaching Hospital, Ghana. Scientific African [Internet] 2020 [consultado 27 marzo 2020]; 8: e00325. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468227620300636?via%3Dihub>
3. Aguayo Reyes A, Quezada Aguiluz M, Mella S, Riedel G, Opazo Capurro A, Bello Toledo H et al. Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. Rev. Chil. Infectol. [Internet] 2018 [consultado 5 abril 2020]; 35 (1): 7-14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000100007>.
4. Serra Valdés MA. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. Rev. Haban. Cienc. Méd. [Internet] 2017 Jun [consultado 28 marzo 2020]; 16 (3): 402-419. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011&lng=es.
5. Camarena JJ, Sánchez R. Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Control de calidad de la SEIMC. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>
6. Turner NA, Sharma Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Pratik PS, Carugati M et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. Nat. Rev. Microbiol. [Internet] 2019 [consultado 25 marzo 2020]; 17: 203–218. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
7. García A, Martínez C, Juárez RI, Téllez R, Paredes MA, Herrera M del R et al. Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* en México.

- biomedica [Internet] 1 de septiembre de 2019 [consultado 27 de marzo de 2020]; 39 (3): 513-2. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/4131>
8. Cervantes García E, García González R, Salazar Schettino PM. Importancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. Rev. Latinoam. Patol. Clin. Med. Lab. [Internet] 2014 [consultado 2 de mayo de 2020]; 61 (4): 196-204. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt144a.pdf>
 9. Gil Romero Y, Gómez Garcés JL. *In vitro* activity of ceftaroline in combination with other antimicrobials active against *Staphylococcus* spp. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet] Enero 2020 [Consultado 25 de Abril de 2020]; 38 (1): 25-27. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2019.03.009>
 10. Goldmann O, Cern A, Müsken M, Rohde M, Weiss W, Barenholz Y et al. Liposomal mupirocin holds promise for systemic treatment of invasive *Staphylococcus aureus* infections. Journal of controlled release [Internet] Diciembre 2019 [Consultado 25 de abril 2020]; 316: 292-301. Disponible en : <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.11.007>
 11. Rodríguez Baño J, Bischofberger C, Álvarez Lerma F, Asensio A, Delgado T, García Arcal et al. Vigilancia y control de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. Documento de consenso GEIH-SEIMC y SEMPSPH. Elsevier [Internet] 2008 [Consultado 28 de marzo de 2020]; 26 (5): 285-298. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-vigilancia-control-staphylococcus-aureus-resistente-S0213005X08727095>
 12. Taha L, Stegger M, Söderquist B. *Staphylococcus lugdunensis*: antimicrobial susceptibility and optimal treatment options. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. [Internet] 2019 [Consultado 28 de marzo de 2020]; 38: 1449–1455. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03571-6>
 13. Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C et al. Human Commensals Producing a Novel Antibiotic Impair Pathogen Colonization. Nature [Internet] 2016 [Consultado 28 de marzo de 2020]; 535: 511-16. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature18634>
 14. Adame Gómez R, Vences Velázquez A, Parra Rojas I, Rodríguez Batatz E, Muñoz Barrios S, Ramírez- Peralta A. *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina

- (SARM) y productores de enterotoxina A aislados de portadores nasales asintomáticos entre estudiantes universitarios de México. *Kasmera* [Internet] 2019 [Consultado 17 de febrero 2020]; 47 (1): 14-20. Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/kasmera/article/view/24672>
15. González Martínez ML, Hernández Castellanos N, Apaulaza Corrales K, Díaz Calzada M, Cordero González A. Portadores asintomáticos nasal y faríngeo de *Staphylococcus aureus* en trabajadores de un hospital pediátrico. *Rev. Ciencias Médicas* [Internet]. 2016 Junio [consultado 8 mayo 2020]; 20 (3): 23-29. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942016000300007&lng=es.
 16. Hernández Aguilera V, García M, García J, Pérez-Ybarra L, Rodríguez Leo C. *Staphylococcus aureus* en escolares portadores asintomáticos del estado Aragua, Venezuela. *Revista Biomedica* [Internet] 2020 [Consultado 27 abril 2020]; 31(1). Disponible en: <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v31i1.661>
 17. Schreiner J, Kretschmer D, Klenk J, Otto K, Bühring HJ, Stevanovic S et al. Los péptidos de modulina solubles en fenol *Staphylococcus aureus* modulan las funciones de las células dendríticas y aumentan el cebado in vitro de las células T reguladoras. *J. Immunol.* [Internet] 2013 [Consultado 2 de mayo 2020]; 190 (7): 3417-3426. Disponible en: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202563>
 18. Cercenado E, Ruiz de Gopegui E. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina de origen comunitario. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* [Internet] 2008 [Consultado 27 de abril 2020]; 26 (13): 19-24. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-staphylococcus-aureus-resistente-meticilina-origen-S0213005X08765789>
 19. Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. *Diagnóstico Microbiológico de Bailey & Scott*. 11th ed.: Panamericana; 2004.
 20. Fernandez Olmos A, García de la Fuente C, Saéz Nieto JA, Valdezate Ramos S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)* [Internet] 2010 [Consultado 25 de marzo 2020]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

21. Prats G. Microbiología clínica. 1 ed. Madrid: Panamericana [Internet] 2005 [Consultado 1 de abril 2020]. Disponible en: https://books.google.es/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA135&dq=medio+manitol+sal+agar&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwix_ann_LXpAhUQA2MBHYcECy0Q6AEIQjAD#v=onepage&q=medio%20manitol%20sal%20agar&f=false
22. Bio-Rad España. [Sede Web] 2020 [Consultado 2 de abril de 2020]. Disponible en: <http://www.bio-rad.com/es-es/product/latex-agglutination-tests/pastorex-staph-plus>.
23. Api Staph. bioMérieux SA [Sede Web] 2009 [Consultado 2 de abril de 2020]. Disponible en: https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/9914/mod_resource/content/1/API.STAPH.instructivo%20REF_20500.pdf
24. García Rodríguez JA, Cantón R, Sánchez JE, Gomez Lus ML, Martínez Martínez L, Rodríguez Avial C, et al. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) [Internet] 2000 [Consultado 2 de abril de 2020] Disponible en: http://coesant-seimc.org/documents/MétodosEspeciales_Sensibilidad.pdf
25. Rodríguez Cavallini E, Gamboa Coronado MM, Hernández Chavarría F, García Hidalgo JD. Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio [Internet] 1. ed. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costarica; 2005 [Consultado 5 de abril de 2020]. Disponible en: <https://books.google.es/books?id=vwB0fgirgN0C&printsec=frontcover&dq=Bacteriolog%C3%ADa+general:+principios+y+pr%C3%A1cticas+de+laboratorio.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjX75uGydvpAhXxzoUKHehUCMoQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Bacteriolog%C3%ADa%20general%3A%20principios%20y%20pr%C3%A1cticas%20de%20laboratorio.&f=false>
26. Herman Bausier P, Labate C, Towell AM, Derclaye S, Geoghegan JA, Dufrière YF. *Staphylococcus aureus* clumping factor A is a force-sensitive molecular switch that activates bacterial adhesion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Internet] 2018 [Consultado 2 de abril de 2020]; 115 (21): 5564–5569. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.1718104115>
27. Ardanuy C, Cercenado E, Morosini MI, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. Sociedad Española de

Enfermedades Infecciosas y Microbiología (SEIMC) [Internet] 2011 [Consultado 2 de abril de 2020] Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>