

UNIVERSIDAD PRIVADA SAN JUAN BAUTISTA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA
ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA
PATOLÓGICA



FENOTIPOS DE RESISTENCIA A METICILINA Y CLINDAMICINA
INDUCIBLE EN ESTAFILOCOCOS AISLADOS DE HEMOCULTIVOS DE
PACIENTES HOSPITALIZADOS DEL HOSPITAL NACIONAL GUILLERMO
ALMENARA IRIGOYEN - 2018

TESIS

PRESENTADA POR BACHILLER

SHARON SAMIRA SAUÑE GALLEGOS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADA EN TECNOLOGÍA MÉDICA ESPECIALIDAD EN
LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

LIMA – PERÚ

2020

ASESOR

Mag. Segundo Ramos León Sandoval

AGRADECIMIENTO

A mi familia y amigos que me inspiran todos los días a seguir adelante.

A los tecnólogos médicos y técnicos de laboratorio del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Nacional Guillermo Almenara que me motivaron y ayudaron en la ejecución de la tesis.

Por último, un agradecimiento especial a mi asesor, el Mag. Segundo León Sandoval y a la Directora de la Escuela Profesional de Tecnología Médica de la UPSJB, Mag. Evelyn Bardales Guzmán.

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a Dios, a mi familia y mis amigos, quienes me motivaron y apoyaron durante todo el desarrollo de mi formación profesional.

RESUMEN

Objetivo: Entre los fenotipos de resistencia a meticilina y clindamicina inducible, determinar el patrón de resistencia más frecuente, en estafilococos aislados de hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen (HNGAI) durante los meses de enero a junio del año 2018.

Materiales y métodos: Se realizó un estudio descriptivo, cuantitativo, de tipo transversal. Para determinar los patrones de resistencia, se utilizó el método difusión en agar (disco difusión) y difusión doble disco (D test), respectivamente. Para el análisis de los datos se usó el programa Microsoft Excel© versión 2016 (Microsoft Corporation, Seattle, WA).

Resultados: Se aislaron 120 cepas de estafilococos, de éstas, se identificó resistencia a meticilina y clindamicina inducible, de los cuáles se encontró que la resistencia a meticilina fue la más frecuente (79/120; 66%), mientras que la resistencia a clindamicina inducible fue la menos frecuente (13/120; 11%). Se encontró que, de acuerdo al tipo de resistencia presentada, el *S. aureus* (20/79; 25%) fue la especie que más resistencia presentó, y respecto a la resistencia a clindamicina inducible, el *S. epidermidis* fue la especie que más resistencia presentó (5/13; 38%).

Conclusiones: Del total de 120 aislamientos de estafilococos provenientes de pacientes hospitalizados evaluados para dos tipos de resistencia, se encontró que el patrón más frecuente fue a meticilina. Se identificó al *Staphylococcus aureus* como la especie aislada con más frecuencia de resistencia a meticilina y clindamicina.

Palabras claves: *Estafilococos, D-test, Disco difusión, resistencia bacteriana, resistencia a meticilina, resistencia a clindamicina inducible.*

ABSTRACT

Aim: Among the phenotypes of resistance to methicillin and inducible clindamycin, determine the most frequent resistance pattern in *Staphylococcus* isolated from blood cultures of hospitalized patients of the Guillermo Almenara Irigoyen National Hospital during the months of January to June of 2018.

Materials and methods: A descriptive, quantitative, cross-sectional study. To determine resistance patterns, select the agar diffusion method (diffusion diffusion) and double disc diffusion (test D), respectively. For the analysis of the data, the Microsoft Excel © version 2016 (Microsoft Corporation, Seattle, WA) was used.

Results: 120 strains of *Staphylococcus* were isolated. Resistance to methicillin and inducible clindamycin was identified. We found that methicillin resistance was the most frequent (79/120; 66%), while inducible clindamycin resistance was the least frequent (13/120; 11%). Among the most frequent species of *Staphylococcus* resistant to methicillin and inducible clindamycin, was found that, according to the type of resistance presented, *S. aureus* (20/79; 25%) was the most prevalent, and with regards to inducible clindamycin resistance, *S. epidermidis*, was the specie with the highest resistance (5/13; 38%).

Conclusions: Of the 120 *Staphylococcus* isolates from hospitalized patients evaluated for two types of resistance, we found that the most frequent pattern was methicillin. *Staphylococcus aureus* was identified as the most frequently isolated specie with resistance to methicillin and clindamycin.

Keywords: *Staphylococcus*, *D-test*, *Disc-diffusion*, *bacterial resistance*, *methicillin resistance*, *inducible clindamycin resistance*

INTRODUCCIÓN

Los *Staphylococcus* forman parte de la microbiota normal del cuerpo humano ya sea a nivel de piel o mucosas. Se presenta como un germen oportunista y es causante de elevadas cifras de morbilidad y mortalidad a nivel hospitalario. Las infecciones nosocomiales causadas por el género *Staphylococcus* van en aumento debido a que, son capaces de desarrollar diversos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos de uso común en la práctica clínica, porque adquieren fácilmente elementos exógenos por transferencia horizontal entre sus propias especies.

Se observará en el primer capítulo, el planteamiento del problema, así como los objetivos generales y específicos, también se observará la justificación principal y propósito del presente estudio.

Para el segundo capítulo, observaremos los antecedentes internacionales y nacionales para el cual se tomaron en cuenta, así como las bases teóricas que sostienen este estudio, las variables principales y la definición de términos operacionales.

El tercer capítulo, indica la metodología global del trabajo, donde se observará los métodos usados, la población y muestra que se tomó en cuenta.

Para el cuarto y quinto capítulo, observaremos los principales resultados tabulados en tablas, discusiones, conclusiones y las recomendaciones más importantes.

Finalmente observaremos los anexos al final de este trabajo.

ÍNDICE

CARÁTULA	I
ASESOR	II
AGRADECIMIENTO	III
DEDICATORIA	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
INTRODUCCIÓN	VII
LISTA DE TABLAS	XI
LISTA DE GRÁFICOS	XII
LISTA DE ANEXOS	XIII
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	4
1.2.1. GENERAL	4
1.2.2. ESPECÍFICOS	4
1.3. JUSTIFICACIÓN	5
1.4. DELIMITACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	6
1.5. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN	6
1.6. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	7
1.6.1. GENERAL	7
1.6.2. ESPECÍFICOS	7
1.7. PROPÓSITO	8
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	9
2.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	9

2.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES	9
2.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES	12
2.2. BASE TEÓRICA	14
2.2.1. GÉNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	14
2.2.2. BACTERIEMIA	21
2.3. MARCO CONCEPTUAL	22
2.4. HIPÓTESIS	23
2.5. VARIABLES	23
2.6. DEFINICIÓN OPERACIONAL DE TÉRMINOS	25
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	26
3.1. DISEÑO METODOLÓGICO	26
3.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	26
3.1.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	26
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA	26
3.2.1. POBLACIÓN	26
3.2.2. MUESTRA	26
3.2.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN	27
3.3. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	27
3.4. DISEÑO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	31
3.5. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	31
3.6. ASPECTOS ÉTICOS	31
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	32
4.1. RESULTADOS	32
4.2. DISCUSIÓN	37
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
5.1. CONCLUSIONES	43

5.2. RECOMENDACIONES	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE TABLAS

TABLA N°1: PATRÓN DE RESISTENCIA MÁS FRECUENTE, ENTRE LOS FENOTIPOS DE RESISTENCIA A METICILINA Y CLINDAMICINA INDUCIBLE EN <i>STAPHYLOCOCCUS</i> AISLADOS DE HEMOCULTIVOS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS DEL HOSPITAL NACIONAL GUILLERMO ALMENARA IRIGOYEN DURANTE LOS MESES DE ENERO A JUNIO DEL 2018	32
TABLA N°2: DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> EN HEMOCULTIVOS DE ACUERDO AL SERVICIO DE PROCEDENCIA EN PACIENTES DEL HOSPITAL NACIONAL GUILLERMO ALMENARA IRIGOYEN DE ENERO A JUNIO DEL 2018	34
TABLA N°3: FRECUENCIA DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SEGÚN ESPECIE Y SU DISTRIBUCIÓN DE ACUERDO AL TIPO DE RESISTENCIA PRESENTADA POR PACIENTES HOSPITALIZADOS DEL HOSPITAL NACIONAL GUILLERMO ALMENARA IRIGOYEN DURANTE LOS MESES DE ENERO A JUNIO DEL AÑO 2018	35
TABLA N°4: FRECUENCIA DE LOS PATRONES DE RESISTENCIA QUE PRESENTAN LOS <i>STAPHYLOCOCCUS</i> EN HEMOCULTIVOS DE ACUERDO AL SERVICIO DE PROCEDENCIA DEL HOSPITAL NACIONAL GUILLERMO ALMENARA IRIGOYEN DE ENERO A JUNIO DEL 2018	36
TABLA N°5: DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS PERTENECIENTES A LOS FENOTIPOS DE RIC, SEGÚN CLSI 2017 M100 2017	63

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO N°1: FRECUENCIA DE FENOTIPOS RESISTENTES CLINDAMICINA INDUCIBLE AISLADOS DE HEMOCULTIVOS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS DEL HOSPITAL NACIONAL GUILLERMO ALMENARA IRIGOYEN DE ENERO A JUNIO DEL 2018 33

LISTA DE ANEXOS

ANEXO N°1: MATRIZ DE CONSISTENCIA DE LA TESIS	52
ANEXO N°2: CUADRO DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES DE LA TESIS	53
ANEXO N°3: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	54
ANEXO N°4: PROCEDIMIENTO DE LOS MÉTODOS MANUALES Y AUTOMATIZADOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA DEL HNGAI	55
ANEXO N°5: MEDIDAS DE HALOS DE INHIBICIÓN PARA CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN DE CEFOXITINA, CLINDAMICINA, ERITROMICINA EN <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> Y <i>STAPHYLOCOCCUS COAGULASA</i> NEGATIVA SEGÚN CLSI 2017 M100 2017	61
ANEXO N°6: FENOTIPOS DE RESISTENCIA A METICILINA Y CLINDAMICINA INDUCIBLE EN <i>STAPHYLOCOCCUS</i> AISLADOS EN HEMOCULTIVOS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS DEL HOSPITAL NACIONAL GUILLERMO ALMENARA IRIGOYEN – 2018	63

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las bacterias del género *Staphylococcus* son causantes de diversas infecciones que afectan tanto a la piel como a otros tejidos blandos e incluso pueden llegar a ocasionar una infección a nivel sistémico (bacteriemias o septicemias). Dichas infecciones se agravan más cuando estas bacterias desarrollan resistencia a los antimicrobianos de uso común como las penicilinas, orientando entonces a los clínicos a tomar la decisión de usar otro tipo de terapia antimicrobiana como los glucopéptidos ^{(1) (2)}.

Según el reporte del Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (GLASS) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2018, se indicó que de un total de 500 000 personas de 22 países en las que se sospechaban infecciones bacteriana hubo un 82% de presencia generalizada de resistencia a los antibióticos y entre ellas el *Staphylococcus* con un 51% fue una de las principales bacterias que causó resistencia a meticilina ⁽³⁾. Otros datos publicados por la OMS en el año 2017, indicaron que la incidencia de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) con resistencia a meticilina (SARM) en España, se sitúa en torno al 27%, y que al menos cada año 150.000 europeos padecen de una infección por SARM, señalando de esta manera que la resistencia a los antibióticos en España va en aumento en los últimos 12 años ⁽⁴⁾.

El *S. aureus* es considerado uno de los tres principales agentes causales de infecciones intrahospitalarias a nivel mundial, afectando de manera grave las condiciones clínicas de pacientes internados cada año, sin distinción de edad, sexo o servicio hospitalario. Las personas infectadas principalmente por SARM, tienen mayor mortalidad (64%), que las personas infectadas por cepas no resistentes, a ello se suman diversos problemas asociados, como la prolongación de estancia hospitalaria del paciente, internamiento en

cuidados intensivos o el aumento de costo e inversión en atención sanitaria (5).

Los *Staphylococcus* Coagulasa Negativa (SCN), son causantes también de bacteriemias intrahospitalarias y han cobrado gran importancia hoy en día debido a su alto porcentaje de resistencia incluso aún más que el *S. aureus*, así como lo indica Aties L et al. (2017) quien en cepas de SCN aislados en hemocultivos, encontró que un 75% presentó resistencia a meticilina (6), mientras que Pujol y Limón (2013), realizaron un estudio en pacientes con sepsis nosocomial señalando que más del 50% de SCN presentó resistencia a meticilina y clindamicina (7).

En el Perú, existen pocos estudios de resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus*. En el año 2010 en el Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Peruana Cayetano Heredia se realizó un estudio donde se evaluó la prevalencia de bacterias resistentes a antimicrobianos provenientes de hemocultivos aisladas en 3 centros hospitalarios de Lima, se encontró que la resistencia a meticilina fue el patrón de resistencia más frecuente (58%) (8). Otro estudio realizado en el Instituto Nacional de Salud, evaluó la resistencia a antimicrobianos en 3 hospitales de Lima, y se encontró que el 77% de *S. aureus*, aislados en su mayoría de hemocultivos, presentó resistencia a meticilina (9).

En el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen (HNGAI) es frecuente la detección de bacteriemias causadas por *Staphylococcus* y cuenta con métodos colorimétrico, turbidimétrico y fluorimétrico bajo el sistema automatizado (*MicroScan Walk Away*), los cuales presentan limitaciones como, la inadecuada detección y diferenciación de los fenotipos de resistencia, esto debido a que no todas las cepas de una misma especie de *Staphylococcus* muestran una característica específica (los clones resistentes crecen más lento que los susceptibles), y la falta de cambio de temperatura constante porque las tarjetas o paneles usados por este sistema no tienen un diseño flexible sujetos a diversos cambios, ya que los

Staphylococcus deben crecer a diferentes temperaturas según lo requiera cada especie ⁽¹⁰⁾; Debido a lo descrito anteriormente, se justifica que, para identificar patrones de resistencia a meticilina y clindamicina inducible, el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) recomienda que los únicos métodos comparados con las pruebas moleculares (estándar de oro) son los métodos de disco difusión y D test respectivamente ⁽¹¹⁾; así como lo señalan diversos estudios, basados en comparaciones de métodos manuales y moleculares, como los realizados por, O'Sullivan MV y cols., que encontraron una sensibilidad y especificidad de 100% ⁽¹²⁾. Horna G y cols., que encontraron una sensibilidad de 96% y especificidad de 91% ⁽¹³⁾, y Cauwelier B y cols., que encontraron una sensibilidad de 97% y especificidad de 97% ⁽¹⁴⁾.

Son escasos los estudios realizados en el HNGAI. Un primer estudio realizado en el año 2006 describió cuáles fueron las bacterias causantes de bacteriemias más frecuentes halladas en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y a qué antimicrobianos fueron resistentes o sensibles, encontrándose que un 95% y 52% de las bacterias pertenecían a SARM y a *Staphylococcus* con resistencia a clindamicina, respectivamente ⁽¹⁵⁾ y un segundo estudio realizado en el año 2017 donde se evaluó el perfil de sensibilidad antimicrobiana se encontró resistencia a meticilina en 46% de SCN y un 22.9% de *S. aureus* ⁽¹⁶⁾.

Teniendo en cuenta la importancia de las infecciones intrahospitalarias causadas por el género *Staphylococcus*, los diversos patrones de resistencia que puede desarrollar y los escasos estudios realizados en el HNGAI, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1. GENERAL

Entre los fenotipos de resistencia a meticilina y clindamicina inducible en estafilococos, ¿Cuál es el patrón de resistencia más frecuente, aislados de hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018?

1.2.2. ESPECÍFICOS

¿Cuál es la especie de estafilococos más frecuente en los hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018?

¿Cuál es la distribución de especies de estafilococos de acuerdo al servicio de procedencia en hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018?

¿Cuál es la frecuencia de estafilococos aislados según especie bacteriana de acuerdo al tipo de resistencia presentada por pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018?

¿Cuál es la frecuencia de los patrones de resistencia que presentan los estafilococos en hemocultivos de pacientes hospitalizados de acuerdo al servicio de procedencia del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018?

1.3. JUSTIFICACIÓN

Debido al frecuente aislamiento del género *Staphylococcus* proveniente de hemocultivos en el área de Microbiología del HNGAI y al uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro para tratar pacientes críticos con septicemia bacteriana, sin conocer necesariamente su sensibilidad a través de un antibiograma, es necesaria la detección fenotípica de cepas resistentes a meticilina y clindamicina inducible para un adecuado manejo de los pacientes con septicemia bacteriana causadas por el género *Staphylococcus*.

Por otro lado, la presencia de bacterias resistentes a antimicrobianos supone un peligro importante para la salud pública, puesto que portan genes de resistencia que pueden ser transferidos de una bacteria a otra mediante elementos genéticos móviles. Cuando una bacteria sensible a los antibióticos recibe un gen de resistencia para un antimicrobiano, éste pierde la eficacia al tratamiento convencional teniendo como consecuencias la estancia hospitalaria prolongada del paciente aumentando los costos de atención, y con ello incrementando el riesgo de muerte ⁽¹⁷⁾.

Los resultados de la presente investigación serán de gran utilidad para aportar información al público en general y al personal de salud sobre todo al personal médico, ya que ayudará a fundamentar las decisiones en sus diagnósticos, para brindar así una adecuada terapia antimicrobiana específica en cada paciente, lo cual influirá en la calidad de atención intrahospitalaria. Los resultados de este estudio pueden servir también para la toma de medidas de control de infecciones donde se incide en la bioseguridad del personal y de las instalaciones hospitalarias. Asimismo, esta investigación podrá ser considerada como propulsora de otras y servir como antecedente, ya que el HNGAI, pertenece al tercer nivel de atención 2 (considerado el máximo nivel en la categoría de establecimientos de

salud del país) debido a la capacidad que tiene para resolver problemas de salud de alta complejidad, asimismo cabe precisar que el número de pacientes atendidos en el HNGAI es de aproximadamente 469 mil 664 pacientes en consultas externas provenientes de todo el país ⁽¹⁹⁾.

1.4. DELIMITACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen de tercer nivel de atención 2, durante el periodo de enero a junio del 2018, en cepas de *Staphylococcus* provenientes de muestras de hemocultivos positivos para bacteriemia de pacientes hospitalizados, ya que es un establecimiento de referencia dentro del sistema de seguro social del país que atiende aproximadamente a 469 mil 664 pacientes cada año en consultas externas provenientes de todo el Perú ⁽¹⁹⁾. El HNGAI está ubicado en el distrito de La Victoria en la avenida Grau N° 800 en Lima.

1.5. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

- Una de las principales limitaciones del estudio fue no incluir una prueba molecular (genotipificación), considerada estándar de oro para la detección de genes de resistencia, debido a su alto costo.
- Otra limitación fue el número de aislamientos, el cual pudo haber sido superior. En el estudio, se presentaron factores externos que no pudieron ser controlados como: algunas fallas de suministro eléctrico en el laboratorio, contaminación de medios de cultivo y hemocultivos.

1.6. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.6.1. GENERAL

Entre los fenotipos de resistencia a meticilina y clindamicina inducible, determinar el patrón de resistencia más frecuente, en estafilococos aislados de hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018.

1.6.2. ESPECÍFICOS

- Determinar la especie de estafilococos más frecuente en los hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018.
- Conocer la distribución de especies de estafilococos en hemocultivos de acuerdo al servicio de procedencia en pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018.
- Determinar la frecuencia de estafilococos aislados según especie bacteriana de acuerdo al tipo de resistencia presentada por pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018.

- Identificar la frecuencia de los patrones de resistencia que presentan los estafilococos en hemocultivos de pacientes hospitalizados de acuerdo al servicio de procedencia del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018.

1.7. PROPÓSITO

Los resultados de la presente investigación serán de gran utilidad para aportar información al público en general y al personal de salud sobre todo al personal médico, ya que ayudará a fundamentar las decisiones en sus diagnósticos, y con ello tomar medidas de control de infecciones donde se incide en la bioseguridad del personal y de las instalaciones hospitalarias. Asimismo, esta investigación podrá ser considerada como propulsora de otras y servir como antecedente.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

En el estudio realizado por Sit P, Teh C, Idris N, Ponnampalavanar S., titulado “Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SARM) infection and the molecular characteristics of SARM bacteraemia over a two-year period in a tertiary teaching hospital in Malaysia”, en el año 2017, los autores establecieron como objetivos principales, identificar las cepas de SARM, determinar cuál fue el factor de riesgo predisponente a bacteriemia y determinar cuáles eran las características genotípicas y fenotípicas de las cepas SARM que ocasionaron bacteriemia en un hospital de Malasia durante los años 2011 al 2012. Para la ejecución del estudio los autores recolectaron 209 muestras provenientes de hemocultivos, de las cuales un 90% fueron SARM; dentro de las cepas SARM el 59% fueron *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina intrahospitalarias (HA-SARM) que portaban el Cassette Cromosómico Estafilocócico (SCCmec) tipo II, III, IV y V, mientras que el 31% eran cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina en comunidad (CA- SARM) con SCCmec III, IV y V. Los autores identificaron que aquellos fenotipos encontrados en cepas HA- SARM también fueron encontrados en cepas provenientes de CA- SARM; y en lo referente al factor de riesgo predisponente a bacteriemia, se encontró que la diabetes fue el factor asociado a la presencia de cepas resistentes ⁽²⁰⁾.

En el estudio realizado en el año 2016 por Cuny C, Layer F, Werner G, Harmsen D, Daniels-Haardt I, Jurke A, y cols., titulado “State-wide

surveillance of antibiotic resistance patterns and spa types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from blood cultures in North Rhine-Westphalia, 2011-2013”; los investigadores plantearon como objetivos principales conocer el perfil completo de sensibilidad antimicrobiana en cepas SARM causantes de infecciones graves, caracterizar todos los aislamientos provenientes de hemocultivos e identificar otro tipo de resistencia a todas las cepas SARM. Encontrando que, de todos los aislamientos, el 96% eran resistentes a las fluoroquinolonas, el 78% a la eritromicina, el 70% a la clindamicina, el 4% a la gentamicina, el 2% a la rifampicina, el 0.4% a la daptomicina, el 0.1% a la linezolid y ninguno era para vancomicina. Al obtener el perfil completo de sensibilidad de cepas SARM se reveló la existencia de una amplia resistencia a los antibióticos utilizados para el tratamiento oral, a su vez encontraron problemas clínicamente relevantes asociados con la búsqueda de opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones graves, así como las infecciones óseas que requieren un tratamiento oral prolongado ⁽²¹⁾.

Los investigadores Lupinacci FS, Bussius D, Acquesta F, Fam G, Rossi R. y cols., realizaron un estudio titulado “High prevalence of clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* blood culture isolates in São Paulo, Brazil” en el año 2017; para el cual plantearon como objetivo principal determinar la prevalencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y clindamicina constitutiva e inducible provenientes de hemocultivos en São Paulo Brasil. Los autores incluyeron a todos los aislamientos de cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de hemocultivos, donde se les realizó pruebas de sensibilidad antimicrobiana usando los métodos disco difusión y doble disco difusión (D test). Los investigadores encontraron un 60.8% de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y un 68% de cepas de *Staphylococcus*

aureus resistentes a clindamicina, de los cuales un 60,8% y 7,2% presentaron resistencia constitutiva y resistencia inducible, respectivamente. Finalmente concluyeron que la alta prevalencia de resistencia a clindamicina resalta la importancia de realizar el método de doble disco difusión (D test) como rutina diaria, a su vez es necesario mantener una vigilancia constante acerca de nuevos patrones de resistencia a clindamicina y meticilina, con el fin de garantizar un tratamiento antimicrobiano adecuado ⁽²²⁾.

Los investigadores Silva ACO, Silva RCG, Oliveira SR. realizaron un estudio titulado “Clindamycin microbial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus* sp. derived from blood cultures of hospitalized patients” en el 2016; donde establecieron como objetivo determinar la prevalencia de cepas de *Staphylococcus* resistentes a clindamicina en muestras provenientes de hemocultivos. Evaluaron la utilidad del método doble disco difusión (D test), para ello recolectaron 100 muestras de pacientes atendidos en el Hospital Agreste Pernambucano en Brasil, e identificaron los fenotipos y perfiles de susceptibilidad antimicrobiana con discos de cefoxitina, eritromicina y clindamicina. Los autores encontraron que un 65% de cepas de *Staphylococcus* fueron susceptibles a cefoxitina, mientras que un 35% fueron resistentes; las cepas de *Staphylococcus* aisladas provenían en su mayoría de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI); dentro del grupo de *Staphylococcus* con resistencia a meticilina obtuvieron que un 26.7% pertenecía a cepas de SARM y el otro 20% pertenecía al grupo de los SCN; concluyeron que, infecciones producidas por *Staphylococcus* resistentes a antibióticos en individuos hospitalizados, sobre todo provenientes de UCI, demuestran la necesidad de medidas profilácticas inmediatas para prevenir la propagación de esta bacteria; además explicaron que el método doble disco difusión (D test) es clave para el monitoreo constante del fenotipo de resistencia inducible, minimizando los

posibles errores de tratamiento antibacteriano y los resultados clínicos adversos ⁽²³⁾.

2.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES

En el estudio realizado por Horna G, Astocondor L, Jacobs J, Coralith Garcia C., que lleva por título “Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)”; los investigadores establecieron como objetivo principal, comparar la sensibilidad y especificidad de tres métodos recomendados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI) para la detección de resistencia a meticilina en hemocultivos provenientes de nueve hospitales del departamento de Lima. Los investigadores utilizaron los siguiente métodos: crecimiento en agar suplementado con oxacilina; disco difusión con cefoxitina (30µg) y PCR en tiempo real para la determinación del gen *mecA* aislaron 331 cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de hemocultivos de pacientes hospitalizados, de los cuales a 165 se les encontró el gen *mecA*; para el método de agar suplementado con oxacilina encontraron un 98.1% de sensibilidad pero fue el método que más falsos positivos presentó y para el método de disco discusión con cefoxitina, observaron una sensibilidad de 96.3% y especificidad de 90.9%. Los investigadores concluyeron que el método de disco difusión fue el más adecuado para la detección de SARM, sobre todo siendo una buena ayuda cuando hay deficiencia de recursos económicos, a su vez el uso de cefoxitina resultó ser un buen inductor del gen *PEB2a* en aislamientos de *Saphylococcus aureus* que son los portadores del gen *mecA* ⁽¹³⁾.

En un estudio realizado por Casas M. en el año 2015, titulado “Resistencia inducida a clindamicina en *Staphylococcus aureus* y

Staphylococcus coagulasa negativo en el Instituto Nacional del Niño”, se planteó como objetivo principal determinar la frecuencia de fenotipos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativo. Para ello, aisló cepas de *Staphylococcus* y los analizó utilizando el método doble disco difusión (D-Test) para la identificación de la resistencia inducible a clindamicina (RIC). El autor reportó que, de las 203 cepas de *Staphylococcus* aisladas, un 18.7% eran *S. aureus* y el 81.3% eran SCN, también encontró que la frecuencia de RIC fue de 7.9% provenientes en su mayoría de cepas de *S.aureus* y el fenotipo de resistencia a clindamicina más frecuente fue el fenotipo R con un 44.8%. Finalmente, el autor concluyó que el método doble disco difusión fue el más adecuado comparado con el método molecular (estándar de oro) y que cada vez más se encuentran cepas resistentes en la comunidad y no a nivel hospitalario como años atrás ⁽²⁴⁾.

Los investigadores Verástegui A y cols., publicaron un estudio titulado “Bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en el Hospital Cayetano Heredia entre junio 2017 - diciembre 2018”, donde establecieron como sus objetivos principales describir el perfil epidemiológico de los pacientes con bacteriemia causados por *S. aureus* e identificar los factores clínico epidemiológicos relacionados a la resistencia antimicrobiana en el Hospital Cayetano Heredia; para el cual realizaron un estudio descriptivo en pacientes con bacteriemia causados por *S. aureus* y revisaron fichas de recolección de datos que acompañaron al hemocultivo. f Los autores identificaron 120 casos de bacteriemia por *S. aureus* (46.6% SARM; 53.4% MSSA), y evidenciaron mayor porcentaje de resistencia en aislamientos SARM. Concluyeron que, al menos la mitad de los casos de bacteriemia por *S. aureus* fueron SARM pero que ninguno de los aislados fue sensible a vancomicina ⁽²⁵⁾.

2.2. BASE TEÓRICA

2.2.1. GÉNERO *STAPHYLOCOCCUS*

a. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Se caracterizan por ser bacterias aerobias o anaerobias facultativas, poseen ácidos teicoicos en su pared, son fermentadores de carbohidratos, tienen un diámetro de 0.5µm a 1.5 µm, su coloración es gram positivo, no son móviles, no forman esporas, y son positivos a la reacción de catalasa. Los *Staphylococcus* se pueden encontrar en agrupaciones como diplococos, tétradas o cadenas cortas, pero el racimo es su forma más predominante; producen pigmentos que varían desde el color blanco hasta amarillo (*S. aureus* o dorado), crecen rápidamente en agar manitol o agar sangre, generalmente causan hemólisis y algunos pueden o no producir coagulasa (*S. aureus*), clasificándose también como SCN ⁽²⁶⁾.

- CLASIFICACIÓN

El género *Staphylococcus* se clasifica en dos grandes grupos, aquellos que producen coagulasa, es decir coagulasa positiva (*S. aureus*) o aquellos que no producen coagulasa, es decir coagulasa negativa (SCN). En general el género *Staphylococcus* está conformado por 35 especies y 17 subespecies, de las cuales la mayoría se aíslan de muestras clínicas humanas, gran parte de estas especies son anaerobios facultativos con la excepción de *S. aureus* sub especie *anaerobius* y *S. saccharolyticus*. Las especies de *Staphylococcus* que se asocian con más frecuencia a las enfermedades en humanos son los *S.*

aureus (conocido como el más virulento), y dentro del grupo de SCN se encuentran los *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. capitis* y *S. saprophyticus* ⁽²⁷⁾.

- **PATOGENICIDAD ESTAFILOCÓCICA**

Los *Staphylococcus* al ser parte de la microbiota normal de la piel y mucosa, pueden actuar como microorganismos oportunistas causando problemas patológicos (formación de abscesos, supuraciones, múltiples infecciones e incluso septicemias generalizadas). Las infecciones estafilocócicas, suelen empezar como cuadros locales por simples acúmulos de pus, luego se disemina hacia otros focos de infección a través del sistema vascular, causando reacciones inmunológicas e infecciones asociadas a diversas toxinas. El proceso patológico más grave asociado a *Staphylococcus* se da por vía hematógena (sepsis), afectando al sistema circulatorio (endocarditis), sistema nervioso central (meningoencefalitis) y sistema respiratorio (neumonía) ⁽²⁸⁾.

- **TRATAMIENTO**

Las opciones terapéuticas para la bacteriemia por SARM son limitadas por el reducido número de antimicrobianos activos y de ensayos aleatorizados disponibles, para ello la erradicación del foco primario o secundario de infección es imprescindible; se suele incluir a la familia de los beta-lactámicos resistentes a las penicilinasas, por ejemplo, la vancomicina u otros fármacos más modernos o con algún aditivo especial como el magnesio, cobalto, etc. La clindamicina por ejemplo, es el antimicrobiano de elección

para el tratamiento de las infecciones de piel y tejidos blandos causadas por SARM, debido a su buena absorción oral y excelente penetración ⁽²⁾.

b. RESISTENCIAS PRESENTADAS POR *STAPHYLOCOCCUS*

Debido al mal uso de antimicrobianos en diversos tratamientos, la resistencia presentada por los *Staphylococcus* ha ido evolucionando, conduciendo así al desarrollo de diversos mecanismos de resistencia:

- RESISTENCIA A METICILINA

El *Staphylococcus* resistente a meticilina fue aislado por primera vez en un cultivo en 1961, y esto sucedió luego de que dos años antes se introdujo el tratamiento con penicilina en la práctica clínica. Inicialmente la resistencia a meticilina solo ocurría en hospitales y ahora se encuentra con más frecuencia a nivel de la comunidad, dicha resistencia está presente en casi el 80% de *S. aureus* por ello la penicilina fue modificada semisintéticamente (oxacilina, meticilina). Los *Staphylococcus* producen al menos 4 *PBPs* (proteína ligada a penicilina), pero los *Staphylococcus* resistentes a meticilina presentan una *PBP* modificada llamada *PBP2a*, que está modificada por el gen *mecA* y esta a su vez se halla en el casete cromosómico *SCCmec*, permitiendo de esa manera la diseminación de esta resistencia ⁽²⁹⁾.

- **MECANISMOS DE RESISTENCIA**

Los *Staphylococcus* han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos, entre los principales se tiene: hiperproducción de β -lactamasas (hidroliza a la penicilina), producción de la proteína de unión a penicilina 2ª (*PBP2a*) por parte del gen *mecA* y modificación del sitio de acción entre el antibiótico y la proteína de unión de la penicilina. Recientemente se han descrito otras modalidades de resistencia en las que no se demuestra la presencia de *PBP2a* ni del gen *mecA*, y una de ellas se le denomina resistencia de bajo nivel o “borderline” (en el límite), porque presenta niveles de resistencia bajos por hiperproducción de β -lactamasas ⁽²⁷⁾.

- **MÉTODOS DE DETECCIÓN FENOTÍPICA**

Los fenotipos pueden ser detectados en el laboratorio de análisis bajo dos métodos, difusión en agar (disco difusión) y doble disco difusión (D test). El disco de cefoxitina usado en el método de difusión en agar se caracteriza por ser un marcador adecuado e inductor potente del gen *mecA*, su utilidad principalmente se basa en detectar resistencia a meticilina mediada por el gen *mecA* ⁽²⁵⁾. Los *Staphylococcus*, pueden presentar dos variedades de fenotipos dentro de la resistencia a meticilina: resistencia homogénea (resistencia de alto nivel a la meticilina) y resistencia heterogénea (resistencia de bajo nivel a la meticilina) ⁽²⁷⁾.

- **RESISTENCIA A CLINDAMICINA INDUCIBLE**

El complejo MLS_B que incluye macrólidos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina) y estreptograminas; es empleado para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus*, pero entre ellos la clindamicina es el antibiótico más usado contra las infecciones producidas por *Staphylococcus* resistentes a meticilina, ya que se puede administrar por vía oral y es bien tolerado. La mayor parte de las cepas de *Staphylococcus* que son resistentes a eritromicina son resistentes también a lincosamidas, esta resistencia es codificada por el gen *erm* (inductor de la metilación de la subunidad 23S ribosomal) ello conlleva a que el sitio de unión de esos antibióticos sea modificado. El uso indiscriminado de los antibióticos del grupo MLS_B ha llevado al aumento en el número de *Staphylococcus* con resistencia a eritromicina y clindamicina ⁽²⁸⁾.

● **MECANISMOS DE RESISTENCIA**

La acción de los MLS_B es inhibir la síntesis de proteínas bacterianas, a través de la unión a la subunidad 50s del ribosoma bacteriano, cercana al centro de la enzima peptidiltransferasa. Pueden presentar 3 mecanismos de resistencia: alteración del sitio de acción unión del antibiótico que afecta directamente a la clindamicina, resistencia por bomba de eflujo y resistencia por inactivación del antibiótico ⁽¹⁴⁾.

- **MÉTODOS DE DETECCIÓN FENOTÍPICA**

Uno de los métodos para evaluar la resistencia MLS_B recomendado por CLSI es el método doble disco difusión (D test) para ello se utiliza el disco de eritromicina 15ug y clindamicina 2ug colocados a una distancia de 15-20mm entre los dos. Se pueden observar dos fenotipos, MLS_{Bc} (constitutiva porque presenta resistencia a cualquiera de los MLS_B) y MLS_{Bi} (inducible porque presenta resistencia a eritromicina y azitromicina y sensibilidad a clindamicina y estreptograminas B). Este tipo de resistencia es muy variada porque depende de la región geográfica, del hospital de procedencia, del perfil de susceptibilidad, de la especie bacteriana o la edad ⁽³⁰⁾.

C. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MÉTODOS DISCO DIFUSIÓN Y D TEST

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, es importante para hallar aquellos fenotipos implicados en los patrones de resistencia a metilina y clindamicina inducible presentada por *Staphylococcus*. El laboratorio de microbiología del HNGAI, cuenta con los métodos colorimétrico, turbidimétrico y fluorimétrico bajo el sistema automatizado (*MicroScan Walk Away*), el cual es un equipo comercial que es utilizado rutinariamente para la identificación de microorganismos como hongos patógenos y bacterias gram positivas y gram negativas; la principal ventaja de este sistema es la rapidez con que entrega los resultados, lo que conlleva a una reducción en el número de exámenes, reducción en los días de hospitalización y reducción en el uso de antimicrobianos, por otro lado otra importante

ventaja es que disminuyen los errores post-analíticos, ya que la conexión en red con el sistema de información de exámenes evita la transcripción de los resultados de un informe que es complejo. El principal inconveniente que presenta este sistema, es que no existen normas en el CLSI donde indican que es un método adecuado para hallar patrones y fenotipos de resistencia a los antimicrobianos, esto debido a que las tarjetas o paneles dispuestos en este sistema no tienen un diseño flexible a todos los antimicrobianos ensayados, además que no son aplicables a todas las bacterias; otro inconveniente es que la temperatura y tiempo de incubación no está sujeto a cambios, eso dificulta al momento de hallar fenotipos resistentes en las especies de *Staphylococcus*, puesto que, se incuban a un diferente tiempo y temperatura ^{(10) (11) (16)}.

Los métodos manuales como disco difusión y D test, son en cambio métodos, cuyas normas están establecidas en el CLSI, donde indican la categorización de las cepas bacterianas en función de su sensibilidad frente al antibiótico probado, catalogándolo como sensible, intermedio y resistente ⁽¹¹⁾ Además el CLSI recomienda también, que en comparación con las pruebas moleculares, los métodos manuales de disco difusión y D test, son aceptables, debido a su sencillez, reproducibilidad y buena especificidad y sensibilidad, así como lo señalan diferentes estudios como los realizados por, O'Sullivan MV y cols., que encontraron una sensibilidad y especificidad de 100% ⁽¹²⁾, Horna G y cols. ⁽¹³⁾, que encontraron una sensibilidad de 96% y especificidad de 91%, y Cauwelier B y cols., que encontraron una sensibilidad de 97% y especificidad de 97% ⁽¹⁴⁾.

2.2.2. BACTERIEMIA

Se define por bacteriemia a la presencia de bacterias en sangre, su diagnóstico básicamente se da por un cultivo microbiológico; se sospecha de bacteriemia cuando el paciente presenta una temperatura superior a 38.3°C por al menos tres días, otros síntomas que también se relacionan son la alteración del estado mental y el dolor abdominal. Las bacteriemias se pueden clasificar como: bacteriemias primarias porque se desconoce el origen y bacteriemias secundarias porque fue desarrollada por causa de una infección localizada y documentada microbiológicamente. La gravedad de las enfermedades que motivan el ingreso a un hospital, el uso inadecuado de una terapia antimicrobiana, la contaminación de los dispositivos intravenosos o catéteres intracardiacos, la falta del cumplimiento de las técnicas básicas de control de infección (lavado de las manos, medidas de barrera, etc.) y la prevalencia de microorganismos multi-resistentes a antibióticos, son los principales factores implicados en la elevada tasa de bacteriemia ⁽²⁶⁾.

SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Dentro de los principales microorganismos causantes de bacteriemias, se encuentran los SCN y los *S. aureus* ya que son los patógenos implicados más frecuentemente en las infecciones relacionadas con los catéteres, mientras que los bacilos gram negativos son los principales patógenos implicados como consecuencia a una infección respiratoria, infección intra-abdominal o infección del tracto urinario; por ello el estándar de oro para diagnosticar una bacteriemia es el hemocultivo ⁽²⁷⁾.

2.3. MARCO CONCEPTUAL

Bacteriemia: Ingreso o invasión bacteriana hacia el torrente sanguíneo.

Beta-Lactamasas: Enzima bacteriana cuya actividad se basa en anular la actividad de los antibióticos betalactámicos hidrolizando el anillo betalactámico y generando un derivado sin actividad antimicrobiana. Lo posee principalmente la especie de *Staphylococcus aureus*.

Cefoxitina: Es un antibiótico bactericida que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, tiene actividad en presencia de algunas betalactamasas. La cefoxitina es un buen inductor de la producción de la *PBP2a* por el método disco difusión, ya que ayuda en la expresión del gen *mecA*, esto explicaría la razón por el cual existen poblaciones heterogéneas del SARM.

Clindamicina: Es un antibiótico estructuralmente parecido a la lincomicina que inhibe la síntesis proteica bacteriana uniéndose a la subunidad 50S de su propio ribosoma, impidiendo así el inicio de la cadena peptídica. Ayuda a detectar aquellos fenotipos resistentes a clindamicina inducible.

Cubrimiento Empírico: Régimen que incluye un antibiótico activo contra el microorganismo causal. Es toda terapia no definitiva.

Fenotipo Bacteriano: Son características que se pueden observar a simple vista, en las bacterias serán aquellas características que en algunos casos le son útiles para su adaptación al crecimiento en determinados ambientes.

Multiresistencia: Son bacterias capaces de sobrevivir a la presencia de más de un antibiótico, ocurren por el abuso de medicamentos, por mutaciones o por transferencia de genes resistentes entre bacterias.

Pacientes hospitalizados: Son aquellos pacientes que tienen un tiempo de permanencia en el hospital, no menor a 48 horas.

Penicilinasas: Denominadas también betalactamasas, que específicamente hidrolizan los anillos betalactámicos de las penicilinas.

Resistencia: Cuando la bacteria deja de ser afectada por la acción de un antibiótico.

Sensibilidad: Cuando las bacterias son eliminadas o afectadas por la acción de los antimicrobianos.

Sepsis: Se refiere a todo el síndrome clínico general producido por el paciente como consecuencia de una bacteriemia.

Transferencia horizontal: Se da por el paso de fragmentos de ADN a través de transposones hacia otras bacterias, está involucrada por la acción de bacteriófagos y plásmidos, siendo la razón principal de la resistencia bacteriana.

2.4. HIPÓTESIS

Por ser un estudio descriptivo no requiere de hipótesis.

2.5. VARIABLES (VER ANEXO 02)

- Variable 1: Resistencia a meticilina.
- Variable 2: Resistencia a clindamicina inducible.

2.5.1. DIMENSIONES

- Variable 1:

Staphylococcus aureus resistente a meticilina

SCN resistente a meticilina

- Variable 2:

Staphylococcus aureus resistente a clindamicina inducible

SCN resistente a clindamicina inducible

2.5.2. INDICADORES

- Variable 1:

Resistente (*mecA* positivo) : ≤ 21 mm (*S. aureus*)
 ≤ 24 mm (SCN)

Sensible (*mecA* negativo) : ≥ 22 mm (*S. aureus*)
 ≥ 25 mm (SCN)

- Variable 2:

D Test positivo (formación de la zona D).

D Test negativo (ausencia de la zona D).

2.6. DEFINICIÓN OPERACIONAL DE TÉRMINOS

- Resistencia a meticilina:

Se da bajo la acción del gen *mecA*, que produce una proteína de unión a penicilina PBP2a, que a su vez está ubicado en el casete cromosómico SCC, el cual se transfiere mediante el mecanismo de transferencia horizontal, su detección se realiza con el método Disco difusión con la observación de un halo de inhibición alrededor del disco de antibiótico cefoxitina 30ug.

- Resistencia a clindamicina inducible:

Se da bajo la acción del gen *erm*, el cual está involucrado en el mecanismo de resistencia a macrólidos, lincosaminas y estreptogaminas MLS, su detección se realiza con el método D-test con la observación de la zona D, el cual el disco de eritromicina 15ug induce al disco de clindamicina 2ug.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Estudio cuantitativo, de tipo transversal, entre los meses de enero a junio del 2018 en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen cuyas características pertenecen al tercer nivel de atención 2, al ser un establecimiento de referencia dentro del sistema de seguro social del país que atiende a un gran número de pacientes provenientes de todo el Perú.

3.1.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN

Se realizó un estudio descriptivo.

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1. POBLACIÓN

La población de estudio estuvo conformada por cepas aisladas de *Staphylococcus* provenientes de hemocultivos positivos para bacteriemia de pacientes hospitalizados de al menos 48 horas de permanencia en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.

3.2.2. MUESTRA

Se usó un muestreo no probabilístico por conveniencia de las cepas aisladas de *Staphylococcus* provenientes de hemocultivos positivos para bacteriemia de pacientes hospitalizados de al menos 48 horas de permanencia en el HNGAI de enero a junio del 2018.

3.2.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Aislamientos de cepas de *Staphylococcus* de dos frascos de hemocultivos.
- Aislamientos de hemocultivos provenientes de pacientes hospitalizados con tiempo de permanencia de al menos 48 horas en el hospital.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Aislamientos de hemocultivos contaminados por otro tipo de microorganismos.

3.3. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Luego de que ambos frascos resultaran positivos para el crecimiento bacteriano con el método de fluorescencia utilizado por el equipo BACTEC FX (BD Medical Technology), se procedió a determinar si se trataba o no del género *Staphylococcus* por medio de la coloración gram y pruebas de catalasa, coagulasa y manitol; luego se determinó la especie de *Staphylococcus* bajo el sistema automatizado MicroScan WalkAway 96 (método colorimétrico, turbidimétrico y fluorimétrico) y finalmente con los métodos manuales disco difusión y D test, se determinó la resistencia antibacteriana a meticilina y clindamicina inducible, respectivamente. El procedimiento de los métodos usados y los valores para determinar la resistencia o sensibilidad a los antimicrobianos, fueron tomados como referencia del manual de procedimientos del área de Laboratorio del Departamento de Microbiología del HNGAI ⁽³¹⁾, ya que es un manual que

fue adaptado del CLSI 2017 M100 ⁽¹¹⁾, en base a las características de la población que se presenta en dicho hospital.

Los datos del paciente como son la edad, sexo, servicio de procedencia y fecha de ingreso fueron obtenidos del sistema de registro del laboratorio del área de microbiología, del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen (VER ANEXO 03).

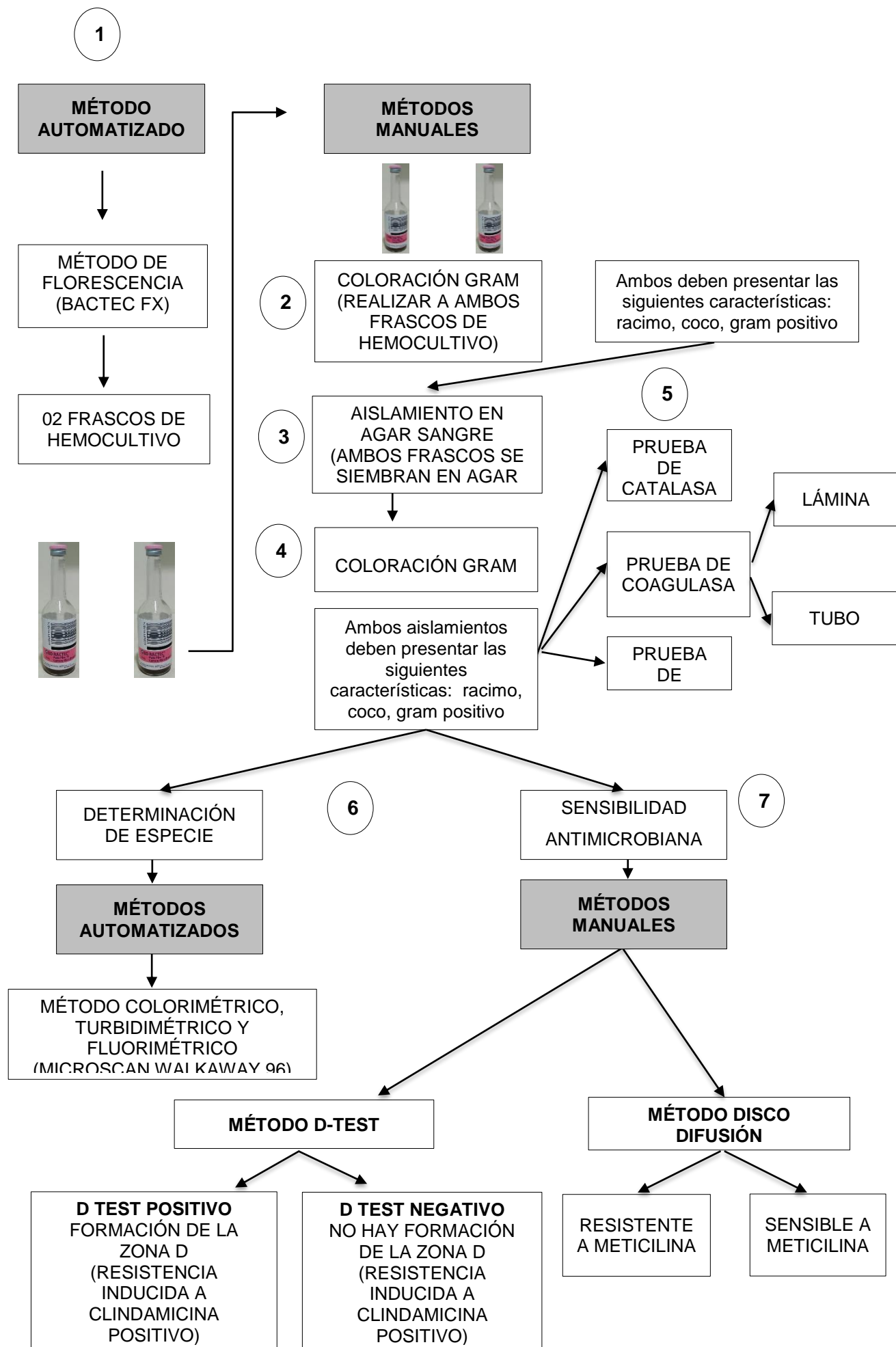
3.3.1. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

Los procedimientos de laboratorio se siguieron en base al protocolo del Departamento de Microbiología del HNGAI, como se especifica en el ANEXO 04.

1. Luego de que ambos frascos de hemocultivo resultaran positivos para el crecimiento bacteriano con el método de fluorescencia utilizado por el equipo BACTEC FX (BD Medical Technology).
2. Se procedió a realizar la coloración gram a ambas botellas de hemocultivo, para así observar que tengan las características de un *Staphylococcus* (coco, racimo gram positivo).
3. Se aislarán ambas botellas en agar sangre, con el fin de obtener colonias aisladas.
4. Una vez que se obtuvieron colonias aisladas, se realizará una vez más la coloración gram, deben presentar nuevamente las mismas características de un *Staphylococcus* (coco, racimo gram positivo).
5. A esa misma colonia aislada, se procedió a realizar las pruebas de catalasa, coagulasa (tubo y lámina) y manitol, esto con el fin de confirmar, que ambas botellas pertenezcan al género *Staphylococcus*.
6. Se determinó la especie de *Staphylococcus* bajo el sistema automatizado MicroScan WalkAway 96 (método colorimétrico, turbidimétrico y fluorimétrico).

7. Finalmente, con los métodos manuales disco difusión y D test, se determinó la resistencia a meticilina y clindamicina inducible, respectivamente.

3.3.2. FIGURA 1: FLUJOGRAMA DE TRABAJO PARA LA DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A METICILINA Y CLINDAMICINA INDUCIBLE



3.4. DISEÑO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Los datos como la edad, el código del paciente, la fecha de ingreso hospitalario y el servicio de procedencia, se colectaron en la FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS (VER ANEXO 03), esta ficha también permitió coleccionar datos de las pruebas realizadas como coagulasa, manitol y catalasa, y datos obtenidos de las resistencias a metilicina y clindamicina inducible.

3.5. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis de las variables se utilizaron las medidas de tendencia central y frecuencias absolutas y relativas, con la ayuda del programa ©Microsoft Excel versión 2016 (Microsoft Corporation, Seattle, US).

3.6. ASPECTOS ÉTICOS

Los datos que fueron recolectados para el presente estudio, fueron conservados con mucha confidencialidad, bajo el amparo de ser usados solamente con fines de investigación.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

4.1. RESULTADOS

Se colectaron y aislaron 120 cepas de *Staphylococcus* provenientes de hemocultivos de pacientes hospitalizados. La edad media fue de 36 años, de los cuales 52 pacientes (43%) eran mayores de 60 años, 41 pacientes (34%) se encontraban entre la edad de 18 a 60 años, y 27 pacientes (23%) eran menores de 18 años. En relación al sexo se encontró que 67 pacientes (56%) pertenecen al sexo masculino y que 53 pacientes (44%) pertenecen al sexo femenino. Luego de haber realizado las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, se identificó el patrón de resistencia más frecuente en las cepas de *Staphylococcus*, se encontró que 79 (66%) cepas eran resistentes a meticilina y que 13 (11%) fueron resistentes a clindamicina inducible (**Tabla 1**).

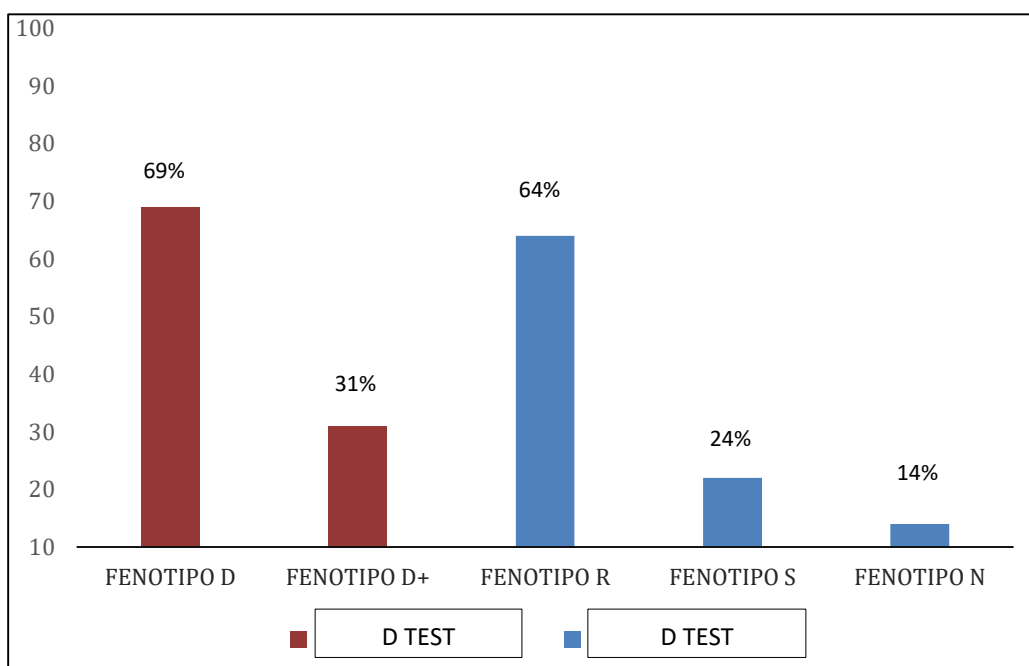
Tabla 1. Patrón de resistencia más frecuente, entre los fenotipos de resistencia a meticilina y clindamicina inducible en estafilococos aislados de hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del 2018 (N=120)

Prueba	<i>Staphylococcus</i>	
Disco – Difusión N=120 (Resistencia a meticilina)	Resistente	79 (66%)
	Sensible	41 (34%)
D – test N=120 (Resistencia a clindamicina inducible)	Positivo	13 (11%)
	Negativo	107 (89%)

En el **Gráfico 1**, luego de evaluar las 120 cepas de *Staphylococcus*, con el método D test para determinar la resistencia a clindamicina inducible se observó que, dentro de los 13 (11%) *Staphylococcus* D Test positivo (INDUCIBLE), se encontraron los fenotipos **D+** (4/13; 31%) y **D** (9/13; 69%), mientras que para los *Staphylococcus* D Test negativo 107 (89%)

(CONSTITUTIVA), se encontraron los fenotipos **R** (68/107; 64%), **S** (24/107; 22%), y **N** (15/107; 14%) (**Gráfico 1**).

GRÁFICO 1. Frecuencia de fenotipos resistentes clindamicina inducible aislados de hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen de enero a junio del 2018 (N=120)



FENOTIPOS: D TEST POSITIVO (INDUCIBLE): **D** (formación de la Zona D) y **D*** (sensible a clindamicina y resistente a eritromicina), **D TEST NEGATIVO (CONSTITUTIVO):** **S** (sensible a eritromicina y sensible a clindamicina), **R** (resistente a eritromicina y resistente a clindamicina) y **N** (sensible a clindamicina y resistente a eritromicina).

En la **Tabla 2**, se determinó la distribución de especies de *Staphylococcus* de acuerdo al servicio de procedencia; encontrándose que, el *S. aureus* (33/120; 28%), fue la especie que se aisló con más frecuencia a nivel de todos los servicios de hospitalización, proviniendo en su mayoría de UCI (13/25; 52%), Cuidados Intermedios (8/20; 40%) y Emergencia (5/9; 56%); la otra especie que se aisló con más frecuencia fue el *S. epidermidis* (25/120; 20%), proviniendo en su mayoría de los servicios de UCI (7/25; 28%), Medicina Interna (7/14; 50%) y Nefrología (5/7; 71%). A

su vez se determinó que, UCI es el servicio que más aislamientos de especies de *Staphylococcus* presentó (25/120; 21%), de los cuáles el *S. aureus* (13/25; 52%), *S. epidermidis* (7/25; 28%) y el *S. hominis* (2/25; 8%), fueron las especies que se aislaron con más frecuencia; y dentro del servicio de Cuidados Intermedios (20/120; 17%), las especies de *S. aureus* (8/20; 40%), *S. hominis* (4/20; 20%) y *S. condimentii* (3/20; 15%), fueron las especies que se aislaron con más frecuencia.

TABLA 2. Distribución de especies de estafilococos en hemocultivos de acuerdo al servicio de procedencia en pacientes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen de enero a junio del 2018 (N=120)

SERVICIO DE PROCEDENCIA / ESPECIE BACTERIANA	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. condimentii</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. sciuri</i>	TOTAL
UCI	13 (52%)	7 (28%)	2 (8%)	0	2 (8%)	0	1 (4%)	0	0	25 (21%)
Cuidados Intermedios	8 (40%)	0	4 (20%)	0	0	3 (15%)	2 (10%)	2 (10%)	1 (5%)	20 (17%)
Medicina Interna	1 (7,1%)	7 (50%)	2 (14%)	4 (29%)	0	0	0	0	0	14 (12%)
Neonatología	1 (8,3%)	0	5 (42%)	6 (50%)	0	0	0	0	0	12 (10%)
Oncología	0	1 (9,1%)	0	4 (36%)	3 (27%)	1 (9,1%)	2 (18%)	0	0	11 (9.1%)
Emergencia	5 (56%)	0	0	0	0	0	0	2 (22%)	2 (22%)	9 (7.5%)
Trauma-Shock	3 (38%)	1 (13%)	0	0	3 (38%)	0	0	1 (13%)	0	8 (6.6%)
Nefrología	0	5 (71%)	0	0	0	2 (29%)	0	0	0	7 (5.8%)
Unidad de Quemados	2 (40%)	2 (40%)	0	0	0	0	0	0	1 (20%)	5 (4.1%)
Neurología	0	0	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)	0	0	0	0	4 (3.3%)
Reumatología	0	1 (33%)	1 (33%)	0	0	0	0	0	1 (33%)	3 (2.5%)
Cirugía Plástica	0	1 (50%)	0	0	0	1 (50%)	0	0	0	2 (1.6%)
	33 (28%)	25 (20%)	15 (13%)	15 (13%)	10 (7.9%)	7 (5.8%)	5 (4.1%)	5 (4.1%)	5 (4.1%)	120

En la **Tabla 3**: Se determinó la frecuencia de *Staphylococcus* aislados según especie; encontrándose que, de las 120 cepas de *Staphylococcus*, la especie más frecuente fue el *S. aureus* (33/120; 28%), seguido del *S. epidermidis* (25/120; 20%) y el *S. hominis* y *S. schleiferi* (15/120; 13%). A su vez se determinó también, la frecuencia de *Staphylococcus* aislados de acuerdo al tipo de resistencia presentada; encontrándose que, respecto a la resistencia a meticilina (79/120; 66%), el *S. aureus* (20/79; 25%) fue la especie que más resistencia presentó, seguido del *S. epidermidis* (22/79 28%) y *S. hominis* y *S. schleiferi* (12/79; 15%) y respecto a la resistencia a clindamicina inducible (107/120; 89%), se encontró que el *S. epidermidis* fue la especie que más resistencia presentó (5/13; 38%), seguido del *S. aureus* (3/13; 23%) y el *S. saprophyticus* (2/13; 15%).

TABLA 3. Frecuencia de estafilococos según especie y su distribución de acuerdo al tipo de resistencia presentada por pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018 (N=120)

Especie	Resistencia a Meticilina (Disco-Difusión) n(120)		Resistencia Inducida a Clindamicina (D-TEST) n(120)		Total de especies de <i>Staphylococcus</i> aislados
	R	S	D-TEST +	D-TEST -	
<i>Staphylococcus aureus</i>	20 (25%)	13 (32%)	3 (23%)	30 (28%)	33 (28%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	22 (28%)	3 (7.3%)	5 (38%)	20 (19%)	25 (20%)
<i>Staphylococcus hominis</i>	12 (15%)	3 (7.3%)	1 (8%)	14 (13%)	15 (13%)
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	12 (15%)	3 (7.3%)	1 (8%)	14 (13%)	15 (13%)
<i>Staphylococcus capitis</i>	4 (5.4%)	6 (15%)	0	10 (9.3%)	10 (7.9%)
<i>Staphylococcus condimentii</i>	5 (6.5%)	2 (4.2%)	0	7 (6.5%)	7 (5.8%)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2 (2.5%)	3 (7.3%)	1 (8%)	4 (3.7%)	5 (4.1%)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1 (1.3%)	4 (9.8%)	2 (15%)	3 (2.8%)	5 (4.1%)
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1 (1.3%)	4 (9.8%)	0	5 (4.7%)	5 (4.1%)
	79	41	13	107	120
Total	120		120		

En la **Tabla 4**, se determinó la frecuencia de los patrones de resistencia de acuerdo al servicio de procedencia; de los 13 servicios de procedencia del HNGAI, UCI con un 19%, fue el servicio que presentó mayor número de aislamientos de *Staphylococcus* resistentes a ambos patrones de resistencia, seguido del servicio de Cuidados Intermedios con un 16% y del servicio de Medicina Interna con un 11%. Dentro de las cepas aisladas de *Staphylococcus* resistentes a meticilina (79/120; 66%), provinieron en su mayoría del servicio de UCI (20/79; 25%), seguido del servicio de Cuidados Intermedios (15/79; 19%) y del servicio de Medicina Interna (11/79; 14%); y respecto a los aislamientos de *Staphylococcus* resistentes a clindamicina inducible (13/120; 41%), provinieron en su mayoría del servicio Cuidados Intermedios (4/13; 31%), seguido del servicio de UCI (3/13; 23%) y del servicio de Medicina Interna y Neonatología (2/13; 15%).

TABLA 4. Frecuencia de los patrones de resistencia que presentan los estafilococos en hemocultivos de acuerdo al servicio de procedencia del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen de enero a junio del 2018 (N=120)

Servicio de Procedencia	Resistencia a Meticilina (Disco-Difusión) n(120)		Resistencia Inducida a Clindamicina (D-TEST) n(120)		Total de <i>Staphylococcus</i> resistentes a ambas patrones de resistencia
	R	S	R	S	
UCI	20 (25%)	5 (12%)	3 (23%)	22 (21%)	23 (19%)
Cuidados Intermedios	15 (19%)	5 (12%)	4 (31%)	16 (15%)	19 (16%)
Medicina Interna	11 (14%)	3 (7.3%)	2 (15%)	12 (11%)	13 (11%)
Oncología	8 (10%)	3 (7.3%)	1 (8%)	10 (9.3%)	9 (7.5%)
Emergencia	7 (8.9%)	2 (4.9%)	0	9 (8.4%)	7 (5.8%)
Neonatología	4 (5.1%)	8 (20%)	2 (15%)	10 (9.3%)	6 (5%)
Unidad de Quemados	4 (5.1%)	1 (2.5%)	1 (8%)	4 (3.7%)	5 (4.2%)
Nefrología	4 (5.1%)	3 (7.3%)	0	7 (6.5%)	4 (3.3%)
Trauma-Shock	3 (3.9%)	5 (12%)	0	8 (7.5%)	3 (2.5%)
Neurología	2 (2.6%)	2 (4.9%)	0	4 (3.7%)	2 (1.6%)
Reumatología	1 (1.3%)	2 (4.9%)	0	3 (2.8%)	1 (0.8%)
Cirugía Plástica	0	2 (4.9%)	0	2 (1.8%)	0
Total	79	41	13	107	
	120		120		

4.2. DISCUSIÓN

Entre los fenotipos de resistencia a meticilina y clindamicina inducible evaluados, la resistencia a meticilina fue más frecuente que a clindamicina inducible (66% vs 11% respectivamente). El presente estudio tiene mayor frecuencia de resistencia que los reportes de otros estudios; como los realizados por Verástegui A. y cols. que evaluaron la resistencia en 120 muestras de hemocultivos encontrando un 47% de resistencia a meticilina realizado en el Hospital Cayetano Heredia ⁽²⁵⁾, Horna y cols. que evaluaron la resistencia en 331 muestras de hemocultivos, encontrando un 50% de resistencia a meticilina realizado en varios hospitales de Lima (13) y Sit P y cols. que determinaron la resistencia en 209 muestras de hemocultivos encontrando un 59% de resistencia a meticilina realizado en un hospital de Malasia ⁽²⁰⁾.

El resultado de este estudio varía con los anteriormente mencionados, debido a que en ellos se consideraron muestras colectadas de diferentes hospitales. Si bien es cierto que los métodos de disco difusión y D test, son casi similares a los métodos moleculares, se debe considerar que la falta de aplicación de pruebas genotípicas hubiese sido importante para contrastar con lo citado. Por otro lado, la falta de acceso para obtener algunos datos clínicos, como los resultados de otros exámenes de cada paciente, pudieron haber sido importantes, así como lo señala el estudio realizado por Jaramillo S ⁽³¹⁾, donde informó que detectó falsos positivos hasta en un 3.6%, en el sistema automatizado BACTEC FX, esto debido a la leucocitosis que pueden presentar algunos pacientes como consecuencia de la enfermedad que padecen; ya que un número elevado de leucocitos produce una curva de crecimiento que es generalmente plana, dando como falso positivo un hemocultivo. No obstante, se debe de tomar importancia el alto porcentaje de resistencia presentado en este estudio.

Según reportes de la OMS la resistencia a meticilina se atribuye principalmente al consumo excesivo y descontrolado de antibióticos ⁽⁵⁾; por otro lado estudios moleculares señalan que, la razón por el cual la resistencia a meticilina es considerada multiresistente, es debido a que la transferencia genética del gen *mecA* se da de manera horizontal (no recibe el material genético de sus ancestros), por ello se estaría eliminando en su totalidad las opciones antimicrobianas ⁽³³⁾.

Para la determinación de resistencia a clindamicina inducible (RIC) por el método D Test, se encontró que, los fenotipos D y D+, pertenecientes al D Test positivo (relacionados con la resistencia MLSBi) obtuvieron un porcentaje bajo en comparación con el D Test negativo. El porcentaje de RIC del presente estudio, fue similar ($p=0.34$) en comparación al estudio realizado por Casas M., en el año 2015, donde reportó un 7,9% de RIC de un total de 203 muestras recolectadas ⁽²⁴⁾. Es importante considerar que la resistencia MLSBi, tiene la particularidad de aparecer de manera repentina y puede extenderse rápidamente, lo cual deja abierta la posibilidad que el fenómeno puede incrementar sus niveles de manera repentina en nuestro medio. Ello amerita la implementación de programas de vigilancia a fin de detectar oportunamente el problema ⁽²⁹⁾. Respecto a los fenotipos R, N y S, pertenecientes al D Test negativo (relacionados con la resistencia MLSBc) encontrados en este estudio, se señala que, el fenotipo R fue el más frecuente y el fenotipo S menos frecuente, contrastando al estudio realizado por Moosavian M., que reportó al fenotipo S (3,9%) como el más frecuente, y al fenotipo R (2,7%) como el menos frecuente ⁽³⁴⁾.

Para la distribución de especies de *Staphylococcus* de acuerdo a los diferentes servicios de hospitalización, se señala que, el *S. aureus* fue la especie más aislada en la mayoría servicios, el *S. epidermidis* en UCI y Medicina Interna, el *S. hominis* en Neonatología y Cuidados Intermedios, y el *S. schleiferi* en Neonatología y Oncología; estos resultados coinciden con lo descrito en la bibliografía consultada para el presente estudio, como los reportes de, Cuny C. y cols. ⁽²¹⁾, Moosavian M. y cols. ⁽³⁴⁾, y Aties L. y

cols. ⁽⁶⁾. El *S. aureus* está reportándose con mayor frecuencia en diversos servicios hospitalarios, ya que es causante de un amplio espectro de infecciones, principalmente de piel y tejidos blandos, como celulitis y abscesos subcutáneos; además, ha sido reportada como causante de endocarditis, artritis, infecciones de prótesis, osteomielitis, infección urinaria y de heridas, en los que se describe la naturaleza agresiva de esta bacteria, considerada más virulenta que otros; el incremento de infecciones debida a *S. epidermidis* puede deberse a un mayor índice de sospecha debido a que comparte muchas características con el *S. aureus* y a su capacidad de producir coagulasa ligada y la similitud de sus colonias, sin embargo, es posible que su incidencia siga aún subestimada ya que al pertenecer al grupo de los SCN, se sigue pensando que es una bacteria no patógena ⁽⁶⁾. El *S. hominis*, no es considerado un patógeno habitual, pero se ha identificado como patógeno nosocomial multi-resistente de las clínicas al igual que el *S. epidermidis*, su hallazgo en el servicio de Neonatología del presente estudio, pudo haberse dado por la contaminación por la falta de bioseguridad del personal que labora en ese servicio, por otro lado los recién nacidos al tener el sistema inmune aún en desarrollo, no están suficientemente maduros hacer frente a diversos microorganismos que provocan las infecciones; así como lo reportan otros autores en sus estudios como, Aties L. y cols. ⁽⁶⁾, o Zasyas T y cols ⁽³⁵⁾.

El *S. schleiferi* aislado en el servicio de Oncología, no es considerado una bacteria habitual de la microbiota comensal humana, a ello suma la dificultad que entraña su identificación, por poseer características similares a los demás SCN ⁽²⁷⁾, es una de las especies de *Staphylococcus* recién descubiertas en 1988, y ha sido en los últimos años cuando se le empieza a atribuir importancia como patógeno responsable de infección de heridas, bacteriemia, endocarditis y meningitis en pacientes inmunocomprometidos ⁽²⁸⁾⁽³⁴⁾. Una de las bases para el tratamiento adecuado de las bacteriemias originadas por *Staphylococcus*, es el conocimiento de la microbiota bacteriana prevalente y el espectro de resistencia y sensibilidad en cada servicio hospitalario ⁽¹⁷⁾.

El *S. aureus*, fue la especie aislada con más frecuencia en el presente estudio, y dentro del grupo de SCN las especies de *S. epidermidis*, *S. hominis* y *S. schleiferi*, fueron las más frecuentes. Se observa que, no hubo mucha diferencia en la prevalencia del *S. aureus* y *S. epidermidis*, dando a entender que cada vez los SCN están aislándose con más frecuencia; estos resultados fueron casi similares a los reportes de algunos autores, como Sit P y cols. ⁽²⁰⁾, y Lupinacci FS y cols. ⁽²²⁾, que señalaron al *S. aureus* como el más prevalente. Para los aislamientos de *Staphylococcus* resistentes a meticilina y clindamicina inducible, las especies de *S. epidermidis* y *S. aureus*, fueron los que mayor número de resistencia presentaron; algo que discrepa al de otros reportes de estudios nacionales internacionales, como el de Horna G. y cols., ⁽¹³⁾, Cuny C. y cols. ⁽²¹⁾, y Moosavian M. y cols. ⁽³⁴⁾, donde señalaron al *S. aureus* como el causante del mayor número de aislamientos resistentes para ambos patrones de resistencia. El *S. epidermidis* ha desarrollado resistencia a antimicrobianos en forma paralela al desarrollo de resistencia por parte del *S. aureus*, pero fue mostrando frecuencias mucho más elevadas que esta última, ya que ha ido incrementándose de manera importante en los últimos 20 años, debido a que la infección por este agente, a pesar que es más silente (que la infección provocada por *S. aureus*), suele ser más grave, y su aislamiento se da usualmente en el ámbito hospitalario, y afecta a sujetos que tienen procesos mórbidos asociados a procedimientos complejos como pueden ser implantes de prótesis, catéteres de drenaje, válvulas cardiacas, entre otros ⁽²⁸⁾.

Es importante resaltar que las infecciones causadas por SARM, en el presente estudio, afectaron en su mayoría a pacientes mayores de 65 años, hecho que concuerda con los obtenidos en otros trabajos realizados por Rodríguez B. en el 2009⁽³⁶⁾ y Stryjewski en el 2014⁽³⁷⁾, encontraron que el rango de edad de pacientes afectados fue de 65 años; no obstante, infecciones causadas por *S. aureus* en general, pueden ocurrir a lo largo del primer año de vida, siendo más frecuentes en neonatos ⁽³⁸⁾.

La mayoría de los aislamientos de *Staphylococcus* resistentes a ambos patrones de resistencia, provinieron del servicio de UCI; éstos resultados coinciden con los reportes de Morales Gl. y cols. (25%)⁽¹⁾ y Paz R y cols. (24%)⁽¹⁵⁾. El ingreso de un paciente a un hospital, representa el riesgo de contraer una infección nosocomial en un rango de 5 a 10% y la estancia en UCI incrementa aún más en un 20 a 40%, por lo que el uso de antibióticos de forma controlada es un tratamiento habitual en el paciente hospitalizado, ya que el uso excesivo podría estar generando presión selectiva por parte de las bacterias, originando cambios en sus patrones de resistencia⁽³⁸⁾. Por otro lado UCI constituye el foco de diseminación de bacterias resistentes a otras áreas del hospital, convirtiendo a los pacientes y el medio ambiente en los principales reservorios, por medio de la transmisión cruzada a partir de los trabajadores sanitarios los cuales no tienen los cuidados necesarios en cuanto a bioseguridad se refiere o por el manejo de monitores, ecógrafos y aparatos radiológicos que pueden contaminarse y actuar como fómite en la expansión de estas bacterias resistentes⁽²⁸⁾.

Es importante indicar que se debe realizar un estudio más amplio, con un mayor número de aislados y que incluya a diversos hospitales, para poder así compararlos. La identificación genotípica de otros genes de resistencia a meticilina y clindamicina inducible, no se pudieron realizar, por ello fueron parte de las limitaciones de este estudio, esta identificación hubiera sido importante, ya que ayudaría a entender otro tipo de comportamiento de diversas cepas de *Staphylococcus*, por otro lado el registro incompleto de datos, como resultados de otros exámenes clínicos hubiese sido importante para tener en cuenta la etiología, el origen y la mortalidad ocasionada por la bacteriemia.

Los resultados de este estudio, evidenciaron los diferentes fenotipos que pueden presentar los *Staphylococcus* resistentes a meticilina y clindamicina inducible, empleando los métodos manuales con las técnicas D Test y disco difusión. Si bien, los sistemas automatizados permiten una identificación rápida y precisa, la exactitud de estos sistemas puede verse

comprometida debido a la expresión variable de características fenotípicas y la naturaleza limitada de las bases de datos, generando en algunos casos resultados ambiguos ⁽²⁰⁾. Por otro lado, el haber encontrado en su mayoría cepas de *Staphylococcus* pertenecientes al grupo de SCN, nos muestra que con la continuidad de los años ha ido tomando importancia, siendo antes considerados como contaminantes, con escasa patogenicidad o escasa importancia clínica. Los estudios poblacionales son necesarios para comprender la dinámica evolutiva de los *Staphylococcus* resistentes y predecir así la selección clonal haciendo posible proponer e implementar políticas de prevención, control y cuidado que limiten el impacto de resistencia en los sistemas sanitarios, y así poder reducir el alto índice de mortalidad.

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se encontró que la resistencia a meticilina, fue más frecuente que la resistencia a clindamicina inducida en los aislados de estafilococos provenientes de pacientes hospitalizados en el HNGAI.
- Se identificó al *S. aureus* como la especie de estafilococos aislada con más frecuencia, en los aislados provenientes de pacientes hospitalizados en el HNGAI.
- Se identificó, a las especies de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. hominis*, como las especies más frecuentes aisladas en los servicios de UCI, Cuidados Intermedios y Emergencia, respectivamente.
- Se identificó al *S. aureus* como la especie que presentó mayor frecuencia a resistencia a meticilina y al *S. epidermidis*, como la especie que presentó mayor frecuencia a resistencia a clindamicina inducible.
- Se identificó a UCI, como el servicio que presentó mayor número de aislamientos resistentes en ambos patrones de resistencia; y a Cuidados Intermedios como el servicio que presentó mayor número de estafilococos resistente a clindamicina inducible.

5.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de los métodos Disco Difusión y D-test, porque ayudarían a detectar los diversos fenotipos de resistencia presentes en *Staphylococcus*.

- Se recomiendan realizar estudios de genotipificación de aquellas cepas resistentes a meticilina y clindamicina inducible, debido a que ayudaría mucho a encontrar otros genes que pueden albergar transposones que posiblemente aún no se conocen debido a los diversos tipos de mecanismos de resistencia y propagación de este tipo de bacterias.

- Se deberían incluir en futuros estudios, más centros hospitalarios a nivel local y nacional, con un mayor grupo de población y en diferentes servicios hospitalarios, con el fin de obtener una visión continua y general de lo que está ocurriendo en cuanto a resistencia bacteriana se refiere.

- Debido a la alta frecuencia de los patrones de resistencia a meticilina y clindamicina inducible, se recomienda la debida atención en las medidas sanitarias como la importancia del lavado de manos para prevenir la transmisión de infecciones de un paciente a otro sobre todo en el personal de salud que labora en centros de hospitalización; igualmente, de efectiva es la prevención cuando se mejoran las normas de higiene y se aplican técnicas correctas de esterilización y aislamiento de los pacientes que lo requieran, así como la asepsia y antisepsia en las técnicas y procedimientos médico quirúrgicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morales GI, Yaneth MC, Chávez K. Characterization of resistance in vitro to different antimicrobial in strains of Staphylococcus spp. in a hospital of the city of Valledupar between January and July 2009. Rev Cienc Salud. 2012;10(2):169-77.
2. OPS. Guía para el tratamiento de las Enfermedades Infecciosas. Organización Panamericana de la Salud, agosto de 2004. <https://apps.who.int/medicinedocs/documents/s18624es/s18624es.pdf>
3. OMS | Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report Early implementation 2017-18 [Internet]. WHO. [citado 18 de enero de 2018] <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/279656/9789241515061-eng.pdf?ua=1>
4. OMS | La resistencia a los antibióticos en España, por encima de la media europea [Internet]. WHO. [citado 15 de setiembre del 2018]. <http://pmfarma.es/noticias/17313-la-resistencia-a-los-antibioticos-en-espana-por-encima-de-la-media-europea.html>
5. OMS | Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2014 [Internet]. WHO. [citado 25 de enero de 2019] https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1
6. Aties L, Moya J, Milá P, Figueredo A, Brossard A. Staphylococcus aureus y estafilococo coagulasa negativa resistentes a la meticilina. Rev MEDISAN. 2017;21(12):3300-3305.

7. Pujol M, Limón EN. Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2013;31(2):108-13.
8. Tamariz J, Agapito J, Horna G, Tapia E, Vicente W, et al. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. *Rev Med Hered*. 2010; 21(1):4-10.
9. Yagui M. Resistencia antimicrobiana: nuevo enfoque y oportunidad. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2018;35(1):7-8.
10. García CP. Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in vitro. *Rev. chil. infectol*. 2002; 19(2): 96-100.
11. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. M100-S25 ed. Wayne (PA), USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. https://clsi.org/media/1469/m100s27_sample.pdf
12. O'Sullivan MV, Zhou F, Sintchenko V, Gilbert GL. Prospective Genotyping of Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates by Use of a Novel, Highly Discriminatory Binary Typing System. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (11): 3513-9.
13. Horna G, Astocondor L, Jacobs J, Coralith García C. Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Rev Esp Quimioter*. 2015;28(2):98-100.
14. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23(5):389-92.

15. Paz R, Pandolfi D, Ramírez P. Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de Cuidados Críticos, Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Essalud, Lima, Perú, 2004-2006. *Acta Médica Perú*. 2008;25(3):140-7.
16. Hernández D, López J, Colin C, Cerón G, Ortega P, et al. Comparison of the MicroScan WalkAway and VITEK 2 Compact systems for the identification and susceptibility of clinical Gram-positive and Gram-negative bacteria. *MEDIGRAPHIC*. 2017;10(2):105-114.
17. Montoya C, Mira O, Álvarez A, Cofre G, Cohen V, et al. Resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. *Rev Chil Pediatría*. 2009;80(1):48-53.
18. MINSA. NTS N° 021 Norma Técnica de Salud “Categorías de Establecimientos del Sector Salud”. Ministerio de Salud. 2019. http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/AtencionFarmaceutica/Categorizacion-UPSS_Farmacia.pdf
19. ESSALUD | Plan Operativo Institucional 2019 del Seguro Social de Salud. [citado 01 de marzo de 2020] http://www.essalud.gob.pe/transparencia/poi/poi2019_desagregado.pdf
20. Sit P, Teh C, Idris N, Sam I, Syed S, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SARM) infection and the molecular characteristics of SARM bacteraemia over a two-year period in a tertiary teaching hospital in Malaysia. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):274.
21. Cuny C, Layer F, Werner G, Harmsen D, Haardt I, et al. State-wide surveillance of antibiotic resistance patterns and spa types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from blood cultures in North Rhine-Westphalia, 2011-2013. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21 (8):750-7.

22. Lupinacci F, Bussius D, Acquesta F, Fam G, Rossi R, et al. High prevalence of clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* blood culture isolates in São Paulo, Brazil. J Lab Physicians. 2017;9(4):314.
23. Silva C, Silva R, Oliveira S. Clindamycin microbial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus* sp. derived from blood cultures of hospitalized patients. J Bras Patol E Med Lab. 2016;52(3):165-70.
24. Casas M. Resistencia inducida a clindamicina en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativo en el Instituto Nacional de Salud del Niño. 2015. Repos Tesis – UNMSM. 2016;55. http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4861/Casas_cm.pdf?sequence=1&isAllowed=y
25. Verástegui A, Reiny S; Balmaceda N, María P, Guardia M, et al. Bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en el Hospital Cayetano Heredia entre junio 2017 - diciembre 2018. Repos Tesis – UPCH. 2019;55.
26. Koneman E, Allen S. Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas. Ed. Médica Panamericana; 2008;1699.
27. Novick R, Ross H, Projan S, Kornblum J, Kreiswirth B, et al. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. EMBO J. 1993;12(10):3967-75.
28. Echevarria Z, Iglesias Q. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. Rev Medica Hered. 2003;14(4):195-203.
29. Cervantes G, García G, Salazar S. Importancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. Rev Latinoam Patol Clínica Med Lab. 2014;61(4):196-204.

30. Morales P, Giovanetti M, Hernández A. Fenotipos de resistencia a meticilina, macrólidos y lincosamidas en *Staphylococcus aureus* aislados de un hospital de Valledupar, Colombia. Rev Cienc Salud 2016;14(2):223-30.
31. Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. Manual de procedimientos del área de Laboratorio del Departamento de Microbiología del HNGA. 2000.
32. Jaramillo S. Equipos de monitoreo continuo en hemocultivos. Acta Médica Colombiana Vol. 1996; 21(5): 196-204. http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/05-1996-04-Ecoqnutiipnouso_d_en_m_hoenmitoocruelot%20ivos.pdf
33. Friedman N, Kaye K, Stout J, McGarry S, Trivette S, et al. Health care associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. Ann Intern Med. 2002;137(10):791-7.
34. Moosavian M, Shoja S, Rostami S, Torabipour M, Farshadzadeh Z. Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to erm genes, Iran. Iran J Microbiol. 2014;6(6):421-7.
35. Zayas T, Barreras G, Álvarez V. Detección mediante el Sistema DIRAMIC de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y comparación con otros métodos utilizado en la práctica clínica. Rev CENIC Cienc Biológicas. 2013;44(2).
36. Rodríguez B, Millán M, Angeles D, Carmen B, Pau G, et al. Impact of inappropriate empirical therapy for sepsis due to health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J of Infection. 2009; 58 (2): 131-7.
37. Stryjewski M, Corey GR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. Rev Clin Infect Dis. 2014;58 (2):10-19.

38. Saderi H, Emadi B, Owlia P. Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLSB) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2011;17(2):BR48-53.
39. Carmona E, Sandoval S, García C. The frequency and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* from nasal swabs in an suburban marginal population in Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2012;29(2):206-11.

ANEXOS

ANEXO 01: Matriz de consistencia de la Tesis: “Fenotipos de Resistencia a Meticilina y Clindamicina Inducible en estafilococos aislados en hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen - 2018”

PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	INDICADORES	METODOLOGÍA
<p><u>PROBLEMA PRINCIPAL</u></p> <p>Entre los fenotipos de resistencia a meticilina y clindamicina inducible en estafilococos, ¿Cuál es el patrón de resistencia más frecuente, aislados de hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018?</p> <p><u>PROBLEMAS ESPECÍFICOS:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ¿Cuál es la especie de estafilococos más frecuente en los hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018? 2. ¿Cuál es la distribución de especies de estafilococos de acuerdo al servicio de procedencia en hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018? 3. ¿Cuál es la frecuencia de estafilococos aislados según especie bacteriana de acuerdo al tipo de resistencia presentada por pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018? 4. ¿Cuál es la frecuencia de los patrones de resistencia que presentan los estafilococos en hemocultivos de pacientes hospitalizados de acuerdo al servicio de procedencia del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018? 	<p><u>OBJETIVO GENERAL</u></p> <p>Entre los fenotipos de resistencia a meticilina y clindamicina inducible, determinar el patrón de resistencia más frecuente, en estafilococos aislados de hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018.</p> <p><u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Determinar la especie de estafilococos más frecuente en los hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018. 2. Conocer la distribución de especies de estafilococos en hemocultivos de acuerdo al servicio de procedencia en pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018. 3. Determinar la frecuencia de estafilococos aislados según especie bacteriana de acuerdo al tipo de resistencia presentada por pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018. 4. Identificar la frecuencia de los patrones de resistencia que presentan los estafilococos en hemocultivos de pacientes hospitalizados de acuerdo al servicio de procedencia del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante los meses de enero a junio del año 2018. 	<p><u>HIPÓTESIS GENERAL</u></p> <p>Por ser un estudio descriptivo no requiere de hipótesis.</p>	<p><u>VARIABLE 1:</u></p> <p>Resistencia a meticilina</p> <p><u>VARIABLE 2:</u></p> <p>Resistencia a clindamicina inducible</p>	<p>- Sensible</p> <p>- Resistente</p> <p>- D Test positivo (Formación de la zona D)</p> <p>- D Test negativo (ausencia de la formación de la zona D)</p>	<p><u>TIPO DE INVESTIGACIÓN:</u></p> <p>Se realizó un estudio descriptivo, cuantitativo, de tipo transversal, entre los meses de enero a junio del 2018 en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen cuyas características cumplen el tercer nivel de atención 2 (Instituto especializado de EsSalud). Los datos del paciente como son la edad, sexo, servicio de procedencia y fecha de ingreso fueron obtenidos del sistema de registro del laboratorio del área de microbiología del HNGAI. Entre los métodos de laboratorio usados para determinar el patrón de resistencia a meticilina y clindamicina inducible se utilizaron los métodos de difusión en agar (disco difusión) y la difusión de doble disco (D test) respectivamente. Los procedimientos y valores de referencia de cada método, fueron tomados del manual de procedimientos del área de Laboratorio del Departamento de Microbiología del HNGA, que a su vez usaron como referencia del CLSI 2017 M100.</p> <p><u>POBLACIÓN:</u></p> <p>La población de estudio estuvo conformada por cepas aisladas de <i>Staphylococcus</i> provenientes de hemocultivos positivos para bacteriemia de pacientes hospitalizados de al menos 48 horas de permanencia en el HNGAI.</p>

ANEXO 02: Cuadro de operacionalización de variables de la Tesis: “Fenotipos de Resistencia a Meticilina y Clindamicina Inducible en *Staphylococcus* aislados en hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen - 2018”

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADORES	TIPO DE RESPUESTA	ESCALA	CRITERIOS DE MEDICIÓN	INSTRUMENTO
<u>Variable 1:</u> Resistencia a metililina	Cualitativo	Multidimensional: - <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metililina. - SCN resistente a metililina.	- Sensible - Resistente	Dicotómica	Disco difusión, medidas CLSI (*)	Resistente (<i>mecA</i> positivo): ≤ 21 mm (<i>S. aureus</i>) ≤ 24 mm (SCN) Sensible (<i>mecA</i> negativo): ≥ 22 mm (<i>S. aureus</i>) ≥ 25 mm (SCN)	Ficha de reporte de resultados
<u>Variable 2:</u> Resistencia a clindamicina inducible	Cualitativo	Multidimensional: - <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a clindamicina inducible. - SCN resistente a metililina.	- D Test positivo (Formación de la zona D) - D Test negativo (ausencia de la formación de la zona D)	Politómica	D test, medidas CLSI (*)	Formación de la zona D Sensible :≥21mm (Clindamicina) :≥23mm (Eritromicina) Intermedio :15-20mm (Clindamicina) 14-22mm (Eritromicina) Resistente :≤14mm (Clindamicina) ≤13mm (Eritromicina)	Ficha de reporte de resultados

(*) Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) 2017 - M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.

ANEXO 04: Procedimiento de los métodos manuales y automatizados realizados en el Laboratorio del Departamento de Microbiología del HNGAI



AISLAMIENTO DE COLONIAS EN AGAR SANGRE

1. Con la ayuda de una aguja y jeringa estéril, se debe de tomar 0,5ml de una botella de hemocultivo y colocar en una placa de agar sangre.
2. Con un asa de siembra en aro se debe proceder a la siembra por dispersión y agotamiento: sembrar la muestra bacteriana en zigzag, hasta la mitad de la superficie del medio de cultivo, girar ésta unos 45° y continuar sembrando en zigzag, hasta que se agote toda la muestra del asa de siembra en aro.
3. Llevar a incubar a 37°C por 18 horas a 24 horas.

COLORACIÓN GRAM

Técnica de coloración Gram

1. Colocar una pequeña gota de Agua destilada en el portaobjetos (con pipeta por ejemplo). Resuspender muestra en el portaobjetos. Secar al mechero. La gota de agua debe, se debe calentar por 5 min aproximadamente hasta que toda el agua se seque.
2. Se debe colocar Cristal Violeta cubriendo toda la muestra por 1min. Se lava con agua corriente.
3. Luego debe agregarse el lugol. Este debe aplicarse como el cristal violeta y también debe cubrir la muestra por 1 min. Luego se lava con agua corriente.
4. El cubrir la muestra con alcohol acetona para decolorar. Este debe cubrir la muestra por el tiempo que puede ir de 15s a 30s según corresponda y la reacción debe ser detenida con el lavado con agua corriente. El tiempo debe ser el mismo para todas las muestras. Al ser tiempos por lo general muy cortos, se recomienda agregar el alcohol mientras ya se tiene la llave del agua corriendo, listo para el lavado.
5. El último paso consiste en agregar una tinción de contraste, para teñir las bacterias que pierden el cristal violeta. Para esto se agrega safranina cubriendo la muestra por 15s o por 1min, dependiendo. Luego se lava con agua corriente y se deja secar.



PRUEBA DE CATALASA

1. Coloque una gota de peróxido de hidrógeno al 3% en un portaobjetos de microscopio.
2. Tomar una asada de colonia pura aislada utilizando un asa de siembra.
3. Mezclar la colonia bacteriana en el peróxido de hidrógeno y observar la formación o no de pequeñas burbujas.



PRUEBA DE COAGULASA

- Prueba de coagulasa en lámina:

1. En un portaobjeto se coloca una gota de solución salina y una gota de plasma de forma separada. Tome con el asa en punta 1 o 2 colonias puras del microorganismo a probar.
2. Mezcle la carga bacteriana en la gota de plasma y repita la operación en la gota de SSF.
3. Observe los resultados de forma inmediata. Un resultado positivo será aquel en donde se observe la formación de un aglutinado macroscópico (precipitado blanco) al cabo de un minuto del lado de la gota con plasma. La gota de SSF sirve de control negativo. Si se observa aglutinación con la SSF, esto quiere decir que el microorganismo se autoaglutina, pudiendo proporcionar resultados falsos positivos. En este caso se debe corroborar con la prueba en tubo. Resultado con SSF. Debe dar siempre negativa, si da positiva automáticamente el resultado de la prueba queda invalidado.

- Prueba de coagulasa en tubo:



1. Mida con una pipeta estéril 0,5 ml de plasma y colóquelo en un tubo de ensayo 12 x 75.
2. Cargue el asa con 2 a 4 colonias puras a estudiar provenientes de un cultivo sólido de 18 a 24 horas y disuélvala en el plasma cuidadosamente, mezcle e incube a 37°C por 4 horas.
3. Examinar el tubo a la primera hora sin agitarlo, solo incline suavemente. Si aún no se observa coágulo, se puede seguir observando cada 30 minutos hasta completar las 4 horas. Si después de 4 horas aún sigue negativo se puede dejar hasta por 24 horas, pero a temperatura ambiente. Observar y reportar el resultado.
4. Si se observa un coágulo que abarca todo el líquido (coagulación completa) o coágulo que nada en el líquido restante (coagulación parcial) debe considerarse como una prueba positiva. Si no se forma coágulo, es decir, la suspensión queda homogénea, la prueba es negativa.

PRUEBA DE MANITOL

1. Se debe de cargar una asada con 1 colonia pura a estudiar proveniente de un cultivo sólido de 18 a 24 horas
2. Se debe de aislar en una placa Petri con el medio de cultivo manitol salado.
3. Se de llevar a incubar a 37°C de 18 horas a 24 horas.



4. Se observará el cambio de color del medio de cultivo, si es amarillo es *Staphylococcus aureus*, si no cambia puede ser otra especie de estafilococo coagulasa negativo.

MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN

1. Se debe realizar una suspensión directa de la colonia a estudiar en solución salina al 0.9 % a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18 - 24 h de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de Mc. Farland.
2. Una vez ajustada la turbidez, sumergir un hisopo estéril y proceder a sembrar en agar Muller Hinton rotando el hisopo tres veces y rotar la placa 60° cada vez para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Dejar reposar por al menos 3 - 5 minutos.
3. Colocar el disco de antibiótico con una pinza o aguja estéril, y llevar a incubar a 35°C o a 37°C, por un tiempo de 16 horas a 24 horas.
4. Pasado ese tiempo proceder a la lectura con la ayuda de una regla para medir el halo de inhibición de cada disco.



MÉTODO DE D TEST

1. Se debe realizar una suspensión directa de la colonia a estudiar en solución salina al 0.9 % a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18 - 24 h de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de Mc. Farland.
2. Una vez ajustada la turbidez, sumergir un hisopo estéril y proceder a sembrar en agar Muller Hinton rotando el hisopo tres veces y rotar la placa 60° cada vez para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Dejar reposar por al menos 3 - 5 minutos.
3. Colocar un disco de eritromicina (15 µg) y otro de clindamicina (2 µg) separados por una distancia de 15 mm de borde a borde en una placa de agar Muller-Hinton.
4. Después de 16-18 h de incubación a 35 °C, el achatamiento en la zona de inhibición de la clindamicina próxima al disco de eritromicina (efecto zona D) indica un fenotipo de resistencia a clindamicina inducible.



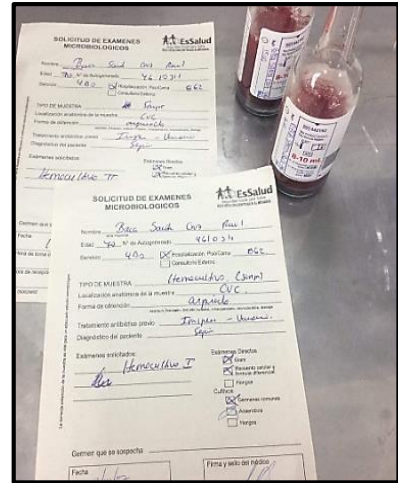
MÉTODO AUTOMATIZADO MICROSCAN WALKAWAY 96

1. Se debe realizar una suspensión directa de la colonia a estudiar en solución salina al 0.9 % a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18 - 24 h de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de Mc. Farland.
2. Una vez ajustada la turbidez, se debe de realizar las diluciones, en el panel para gram positivos.
3. Se lleva el panel al equipo MicroScan WalkAway 96.
4. Programar el sistema para determinar la especie y sensibilidad antibacteriana.





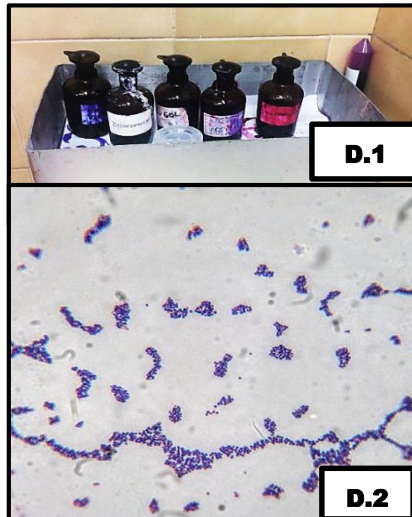
A



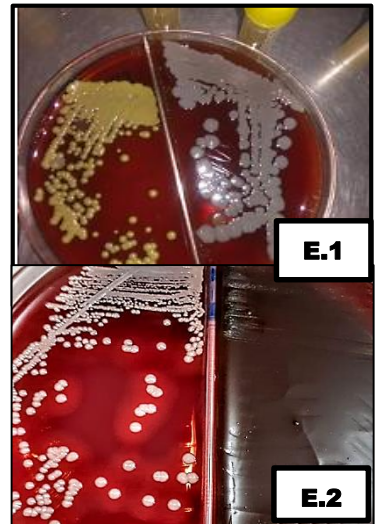
B



C



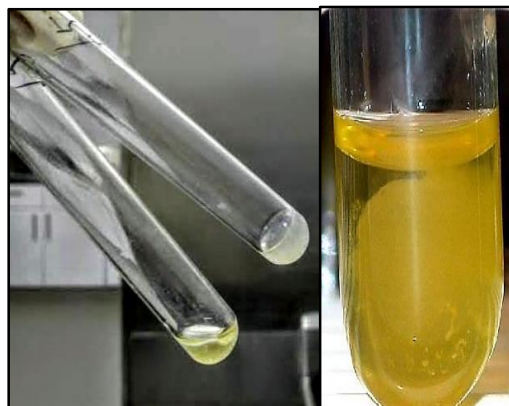
D



E



F



G



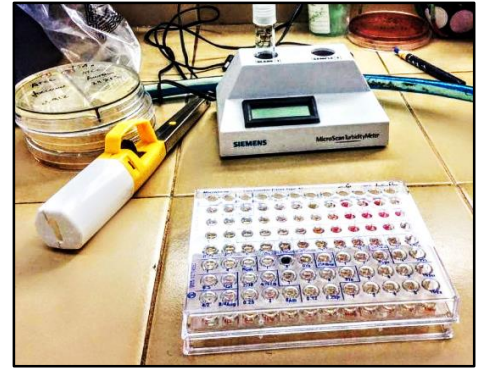
H



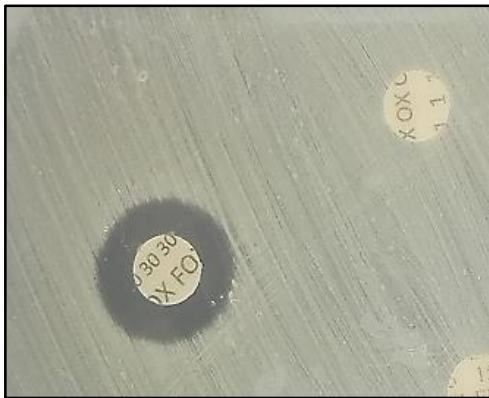
I



J



k



L



M

FIGURA 2. Procedimiento realizado en el Área de Laboratorio del Departamento de Microbiología del HNGA: A. Área de aislamiento de hemocultivos del HNGAI. **B.** Hemocultivos con la orden médica. **C.** Equipo automatizado BACTEX FX. **D.** Coloración gram. **D.1.** Batería de colorantes, **D.2.** Staphylococcus agrupadas en racimo y tétradas. **E.** Staphylococcus, **E.1.** Staphylococcus aureus, **E.2.** Staphylococcus coagulasa negativa. **F.** Prueba de catalasa positiva. **G.** Prueba de coagulasa positiva. **H.** Prueba de manitol en placa. **I.** Turbidímetro para la escala Mc Farland. **J.** Equipo automatizado MICROSCAN WALKAWAY 96. **K.** Panel para bacterias gram positivo. **L.** Método de disco difusión con disco de cefoxitina 30ug. **M.** Método de D test, con discos de clindamicina 2ug y eritromicina 15ug.

ANEXO 05: Medidas de halos de inhibición para criterios de interpretación de cefoxitina, clindamicina, eritromicina en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus Coagulasa Negativa* según CLSI 2017 M100 2017

Especie de <i>Staphylococcus</i>	Disco	Sensible (mm)	Resistente (mm)
<i>S. aureus</i> y <i>S. lugdunensis</i>	Cefoxitina	≥22	≤21
SCN excepto <i>S. lugdunensis</i>	Cefoxitina	≥25	≤24
<i>S. aureus</i> y SCN	Clindamicina	≥21	≤14
	Eritromicina	≥23	≤13

Según “CLSI 2017 M100 2017 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing” se mencionan dos fenotipos de RIC mediante el método de D-test: inducida y constitutiva.

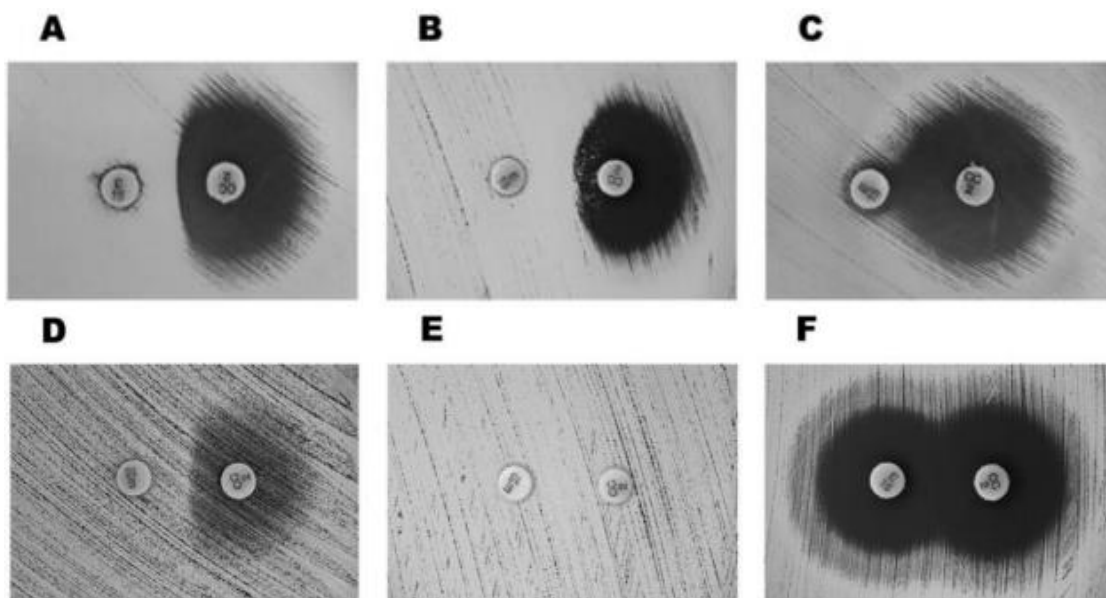


FIGURA 3: Fenotipos pertenecientes a RIC, según CLSI 2017 M100 2017

Fenotipos RIC		CLI	ERI	Descripción
INDUCIBLE	D	S	R	Presenta el gen <i>ermA</i> , aplanamiento del halo de la clindamicina junto a la eritromicina, sin microcolonias dentro.
	D+	S	R	Presenta el gen <i>ermC</i> , con o sin presencia del gen <i>ermA</i> , aplanamiento del halo de la clindamicina junto a la eritromicina, con microcolonias dentro.
CONSTITUTIVA	N	S	R	Presenta el gen <i>msrA</i> , se observa eritromicina resistente y clindamicina susceptible sin aplanamiento del halo.
	HD	R	R	Se observan dos zonas de crecimiento: Crecimiento ligero y brumoso que se extiende desde el disco clindamicina hasta la segunda zona donde el crecimiento es mucho más intenso. La zona interior, nebuloso próximo al disco eritromicina.
	R	R	R	Resistencia a cMLSB, presencia de genes <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> ; crecimiento homogéneo alrededor de ambos discos.
	S	S	S	Se observa sensibilidad para ambos discos.

TABLA 5. Descripción de las características pertenecientes a los fenotipos de RIC, según CLSI 2017 M100 2017

ANEXO 06: Fenotipos de Resistencia a Meticilina y Clindamicina Inducible en *Staphylococcus* aislados en hemocultivos de pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen - 2018

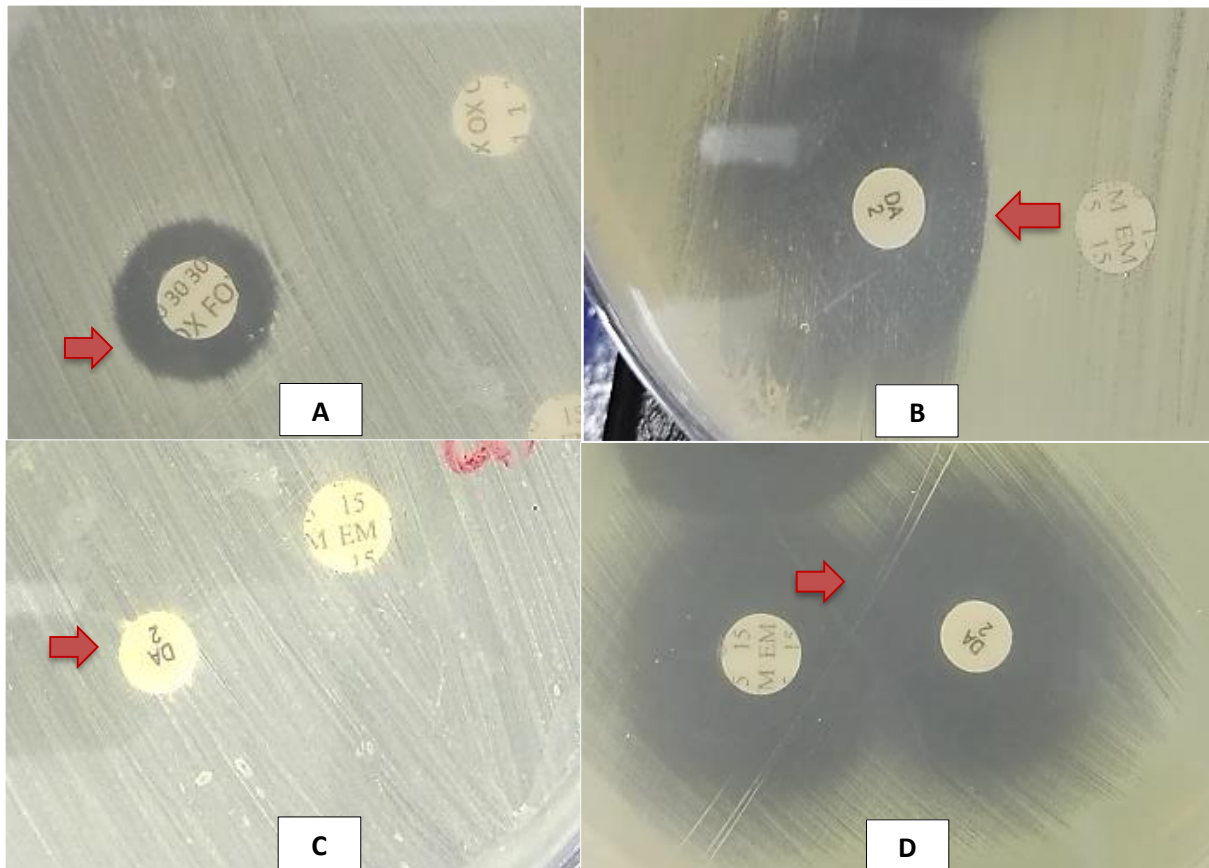


FIGURA 3. A. MÉTODO: DISCO-DIFUSIÓN. Resistencia presentada a Meticilina; **B. MÉTODO: D-TEST.** D-Test positivo, fenotipo D⁺ (Clindamicina Sensible y Eritromicina Resistente). **C. MÉTODO: D-TEST.** D-Test negativo, fenotipo R (Eritromicina y Clindamicina Resistentes); **D. MÉTODO: D-TEST.** D-Test negativo, fenotipo S (Eritromicina Y Clindamicina Sensibles).

