

Caracterización microbiológica y molecular de las cepas *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en hisopados nasales del personal asistencial de la Unidad de Cuidados intensivos adultos de la Clínica Cartagena del Mar, Cartagena de Indias.

Caracterización microbiológica y molecular de las cepas *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en hisopados nasales del personal asistencial de la Unidad de Cuidados intensivos adultos de la Clínica Cartagena del Mar, Cartagena de Indias.

**Carrillo Padilla Laura Vanessa
Caycedo Assia Samir Alberto
Gómez Navarro Maria Bernarda
Hoyos Sarmiento Andrea Carolina
Moreno Brún Paula Andrea**

**UNIVERSIDAD DEL SINU ELIAS BECHARA ZAINUM
SECCIONAL CARTAGENA
CARTAGENA DE INDIAS- BOLIVAR
NOVIEMBRE 2018**

Caracterización microbiológica y molecular de las cepas *Staphylococcus aureus* aislados en hisopados nasales del personal asistencial de la Unidad de Cuidados intensivos adultos de la Clínica Cartagena del Mar, Cartagena de Indias.

**Carrillo Padilla Laura Vanessa
Caycedo Assia Samir Alberto
Gómez Navarro Maria Bernarda
Hoyos Sarmiento Andrea Carolina
Moreno Brún Paula Andrea**

ASESOR METODOLÓGICO: LUZ MARINA PADILLA MARRUGO

ASESOR DISCIPLINAR: YALEYVIS VUELVAS MONTES

**UNIVERSIDAD DEL SINU ELIAS BECHARA ZAINUM
SECCIONAL CARTAGENA
CARTAGENA NOVIEMBRE 2018**

Inicialmente le damos las gracias a Dios por permitirnos lograr una meta más

A la Bióloga Yaleyvis Buelvas Montes y la doctora Luz Marina Padilla por su paciencia, constancia y por ser multiplicadoras de su conocimiento.

A Juan Rebollo y doctor Enrique Ramos por su gentileza y valiosa ayuda.

Al grupo del laboratorio de microbiología Liris González y Dayana Berrío.

A nuestra alma máter.

A nuestros padres, familiares y amigos por motivarnos día a día.

A todos ellos muchísimas gracias.

TABLE OF CONTENTS

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. PROBLEMA	10
2.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
2.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	11
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. OBJETIVOS	13
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
5. MARCOS	14
5.1 MARCO TEÓRICO	14
5.2 ESTADO DEL ARTE / ANTECEDENTES.....	15
5.3 MARCO CONCEPTUAL	18
5.4 MARCO LEGAL.....	18
6. METODOLOGÍA	19
6.1 TIPO DE ESTUDIO	19
6.2 POBLACIÓN Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA	19
6.2.1 CRITERIOS PARA SELECCIONAR LA MUESTRA	19
6.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	21
6.4.2 CULTIVO DE LA MUESTRA.....	21
6.4.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	21
6.4.4 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA	21
6.4.4.1 TINCIÓN DE GRAM.	22
6.4.4.2 PRUEBA DE LA CATALASA.	22
6.4.4.3 PRUEBA DE COAGULASA.....	22
6.5 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	22
6.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS	22
7. RESULTADOS	24

8. DISCUSIÓN	25
9. CONCLUSIÓN.....	26
10. BIBLIOGRAFÍA	27
ANEXOS.....	31

RESUMEN

Staphylococcus aureus metilcilino resistente (SARM) es una bacteria gram-positiva, ampliamente distribuida causante de graves infecciones asociadas al cuidado de la salud y adquiridas en la comunidad, constituyendo un problema de salud pública debido al aumento en la estancia hospitalaria y los costos. Esta bacteria se encuentra como parte de la microbiota normal en diferentes mucosas, por lo que la colonización nasal por esta bacteria, aumenta el riesgo de una infección invasiva y aumenta tres veces la aparición de la infección del sitio operatorio y necrosis por la presencia de un factor de virulencia llamado leucocidina de Pantón-Valentine (PVL). Se hace necesario la búsqueda de SARM en la mucosa nasal para así tomar medidas preventivas de aislamiento, para evitar contacto con los pacientes por parte del personal portador y descolonización de los mismos. El objetivo de este trabajo es caracterizar microbiológica y molecularmente las cepas de *Staphylococcus aureus* metilcilino resistente en muestras de hisopado nasal del personal asistencial de una Unidad de Cuidado Intensivo. Los hallazgos de esta investigación facilitaran la toma de decisiones para el manejo de los pacientes y la prevención de infecciones por esta cepa.

PALABRAS CLAVES: staphylococcus aureus metilcilino resistente, leucocidina de panton-valentine, mucosa nasal, unidad de cuidados intensivos.

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a gram-positive bacterium, widely distributed caused by diseases in health care and acquired in the community, constituting a public health problem as an increase in hospital stay and costs. This bacterium is found as part of the normal microbiota in different mucous membranes, so nasal colonization by this bacterium increases the risk of invasive infection and increases three times the onset of infection of the operative site and necrosis due to the presence of a virulence factor called Panton-Valentine Leukocidin (PVL). It is necessary to perform a search for MRSA in the nasal mucosa in order to take the preventive measures of isolation, in order to avoid contact with patients by the personnel who carry and decolonize them. The objective of this work is to characterize microbiologically and molecularly the *Staphylococcus aureus* methicillin resistant strains in the nasal swab samples of the care personnel of an Intensive Care Unit. The findings of this research will facilitate decision making for the management of patients and the prevention of infections by this strain.

KEY WORDS: methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Panton-Valentine leukocidine, nasal mucose, intensive care unit.

1. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es la principal especie patógena de su género, causa común de infecciones diversas, tanto de origen comunitario como hospitalario. Es de importancia su estudio debido a la elevada frecuencia de infecciones en sitios donde hace parte del microbiota tales como la piel, las mucosas y las partes blandas, y por presentar cepas resistentes a meticilina (aislados SARM), siendo una causa importante de infecciones asociadas a la atención en salud en nuestro país.

Es importante el conocimiento de las características de las cepas de SARM presentes en el ámbito del personal hospitalario que permitan conocer el riesgo de infecciones asociadas a la atención en salud y la dinámica de transmisión dentro de los espacios intrahospitalarios, con el objetivo final de implementar medidas de prevención y control que lleven a disminución de las infecciones intrahospitalarias con menor estancia del paciente y reducción de costos para la institución.

Se realiza la investigación para conocer el número de portadores que se encuentra entre el personal asistencial de salud de la Unidad de Cuidados Intensivos Adultos en la Clínica Cartagena del Mar y su relación con el número de horas que el personal se encuentra laborando.

2. PROBLEMA

2.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El *Staphylococcus aureus* es uno de los microorganismos considerados patógenos por excelencia, por ende de gran importancia médica debido a sus múltiples factores de virulencia y a la aparición de cepas resistentes a la metilcilina (1). La prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilcilina (SARM) en los últimos años ha venido en aumento. En los Estados Unidos en las unidades de cuidados intensivos se estima que el 59,5% de *Staphylococcus aureus* aislados son SARM y que la tasa de mortalidad asociada con las infecciones por SARM invasivas es de aproximadamente 20%. En América Latina, más específicamente en Cuba se han reportado un 64,2% de prevalencia (2,3). En Colombia, la resistencia a la metilcilina se ha encontrado hasta porcentajes por encima del 40% (4). Los SARM asociados a la comunidad se han convertido en un asunto preocupante por las infecciones graves y fatales que puede ocasionar (2).

El *Staphylococcus aureus* puede hacer parte de la microbiota nasal. La colonización nasal de SARM es considerado un riesgo tanto para infecciones adquiridas en la comunidad, entre ellas piodermitis, neumonía osteomielitis y bacteriemia; como las infecciones asociadas a la atención en salud en personas con poca o ningún factor de riesgo conocido (5). Debido a que la diseminación de esta bacteria puede ocurrir por vía respiratoria provenientes de personas sanas en donde hace parte de su microbiota. La colonización nasal por esta bacteria, aumenta el riesgo de una infección invasiva y aumenta tres veces la aparición de la infección del sitio operatorio, necrosis por la presencia de un factor de virulencia llamado leucocidina de Panton-Valentine (PVL), su patogenicidad se refleja en las altas tasas de morbimortalidad, aumento de la estancia hospitalaria y costos, tornándola un problema de salud pública. Se hace necesario la búsqueda de SARM en la mucosa nasal para así tomar medidas preventivas de aislamiento para evitar la transmisión por contacto a los pacientes y descolonización al personal asistencial (1, 6, 8,16).

2.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es la caracterización microbiológica y molecular de las cepas *Staphylococcus aureus* aislados en hisopados nasales del personal asistencial de Unidades de Cuidados intensivos de la Clínica del Mar, Cartagena de Indias?

3. JUSTIFICACIÓN

En Cartagena, Colombia, según los registros que entregan los comités de infecciones de una entidad clínica del régimen subsidiado, el SARM tiene una prevalencia aproximada del 27.6%, incluyendo tanto casos de origen comunitarios como infecciones asociadas a la atención en salud. Además existen registros de mortalidad por esta bacteria, principalmente provenientes de infecciones de tejido blando y osteomielitis, generando así mucha preocupación entre la comunidad científica de la ciudad. Sin embargo los datos de otras instituciones no son conocidos así como tampoco se dispone de información sobre las características moleculares de las cepas y su patogenicidad.

El presente trabajo pretende conocer la frecuencia de cepas SARM en muestras de hisopado nasal del personal asistencial de Unidades de Cuidados Intensivos, utilizando técnicas microbiológicas y moleculares para lograr su identificación y caracterización de su patogenicidad además de su dinámica de transmisión.

El conocimiento de la frecuencia y características de las cepas de SARM presentes en el ámbito hospitalario permiten conocer el riesgo de infecciones asociadas a la atención en salud y la dinámica de transmisión dentro de los espacios institucionales, además del papel del personal asistencial con el objeto final de implementar medidas de prevención y control que llevaran a disminución de las infecciones intrahospitalarias con menor estancia del paciente y reducción de costos para la institución

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar microbiológica y molecularmente las cepas de *Staphylococcus aureus* aislados en hisopados nasales de personal asistencial de la Unidad de Cuidados intensivos adultos de la Clínica del Mar, Cartagena de Indias.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir las características laborales del personal asistencial portador del SARM incluidos en el estudio.
- Determinar el número de individuos portadores de cepas SARM mediante análisis microbiológico del hisopado nasal.
- Caracterizar molecularmente la presencia de PLV Mec-A, nuc en las cepas SARM obtenidas de los hisopados.

5. MARCOS

5.1 MARCO TEÓRICO

Generalidades de *Staphylococcus aureus*. Una bacteria potencialmente patógena.

Los *Staphylococcus aureus* son de bacterias cuyo principal reservorio es el ser humano, hallándose en los portadores sanos, especialmente en las fosas nasales, así como en los pacientes infectados. La colonización puede asentar sobre la mucosa nasal, orofaringe, epidermis íntegra, úlceras crónicas cutáneas, heridas en fase de cicatrización o en la uretra de portadores de sonda (7).

Esta bacteria posee una gran capacidad para sobrevivir en un ambiente adverso y por la acción de sus determinantes de patogenicidad (cápsula mucoide polisacárida, componentes antigénicos de la pared, producción de enzimas como catalasa, coagulasa, hialuronidasa, estafiloquinasas, lipasas, β -lactamasas, o la secreción de diversas toxinas como la exotoxina epidermolítica, enterotoxinas o la toxina del síndrome de shock tóxico), acaba produciendo infección. Además también tiene gran capacidad de adherencia a diversos sustratos in vitro, por mecanismos que se activan también sobre diversos materiales inanimados como el polimetacrilato el teflón o la mayoría de materiales protésicos (7, 8, 9,10).

Caracterización epidemiológica de los aislamientos de SARM

En una investigación sobre un brote epidémico por SARM se deberá aislar el microorganismo de los pacientes infectados y en los casos indicados, a partir de muestras de personales sanitarios y ambientales potencialmente colonizados o contaminados. La detección y control de las infecciones por *S. aureus* tiene en cuenta el diagnóstico y control de las infecciones o colonizaciones, y detección precoz de casos de SARM; realización de controles para detección de reservorios; realización de cultivos de vigilancia; establecer un sistema de información sobre las áreas y extensión del brote hospitalario; estudio de la sensibilidad de las cepas circulantes a los posibles tratamientos establecidos; y caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos.

En la actualidad existen tanto métodos fenotípicos y genotípicos que ayudan a definir si se trata de un brote o que personal asistencial esta colonizado (11,12).

Mecanismos de resistencia a los betalactámicos de *Staphylococcus aureus*

En el año 2000, los Centros de Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) definieron una infección por SARM-AC como el aislamiento de una cepa SARM en un paciente externo o dentro de las 48 horas de hospitalización sin que existieran los factores de riesgo de los SARM asociados a la atención en salud como hemodiálisis, cirugía, residencia en centros de cuidados de largo plazo, hospitalización durante el año previo, presencia de un catéter intravenoso permanente, dispositivos transcutáneos o un aislamiento previo de SARM en el paciente (2).

El *Staphylococcus aureus* es un microorganismo de gran importancia clínica, en especial por la aparición de cepas resistentes a meticilina. Considerados los principales patógenos bacterianos resistentes a antibióticos asociados a infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad (4,5). SARM actualmente no es considerado como un patógeno puramente nosocomial debido a informes de SARM adquirido en comunidad (SARM-AC) en pacientes sin factores de riesgo identificable (1,8,13).

La vancomicina se ha considerado de elección para tratar las infecciones graves causadas por el SARM desde hace más de cuatro décadas (14,15).

5.2 ESTADO DEL ARTE / ANTECEDENTES

El primer caso de SARM, adquirido en la comunidad fue descrito en poblaciones indígenas, sin hospitalización previa, que habitaban en comunidades alejadas en Australia, a inicios de la década de 1990 (2).

El *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) es un Causa de infección asociada a la atención en salud, causando una variedad de enfermedades como bacteriemia, endocarditis, infecciones de la herida, neumonía. Anteriormente estas cepas solo se encontraban en los hospitales pero hoy se han incrementado los aislados en pacientes que vienen de la comunidad. Se ha observado además que, en comparación con *Staphylococcus aureus* susceptible de meticilina (MSSA), la colonización con SARM aumenta el riesgo para el desarrollo de Infecciones posteriores (17,18).

Características microbiológicas de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pertenece a la familia Micrococcaceae, género *Staphylococcus*. Son cocos Gram positivos, al microscopio se pueden observar en pares o en racimos con un diámetro de 0.5 a 0.1 μ , inmóviles, aerobios y anaerobios facultativos, no forman esporas y sólo algunas cepas presentan una cápsula. El nombre del género fue designado por Alexander Ogston en 1883. El género está compuesto por 35 especies y 17 subespecies, entre ellas cabe destacar la importancia de patógenos como *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus saprophyticus*, entre otras (18,19).

¿Por qué *Staphylococcus aureus* metilcilino resistente?

Se debe a que estas cepas son portadores del gen *mecA* localizado en un elemento genético móvil llamado cassette cromosomal estafilocócico (SCCmec). Este gen codifica una proteína de unión a la penicilina (PBP2a) que se diferencia de la PBP natural (penicillin binding protein 2A), no permite la unión a los β -lactámicos. Por lo tanto, no inhibe la síntesis de la pared celular de la bacteria. Inicialmente se describieron cinco tipos de SCCmec: I, II, III, IV y V. Recientemente se han descrito más tipos del elemento SCCmec. En la mayoría de las cepas CA-MRSA se ha observado que portan el SCCmec tipo IV y algunas el tipo V. Mientras que los adquiridos en el hospital por lo general portan los SCCmec tipo I, II y III. Otra diferencia entre estas cepas es la presencia de la leucocidina Pantón Valentine (PVL), exotoxina específica de las cepas de *S. aureus* en su mayoría adquiridas en la comunidad que actúa lesionando leucocitos y posiblemente tejidos. Los genes que codifican esta toxina pueden diseminarse de una cepa a otra por bacteriófagos (20,28).

Las cepas aisladas portadoras del gen *mecA* son resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos incluyendo penicilinas, oxacilinas y cefalosporinas (18, 19, 20,21).

Factores de riesgo para adquirir SARM

Entre los factores relacionados con el huésped están los poblacionales, sociodemográficos y los genéticos. Factores como la deficiencia en la inmunidad innata han sido implicados en los mecanismos de colonización de *Staphylococcus aureus*. Deficiente lactancia materna se han relacionados. Infección por VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), diabetes, obesidad, así como factores ambientales aumentan el riesgo de colonización de SARM. Además, una variedad de factores como uso reciente a antibióticos y antecedentes de nacimiento

prematureo. Los ambientes concurridos como las guarderías, colegios con un mayor número de niños aumentó significativamente el riesgo de colonización de SARM. Estas Observaciones pueden explicar la creciente incidencia de SARM en la década pasada. Factores como la lactancia materna han sido descritos como protectores contra la colonización de SARM (22,26).

***Staphylococcus aureus* en la comunidad**

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria que produce diversas infecciones entre las cuales se destaca infecciones de piel y partes blandas. La mayoría de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM) ocurren en huéspedes con factores relacionados con la estancia hospitalaria como cirugía previa, hospitalización, cateterismo endovenoso, usuario de diálisis. Tiempo después se describieron infecciones por SARM en grupos de personas sin los factores ya estudiados clasificándolos entonces en infecciones por SARM adquiridos en la comunidad e infecciones por SARM adquiridos en el hospital (23).

El cuadro clínico de los pacientes no hay diferencias entre las observadas por SAMS y SARM. Las infecciones de la piel y tejidos blandos por SARM son celulitis, forunculitis y abscesos, que por lo general se encuentran en cuello y cabeza como una linfadenitis cervical, otitis externa o mastoiditis aguda, infecciones orbitarias y periorbitarias. Las infecciones en su mayoría son leves y superficiales, aunque el incremento de casos graves y fatales han venido en aumento, como neumonías necrotizantes, empiema, osteomielitis, sepsis (21).

Susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*

Tras el descubrimiento de la penicilina, tan solo después de un año ya el *Staphylococcus aureus* presentaba resistencia, esta se debe a la producción de penicilinasas (13). Posteriormente se introdujo el uso de metilcilina que resulto ser mucho más eficaz, en 1960 se detectó la primera cepa resistente a metilcilina (14,15). Se observó en un estudio que más del 90% de las cepas son resistentes a la penicilina, aproximadamente un 10% de las cepas resistente a eritromicina y clindamicina, no se encontró resistencia a linezolid y daptomicina (14). La vancomicina sigue siendo el antibiótico de elección, sin embargo, se han detectado concentraciones inhibitorias mínimas mayor de 1.5 mg/L, cuya susceptibilidad al glucopéptido se ha asociado con fallas terapéuticas.

Teniendo en cuenta esto se hace necesario el reporte de las concentraciones inhibitorias mínimas del antibiótico, para determinar si se requiere el uso de otros antibióticos como linezolid o daptomicina (14,15,24,25,27,28). Revisión

bibliográfica que permita tener aproximaciones o certezas de otras investigaciones desarrolladas en el ámbito local, nacional e internacional del área de conocimiento en el cual se suscribe el proyecto. Esta revisión permite establecer en caso necesario re direccionamiento de la investigación.

5.3 MARCO CONCEPTUAL

Staphylococcus aureus: (*S. aureus*) es uno de los patógenos de mayor importancia en la etiología de infecciones asociadas al cuidado de la salud y adquiridas en la comunidad (29). En los últimos años se ha observado que los aislamientos de *S. aureus*, tanto clínicos como colonizantes, han presentado variaciones genotípicas, particularmente un incremento en la resistencia a meticilina y a antibióticos beta-lactámicos en general, lo cual se debe a la adquisición horizontal del gen *mecA*, el cual codifica la PBP2a, una transpeptidasa que funciona en la síntesis del peptidoglicano y que presenta baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos(30,31).

Staphylococcus aureus metilcilino resistente: (SARM) se identificó por primera vez en 1960 y desde entonces se ha convertido en una causa reconocida de infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad (32). La introducción de la meticilina, junto con otros antibióticos, ha ocasionado una fuerte presión selectiva que ha llevado a la evolución de una variedad de clones SARM que se han diseminado alrededor del mundo.

Clon: está integrado por diferentes cepas de la bacteria que se han originado a partir de un mismo ancestro común, y que han variado mediante mutaciones puntuales, recombinación, o la adquisición/delección de elementos genéticos móviles, lo que conlleva a una extensa diversidad genómica y fenotípica (33). Cabe resaltar que la distribución mundial de las cepas SARM no se debe al surgimiento y diseminación de un único clon, sino al de múltiples clones con características genéticas diversas.

5.4 MARCO LEGAL

El presente proyecto respeta la integridad y derechos de cada uno de los pacientes participantes mediante consentimiento informado firmado por los padres o representante legal, siguiendo así los lineamientos estipulados en la declaración de Helsinki y por ende el código de Núremberg de 1947.

6. METODOLOGÍA

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Se desarrollará un estudio de tipo descriptivo, se describirán la frecuencia y las características más importantes relacionadas con la colonización de SARM en el personal asistencial de la UCI adulto.

6.2 POBLACIÓN Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA

La población de este estudio será la totalidad del personal asistencial de la unidad de cuidados intensivos en la clínica Cartagena del Mar, Cartagena de Indias.

Dentro de esta población serán incluidos todas las personas que tengan contacto con los pacientes. A todos los participantes se les explicará el procedimiento para toma de muestra y se les solicitará la firma del consentimiento informado.

6.2.1 CRITERIOS PARA SELECCIONAR LA MUESTRA

- **Criterios de inclusión**

→ Todo el personal asistencial que trabaja en la UCI adulto de la clínica Cartagena del mar.

→ Ser mayor de 18 años.

- **Criterios de exclusión**

→ Ser menor de 18 años.

→ Trabajar en otra UCI.

→ Haber cursado con infección del tracto respiratorio en el último mes.

→ Haber recibido antibiótico durante las últimas tres semanas.

6.3 VARIABLES

N°	Nombre	Definición	Tipo	Categoría
1	Medio manitol	Medio de cultivo selectivo y	Cualitativa Nominal	Cambio color Sin cambio de

		diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos.		color
2	Prueba catalasa	Enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	Cualitativa Nominal	Burbujas No burbujas
3	Prueba coagulasa	Proteína que permite la conversión del fibrinógeno en fibrina	Cualitativa nominal	Aglutina, No Aglutina
4	Gen nuc	Presencia de secuencia genética que codifica para el gen de la termonucleasa estafilocócica (nuc)	Cualitativa Nominal	Si no
5	Gen mecA	Presencia de secuencia genética que codifica para el gen mecA	Cualitativa nominal	Si no
6	Leucocidina PVL	Presencia de secuencia genética que codifica para el gen: PVL (lukS-PV y lukF-PV)	Cualitativa nominal	Si No
7	S. aureus	Bacteria Gram-positiva identificada de acuerdo a lineamientos de la Asociación Americana de Microbiología	Cualitativa nominal	Fermenta el agar manitol, pruebas catalasa y coagulasa
8	SARM	Staphylococcus aureus resistente a meticilina	Cualitativa nominal	Presencia gen mecA

6.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

6.4.1 TOMA DE MUESTRAS. Las muestras serán tomadas por el auxiliar de enfermería encargado del servicio, con una explicación previa sobre cómo se debe tomar la muestra hecha por la microbióloga encargada del proyecto, previo consentimiento informado y firmado por la paciente. Las muestras de secreción nasal se tomarán al personal asistencial según el turno que les corresponda, introduciendo el hisopo estéril en las fosas nasales, se rota por unos segundos y se coloca en tubo estéril con medio líquido que será suministrado por el laboratorio. Una vez tomada la muestra se transportará al laboratorio inmediatamente, en caso de no ser posible el traslado, debe conservarse en medio de transporte.

6.4.2 CULTIVO DE LA MUESTRA

Los hisopados nasales se sembrarán directamente en el medio agar sangre de Becton Dickinson. Buscar las colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* en este medio después de incubar en aerobiosis a 37 °C durante 24 horas.

6.4.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

1. Extracción de ADN genómico: Las cepas cultivadas serán seleccionadas 1-3 colonias del agar y reconstituidas en medio nutritivo durante 24 horas a 37 grados centígrados. Luego se tomará 1 mL del cultivo que será centrifugado, descartando el sobrenadante y el pellet será utilizado para la extracción de ADN con el kit Wizard Genomic DNA purification (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido será almacenado a -20 grados centígrados.
2. Tipificación del casete cromosómico estafilocócico SCCmec: la subtipificación del casete SCCmec de las cepas se realizará por PCR múltiple utilizando cebadores específicos para los subtipos previamente reportados (35). Así mismo se determinará la presencia de los genes que codifican para las toxinas estafilocócicas PVL, SEQ, SEK y Bacteriocina B utilizando PCR multiplex según el protocolo utilizado por Rebollo et al., Los productos e visualizaran el gel de agarosa al 2.0% con bromuro de etidio 0.5 ug/mL. (36)
3. Tipificación molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE): Se realizará la PFGE según el protocolo de Mulvey et al, y Tenover et al. (37,38). Este procedimiento se realizará en los laboratorios de la profesora Niradiz Reyes en la Universidad de Cartagena.

6.4.4 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

Se evalúa a las 24 horas del crecimiento bacteriano la reacción del agar y cambio de coloración a amarillo, se obtienen colonias de la muestra para realizar tinción de gram, prueba de catalasa y coagulasa.

6.4.4.1 TINCIÓN DE GRAM. La tinción de Gram se realizó mediante la preparación de extendidos de *S. aureus* a partir de cultivos en agar nutritivo de 24 horas de crecimiento a 37°C. El extendido se fijó con calor, se le adicionó cristal violeta por un minuto y se enjuagó con agua. Seguidamente, se le adicionó lugol con las mismas características en tiempo y lavado que el colorante anterior. Luego de ello, se decoloró con alcohol acetona, se enjuagó y se adicionó safranina. Luego de un minuto se enjuagó y se dejó secar a temperatura ambiente para ser observado al microscopio con los objetivos de 10X, 40X y 100X.

6.4.4.2 PRUEBA DE LA CATALASA. Para esta prueba se utilizó una colonia con 24 horas de crecimiento en agar nutritivo y se colocó sobre un portaobjetos, posteriormente se le adicionó una gota de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Luego, se determinó la producción de catalasa teniendo en cuenta la formación de burbujas.

6.4.4.3 PRUEBA DE COAGULASA. Esta prueba se realizó, mezclando un cultivo de caldo o de colonias extraídas de una placa de agar a un tubo con plasma de conejo BBL rehidratado. Esta mezcla se incubó a 37°C hasta por 24 horas. La formación de un coágulo en el plasma indicaba la producción de coagulasa.

6.5 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los datos serán almacenados en Excel y posteriormente se utilizarán para análisis en el software SPSS versión 20, a través de estadística descriptiva. Se determinará la distribución de cada una de las variables, en el caso de las variables categóricas el número de datos y la distribución de frecuencias según categorías, en el caso de las variables continuas su aproximación a la distribución normal. También se hará análisis bivariado para determinar la asociación entre las variables, utilizando un intervalo de confianza del 95 % y un valor de $p < 0,05$.

6.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para la inclusión de participantes en el estudio se pedirá la firma del consentimiento posterior a la explicación detallada del objeto del estudio y del

procedimiento de toma de muestra. Los pacientes que por su condición crítica no estén conscientes serán incluidos siempre y cuando el familiar responsable de su autorización y firma. El procedimiento de hisopado nasal es inocuo, no-invasivo y utilizado ampliamente como técnica de muestreo para cultivos bacterianos, por lo tanto, no causa daño ni alteraciones en los individuos. De acuerdo a la resolución N° 008430 DE 1993 (4 DE OCTUBRE DE 1993), y considerando lo anteriormente descrito, esta investigación se clasifica con riesgo mínimo, ya que es un estudio descriptivo, no experimentable detallar como se llevará a cabo cada paso propuesto.

7. RESULTADOS

TABLA 1

	MEC positivo N=8	MEC negativo N=13	Valor p
Auxiliar de enfermería*	1 (12,5)	6 (46,2)	0,1735
Enfermera Jefe	3 (37,5)	0 (0,0)	0,0421
Fisioterapeuta	0 (0,0)	2 (15,4)	0,5047
Interno (a)	1 (12,5)	2 (15,4)	0,9997
Médico internista	1 (12,5)	1 (7,7)	0,9897
Residente	1 (12,5)	1 (7,7)	0,9897
Servicios generales	1 (12,5)	1 (7,7)	0,9897
Horas a la semana Me (RIC) †	48 (42 - 48)	48 (48 - 48)	0,9590

* en una auxiliar de enfermería no se amplificó; † Me (Mediana), RIC (Rango intercuartílico)

	PVL positivo N=3	PVL negativo N=18	Valor p
Auxiliar de enfermería*	1 (33,3)	6 (33,3)	0,9987
Enfermera Jefe	1 (33,3)	2 (11,1)	0,3864
Fisioterapeuta	0 (0,0)	2 (11,1)	0,5438
Interno (a)	0 (0,0)	3 (16,7)	0,4450
Médico internista	1 (33,3)	1 (5,6)	0,2714
Residente	0 (0,0)	2 (11,1)	0,5438
Servicios generales	0 (0,0)	2 (11,1)	0,5438
Horas a la semana Me (RIC) †	48 (30 - 48)	48 (48 - 48)	0,6686

* en una auxiliar de enfermería no se amplificó; † Me (Mediana), RIC (Rango intercuartílico)

	Coagulasa positivo N=17	Coagulasa negativo N=5
<i>Staphylococcus</i>	0 (0,0)	5 (100,0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	17 (100,0)	0 (0,0)

8. DISCUSIÓN

El presente estudio constituye una investigación netamente descriptivo, donde se especifica las características microbiológicas y moleculares del *S.aureus* metilino resistente, las muestras obtenidas en el personal asistencial de la UCI Clínica Cartagena del Mar. Se llevó a cabo esta investigación teniendo en cuenta que la bacteria cuenta con diferentes factores de virulencia, lo cual permite infecciones en el humano capaces de producir la muerte.

Las cepas SARM originan un problema terapéutico y de salud pública; el estado de portador nasal de *Staphylococcus aureus* ha sido investigado en diversos grupos de riesgo, entre los que destacan el personal de salud (Kluytmans et al., 1997); Esta investigación se está llevando a cabo considerando que *S. aureus* es una bacteria patogénica que cuenta con diversos factores de virulencia, haciendo a este microorganismo capaz de producir infecciones potencialmente mortales en humanos hasta en un 34,2% (24).

En la recolección parcial de las muestras del personal asistencial de la UCI Cartagena del mar, hasta el momento han sido evaluado 22 personas y se demostró que 77,2% son portadores nasales de *Staphylococcus aureus*; el 22,7% de las muestras eran *Staphylococcus Sp*, el 36,3% demostraron la presencia del Mec-a y 13,6 demostraron la presencia de Pvl. Rebollo-Pérez y colaboradores en 2011 revelan la alta tasa de portación de este casete cromosómico en las cepas que circulan en este entorno geográfico colombiano, demostrando que la colonización de *Staphylococcus aureus* con un 38.5 % y 4.8 % para cepas SAMR Estos hallazgos coinciden con los encontrados en un estudio realizado por Weiss et en donde se observó una proporción de SARM y SASM de 41,6% y 58,4% reafirmando nuestros resultados parciales dado a la similitud de las proporción.

9. CONCLUSIÓN

A través de esta investigación se demostró la presencia de *Staphylococcus aureus meticilino resistente* (SARM) en el personal asistencial de la UCI Clínica Cartagena del mar, lo cual los convierte a ellos en un vehículo para la transmisión de SARM y a su vez representan un riesgo para los pacientes, dado que si se da la transmisión aumenta la estancia hospitalaria y los gastos a la salud convirtiéndolo en un problema de salud pública; además la infección de los pacientes por los factores de virulencia presentes en esta bacteria como la leucocidina de Pantón- Valentain incrementa las tasa de mortalidad, sumándole a esto actualmente está instaurado como problema de salud la resistencia a los antimicrobiano engrandeciendo el problema.

El 77,2% son portadores de *Staphylococcus aureus* por caracterización microbiológicamente y molecularmente 36,3% MecA positivo de ellos 13,6% se determinó la presencia de la leucocidina de Pantón - Valentain PVL.

Se recomienda, estudios moleculares adicionales como el análisis específico del cassette cromosomal del SARM para determinar si las cepas aisladas son adquiridas en la comunidad o están asociadas al cuidado de la salud, además de esto se sugiere el aislamiento y descolonización del personal asistencial portador de la bacteria para disminuir el riesgo de transmisión y a su vez los costos implicados en los cuidados de atención.

10. BIBLIOGRAFÍA

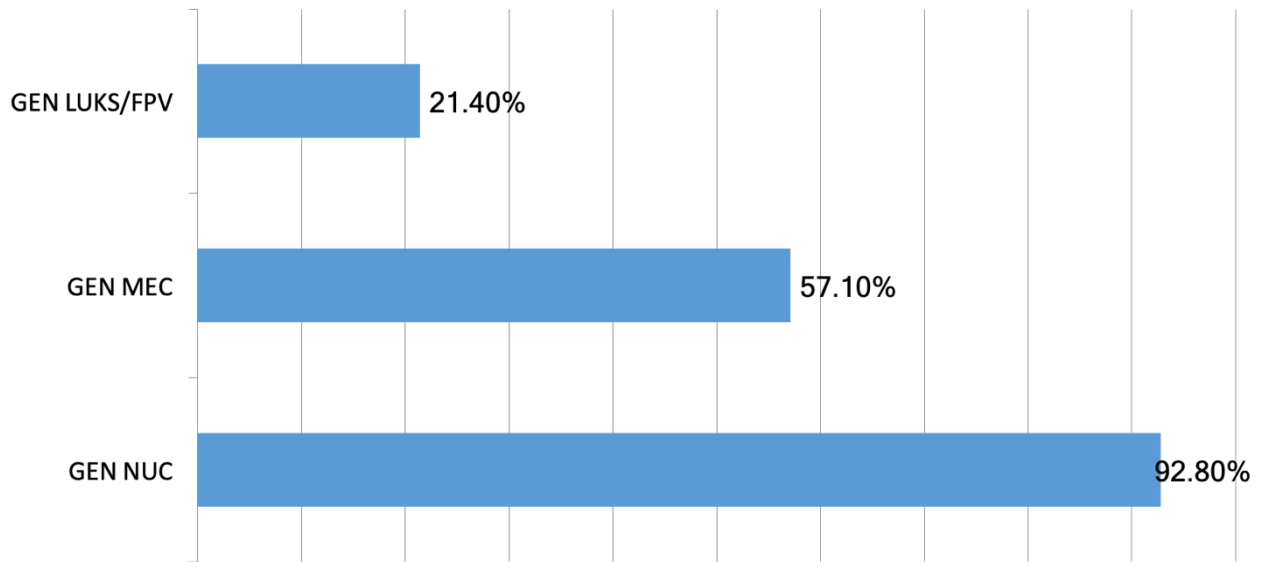
1. Silvas H, Milanés R, Álvarez A, Arzuza O. Características epidemiológicas de pacientes que presentan portación nasal de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. *Rev.cienc.biomed.* 2015;6(1):85-95
2. Luján D, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad: aspectos epidemiológicos y moleculares *An Fac med.* 2013; 74(1):57-62 1)
3. Mederos J, Morejón M. Frecuencia de aislamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el Hospital "Manuel Fajardo Rivero" *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 2014;13(3):406-416
4. Camacho G, Cortés L, Pabón S. Factores de riesgo para infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente comunitario en la fundación hospital de la misericordia entre 2011 a 2013 *Rev.Medica.Sanitas* 17 (3): 110-118, 2014.
5. Espinosa C, Romero M, Rincón G, Jácome M, Arámbula A. Portadores nasales de *Staphylococcus aureus* en personal que labora en un Hospital de Santander, *Salud UIS* 2011; 43 (2): 111-117.
6. Aiarza A, Azaldegui F, Esparza M, Lanzeta I, Sannino C, Urbizu A, et al. Actualización de la guía de actuación ante el *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y otros microorganismos multirresistentes en centros gerontológicos, sociosanitarios y de personas con discapacidad. *Hospital Donostia.* 2011
7. Zendejas G, Avalos H, Soto M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed* 2014; 25:129-143
8. Bou G, Chaves F, Oliver A, Oteo J. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. *Seimc.* 2015
9. Sanchez M, Hernández O, Velasquez L, Rivas D, Marín A, González L, et al. Caracterización del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de tres grupos poblacionales de la ciudad de Medellín. *Infectio.* 2013;17(2):66–72
10. Rojo A, Videgaray F, Raffoul I. Neumonía necrotizante hemorrágica y SARM-AC como causa emergente. *Acta médica.* 2011;9(3):143-148

11. Soltani B, Taghavi A, Moravveji A, Erami M, Haji M, Moniri R, et al. Risk Factors for Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization of Healthy Children. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;7(9):e20025
12. Zacharioudakis I, Zervou F, Ziakas P, Mylonakis E. Meta-Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization and Risk of Infection in Dialysis Patients *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25(1):1-11
13. Castellano M, Perozo A. Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera* 2010; 38(1): 18-35
14. Carmona E, Sandoval S, García C. Frecuencia y susceptibilidad antibiótica del *Staphylococcus aureus* proveniente de hisopados nasales en una población urbano marginal de Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2012; 29(2):206-11.
15. González M. Resistencia antimicrobiana, una amenaza mundial. *Revista Cubana de Pediatría.* 2013;85(4):414-417
16. Carpinelli M, Guillén R, Fariña N, Basualdo W, Aquino R. PCR múltiple para la detección simultánea de los genes *mecA* y *pvl* en *Staphylococcus* spp. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud,* 2012: 8(1): 5-13
17. García F, Cercenado E, Marín M, Bal M, Trincado P, Corredoira J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 45–50
18. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinamer Patol Clin.* 2014; 61: 28-40.
19. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Importancia de *Staphylococcus aureus* metilina-resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. *Rev Latinamer Patol Clin.* 2014; 61: 196-204.
20. Ohadian S 1, Reza M, Da-Voodabadi A. The Detection of Mupirocin Resistance and Nasal Carriage of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* among Healthcare Workers at University Hospitals of Tehran, Iran *J Public Health,* Vol. 44, No.3, Mar 2015, pp.361-368
21. Cervantes E, García R, Salazar P. *Staphylococcus aureus* asociado a la comunidad (CA-MRSA) *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* 2015; 62 (2): 100-111

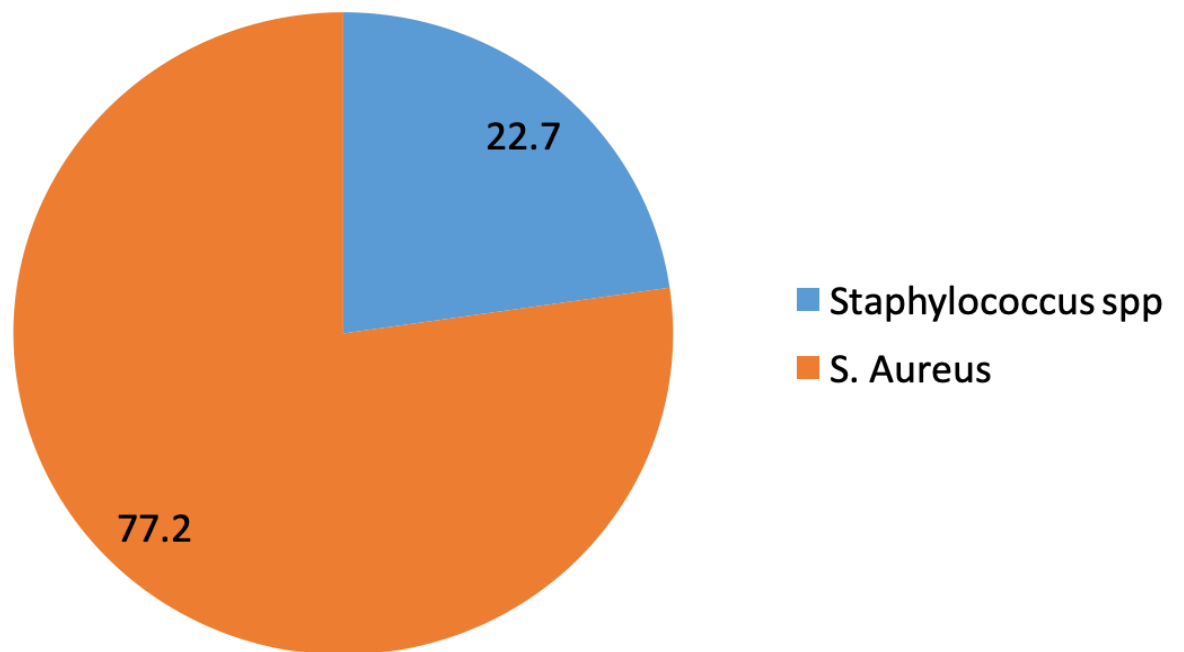
22. Rodriguez E, Jimenez J. Factores relacionados con la colonización por *Staphylococcus aureus*. IATREIA Vol 28(1): 66-77, enero-marzo 2015
23. García C. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad Acta Med Per 2011; 28(2):159-162
24. Kullar R, Davis S, Levine D, Rybak M. Impact of Vancomycin Exposure on Outcomes in Patients With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Support for Consensus Guidelines Suggested Targets. Clinical Infectious Diseases 2011; 52(8):975-981
25. Liu C, Bayer A, Cosgrove S, Daum R, Fridkin S, Gorwitz R, et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children Clinical. Infectious Diseases 2011;52(3):18-55
26. Chen Ch, Hsu k, Lin T, Hwang K, Chen P, Huang Y. Factors Associated with Nasal Colonization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* among Healthy Children in Taiwan. Journal of clinical microbiology, Jan. 2011; 49(1):131-137
27. Sanabria G. Evolución de la resistencia en el *Staphylococcus aureus*. Rev. Inst. Med. Trop. 2014; 3(2) 27-39
28. Mirzaii M, Emaneini M, Jabalameli FHalimi S, Taherikalani M. Molecular investigation of *Staphylococcus aureus* isolated from the patients, personnel, air and environment of an ICU in Theran. Journal of Infection and Public Health. 2015; 8, 202-206
29. Plata K., Rosato A.E., and Wegrzyn G., *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biochim Pol, 2009. 56(4): p. 597-612.
30. Beck W.D., Berger-Bachi B., and Kayser F.H., Additional DNA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of mec-specific DNA. J Bacteriol, 1986. 165(2): p. 373-8.
31. Ito T. and Hiramatsu K., Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Yonsei Med J, 1998. 39(6): p. 526-33.
32. Chambers H.F., The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis, 2001. 7(2): p. 178-82.

33. Rodriguez-Noriega E., Seas C., Guzman-Blanco M., et al., Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *Int J Infect Dis*, 2010. 14(7): p. e560-6.
34. Bettin A, Causil C, Reyes N. Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* nasal isolates from medical students in Cartagena, Colombia. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2012;16(4):329-34
35. Milheirico C., Oliveira D.C., and de Lencastre H., Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCCmec IV multiplex'. *J Antimicrob Chemother*, 2007. 60(1): p. 42-8.).
36. Rebollo-Pérez, J., Ordoñez-Tapia, C., Herazo-Herazo, C., & Reyes-Ramos, N., Nasal carriage of Panton Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy preschool children. *Revista de Salud Pública*, 2011. 13(5), p824-832.
37. Mulvey M.R., Chui L., Ismail J., et al., Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 2001. 39(10): p. 3481-5
38. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., et al., Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 1995. 33(9): p. 2233-9.

ANEXOS
RESULTADOS MOLECULARES TOTALES



RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

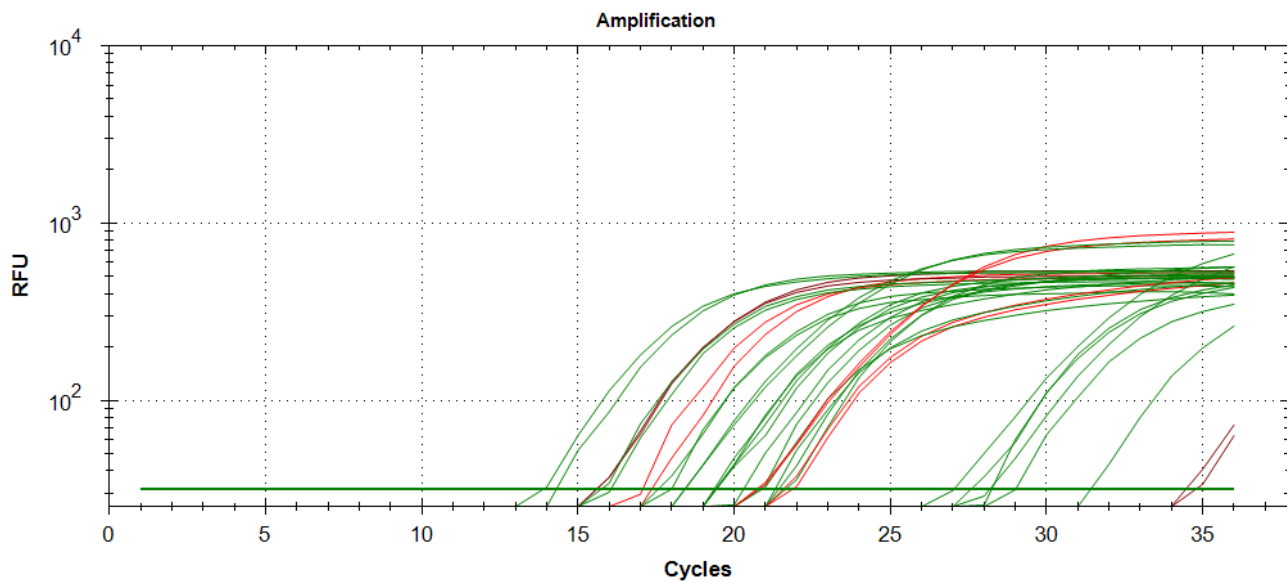


ANALISIS MOLECULAR

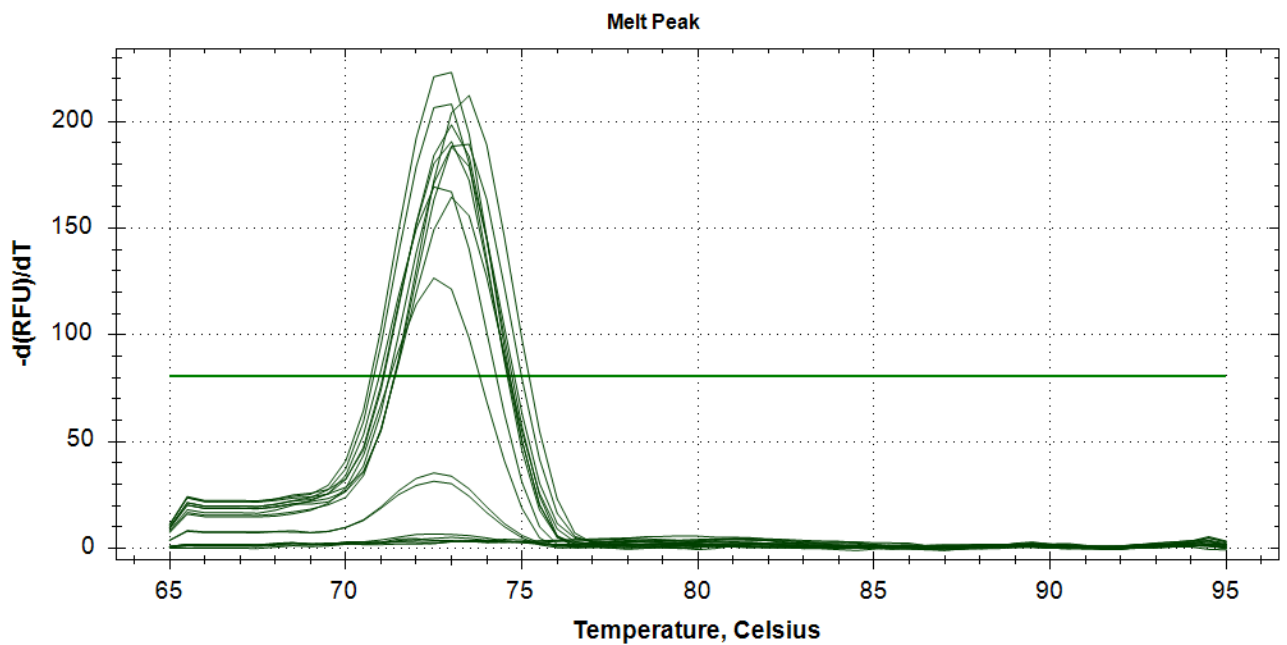
CEPAS DE <i>Staphylococcus sp</i> DE AISLADOS NASALES DEL PERSONAL ASISTENCIAL DE UNA UCI DE UNA CLÍNICA DE LA CIUDAD DE CARTAGENA DE INDIAS										
GEN	CONTROL POSITIVO USA	CONTROL POSITIVO ATCC 29213	SA01	SA02	SA03	SA11	SA12	SA13	SA14	CONTROL NEGATIVO
NUC	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
MEC	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
LukS/F-PV	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-

CEPAS DE <i>Staphylococcus sp</i> DE AISLADOS NASALES DEL PERSONAL ASISTENCIAL DE UNA UCI DE UNA CLÍNICA DE LA CIUDAD DE CARTAGENA DE INDIAS										
GEN	CONTROL POSITIVO USA	CONTROL POSITIVO ATCC 29213	SA15	SA16	SA17	SA18	SA19	SA21	SA22	CONTROL NEGATIVO
NUC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
MEC	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
LukS/F-PV	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-

AMPLIFICACIÓN TOTAL

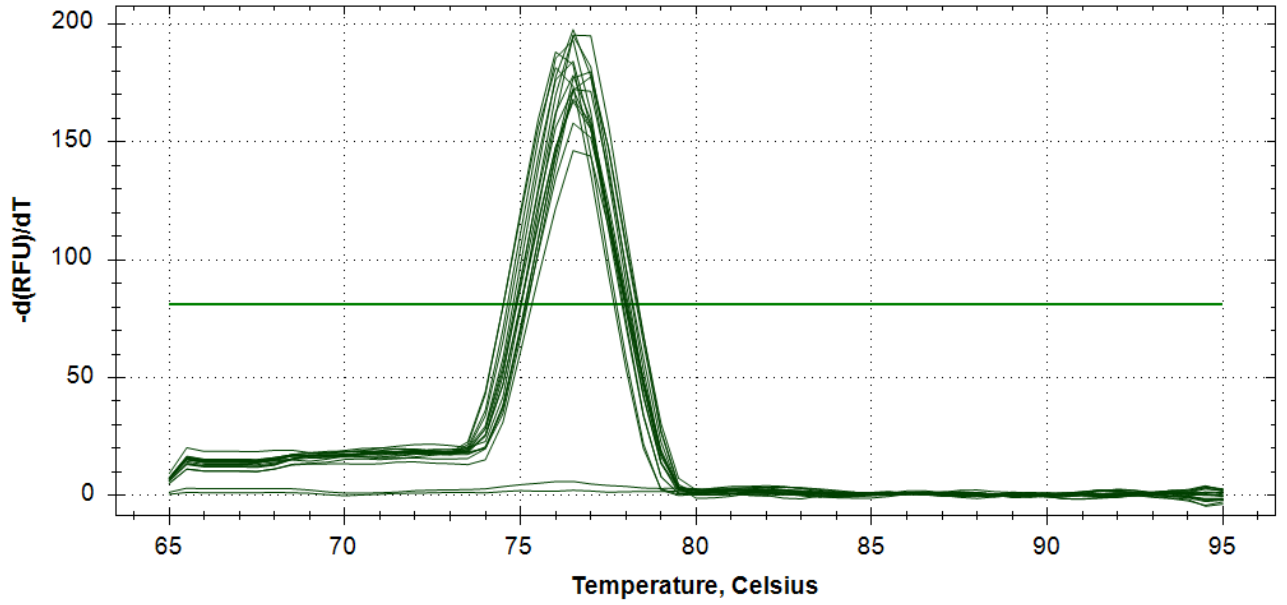


GEN MEC-A



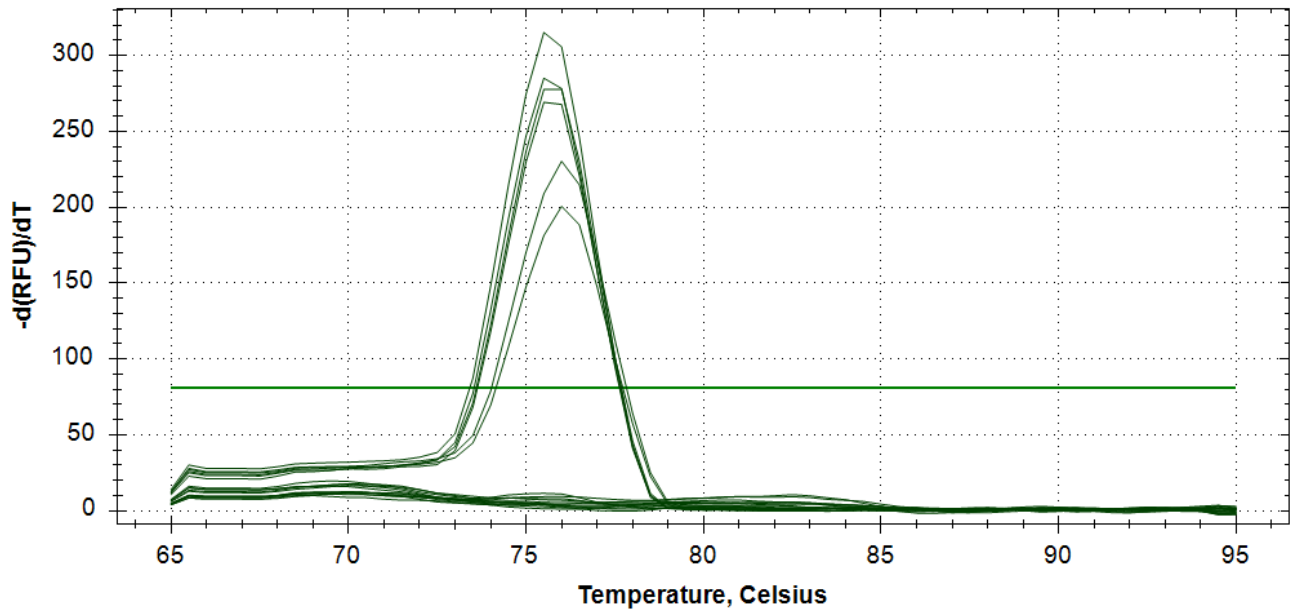
GEN NUC

Melt Peak

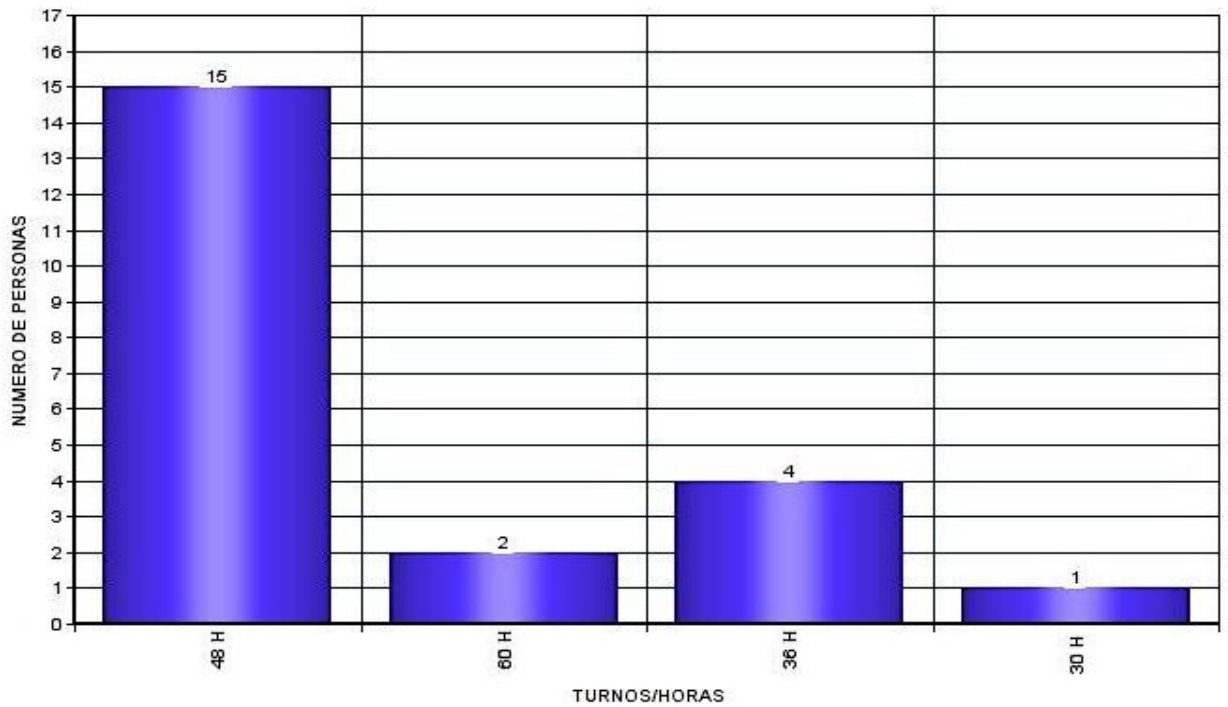


GEN PVL

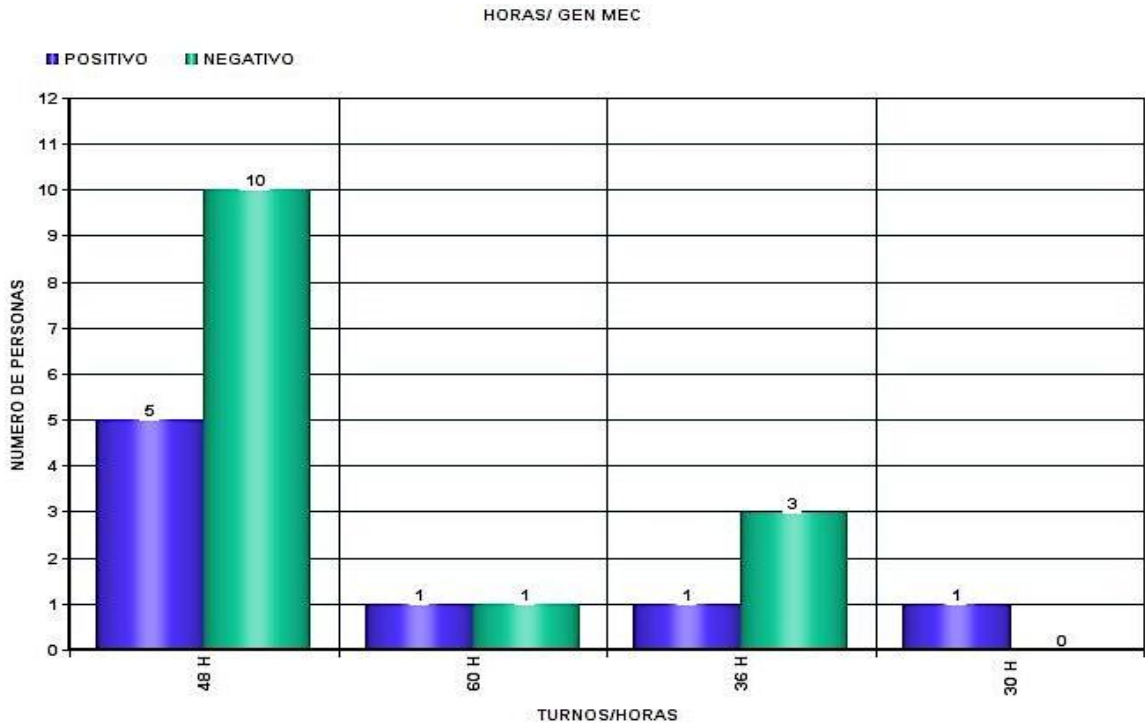
Melt Peak

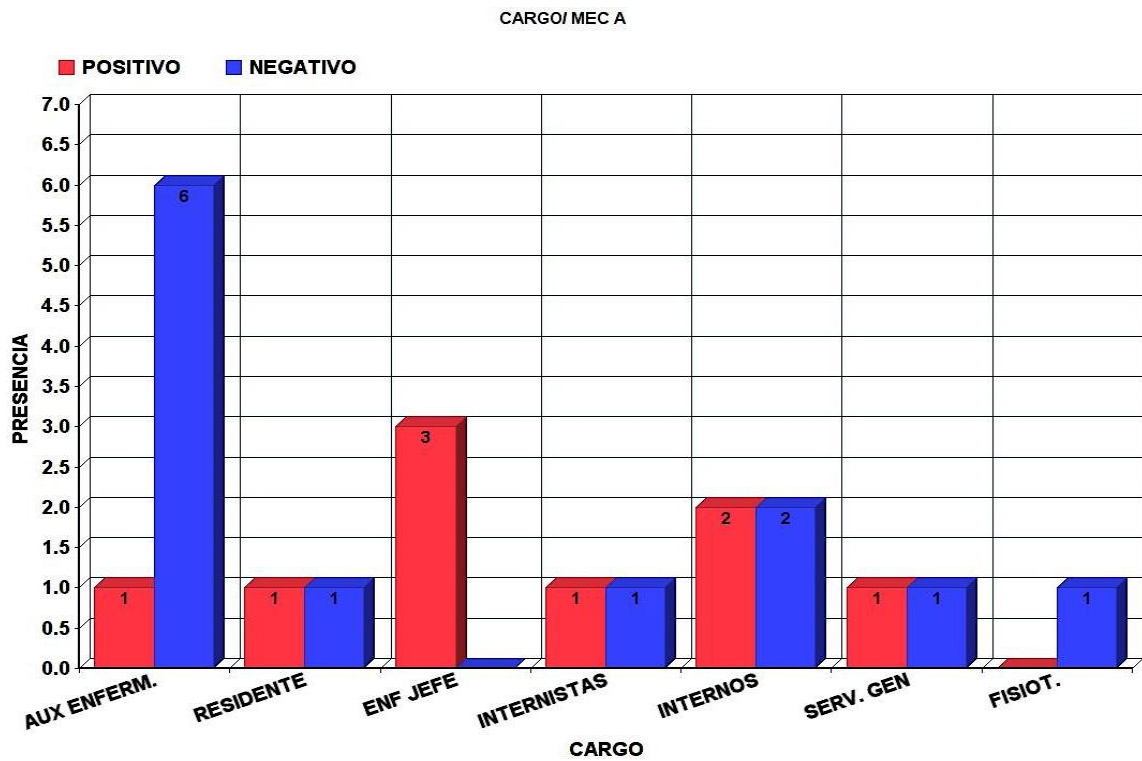


NÚMERO DE HORAS TRABAJADAS POR EL PERSONAL



RELACIÓN ENTRE HORAS Y PRESENCIA DE GEN MEC A Y CARGO Y PRESENCIA DEL GEN MEC A.





RELACIÓN ENTRE CARGO Y PRESENCIA DE LEUCOCIDINA DE PANTON VALENTINE.

