UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

Presencia de Staphylococcus aureus resistente a meticilina en granjas porcinas tecnificadas del departamento de Lima

TESIS

para optar el título profesinal de Medico Veterinario

AUTORA

Claudia Inés Changanaqui Arriola

Lima – Perú

2010

DEDICADO

A mis padres, por brindarme absolutamente todo, por ser el motor de mis sueños y de mis metas, por su amor incondicional y porque nunca dejaron de creer en mí.

A mi hermanita, a la cual adoro, que a lo largo de estos años me brindó mucho apoyo, amor y una eterna amistad.

A Markus, por alentarme a mejorar, por creer que nada es imposible y por sobre todo, el demostrarme que serás parte de mi vida para siempre.

Al Dr. González, por brindarme la oportunidad de realizar la presente Tesis y del cual guardo un gran cariño, admiración y respeto.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Sonia Calle Espinoza por brindarme su apoyo incondicional, su valiosa amistad, y por ser una mujer ejemplar para muchos de nosotros.

A la Dra. Sofía Arriola, por liderar el presente proyecto de tesis con toda su experiencia, su conocimiento, y amistad; y por brindarme una magnífica oportunidad de adquirir mayores conocimientos, considerándola más que mí asesora, una gran amiga.

Al Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva de la FMV-UNMSM así como sus representantes Dr. González, Dr. Gavidia, Dra. Noé, Dra. Arriola, Dr. Angulo, por el apoyo brindado para la realización de la presente tesis. Demostrando su gran organización y dinamismo, siendo un gran ejemplo de trabajo en equipo.

A la Unidad de Bacteriología y Micología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria de la FMV-UNMSM, así como sus representantes la Dra. Hermelinda Rivera, Dra. Sonia Calle, Dra. Lorena Mori, Dr. Siever Morales por sus consejos, acertadas sugerencias, paciencia, apoyo, guía y amistad, brindado durante el tiempo en que realice mi tesis y que hasta aun hoy nos brindan.

ÍNDICE

- Resumen……..……....i
- Abstract...…….……...……ii
- Lista de cuadros……..…….iii
- Lista de figuras.…….…….…….……...iv
- Abreviaciones…….……..……..v

I. INTRODUCCIÓN……..…….……..1

II. REVISIÓN DE LITERATURA……...…….……3

2.1 Generalidades ……...…….....…..3

2.1.1 *Staphylococcus aureus*…….…….....…..3

2.1.2 Morfología ……...……....3

2.1.3 Factores de Virulencia……..……..……...4

2.1.4 Patología de la Infección……..…….……5

2.1.5 Medios de Crecimiento..……...…….....5

2.2 Pruebas Complementarias para Identificación de *Staphylococcus aureus*……...…7

2.2.1 Tinción Gram…….……...7

2.2.2 Prueba de Coagulasa……...…....7

2.2.3 Prueba de Catalasa…….…….…....8

2.3 Agentes Antimicrobianos Betalactámicos……...….....……..……8

2.3.1 Penicilinas……..8

2.3.2 Penicilinas Sintéticas…….……..…….....9

2.4 Resistencia Antimicrobiana……...……9

2.4.1 *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina……...…....10

2.4.1.1 Mecanismos de Resistencia a Betalactácmicos……...……..….10

2.4.1.2 Mecanismos de Resistencia a Otros Antimicrobianos……..….12

2.4.2 Técnicas para Detección de Resistencia Bacteriana……....15

2.4.2.1 Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana……..……..15

2.4.2.2 Prueba de Látex Aglutinación……..……..17

2.4.2.3 Reacción de la Polimerasa en Cadena……...……..……...17

2.5 Importancia en Salud Pública Veterinaria……...……18
2.5.1 Uso de Promotores de Crecimiento en Producción Animal…….……...18
2.5.2 Uso de Promotores de Crecimiento en Granjas Porcinas….……...19
2.5.3 SARM Asociado a Hospitales (SARM-AH)…….…….....19
2.5.4 SARM Asociado a Comunidades (SARM-AC)..…….……..……20
2.5.5 SARM en Animales……..…21
2.5.5.1 SARM en Porcinos…….……...…….……...…22
2.6 Importancia Económica……..……...……..22
III. MATERIALES Y MÉTODOS……...……..24
3.1 Materiales……..……..…...24
3.2 Método Experimental ……..…..…24
3.2.1 Lugar de ejecución……...……...……..24
3.2.2 Animales…….……..……..….....24
3.2.3 Toma de muestras ……...……...……..……25
3.2.4 Procesamiento de muestras…….……...……25
3.2.5 Análisis de Datos……..…...28
IV. RESULTADOS……...….29
V. DISCUSIÓN……...……..36
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES……..…..…39
VII. BIBLIOGRAFÍA……...……40
VIII. ANEXOS……..……48

LISTA DE CUADROS

Cuadro Nº 1: Frecuencia y distribución de la proporción de colonias (+) a SARM provenientes de una población de 120 porcinos. Lima– Perú 2009.

Cuadro Nº 2: Proporción de animales positivos a SARM dentro de la granja porcina tecnificada positiva y proporción de colonias de SARM positivas en el total de animales muestreados. Lima– Perú 2009.

Cuadro Nº 3: Muestras resistentes sometidas a pruebas de detección de SARM. Lima – Perú 2009.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aislamiento de colonias de *Staphylococcus spp*. en placa de agar manitol salado.

Figura 2. Siembra de colonias (*Staphylococcus spp*.) en placa de agar sangre

Figura 3. Aislamiento de colonia resistente al disco de oxacilina **y** con características fenotípicas de *S. aureus* en placa de agar sangre

Figura 4. Formación de coágulos, muestras positivas a la presencia de enzima coagulasa

Figura 5. Aislamiento de colonias de SARM en medio selectivo ORSAB

Figura 6. Detección de colonia de SARM por medio de la prueba de látex aglutinación

ABREVIACIONES

(1/6) Una granja positiva a SARM de 6 granjas porcinas tecnificadas

(3/20) Tres porcinos positivos a SARM de 20 dentro de granjas porcinas tecnificadas

SARM *Staphyloccoccus aureus* resistente a Meticilina

SASM *Staphyloccoccus aureus* sensible a Meticilina

SARM-AH *Staphyloccoccus aureus* resistente a Meticilina adquirido en hospitales

SARM-AC *Staphyloccoccus aureus* resistente a Meticilina adquirido en la comunidad

ORSAB Oxacillin Resistance Screening Agar Base

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

RPC Reacción de la Polimerasa en Cadena

CMI Concentración Mínima Inhibitoria

UFC Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (SARM), es una bacteria multirresistente gram positiva, considerada como patógeno crítico en medicina humana. Es una de las causas que lideran las infecciones asociadas a hospitales (SARM-AH), así mismo ha emergido como causa de enfermedades en personas de la comunidad (SARM-AC).

La mayoría de cepas de SARM son resistentes a un amplio rango de agentes antimicrobianos. En los últimos años, nuevas cepas de SARM emergieron dentro del reino animal, causando infección en humanos; habiéndose identificado a la crianza porcina como factor de riesgo en el incremento de portadores de *Staphylococcus aureus* a nivel nasal.

Estudios previos en países europeos demostraron prevalencias de SARM del 81% y 23% en granjas porcinas. En este estudio se buscó determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en granjas tecnificadas del departamento de Lima.

Para realizar este estudio se seleccionaron al azar seis granjas porcinas tecnificadas; de cada una de ellas se seleccionaron a 20 cerdos. A cada grupo experimental se le realizó hisopados nasales de ambas narinas, las muestras fueron aisladas en medios no selectivos para SARM y se les sometió a pruebas bioquímicas y métodos selectivos para la detección de resistencia a meticilina.

La prueba de Látex aglutinación confirmó a 3 aislamientos como SARM. Los resultados de este estudio demostraron una presencia de 17% en granjas porcinas tecnificadas; confirmando así la persistencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en granjas porcinas tecnificadas del departamento de Lima.

Palabras claves: ***Staphylococcus aureus***, SARM, bacterias resistentes, agentes betalactámicos

ABSTRACT

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), is a gram positive multiresistant bacteria, considered to be a critical pathogen in human medicine. It is one of the leading causes of hospital-acquired infections (HA-MRSA). It has also emerged as a cause of illnesses in the community (CA-MRSA).

The majority of strains of MRSA are resistant to a wide range of antibacterial agents. In recent years, new strains of MRSA have appeared in the animal kingdom, causing infections in humans; pig rearing has been identified as a risk factor in the increase in carriers of *Staphylococcus aureus* in the nose.

Earlier studies in Europe show that MRSA is present on 81% and 23% of pig farms. This study seeks to determine the presence of *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* in industrial pig farms in the department of Lima.

Six industrial pig farms were selected at random for this study; and 20 pigs were from each one. Nasal swabs were taken from both nostrils of animals from each group and the samples were isolated in selective media before being subject to biochemical and selective tests to detect resistance to methicillin.

The latex agglutination test confirmed 3 isolates as MRSA. The results of this study show a presence of 17% in industrial pig farms; thus the persistence of *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* in industrial pig farms in the department of Lima has been confirmed.

Key words: ***Staphylococcus aureus***, MRSA, resistant bacteria, beta-lactamic agents

I. INTRODUCCIÓN

Los agentes antimicrobianos son el arma principal para combatir las infecciones. Su utilización data de hace setenta años y su efecto inmediato fue el de provocar una drástica mejoría en el pronóstico de las infecciones (Muara *et al*., 2004b). No obstante, la síntesis y el abuso en la utilización de gran número de agentes antimicrobianos en las tres últimas décadas, ha generado un incremento de la resistencia. Esta resistencia ocurrió como resultado de cambios cromosómicos o intercambio de material genético, mediados por plásmidos o transposones (Lozano *et al*., 1998).

El uso de agentes antimicrobianos como promotores de crecimiento se dio en la producción animal. Finalmente, su uso sin supervisión profesional adecuada ha devenido los animales actúen como grandes reservorios de bacterias resistentes. Es desde sistemas productivos animales que se podrían desarrollar bacterias resistentes con el potencial de diseminarse hacia los humanos por medio del consumo o el contacto animal (Wegener, 2003).

Existen varios patógenos resistentes a antimicrobianos, entre ellos, el *Staphylococcus aureus*. El *S. aureus* es una un coco gram positivo considerado como patógeno crítico en medicina humana. A los *S. aureus* resistentes a la meticilina se les denomina como SARM. Las infecciones por SARM están entre las causas que lideran las infecciones adquiridas en hospitales (SARM - AH). Asimismo, ha emergido como causa de enfermedades en la comunidad (SARM- AC) (Khanna *et al*., 2008).

Las infecciones por SARM son de gran importancia en medicina humana. SARM puede colonizar piel, orificios nasales y mucosa oral de humanos y animales sanos. Desde el punto de vista clínico, las cepas de SARM tienen la capacidad patogénica para colonizar y causar infecciones que afectan tejidos, abscesos, heridas quirúrgicas, infecciones asociadas a catéteres y diversas complicaciones. SARM es responsable de una considerable cantidad de casos de mortalidad y morbilidad alrededor del mundo (Van Den Broek *et al*., 2009; Wulf *et al*., 2008).

Diversos estudios, en la actualidad, se han generado con relación a SARM en animales y granjas de producción porcina. En Holanda en el 2004, se identificó al contacto con ganado porcino como factor de riesgo para portar SARM. En el 2005, la crianza porcina fue considerada como factor de riesgo en el incremento de portadores de *S. aureus* a nivel nasal Finalmente, en el 2005 y 2006, estudios realizados en Holanda documentaron prevalencias de SARM en granjas porcinas de 81% y 23% (De Neeling *et al*., 2007; Van Den Broek *et al*., 2009; Wulf *et al*.,2008).

La transmisión de SARM, en los últimos años, se viene dando por medio de animales de producción dentro de la comunidad (SARM-AC). Las cepas de SARM posiblemente se diseminaron entre cerdos, criadores de cerdos y miembros de familia de los criadores. Finalmente, la adquisición de SARM se ha ido incrementando a nivel nasal. Esto último, reportado en base a estudios de control realizados en veterinarios y personal de granjas porcinas (Khanna *et al*., 2008).

Existe actualmente una cepa de origen porcino aislada de humanos con infecciones superficiales invasivas. La cepa porcina se denominó, ST 398. Se cree, guardaría relación con humanos dedicados a la crianza porcina y pertenecería a un nuevo complejo clonal (Van Loo *et a*l., 2007; Van Belkum *et al*., 2008; Khanna *et al*., 2008).

El Perú no cuenta con estudio alguno de presencia de SARM en animales; a pesar del ser un país con diversas regiones dedicadas a la producción porcina. Por tanto, el propósito de este estudio es que los hallazgos logrados sirvan para dilucidar la presencia de SARM en granjas porcinas tecnificadas del departamento de Lima.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades

2.1.1 Staphylococcus aureus

En 1880, Pasteur describió y cultivó al *Staphylococcus aureus*. Hacia 1881, Ogston fue quien lo denominó con los siguientes términos derivados del griego staphyle = racimo y kokkos = granos. La principal característica que diferencia a *S. aureus* de los demás estafilococos es la producción de la enzima coagulasa (coagula el plasma citratado). *S. aureus* resiste al calor y a la desecación y puede crecer en condiciones de salinidad (7,5% de ClNa). Muestran beta hemólisis en medios con sangre. Su característica bioquímica más importante es la fermentación de varios azúcares, entre ellos, el manitol para producir ácido láctico (Salvador *et al*., 2005)**.**

La bacteria de *Staphylococcus aureus* posee muchas características. *S. aureus* es un coco gram positivo no móvil. *S. aureus* puede encontrarse en pares, cadenas cortas o racimos. Es aerobia y anaerobia facultativa, pero crece mejor en condiciones aerobias. Finalmente, *S. aureus* conforma la flora normal de la piel y mucosas nasales; siendo las fosas nasales el principal reservorio del microorganismo (Bustos-Martínez *et al*., 2006).

2.1.2 Morfología.,

La pared celular del *Staphylococcus aureus* esta conformada por diversos componentes que le confieren rigidez y estabilidad. El principal componente son las proteínas denominadas péptidoglicanos. Estas proteínas se encuentran asociadas a ácidos teicoicos mediante el aminoácido L-lisina (Bustos-Martínez *et al*., 2006).

Staphylococcus aureus crece muy bien en diversos medios de cultivo. *S. aureus* crece rápidamente en agar sangre. Las colonias miden de 1 a 3 mm. Asimismo, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas (Salvador *et al*., 2005; Bustos-Martínez *et al*., 2006; Callisaya *et al*., 2007).

2.1.3 Factores de Virulencia.

Staphylococcus aureus posee una gran capacidad para sobrevivir en un ambiente adverso por la acción de sus determinantes patogénicos. En el 2005, Salvador *et al*., clasificaron a los factores de virulencia en tres grupos:

1) Componentes de la pared celular: peptidoglicano (activación del complemento), ácidos teitoicos y proteína A (antifagocitarios) y la cápsula mucoide (adherencia).

2) Enzimas: coagulasa (formación de abscesos), catalasa (catalizadora del peróxido de hidrógeno), estafiloquinasas (destrucción del coágulo), hialuronidasa (invasión hística), b-lactamasas (inactivación de b-láctamicos) y lipasas (colonización).

3) Toxinas: hemolisinas (rotura de membrana celular), leucocidinas (alteración de la permeabilidad celular), toxina exfoliativa (epidermólisis), toxina TSST (shock toxico) y enterotoxina (intoxicación alimentaria)**.**

Los factores de virulencia del *S.aureus* pueden ser clasificados según su función. Estos factores pueden participar en la adhesión, invasión y evasión de la respuesta inmune del hospedero. En base a estas funciones, Bustos-Martínez *et al*. (2006), clasificaron los factores de virulencia en tres categorías:

1) Factores involucrados en la adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa.

2) Factores involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la leucicidina de Panton-Valentine (PVL), proteína A, lipasas y polisacáridos capsulares.

3) Factores involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la hemolisina alfa, hemolisina beta, gamma y épsilon.

2.1.4 Patología de la Infección por Staphylococcus aureus

La bacteria *Staphylococcus aureus,* puede ocasionar graves problemas de multirresistencia en el ámbito hospitalario. Esta bacteria posee una rápida respuesta adaptativa a la presión selectiva de agentes antimicrobianos, lo que contribuye a su emergencia y diseminación. Finalmente su continua adquisición de determinantes de resistencia ha determinado su nivel de patogenicidad (Franco-Álvarez de Luna *et al*., 2003; Bustos-Martínez *et al*., 2006; Deurenberg *et al*., 2007; Callisaya *et al*., 2004a).

La bacteria oportunista *S. aureus* puede ocasionar diversos tipos de infecciones. Esta bacteria se puede transmitirse a través del cuerpo o membranas mucosas. En el 2004, Aires de Sousa y de Lencastre describieron tres tipos de infecciones por *S. aureus* como las más comunes:

1) Infecciones por lesiones superficiales tales como heridas infectadas.

2) Infecciones por tratamientos sistémicos o de por vida como el tratamiento de endocarditis, osteomielitis, neumonía, abscesos cerebrales, meningitis y bacteriemias.

3) Infecciones por toxinas en casos de envenenamiento por alimentos, síndrome de piel irritada y síndrome por shock tóxico.

2.1.5 Medios de Crecimiento

Agar Manitol Salado

El agar manitol salado es un medio selectivo para el aislamiento del género *Staphylococcus spp*. Este agar posee una alta concentración de sal e inhibe así el crecimiento de bacterias no estafilocócicas. AMS, permite el aislamiento de colonias amarillas con halos amarillos (microorganismos fermentadores de manitol) (Durán Vila *et al*., 2004).

Las colonias de *Staphylococcus spp.* producen el viraje del agar manitol salado (rosado) hacia amarillo. Las colonias de *Staphylococcus spp.* producen ácidos tras fermentar al componente manitol del agar. Estos ácidos reaccionan con el indicador de pH rojo fenol, produciendo áreas de color amarillo a su alrededor (Durán Vila *et al*., 2004).

Agar Sangre

El agar sangre es un medio nutritivo de uso general para el aislamiento de bacterias. El agar sangre permite el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias. Este medio tiene por base una fuente protéica (digeridos trípticos, digeridos proteicos de soya) y una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales, cloruro sódico y 5% de sangre (Granados y Villaverde, 1997).

El agar sangre determina la capacidad de algunas bacterias de producir enzimas extracelulares. Tal es el caso, de las enzimas que actúan sobre los glóbulos rojos (hemolisinas). Las hemolisinas pueden producir lisis completa (hemólisis beta, produce un halo transparente alrededor de la colonia hemolítica), parcial (hemólisis alfa, coloración verdosa alrededor de la colonia) o por ausencia de alteración (hemólisis gamma). La producción de hemolisinas por las bacterias depende de muchos factores ambientales como pH o atmósfera de incubación (Granados y Villaverde, 1997).

Las colonias de *S. aureus* aisladas en agar sangre, presentan diversas características de cultivo. Las colonias aisladas son de color dorado y presentan forma redonda y aplanada. Asimismo, constan de bordes bien definidos, superficie lisa y brillante. Finalmente, las colonias de *S. aureus* pueden llegar a producir beta hemólisis en el agar (Díaz y Ferrán, 2004).

Oxacillin Resistance Screening Agar Base (ORSAB)

El medio oxacillin resistance agar base es conocido por sus siglas en inglés como ORSAB. ORSAB es considerado como un medio selectivo para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). Asimismo, es utilizado para el control de pacientes y personal del ámbito hospitalario. Finalmente, ORSAB es esencial para prevenir epidemias debido a su rápida capacidad de detección (Granados y Villaverde, 1997).

El medio ORSAB contiene agentes antimicrobianos (oxacilina y polimixina B). La oxacilina permite inhibir al *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (SASM). La polimixina B permite la represión de otras bacterias capaces de crecer a una concentración tan elevada de sal (ej. *Proteus spp.*) (Granados y Villaverde, 1997).

El medio ORSAB, posee una especificidad y sensibilidad de 91.5% (Taguchi *et al*, 2004). ORSAB, contiene altas concentraciones de sal y cloruro de litio. Estos últimos, suprimen el crecimiento de bacterias no estafilocócicas. Asimismo, contiene manitol y azul de anilina

(indicador de pH) para la detección de bacterias fermentadoras de manitol (Granados y Villaverde, 1997).

2.2 Pruebas Complementarias para la Identificación de *Staphylococcus aureus*

2.2.1 Tinción Gram

La tinción Gram, es uno de los métodos de rutina más importantes en laboratorios de microbiología. En 1844, fue desarrollada por el bacteriólogo danés Christian Gram. La reacción a la tinción Gram permite la división de dos grupos, grampositivas y gramnegativas. El frotis con cocos Gram positivos, muestra la distribución de la bacteria en forma de racimos (Val, 2008).

Existen pruebas complementarias para identificar correctamente a los aislamientos de *Staphylocooccus aureus*. Las pruebas bioquímicas son de gran utilidad. Estas últimas, ponen en evidencia la existencia de una enzima o pasos metabólicos determinados (Díaz y Ferrán, 2004; Constantino *et al*, 2008).

2.2.2 Prueba de Coagulasa

Staphylococcus aureus, posee dos tipos de coagulasa:

1) La endocoagulasa o coagulasa ligada o clumping factor se encuentra unida a la pared celular bacteriana. Esta actúa, directamente sobre el fibrinógeno y lo convierte en fibrina, provocando la formación de coágulos o grumos cuando se mezcla una suspensión bacteriana con plasma citratado (Test en lámina) (Constantino *et al.*, 2008).

2) La exocoagulasa o coagulasa libre, actúa mediante la activación de procoagulasa (enzima extracelular bacteriana). La exocoagulasa reacciona junto con un factor activador presente en el plasma sanguíneo (similar a la protrombina), dando lugar a un complejo análogo a la trombina. Este complejo reacciona con fibrinógeno formando un coágulo de fibrina en ausencia de Ca2+ (Prueba *in vitro*) (Constantino *et al*., 2008).

3) La prueba de coagulasa se puede realizar utilizando diversas variedades de plasmas. Sin embargo, el plasma deshidratado de conejo conteniendo citrato o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es adecuado para la identificación del *S. aureus*. (Rojas *et al*., 2006).

2.2.3 Prueba de Catalasa

Es una prueba bioquímica que permite determinar la presencia de la enzima extracelular catalasa. La enzima catalasa es producida por *S. aureus* durante el crecimiento bacteriano en medios aerobios. Asimismo, esta prueba permite diferenciar entre el género *Staphylococcus* (catalasa positivo) del género *Streptococcus* (catalasa negativo) (Díaz *et al*., 2005; Constantino *et al*., 2008).

La catalasa favorece la supervivencia de *S. aureus*. La catalasa es capaz de descomponer al peróxido de hidrogeno (H2O2) en agua y oxigeno molecular. El H2O2, posee un efecto tóxico sobre las bacterias. Este último, se genera tras el proceso de estrés oxidativo por parte de los PMN. La enzima catalasa reacciona al contacto con el H2O2, produciendo el desprendimiento de burbujas (reacción positiva) (Díaz *et al*., 2005; Constantino *et al*., 2008).

2.3 Agentes Antimicrobianos Betalactámicos

2.3.1 Penicilinas

Las penicilinas fueron descubiertas por Alexander Fleming en 1928. Las penicilinas fueron utilizadas con el fin de contrarrestar las infecciones causadas por *S. aureus.* Las penicilinas actúan en fase de multiplicación bacteriana, cuando se sintetiza la pared celular. La mayoría de penicilinas poseen un anillo tiazolidínico enlazado a un anillo betaláctamico. Este último, es esencial para la actividad antimicrobiana por parte de las penicilinas (Marin y Gudiol, 2003).

Las penicilinas son bactericidas. Las penicilinas impiden la síntesis de la pared celular bacteriana. Esto último, se debe a la inhibición de la última etapa de la síntesis de peptidoglicanos (transpeptidación). De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular (Marin y Gudiol, 2003).

Las penicilinas inducen además un efecto autolítico. Esto último, se genera por la activación de una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano. La lisis se produce con concentraciones que superan entre 4 y 10 veces la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un determinado microorganismo. Las bacterias que carecen de autolisina son inhibidas pero no destruidas, por lo que se dice que son tolerantes (Marin y Gudiol, 2003).

La resistencia hacia las penicilinas naturales generó la introducción de nuevos agentes antimicrobianos. A finales de los años 50, se llevó a cabo la introducción de cefalosporinas estables a penicilinasas y penicilinas semisintéticas (meticilina) (Bustos-Martínez *et al*., 2006).

2.3.2 Penicilinas Sintéticas

La modificación de la molécula de bencilpenicilina, desarrolló agentes antimicrobianos de acción prolongada, conocidos como penicilinas semisintéticas. Las penicilinas semisintéticas difieren entre sí según la cadena lateral anclada en su grupo amino. Las penicilinas semisintéticas, ofrecen grandes ventajas sobre sus antecesores, como son: acción más prolongada, mayor absorción digestiva, estabilidad frente a betalactamasas y espectro antimicrobiano más amplio (Araujo *et al*., 1998; Bustos-Martínez *et al*., 2006).

Las penicilinas semisintéticas, actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Las penicilinas semisintéticas interrumpen el vínculo transversal entre las cadenas poliméricas lineales de peptidoglicanos; los cuales constituyen uno de los componentes principales de la pared celular (Lozano *et al*., 1998). Este antibiótico se absorbe mejor por vía parenteral (inyecciones). Estas, poseen una pobre absorción por vía oral debido al pH gástrico tan bajo que destruye rápidamente al antibiótico. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan a los 30 a 60 minutos. El metabolismo de la mayoría es casi nulo, manteniéndose en forma activa hasta su eliminación por vía renal. Las penicilinas semisintéticas se eliminan por secreción activa a nivel de las células del epitelio tubular del riñón por mecanismos de filtración y secreción glomerular (Lozano *et al*., 1998; Marin y Gudiol, 2003).

La penicilina semisintética denominada meticilina fue elaborada en Europa en 1959. Un año después de su elaboración, se originó resistencia a la meticilina detectándose la primera cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) (Bustos-Martínez *et al*., 2006).

2.4 Resistencia Antimicrobiana

Una bacteria es considerada como resistente a un agente antimicrobiano cuando la concentración de este último en el sitio de infección no es lo suficientemente alta como para destruir o inhibir la replicación bacteriana (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001).

La resistencia antimicrobiana no es solamente un problema microbiológico, también incluye aspectos farmacológicos y clínicos. La resistencia antimicrobiana es una propiedad sumamente flexible, ya que varía con respecto al agente antimicrobiano, la bacteria involucrada y el mecanismo de resistencia (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001).

La adquisición de resistencia se encuentra mayormente asociada a la adquisición de elementos genéticos móviles. Estos últimos, portan uno o más genes de resistencia. Los genes de

resistencia pueden codificar para proteínas, que usualmente se desconoce su función en el metabolismo fisiológico celular, pero las cuales median resistencia tanto para agentes antimicrobianos individuales como para agentes de una misma clase (ej. Tetraciclinas) (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001).

2.4.1 Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina (SARM)

La cepa bacteriana SARM es resistente a múltiples agentes antimicrobianos. SARM es considerado como patógeno crítico en medicina humana. SARM es una de las causas que lideran las infecciones adquiridas en hospitales (SARM-AH); así mismo ha emergido como causa de enfermedades en personas de la comunidad (SARM- AC) (Khanna *et al*., 2008).

La mayoría de cepas SARM son resistentes a una amplia variedad de fármacos. Las cepas de SARM presentan resistencia hacia aminoglucosidos, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclinas y fluoroquinolonas. En adición, las cepas SARM deberían considerarse como resistentes a todos los agentes betalactámicos (Khanna *et al*., 2008).

2.4.1.1 Mecanismos de Resistencia a Betalactámicos

En el 2004, Muara *et al*. describieron al menos, tres mecanismos de resistencia de SARM hacia agentes betalactámicos:

1) Modificación de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP2a), este tipo de resistencia es conocida como resistencia intrínseca a meticilina.

2) Inactivación por medio de enzimas betalactamasas o resistencia extrínseca.

3) Fenómeno de tolerancia.

El control genético de estos mecanismos puede ser cromosómico, plasmídico o por transposones. La resistencia cromosómica aparece por mutación, mientras que los plásmidos y los transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias (Marin y Gudiol, 2003).

Modificación de las Proteínas Fijadoras de Penicilina (PBP2a)

Las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), se encuentran en la membrana citoplasmática bacteriana. Las PBP se unen a los agentes betalactámicos para ejercer su acción bactericida mediante enlaces covalentes. Asimismo, intervienen en la síntesis de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana (Lozano *et al*., 1998; Marin y Gudiol, 2003).

Las PBP pueden variar en cuanto a tamaño, número y afinidad por agentes antimicrobianos según la especie bacteriana. La modificación de las PBP, implican pérdida de afinidad y disminución en la actividad bactericida de los agentes betalactámicos. Este mecanismo se observa fundamentalmente en cocos grampositivos (Lozano *et al*., 1998; Marin y Gudiol, 2003).

Las cepas SARM producen una proteína fijadora de penicilina modificada, denominada PBP2a. La PBP2a tiene menor afinidad a la meticilina y al resto de los agentes antimicrobianos betalactámicos. La PBP2a asume la síntesis de la pared bacteriana cuando otras proteínas fijadoras de penicilinas se encuentran saturadas por el agente antimicrobiano, evitando así la muerte del microorganismo (Sopena, 2001).

La resistencia del SARM esta codificada en la región denominada "*mec*" cromosómica, que está presente únicamente en las cepas resistentes. Dicha región está formada por el gen "*mec A*" (responsable de la síntesis de la PBP2a y marcador genético de la resistencia) y por el gen "*mecR*" o represor (Sopena, 2001).

Inactivación por betalactamasas excretadas al medio extracelular

Las betalactamasas son enzimas catalíticas de naturaleza proteica. Las betalactamasas son secretadas al medio externo en gran cantidad, con lo que la resistencia tiene un efecto poblacional (Mediavilla y García- Lobo, 1998; Marin y Gudiol, 2003; Sopena, 2001).

La producción de betalactamasas está controlada por un gen, bien cromosómico o bien transferido por plásmidos o transposones. La síntesis de betalactamasas suele ser inducible, es decir la producción de estas enzimas depende de la presencia de agentes betalactámicos (Mediavilla y García- Lobo, 1998; Marin y Gudiol, 2003).

Las betalactamasas confieren resistencia. Las betalactamas inactivan a la penicilina mediante la hidrólisis de su enlace betalactámico, por lo tanto, el agente antimicrobiano pierde la capacidad de unirse a las PBP tornándose inactivo. Finalmente, el grado de resistencia se correlaciona con su concentración, afinidad por los diferentes betalactámicos y propiedades hidrolíticas (Mediavilla y García- Lobo, 1998; Marin y Gudiol, 2003).

Tolerancia

El mecanismo de tolerancia puede generarse en algunas baceterias. Los agentes betalactámicos activan una enzima bacteriana endógena (autolisina). La autolisina destruye el

peptidoglicano de la pared celular bacteriana y favorece la lisis. La lisis bacteriana se produce con concentraciones que superan entre 4 y 10 veces la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un determinado microorganismo. Finalmente, las bacterias pueden o no sintetizar a la autolisina y por tanto, ser inhibidas por los agentes betalactámicos pero no destruidas (bacterias tolerantes) (Sopena, 2001).

2.4.1.2 Mecanismos de Resistencia a Otros Agentes Antimicrobianos

Resistencia a Aminoglucósidos

En el 2001, Sopena describió que la resistencia puede deberse a tres mecanismos:

1) Modificación estructural de las proteínas diana ribosómicas, por mutaciones de los genes que las codifican. Es una resistencia de tipo cromosómico y habitualmente de alto nivel de expresión, que afecta principalmente a la estreptomicina.

2) Alteración de la permeabilidad a los aminoglucósidos por mutaciones que afectan al sistema de transporte dependiente de energía. Este mecanismo es poco frecuente en *S.aureus* y produce una resistencia de bajo nivel a todos los aminoglucósidos.

3) Modificación enzimática del agente antimicrobiano, que es el mecanismo de resistencia habitual de *S.aureus* y los gramnegativos a la mayoría de los aminoglucósidos.

La modificación enzimática, se produce durante el transporte del aminoglicósido a través de la membrana citoplasmática. Este mecanismo, depende de cada aminoglucósido y enzima. El compuesto resultante no se transporta adecuadamente al interior de la bacteria o no se une al ribosoma. Finalmente, se conocen diversas enzimas modificadoras (fosfotransferasas, nucleotidiltransferasas), que pueden actuar sobre varios aminoglucósidos (Sopena, 2001).

El mecanismo de resistencia de modificación enzimática puede estar codificado a nivel plasmídico o cromosómico. En general, la resistencia cromosómica suele ser de alto nivel, a diferencia de la plasmídica. Asimismo, existe resistencia a la gentamicina, tobramicina y kanamicina, y más esporádicamente a netilmicina y amikacina (Sopena, 2001).

Resistencia a Macrólidos, Lincosamidas (Clindamicina) y Estreptograminas.

Los macrólidos, las lincosamidas y las estreptograminas son un grupo de agentes antimicrobianos alternativos en el tratamiento de las infecciones por *S.aureus*. Estos agentes antimicrobianos tienen estructuras químicas diferentes, pero todos ellos actúan en la subunidad

50s del ribosoma bacteriano. Actúan inhibiendo la traslocación de la cadena peptídica en la síntesis proteica. Los determinantes genéticos de estos mecanismos de resistencia son tanto cromosómicos como plasmídicos (Sopena, 2001).

En el 2001, según Sopena la resistencia del *S.aureus* se produce para los tres grupos de agentes antimicrobianos a la vez, mediante varios mecanismos:

1) Inhibición de la penetración del agente antimicrobiano al interior de la bacteria.

2) Modificación enzimática de los agentes antimicrobianos, ambos con escasa incidencia.

3) Alteración enzimática de la diana cromosómica, que afecta a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B (dalfoprinstina), pero no a las del grupo A (pristinamicina y quinupristina).

Resistencia al Cloranfenicol

El cloranfenicol es un agente antimicrobiano bacteriostático. Actúa inhibiendo la transpeptidación en la síntesis proteica, al unirse a la subunidad 50s del ribosoma. La resistencia del *S.aureus* al cloranfenicol es debida a su modificación enzimática por una acetiltransferasa, mediada por plásmidos (Sopena, 2001).

Resistencia a Tetraciclinas

Las tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis proteica al unirse a la subunidad 30s del ribosoma, tras atravesar la membrana bacteriana de forma activa (Sopena, 2001).

En el 2001, según Sopena la resistencia a las tetraciclinas es bastante frecuente por *S.aureus* y por SARM, depende de dos mecanismos:

1) La disminución de penetración por las tetraciclinas en la bacteria, mediada por plásmidos.
2) El aumento del flujo de salida del fármaco, dependiente de un determinante cromosómico.

Resistencia a Sulfamidas y Trimetoprim

La resistencia del *S.aureus* a las sulfamidas es mucho más común que al trimetoprim. La asociación de ambos fármacos en forma trimetoprim-sulfametoxasol resulta sinérgica incluso cuando las cepas son resistentes a las sulfamidas. Finalmente, la resistencia se produce por aumento de la producción de ácido paraaminobenzoico, gracias a una mutación cromosómica (Sopena, 2001).

En cambio, la resistencia al trimetoprim puede ser debida a varios mecanismos, los cuales son mencionados por Sopena (2001) como:

1) Una menor afinidad de la enzima dihidrofolato-reductasa por el agente antimicrobiano, mediada por plásmidos.

2) Un aumento de la producción de la enzima, codificado a nivel cromosómico.

Resistencia a Rifampicina

La rifampicina inhibe la síntesis bacteriana de RNA a través de la unión a la polimerasa del RNA. El mecanismo de resistencia del *S.aureus* a la rifampicina podría depender de la disminución de la afinidad de la polimerasa de RNA al agente antimicrobiano, a partir de una mutación cromosómica. En este sentido, se ha observado que, cuando la rifampicina se administra sola, las resistencias se desarrollan rápidamente in vivo (Sopena, 2001).

Resistencia a Fluorquinolonas

A mediados de los ochenta, se introdujeron en la terapéutica a las quinolonas. Las quinolonas eran uniformemente activas contra el *S.aureus*, incluidas las cepas resistentes. Sin embargo, en 1985 se describieron las primeras resistencias desarrolladas durante el tratamiento. Desde entonces y hasta la actualidad, la tasa de resistencia ha ido en aumento, probablemente por el uso frecuente de estos agentes antimicrobianos (Sopena, 2001).

Sopena (2001), menciona que la resistencia del *S.aureus* a las quinolonas se produce por dos mecanismos:

1) Alteración de la diana (modificación de la DNA-girasa), debida a mutaciones cromosómicas

2) Alteración en la entrada del agente antimicrobiano, de origen plasmídico o cromosómico.

El primer mecanismo afecta a todas las quinolonas, aunque con distinto nivel de expresión según el tipo de mutación. El segundo, afecta a las quinolonas hidrófilas como norfloxacino, ofloxacino y ciprofloxacino, pero no a las de carácter hidrófobo como esparfloxacino (Sopena, 2001).

Resistencia a Glucopéptidos (Vancomicina y Teicoplanina)

La vancomicina, se introdujo de manera global a principios de los años 90, debido a la resistencia generada hacia la meticilina. La vancomicina ejerce su acción al llegar a la membrana

citoplasmática y se une a las moléculas precursoras nacientes de la pared celular bacteriana. Finalmente esta unión inhibe la incorporación de los precursores a la pared celular en formación (Bustos-Martínez *et al*., 2006).

En el año 1997, se encontraron cepas con resistencia intermedia a la vancomicina (VISA). Las cepas VISA fueron reportadas en países como: Japón, Estados Unidos y Francia. Las cepas VISA fueron aisladas de pacientes con enfermedades subyacentes (insuficiencia renal crónica o neoplasias) y tratados previamente con glucopéptidos. En el 2002 se detectaron las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina (VRSA) (Sopena, 2001).

La resistencia a la vancomicina se debe a la adquisición del gen *van*. El gen *van* se transfiere a través de un plásmido. Finalmente, cambios en la biosíntesis del peptidoglicano guardan relación con esta resistencia (Bustos-Martínez *et al*., 2006).

Resistencia a la fosfomicina, ácido fusídico y mupirocina

La fosfomicina es un agente antimicrobiano de amplio espectro que actúa interfiriendo la síntesis de la pared celular. La resistencia del *S.aureus* a la fosfomicina es debida a la inactivación enzimática del agente antimicrobiano, mediada por plásmidos (Sopena, 2001).

El ácido fusídico es un agente antimicrobiano bacteriostático que actúa inhibiendo la síntesis de las proteínas al modificar el factor G de elongación proteica. La resistencia a este agente antimicrobiano puede ser de origen cromosómico, por alteración de la diana (factor G), o plasmídico, al reducir la permeabilidad del agente antimicrobiano. La tasa de resistencia del *Staphylococcus aureus* al ácido fusídico se ha mantenido baja hasta la actualidad (alrededor 1-2%) (Sopena, 2001).

La mupirocina o ácido pseudomónico actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana.La resistencia del *S.aureus* es debida a la modificación de la diana y puede ser de alto (mediada por plásmidos) o de bajo nivel (de origen cromosómico). Hasta la actualidad es poco frecuente, y suele aparecer tras tratamientos prolongados (Sopena, 2001).

2.4.2. Técnicas para Detección de Resistencia Bacteriana

2.4.2.1 Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana es un método eficaz para detectar los aislamientos de *S.aureus* con susceptibilidad disminuida a la penicilina (SDP). Esta prueba es

recomendada por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). La prueba necesita el empleo de un disco de oxacilina (1μg). Finalmente, de acuerdo con los criterios de interpretación recomendados por la CLSI, los aislamientos que presentan halos ≤ 10 mm son resistentes a los antibióticos betalactámicos. Estudios realizados en Trinidad y Tobago, determinaron que esta prueba cuenta con una sensibilidad de 98% y una especificidad de 99% para la detección de resistencia a meticilina en *S. aureus* (Ovalle *et al*., 2001).

Interpretación de los Resultados

Estándares de Interpretación de Zonas de Diámetro

Existen tablas específicas del CLSI, que indican los criterios para interpretar los diámetros de zonas para categorizar exactamente niveles de susceptibilidad de los microorganismos a diferentes agentes antimicrobianos. (Sopena, 2001).

Categorías Interpretativas

Sensible

La categoría "sensible" implica que una cepa puede ser apropiadamente tratada con la dosis de agente antimicrobiano recomendado para ese tipo de infección y especie infectante (Sopena, 2001).

Intermedio

La categoría "Intermedio" incluye aislamientos con agentes antimicrobianos con un CIM que se aproximan usualmente a nivel de tejido y sangre disponible y para los cuales su velocidad de respuesta puede ser más lenta que la de los aislamientos susceptibles. La categoría "Intermedio" implica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde la droga es fisiológicamente concentrada (por ej. quinolonas y betalactámicos en orina) o cuando una dosis mayor que lo normal de una droga puede ser usada (por ej. betalactámicos) (Sopena, 2001).

Resistente

Las cepas resistentes no son inhibidas por la concentración sistémica usualmente alcanzable de un agente cuando los esquemas de dosificación normal son usados. Pueden tener CMI que caen dentro del rango donde están disponibles mecanismos de resistencia específicos (por ej. betalactámicos) y la eficacia clínica no ha sido confiable en tratamientos estudiados (Sopena, 2001).

2.4.2.2 Prueba de Látex Aglutinación (PBP2a)

Es una prueba rápida de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos monoclonales dirigidos hacia las proteínas modificadas bacterianas (PBP2a) presentes en SARM. La prueba permite la detección indirecta de SARM poniendo de manifiesto a la proteína PBP2a. Su uso facilita el reconocimiento de SARM, en pocos minutos, debido a que existe una reacción de aglutinación a simple vista (Ulloa *et al*., 2001; Salvador *et al*., 2005).

Los agentes betalactámicos, inhiben todas las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), a excepción de la PBP2a. Esta última, sería responsable de seguir adelante con la síntesis de la pared celular bacteriana y favorecer así la supervivencia. La PBP2a es una proteína con actividad transpeptidasa y de baja afinidad por los agentes betalactámicos vista (Ulloa *et al*., 2001; Salvador *et al*., 2005).

Estudios realizados en Trinidad y Tobago determinaron que no existe diferencia en cuanto a sensibilidad (100%) y especificidad (100%) para la detección del gen *mec A* por medio de técnicas como PCR y Látex Aglutinación; además se determinó que esta ultima detectó con mayor rapidez SARM, ofreciendo así un resultado confiable, rápido y altamente costo-efectivo (Akpaka *et al*., 2008).

2.4.2.3 Reacción de la Polimerasa en Cadena

La prueba de reacción de la polimerasa en cadena, fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Esta prueba es conocida por sus siglas en inglés como PCR (Polymerase Chain Reaction). La prueba de PCR, permite producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN (AMGEN, 2010).

La prueba de PCR, como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa. La enzima ADN polimerasa es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Para esta prueba se necesita que existan nucleótidos en el medio, que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que se desea copiar para que sirva como cebadora (AMGEN, 2010).

El PCR se desarrolla en tres pasos los cuales han sido descritos por AMGEN (2010):

1) Desnaturalización, es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar. Se debe calentar el ADN a altas temperaturas que pueden ser próximas a la ebullición. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria.

2) Hibridación, para este paso se debe bajar la temperatura para conseguir que cada cebador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN.

3) Extensión, consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa.

EL PCR es un método rápido y eficaz, considerado como "gold stantard" para la detección gen *mec A.* El gen *mec A* transfiere la resistencia a la meticilina en estafilococos y se encuentra integrado en el DNA cromosómico bacteriano. La transcripción del gen *mecA* genera la proteína, PBP2a. Finalmente, los estafilococos portadores del gen *mecA* y de su proteína PBP2a deben considerarse resistentes a todos los agentes betalactámicos sin excepción (Salvador *et al*., 2005).

El gen *mec A* se encuentra asociado a un variable número de determinantes genéticos entre los cuales se encuentran: secuencias de origen plasmídico, transposones y secuencias de inserción. Estos últimos, portan genes que contribuyen a expresar resistencia hacia agentes no betalactámicos (Salvador *et al*., 2005).

2.5 Importancia en Salud Pública Veterinaria

2.5.1 Uso de Promotores de Crecimiento en Producción Animal

La utilización de penicilina se implementó a gran escala, durante la segunda guerra mundial. Esta acción se produjo a raíz de las necesidades de este antibiótico, para el tratamiento de tropas en el frente, en flotas de buques y víctimas de ataques durante la guerra. Fue durante las últimas etapas de la guerra que se autorizó a los veterinarios, el uso de penicilina liofilizada para el tratamiento de mastitis bovina. Finalmente se consideró al uso de la penicilina como un gran avance debido que demostró ser más efectiva que los tratamientos tradicionales utilizados en enfermedades del ganado lechero (Gustafson y Bowen, 1997).

Tras culminar la guerra, se reportó que otro agente antimicrobiano, estreptomicina, administrado en la dieta de pollos, promovía el crecimiento. Asimismo, otros agentes antimicrobianos utilizados como promotores de crecimiento demostraron tener similares efectos en otros animales y en la performance de las aves (Gustafson y Bowen, 1997).

La alimentación con promotores de crecimiento coincidió con el desarrollo de la crianza por confinamiento de gran número de animales para consumo. La variedad de agentes antimicrobianos, las rutas de administración y las razones de su uso, se expandieron durante el periodo de 1950 a 1960. Finalmente, el frecuente uso de agentes antimicrobianos en la dieta animal, trajo como consecuencia el desarrollo y la diseminación de bacterias resistentes en animales y humanos (Gustafson y Bowen, 1997; Collignon, 2003).

2.5.2 Uso de Promotores de Crecimiento en Granjas Porcinas

El término "promotores de crecimiento" (PC) es usado para aditivos alimentarios, distintos a nutrientes. Los PC, aumentan la tasa de crecimiento y/o mejoran la eficiencia de conversión en animales sanos alimentados con una dieta balanceada. Finalmente, han sido aplicados en la crianza intensiva de animales de carne. (Committee on Drug Use in Food Animals Panel on Animal Health, Food Safety, and Public Health, 1998; Gesche y Emilfork, 1998; Van den Boggard y Stobberingh, 1999).

La introducción de los PC en la porcicultura resultó ser eficiente y efectiva para mantener la salud en los animales de producción, y de los pocos que sí lo hacían, se obtenía información para realizar una medicación profiláctica satisfactoria del lote de animales en un corto periodo de tiempo. Asimismo, han demostrando que previenen enfermedades endémicas en grandes grupos de animales; particularmente animales jóvenes, destetados y los expuestos a algún otro tipo de estrés (Gustafson y Bowen, 1997).

Existen diversos promotores de crecimiento en la actualidad. Los promotores de crecimiento como: bacitracina, clortetraciclina, eritromicina, penicilina, tiamulina, tilosina y virginiamicina son administrados oralmente a través del alimento. Estos últimos, son absorbidos por el tracto digestivo y pueden favorecer el almacenamiento de diminutos residuos de agentes antimicrobianos en tejidos comestibles (Gustafson y Bowen, 1997).

2.5.3 Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina Asociado a Hospitales (SARM-AH)

Las cepas SARM-AH se identificaron de forma casi inmediata en 1959 tras la introducción de la meticilina. A inicios de los años setenta, se describieron los primeros brotes de infección por cepas de SARM-AH a nivel nosocomial. Finalmente, se ha ido incrementando la prevalencia de SARM-AH en áreas hospitalarias, consideradas de alto riesgo, como las Unidades de Cuidados Intensivos (Muara *et al*., 2004a).

Existe gran número de clones epidémicos de SARM-AH en la actualidad. Los clones de SARM-AH muestran grandes diferencias genéticas entre sí. Inicialmente las cepas de SARM-AH exhibieron una expansión clonal y por más de un decenio, solo un clon fue responsable de las epidemias en los diversos hospitales. Finalmente, en los últimos años nuevos clones de SARM-AH han empezado a surgir y a extenderse por todo el mundo (Jiménez y Correa, 2009).

Las cepas de SARM-AH se introducen en el medio hospitalario a través de pacientes, visitantes o trabajadores sanitarios. El reservorio fundamental lo constituyen los pacientes ingresados que están infectados o colonizados, extendiéndose a otros pacientes principalmente por medio de las manos del personal sanitario (infección cruzada). Asimismo, a medida que progresa un brote epidémico, aumenta el número de portadores nasales de SARM que constituyen, a menudo, la propia fuente de infección (Camarena y Sánchez, 2002).

Las cepas de SARM-AH pueden transmitirse a través del entorno inanimado (reservorio ambiental). Esto último, se ha observado en unidades de cuidados intensivos lo que ha generado un aumento en el porcentaje de portadores. Las cepas de SARM-AH pueden transmitirse además, por vía aérea en pacientes intubados o por proximidad con pacientes afectos de neumonía (Camarena y Sánchez, 2002).

Las infecciones nosocomiales por cepas de SARM-AH son un problema relevante en salud pública debido a su trascendencia económica y social. Asimismo, son consideradas de importancia clínica y epidemiológica ya que se presentan altas tasas de morbilidad y mortalidad (Bustos-Martínez *et al*., 2006).

2.5.4 Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina Asociado a Comunidades (SARM-AC)

La emergencia de cepas SARM en la comunidad (SARM-AC) adquirió gran importancia en los años noventa. Los primeros casos se reportaron en Australia y Estados Unidos, en 1993 y 1998, respectivamente. En los últimos años, las cepas de SARM-AC han incrementado su aparición a nivel mundial. Las cepas de SARM-AC se caracterizan por causar brotes en comunidades cerradas. Estas cepas afectan a grupos familiares, militares, reclusos, niños en guarderías y deportistas (Jiménez y Correa, 2009).

Existe dificultad en determinar el origen real de las cepas de SARM-AC en la actualidad. Las cepas de SARM-AC pueden colonizar al individuo por períodos largos sin ser detectadas y puede presentarse la infección un tiempo después. Lo anterior condujo al establecimiento de pautas para lograr una definición precisa de lo que constituye una infección por SARM-AC. Las

pautas mencionan que el individuo afectado no debía presentar ninguno de los siguientes factores de riesgo: contacto estrecho con personas con reciente hospitalización, cirugía previa, diálisis, visitas a hospitales, exposición reciente a agentes antimicrobianos, enfermedad crónica, inyecciones y residencia prolongada en instituciones de cuidado (Jiménez y Correa, 2009).

La dificultad para definir el origen de estas cepas ha generado un auge en el desarrollo de estudios moleculares. Los estudios moleculares q han contribuido, entre otras cosas, a distinguir entre las cepas realmente adquiridas en la comunidad y aquellas de origen nosocomial (Jiménez y Correa, 2009).

La evolución genética de las cepas SARM-AH y SARM-AC ha mostrado diferencias en cuanto a su susceptibilidad hacia agentes antimicrobianos. Las cepas SARM-AH son resistentes a todos los agentes antimicrobianos betalactámicos y a muchos no betalactámicos a diferencia de las cepas SARM-AC que aun son susceptibles (Jiménez y Correa, 2009).

2.5.5 Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina en Animales

Históricamente, las infecciones por cepas de SARM en animales de compañía se encontraron relacionadas con cepas nosocomiales halladas en el humano. Un tiempo después, se observaron clones epidémicos de SARM-AH en perros y se asumió que la forma de diseminación era a través del humano hacia el animal (humaniosis). Estudios posteriores develaron un cambio en cuanto a la transmisión de cepas de SARM y se determinó que los animales portadores podían infectar al hombre. Finalmente, las cepas de SARM, se han aislado en varias especies animales como: perro, gato, oveja, cerdo, pollo, caballo, conejo, foca, aves psitácidas, tortuga, murciélago, cuy y Chinchilla (Van Belkum *et al*., 2008).

Las cepas de SARM pueden diseminarse de los animales al ambiente. Esto último, facilitó la colonización de personas que no guardan relación alguna con la crianza animal. El aislamiento de una cepa de SARM en porcinos, se ha logrado en los últimos años. Esta cepa porcina fue aislada de humanos con infecciones superficiales invasivas. Se cree guardaría relación con la crianza porcina y pertenecería a un nuevo complejo clonal, ST 398 (Van Loo *et al*., 2007; Van Belkum *et al*., 2008).

2.5.5.1 Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina en Porcinos

A nivel mundial, se han venido reportando casos de colonización por SARM en porcinos. El primer caso de SARM reportado en porcinos fue en Holanda. Posteriormente se reportaron casos en Francia, Dinamarca y República de Singapur (Khanna *et al*., 2008).

Existe una nueva cepa en la actualidad, que guardaría relación con los porcinos denominada como ST 398. La cepa ST 398 fue identificada a través de uno de sus clones por medio de secuencia tipificada multilocus (MLST). La cepa ST 398, es considerada por varios científicos como una cepa de gran riesgo zoonótico, ya que tanto personal de granjas, veterinarios y personas de la comunidad pueden colonizarse o infectarse con cepas de SARM (Van Belkum *et al*., 2008; Khanna *et al*., 2008).

Se ha visto, en los últimos años, el incremento en el número de portadores nasales de SARM. Asimismo, estudios recientes en países europeos han documentado la aparente transmisión de cepas de SARM entre cerdos, criadores y miembros de familia de los criadores. Finalmente, se ha considerado el contacto o la exposición con cerdos portadores como factor de riesgo para contraer SARM (Van Belkum *et al*., 2008; Khanna *et al.*, 2008).

2.6 Importancia Económica

A nivel mundial, la importancia económica de SARM en la porcicultura se ha visto reflejada en cuanto al incremento de costos a nivel sanitario. Esto último, con el fin de permitir una mayor seguridad alimentaria. Asimismo, la búsqueda por conseguir alimentos sanos, y seguros para los consumidores son factores claves para mantener cada vez más una cadena alimentaria integrada (Martín, 2009).

La sanidad animal en el contexto económico constituye uno de los pilares más importantes de los sistemas de producción ganaderos. Es considerada como pieza clave para el desarrollo de la ganadería y de vital importancia tanto para la economía nacional como para la salud pública (Martín, 2009).

Las pérdidas económicas, en cuanto al ámbito nacional en la porcicultura podrían darse de manera directa o indirecta. SARM, repercutiría de manera directa producto de infecciones afectando la productividad animal y de manera indirecta por restricciones sanitarias que se pueden producir en el mercado interior y exterior para los animales afectados y sus productos (Martín, 2009).

La nueva estrategia comunitaria en sanidad animal (2007-2013) formulada por la Unión Europea, incorpora entre sus objetivos:

1) Promover la sanidad animal mediante la prevención o la reducción de la incidencia de determinadas enfermedades animales (Martín, 2009).
2) Garantizar la salud pública y la seguridad alimentaria (Martín, 2009).
3) Reducir al mínimo la incidencia de los riesgos biológicos y químicos para los seres humanos (Martín, 2009).

El control de las enfermedades animales y en particular de aquellas transmisibles de forma directa o indirecta entre animales y seres humanos (zoonosis) se hace imprescindible en la actualidad. Al respecto, debe tenerse en consideración que de acuerdo con el National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS), al menos 80,000 pacientes por año adquieren infección por cepas de SARM luego de haber sido hospitalizados (De Lencastre y De Sousa, 2004; Martín, 2009).

En el 2004, Aires de Sousa y De Lencastre consideraron como zoonosis a las infecciones por SARM; las cuales aumentan los costos de hospitalización y el riesgo de mortalidad en humanos. Este incremento según los autores, se ve influenciado por tres factores:

1) Los tratamientos para contrarrestar las infecciones por SARM se han tornado muy costosos debido al uso de drogas como la vancomicina.
2) La necesidad de aislar a pacientes con infecciones por SARM en hospitales en ambientes específicos, genera un gran presupuesto.
3) Los pacientes con infecciones por SARM deben permanecer más tiempo en los hospitales.

En un estudio de comprensión, finalmente, el rango de muertes por bacteriemia en pacientes con SARM fue estimado como el doble del rango de muertes por bacteriemia en paciente con SASM (Aires de Sousa y De Lencastre, 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

- Equipo y material para la recolección de muestras
- Equipo para procesamiento de muestras
- Equipo de Laboratorio

3.2 Método Experimental

3.2.1 Lugar de ejecución

La colección de muestras de hisopado nasal se realizó en porcinos provenientes de granjas tecnificadas a lo largo del departamento de Lima (Norte, Sur y Centro). Las muestras recolectadas fueron trasladadas y procesadas en la Sección de Bacteriología y Micología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV-UNMSM) ubicada en Lima – Perú.

3.2.2 Selección de granjas porcinas tecnificadas

La selección de granjas porcinas tecnificadas se dio de una lista proporcionada por la Asociación de Porcicultores del Perú (APP). La lista contaba con 30 granjas porcinas debidamente registradas en el departamento de Lima. Finalmente, de la lista de 30 granjas porcinas tecnificadas se eligieron de manera aleatoria a 6 de ellas (Van Den Broek *et al.*, 2009**).**

3.2.3 Animales

Se seleccionaron 20 porcinos en etapa de engorde (140-150 días) de cada una de las 6 granjas porcinas tecnificadas. La selección de los 20 porcinos se dio de manera proporcional al número de corrales de engorde (sistemática). Los 120 porcinos seleccionados no deben de presentar al momento de la toma signos de enfermedad ni algún otro factor por considerar (Dunlop *et al*., 1999).

Toma de muestra

Las muestras se colectaron de distintas áreas del departamento de Lima, en los meses de febrero, marzo y abril del 2009. Para realizar la toma de muestra se utilizó un hisopo estéril, el cual se rotó alrededor de la membrana mucosa de ambas narinas. Las muestras fueron debidamente rotuladas con fecha, código de muestra, especificando el sexo de cada animal. Asimismo, las muestras de hisopado nasal se mantuvieron en medio de transporte Stuart Rayon 300295 (Eurotubo ®) para asegurar su viabilidad hasta su debido procesamiento. Finalmente, fueron trasladadas en un cooler a una temperatura aproximada de 4ºC (Khanna *et al*., 2008; Pineda, 2008).

3.2.5 Procesamiento de muestras

Cultivo de Muestras en Agar Manitol Salado

Se realizó un primer cultivo de las muestras en placas con agar manitol salado por ser, un medio selectivo para el aislamiento de colonias pertenecientes al género de *Staphylococcus spp*. Cada una de las muestras de hisopado nasal fue sembrada a manera de estrías y posteriormente, llevadas a incubación a 37°C por 24 horas. Al día siguiente, se procedió a la lectura de las placas contándose más de 100 unidades formadoras de colonias (UFC). Las colonias aisladas presentaron un halo amarillo, bordes definidos, circulares, y estructura convexa de 1-4 mm de diámetro. Asimismo, se observó el viraje del color característico del agar manitol salado (rosado) hacia amarillo. Esto último, indicó la presencia de colonias fermentadoras del componente manitol pertenecientes al género *Staphylococcus spp.* (Salvador *et al*., 2005).

Subcultivo de Colonias del género Staphylococcus spp. a Agar Sangre

Se realizó un subcultivo en placas con agar sangre, con el fin de observar colonias con características fenotípicas de *Staphylococcus aureus*. Previamente, se seleccionaron al azar 2 colonias por cada una de las placas con agar manitol salado. Posteriormente, se sembraron cada uno de los pares en placas subdivididas con agar sangre. Las placas con agar sangre ya sembradas fueron incubadas a 37ºC por 24 horas. Finalmente, tras 24 horas se procedió a la visualización de las características fenotípicas (colonias doradas de superficie lisa, bordes netos y brillantes, beta hemolisis, etc.) (Salvador *et al*., 2005).

Prueba de Disco Difusión

Se realizó una primera detección de resistencia a la meticilina a base de la prueba de sensibilidad de disco difusión. Se aplicó un disco de oxacilina (1ug) sobre cada una de las siembras realizadas en las placas con agar sangre. Posteriormente, se determinó la resitencia a la oxacilina según los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Finalmente, el CLSI considera como colonias resistentes, aquellas con halos (≤10mm).

La utilización del disco de oxacilina (1ug) se debió a que este posee estabilidad in vitro a diferencia de la meticilina. En adición, tanto la meticilina como la oxacilina pertenecen al mismo grupo de penicilinas semisintéticas. Finalmente, de generarse colonias resistentes hacia la oxacilina, estas serían a su vez, resistentes a la meticilina (SEIMC, 2001).

Tinción Gram

Se realizó la tinción Gram, con el fin de diferenciar entre bacterias gram-positivas y gram-negativas; las cuales tiñen de forma distinta debido a las diferencias en la estructura de sus paredes celulares. Por tanto, las células grampositivas, a causa de sus paredes celulares más espesas (tienen más peptidoglicano y menos lípido), no son permeables a disolventes. Los disolventes, deshidratan la pared celular y cierran los poros, provocando que el de complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular (Val, 2008).

Val (2008), menciona que luego de realizar el frotis, la colonia debe ser fijar al calor sobre un portaobjetos. Posteriormente se tiñe, primero con una solución de cristal violeta y es lavada después para quitar el exceso de colorante. El portaobjetos se cubre entonces con una solución de yodo-yoduro potásico. Se lleva a cabo después la decoloración, usando una mezcla de alcohol-acetona. Asimismo, se utiliza una coloración de contraste (safranina o fucsina básica) (Val, 2008). Finalmente, se utilizó un microscopio electronico (100X) para lograr observar colonias de forma esférica (cocos), de color azul y se encontraban distribuidas en forma de racimos.

Prueba de Catalasa

Para realizar esta prueba se seleccionó una colonia resistente (disco de oxacilina) proveniente de una placa con agar sangre. La colonia resistente se disolvió en una gota de peróxido de hidrogeno sobre una lámina portaobjetos. Posteriormente, se observó tras unos segundos una reacción efervescente (burbujas). Esto último, debido a que *S .aureus* requiere de la enzima catalasa para descomponer el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en agua y oxigeno molécula;

y de esta manera, se protege del efecto tóxico del (H_2O_2). Finalmente, la formación de burbujas representa un resultado positivo a la presencia de la enzima catalasa (Díaz y Ferrán, 2004).

Prueba de Coagulasa

Se administró 0,5 ml de plasma de conejo en un tubo de ensayo, en el cual, con ayuda de un asa de siembra, se disolvió a una de las colonias resistentes (disco de oxacilina). Primero, se dejo en incubación a 37°C por 4 horas, tras las cuales se realizó la primera lectura (visualización de formación de coágulo). Inmediatamente después, se dejo al medio ambiente el tubo de ensayo hasta completar las 18 horas; procediéndose a realizar la segunda lectura. Finalmente, la formación de un coágulo bien definido se consideró como una reacción positiva a la presencia de la enzima coagulasa (Díaz y Ferrán, 2004).

Subcultivo de Colonias Resistentes a Oxacilina en medio ORSAB

Se realizó una segunda detección de resistencia a meticilina, por medio del oxacillin resistance screening agar base (ORSAB). ORSAB, fue utilizado con el fin de detectar de manera selectiva a colonias de SARM. Se realizaron subcultivos en placas ORSAB de las colonias resistentes (oxacilina) y positivas a las pruebas bioquímicas de catalasa y coagulasa. Las placas de ORSAB ya sembradas se incubaron por 24-48 horas a temperatura de 37ºC. Las colonias aisladas se observaron de un color azul intenso. Esto último, debido al componente azul de anilina (indicador de pH) que reacciona a los ácidos producidos por la fermentación del manitol por parte de las colonias de SARM.

El medio ORSAB, es considerado como un medio modificado del agar manitol salado, posee una sensibilidad de 87.8% y especificidad 93.3%. Asimismo, es selectivo para el aislamiento de colonias de SARM debido que posee agentes antimicrobianos dentro de su composición (oxacilina y polimixina B). Finalmente, por medio de agentes antimicrobianos ORSAB permite inhibir el crecimiento de bacterias estafilocócicas sensibles a la meticilina (SASM) y no estafilocócicas (*Proteus spp.*) (Salvador *et al*., 2005).

Prueba de Látex Aglutinación

Se realizó una tercera detección de resistencia a meticilina por medio de la prueba de látex aglutinación PBP´2 (Oxoid). Esta prueba confirmó como positivos a los aislamientos de SARM obtenidos de placas de ORSAB y permitió la rápida detección de proteínas fijadoras de penicilina modificadas (PBP’2 ó PBP2a) sintetizadas por SARM. Finalmente, esta prueba cuenta con una sensibilidad y especificidad del 100% (Akpaka *et al*., 2008).

La detección de las PBP2a se da por medio de la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos monoclonales dirigidos hacia las PBP2a de SARM. Las PBP2a serían responsables de la resistencia a la meticilina por parte de SARM. Finalmente, la prueba de látex aglutinación se realizó según las instrucciones del fabricante (Salvador *et al*., 2005).

3.2.5 Análisis de Datos

Los datos provenientes de cada granja fueron registrados y analizados por medio del programa Microsoft Office Excel 2003 (Copyright 1985-2003). El presente estudio basó sus resultados según el criterio para muestras por conglomerados. Esto último, debido a que el sistema tecnificado de producción porcina se basa normalmente, en agrupar a animales en corrales; y estos, a su vez, se encuentran dentro de unidades de producción (ej. acabado). Finalmente, para el presente estudio fue preciso dividir la población porcina en subpoblaciones (conglomerados); lo cual simplificó el recojo de información muestral (Dunlop *et al*., 1999).

El presente estudio consideró además, como factores importantes a los costos y restricciones de tiempo que a menudo, son limitantes. Estos últimos, pueden ejercer un conflicto entre el número de aislamientos por muestra (colonias) para ser examinadas y el número de ejemplares para recoger en cada unidad muestral (granja tecnificada). La resolución de este conflicto, fue importante para lograr obtener de manera imparcial y precisa, la estimación de la distribución de SARM en granjas porcinas tecnificadas del departamento de Lima. Finalmente, se utilizó la fórmula de intervalo de confianza (por conglomerados). Esto útlimo, debido a que existió alta variabilidad entre cada una de las unidades muestrales (granja tecnificada) (Dunlop *et al*., 1999; Thrusfield, 2007).

IV. RESULTADOS

Para la realización del presente estudio se tomaron muestras de hisopado nasal de ambas narinas pertenecientes a 120 porcinos provenientes de 6 granjas tecnificadas del departamento de Lima. La presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina hallada en granjas porcinas tecnificadas (1/6) fue de 17% (95%: 0.034-0.3). Asimismo, la presencia hallada de SARM dentro de la granja porcina tecnificada positiva fue de 15% (95%: 0.01-0.33). (Ver **Cuadro 2**).

Con la finalidad de detectar *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) en granjas porcinas tecnificadas, se colectaron 120 muestras de hisopado nasal. Posteriormente, se realizó el primer aislamiento de las muestras en agar manitol salado, observándose más de 100 UFC con características fenotípicas del género *Staphylococcus spp.* (Ver. **Figura Nº1**).

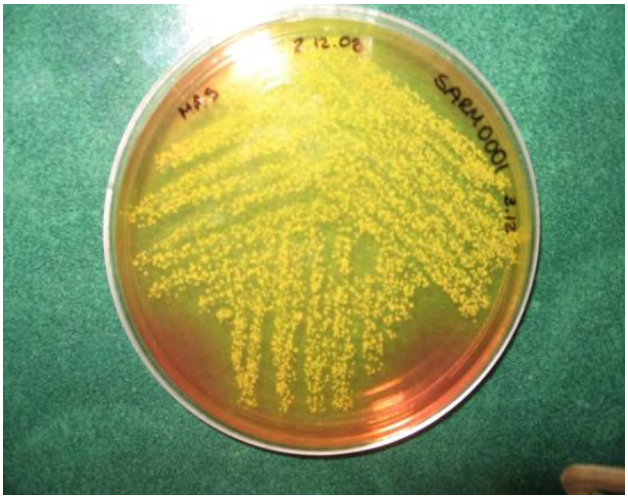


Figura Nº1: Aislamiento de colonias de *Staphylococcus spp*. en placa de agar manitol salado. (Elaborado por Claudia Changanaquí, 2010).

Se seleccionaron 2 colonias (*Staphylococcus spp*.) al azar de las más de 100 UFC aisladas en cada una de las placas de agar manitol salado. Se sembraron cada uno de los pares seleccionados en placas con agar sangre (Ver **Figura Nº 2**). El estudio determinó que de las 240 muestras sembradas en agar sangre, solo 64 de ellas resultaron resistentes; tras realizarse la primera detección de resistencia a la meticilina por medio del disco de oxacilina. Finalmente, se logró evidenciar características fenotípicas de *S. aureus* (beta hemolisis, colonias doradas de bordes netos y brillantes, etc.) (Ver **Figura Nº 3**).



Figura Nº 2: Siembra de colonias (*Staphylococcus spp*.) en placa de agar sangre (Elaborado por Claudia Changanaquí, 2010).



Figura Nº 3: Aislamiento de colonia resistente al disco de oxacilina **y** con características fenotípicas de *S. aureus* en placa de agar sangre (Elaborado por Claudia Changanaquí, 2010).

Sin embargo, de las 64 muestras resistentes a la meticilina y positivas a la prueba de catalasa, tan solo 9 resultaron positivas a la prueba de coagulasa (Ver **Figura Nº 4**). Posteriormente, estas 9 colonias resistentes fueron se sembradas en medio selectivo ORSAB para determinar por medio de una segunda detección la resistencia hacia la meticilina (Ver **Figura Nº 5**).

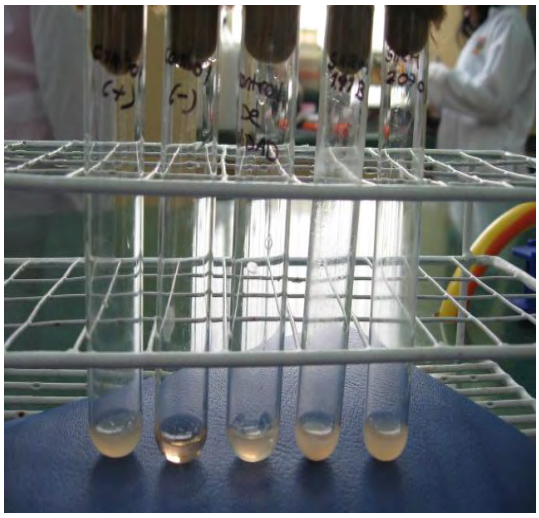


Figura Nº 4: Formación de coágulos, muestras positivas a la presencia de enzima coagulasa (Elaborado por Claudia Changanaquí, 2010).

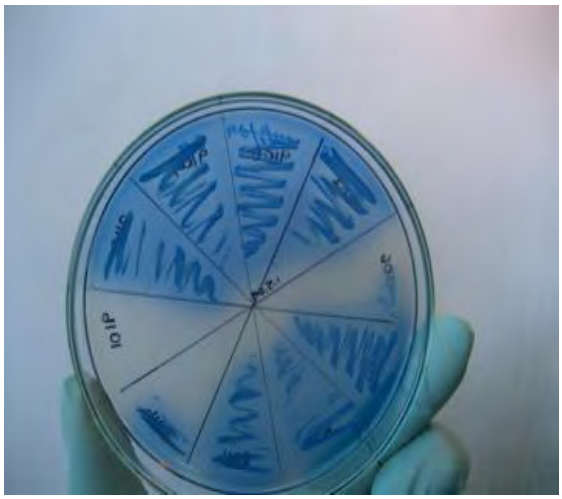


Figura Nº 5: Aislamiento de colonias de SARM en medio selectivo ORSAB (Elaborado por Claudia Changanaquí, 2010).

Se realizó finalmente la última detección de resistencia a las 9 colonias resistentes; para lo cual se utilizó una prueba de alta sensibilidad (100%) y especificidad (100%), llamada Látex Aglutinación (Ver **Figura Nº 6**). Esta prueba permitió determinar a 3 muestras como positivas a SARM, las cuales provenían de una misma granja (Ver **Cuadro 3**).

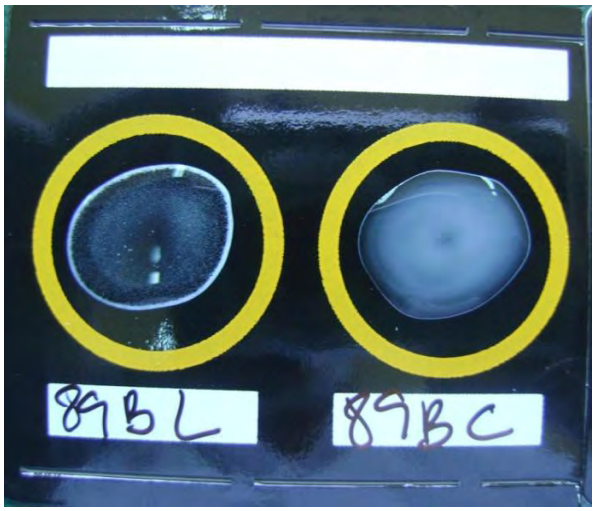
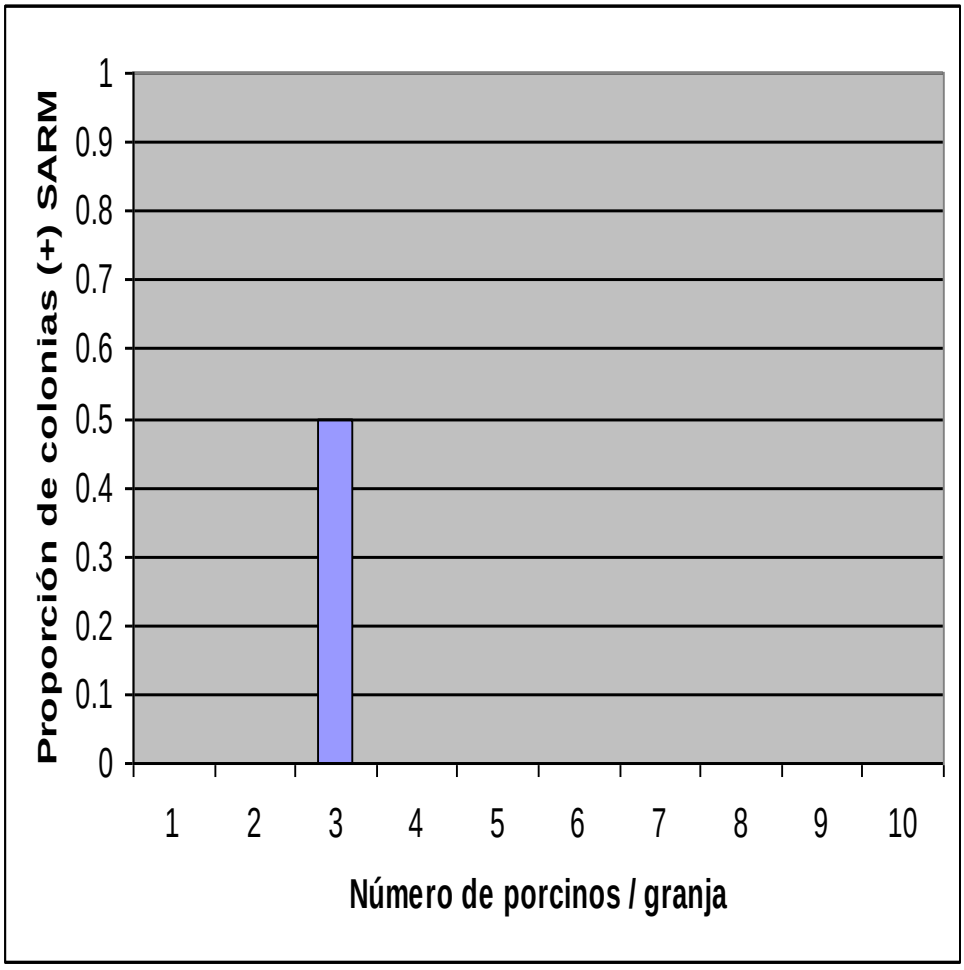


Figura Nº 6: Detección de colonia de SARM por medio de la prueba de látex aglutinación (Elaborado por Claudia Changanaquí, 2010).

CUADRO 1. Frecuencia y distribución de la proporción de colonias (+) a SARM provenientes de una población de 120 porcinos. Lima– Perú 2009.



CUADRO 2. Proporción de animales positivos a SARM dentro de la granja porcina tecnificada positiva y proporción de colonias de SARM positivas en el total de animales muestreados. Lima–Perú 2009.

Granjas Porcinas Tecnificadas	Número Animales/granja	Número/ Animales (+)	Proporción animales (+) SARM/granja (+)	Proporción colonias SARM (+) / total animales (promedio, error estándar)
1	20	0	0	0
2	20	0	0	0
3	20	0	0	0
4	20	0	0	0
5	20	**3**	**15% (95% IC: 0.01-0.33)**	**X=0.075 DST:0.18**
6	20	0	0	0

CUADRO 3. Muestras resistentes sometidas a pruebas de detección de SARM. Lima – Perú 2009.

Granjas con Muestras Resistentes	Resitencia a Oxacilina (≤10)	Catalasa	Coagulasa	ORSAB	Látex Aglutinación
E	R	+	+	+	+
E	R	+	+	+	+
E	R	+	+	+	+
A	R	+	+	+	-
B	R	+	+	+	-
C	R	+	+	+	-
C	R	+	+	+	-
F	R	+	+	+	-
F	R	+	+	+	-

R: Colonias resistentes al disco de oxacilina

V. DISCUSIÓN

El presente estudio, es el primero en documentar el aislamiento de SARM en porcinos provenientes de granjas tecnificadas en el país. Los resultados hallados, indican claramente la presencia de SARM con un 17% (95% IC: 0.034-0.3) en granjas porcinas tecnificadas del departamento de Lima

Existen reportes recientes en Francia y Holanda que han demostrado la presencia de SARM en cerdos. En el 2007 y 2008 estudios realizados en Holanda demostraron la presencia de SARM en granjas porcinas con prevalencias de 81% (95% IC: 0.01-0.05) y 23% (95% IC: 0.08-0.38) respectivamente. Finalmente, en el 2008, Cánada reportó la prevalencia de SARM con un 45% (De Neeling *et al*., 2007; Bufete *et al*., 2007; Van Belkum *et al*., 2008; Khanna *et al*., 2008).

La presencia hallada de SARM en granjas porcinas tecnificadas de nuestro país discrepa con los altos índices en países como Holanda y Cánada. Se estima que esa discrepancia se deba a que en este estudio se utilizaron métodos no selectivos para lograr el aislamiento de SARM. Por lo tanto, se consideró la baja probabilidad de aislar colonias de SARM por medio de métodos no selectivos; los cuales no inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (SASM).

A nivel mundial, muchos autores concuerdan que mediante el uso de métodos selectivos y diferenciales se logran identificar de manera rápida y precisa aislamientos de SARM en distintos tipos de muestras. Esto último, debido a que previenen el crecimiento de organismos sensibles a la meticilina. Asimismo, con respecto a la utilización de métodos no selectivos mencionan sobre fallas no solo en detectar aislamientos de *S. aureus* sino también en detectar SARM entre colonias de SASM (Van Enk y Thompson, 1992; European Food Safety Authority, 2009).

Van Enk y Thompson definieron en 1992, al agar manitol salado como un medio no selectivo para el aislamiento de SARM; debido que el agar manitol salado carece de agentes antimicrobianos capaces de inhibir microorganismos sensibles a la meticilina. Por lo tanto, estos últimos podrían llegar a confundirse con SARM hasta someterlos a otros subcultivos, pruebas bioquímicas y de resistencia a la meticilina. Cabe mencionar, que el presente estudio utilizó placas con agar manitol salado, para un primer aislamiento de colonias de SARM.

En el año 1999, Dunlop *et al*. determinaron como factores importantes a los costos y restricciones de tiempo ya que a menudo son considerados como limitantes; por lo tanto, se seleccionó de cada placa a sólo 2 colonias de más de 100 UFC. Asimismo, la probabilidad de aislar colonias de SARM era muy baja. Sin embargo, se observó un 50%, en cuanto al porcentaje de aislamiento de SARM en las 3 muestras positivas a SARM de la granja positiva, de dicha selección de 2 colonias lo que haría pensar que si se hubiesen seleccionado más colonias al azar de placas agar manitol salado hubiese sido mayor el porcentaje de aislamiento por el presente estudio (Ver **Cuadro 1**).

La baja variabilidad entre los porcinos dentro de la granja tecnificada positiva a SARM, se pone en evidencia en este estudio; debido que estos individuos han permanecido bajo confinamiento y en condiciones similares, por lo que probablemente poseen una flora nasal muy similar. Esto último, hará que exista una pequeña variación entre porcino-porcino, debido a la constante exposición entre ellos al SARM. Sin embargo, estudios realizados por Dunlop *et al*. (1999), reportaron una marcada variabilidad a nivel individual (porcino-porcino) y una muy baja a nivel de corrales y unidades de producción. Cabe mencionar, que sus estudios se basaron en estimar los niveles de resistencia antimicrobiana de la bacteria *Escherichia coli,* provenientes de 55 porcinos en etapa de acabado de una sola granja.

La determinación de resistencia a la meticilina en los aislamientos, se realizó por medio de métodos selectivos (disco difusión, ORSAB y látex aglutinación). Siendo la prueba de mayor sensibilidad y especificidad (látex aglutinación), la que confirmaría a los aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). A pesar de lo manifestado por los diversos autores internacionales con respecto a la supuesta ineficacia de métodos no selectivos para el aislamiento de SARM; el presente estudio logró el aislamiento satisfactorio de SARM en granjas porcinas tecnificadas del departamento de Lima, hallando una presencia de 17% (95% IC: 0.034-0.3).

Los resultados obtenidos nos brindan un alcance de la distribución de SARM en el sistema tecnificado de producción porcina; lo cual servirá como base, para futuras pruebas estadísticas con relación al riesgo cuantitativo en salud pública. Finalmente, al considerar a nuestro estudio como un estudio piloto en nuestro país, este bien podría servir de precedente a estudios futuros, en los cuales podrían utilizarse métodos selectivos para así lograr unificación en cuanto a la metodología para el aislamiento y detección de SARM. Asimismo, obtener una mejor comprensión de la diversidad, distribución e inherentes caminos moleculares de las cepas de

SARM y establecer así su localización en importantes reservorios animales (Aarestrup y Schwarz, 2006).

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El presente estudio, es considerado como el primero en analizar muestras de hisopados nasales de porcinos con el propósito de determinar la presencia de SARM en granjas porcinas tecnificadas del departamento de Lima.

La presencia de SARM hallada en granjas porcinas tecnificadas del departamento de Lima (1/6) fue de 17% (95% IC: 0.034-0.3).

La presencia hallada de SARM dentro de la granja porcina tecnificada positiva del departamento de Lima (3/20) fue de 15% (IC: 0.01-0.33).

El alto porcentaje de aislamiento del 50% presente en las 3 muestras positivas a SARM dentro de la granja porcina tecnificada, es digna de mención, debido a que tan solo se realizó una selección de 2 colonias al azar de cada una de las placas de agar manitol salado por el presente estudio.

El presente estudio, pone en evidencia a los porcinos como posibles reservorios de SARM, lo que conlleva a un inminente peligro no solo para el personal que labora en las granjas sino para la comunidad en general.

El presente estudio, sugiere se refuercen e implementen medidas de control en cuanto a sanidad animal y bioseguridad. Asimismo, llevar a cabo campañas con el fin de informar a la comunidad acerca del riesgo y prevención concerniente al *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM).

Finalmente, se recomienda a los futuros estudios relacionados con el aislamiento y detección de SARM en nuestro país, el uso de métodos selectivos con el propósito de lograr una detección directa de cepas de SARM. La utilización de métodos selectivos contribuiría a lograr la ansiada unificación de la metodología para el aislamiento y detección de SARM, tal como se viene realizando en diversos países a nivel mundial (Aarestrup y Schwarz, 2006).

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aarestrup FM, Schwarz S. 2006.** Antimicrobial Resistance in Staphylococci and Streptococci of Animal Origin. En: Aarestrup FM, ed. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington D.C: ASM. p. 37-38.

2. **Aires de Sousa M, de Lencastre H. 2004**. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. FEMS Inmunol Med Microbiol 40: 101-111.

3. **Akpaka PE, Kissoon S, Rutherford C, Swanston WH, Jayaratne P. 2008.** Evaluation of Methods and Costs for Detecting Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Clinical Specimens at Regional Hospitals in Trinidad and Tobago. West Indian Med J 57: 24-25.

4. **AMGEN. 2010**. España: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). [Internet], [17 febrero 2010]. Disponible en: http://biotec.amgen.es/html/reaccion.html

5. **Beam JW, Buckley B. 2006**. Community-acquired methicillin – resistant *Staphylococcus aureus:* prevalence and risk factors. J Athl Train 41(3): 337-340.

6. **Biberstein EL, Chung Zee Y. 1994**. Tratado de microbiología veterinaria. Zaragoza: Editorial Acribia SA.

7. **Bufete SDM, Tse Hsien K, Li-Yang H, Emmett OB, Goh ALH, Chow PKH. 2007**. Investigation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs used for research. J Med Microbiol 56 :1107-1109.

8. **Bustos-Martínez JA, Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas M. 2006**. *Staphyloccoccus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev. Biomed 17: 287-305.

9. **Callisaya HJ, Sarmiento Z, Choque H. 2007**. Prevalencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* en el personal de limpieza del Hospital Obrero. BIOFARBO 15 (1): 55-60.

10. **Camarena JJ, Sánchez R. 2002.** Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Revisión control de calidad SEIMC. [Internet], [agosto, 2002]. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/pdf/sarm.pdf

11. [**CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA: CLSI. 16th informational supplement

12. **[CMPT]Clinical Microbiology Proficiency Testing. 2003**. Nasal swab: MRSA positive—Ungraded Educational Challenge. [Internet], [agosto 2003]. Disponible en: http://www.cmpt.ca/critiques_2003/m032_3_nasal_aug_03.pdf

13. **Collignon P. 2003**. A review-the use of antibiotics in food production animals - does this cause problems in human health? En: Cranwell PD, ed. Manipulating Pig Production IX. Werribee: APSA p. 73-80.

14. **Committee on Drug Use in Food Animals Panel on Animal Health, Food Safety, and Public Health. 1998.** The use of drugs in food animals: benefits and risks. National Research Council, Board on Agriculture, and Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, National Academy Press [Internet], [28 julio 1998]. Disponible en: http://www.nap.edu/readingroom/

15. **Constantino MN, León CY, Rivera M, Sandoval S. 2008**. Práctica *Staphylococcus.* [Internet], [febrero 2010]. Disponible en: http://qfbmicro.blogspot.com/2008/05/prctica-staphylococccus.html

16. **De Neeling AJ, Van den Broek MJ, Spalburg EC, Van Santen-Verheuvel MG, Dam-Deisz WD, Boshuizen HC, Van de Giessen AW, Van Duijkeren E, Huijsdens XW. 2007.** High prevalence of methicilin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. Vet Microbiol 122: 336-372.

17. **Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. 2007**. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 13: 222-235.

18. **Díaz GA, Ferrán J. 2004**. Género *Staphylococcus*. Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos. [Internet], [16 enero 2010]. Disponible en: http://chopo.pntic.mec.es/~gdiaz3/apuntes/UT124.pdf

19. **Díaz R, Gamazo C, López-Goñi I. 2005**. Manual práctico de microbiología. 3ª ed. Barcelona: Masson S.A. p. 49.

20. **Dunlop RH, McEwen SA, Meek AH, Friendship RM, Black WD, Clarke RC. 1999.** Sampling considerations for herd-level measurement of faecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in finisher pigs. Epidemiol Infect 122: 485–96.

21. **Durán Vila A, Zhurbenko R, Viera DR. 2004**. Propuesta de una modificación en la formulación del medio agar manitol salado utilizado en el aislamiento de estafilococos de importancia clínica. Rev. Cubana Med Trop 56 (3): 172-177.

22. **European Food Safety Authority. 2009.** Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Assessment of the Public Health significance of meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. The EFSA Journal 993: 1-73.

23. **Franco-Álvarez de Luna F, Ibarra A, Tejero R, Rodríguez F, Solis F, Casal M. 2003.** *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina procedentes de muestras clínicas en la provincia de Córdoba. Rev Esp Quimioterap 16: 304-307.

24. **Fuentes, V. 1992.** Farmacología y terapéutica veterinaria. 2ª ed. México D.F: Interamericana S.A.

25. **Gaze W, O'Neill C, Wellington E, Hawkey P. 2008.** Antibiotic resistance in the environment, with particular reference to MRSA. Adv Appl Microbiol 63: 249- 280.

26. **Gesche E, Emilfork C. 1998**. Residuos de antimicrobianos en canales de vacas. Arch Med Vet 30 (2): 137-143.

27. **Granados R, Villaverde MC. 1997.** Microbiología: bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas, micología general, parasitología. 1ª ed. Madrid: Paraninfo.

28. **Guardabassi L, Courvalin P. 2006.** Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. En: Aarestrup FM, ed. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington D.C: ASM. p 1-18

29. **Gustafson RH, Bowen RE. 1997.** Antibiotic use in animal agriculture. J Appl Microbiol 83: 531-541.

30. **Jiménez JN, Correa MM. 2009.** *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. [Internet], [junio 2009]. Disponible en:http://medicina.udea.edu.co/ojs/index.php/iatreia/article/view/1116/959

31. **Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. 2008.** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. Vet Microbiol 128: 298-303.

32. **Lee PR, Lin C. 2003.** The antibiotic paradox: how the isuse of antibiotics destroys their curative powers. Perspect Biol Med 46(4): 603-604.

33. **Linton AH. 1983.** Antibiotic resistance in veterinary practice. En: Bogan JA, Lees P, Yoxall AT, eds. Pharmacological basis of large animal medicine. Oxford: Blackwell Scientific Publications. p. 129-141.

34. **Lozano D, Larrondo H, Herrera ML, Rivero E, Zamora R, Araujo LJ. 1998.** Penicilinas. Act Med 8 (1): 28-39.

35. **Lukasova J, Sustackova A. 2003**. Enterococci and antibiotic resistance. Acta Vet Brno 72: 315-323.

36. **Marin M, Gudiol F. 2003.** Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin 21(1): 42-55.

37. **Martín MA. 2009.** Nuevos Retos de Seguridad Alimentaria y Salud Pública en Producción Porcina. [Internet], [julio 2009]. Disponible en: http://www.seporlorca.com/pdf/ponencias09/MIGUEL-ANGEL-MARTIN.pdf

38. **Mediavilla A, García-Lobo JM. 1998**. Antibióticos b-lactámicos. En: Farmacología Humana 3ª ed. Barcelona: Masson S.A. p. 1085-1106.

39. **Mitscher LA. 2002.** Antibiotics and antimicrobial agents. En: Williams DA, Lemke TL, eds. Principles of medicinal chemistry. 5ta ed. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 1028-1083.

40. **Morgan M. 2008.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? J Antimicrob Chemother 62 (6): 1181 – 1187.

41. **Muara HD, Hernández JM, Villamil K. 2004a**. Generalidades de resistencia bacteriana en terapia intensiva. [Internet], [29 de agosto 2009]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mciego/vol10 _supl2 _04/revisiones/r9 _v10_ supl204.htm

42. **Muara HD, Hernández JM, Villamil K. 2004b**. Resistencia bacteriana a gérmenes gram positivos en la unidad de cuidados intensivos. [Internet], [28 julio 1998]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mciego/vol10 _supl2 _04/revisiones/r11_ v10_ supl204.htm

43. **Okolo MIO. 1986**. Bacterial drug resistance in meat animals: a review. Int. J. Zoon 13: 143-152.

44. **Ovalle MV, Agudelo CI, Castañeda E. 2001.** Empleo del disco de 1 µg de oxacilina para predecir resistencia a penicilina y ceftriaxona en *Streptococcus pneumoniae*. Infect Bact 53:156-161.

45. **OXOID. 2001.** Oxacillin resistance screening agar base. [Internet], [16 febrero 2010]. Disponible en: http://www.oxoid.com/uk/blue/index.asp

46. **Pareja A, Payeras A, Roca P, Tobías A, Díaz ATMP, Pérez MC. 2008**. Incidencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y de *Escherichia coli - Klebsiella pneumoniae* con producción de b-lactamasa de espectro amplio en el Hospital de Son Llátzer, durante el periodo 2003-2006: Un análisis de serie temporal. Medicina Balear 23 (1): 25-31.

47. **Pineda J. 2008.** Manual de toma de muestras. [Internet], [12 julio 2009]. Disponible en: http://163.247.80.241/intranet/documentos/manualbionet.pdf

48. **Portal Agrario. 2007.** Ministerio de Agricultura. [Internet], [12 agosto 2009]. Disponible en: http://www.minag.gob.pe/

49. **Rojas N, Chaves E, García F. 2006.** Bacteriología Diagnóstica. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología. Costa Rica. 69 p.

50. **Salvador C, Acevedo C, Bennani A. 2005.** Técnicas para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el laboratorio de microbiología clínica. AEFA. Disponible en: http://www.pncq.org.br/biblioteca/actualidades2005_11.pdf

51. [**SEIMC]Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2001.** Métodos Especiales para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos. [Internet], [25 febrero 2010]. Disponible en: http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap12.htm

52. **Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, Moritz ED, Capuano AW, Herwaldt LA, Diekema DJ. 2009.** Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. Plos ONE 4(1): e4258.

53. **Sopena N. 2001.** Evolución de un brote epidémico por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Tesis de Médico Humano. Barcelona: Univ. Aut. de Barcelona. 1 -259p.

54. **Schwarz S, Chaslus-Dancla E. 2001.** Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. J Vet Res 32: 201-225.

55. **Taguchi H, Kaneko T, Onozaki M. 2004.** Evaluation of a new chromogenic medium for isolation of MRSA. J. Jap. Assoc. Infect. Dis., 78: 54-58.

56. **Thrusfield M. 2007.** Veterinary Epidemiology. 3ª ed. Oxford: Blackwell Science Ltd.

57. **Ulloa MT, Porte L, Carmi A, Varela C, Fica A. 2001.** Comparación de reacción de polimerasa en cadena, látex y antibiograma para detección de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Rev Chil Infect 18(4): 1-8.

58. **Van Belkum A, Melles DC, Peeters JK, Van Leeuwen WB, Van Duijkeren E, Huijsdens XW, Spalburg E, De Neeling AJ, Verbrugh HA. 2008.** Methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. J Emerg Infect Dis 14: 479-483.

59. **Val D. 2008.** Examen de muestras al microscopio: la tinción GRAM. [Internet], [diciembre 2008]. Disponible en: http://danival.org/600%20microbio/6000notasmicro/tincion/tincion_gram.html

60. **Van den Bogaard AE, Stobberingh EE. 1999.** Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. Drugs 58(4): 589-607.

61. **Van Den Broek IVF, Van Cleef BAGL, Haenen A, Broens EM, Van Der Wolf PJ, Van Den Broek MJM, Huijsdens XW, Kluytmans JAJW, Van Den Giessen AW, Tiemersma EW. 2009.** Methicillin-resistant *Staphyloccoccus aureus* in people living and working in pig farms. Epidemiol Infect 137:1-9.

62. **Van Duijkeren E, Ikawaty R, Broekhuizen-Stins MJ, Jansen MD, Spalburg EC, De Neeling AJ, Allaart JG, Van Nes A, Wagenaar JA, Fluit AC. 2008.** Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. Vet Microbiol 126: 383-389.

63. **Van Enk RA, Thompson KD. 1992.** Use of a Primary Isolation Medium for Recovery of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 30 (2): 504-505.

64. **Van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, De Neeeling AJ, Van De Sande-Bruinsma N, Beaujean D, Voss A, Kluytmans J. 2007.** Emergence of Methicillin – Resistant *Staphylococcus aureus* of Animal Origin in Humans. Emerg Infect Dis 13(12): 1834-1839.

65. **UNAM. 2009**. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. [Internet], [2 enero 2010] Disponible en: http://www.lamolina.edu.pe/portada/

66. **Wegener HC. 2003**. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. Curr Opin Microbiol 6: 439-445.

67. **Wulf MW, Sorum M, Van Nes A, Skov R, Melchers WJ, Klaassen CH, Voss A. 2008.** Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. J Clin Microbiol Infect 14(1): 29-34.

VIII. ANEXOS

PROTOCOLO

Sembrado en Agar Manitol – Sal

1. Sembrar por barrido en placa agar Sal manitol.
2. Dejar las placas en la estufa por 24 horas a 37°C.
3. De dar positivo el agar virará al color amarillo.
4. Escoger colonias redondas, amarillas y pequeñas

Datos:

De dar positivo se observará el viraje de color rosado característico de la placa hacia un color amarillo.

Este agar permite identificar *Staphylococcus aureus* y otros pocos *Staphylococci*.

PROTOCOLO

Siembra en Agar Sangre

1. Sembrar colonias elegidas de placas AMS en placas agar sangre de manera que
2. una zona se encuentre tupida y otra sembrada por agotamiento.
3. Colocar disco de oxacilina 1ug en la zona tupida del agar sangre.
4. Llevar las placas de agar sangre a estufa por 24 horas a 37°C.
5. Proceder a la observación de colonias.
6. Realizar lectura de antibiograma.

Datos:

De dar positivo se observará características fenotípicas como:

a. Morfología: colonias redondeadas y aplanadas de bordes neto, superficie
b. lisa y brillante.
c. Coloración dorada de las colonias
d. Hemólisis

Antibiograma: (halo) > 10mm : sensible

≤ 10mm: resistente

PROTOCOLO

Prueba de Catalasa

Método del portaobjetos:

1. Con ayuda de un asa de siembra recoger una colonia cultivada de placa sangre
2. Colocar la colonia sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
3. Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de H_2O_2 al 30%.
4. Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).
5. Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.

Datos

Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producirse falsos positivos.

Prueba de catalasa debe dar positivo (pequeñas burbujas)

PROTOCOLO

Tinción Gram

1. Colocar con ayuda de un ansa de siembra una colonia sobre un
2. portaobjetos
3. Realizar el extendido
4. Agregar azul violeta (esperar 1 minuto)
5. Enjuagar con agua
6. Agregar lugol (esperar 1 minuto)
7. Enjuagar con alcohol
8. Enjuagar con agua
9. Agregar safranina
10. Enjuagar con agua
11. Dejar secar la lámina portaobjeto
12. Observar al microscopio (100X)

Datos

Se utiliza para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para la diferenciación bacteriana, considerándose Gram (+) a las bacterias que se visualizan de color violeta y Gram (-) a las que se visualizan de color rosa.

PROTOCOLO

PRUEBA DE LÁTEX AGLUTINACIÓN

1. Para cada prueba a realizar, marque un círculo de la tarjeta de reacción para el Látex Reactivo y otro para el Látex de Control.

2. Coloque 50ul de sobrenadante en el círculo correspondiente y añada una gota de de Látex Reactivo. Mezcle bien con un palito mezclador.

3. De la misma manera, coloque 50ul de sobrenadante en el otro círculo, correspondiente al control y añada una gota del Látex de Control. Mézclese bien con un palito mezclador

4. Imprima un movimiento giratorio a la tarjeta durante tres minutos y observe la aparición de aglutinación en condiciones normales de iluminación.

5. Deseche la tarjeta de acuerdo con las normas de bioseguridad, en un recipiente con desinfectante.

Lectura e Interpretación de los Resultados

Aglutinación en 3 minutos con el Látex Reactivo y no con el Látex de Control.	PBP'2 Positivo (MRSA)
No aglutinación con ninguno de los Látex en 3 minutos.	PBP'2 Negativo (MSSA)
Aglutinación en 3 minutos solo con el Látex de Control.	Indeterminado

Intensidad de la Reacción de aglutinación

Negativa	Suspensión homogénea de las partículas sin ninguna agregación visible.
Positivo débil (+)	Agregados pequeños pero bien definidos contra un fondo turbio.
Positivo (+)	Agregados grandes y pequeños contra un fondo ligeramente turbio, o agregados grandes contra un fondo claro