



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus* OXACILINO RESISTENTE EN
MANIPULADORES DE ALIMENTOS DEL ÁREA DE COCINA DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO “ANTONIO PATRICIO DE ALCALÁ”, CUMANÁ, ESTADO
SUCRE
(Modalidad: Tesis de Grado)

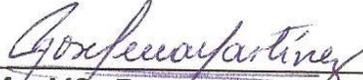
MARBELLA CÁRDENAS VÉLIZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2012

DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus* OXACILINO RESISTENTE EN
MANIPULADORES DE ALIMENTOS DEL ÁREA DE COCINA DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO "ANTONIO PATRICIO DE ALCALÁ", CUMANÁ, ESTADO
SUCRE

APROBADO POR


Profra. MSc Rosa Martínez Nazaret
Asesora


Dra. Elsa Z. Salazar
Jurado Principal


Msc. José G. Betancourt V.
Jurado Principal

DEDICATORIA

A

Dios Todopoderoso, que es el motor principal de mi vida y quien me ayuda a levantarme cada vez que caigo, recordándome que siempre es posible si confío en mi y que la humildad es una virtud.

Mis padres, Víctor Cárdenas (Q.E.P.D) y Maribel Véliz, mi máximo ejemplo de fuerza, entereza, los pilares de mi vida, y a los cuales me esmero en enorgullecer. Los logros son míos, el mérito es de ellos, especialmente de mi madre. Ser madre y padre no es fácil y ella lo ha hecho muy bien, gracias por eso.

Todos mis hermanos, especialmente a la Dra. Neida Cárdenas, mi ejemplo a seguir y a mis demás familiares, abuelos, tíos, primos quienes han apoyado cada uno de mis pasos, confiando en mi.

Mis amigos Cecilia Brito, Uslany Lozada, Johan Calvo, Alba Vargas, Zamara Yépez, Asdays Henríquez, Greisy Márquez, Javier Olivero, Henry Díaz, Armileidis Licet y Lerida Montaña, con quienes emprendí un camino, todos con la misma meta, en la cual nos hemos apoyado en las buenas y malas, gracias por no dejarme caer y por estar allí, más que amigos, hermanos, mis “Amigos por Docena”. Yusmary Marín, Carmen Julia Colón, Dayana Antón, Xiomara León, María Álvarez y Arianny Colón, gracias por ser tan buenas amigas y adoptarme entre ustedes. Marieva Velásquez, María Márquez, Mariajesús Vásquez, Luz Coronado, gracias también por el apoyo y el cariño.

Todas aquellas personas que de una u otra manera influyeron positivamente en la realización de esta parte de mi proyecto de vida.

AGRADECIMIENTOS

A

La Universidad de Oriente Núcleo de Sucre, Cumaná, por colocar para el desarrollo académico profesionales que han hecho de mí una persona amante de su carrera y de la ciencia en general.

El laboratorio de Microbiología del Postgrado de Biología Aplicada de la Universidad de Oriente.

Las profesoras Rosa E. Martínez Nazaret, Mariolga Berrizbeitia, Alina Bravo, Dina Antón, Luz Bettina Villalobos, Jessica Rodríguez, Diannis Martínez, Olga Bianchi, Yoleida Rodríguez y Elsa Salazar, gracias por su apoyo, influyeron en esto más de lo que piensan.

Las Licenciadas Mayelys González, Sarai Acuña, Belkis Medina, Yanna Ortiz y Ruth Lara, piezas fundamentales, muchas gracias por su ayuda.

El Dr. José Ascanio, director del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (HUAPA) para la fecha de muestreo, Licda. Tania Navarro, encargada del Departamento de Dietética del mismo y al personal manipulador de alimentos que allí labora por su gran colaboración en esta investigación.

Todos, gracias.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE FIGURAS	VI
RESUMEN	VII
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	9
Población de estudio	9
Recolección y transporte de la muestra	9
Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Observación microscópica.....	11
Identificación bioquímica	11
Prueba de catalasa	11
Fermentación de manitol.....	11
Prueba de la coagulasa en tubo	12
Prueba de DNasa	12
Resistencia a concentraciones de cloruro de sodio (NaCl).....	13
Prueba de susceptibilidad a novobiocina (NOV)	13
Susceptibilidad antimicrobiana	13
Confirmación de la resistencia a oxacilina (metecilina) de las cepas de <i>S. aureus</i> identificadas.....	14
Control de calidad.....	15
Análisis estadístico	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
CONCLUSIONES	25
RECOMENDACIONES	26

BIBLIOGRAFÍA	27
APÉNDICES	32
ANEXOS	36
HOJAS DE METADATOS	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Muestras del personal que labora en la cocina del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Sucre, que resultaron positivas y negativas al aislamiento de cepas características al género <i>Staphylococcus</i>	16
Figura 2. Muestras positivas a <i>Staphylococcus aureus</i> según su procedencia en el personal que labora en la cocina del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Sucre.	18
Figura 3. Susceptibilidad antimicrobiana, por difusión en disco, de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas del personal que labora en la cocina del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Sucre. Clindamicina (DA), ampicilina (A), cefoxitina (FOX), oxacilina (OX), eritromicina (E), teicoplanina (TEC) y ampicilina-sulbactam (SAM).	21
Figura 4. Porcentaje de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> sensibles y resistentes a oxacilina en el medio oxacillin resistance screening agar base (ORSAB), aisladas del personal que labora en la cocina del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Sucre.	22

RESUMEN

Se analizaron muestras de fosas nasales, manos y faringe del personal que labora en el área de cocina del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá", Cumaná, Sucre, para la búsqueda de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (OX). El aislamiento de cepas características del género *Staphylococcus* se logró por siembra directa en el medio Agar Baird Parker (ABP) a 37°C por 24 a 48 horas. La identificación bioquímica de la especie *S. aureus* se llevó a cabo por pruebas convencionales. La susceptibilidad a antimicrobianos se determinó mediante el método de difusión en disco, para los antibióticos: cefoxitina (FOX 30,00 µg), clindamicina (DA 2,00 µg), eritromicina (E 15,00 µg), teicoplanina (TEC 30,00 µg), ampicilina (A 10,00 µg), ampicilina-sulbactam (SAM 20,00 µg) y OX 1,00 µg. La confirmación de la resistencia a OX se determinó por agotamiento en superficie en el medio suplementado con OX (agar base para probar la resistencia a oxacilina, ORSAB, por sus siglas en inglés: oxacillin resistance screening agar base). Un total de 124 muestras fueron analizadas, de las cuales 40 (32,26%) resultaron positivas al aislamiento de colonias características del género *Staphylococcus*. La identificación bioquímica confirmó que 22 (17,74%) mostraron ser *S. aureus*. 9 (40,90%) de estas se obtuvieron a partir de muestras de fosas nasales, 8 (36,36%) de muestras de manos y 5 (22,74%) de muestras faríngeas. La prueba de susceptibilidad a antimicrobianos arrojó alto porcentaje (90,91%) de cepas resistentes a DA, A y FOX y, 86,86% a la OX. En el caso de la E y TEC, se observaron porcentajes de resistencia de 77,27% y 68,18%, respectivamente. 95,45% de las cepas de *S. aureus* analizadas fueron sensibles a SAM. En el ensayo de confirmación de susceptibilidad a OX en medio ORSAB, 90,91% crecieron. La resistencia a OX por *S. aureus* fue entonces de 90,91%. Los resultados demuestran que el personal que labora en la cocina del HUAPA conforman una fuente de diseminación de estafilococos factible, por lo que, los mismos deberían ser considerados, desde un enfoque sanitario, como un problema de salud pública, los cuales representan un factor de riesgo para la transmisión de *S. aureus* resistentes a OX a los pacientes hospitalizados y a la comunidad.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas son producto de una alteración de la relación entre el hospedero y el microorganismo que las provoca. Desde el punto de vista clínico, se consideran dos tipos de infecciones, las comunitarias y las intrahospitalarias o asociadas al cuidado de la salud (Joklik *et al.*, 1995; García y Fresnadillo, 2000).

Según los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés: Centers for Disease Control and Prevention), una infección intrahospitalaria es aquella que no estaba presente, ni en estado de incubación, en el momento de ingreso del paciente al hospital y que se desarrolla después de 48 horas del mismo, o bien, si la infección ocurre tres días después del alta hospitalaria. Por otro lado, se considera como infección comunitaria aquella que es adquirida en la comunidad, sin que el paciente haya tenido contacto, por lo menos, 12 meses antes con recintos hospitalarios (Garner *et al.*, 1988).

Los bacilos Gram negativos causan la mayor parte de los casos de infecciones en los seres humanos, sin embargo, se ha observado un incremento de éstas debido a cocos Gram positivos, y en particular, las producidas por *Staphylococcus aureus* (Notario *et al.*, 2007).

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos de 0,50 a 1,50 μm de diámetro, que se presentan aislados, en pares, tétradas o cadenas cortas y en grupos irregulares o racimos. Son bacterias catalasa positivas, inmóviles, resistentes a bacitracina, oxidasa negativas y la mayoría de las especies que la forman son anaerobias facultativas, no esporuladas y cápsula variable. *S. aureus* es una de las 47 especies del género que se distingue por ser coagulasa positiva, DNasa positiva, Voges-Proskauer positiva y resistente a polimixina B (Nabón, 2006). Según el manual de Bergey, *S. aureus* pertenece al

orden Bacillales, familia *Staphylococcaceae* y género *Staphylococcus* (Garrity *et al.*, 2004).

Las colonias de *S. aureus* miden de 1 a 3 mm de diámetro, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas (Bustos *et al.*, 2006).

Este microorganismo posee una gran capacidad para sobrevivir en un medio adverso y puede producir diversos cuadros clínicos por la acción de sus determinantes de patogenicidad, entre los que se encuentran: cápsula mucoide-polisacárida, componentes antigénicos de las paredes, producción de enzimas (catalasa, coagulasa, hialuronidasa, estafiloquinasa, lipasas, β -lactamasa, entre otras) y la secreción de diversas toxinas como hemolisina, leucocidina, exfoliatina, exotoxina epidermolítica, enterotoxina estafilocócica y/o la toxina del shock tóxico (TSST-1) (Koneman *et al.*, 2008; Swanston, 1999; Bustos *et al.*, 2006; Riquelme, 2007).

El óptimo desarrollo de *S. aureus* se logra a 37°C, pH cercano a la neutralidad y una actividad de agua (A_w) de 0,98. Las condiciones que favorecen la producción de enterotoxinas se logran a temperaturas entre los 40 y 45°C, pH 7-8 y una A_w equivalente a 0,98 (Riquelme, 2007).

Las enterotoxinas son proteínas de cadena simple no ramificada, solubles en agua y con un peso molecular relativamente bajo. Las enterotoxinas estafilocócicas son producidas por cepas muy específicas; sin embargo, una de ellas es capaz de sintetizar más de un serotipo. Actualmente, se diferencian por su actividad serológica varias enterotoxinas que se designan A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, F, G, H e I; todas se caracterizan por presentar estructuras y pesos moleculares similares. Desde el año 1962, se identifican con una letra del

abecedario, según se han ido descubriendo (A-I). La producción de enterotoxinas por cepas de *S. aureus* depende de la calidad del sustrato, el pH, además de otros compuestos químicos, microorganismos competidores, naturaleza del alimento, procesos a los cuales fue sometido (crudo, cocido, fermentado, entre otros) y de su potencial exposición a temperaturas de crecimiento (Figuroa *et al.*, 2002; Riquelme, 2007; Torres, 2008).

Esta bacteria es un patógeno primario reconocido para el hombre, y con mucha frecuencia causa infecciones intrahospitalarias, forma parte de la flora normal del hombre, siendo el sitio de portación principal las fosas nasales (20,00 a 40,00%) y en una menor proporción (10,00 a 20,00%) la piel, por lo que puede ser considerado un patógeno oportunista, ya que el estado de portador es un factor de riesgo importante para que dicha bacteria pueda causar infecciones, entre las que se encuentran: lesiones cutáneas superficiales, infecciones sistémicas con riesgo de vida (endocarditis, osteomielitis, neumonía, abscesos cerebrales, meningitis y bacteremia), y enfermedades producidas por la acción de las toxinas (intoxicación alimentaria, síndrome de piel escaldada o síndrome de shock tóxico) (Nabón, 2006).

S. aureus puede pasar de fosas nasales a la piel y provocar lesiones en ésta, localizándose, principalmente, en brazos, manos y cara; también, se puede encontrar en la garganta y en el tracto intestinal, pasando de estas localizaciones al aire, polvo, ropa, utensilios y equipos, llegando a contaminar los alimentos (Díaz y González, 2001).

Entre la población adulta sana, 20,00% de los individuos son portadores persistentes de *S. aureus*, 60,00% son portadores intermitentes y 20,00% no son portadores. Los mecanismos que explican la existencia de estos patrones aún no se encuentran dilucidados del todo; sin embargo, se sugiere que podrían estar influenciados, tanto por factores del hospedero, como del microorganismo.

Entre los factores del hospedero parece ser relevante el número y naturaleza de los receptores nasales necesarios para la adherencia de la bacteria, la respuesta inmune que se activa y la presencia de componentes solubles antiestafilococos en las secreciones nasales. Respecto al microorganismo, se propone la expresión de ciertos tipos de adhesinas, cápsula o la capacidad de formar biopelículas como factores que influyen en la colonización (Figueroa *et al.*, 2002).

Los agentes antimicrobianos son el arma principal para combatir las infecciones. Su utilización data de hace más de setenta años y su efecto inmediato fue el de provocar una drástica mejoría en el pronóstico de las infecciones. 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 bacteriana. Ésta se define como una condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida, por parte de una cepa bacteriana, de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico. Esta resistencia ocurrió como resultado de cambios cromosómicos o intercambio de material genético, mediados por plásmidos o transposones (Galiana, 2003; Changanaqui, 2010).

S. aureus, por su parte, ha demostrado un gran poder de adaptación a los agentes antimicrobianos, adquiriendo paso a paso resistencia a los antibióticos disponibles para el tratamiento de las infecciones que ocasiona. Aunque inicialmente era sensible a penicilina, la resistencia de *S. aureus* a este antimicrobiano fue detectada poco después de su aparición en la década de 1940. La resistencia de la gran mayoría de cepas de *S. aureus* es debido a la producción de beta-lactamasas (penicilinasas), enzimas extracelulares de origen plasmídico, cuya reacción básica es hidrolizar el anillo betalactámico de la penicilina, impidiendo, de esta manera, su acción antibiótica. Esto motivó al surgimiento de nuevas drogas llamadas penicilinas penicilinasas resistentes

(PPR), como meticilina, introducida en 1961, y en la década de los 70, las cefalosporinas, drogas también estables frente a las beta-lactamasas estafilocócicas (Carmona y Silva, 1994; Galiana, 2003).

Las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina o meticilino resistentes (SAMR) se empezaron a observar un año después de la introducción de la meticilina como agente antimicrobiano para el tratamiento de infecciones causadas por dicho microorganismo. En las últimas cuatro décadas, los SAMR han sido considerados como patógenos emergentes causantes de infecciones intrahospitalarias y comunitarias, y han constituido, conjuntamente con la resistencia a vancomicina (VA), uno de los retos terapéuticos y de control de infección más importantes de los últimos años (Guzmán y Lozada, 2007).

El primer reporte de SAMR fue realizado en Europa, al inicio de los años sesenta cuando el mismo se aisló de diferentes hospitales por toda Europa, Australia y Asia. En Estados Unidos, por ejemplo, su prevalencia aumentó de 2,40%, en 1975, a 29,00%, en 1991. Este incremento se ha producido, no sólo en los grandes hospitales del tercer nivel, sino también, en las pequeñas poblaciones e incluso se han reportado SAMR adquiridos en la comunidad. En el 2004 se describieron, al menos, tres mecanismos de resistencia de SARM hacia agentes betalactámicos: la modificación de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP2a), la cual es conocida como resistencia intrínseca a meticilina; la inactivación por medio de enzimas betalactamasas o resistencia extrínseca; y el fenómeno de tolerancia. El soporte 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 (Mendoza *et al.*, 2001; Changanaqui, 2010).

El mecanismo más importante de resistencia a meticilina es la expresión alterada de una proteína ligadora de penicilina (PLP) denominada PLP2a o

PBP2'. Esta proteína es codificada por el gen *mecA*, el cual está contenido en un ADN adquirido exógenamente, por transferencia horizontal. Dicho ADN contiene el gen *mecA* en un elemento genético móvil o "casette" de resistencia, el cual se inserta en el ADN cromosómico de una cepa meticilino sensible (SAMS), es decir, reside dentro de una isla genómica, un elemento genético denominado casette cromosómico estafilocócico (SCC, por sus siglas en inglés) en *S. aureus*, y se caracteriza por presentar muy baja afinidad por los antibióticos betalactámicos. Esta propiedad condiciona la resistencia al resto de los antibióticos betalactámicos, aun cuando se asocien con inhibidores de betalactamasas, ya que lo que se altera es el sitio diana sobre el que actúan estos fármacos, situación alarmante y de importancia médica (Lorenz *et al.*, 2006; Nabón, 2006; Castellano *et al.*, 2008; Nodarse, 2009).

Se han descrito diferentes variedades de SCC*mec* en *S. aureus*, las cuales varían dependiendo de su tamaño (21 a 67 kb), modificaciones en la región reguladora *mecA* (complejo *mec*), el tipo de recombinasas cromosómicas que posea el casette (genes *ccr*) y los determinantes de resistencia que adquiera, debido a la integración de plásmidos y/o transposones (Castellano *et al.*, 2008).

Meticilina ya no es un agente de elección en el manejo clínico, ni para evaluar la susceptibilidad de *S. aureus*. En su lugar, se utiliza oxacilina (OX), la cual es más estable, por lo que el término correcto sería *S. aureus* resistente a oxacilina u oxacilino resistente (SAOR); no obstante, debido a su rol histórico, el acrónimo SAMR es aún usado por la mayoría de los autores para describir estos aislamientos (Castellano *et al.*, 2008).

Cefoxitina (FOX) es una cefamicina que actúa como un inductor más fuerte que OX sobre la producción de PBP2a en aislados de *S. aureus* que poseen el gen *mecA*; por lo tanto, parece más eficaz que OX en la detección de la resistencia a meticilina (Batista *et al.*, 2008).

Tradicionalmente, la detección fenotípica de SAMR se realizaba utilizando el método de difusión con disco de OX (1µg). A partir del 2004, el ahora Instituto de Laboratorio de Estándares Clínicos (CLSI, por sus siglas en inglés: Clinical and Laboratory Standards Institute), debido a que el antibiótico FOX es más estable que OX, recomienda utilizar el disco de FOX (30,00 µg) para monitorear la resistencia a OX, mediada por el gen *mecA*, por lo tanto, las cepas se deben reportar como oxacilina o metilino resistentes (no cefoxitina) (Lorenz *et al.*, 2006; CLSI, 2011).

La prevalencia de portadores nasales de *S. aureus* en la población general es, en promedio, cercana a 37,00%, con un rango entre 19,00% y 55,00%. Estudios en Chile mostraron diferentes tasas dependiendo de la población estudiada: 27,00% en trabajadores de un servicio de cirugía, 36,80% en estudiantes de medicina, 48,60% en población general, 40,40% en estudiantes universitarios del área de la salud, 28,80% en personal de Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y 35,60% en manipuladores de alimentos (Figueroa *et al.*, 2002).

El término manipulador de alimentos incluye a toda persona que interviene en alguna de las fases de elaboración de una comida o que puede entrar en contacto directo con un producto alimenticio en cualquier etapa de la cadena alimentaria. Está demostrada la relación existente entre la inadecuada manipulación de los alimentos y la producción de enfermedades transmitidas a través de éstos, los cuales pueden desencadenar brotes toxoinfectoalimentarios. La causa primaria de contaminación la constituyen la falta de higiene de los manipuladores, utensilios o superficies donde se elaboran las preparaciones. Las medidas más eficaces en la prevención de estas enfermedades son las higiénicas, ya que en la mayoría de los casos es el manipulador el que interviene como vehículo de transmisión, por actuaciones incorrectas, en la contaminación de alimentos (Valdiviezo *et al.*, 2006; Riquelme, 2007).

El patógeno aislado con mayor frecuencia en casos de toxi-infecciones alimentarias es *S. aureus*, dicho cuadro clínico se conoce como estafiloesterotoxicosis o estafiloenterotoxemia y se produce como consecuencia de la ingestión de alimentos que contienen toxinas preformadas. Los estafilococos, una vez que llegan a los alimentos, si las circunstancias lo permiten, se multiplican y producen toxinas. La contaminación de los alimentos, en la mayoría de los casos, suele ocurrir después de ser cocidos, cuando no son conservados adecuadamente, lo que favorece la multiplicación de los microorganismos (Valdiviezo *et al.*, 2006; Riquelme, 2007)

Mendoza *et al.* (2001), cuando estudió la colonización y susceptibilidad de SAMR en pacientes y personal de un hospital de referencia en la Ciudad de Lima, Perú; en varias áreas del hospital, encontraron cepas de SAMR, tanto en los pacientes, como en el personal. De las cepas encontradas en el personal, el porcentaje de cepas resistentes a meticilina fue mayor en las aisladas a partir de las fosas nasales.

Según la revisión bibliográfica, no se encontraron antecedentes sobre el porcentaje de manipuladores de alimentos de centros de salud portadores de SAMR en Venezuela; sin embargo, en la investigación realizada por Gámez, (2010), de los aislamientos de *Staphylococcus* spp, procedentes de pacientes hospitalizados y ambulatorios del HUAPA, la especie predominante es *S. aureus*, (51,30% y 48,70% respectivamente), de los cuales, 43,60% de los primeros y 24,10% de los segundos, fueron resistentes a OX, por lo que se hizo necesaria la búsqueda de SAMR en los manipuladores de alimentos del HUAPA, pues la población allí recluida es muy susceptible a sufrir infecciones.

METODOLOGÍA

Población de estudio

La población estudiada estuvo conformada por todo el personal manipulador de alimentos del área de cocina del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (HUAPA), que funciona en la ciudad de Cumaná, estado Sucre. El grupo estuvo dividido en dos turnos de trabajo, uno en la mañana y otro en la tarde. Esta investigación se llevó a cabo tomando en cuenta las normas de ética establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para estudios de investigación de grupos humanos, así como los lineamientos señalados en la declaración de Helsinki (1980), entre los cuales destaca: “El trabajo de investigación estará a cargo de personas con la debida preparación científica y bajo la vigilancia de profesionales de la salud, se respetará el derecho de cada individuo participante en la investigación, a salvaguardar su identidad personal y respetar la intimidad, la integridad física y mental del sujeto” (Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, 1993). A cada integrante del grupo se le solicitó por escrito una autorización, en la cual quedó reflejada su aceptación de participación en la investigación (Anexo 1).

Recolección y transporte de la muestra

El procedimiento para la recolección de las muestras en los individuos manipuladores de alimentos se realizó de acuerdo con lo establecido para el análisis microbiológico, recomendado por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (ICMSF, por sus siglas en inglés: Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1981). De cada integrante del personal seleccionado se obtuvieron cuatro muestras: una muestra por hisopado nasal, de ambas manos y un exudado faríngeo. Para el exudado faríngeo se le instruyó que respirara profundamente y sacara la

lengua. Luego, se extendió el hisopo entre los pilares amigdalinos y detrás de la úvula, se tomó la muestra moviendo el hisopo de lado a lado, teniendo el cuidado de no tocar las paredes laterales de la cavidad bucal, ni la úvula. La muestra nasal se tomó con un hisopo estéril humedecido en solución salina fisiológica estéril (SSF), el cual se rotó en el vestíbulo de ambas fosas nasales (tabique y cara interna de aletas nasales). Para las muestras de las manos, se impregnó un hisopo con SSF y se procedió a pasarlo entre los espacios interdigitales y las primeras falanges de los dedos de las manos. Cada una de las muestras colectadas en faringe, fosas nasales y manos, fueron colocadas en un tubo con medio de transporte Cary Blair, los cuales se sellaron y rotularon con el nombre de la persona, fecha y hora de recolección. Posteriormente, las muestras se transportaron de forma inmediata al laboratorio de bacteriología del Postgrado de Biología Aplicada, con sede en Cerro el Medio, Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre.

Aislamiento de *Staphylococcus aureus*

Cada una de las muestras, por separado, se sembró directamente en placas que contenían el medio selectivo Agar Baird Parker (ABP). Este es un medio que posee piruvato sódico como estimulante del crecimiento selectivo de este microorganismo. Para tal fin, se procedió a tomar el hisopo contenido en el medio de Cary Blair y se pasó por un extremo de la placa y luego, se realizó la siembra por diseminación en cuatro cuadrantes. Se incubaron las placas a 37°C por 24 a 48 horas. Culminado el período de incubación, se procedió al aislamiento de colonias negras (debido a la reducción de telurito a telurio), convexas, de 2 a 3 mm, y con un halo claro alrededor de la colonia, esto debido a la actividad proteolítica, presuntivas de *S. aureus*. Las cepas aisladas se traspasaron a caldo de BHI (infusión cerebro corazón) para su posterior purificación en agar nutritivo e identificación por pruebas bioquímicas convencionales (Riquelme, 2007).

Observación microscópica

A las colonias que, morfológicamente, se correspondieron con las características de *S. aureus*, se les realizó un extendido a fin de teñirlo con la coloración de Gram y poder observar al microscopio la presencia de cocos Gram positivos dispuestos en racimos, tétradas, pares o aislados, morfología típica de este microorganismo (Koneman *et al.*, 2008).

Identificación bioquímica

A las colonias características de *S. aureus*, en ABP, se les realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, fermentación de manitol en agar manitol salado, coagulasa libre, DNasa, resistencia a varias concentraciones de cloruro de sodio, siguiendo los procedimientos descritos por Koneman *et al.* (2008).

Prueba de catalasa: para detectar la producción de la enzima catalasa, se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3,00% en un portaobjeto limpio y seco, y se mezcló con una colonia del microorganismo sospechoso, tomándola con un palillo de madera. La producción de burbujas se consideró como un resultado positivo para la prueba, como producto de la transformación del peróxido de hidrógeno en agua, más oxígeno libre por acción de la enzima catalasa. Esta prueba se realizó para diferenciar los géneros *Staphylococcus* (catalasa positiva) de otros cocos catalasa negativa como *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp.

Fermentación de manitol: el agar manitol salado (AMS) es un medio selectivo diferencial. Se dice que es selectivo, pues, al contener cloruro de sodio al 7,50% sólo permite el crecimiento de bacterias halófilas y diferencial porque al

contener manitol, como fuente de energía, permite observar la fermentación del mismo por parte de los microorganismos capaces de hacerlo, al virar el indicador rojo de fenol a amarillo. Éste se inoculó por diseminación en cuatro cuadrantes y se seleccionaron aquellas colonias fermentadoras de manitol para continuar con el estudio. Esta prueba se realizó para diferenciar las especies *S. aureus* y *Staphylococcus saprophyticus*, manitol salado positivas, de cepas de *Staphylococcus*, manitol salado negativo, como *Staphylococcus epidermidis*.

Prueba de la coagulasa en tubo: para evaluar la capacidad del microorganismo de transformar el fibrinógeno en fibrina al producir la enzima coagulasa, se colocó una o dos colonias de un cultivo de 18 a 24 horas de incubación en agar nutritivo, en un tubo contentivo de 0,50 ml de plasma de conejo y se incubó a 35°C, por cuatro horas. A partir de ese tiempo se determinó la formación del coágulo (prueba positiva). Aquellos tubos donde no ocurrió formación de coágulo a las cuatro horas, se reincubaron a temperatura ambiente por 24 horas antes de descartarlos para hacer una nueva lectura. Esta prueba se utilizó para diferenciar a *S. aureus* (coagulasa positiva) de otras especies de *Staphylococcus*.

Prueba de DNasa: las colonias formadoras de DNasa hidrolizan, a su alrededor, el ácido desoxirribonucleico (ADN) contenido en el medio de cultivo. Para realizar la prueba de la DNasa, se sembró en forma de mancha densa las cepas en estudio en el agar DNasa (el cual es un medio que contiene, entre otros compuestos, ácido desoxirribonucleico). Después de 24 horas de incubación a 35°C, se acidificó el conjunto con unas gotas de ácido clorhídrico (HCl) $1\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, con lo cual precipitó el ADN, opalesciendo el medio; si alrededor de la colonia se formó un halo transparente, se consideró positiva la prueba; si por el contrario se observó un halo opaco, la prueba se consideró negativa. Esta prueba se aplicó para confirmar la diferenciación de *S. aureus* (coagulasa positiva) de otras especies de *Staphylococcus*.

Resistencia a concentraciones de cloruro de sodio (NaCl): para probar la capacidad halófila de las cepas aisladas, éstas se sembraron en agar nutritivo adicionado con cloruro de sodio en concentraciones de 6,00; 7,00; 8,00; 9,00 y 10,00%, por diseminación en cuatro cuadrantes.

Prueba de susceptibilidad a novobiocina (NOV)

Para realizar la prueba, se tomaron de 1 a 3 colonias del microorganismo en agar nutritivo, luego de 24 horas de incubación a 37°C en aerobiosis, y se realizó una suspensión de un estándar 0,5 de Mac Farland en 4,50 ml de SSF. Obtenida la suspensión con la turbidez correspondiente ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml), se procedió a impregnar un hisopo estéril en la suspensión y se rotó varias veces, ejerciendo presión sobre las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido, luego se diseminó el hisopo en tres direcciones para cubrir toda la superficie del agar sangre. Se colocó un disco de 5 µg de novobiocina y se incubó a 35°C durante toda la noche en aerobiosis. Las cepas resistentes mostraron una zona de inhibición de 16 mm o menos. Las cepas de *S. aureus* son sensibles a este antibiótico a diferencia de las cepas de *S. saprophyticus*.

Susceptibilidad antimicrobiana

Los patrones de susceptibilidad se determinaron mediante el método de difusión en disco y lineamientos de Bauer *et al.* (1966), sembrándose las cepas de *S. aureus* a estudiar en placas con agar nutritivo. Una vez transcurridas las 24 horas, se seleccionaron de 1 a 3 colonias y se realizó una suspensión estándar de 0,5 Mac Farland en 4,50 ml de SSF. Obtenida la suspensión con la turbidez correspondiente ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml), se sembraron en placas contentivas de agar Mueller Hinton, con un hisopo estéril, el cual se impregnó en la suspensión y se rotó varias veces, ejerciendo presión sobre las paredes

del tubo para eliminar el exceso de líquido. Luego, se diseminó el hisopo en tres direcciones para cubrir toda la superficie del agar. Se dejó secar alrededor de unos cinco minutos y se procedió a colocar discos de antibióticos de: FOX (30,00 µg), clindamicina (DA 2,00 µg), eritromicina (E 15,00 µg), teicoplanina (TEC 30,00 µg), ampicilina (A 10,00 µg), ampicilina-sulbactam (SAM 20,00 µg) y OX (1,00 µg), todos de la casa comercial OXOID Ltd,. Cada disco se colocó siguiendo las normas establecidas por el manual M100-S21 del CLSI (2011). Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas en aerobiosis. Los halos inhibitorios fueron medidos en milímetros y, seguidamente, la lectura de los antibiogramas fueron interpretados bajo los criterios del mismo.

Confirmación de la resistencia a oxacilina (meticilina) de las cepas de *S. aureus* identificadas

Para confirmar la resistencia a OX se utilizó el agar base para probar la resistencia a oxacilina (ORSAB, por sus siglas en inglés: oxacillin resistance screening agar base). Este es un medio modificado de AMS con cloruro de sodio al 5,50%, al cual se le adiciona un suplemento a base de los antibióticos OX (1,00 mg) y polimixina B (25,000 UI) por cada 500ml de medio. El indicador del medio es el azul de anilina que reacciona con los ácidos producidos por la fermentación del manitol (Changanaqui, 2010).

Siguiendo las instrucciones descritas para la prueba en el manual de técnicas microbiológicas (Ministerio de Salud de Chile, 1998), se procedió a repicar en caldo de BHI, las colonias ya identificadas. Se incubaron durante 24 horas y se sembraron en placas con agar nutritivo a 37°C. Una vez transcurridas las 24 horas, se seleccionaron de 1 a 3 colonias y se realizó una suspensión de un estándar 0,5 de Mac Farland en 4,50 ml de SSF. Obtenida la suspensión con la turbidez correspondiente ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml), se procedió a impregnar un hisopo estéril en la suspensión y se rotó varias veces, ejerciendo presión sobre las

paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido, luego, se diseminó el hisopo en tres direcciones para cubrir toda la superficie del agar y se incubaron durante 24 horas a 37°C en aerobiosis. Finalizado el período de incubación, se llevó a cabo la evaluación macroscópica de crecimiento o no de colonias. Donde hubo crecimiento, se consideró al microorganismo como resistente a OX, y donde no creció, se consideró sensible a la misma. Las colonias de *S. aureus* meticilino resistente se distinguieron por la presencia de una coloración azul intenso, a diferencia de los estafilococos coagulasa negativos resistentes a meticilina, los cuales suelen aparecer con coloración azul pálida (Changanaqui, 2010).

Control de calidad

El control de calidad de los ensayos se llevó a cabo utilizando una cepa certificada de *S. aureus* ATCC 25923, sensible a oxacilina, y *S. aureus* ATCC 43300, resistente a oxacilina, provenientes del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), Caracas, Venezuela.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el estudio realizado fueron expresados en figuras en base a los porcentajes de aislamientos (Jiménez, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 124 muestras colectadas al personal que labora en la cocina del HUAPA, 40 (32,26%) resultaron positivas al aislamiento de colonias características al género *Staphylococcus* (Figura 1).

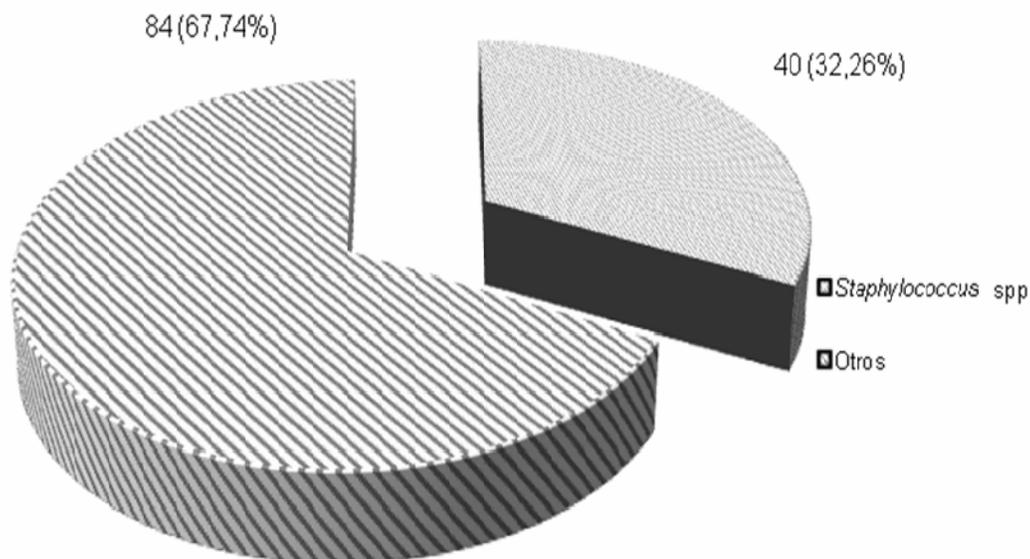


Figura 1. Muestras del personal que labora en la cocina del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Sucre, que resultaron positivas y negativas al aislamiento de cepas características al género *Staphylococcus*.

La identificación bioquímica confirmó que de 40 (32,26%) cepas identificadas como *Staphylococcus* spp, 22 (17,74%) mostraron ser *S. aureus*, por sus características bioquímicas particulares de transformar el peróxido de hidrógeno en agua más oxígeno libre, fermentar manitol, coagular el plasma de conejo, hidrolizar DNasa, soportar altas concentraciones de NaCl y la sensibilidad a NOV.

En Venezuela no hay reporte de incidencia de *S. aureus* en personal que elabora alimentos en centros hospitalarios, sin embargo, hay información a nivel del personal de enfermería, como por ejemplo, el del servicio de neonatología

del HUAPA, realizado por Díaz (2010), y en pacientes hospitalarios y ambulatorios del HUAPA (Gámez, 2010), donde se reportan porcentajes de aislamientos de *S. aureus* de 21,05% y 57,65%, respectivamente. En el primer caso se trabajó con portadores y en el segundo con muestras clínicas.

Este resultado (17,74%), además, se aproxima a los reportados por Puig *et al.* (1990), quienes aislaron *S. aureus* en 20,50% del personal que laboraba en una fábrica de alimentos, en Argentina, y a los de Arzú *et al.* (2000), quienes obtuvieron un total de 21,00% de aislamientos en manipuladores alimentarios de un supermercado argentino.

Al comparar estos valores con el obtenido en este estudio (17,74%), se puede observar que el mismo, se acerca a los reportados para portadores, pero está por debajo de los aislados en muestras clínicas.

El aislamiento e identificación de 22 cepas (17,74%) de *S. aureus* en el personal encargado de elaborar los alimentos en el HUAPA, es una clara señal de que estos trabajadores pueden ser una fuente importante de diseminación de este patógeno entre los pacientes de la institución. Se ha demostrado que uno de los factores que en mayor medida puede afectar a la salud, es la falta de higiene por parte del personal que manipula los alimentos (Valdiviezo *et al.*, 2006), trayendo como consecuencia que sean señalados como principales vehículos de transmisión de la enfermedad de origen alimentario producida por *S. aureus*, conocida como estafiloenterotoxiosis o estafiloenterotoxemia, la cual puede ser mortal, cuando esta afecta especialmente a pacientes hospitalizados.

Cuando se habla de posible transmisión de *S. aureus* por parte de manipuladores de alimentos, automáticamente se piensa cual es la principal vía de ingreso de este patógeno a los alimentos. Al respecto, Sopena y Sabriá

(2002) afirman que el mayor aporte de este patógeno es a partir de las fosas nasales de los manipuladores, que en promedio se reporta cerca de 32,00%, con un rango entre 19,00 y 55,00%.

En este estudio, de 22 cepas de *S. aureus* aisladas de las muestras obtenidas de los manipuladores, 9 (40,90%) se obtuvieron a partir de muestras de fosas nasales, 8 (36,36%) de muestras de manos y 5 (22,74%), de muestras de faringe (Figura 2). Como puede apreciarse, el mayor porcentaje de aislamiento se obtuvo a partir de muestras de fosas nasales, cuyo porcentaje se encuentra dentro del rango descrito anteriormente.

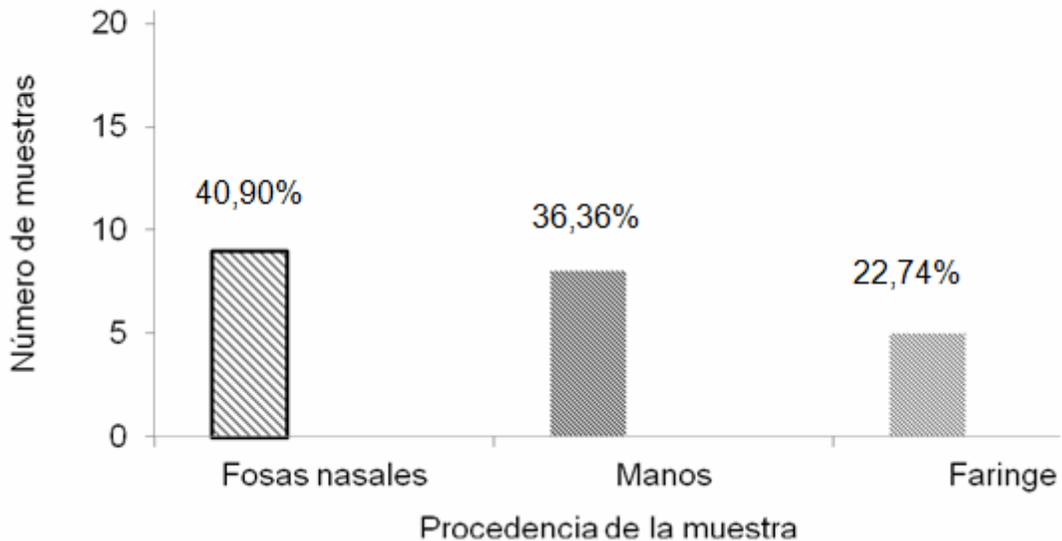


Figura 2. Muestras positivas a *Staphylococcus aureus* según su procedencia en el personal que labora en la cocina del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Sucre.

Esto coincide con los resultados de Valdiviezo *et al.* (2006), quienes, en su búsqueda de portadores de *S. aureus* en los manipuladores de alimentos de tres comedores públicos de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, hallaron que el 40,00% de los aislamientos se ubicó en las fosas nasales.

Toraño *et al.* (2001) refieren que el alto porcentaje de aislamiento de *S. aureus*

a partir de muestras de fosas nasales está estrechamente relacionado con la habilidad de esta bacteria de adherirse con mayor facilidad a la cavidad nasal, lo que le ha permitido catalogar a las fosas nasales como el nicho ecológico fundamental de este microorganismo. Por lo tanto, si el personal que labora en el área de cocina del HUAPA no toma las medidas higiénicas necesarias al momento de elaborar los alimentos, como por ejemplo el uso adecuado de tapabocas, pueden fácilmente transmitir por vía aérea, específicamente a través del estornudo, cepas de *S. aureus* a la superficie de los alimentos, lo que representa un riesgo de salud, ya que cuando los microorganismos sean ingeridos por los pacientes del HUAPA, se está abriendo las puertas para un posible cuadro de intoxicación alimentaria por *S. aureus*.

Velasco *et al.* (2002), por su parte, refieren que la transmisión de *S. aureus* a partir de las manos del personal que labora en salud, también debe ser considerado importante, pues pueden servir como fuente en la diseminación de cepas de *S. aureus* dentro de la institución, especialmente cepas resistentes a agentes antimicrobianos.

Al respecto, Arce *et al.* (2012) hallaron que 46,70% de las cepas que resultaron positivas para *S. aureus* del personal de un centro integral de salud en Perú provenían de las muestras obtenidas de manos; mientras que Valdiviezo *et al.* (2006) encontraron que 20,00% de los aislamientos de *S. aureus* en muestras de manipuladores de alimentos de comedores públicos en la ciudad de Cumaná, estado Sucre se aislaron de manos, resultados cercanos a los encontrados en este estudio (36,36%) observándose que los porcentajes de aislamiento de cepas de *S. aureus* en portadores son más elevados en aquellos individuos que se desenvuelven en centros de salud.

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública que ha sido considerado como el desafío supremo de la microbiología del siglo XXI. La

prevalencia de microorganismos Gram positivos resistentes a los antimicrobianos usados de primera línea para su tratamiento ha aumentado desde las últimas décadas, modificándose las pautas terapéuticas en base a los patrones de susceptibilidad de cada región. El tratamiento de las infecciones producidas por *S. aureus* es cada vez más complicado, ya que a pesar de la existencia de gran variedad de antimicrobianos activos *in vitro* contra este patógeno, su habilidad natural para desarrollar nuevos mecanismos de resistencia compromete su utilidad terapéutica. *S. aureus* puede ocasionar graves problemas de multirresistencia en el ámbito hospitalario, lo cual ha generado que este microorganismo sea actualmente catalogado como superbacteria (Castellano *et al.*, 2008; Nodarse, 2009; Changanqui, 2010).

Debido a que *S. aureus* posee una rápida respuesta adaptativa a la presión selectiva de agentes antimicrobianos, y que las cepas que pueden ser transmitidas por el personal que labora en la cocina del HUAPA están en contacto directo con el ambiente hospitalario y sus pacientes, en este estudio se procedió a llevar a cabo una evaluación de susceptibilidad antimicrobiana a las cepas de *S. aureus* que se aislaron de 22 trabajadores, los cuales son considerados portadores de este microorganismo.

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana contuvo un primer ensayo en el que se usó el método en difusión en discos, con los antimicrobianos: FOX, DA, E, TEC, A, SAM y OX y un segundo ensayo que incluyó la utilización del medio ORSAB, medio enriquecido y suplementado, listo para confirmar la resistencia a OX en *S. aureus*. Los resultados de la prueba de susceptibilidad señalaron que un alto porcentaje de cepas de *S. aureus*, aisladas del personal que labora en la cocina del HUAPA, presentan resistencia a la mayoría de los antimicrobianos probados.

En la figura 3 se observa que 90,91% de las cepas mostró resistencia a DA, A

y FOX y, 86,86% a OX, al ser leída esta última, en este caso, de forma aislada de FOX, a pesar de que el CLSI 2011 recomienda la utilización del disco de FOX (30,00µg) para monitorear la resistencia a OX, puesto que se considera mucho más estable que OX, por lo que las cepas se deben reportar como oxacilina o meticilino resistentes y no cefoxitina. Para confirmar la discrepancia arrojada entre la lectura de los discos de FOX y OX se aplicó el segundo ensayo de susceptibilidad utilizando el medio ORSAB.

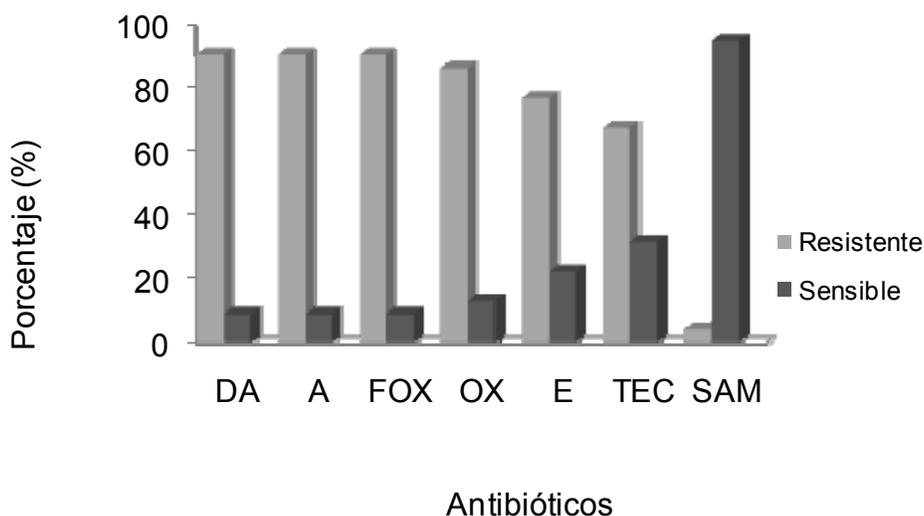


Figura 3. Susceptibilidad antimicrobiana, por difusión en disco, de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas del personal que labora en la cocina del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Sucre. Clindamicina (DA), ampicilina (A), cefoxitina (FOX), oxacilina (OX), eritromicina (E), teicoplanina (TEC) y ampicilina-sulbactam (SAM).

En el caso de E y TEC, se observaron porcentajes de resistencia de 77,27% y 68,18%, respectivamente. Contrariamente, se observó 95,45% de sensibilidad por parte de las cepas de *S. aureus* analizadas al antibiótico SAM. Cabe destacar que diferencia de los halos entre A y SAM fue mayor de 5mm, en todas las cepas resistentes a A pero sensibles a SAM, lo cual hace pensar en que las cepas sean productoras de penicilinasas. Por otro lado, no se evidenció resistencia inducible a DA en presencia de E.

Al aplicar ensayo de susceptibilidad a OX en medio ORSAB, se pudo observar que de 22 cepas de *S. aureus* aisladas, 20 (90,91%) fueron resistentes a OX (Figura 4).

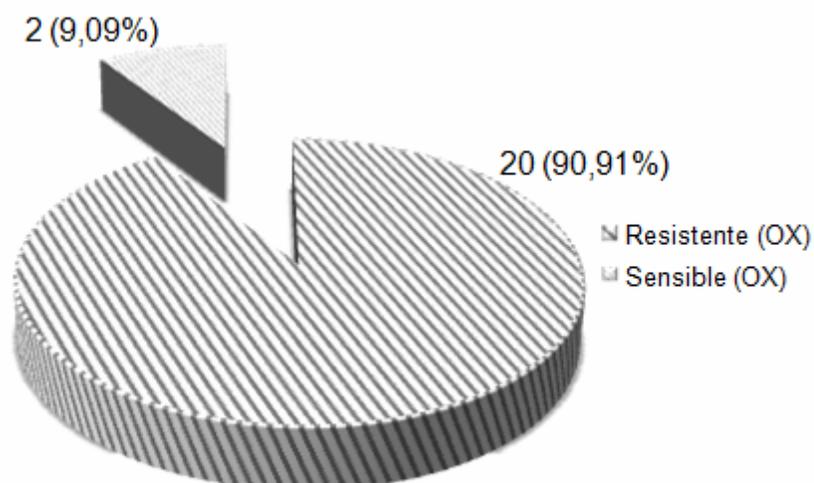


Figura 4. Porcentaje de cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a oxacilina en el medio oxacillin resistance screening agar base (ORSAB), aisladas del personal que labora en la cocina del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Sucre.

Este resultado confirma el de FOX, arrojado por el método de difusión en disco, donde el porcentaje de resistencia fue el mismo (90,91%), por lo que, al comparar los dos ensayos aplicados para medir la resistencia a OX, se evidenció que ciertamente FOX es mucho más eficaz que OX para determinar la sensibilidad antimicrobiana en las cepas ante OX y que el medio ORSAB arroja muy buenos resultados para el mismo. Puede afirmarse entonces que, de 22 cepas identificadas como *S. aureus*, 90,91% resultaron ser SAMR.

Estos resultados son similares a los encontrados por Sigvas *et al.* (1997), en el hospital Almenara de Perú, y Vásquez (1997), en el hospital Rebagliatti de Perú, quienes reportan porcentajes de SAMR de 90,00% y 85,00% respectivamente. En cambio al comparar con porcentajes hallados por Cornejo

et al. (1995) en el hospital Nacional de Arequipa en Perú (71,40%), Guzmán y Lozada (2007) y Gámez (2010) en el HUAPA (62,20% y 67,70% respectivamente), se puede observar que el porcentaje de cepas de SAMR encontrados supera los valores antes mencionados; sin embargo, es importante destacar que en todos los estudios antes mencionados se trabajó con muestras clínicas y en la presente investigación, con portadores. Por su parte, Alviárez *et al.* (2005) hallaron SAMR en 39,47% del personal de una unidad de alto riesgo neonatal, en Mérida, Venezuela, y Díaz (2010), quien encontró SAMR en 66,67% en la unidad de neonatología del HUAPA, lo que quiere decir que la aparición de los mismos ha venido en aumento progresivo con el transcurso de los años,

Achón *et al.* (2012), en su búsqueda de portadores nasales de SAMR en manipuladores de alimentos de un mercado, en Paraguay, obtuvieron 5,70% de aislamientos. Esto sumado a los resultados de los otros investigadores citados refleja que el porcentaje de portadores de SAMR es mayor en aquellos que tienen contacto con centros de salud de manera constante.

El alto porcentaje de SAMR observado en el personal que labora en la cocina del HUAPA, es un claro indicio de que las cepas de *S. aureus* procedentes del de hospitales se aíslan cada vez con mayor frecuencia de personas vinculadas a dichas instituciones, cuya característica más resaltante es tener la capacidad de evadir la acción de múltiples antimicrobianos, en especial a los betalactámicos. Al respecto, Gámez (2010) refiere que el consumo antimicrobianos, principalmente de betalactámicos, podrían estar influyendo en la resistencia de cepas de *S. aureus* provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios, con lo cual se estaría poniendo en evidencia la presión selectiva ejercida por los antibióticos sobre la población bacteriana, lo que es motivo de preocupación, ya que al ser el personal de la cocina portador de estas cepas resistentes y el principal enlace entre el paciente hospitalario y los alimentos, se

estaría exponiendo a los pacientes a posibles brotes de intoxicación alimentaria o infecciones, las cuales una vez que se instalan en este tipo de pacientes, por lo general con sistema inmune disminuido, podría acarrear serias consecuencias incluyendo la muerte.

Velásquez *et al.* (2005) hacen referencia que, en las últimas cuatro décadas, la aparición y diseminación de cepas de SARM, ha convertido a esta bacteria en la responsable de un gran número de infecciones intrahospitalarias en todos los continentes, aún cuando existan diferencias epidemiológicas importantes entre los distintos países e incluso entre las regiones de un mismo país.

El aumento de infecciones intrahospitalarias por cepas de SAMR, se describe desde que meticilina fue empleada como antibiótico de elección en el tratamiento contra *S. aureus* (Velásquez, 2005; Kanafani y Fowler, 2006). Sin embargo, este panorama ha cambiado mucho, ya que se ha demostrado que cepas SAMR también se ha extendido a las comunidades, las cuales han estado involucradas en infecciones con elevada tasa de mortalidad, principalmente en la piel, tejidos blandos, neumonías necrotizantes y septicemias (Said-Salim *et al.*, 2003).

Es conveniente tomar en consideración que el personal que labora en los centros hospitalarios conforma un modelo factible como fuente de diseminación de estafilococos, por lo que, los mismos deberían ser considerados desde un enfoque sanitario, como un problema de salud pública donde se incrementan los factores de riesgo de adquirir y transmitir a los pacientes hospitalizados una infección por *S. aureus* resistente a OX. Por lo que, se hace necesario impartir medidas educativas y preventivas dirigidas a la modificación de las condiciones de trabajo que favorecen el desarrollo de estas cepas, a fin de minimizar el riesgo tanto en los hospitales como en la comunidad.

CONCLUSIONES

El mayor porcentaje de aislamiento de cepas de *S. aureus* se ubicó en fosas nasales, seguida de manos y faringe.

Los antimicrobianos a los que las cepas presentaron porcentaje de resistencia más elevados fueron cefoxitina, clindamicina y ampicilina.

Cefoxitina es mucho más eficaz, debido a su estabilidad, en el estudio de sensibilidad por parte de estas cepas a OX y el medio ORSAB arroja muy buenos resultados para el mismo fin.

El aislamiento e identificación de 20 cepas de SAMR en el personal encargado de elaborar los alimentos en el HUAPA es una clara señal de que estos trabajadores son una fuente importante de diseminación de este patógeno entre los pacientes de la institución.

RECOMENDACIONES

Confirmar la resistencia a la metilina por métodos serológicos y/o moleculares.

Fomentar actividades dirigidas a difundir información sobre el uso adecuado de los agentes antimicrobianos entre el personal que labora en el HUAPA.

Implementar medidas educativas y preventivas entre el personal manipulador de alimentos del HUAPA, a modo de concientizarlos sobre la importancia de transmisión de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos entre el trabajador y paciente.

Cumplir con apego las normas esenciales de manipulación de alimentos por parte del personal que labora en el área de la cocina, para así poder brindar al paciente alimentos libres de microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

Achón, F.; Cabral, L. y Walde, J. 2012. Portación nasal de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos del mercado N° 4 de Asunción, Paraguay. *Revista ANACEM*, 6(1): 14-17.

Alviárez, E.; Velazco, E.; Nieves, B.; Vivas, G. y Gutiérrez, B. 2005. Detección de portadores de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en una unidad de alto riesgo neonatal. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 47(2): 16-21

Arce, Z. y Asalde, R. 2012. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en trabajadores del centro integral de salud de la Universidad Católica Santo Toribio de Mongrovejo. Chiclayo 2009. *Revista del Cuerpo Médico del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 5(1): 33-35

Arzú, O.; Pieretti, H.; Rolla, R. y Roibón, W. 2000. Evaluación de riesgo microbiológico en superficies inertes y vivas de manipuladores en áreas de producción de un supermercado del Nordeste Argentino. *Universidad Nacional del Nordeste*, 17: 6-10.

Batista, N.; Gutiérrez, I.; Lara, M.; Laich, F. y Méndez, S. 2008. Evaluación del método de difusión en disco de 30 µg de cefoxitina en la detección de resistencia a meticilina en aislamientos seleccionados de *Staphylococcus aureus*. *Revista Española de Quimioterapia*, 21(4): 213-216.

Bauer, A.; Kirby, M.; Sherris, J. y Truck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45: 493-496.

Bustos, J.; Hamdan, A. y Gutiérrez, M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomédica*, 17: 287-305.

Carmona, O. y Silva, H. 1994. Mecanismos de resistencia a los antibióticos. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 13: 6-18.

Castellano, M.; Perozo, A. y Vivas, R. 2008. Detección fenotípica y molecular de resistencia a meticilina en *S. aureus*. *Revista Kasmera*, 36(1): 28-38.

Changanaqui, C. 2010. Presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en granjas porcinas tecnificadas del departamento de Lima. Trabajo de pregrado. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 21 ed. Pennsylvania.,30(1): 68-115.

Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas. 1993. *Pautas y éticas internacionales para la investigación y experimentación biomédica en seres humanos*. Ginebra.

Cornejo, M.; Azpilcueta, A.; Zea, E.; Del Carpio, J.; Núñez, D, y Muñoz, E. 1995, *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina en el servicio de medicina interna del HNSA. *Boletín de la Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales*, 4(22): 66.

Díaz, C. y González, B. 2001. *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 2(3): 1-9.

Díaz, E. 2010. "Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. aisladas al personal de enfermería del servicio de neonatología del Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" (SAHUAPA), de Cumaná, estado Sucre". Trabajo de pregrado. Escuela de Ciencias, Departamento de Enfermería. Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, extensión Cumaná, Venezuela.

Figuroa, G.; Navarrete, P.; Caro, M.; Troncoso, M. y Faúndez, G. 2002. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. *Revista Médica de Chile*, 130: 859-886.

Galiana, A. 2003. Infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 74(1): 26-29.

Gámez, L. 2010. "Resistencia antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de pacientes hospitalizados y ambulatorios del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá", de la ciudad de Cumaná, estado Sucre". Trabajo de pregrado. Escuela de Ciencias, Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, extensión Cumaná, Venezuela.

García, J. y Fresnadillo, M. 2000. Nuevos antibióticos activos frente a Gram positivos. *Revista Española de Quimioterapia*, 13(4): 13-16.

Garner, J.; Jarvis, W.; Emori, T.; Horan, T. y Hughes, J. 1988. CDC. Definitions for nosocomial infection. *American Journal of Infection Control*, 16: 128-140.

Garrity, G.; Bell, J. y Lilburn, T. 2004. *Bergey'S Manual of Systematic*

Bacteriology. Second Edition. Editorial Office. New York.

Guzmán, M. y Lozada, R. 2007. Detección de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes aislados de pacientes con infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27(1): 349-363.

International Commission on Microbial Specifications Foods (ICSMF).1981. *Microorganismos de los alimentos. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones prácticas*. Editorial Acirbia. Zaragoza, España.

Jiménez, J. 2000. *Bioestadística. Métodos descriptivos*. Universidad de los Andes. Facultad de Medicina. Mérida. Venezuela

Joklik, W.; Willet, H.; Amos, D. y Wilfert, C. 1995. *Microbiología de Zinsser*. Vigésima Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Kanafani, Z. y Fowler, V. 2006. *Staphylococcus aureus* infections: new challenger from an old pathogen. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24: 182-193.

Koneman, E.; Stephen, B.; Willian, M.; Winn, W. y Scherckenberg, P. 2008. *Diagnóstico Microbiológico*. Quinta edición. Editorial médica panamericana. Buenos Aires, Argentina

Lorenz, R.; Méndez, E.; Ahumada, C.; Nagel, A.; Ramos, C.; Mendoza, M.; Nardín, M.; Morano, S.; Mollerach, A. 2006. Evaluación de placas de screening de cefoxitina y cefotaxima para la detección de resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(3): 152-154.

Mendoza, C.; Ballón, J.; De los Rios, J. y Velásquez, R. 2001. *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (MRSA): Colonización y susceptibilidad en pacientes y personal de salud de un hospital de referencia. *Revista Diagnóstico*, 40(3): 149-156.

Ministerio de Salud de Chile. 1998. *Manual de Técnicas Microbiológicas*. Instituto de Salud Pública de Chile.

Nabón, A. 2006. *Staphylococcus aureus* resistente a betalactámicos en infecciones detectadas en la comunidad. *Salud Militar*, 28(1): 26-33.

Nodarse, R. 2009. Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina mediante disco de cefoxitina. *Revista Cubana de Medicina Militar* 38(3-4): 30-39.

Notario, R.; Lejona, S.; Méndez, E.; All, L.; Lascialandare, S. y Borda, N. 2007. Aislamientos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes adquiridos en la comunidad (SAMR-AC), en Rosario y Santa Fe. *Revista Médica de Rosario*, 73: 82-85.

Puig, O.; López, O.; Alcaraz, L. y Abdon, A. 1990. Primer aislamiento de cepas de *Staphylococcus aureus* productores de toxina del síndrome de shock tóxico-1 en manipuladores de alimentos en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 22(3): 142-145.

Riquelme, L. 2007. Incidencia de *Staphylococcus aureus* en platos fríos listos para el consumo en locales de comida rápida italiana y medidas para su control. Trabajo de pregrado. Departamento de Ciencias de los Alimentos y Tecnología Química. Universidad de Chile, Chile.

Said-Salim, B.; Mathema, B. y Kreiswirth, B. 2003. Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24: 451-455.

Siguas, A.; Salazar, N.; Salazar, A.; Velásquez, E.; Villa, Z. y Siguas, F. 1997. Susceptibilidad del *Staphylococcus* en un servicio de medicina. *Boletín de la Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales*, 6(2): 41.

Sopena, N. y Sabriá, M. 2002. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. *Medicina Clínica*, 118(17): 671-676.

Swanston, W. 1999. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *American Journal of Medicine*, 48(1): 20-22.

Toraño, G.; Quiñones, D.; Hernández, I, Hernández, T.; Tamargo I. y Borroto, S. 2001. Portadores nasales de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina entre niños cubanos que asisten a círculos infantiles. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 19: 367-370.

Torres, M. 2008. Evaluación microbiológica y detección de enterotoxinas estafilocócicas en ensaladas de moluscos y vegetales. *Revista Científica*, 18(6): 739-744.

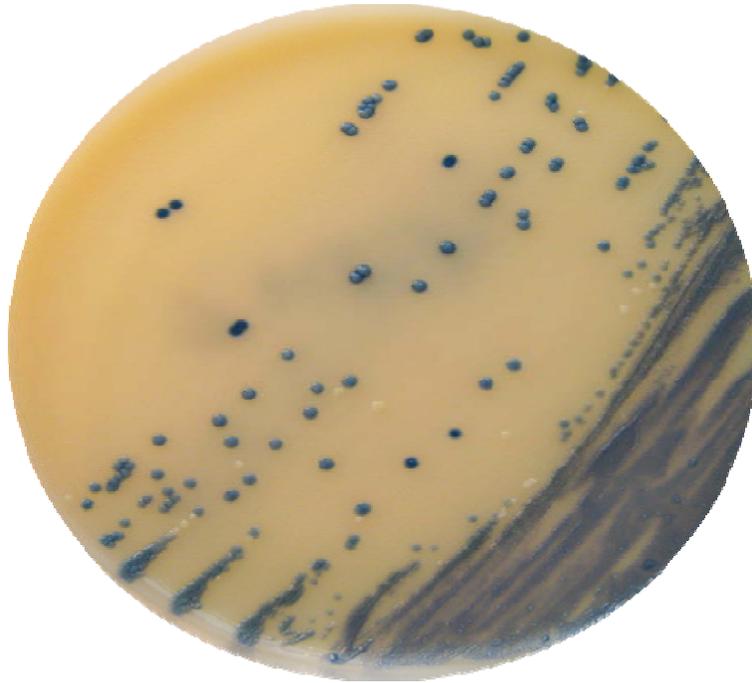
Valdiviezo, N.; Villalobos, L. y Martínez, R. 2006. Evaluación microbiológica en manipuladores de alimentos de tres comedores públicos en Cumaná-Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 26(2): 95-100.

Vásquez, L. 1997. Sensibilidad del *Staphylococcus aureus* en cultivos de heridas, esputo y úlceras, HNERM. *Boletín de la Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales*, 6(2): 43.

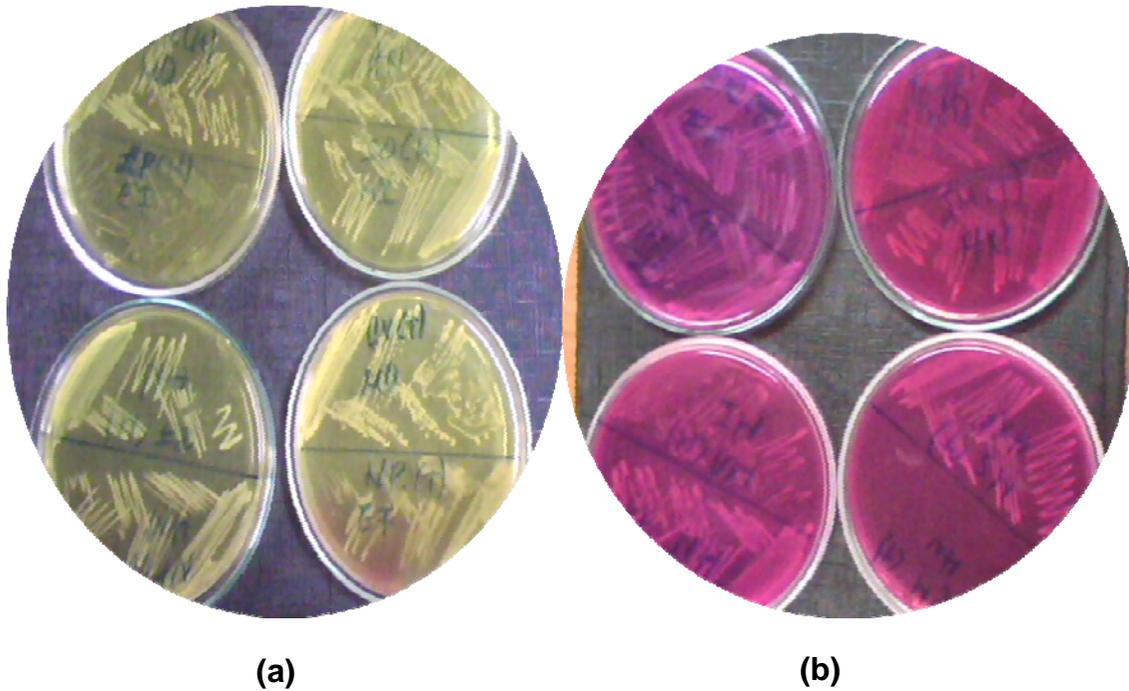
Velasco, E.; Nieves, B.; Araque, M. y Calderas, Z. 2002. Epidemiología de infecciones nosocomiales por *Staphylococcus aureus* en una unidad de alto riesgo neonatal. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 20(7): 231-235.

Velásquez, M. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. *Salud Pública de México*, 47(5): 381-387.

APÉNDICES



Apéndice 1. Colonias de *Staphylococcus* spp, en agar Baird Parker.



Apéndice 2. Cepas de *Staphylococcus* spp., fermentadoras y no fermentadoras de manitol salado. (a) manitol salado positivo; (b) manitol salado negativo.



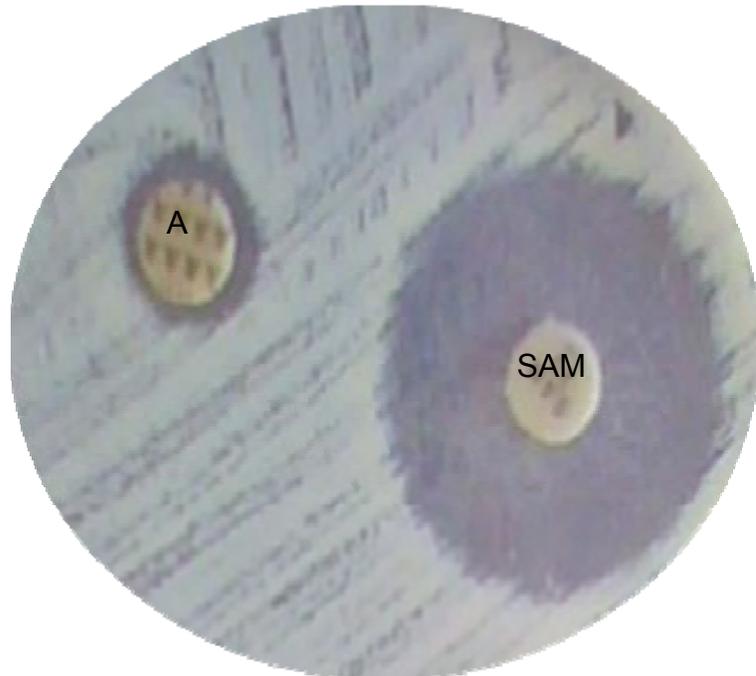
Apéndice 3. Coagulasa positiva en tubo.



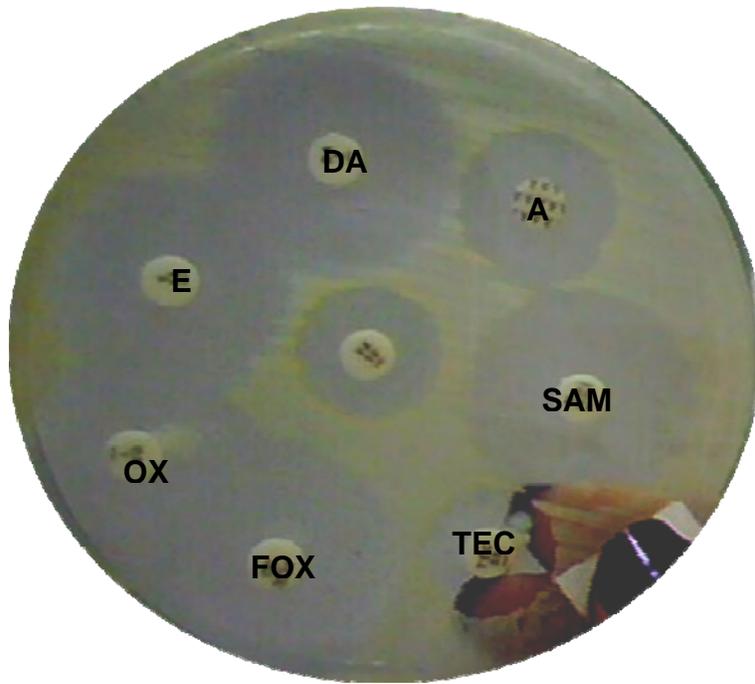
Apéndice 4. Resistencia al disco de Novobiocina



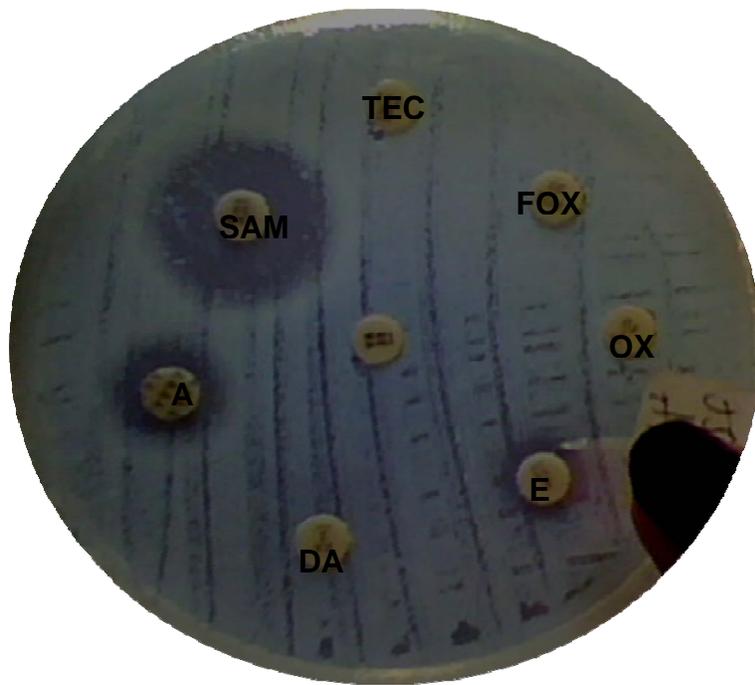
Apéndice 5. Expresión de DNasa en las cepas estudiadas.



Apéndice 6. Expresión de β -lactamasas.



Apéndice 7. Cepa sensible a los antibióticos probados.



Apéndice 8. Cepa multirresistente.

ANEXOS

ANEXO 1

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

Yo:	
C.I	Nacionalidad:
Estado Civil	Domiciliado en:

Siendo mayor de 18 años y en uso pleno de mis facultades mentales por medio de la presente autorizo a la Br. Marbella Cárdenas Véliz, cédula de identidad N° 18 776 444, para que mi persona sea incluida voluntariamente en el grupo de individuos a los cuales se les tomará una muestra por hisopado nasal, de manos y exudado faríngeo en medio de transporte Cary Blair con el fin de determinar la presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* así como la posible oxacilino resistencia de las mismas, cuyos resultados serán evaluados como parte del trabajo de grado intitulado “DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus* OXACILINO RESISTENTE EN MANIPULADORES DE ALIMENTOS DEL ÁREA DE COCINA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO “ANTONIO PATRICIO DE ALCALÁ”, CUMANÁ, ESTADO SUCRE”, el cual se realizará bajo la supervisión académica de la M.Sc. Rosa Elena Martínez Nazaret.

En Cumaná, a los _____ días del mes de _____ de 20____.

Nombre

C.I.

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Detección de <i>Staphylococcus aureus</i> OXACILINO resistente en manipuladores de alimentos del área de cocina del Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, Cumaná, Estado Sucre
---------------	---

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Cárdenas V, Marbella	CVLAC	18.776.444
	e-mail	marbellacv23@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Staphylococcus aureus , manipuladores de alimentos, resistencia bacteriana

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Se analizaron muestras de fosas nasales, manos y faringe del personal que labora en el área de cocina del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Sucre, para la búsqueda de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (OX). El aislamiento de cepas características del género *Staphylococcus* se logró por siembra directa en el medio Agar Baird Parker (ABP) a 37°C por 24 a 48 horas. La identificación bioquímica de la especie *S. aureus* se llevó a cabo por pruebas convencionales. La susceptibilidad a antimicrobianos se determinó mediante el método de difusión en disco, para los antibióticos: cefoxitina (FOX 30,00 µg), clindamicina (DA 2,00 µg), eritromicina (E 15,00 µg), teicoplanina (TEC 30,00 µg), ampicilina (A 10,00 µg), ampicilina-sulbactam (SAM 20,00 µg) y OX 1,00 µg. La confirmación de la resistencia a OX se determinó por agotamiento en superficie en el medio suplementado con OX (agar base para probar la resistencia a oxacilina, ORSAB, por sus siglas en inglés: oxacillin resistance screening agar base). Un total de 124 muestras fueron analizadas, de las cuales 40 (32,26%) resultaron positivas al aislamiento de colonias características del género *Staphylococcus*. La identificación bioquímica confirmó que 22 (17,74%) mostraron ser *S. aureus*. 9 (40,90%) de estas se obtuvieron a partir de muestras de fosas nasales, 8 (36,36%) de muestras de manos y 5 (22,74%) de muestras faríngeas. La prueba de susceptibilidad a antimicrobianos arrojó alto porcentaje (90,91%) de cepas resistentes a DA, A y FOX y, 86,86% a la OX. En el caso de la E y TEC, se observaron porcentajes de resistencia de 77,27% y 68,18%, respectivamente. 95,45% de las cepas de *S. aureus* analizadas fueron sensibles a SAM. En el ensayo de confirmación de susceptibilidad a OX en medio ORSAB, 90,91% crecieron. La resistencia a OX por *S. aureus* fue entonces de 90,91%. Los resultados demuestran que el personal que labora en la cocina del HUAPA conforman una fuente de diseminación de estafilococos factible, por lo que, los mismos deberían ser considerados, desde un enfoque sanitario, como un problema de salud pública, los cuales representan un factor de riesgo para la transmisión de *S. aureus* resistentes a OX a los pacientes hospitalizados y a la comunidad.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Martínez N., Rosa E.	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	11.383.167
	e-mail	rosamnazaret@hotmail.com
	e-mail	
Salazar de V., Elsa Z.	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	10.460.717
	e-mail	elsazul2003@yahoo.es
	e-mail	
José Gregorio Betancourt Villaroel	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8.649.514
	e-mail	jbetanvi@gmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

23	11	2012
----	----	------

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-cardenasm.doc	Aplication/word

Alcance:

Espacial: INTERNACIONAL

Temporal: TEMPORAL

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciada en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

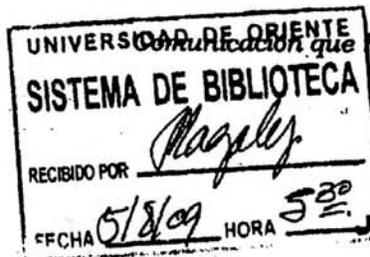
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUNPEL
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

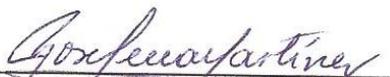
JABC/YGC/manuja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



Cárdenas Véliz, Marbella
Autor



Msc. Martínez Nazaret, Rosa Elena
Asesor