



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



**PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus*
SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A LA METICILINA
AISLADAS DEL PERSONAL CLINICO**

Autora:

Malena Sharel Guevara Laguado

C.I: V-21.221.958

Tutor: Silvio Barreto

Mérida, Mayo 2019



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



**PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus*
SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A LA METICILINA
AISLADAS DEL PERSONAL CLINICO**

Trabajo de Grado para optar al Título de Licenciada en Bioanálisis

Autora:

Malena Sharel Guevara Laguado

C.I: V-21.221.958

Tutor: Silvio Barreto

Mérida, Mayo 2019

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso por ser mi guía en tiempos difíciles, acompañándome en cada proyecto que me propongo, bendiciendo cada día de mi vida, sé que tus pruebas me fortalecen y me hacen entender que soy una gran guerrera, dándome a entender que su tiempo es perfecto.

A mi madre amada, por ser ese motor que me inspira a creer que si lo puedes soñar lo puedes lograr, gracias por enseñarme tu ejemplo de constancia valentía y dedicación, por ser mi fortaleza y mi gran consejera todos estos años de vida, pues es a ti quien debo hoy en día lo que soy como persona y futura profesional, siempre serás mi gran tesoro.

A mis 3 ángeles en el cielo quienes me cuidan y aunque hoy no estén físicamente fueron parte de mi crecimiento personal gracias por brindarme su amor y enseñanzas, sé que hoy celebran conmigo este gran logro.

A ti Gabriel, por ser mi compañero en este camino, amarme con mis virtudes y defectos, por tu paciencia y apoyo incondicional, gracias por llegar a mi vida en el mejor momento, deseando celebrar muchos más proyectos a tu lado, te amo.

A mi gran amiga y hermana Kiara, quien inicio conmigo este largo camino y hoy me acompaña a culminar este gran logro, por estar siempre para mí brindándome sus consejos y ser mi bastón de apoyo en mis caídas, gracias por brindarme lo mejor de ti e inspirarme a tomar amor por esta linda profesión te quiero mucho lo logramos.

A mi querida gran amiga Jhonitza gracias por tu apoyo brindado, tus consejos y aun hoy en día seguir siendo la hermana que me regalo la vida, siempre estando a mi lado en cada paso dado a pesar de la distancia, te quiero mucho.

A mi familia por su apoyo, por escuchar mis inquietudes, brindarme sus palabras de aliento siempre valorando mi esfuerzo y creer en mis capacidades, me siento muy dichosa de ser su orgullo y doy gracias a Dios por rodearme del mejor cariño y amor del mundo con esta hermosa familia que me vio crecer

A mis pequeños grandes amores, acompañándome siempre y llenándome de su amor puro e incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A la ilustre Universidad de Los Andes, quien me abrió sus puertas y ser la casa de conocimientos que junto con la ayuda de sus estimados profesores me permitió crecer con calidad humana y profesional.

Al Centro De Microscopía Electrónica Dr. Ernesto Palacios Prú, de la Universidad de Los Andes, y todo el personal quien lo integra por brindar su colaboración para el desarrollo de esta investigación en sus espacios y lograr así culminar apropiadamente este proyecto.

A mi tutor Lcdo. Silvio Barreto, gracias por aportar su tiempo y conocimientos para lograr culminar este proyecto con éxito.

A la Dra. Beatriz Quintero y la Dra. Elsa Velazco gracias por brindarnos, su tiempo, colaboración y dedicación en el desarrollo de esta investigación.

A la Lcda. Ana Flores, quien nos apoyó en el proceso de esta investigación en la identificación de las cepas a través del Viteck el cual se realizó en el laboratorio del IPASME.

Al Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), del cual recibimos la información necesaria para desarrollar las cepas controles.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCION	1
CAPITULO I: EL PROBLEMA	4
Planteamiento del problema	4
Justificación de la investigación	4
Objetivos de la investigación	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
CAPITULO II: MARCO TEORICO	6
Generalidades de los estafilococos	8
Importancia clínica y epidemiológica de <i>Staphylococcus aureus</i>	9
Formación de biopelículas por <i>Staphylococcus aureus</i>	13
Producción del polisacárido intercelular PIA por <i>Staphylococcus aureus</i>	14
CAPITULO III: MARCO METODOLOGICO	18
Tipo de investigación	18
Diseño de investigación	18
Unidad de análisis	19
Cepas bacterianas	19
Determinación de la susceptibilidad a la meticilina	21
Determinación de la formación de biopelícula	22
Preparación del inóculo bacteriano	22

Formación y visualización de la biopelícula.....	22
CAPTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION.....	24
Resultados.....	24
Procedencia de las cepas de <i>S. aureus</i> de acuerdo al origen del aislamiento.....	24
Perfil de susceptibilidad a la meticilina.....	24
Producción de biopelícula en <i>Staphylococcus aureus</i>	24
Comparación entre la producción de biopelícula y la resistencia a la meticilina.....	24
Relación entre la producción de biopelícula y la presencia o no de glucosa.....	28
Discusión.....	30
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	35
Conclusiones.....	35
Recomendaciones.....	36
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRAFICAS.....	37
ANEXOS.....	45

INDICE DE TABLAS

TABLA	Pág
1 Descripción de las cepas <i>S. aureus</i> de acuerdo al origen del aislamiento.....	20

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del cassette cromosomal estafilocócico mec (SCCmec).....	12
Figura 2. Microfotografías electrónicas en las que se muestran las células bacterianas de <i>S. aureus</i> (a) en forma planctónica (b) Formando biopelícula.....	13
Figura 3. Fases de la formación de biopelículas	15
Figura 4. Producción de polisacárido intercelular PIA	16
Figura 5. Procedencia de aislamiento de las cepas de <i>S. aureus</i>	25
Figura 6. Cepas de <i>S. aureus</i> según la susceptibilidad a la meticilina	25
Figura 7. Cepas de acuerdo al origen de procedencia y perfil de susceptibilidad	26
Figura 8. Cepas de <i>S. aureus</i> de acuerdo a la producción de biopelículas.....	26
Figura 9. Cantidad de biopelícula y susceptibilidad a la meticilina en <i>S. aureus</i>	27
Figura 10. Cantidad de biopelícula producida en ausencia de glucosa	30
Figura 11. Cantidad de biopelícula producida en presencia de glucosa.....	30

www.bdigital.ula.ve

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS

PRODUCCION DE BIOPELÍCULA EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus*
SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A LA METICILINA
 AISLADAS DEL PERSONAL CLINICO

Autora: Malena Guevara

RESUMEN

Staphylococcus aureus es un patógeno oportunista que puede causar infecciones leves, moderadas o graves en el hombre, en el ámbito hospitalario puede colonizar piel y membranas mucosas en el personal de salud, facilitando su transmisión a los pacientes durante su atención. El objetivo de esta investigación fue comparar la producción de biopelícula en cepas de *S. aureus* susceptibles y resistentes a la meticilina de una colección de aislados procedentes del personal clínico que labora en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal del Instituto Autonomo Hospital Universitario de Los Andes. Para ello, se realizó la determinó la susceptibilidad a la meticilina en utilizando el método de microdilución en caldo, la producción de biopelícula por el método de formación en microplaca en presencia o no de glucosa. Los resultados de este trabajo demostraron que la resistencia a la meticilina de *S. aureus* se ubicó en 52,2% (12/23) de las cepas y el 30,4% (7/23) de los aislados la formaron biopelícula. Al comparar la producción de biopelícula y la susceptibilidad a la meticilina se observó que las cantidades de exopolisacárido desarrollada en las cepas susceptibles mostraron leves variaciones con respecto a los aislados meticolinorresistentes. La presencia de glucosa aumenta el desarrollo de exopolisacárido en cepas formadoras de biopelícula. La formación de biopelícula es independiente de la susceptibilidad a la meticilina y la presencia o no de glucosa. La resistencia a la meticilina y la formación de biopelícula fueron condiciones que favorecieron la colonización del personal clínico por cepas de *S. aureus*, los cuales a su vez pudieron originar infecciones asociadas a la atención sanitaria.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, Biopelícula, Susceptibilidad y Resistencia a la Meticilina

INTRODUCCIÓN

El estudio de las biopelículas o *biofilms* se inició en el siglo XVII, cuando Van Leeuwenhoek determinó la presencia de microorganismos bacterianos en la placa dental. Sin embargo, no fue sino hasta el año de 1978 cuando se describieron, por primera vez, comunidades bacterianas en forma de matriz glucoproteicas sobre superficies de ecosistemas acuáticos. En general, las bacterias pueden encontrarse ampliamente distribuidas en la naturaleza formando biopelículas. (Donlan y Costerton, 2002; Burmolle y col., 2006).

Las biopelículas bacterianas se forman cuando un microorganismo unicelular constituye junto con otros, una comunidad multicelular con capacidad de adherirse a una superficie sólida y producir una matriz de exopolisacárido (Mah y O'Toole, 2001). No obstante, los microorganismos antes de establecerse en una superficie determinada, se encuentran en una fase denominada planctónica, es decir, son microorganismos disgregados o libres que se trasladan de una superficie a otra, y su capacidad para adherirse a las mismas les permite permanecer en un ambiente que sea favorable para su desarrollo. (Watnick y Kolter, 2000).

A pesar de que en la naturaleza predominan las biopelículas integradas por varias especies bacterianas, únicamente aquellas constituidas por una sola especie son las más estudiadas por su importancia clínica. Un ejemplo de ello es el caso de las biopelículas formadas por *Staphylococcus aureus*. (Davey y O'Toole 2000).

S. aureus es un patógeno oportunista que causa infecciones leves, moderadas o graves en el hombre. En el ámbito hospitalario, este microorganismo puede colonizar con frecuencia las membranas mucosas y la piel del personal clínico, facilitando su transmisión hacia los pacientes durante su atención, lo que evidencia la capacidad que tiene esta bacteria para establecerse y luego diseminarse a otros hospederos. (Rongpharpi y col., 2013).

Por otra parte, *S. aureus* es una bacteria asociada frecuentemente a infecciones asociadas a la atención sanitaria (IAAS); en estos casos el tipo de contagio está relacionado con la utilización de dispositivos médicos invasivos (como catéteres intravasculares, válvulas cardíacas, prótesis articulares) en los centros asistenciales, donde *S. aureus* puede circular libremente en las diferentes áreas de servicios, principalmente en las salas de emergencias y en las unidades cuidados intensivos (UCI). (O'Toole y col., 2000; McCarthy y col., 2015).

Diversos estudios señalan que la capacidad de *S. aureus* para adherirse y formar biopelícula en los dispositivos médicos invasivos, así como el tejido lesionado luego de una cirugía, es un factor de virulencia importante de este patógeno. Asimismo, se ha descrito que la exposición a ciertas concentraciones de glucosa induce la formación de biopelícula en esta especie bacteriana (Raffa y col., 2005; Agarwal y Jain, 2011).

Por otra parte, las cepas de *S. aureus* formadoras de biopelículas pueden mostrar resistencia a los antimicrobianos, especialmente a la meticilina (McCarthy y col., 2015). En este contexto, se conoce que este tipo de resistencia en el ambiente hospitalario es un problema clínico importante, debido a que estos microorganismos muestran resistencia a los β -lactámicos, limitando así, las opciones terapéuticas en el tratamiento de procesos infecciosos causados por este patógeno (Uhlemann y col., 2014; Yildiz y col., 2014).

Las infecciones asociadas a las biopelículas por lo general son difíciles de tratar debido a que estas formas de crecimiento bacteriano protegen al *S. aureus* de la acción fagocítica de los anticuerpos del hospedero e incrementan la resistencia a los antimicrobianos, ya que disminuyen o no permiten la entrada de estos agentes hacia su interior, impidiendo que actúen en sus respectivos blancos bacterianos. Por lo tanto, este mecanismo de protección de las bacterias puede conferirles una resistencia a los antibióticos hasta mil veces mayor en comparación con los microorganismos

cuando se encuentran en fase planctónica. (Donlan, 2001; Stewart y Costerton, 2001).

La resistencia a los antibióticos y la capacidad de formar biopelícula contribuye al éxito de *S. aureus* como patógeno nosocomial. En este contexto, estudios recientes han reportado que la resistencia de *S. aureus* a la meticilina (SARM) y su exposición a concentraciones de glucosa, modula la expresión de importantes proteínas de superficies que intervienen en la formación de éste exopolisacárido, originando un fenotipo SARM formador de biopelícula (Rocchetto y col., 2008; Pozzi y col., 2012).

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Desde el punto de vista clínico-microbiológico, las cepas SARM productoras de biopelícula asociadas al personal clínico son de gran importancia, debido a que estos microorganismos son los responsables de procesos infecciosos relacionados con la utilización de dispositivos médicos en pacientes inmunocomprometidos (Pozzi y col., 2012). Con base a lo mencionado anteriormente se plantea lo siguiente:

¿Cuál será la frecuencia de la producción de biopelícula en *S. aureus* susceptible y resistente a la meticilina?

Justificación de la investigación

En Venezuela son escasas las investigaciones acerca de la formación de biopelícula en cepas SARM que colonizan al personal que ofrece asistencia sanitaria, y en general, se desconoce la relación entre la producción de este exopolisacárido y la resistencia a la meticilina. Por ello, no sólo es importante identificar las cepas formadoras de biopelícula, sino determinar también la susceptibilidad de este patógeno a este fármaco, con la finalidad de plantear medidas efectivas que disminuyan la colonización del personal clínico por cepas SARM que desarrollen exopolisacárido.

El estudio de la formación de biopelícula en *S. aureus* permitirá establecer su relación con la susceptibilidad a la meticilina. Por ello, se hace necesario determinar las cepas SARM e identificar los microorganismos que desarrollen biopelícula. De esta manera, la investigación permitirá aportar datos epidemiológicos locales importantes para la optimización de conductas en el control de infecciones por cepas SARM formadoras de biopelícula.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Comparar la producción de biopelícula en cepas de *Staphylococcus aureus* susceptibles y resistentes a la meticilina de una colección de aislados procedentes del personal clínico que labora en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes.

Objetivos Específicos

- Establecer la procedencia de las cepas de *S. aureus* de acuerdo al origen del aislamiento.
- Determinar la susceptibilidad a la meticilina en las cepas de *S. aureus* utilizando el método de microdilución en caldo.
- Estimar la producción de biopelícula en las cepas de *S. aureus* utilizando el método de formación en microplaca.
- Comparar la cantidad de biopelícula producida en las cepas de *S. aureus* según la susceptibilidad a la meticilina.
- Establecer la relación entre la cantidad de biopelícula producida en las cepas de *S. aureus* y la presencia o no de glucosa.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

S. aureus es la principal especie del género *Staphylococcus* y la más patógena, logrando colonizar y causar infecciones agudas en el hombre debido a un traumatismo o una cirugía, que al no ser tratadas se diseminan a tejidos circundantes vía hematógena. Los cuadros clínicos ocasionados por *S. aureus* abarcan desde simples afecciones de la piel hasta infecciones que comprometen la vida del paciente, tales como neumonías, septicemias, osteomielitis, endocarditis y meningitis entre otras. (Sabater y col., 2008).

Las infecciones ocasionadas por *S. aureus* constituyen un problema relevante en las áreas intrahospitalarias debido al surgimiento y diseminación de cepas resistentes a los antimicrobianos, principalmente a la meticilina. Asimismo, los microorganismos resistentes a este fármaco, muestran también resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos utilizados ampliamente como tratamiento de primera línea de procesos infecciosos originados por este patógeno, limitando así las opciones terapéuticas (Sabet y col., 2012; Rongpharpi y col., 2013). En la actualidad, se estima que, en Europa, Estados Unidos, Japón y Latinoamérica, aproximadamente el 40% de los *S. aureus* aislados son resistentes a la meticilina. (Armas y col., 2015).

En el ambiente hospitalario, el número de portadores de *S. aureus* se distribuye de manera desigual según las áreas de hospitalización, encontrándose con mayor frecuencia en las salas de emergencias y en las unidades de cuidados intensivos. De igual forma, el personal médico que ofrece asistencia sanitaria es también portador potencial de este patógeno. (Shibabaw y col., 2013).

En este contexto, se ha descrito que el estado de portador de *S. aureus* puede tener un rol importante en la epidemiología y patogenia de la infección, debido a que el porcentaje de portadores en el personal clínico es más elevado (entre 70 y 90%) con respecto a la población general (33%). (Eveillard y col., 2014).

En Venezuela, la frecuencia del estado de portador nasal de *S. aureus* (SARM) en el personal de salud oscila entre el 18 y 45% (Castellano y col., 2005). Asimismo, para el año 1999 Rodríguez y cols., reportaron una elevada presencia de este microorganismo (32%) en fosas nasales del personal médico del Hospital Militar Dr. Carlos Arvelo, Caracas. Igualmente, Castellano y cols. (2005) describieron que la presencia de portadores de *S.aureus* y SARM en el personal de enfermería del Hospital Universitario de Maracaibo fueron muy similares (18,25% y 18,87% respectivamente). A nivel local, Alviarez y cols. (2005) reportaron que la frecuencia de portadores nasales de SARM en el personal hospitalario que labora en la unidad de alto riesgo neonatal del Hospital Universitario de los Andes fue de 31,58%.

Por otra parte, en los últimos años varios estudios han demostrado que el personal clínico portador de *S. aureus* no sólo facilita la transmisión del microorganismo hacia el paciente susceptible debido a la utilización de dispositivos médicos invasivos, sino también a la capacidad de estas bacterias de colonizar y desarrollar biopelícula rápidamente sobre la superficie del biomaterial y el tejido circundante a éste. Por ello, la formación de biopelícula, junto con la resistencia a los antimicrobianos (meticilina) son factores de virulencia importantes para el establecimiento de este microorganismo como patógeno intrahospitalario. (Petrelli y col., 2008; Garza-González y col., 2010; Kaplan, 2011).

La resistencia de *S. aureus* a la meticilina se debe a que lleva consigo el casett cromosomal *mecA* (SCC*mec*), el cual codifica la síntesis de la proteína PBP2a (confiere resistencia a los β -lactámicos) (Uhlemann y col., 2014). En este contexto, estudios recientes han reportado que la formación de biopelícula en cepas SARM

obedece a la expresión de proteínas ligadoras a la fibronectina (FnBP) y a la autolisina AtlA, afirmando que la síntesis del exopolisacárido dependiera de la susceptibilidad de la bacteria a la meticilina (Pozzi y col., 2012; McCarty y col., 2015).

Generalidades de los estafilococos

El género está conformado por cocos grampositivos que desarrollan un patrón similar a un racimo de uvas cuando se observa al microscopio de luz; sin embargo, los microorganismos provenientes de muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares o en cadenas cortas. La mayoría de los estafilococos presentan un diámetro entre 0,5 y 1µm y son anaerobios facultativos, inmóviles con la capacidad de crecer en medios de cultivo con una elevada concentración de cloruro de sodio (NaCl) y a temperaturas entre 18 y 40°C. (Murray y col., 2009).

En la actualidad, el género *Staphylococcus* comprende 47 especies y 23 subespecies, donde *Staphylococcus aureus* es la especie asociada con mayor frecuencia a infecciones de piel, tejidos blandos e infecciones oportunistas. Este microorganismo se desarrolla en medios de cultivos convencionales por un periodo de incubación de 24 horas, mostrando colonias redondeadas, de coloración blanca a amarilla. El color amarillo clásico de las colonias de *S. aureus* se debe a la producción de carotenoides; sin embargo, se presentan frecuentemente variantes no pigmentadas en muchas cepas. En medios suplementados con sangre se observa β-hemólisis; además estos cocos grampositivos son, catalasa y coagulasa positivos. (Winn y col., 2013; Becker y col., 2014).

Importancia clínica y epidemiológica de *Staphylococcus aureus*

La incidencia de *S. aureus* como agente causal de infecciones oportunistas se relaciona con el hecho de que esta especie bacteriana forma parte del microbiota habitual del hombre, ya que está normalmente presente en la nasofaringe y en la piel. (Sabater y col., 2008) En el ambiente hospitalario, el número de portadores de *S. aureus* se distribuye según las áreas de hospitalización. De igual forma, el personal médico que labora en los centros asistenciales es también portador potencial no sólo de *S. aureus* sino también de otros microorganismos. Así mismo el porcentaje de colonización de bacterias resistentes en un paciente aumenta al prolongar su estadía en el hospital. (Mongkolrattanothai y col., 2004; Rongpharpi y col., 2013).

En este último caso, las cepas SARM están relacionadas con la colonización de la nasofaringe, la contaminación de superficies ambientales, la diseminación a través de las manos del personal hospitalario, así como con el uso incorrecto e indiscriminado de antimicrobianos y la ausencia de programas de vigilancia de resistencia a los mismos (Aiello y col., 2003).

Desde el punto de vista clínico, *Staphylococcus aureus*, es un patógeno importante que presenta de resistencia a la mayoría de los antibióticos principalmente a la meticilina, afectando a pacientes hospitalizados. Este microorganismo presenta una proteína de unión a la penicilina, la PBP2a, sintetizada por el gen *mecA*, el cual se ubica dentro un elemento genético móvil llamado cassette cromosómico estafilocócico (SCC*mec*) (Castellano y col 2014).

El SCC*mec*, también conocido como isla genómica o de resistencia a los antibióticos, está compuesto por los siguientes componentes esenciales: el complejo del gen *mec* y el complejo del gen *ccr*. El complejo del gen *mec* comprende a su vez el propio gen *mecA* y a sus genes reguladores, *mecI* (un represor) y *mecRI* (un sensor inductor), así como una secuencia de inserción IS431*mec*, el complejo *ccr* contiene

los genes caseína recombinasa cromosómica (*ccrA*, *ccrB* y *ccrC*), los cuales codifican las integrasas sitio específicas, que catalizan la integración o escisión de todo el *SCCmec* en el locus *orfX* (en su extremo 3') del genoma estafilocócico. (Becker y col 2014) (Figura 1).

Por ello, el cassette cromosomal *SCCmec* juega un rol importante en la transferencia horizontal del gen *mecA* entre diferentes especies del género *Staphylococcus* (Bouchami y col., 2011; Ruppé y col., 2009; Garza- González y col., 2010). En la actualidad, se han descritos 11 tipos de elementos *SCCmec* que confieren resistencia a la oxacilina, siendo los ECN donde se han reportado la mayor diversidad de estos cassettes (Becker y col. 2014).

Asimismo, el *SCCmec* es parte de una familia única de SCC con una diversidad estructural cada vez más reconocida. Además de los elementos del *SCCmec*, caracterizados por la posesión de complejos de genes *mec* y *ccr*, existen otros elementos diversos que carecen de uno o de ambos complejos. Entre los elementos de SCC, se incluyen sus pseudoelementos, frecuentemente estos portan genes de resistencia a otros antibióticos, principalmente integrados en transposones y plásmidos (por ejemplo, genes que codifican resistencia a y eritromicina, tetraciclina, espectinomicina y ácido fusídico). Además, también presenta, los genes que median la resistencia a metaloides y metales de transición con propiedades tóxicas y/o bactericidas, como arsénico, cadmio, cobre y mercurio, los cuales se han encontrado con frecuencia en los elementos del SCC de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y otros. (Becker y col 2014).

La resistencia a los β - lactámicos no es solo mediada por el gen *mecA*, también se puede producir por otros mecanismos de resistencia, mediante una modificación en la expresión genética que puede ser cromosómica, plásmidica o por transposones; entre los mecanismos de resistencia presentes en *S. aureus* están los siguientes:

1. Hiperproducción de betalactamasas, son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico, por lo que inutilizan su actividad antimicrobiana, su mecanismo de acción es la hiperproducción de penicilinas estafilocócica mediada por plásmidos, estas cepas producen altas cantidades de enzima, haciendo que antibióticos como la oxacilina y la meticilina que fueron creados para resistir a la acción hidrolítica de la penicilinas, sean degradados de manera lenta. (Chambers H., 1999).
2. Modificación de las Proteínas de unión a la Penicilina (PBPs), consiste en una modificación mínima en las Proteínas de unión a Penicilinas (PBPs) 1, 2 y 4 de peso molecular normal; pero con una afinidad baja por los antibióticos β -lactámicos. Estas cepas no producen β -lac- tamasas y presentan bajos niveles de resistencia a meticilina, ello puede ser debido a la hiperexpresión de alguna de estas PBPs o la consecuencia de mutaciones genéticas que alteren la afinidad de la proteína final por el antibiótico. (Hanssen y col., 2006).
3. Resistencia a betalactámicos por expresión de una proteína de unión a penicilina adicional, En los estafilococos, incluidas las especies de ECN, la expresión de una proteína de unión a la penicilina adicional (PBP), denominada PBP2a o (PBP2'), conduce a la resistencia completa a todos los betalactámicos (penicilinas, la mayoría de las cefalosporinas y carbapenémicos), con la única excepción de cefalosporinas recientemente introducidas con actividad SARM, tales como ceftobiprol y ceftarolina. La razón de esto es que la PBP2a tiene afinidades de unión considerablemente reducidas para los antibióticos β - lactámicos, a diferencia del conjunto intrínseco de PBPs estafilocócicas (PBP1 a PBP4). (Becker y col 2014).

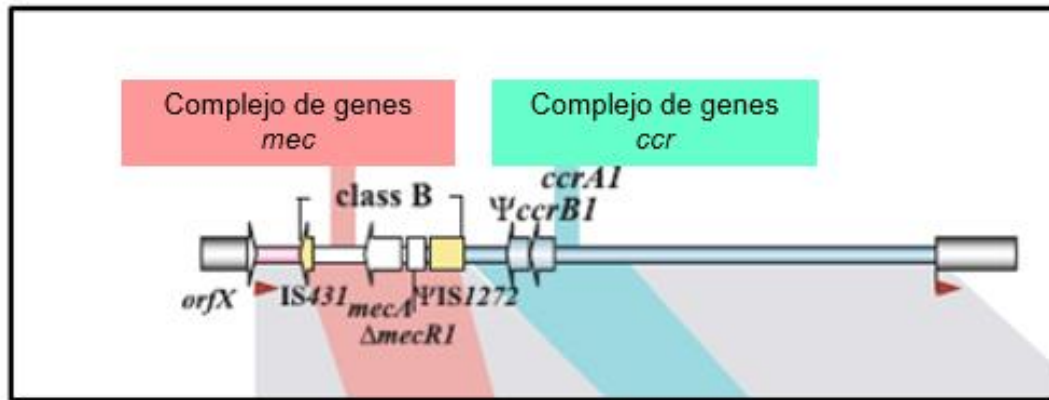


Figura 1. Representación del cassette cromosomal estafilocócico *mec* (SCC*mec*)
Tomado de American Society for Microbiology (2009)

Las infecciones asociadas a la atención sanitaria originadas por *S. aureus* resistentes a los β -lactámicos constituyen una razón de alarma debido a la capacidad que tiene este microorganismo para mantenerse y diseminarse en el ambiente hospitalario, conduciendo con frecuencia a brotes nosocomiales debido a la aparición de cepas meticilinoresistentes (SARM) (Shibabaw y col., 2013; Uhlemann y col., 2014).

Como patógeno nosocomial, la mayor incidencia de infecciones por *S. aureus* se observa en piel y el tracto respiratorio, pero también puede afectar otras áreas del cuerpo como el sistema nervioso central (SNC) y las heridas quirúrgicas. Uno de los factores de riesgo que permite la entrada de *S. aureus* en el hospedero, es la utilización de dispositivos médicos invasivos (catéteres intravasculares, válvulas cardíacas y prótesis, entre otras), los cuales pueden ser colonizados por este microorganismo y posteriormente desarrollar biopelículas. Esto trae como consecuencia la génesis de infecciones crónicas o persistentes, en cuyo caso el único tratamiento para eliminar el foco infeccioso del paciente es a través de la remoción del dispositivo o la debridación del tejido afectado (Vergara-Irigaray y col., 2009; Taj y col., 2012).

La biopelícula es un campo de protección para las bacterias que la conforman, debido a que evita la fagocitosis por los macrófagos y de los neutrófilos del sistema inmune del hospedero. Los microorganismos bacterianos al adherirse a la superficie de un dispositivo médico invasivo o tejido vivo, liberan antígenos que activan a los fagocitos, pero la matriz de exopolisacárido los protege de su acción (Barreti y col, 2014).

Formación de biopelícula por *Staphylococcus aureus*

Una biopelícula es un depósito no estructurado de células y de glucocáliz acumulado, compuesto por exopolisacáridos y una compleja comunidad de bacterias, donde se observa un ensamblado de microorganismos dentro de una matriz con la capacidad de adherirse a biomateriales, o tejidos dañados del hospedero, favoreciendo de esta manera su colonización (Figura 2) (Donlan, 2002).

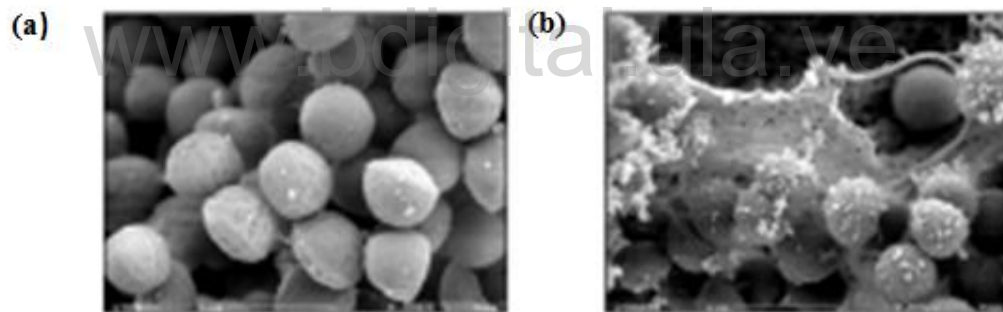


Figura 2. Microfotografías electrónicas en las que se muestran las células bacterianas de *S. aureus* (a) en forma planctónica (b) Formando biopelícula.

Tomado de Vergara- Irigaray (2009)

El proceso de adhesión bacteriana a una superficie para la formación de una biopelícula va a depender de la composición de la misma y de factores ambientales (pH del medio). Como un mecanismo simplificado, la adhesión de *S. aureus* a una superficie inanimada, tejidos vivos o desvitalizados ocurre a través de unidades moleculares

específicas como las proteínas de superficie (Arciola y col., 2012; Van Acker y col. 2014;).

La formación de biopelícula por *S. aureus* ocurre en tres fases, los cuales se describen a continuación:

1. Adhesión inicial: los microorganismos planctónicos se adhieren inicialmente a los tejidos mediante el reconocimiento célula-célula, a través de proteínas de superficie ubicadas en la pared celular de la bacteria denominadas MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), las cuales intervienen en la unión de los microorganismos a la matriz extracelular del hospedero (fibrinógeno, fibronectina, colágeno, vitronectina o laminina). Por otra parte, la molécula AtIA promueve la unión de la bacteria directamente a superficies hidrofóbicas (catéteres). De esta manera los *S. aureus* se adhieren al biomaterial sin necesidad de las proteínas extracelulares del hospedador originando la adhesión inicial y posteriormente continuar con la fase de acumulación o agregación (Figura 3) (Cue y col., 2012; Nasr y col., 2012; Cui y col., 2013).

2. Acumulación o agregación bacteriana: en esta fase *S. aureus* inicia la agregación bacteriana que consiste en la fijación de los microorganismos a la superficie biótica o abiótica mediante la unión célula-célula y la posterior producción del polisacárido de adhesión intercelular o PIA conocido por su nombre en inglés (*polysaccharide intercelular adhesión*), originando una biopelícula madura. La expresión del PIA en *S. aureus* es un factor importante en la acumulación de la biopelícula, sin embargo, se han descrito cepas de origen clínico que no producen polisacárido intercelular, debido a que expresan otra adhesina alterna denominada proteína Aap, sustituyendo funcionalmente al PIA (Figura 3) (O’Gara, 2007; Rhode y col., 2007).

En *S. aureus*, el principal componente de la biopelícula es el polisacárido intercelular PIA también conocido como poli-*N*-acetyl-glucosamina (PNAG). El PIA presenta características catiónicas (carga +) consiguiendo promover interacciones

intercelulares debido a las características aniónicas (carga -) de la superficie de las células bacterianas. (Cue y col., 2012).

3. Desprendimiento de la biopelícula: Luego de la maduración del exopolisacárido, los microorganismos comienzan a desprenderse del biomaterial o tejido volviendo al estado planctónico. La disociación de la biopelícula es considerado como un mecanismo de diseminación bacteriana en el hospedero infectado, iniciado por la acumulación de residuos dentro de la misma, variaciones en el pH, agotamiento de los nutrientes, así como a través de la actividad enzimática extracelular de modulinas fenol solubles, la cual funcionan como surfactantes que destruyen las interacciones célula-célula dentro del exopolisacárido (Figura 3) (O’Gara, 2007; Becker, 2014).

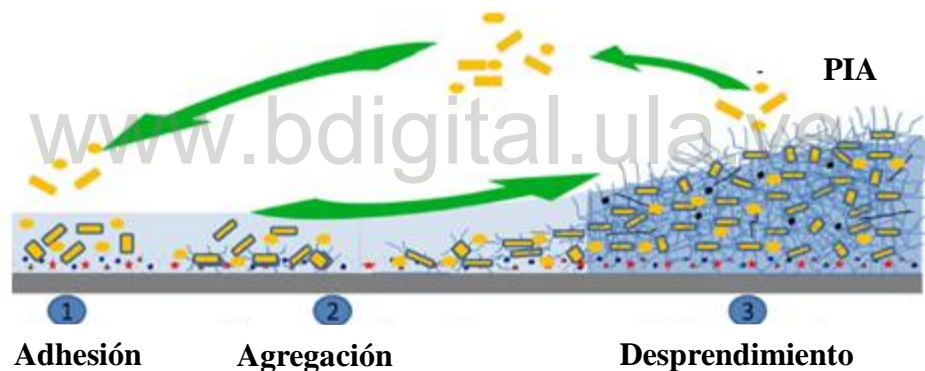


Figura. 3 Ilustración que muestra las fases de la formación de biopelículas tomado de Abdallah (2014)

Producción del polisacárido intercelular PIA por *Staphylococcus aureus*

El polisacárido intercelular en *S. aureus* es sintetizado por cuatro proteínas (IcaA, IcaD, IcaB e IcaC), codificadas por el operón *icaADBC*. Las moléculas transmembranales IcaA e IcaD sintetizan a partir del UDP-N-acetilglucosamina presente en el citoplasma de la bacteria un oligómero β -1,6-N-acetilglucosamina de 20 residuos de longitud. Luego IcaC (otra proteína transmembranal) procesa y

transforma el oligómero recién formado en otro β -1,6-*N*-acetilglucosamina de 130 residuos, el cual es secretado a través de la membrana celular. Posteriormente, la molécula IcaB presente en la superficie celular de *S. aureus* deacetila al PIA produciendo un polímero aniónico, favoreciendo así las propiedades adhesivas del polisacárido intercelular con superficies de naturaleza catiónica. (Figura 4) (Longauerova y col., 2006; Rhode y col., 2007; Cue y col., 2012;).

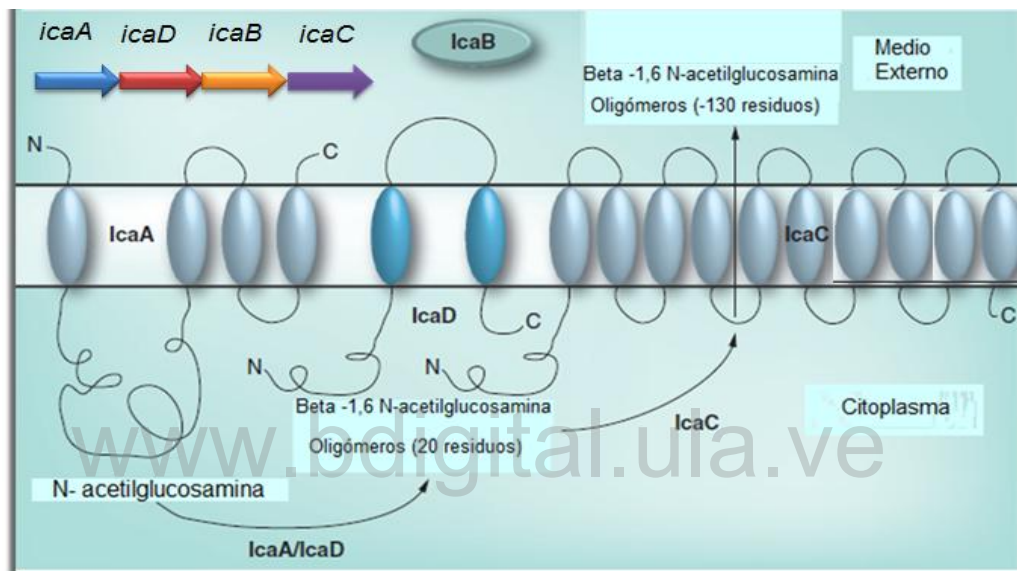


Figura. 4 Esquema que muestra la producción de polisacárido intercelular PIA
Lavery y col. (2013)

La síntesis del PIA en estafilococos es regulado principalmente a nivel transcripcional, es decir a través de la activación o represión de genes específicos que codifican la producción de pequeñas moléculas que regulan la producción del polisacárido intercelular y otras funciones fisiológicas (virulencia), en respuesta a condiciones ambientales como: presencia de elevadas cantidades de glucosa, variaciones de temperaturas y osmolaridad, anaerobiosis y la exposición de los microorganismos a concentraciones sub-inhibitorias de antibióticos (tetraciclina y aminoglucósidos) que inducen la producción de PIA. (de Silva y col., 2002; Cerca y col, 2005).

En este contexto, diferentes trabajos señalan que las infecciones nosocomiales causadas por *S. aureus* formadoras de biopelícula pueden estar asociadas a cepas resistentes a la meticilina, antimicrobiano β -lactámico utilizado como tratamiento de elección para las infecciones ocasionadas por el género *Staphylococcus*. (Archer y col., 2011).

En *S. aureus*, diferentes estudios han demostrado que la matriz de exopolisacárido que forma una biopelícula retarda la difusión de fármacos como la meticilina, la cefotaxima y la vancomicina (Archer y col., 2011; Lebeaux y col., 2014). Asimismo, es importante destacar que las bacterias dentro de una biopelícula son más resistentes a los antimicrobianos que aquellas que están libres o en suspensión. En casos extremos, la cantidad de antibiótico necesaria para alcanzar las concentraciones bactericidas mínimas para los microorganismos sésiles debe ser cien veces más alta que para los microorganismos en fase planctónica. (Donlan, 2001).

Por otra parte, en *S. aureus* la biopelícula facilita la diseminación de información genética entre los microorganismos que la conforman, debido a que establecen un ambiente apto para el intercambio de material genético móvil. Esta condición es favorecida porque las bacterias cohabitan en microcolonias, promoviendo de esta manera la acumulación de determinantes de resistencia como el gen *mecA* y otros factores de virulencia (Donlan, 2002; Otto, 2012).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, en el ámbito clínico, la colonización del personal médico por cepas SARM formadoras de biopelícula, facilitaría la transmisión cruzada de los microorganismos hacia el hospedero susceptible, lo que traería como consecuencia la generación de infecciones persistentes asociadas a la atención sanitaria difíciles de abordar, debido a la resistencia a los antimicrobianos y a los componentes del sistema inmune. Por ello, no sólo es importante identificar a las cepas de ECN formadoras de biopelícula, sino también determinar la susceptibilidad a la meticilina.

CAPITULO III

MARCO METODOLOGICO

Tipo de Investigación

El tipo de investigación debe tener relación con el problema que se plantea, donde se resalta lo que se quiere saber, de esta manera se definirá que se desea obtener durante el proceso de investigación (Hurtado, 2010). En este contexto, nosotros nos planteamos estudiar la incidencia de la producción de biopelícula en *S. aureus* susceptible y resistente a la meticilina. Por lo tanto, haciendo referencia a lo expuesto anteriormente, este trabajo pretende realizar un estudio descriptivo, definido por Hurtado (2010) como “la descripción o caracterización de un evento de estudio dentro de un contexto particular, identificando las características del evento estudiado”. Así mismo esta investigación realizará un análisis comparativo, en base a las diferencias y semejanzas que pudieran existir entre dos o más grupos en un mismo evento.

Diseño de Investigación

Este tipo de investigación no es de carácter experimental; ya que para Sabino (1992) define el diseño de investigación experimental, como aquel experimento en el cual se somete el objeto de estudio a la influencia de ciertas variables, en condiciones controladas y conocidas por el investigador, En efecto el análisis precedente será de tipo prospectivo, en este tipo de estudio toda la información se recolecta de acuerdo con los criterios del investigador, para fines específicos de la investigación y después de planeada la misma; y por otra parte es de tipo transversal,

el cual consiste en la toma de datos en un momento único, mediante los criterios de uno o más grupos de unidades, sin pretender evaluar la evolución de esas unidades donde el propósito será describir variables y analizar su incidencia e interrelación en un momento determinado.

Unidad de Análisis

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ultraestructural, del Centro De Microscopía Electrónica Dr. Ernesto Palacios Prú, Universidad de Los Andes, y en el Laboratorio de Microbiología del IPAS-ME, Mérida – Venezuela.

Cepas bacterianas.

Se analizaron un total de 23 cepas de *S. aureus* pertenecientes a la colección de microorganismo recolectadas por Sanguinetti y col... Los microorganismos descritos anteriormente fueron recuperados en un sólo evento de recolección (febrero del año 2013) a partir de manos y fosa nasal del personal clínico de la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Tabla 1. Descripción de las cepas de *S. aureus* de acuerdo al origen del aislamiento

<i>S. aureus</i> (código)	Procedencia	numero
2FNB,6FN,7FN,19FN,19FNB,25FN,35FN,41FN,49FNA 52FNA,52FNB,54FN1,54FN2,65FN	Fosa Nasal	14
2M,3MA,3MB,8M,12M,15M,20M,23M,48M	Manos	9
Cepas de Referencia		
<i>S. aureus</i> CVCM 721	CVCM	01
<i>S. epidermidis</i> CVCM 2175	CVCM	01

Para reactivar y lograr la estabilidad metabólica de las cepas se procedió a cultivarlas en 1 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI), colocándolas en baño de María con agitación por 24 horas. En seguida, se inoculó cada cepa en agar Sangre al 5% (AS Oxoid) por agotamiento y se incubó en anaerobiosis de 24-72 horas. Todas las temperaturas de los cultivos fueron a 37 °C.

Posteriormente, se comprobó el crecimiento bacteriano y la obtención de colonias aisladas con la finalidad de realizar la coloración de Gram y verificar la morfología celular bacteriana (cocos grampositivos dispuestos en tétradas o racimos). Luego a la confirmación de estas características, se efectuó la prueba de la Catalasa para constatar su pureza colonial. Por último, se verificó la pureza de los cultivos inoculando las cepas por agotamiento en agar Manitol Salado (AMS Oxoid) y se incubaron en aerobiosis a 37 °C por 24 horas. Todas las pruebas que se describirán a continuación fueron realizadas a partir de cultivos frescos en agar Tripticasa Soya (ATS Oxoid) no mayores a 24 horas de incubación.

Para los ensayos de este trabajo se utilizaron cepas controles del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM): *S. aureus* CVCM 721 y *S. epidermidis* CVCM 2175. La cepa CVCM 721 *S. aureus* es un microorganismo derivado del *S. aureus* ATCC 6538 formador de biopelícula (control positivo) acorde a lo reportado por Vázquez y col. (2013). Mientras la cepa *S. epidermidis* CVCM 2175 es procedente del *S. epidermidis* ATCC 12228 no formador de biopelícula (control negativo) según trabajo de Dice y col. (2009).

Determinación de la susceptibilidad a la meticilina

A las cepas *S. aureus* se les determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) por micro dilución en caldo a oxacilina y cefoxitin, empleando el equipo automatizado VITEK 2 (bioMérieux) y la tarjeta VITEK 2 AST-GP71 para (cocos grampositivos) que contiene diluciones estandarizadas de los antimicrobianos en 64 pozos y un pozo sin fármaco como control positivo. La tarjeta VITEK 2 AST-GP71 contiene cefoxitin para la detección de las cepas SARM. (*S. aureus* resistentes a la meticilina)

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron a partir de cultivos frescos en agar Sangre al 5% (AS Oxoid), luego se preparó un inóculo bacteriano en de 2 ml de solución salina estéril (al 0,45-0,5%), al cual se transfirieron con un hisopo estéril una cantidad suficiente de cada cepa, ajustándolos al patrón de turbidez 0,5 de McFarland (suspensión bacteriana de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Esta dilución final se utilizó para el llenado de la tarjeta de VITEK 2 AST-GP71 y luego se introdujo en el inyector/ lector/incubador por un periodo de 8 horas. El equipo VITEK® 2 evalúa cada pozo por separado, determinando así el desarrollo bacteriano una vez por hora. Al finalizar el tiempo de incubación se obtuvieron los valores de las CIM de oxacilina y cefoxitin para cada cepa (Anexo 1), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y los puntos de corte del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Se estableció como cepas SARM o meticilinorresistentes a los aislados que mostraron crecimiento en concentraciones de oxacilina $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ y cefoxitin \geq

8 µg/mL respectivamente (Anexo 1), Para los ensayos de susceptibilidad se utilizó como control la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Determinación de la formación de biopelículas

Preparación del inóculo bacteriano

Para la preparación de los inóculos bacterianos se transfirió con un asa bacteriológica de 3 a 4 colonias de cada cepa a un tubo con 3 ml de caldo TS y se comparó con el patrón 0,5 de McFarland. Posteriormente, con la finalidad de estandarizar la misma concentración celular en todos los inóculos bacterianos, se determinaron las densidades ópticas (DO) alcanzadas por cada una de las cepas. Para ello, se colocaron 100 µL de cada uno de los inóculos en un pozo de una microplaca (BD, Falcon de 96 pozos) y se llevó a un espectrofotómetro (Termo) para su lectura a una longitud de onda de 620 nm. Las DO alcanzadas en las 23 cepas estuvieron entre 0,2 a 0,8 preguntar. A partir de estos resultados, se estableció que se utilizaría el inóculo con DO de 0,2 para el estudio de la formación de biopelículas. Todas las cepas fueron ajustadas a este inóculo en caldo TS (Anexo 2).

Formación y visualización de la biopelícula

Los inóculos bacterianos obtenidos en el procedimiento anterior fueron utilizados para el estudio de la formación de biopelícula, siguiendo el procedimiento descrito por O'Toole y col. (2000) y Barreto y col. (2009). Se agregaron 150 µL del inóculo en cada pozo de una placa de poliestireno y luego, se incubó a 37 °C por un período de 24 horas. Posteriormente, se corroboró el crecimiento bacteriano en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm.

Para visualizar la formación de la biopelícula se removieron las células planctónicas, descartando el medio de cultivo por inmersión de la placa de poliestireno en una bandeja con agua destilada. El exceso de agua se eliminó sacudiendo suavemente la placa y dejándola secar en forma invertida sobre un papel

absorbente a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, las células sésiles (adheridas a las paredes del pozo) fueron teñidas con 200 μL del colorante cristalvioleta al 1 % por 20 minutos a temperatura ambiente (Anexo 4). Transcurrido este tiempo el exceso de colorante fue removido lavando los pozos 3 veces por inmersión en agua destilada. La formación firme de un substrato o botón adherido al fondo del pozo fue considerada como una prueba positiva para la producción de biopelícula (Anexo 5). Asimismo, en este trabajo se estableció que una cepa se consideraba positiva para la formación de biopelícula cuando su DO presentase una lectura cuatro veces mayor a la DO del pozo control o sin bacteria (blanco), reportado por Soto y col., (2006), es decir que el punto de corte es el resultado de la DO del pozo control multiplicado por cuatro, como se muestra en la fórmula siguiente:

$$\text{Punto de corte formación de biopelícula} = \text{DO del pozo control o blanco} \times 4$$

Para la producción de biopelícula se realizaron tres experimentos independientes, en cada uno de ellos se obtuvieron tres lecturas de los pozos control y con inóculos bacterianos, los cuales se promediaron. Posteriormente, en este trabajo se estableció que la cantidad de biopelícula formada es la proporción en DO por encima del punto de corte:

$$\text{Cantidad de biopelícula formada} \quad \text{N}^{\circ} \text{ de veces} = \frac{\text{DO en el pozo evaluado}}{\text{Punto de corte}}$$

CAPITULO IV

RESULTADOS

Procedencia de las cepas de *S. aureus* de acuerdo al origen del aislamiento.

En el presente trabajo se analizaron 23 aislados de *S. aureus* procedentes del personal clínico que labora en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal del IAHULA, Mérida-Venezuela. La frecuencia de cepas procedentes de fosa nasal se ubicó en 60,9% (14/23), mientras en manos fue de 39,1% (9/23) respectivamente (Figura 5).

Perfil de susceptibilidad a la meticilina.

Las pruebas de susceptibilidad de las cepas de *S. aureus* a la meticilina demostraron que la resistencia a este antimicrobiano se ubicó en 52,2% (12/23), mientras que el 47,8% (11/23) de los aislados resultaron susceptibles (Figura 6).

Producción de biopelícula en *Staphylococcus aureus*.

La producción de biopelícula se observó en el 30,4% (7/23) de las cepas de *S. aureus*, mientras el 69,6% (16/23) de los aislados no mostraron este fenotipo (Figura 7)

Comparación entre la producción de biopelícula y la resistencia a la meticilina.

Al comparar la producción de biopelícula y la susceptibilidad a la meticilina se observó que las cantidades de exopolisacárido desarrolladas en las cepas susceptibles (3) mostraron leves variaciones con respecto a los aislados meticilinoresistentes (4) (entre 1,2 y 1,9 veces), a excepción de la cepa SARM 15M que produjo una elevada cantidad de biopelícula de 4,4 veces sobre el punto de corte (DO del blanco x 4). (Figura 8). No se encontró relación estadística entre la producción de biopelícula y la susceptibilidad a la meticilina ($p \geq 0,05$).

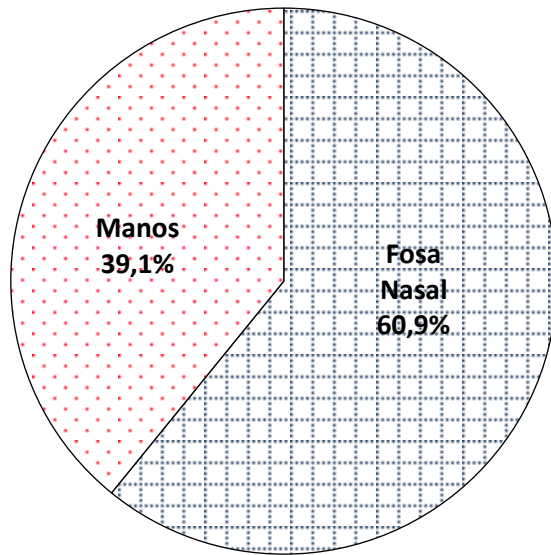


Figura 5. Distribución de las cepas de *S. aureus* de acuerdo a la procedencia del aislamiento.

www.bdigital.ula.ve

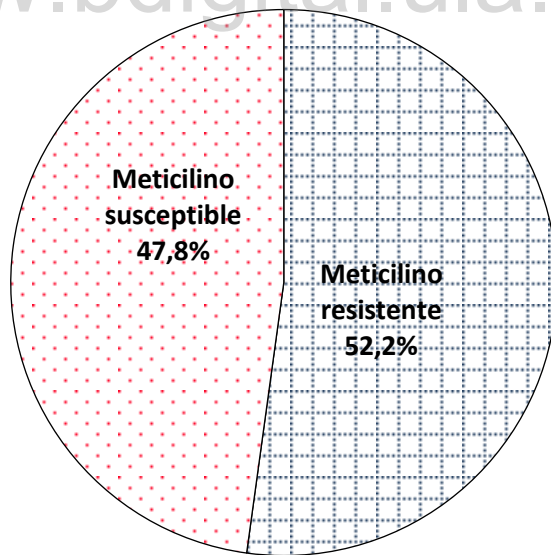


Figura 6. Distribución de las cepas de *S. aureus* según la susceptibilidad a la meticilina.

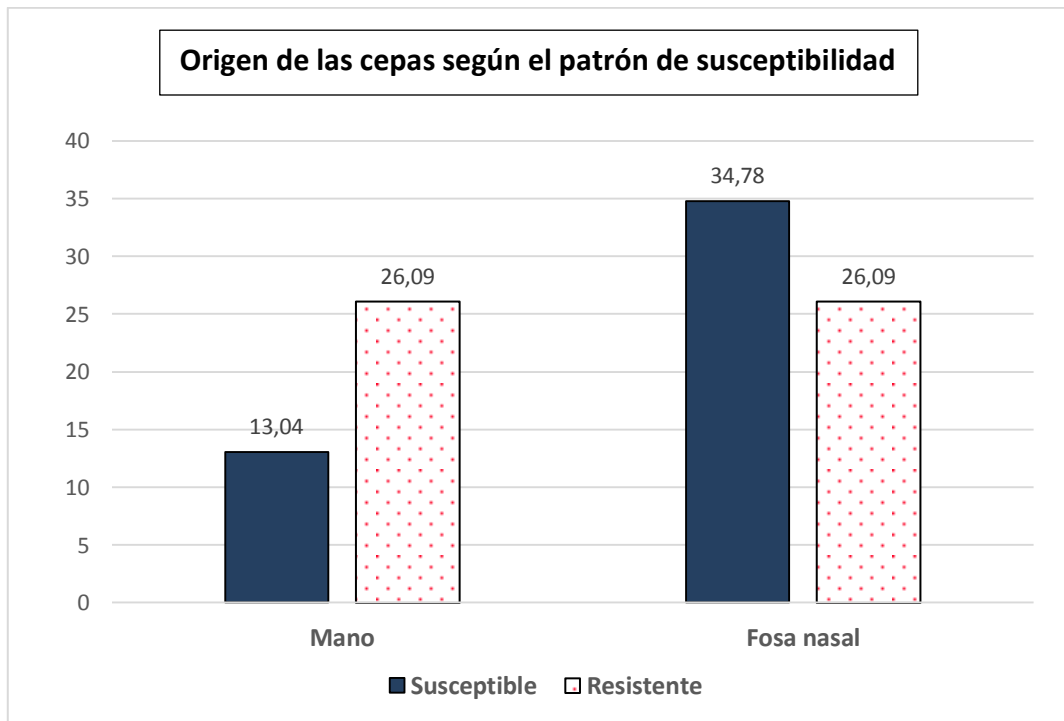


Figura 7. Distribución de las cepas de acuerdo al origen de procedencia y perfil de susceptibilidad

www.bdigital.ula.ve

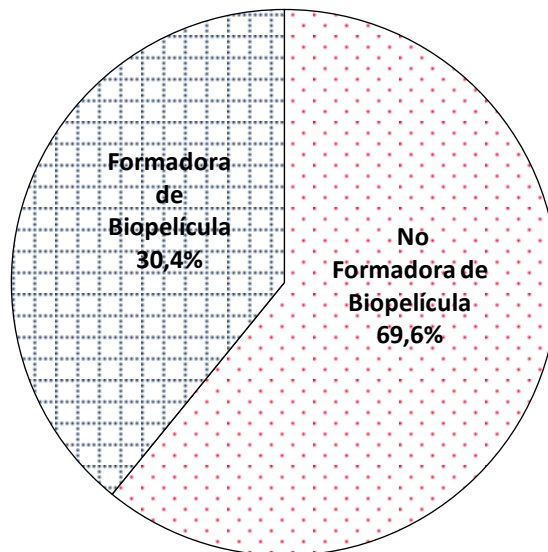


Figura 8. Distribución de las cepas de *S. aureus* de acuerdo a la producción de biopelícula.

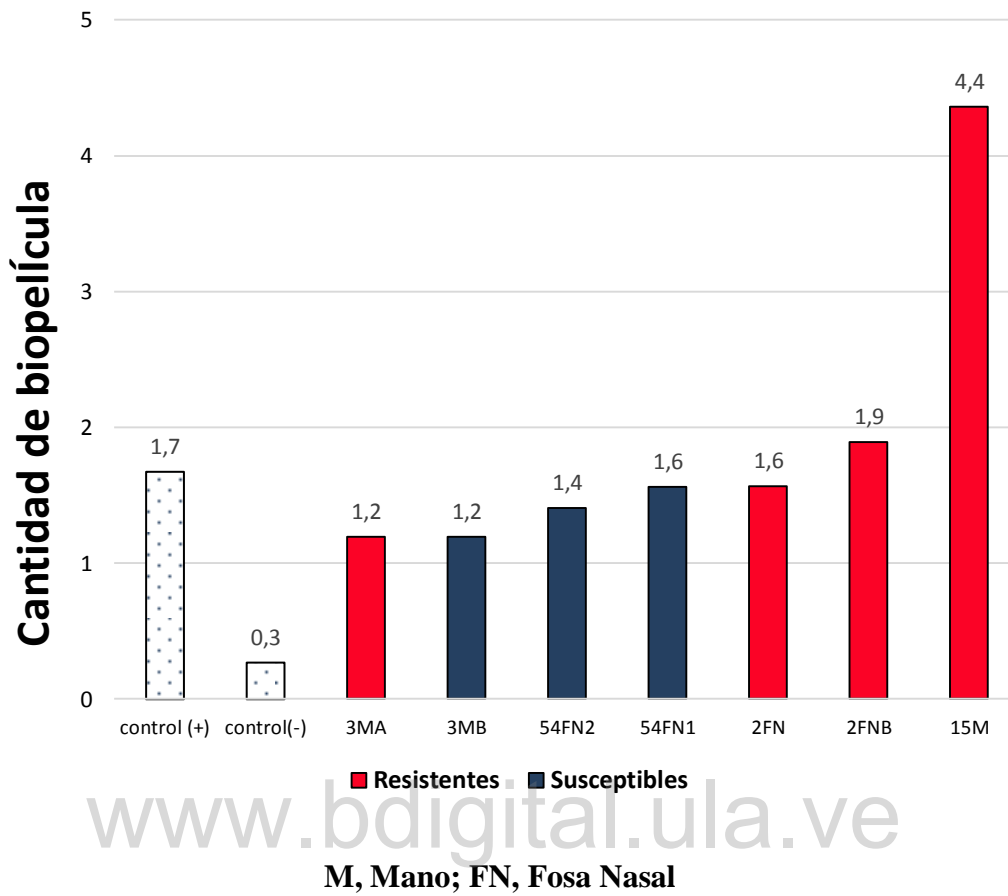
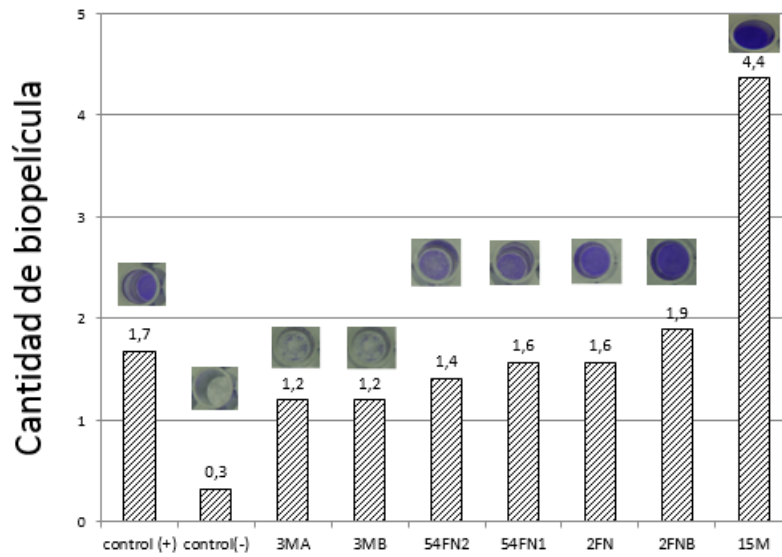


Figura 9. Distribución de las cepas de *S. aureus* de acuerdo a la cantidad de biopelícula producida y la susceptibilidad a la meticilina.

Relación entre la producción de biopelícula y la presencia o no de glucosa.

Los aislados identificados como formadores de biopelícula en ausencia de glucosa exhibieron cantidades máximas de exopolisacárido entre 1,2 y 4,4 veces sobre el punto de corte (DO del blanco x 4). La cepa 15M mostró una elevada proporción de biopelícula en comparación con el punto de corte (4,4 veces) y la cepa control (+) (2,7veces) (Figura 9). Por otra parte, al determinar la producción de biopelícula en presencia de glucosa, las cantidades máximas de exopolisacárido observadas estuvieron entre 1,3 y 3,1 veces sobre el punto de corte (Figura 10).

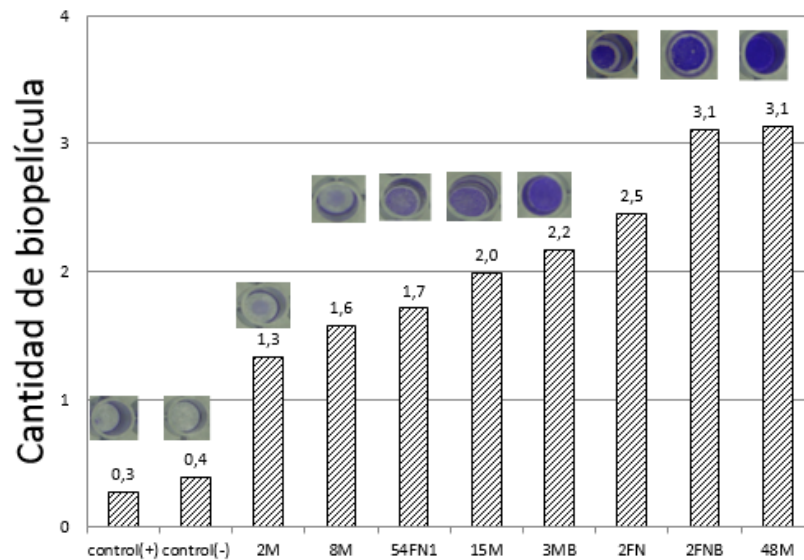
Al comparar el desarrollo de biopelícula bajo las dos condiciones, se observó que la cantidad de exopolisacárido en las cepas 3MB (Sin glucosa: **1,2** versus Con glucosa: **2,2**); 54FN (Sin glucosa: **1,6** versus Con glucosa: **1,7**); 2FN (Sin glucosa: **1,6** versus Con glucosa: **2,5**); 2FNB (Sin glucosa: **1,9** versus Con glucosa: **3,1**) fueron más elevadas en presencia de glucosa. Sin embargo, la proporción de biopelícula expresada por la cepa 15M disminuyó bajo la misma condición (Sin glucosa: **4,4** versus Con glucosa: **2,0**). Los aislados 3MA (**1,2**) y 54FN2 (**1,4**) sólo formaron biopelícula en ausencia de glucosa, mientras las cepas 2M (**1,3**), 8M (**1,6**) y 48M (**3,1**) hicieron lo mismo únicamente en presencia de glucosa respectivamente. La cepa control (+) no produjo exopolisacárido en presencia de glucosa (Figura 9 y 10). No hubo asociación estadística entre la producción de biopelícula y la presencia o no de glucosa ($p \geq 0,05$).



M, Mano; FN, Fosa Nasal

Figura10. Distribución de las cepas *S. aureus* de acuerdo a la cantidad máxima de biopelícula producida en ausencia de glucosa.

www.bdigital.ula.ve



M, Mano; FN, Fosa Nasal

Figura 11. Distribución de las cepas de *S. aureus* de acuerdo a la cantidad de biopelícula producida en presencia de glucosa.

DISCUSIÓN

Staphylococcus aureus es reconocido como un importante agente causal de infecciones asociadas a la atención sanitaria; en el ambiente hospitalario, el personal médico y de enfermería pueden ser portadores de estos microorganismos por prolongados periodos y así servir como un foco de diseminación hacia los pacientes recluidos en el centro de salud (Boncompain y col., 2017).

En el presente trabajo, la mayoría de las cepas de *S. aureus* analizadas fueron aisladas de fosa nasal (60,9%). En este contexto, esta aseveración difiere a las observadas en estudios previos realizados por Agarwal y col. (2018) y Abdullah y col. (2017), quienes observaron en trabajadores hospitalarios una menor frecuencia de *S. aureus* en este mismo sitio anatómico (48% y 31 % respectivamente). Asimismo, se determinó que la frecuencia de esta especie bacteriana en manos (39,1%) fue más baja que la observada en fosa nasal. Al respecto, en un trabajo reciente, Castro y col. (2016) mediante análisis de electroforesis de campo pulsado reportaron que las cepas de *S. aureus* aisladas de manos y fosa nasal de trabajadores de la salud eran las mismas (Castro y col., 2016). Es posible que la presencia de *S. aureus* en el personal clínico que labora en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal del IAHULA pudo haber sido favorecida a través de la contaminación cruzada entre la nariz y las manos de los mismos. Sin embargo, no se puede descartar la colonización de estos microorganismos a partir de la atención de los pacientes y del propio ambiente hospitalario.

Asimismo, los *S. aureus* aparte de establecerse en el personal de salud a través de la atención sanitaria, también los puede adquirir a partir del manejo de equipos médicos de soporte vital (Rashid y col., 2012). Se conoce que las manos de los médicos y enfermeras son la principal vía de transmisión de patógenos en el ámbito hospitalario (Albrich y col., 2008). Probablemente, las cepas de *S. aureus* aisladas del personal sanitario se deba a que durante la práctica clínica las barreras de contención como el correcto lavado de manos y una adecuada asepsia en la aplicación de

procedimientos invasivos o de diagnóstico se realizaron de manera inapropiada o no se aplicaron. Por lo tanto, ambos escenarios pudieron favorecer la colonización de los mismos durante la atención del paciente.

Otro hallazgo importante en esta investigación fue la elevada frecuencia de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (52,2%). Estos resultados avalan las afirmaciones de Hidron y col. (2008) y García y col. (2015), quienes reportaron que una elevada frecuencia de *S. aureus* aislados del personal clínico expresan resistencia a este fármaco. Así mismo Pascual y col. (2016), reportaron resultados similares a nivel de países como Perú, Colombia y Ecuador observándose que la prevalencia de SARM fue del (58, 45 y 28%) respectivamente. A este respecto, se conoce que las cepas SARM poseen una elevada capacidad de adaptación y permanencia en las áreas hospitalarias, debido a que con frecuencia también pueden expresar resistencia a otros antimicrobianos (Boncompain y col., 2017). Es posible que, ante este escenario, las cepas aquí estudiadas se adaptaron a la Unidad de Alto Riesgo Neonatal y colonizaron con facilidad al personal clínico que dispensa atención sanitaria, permitiendo de esta manera demostrar en portadores asintomáticos la presencia de cepas de *S. aureus* meticilinorresistentes.

Los *S. aureus* con frecuencia se encuentran asociados a infecciones hospitalarias, debido a su capacidad de adherirse y formar biopelícula en dispositivos médicos invasivos (como prótesis, catéteres intravasculares, entre otros), así como en tejido desvitalizado o lesionado por cirugías o traumatismos (Izano y col., 2008). En este estudio se demostró que el 30,4% de las cepas analizadas formaron biopelícula, poniendo en evidencia que el personal hospitalario es portador de cepas con la capacidad de colonizar al paciente pediátrico susceptible durante la atención clínica. En este contexto, el desarrollo de biopelícula es considerado un importante factor de virulencia en *S. aureus*, debido a que el mismo protege a los microorganismos bacterianos de la acción de los componentes del sistema inmune del hospedero (Kim y col., 2008). Ante este escenario, el estado de portador del personal que presta

asistencia sanitaria de estafilococos formadores de biopelícula eventualmente favoreció la instauración de procesos infecciosos persistentes en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal

Por otra parte, cuando se comparó la producción de biopelícula con la susceptibilidad a la meticilina, se observó que las cantidades de exopolisacárido expresadas por las cepas susceptibles y meticilinoresistentes mostraron leves variaciones (entre 1,2 y 1,9 veces). Sin embargo, la cepa SARM 15M demostró una elevada cantidad de biopelícula (4,4 veces sobre el punto de corte). En este contexto, varios trabajos han reportado que las cepas de estafilococos (nosocomiales o de la comunidad) pueden expresar elevadas cantidades de exopolisacárido, debido a un aumento en los niveles de expresión del operón *icaADBC* (responsable de la producción del exopolisacárido PIA) (Melo y col., 2013; Greco-Stewart y col., 2013; Freitas y col., 2018). Posiblemente, la cepa descrita anteriormente (SARM 15M) mostró *in vitro* elevados niveles de expresión del locus *icaADBC*, lo cual originó una cepa altamente formadora de exopolisacárido. Estos resultados permiten afirmar que los *S. aureus* tienen la capacidad de desarrollarse como biopelícula, y que bajo esta condición demuestran diferencias fenotípicas significativas.

Varios trabajos reportados en la literatura señalan que las biopelículas formadas por estafilococos disminuyen la acción de los antimicrobianos ampliamente, debido a que la matriz del exopolisacárido limita la difusión del fármaco hacia su interior por su naturaleza aniónica (la biopelícula retarda la entrada de antibióticos catiónicos como los aminoglucósidos) (Cerca y col., 2005; Diamond-Hernández y col., 2010). Además, otros reportes avalan que la exposición de estos microorganismos a concentraciones subinhibitorias de antibióticos (eritromicina y tetraciclina) pueden inducirlos a que formen biopelícula (Qu y col., 2010; Del Pozo y Patel, 2013). Por lo tanto, en el ámbito hospitalario, este fenómeno podría originar una subpoblación de cepas productoras de biopelícula debido a que el exopolisacárido restringe la entrada

del antimicrobiano disminuyendo su concentración, lo que estimularía a los microorganismos a desarrollar la biopelícula.

Otro aspecto importante observado en esta investigación fue el aumento en la producción de biopelícula inducida por la presencia de glucosa en las cepas 3MB, 54FN1, 2FN y 2FNB. En este contexto, O'Neill y col. (2007) y Lavery y col. (2013) reportaron que el aumento en el desarrollo de biopelícula en aislados de *S. aureus* es inducido por la glucosa, debido a que eleva los niveles de expresión de las proteínas de unión a la fibronectina (FnBP). Estas proteínas, igualmente que el PIA (principal componente del exopolisacárido en estafilococos) participan el desarrollo de biopelícula en cepas de *S. aureus* (O'Neill y col., 2008. Sin embargo, en este trabajo las cepas 15M (SARM). y la cepa control (+) (productora de biopelícula dependiente del PIA (Vázquez y col. (2013)) disminuyeron considerablemente la formación de biopelículas bajo la misma condición. Es decir, la cantidad de exopolisacárido en las cepas descritas anteriormente podría estar asociada a la disminución de la expresión del PIA, de las proteínas FnBP, o de ambas al mismo tiempo, en presencia de glucosa. En consecuencia, esta investigación deja en evidencia, que *S. aureus* es un microorganismo que se adapta fácilmente a condiciones ambientales externas, características que favorecen su persistencia y diseminación en el entorno hospitalario.

Finalmente, en este trabajo se pudo establecer que la formación de biopelícula es independiente de la susceptibilidad a la meticilina y la presencia o no de glucosa. Es probable que la expresión de mecanismos que favorecieron el desarrollo de exopolisacárido en las cepas estudiadas sea una condición inherente del microorganismo y que la misma esté regulada por factores propios del microambiente bacteriano (pH, osmolaridad, temperatura, oxígeno, nutrientes, etc.). En consecuencia, los resultados mostrados en esta investigación evidencian que en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal del IAHULA del

IAHULA reside una población bacteriana con adaptaciones importantes al ambiente y a los escenarios donde se desarrollan. Por lo tanto, la resistencia a la meticilina y la formación de biopelícula constituyeron las bases para el establecimiento exitoso de *S. aureus* en el ambiente hospitalario.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. La mayoría de las cepas de *S. aureus* procedieron de fosa nasal del personal clínico
2. Se demostró la existencia de una elevada frecuencia de cepas SARM (52,2%) presentes en portadores asintomáticos.
3. La formación de biopelícula se observó en el 30,4% de las cepas de *S. aureus*.
4. En los aislados de *S. aureus* formadores de biopelícula, la cantidad de exopolisacárido producida por las cepas susceptibles y meticilinorresistentes mostraron mínimas, excepto la cepa SARM 15M.
5. Los aislados de *S. aureus* formadores de biopelícula tuvieron la capacidad de producir más exopolisacárido en presencia de glucosa, excepto la cepa SARM 15M y el control (+).
6. Se estableció que la formación de biopelícula *S. aureus* es independiente de la susceptibilidad a la meticilina y la presencia o no de glucosa
7. Estos resultados sugieren que la resistencia a la meticilina y la formación de biopelícula fueron condiciones que favorecieron la colonización del personal clínico por cepas de *S. aureus*, los cuales a su vez pudieron originar infecciones asociadas a la atención sanitaria.

RECOMENDACIONES

1. Aplicar o mejorar las medidas de contención como el correcto lavado de manos, uso de guantes, tapabocas y una adecuada asepsia en la aplicación de procedimientos invasivos o de diagnóstico durante la atención sanitaria.
2. Realizar una adecuada limpieza y una correcta asepsia de las áreas y superficies de la Unidad de Alto Riesgo Neonatal.
3. Realizar periódicamente estudios microbiológicos para la detección de microorganismos que se encuentren circulando en la UARN, así como en otras áreas de servicio.
4. Estudiar la presencia de otros mecanismos de resistencia en las cepas analizadas para determinar nuevas estrategias terapéuticas en el control de infecciones asociadas a la atención sanitaria.
5. Evaluar patrones de susceptibilidad y resistencia ante otros antimicrobianos para estudios posteriores.
6. Planificar estrategias para el empleo adecuado de antibióticos, ya que su uso no ha sido el adecuado en los últimos tiempos, teniendo esto como consecuencia la aparición de nuevos mecanismos de resistencia.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRAFICAS

- Abdallah M., Benoliel C., Drider D., Dhulster P. y Chihib N. (2014). **Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments.** Arch Microbiol. 196: 453–472.
- Agarwal A., y Jain A. (2011). **Glucose & Sodium chloride induced biofilm production & ica in clinical isolates of staphylococci.** Indian J Med Res 138: 264.
- Aiello A. Cimiotti J, Della- latta P, y Larson E.L. (2003) **A comparison of the bacteria found on the hands of ‘homemakers’ and neonatal intensive care unit nurses,** Journal of Hospital Infection .54:310–315.
- Alviarez E., Velazco E., Nieves B., Vivas G., y Gutierrez 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).
- American Society for Microbiology (2009) **Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC*mec*).** Vol 53, N° 12: 4963.
- Archche N., Mazaitis M., Coterton W., Leid J., Powers M. y Shirtliff M. (2011). ***Staphylococcus aureus* biofilms Properties, regulation and roles in human disease.** Special focus review: biofilms. Virulence .2 :(5): 445-459.
- Arciola C., Campoccia D., Speziale P. y Montanaro L. (2012). **Biofilm formations in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials.** Biomaterials.33:5967-5982.
- Armas A., Suarez B., Crespo N., y Suarez A. (2015). **Resistencia de *Staphylococcus aureus* a la meticilina en aislamientos nosocomiales en un hospital provincial.** Gaceta médica espirituana 17 (3)1608-8921.
- Barreto S., Zambrano M., y Araque M. (2009). **Variaciones fenotípicas de susceptibilidad en cepas de *Klebsiella pneumoniae* de origen nosocomial y su asociación con la formación de biopelículas.** Invest Clin 50 (2): 221-229.

- Barretti P., Moraes T., Camargo C., Caramori J., Mondelli A., Montelli A., y col. (2014). **Peritoneal Dialysis-Related Peritonitis Due to *Staphylococcus aureus*: A Single-Center Experience over 15 Years**. Plos One. 7 (2): 1-7.
- Becker K.; Heilmann C.; y Peters G (2014). **Coagulase-Negative Staphylococci**. Clin microbiol, Rev. 27 (4): 870.
- Bouchami O., Hassen A., De Lencastre H., y Miragaia M. (2011). **Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus hominis* (MRSHo): Low Clonality and Reservoirs of SCCmec Structural Elements**. 6 Pp. 1.
- Burmolle M., Webb J., Rao D, Hansen L., Sorensen S., Kjelleberg S. (2006) **Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms**. Applied and Environmental Microbiology; 72(6):3916-923.
- Castellano G., Maribel J., Bermúdez N. Eilyng J., Perozo M. Armindo, Camacho M.Lizbeth M, Harris S. Belinda C, Ginestre P. Messaria M. (2005) ***Staphylococcus aureus*: estado de portador en personal de enfermería y patrones de susceptibilidad antimicrobiana**. Rev.SVM. 25: 72-78.
- Castellano G., Maribel J., Bermúdez N. Eilyng J., Perozo M. Armindo. (2014) **Tipo de cassette cromosómico estafilocócico en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina**. KAMERA Rev.42(2): 116.
- Cerca N., Martins S., Pier G., Oliveira R, y Azeredo J. (2005). **The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-MICs of antibiotics and subsequent development of a biofilm**. Rev. microbiol. 156:650–655.
- Chambers H. (1999). **Penicillin-Binding Protein–Mediated Resistance in Pneumococci and Staphylococci**. The journal of infectious diseases. (supl 2): 353-356.

- Clinical Laboratory Standards Institute (2018). 950 West Valley Road, Suite 2500 Wayne, PA 19087 USA 35 (3).
- Cue D., Lei M, y Lee C. (2012). **Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci.** Department of Microbiology and Immunology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR, USA; 2 (38).
- Cui B., Smooker P., Rouch D., Daley A., y Deighton M. (2013). **Differences between two clinical Profiling and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Revealed by Biofilm, Antibiotic Resistance, *Staphylococcus capitis* Subspecies as.** Journal Clin. Microbiol. 51(1):9.
- Davey M., y O'Toole G. (2000) **Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.** Microbiology and Molecular Biology Reviews; 64(4):847-67.
- De silva M., Kantzannou A., Justice R., Massey A, Wilkinson N., Peacock S. (2002). **The *ica* Operon and Biofilm Production in Coagulase Negative Staphylococci Associated with Carriage and Disease in a Neonatal Intensive Care Unit.** Journal of clinical microbiology, 40 (2): 382–388.
- Del Pozo J., y Patel R. (2013). ¿Son suficientes los antibióticos y la cirugía para tratar las infecciones asociadas a biofilms?. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 31(10):641–642.
- Dice B., Stoodley P., Buchinsky F., Metha N., Ehrlich G., y Hu F. (2009). **Biofilm formation by *ica*- positive and *ica* – negative strains of *staphylococcus epidermidis* in vitro.** The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research, 25:4, 367- 375.
- Diamond-Hernández B., Solórzano-Santos F., Leños-Miranda B., Peregrino-Bejarano L., Miranda-Novales G. (2010). Production of *ica*A_{DB}C-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. ***Infectious Disease.*** (10):68-74.
- Donlan R. (2001) **Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process.** Clinical Infectious Diseases; 33:1387-92.

- Donlan R., Costerton W. (2002) **Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms**. Clinical Microbiology Reviews; 15(2):933-51.
- Eveillard M., Martin Y., Hidri N., Boussougant Y., y Joly- Guillou M. (2014). **Carriage of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus***. Infection Control and Hospital Epidemiology 25 (2): 114- 120.
- Garza- Gonzalez E., Lopez D., Pezina C., Muruet W., Bocanegra – GarciaV, Muñoz M. y col. (2010). **Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in coagulase-negative staphylococci and relationship to drug resistance**. Journal of Medical Microbiology, 59:323–329.
- Garza R., Rangel O., y Perea, L. (2013). **Educación química**. Universidad Nacional Autónoma de México. 24:1.
- Hanssen A., Ericson Sollid J. (2006). **SCCmec in staphylococci: genes on the move**. FEMS Immunol MedMicrobiol; 46 (1):8-20.
- Hurtado J. (2010). Diseño de Investigación. **En el proyecto de investigación, comprensión holística de la metodología y la Investigación** Bogotá- Caracas: Ediciones Quirón.
- Kaplan J.; (2011) **Antibiotic-induced biofilm formation**. Int J Artif Organs; 34(9):737-751.
- Laverty G., Gorman S. y Gilmore B. (2013) **Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation**. Review future microbiology. 8 (4): 513
- Lebeaux D., Ghigo J. y Beloin C. (2014). **Biofilm – related infection: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics**. Microbiology and molecular biology reviews .78 (3).
- Longauerova A. (2006). **Coagulase negative Staphylococci and their participation in pathogenesis of human infections**. Bratisl lek listy .107: 448- 452.

- Mah T, y O'Toole G. (2001). **Mechanisms of biofilms resistance to antimicrobial agents.** Trends in Microbiology; 9(1):34-39.
- McCarthy H, Rudkin J, Black N, Gallagher L, O'Neill E, y O'gara J. (2015) **Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*** review article Cellular and infection microbiology. 5 (1):1-5.
- Mongkolrattanothai K.; Boyle S.; Murphy T.; y Daum R (2004). **Novel non-mecA-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing *pbp4* and *tagF* genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*.** Antimicrobial agents and chemotherapy.48 (5):1823–1836.
- Murray P., Rosenthal K., y Pfaller M. (2009) **Microbiología médica** sexta edición, editorial Elsemer Barcelona España.
- Nasr R., Abushady H., y Hussein H. (2012). **Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci.** The Egyptian journal of medical human genetics. 13: 269–274.
- O' gara J. (2007). ***Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and application.** J med. Microbial; 50: 582-587.
- O'Toole G., Kaplan H., Kolter R. (2000). **Biofilm formation as microbial development.** Annual Review of Microbiology; 54:49-79.
- Otto M. (2012). **Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection.** Bioessays, 35: 4–11.
- Pascual K., y Turcaz M. (2016). **Incidence of Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized pediatric patients.** Rev Inf Cient. 95(1): 64-72

- Petrelli D., Repetto A., D'Ercole S., Rombini S., Ripa S., Prena M., y col (2008). **Analysis of meticillin-susceptible and meticillin resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital.** Journal of Medical Microbiology; 57, 364–372.
- Pozzi C., Water E., Rudkin J., Schaeffer C., Lohan A., Tong P. y col. (2012) **Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections.** PLoS Pathogens, 8(4):1-15.
- Raffa R., Iannuzzo J., Levine D., Saeid K., Schwartz R., Sucic N. y col. (2005) **Bacterial communication (“quorum sensing”) via ligands and receptors: a novel pharmacologic for the design of antibiotic drugs.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics; 312(2):417-23.
- Rochetto L., Rodrigues R., Antunes F., Aparecida M., Texeira B., y Marie A., (2008) **agr RNAIII divergently regulates glucose – induced biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.** Universidad Federal de Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, 154: 3481- 3487.
- Rodríguez, S. (1999). Prevalencia de portadores nasales de *staphylococcus aureus* en el personal médico del Hospital Militar Dr. Carlos Arvelo. *Salus militiae*; 24(2):126-128.
- Rohde H., Burandt E., Siemssen N., Frommelt L., Burdelski C., Wurster S., y col. (2007). **Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections.** Biomaterials. 28:1711–1720.
- Rongpharpi S., Hazarika N., y Kalita H. (2013) **the prevalence of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers at a tertiary care hospital in assam with special reference to MRSA;** Journal of Clinical and Diagnostic Research. 7(2): 257-260.

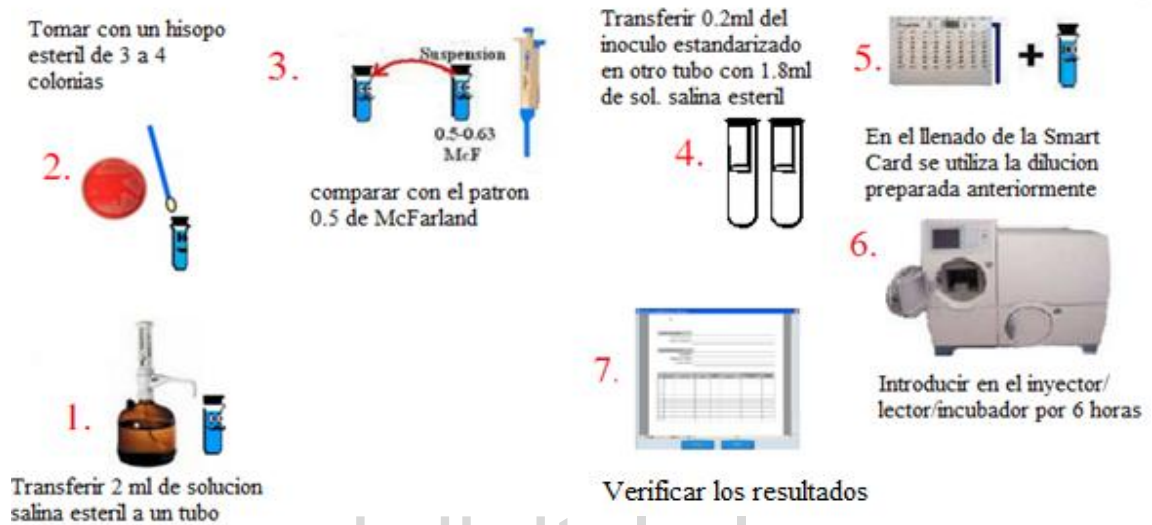
- Ruppe E., Barbier F., Mesli Y., Maiga A., Cojocar R., Benkhalfat M. y col. (2009). **Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries.** Antimicrobial agents and Chemotherapy 53(2):442.
- Sabater S., y Moreno R. (2008) **Bacteriemias por *Staphylococcus aureus* en el hospital general de castellon.** Revista Española de quimioterapia 21 (4): 217-233.
- Sabet N, Subramaniam G, Navaratnam P y Sekaran S. (2012). **In vitro mecA gene transfer among *Staphylococcus aureus* in Malaysian clinical isolates.** Journal of Biotechnology .11(2): 385-390.
- Shibabaw A., Tamrat A. y Mihret A. (2013). **Nasal carriage rate of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among Dessie Referral Hospital Health Care Workers; Dessie, Northeast Ethiopia** 2:25.
- Stewart P., y Costerton J. (2001) **Antibiotic resistance of bacteria in biofilms.** The Lancet; 358:135-38.
- Taj Y., Essa F., Aziz F., Kazmi S. (2012). **Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.** Journal Infect Dev Ctries; 5(6): 403-409.
- Uhlemann A., Otto M., Lowy F., y Deleo F. (2014). **Evolution of community and healthcare associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.** Infect Genet Evol. 21: 563–574.
- Van acker H., Van dijk P., y Coenye T. (2014). **Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms.** Review Cell press: 1-8.
- Vazquez D., Habimana O., y Holck A. (2013). **Impact of food-related environmental factor son the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates.** Curr Microbiol 66: 110- 121.

- Vergara- Irigaray M., Valle J., Merino N., Latasa C., García B., Mozos I. y col. (2009). **Relevant Role of Fibronectin-Binding Proteins in *Staphylococcus aureus* Biofilm-Associated Foreign-Body Infections.** Infection and immunity. 77 (9): 3978-3991.
- Watnick P., y Kolter R. (2000) **Biofilms, city of microbes.** Journal of Bacteriology; 182(10):2675-679.
- Winn W., Allen S., Janda W, Koneman E., Procop G., Schreckenberger P. y col. (2013) Koneman **Diagnóstico Microbiológico.** Sexta Edición. Editorial Médica Panamericana, 2 (I): 529-539.
- Yıldız O. (2014) **Antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 12 Hospitals in Turkey.** Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 13:44.

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

Anexo 1. Metodología para la determinación de la susceptibilidad a la metilicina



www.bdigital.ula.ve

Cepas que presenten crecimiento frente al Cefoxitin a concentraciones $>$ a $4\mu\text{g/ml}$ se consideran SARM según criterios del CLSI 2018.

Anexo 2. Metodología para la detección de biopelícula en *S. aureus*

