

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
UNIDAD DE BIOLOGÍA, TECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS**

**“Determinación in vitro de la DL_{50} de diferentes tipos de
Penicilina G en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de
diferentes ambientes”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGA

PRESENTA
SARA TORRES MÁRQUEZ

Director de Tesis: Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Edo. Mex.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la actual Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Al Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza, por aceptar ser director y guía de este proceso de realización académica y personal. Por ser un Amigo Mayor.

M en C Ramón V. Moreno T. por sus consejos y amistad.

A la M en C María Eugenia Heres Pulido, M en C Irma Elena Dueñas García y al M en C Sergio Vaca Pacheco por sus consejos y sugerencias.

Al Dr. Rafael Jiménez Flores por su confianza y ayuda.

A la Dra. Myriam Arriaga Alba y al QFB Roberto Rivera Sánchez del Laboratorio de Microbiología en Hospital Juárez de México por compartir sus conocimientos, disponibilidad y sugerencias.

QBP. Rita Mancilla N.(Instituto Bioclon), Lic. Gabriela Rodríguez y Q. Noel Chávez (Gist-brocades), M en C Eric Monroy (CUSI, FESI) por el material proporcionado.

Agradezco a mis padres por haberme dado todo lo que pudieron y han podido dar

A mi esposo Paco por su amor, paciencia y prudencia

A la familia García Carranza, especialmente a la Sra. Isabel, Antonia y Ana E. por el apoyo constante.

A Teresa González R. y Ernestina González L. por su ayuda desinteresada.

Dedicado

A Paco y Emiliano

A mis padres Graciela y Camilo†

A mis hermanos Mauricia, Marcela, José Luis y Belina

A mis sobrinos Neftali, Sergio, Israel, Rodrigo, Valeria y Belina Elisa.

El presente trabajo se llevo a cabo en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Juarez de México, bajo la supervisión de la Dra. Myriam Arriaga Alba y el QFB Roberto Rivera Sánchez

INDICE

	PÁGINA
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	11
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	40
ANEXOS	41
BIBLIOGRAFÍA	46

RESUMEN

La penicilina es un antibiótico que se ha usado con fines terapéuticos desde hace casi 60 años, su actividad se valora por la capacidad que tiene de inhibir el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P. Esta especie es causante de varias enfermedades infecciosas para las cuales los médicos en numerosos casos prescriben penicilina, sin considerar que los microorganismos silvestres están expuestos a mutaciones o adquisición de plásmidos, lo que puede aumentar, por selección, el número de microorganismos resistentes a la penicilina. Es por ello que en el presente trabajo la determinación de la DL_{50} fue determinante para conocer el incremento de cepas resistentes así como el aumento en la resistencia misma. La identificación de los microorganismos es esencial para asegurar resultados certeros con respecto al comportamiento que puedan tener frente algún antibiótico. La incorporación de la prueba de DNAsa como ensayo preliminar fue adecuada para la identificación de *S. aureus*. La manera en que este género aprovechó los nutrientes fue igual, independientemente de su resistencia a la penicilina y el lugar de aislamiento, obteniendo un crecimiento mas activo en el Caldo Soya Trypticaseína enriquecido con 5% de extracto de levadura. El análisis estadístico indica que no hubo diferencia significativa ($F= 3.6823$, $\alpha 0.05$) entre el efecto de las penicilinas. Los métodos de sensibilidad tuvieron diferentes alcances. Por el método de difusión en agar se encontró un mayor porcentaje de cepas resistentes en pacientes hospitalizados. Por el método del replicador de Steers, se observó un espectro más amplio de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en las cepas de pacientes externos. Por el método de dilución en caldo se observó que algunas cepas no mostraron curvas de mortalidad monótonicas, las cuales están dadas probablemente por el funcionamiento de algún mecanismo interno de resistencia a la penicilina.

INTRODUCCIÓN

Alexander Fleming descubrió la penicilina en 1928 al observar que el crecimiento de *Staphylococcus* sp. se detenía cuando entraban en contacto con el borde de un hongo contaminante. Posteriormente, Howard *et al.* (1943; citado en Madigan *et al.*, 1977), implementaron el uso terapéutico de penicilina, para tratar las enfermedades infecciosas de los soldados, conscientes de que ésta era la causa principal de muerte en la Primera Guerra Mundial. La penicilina resultó un potente agente antimicrobiano. Hacia los años 60's se empezó a reconocer que había disminuido la eficacia de la penicilina en el tratamiento de estas enfermedades pues comenzaron a detectarse bacterias resistentes (Madigan *et al.*, 1977). A la capacidad de sobrevivencia de los microorganismos en presencia del antibiótico se le denomina resistencia.

El término antibiótico se refiere a una sustancia producida por un microorganismo o una sustancia similar producida artificialmente por una síntesis química específica, la cual inhibe el crecimiento de las bacterias, en bajas concentraciones (Joklik *et al.*, 1992). Los microorganismos que producen antibióticos están ampliamente distribuidos en la naturaleza.

La penicilina es un antibiótico producido por los hongos *Penicillun notatum* y *P. chrysogenum*. Se han identificado varios tipos de penicilinas, las cuales se han nombrado con las literales F, G, K, V, y X para diferenciarlas entre ellas. De estas últimas, la G y la V han dado resultados terapéuticos útiles. Este tipo de antibióticos tiene una estructura básica que es el ácido 6-aminopenicilánico (unión de los núcleos heterocíclicos de tiazolidina y β -lactámico) producto de la fusión y arreglo cíclico de los aminoácidos valina y cisteína a los que se agregan diferentes radicales (Kumate, 1981).

Los mecanismos generales de acción de los antibióticos bloquean uno o varios procesos vitales para los microorganismos, que pueden ser 1) la síntesis de la pared celular, 2) la fusión de la membrana, 3) la síntesis de proteínas, 4) el metabolismo de los ácidos nucleicos y/o 5) la inactivación de otras reacciones enzimáticas.

Las penicilinas, actúan sobre la síntesis de la pared celular, la cual se lleva a cabo por un grupo de enzimas llamadas proteínas de unión a la penicilina PBP (PBP de *penicillin binding protein*). Éstas se encuentran en todas las eubacterias y son responsables

del ensamble, mantenimiento y regulación de la estructura del peptidoglicano que es la molécula responsable de la integridad de la membrana.

En *Staphylococcus* spp. se han identificado diferentes tipos, como la PBP 1 que es de las más importantes para la sobrevivencia de *Staphylococcus* expuestos a β lactámicos, la PBP 4, es responsable para el enlace transversal secundario y la PBP 2^a es la responsable de resistencia a meticilina en *Staphylococcus* (Giesbrech *et al.*, 1998).

El ensamble del peptidoglicano se da por enlaces cruzados de una transpeptidasa, la cual forma un puente entre dos enlaces y elimina la D-alanina terminal que va unida al ácido acetilmurámico (AcM). Cuando la bacteria está creciendo en presencia de penicilina, el peptidoglicano es transportado por el difosfato de uridina, el cual se acumula, ya que no hay unión entre los péptidos que forman el enlace transversal. Aunque la síntesis de la pared celular continúa, ésta es inestable y se debilita (Madigan *et al.*, 1997; Giesbrech *et al.*, 1998). El complejo formado por PBP-penicilina estimula la síntesis de hidrolasas promoviendo la lisis durante la división celular (Giesbrech *et al.*, 1998).

En general, los mecanismos de resistencia a los antibióticos pueden darse por inactivación del antibiótico, alteración en los sitios receptores o por el bloqueo del transporte del antibiótico al interior de la célula (Joklik *et al.*, 1992).

Uno de los mecanismos de resistencia que tiene *S. aureus* a antibióticos β -lactámicos está dado por la síntesis de una enzima llamada β -lactamasa, cuya actividad se centra en la hidrólisis del anillo β -lactámico del antibiótico (Sabath, 1977). Este tipo de enzimas son inducibles en bacterias gram positivas y tienen alta afinidad por su sustrato provocando que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) sea elevada (Francioli *et al.*, 1991). Se han clasificado 4 tipos (A, B, C y D) de acuerdo con su espectro hidrolítico, la afinidad de inhibir y el lugar donde son codificadas; en *S. aureus* aproximadamente 5% sintetiza β -lactamasa y puede ser transferida por un gen vía transposición o bien por plásmidos aumentando hasta 90% en aislamientos de *S. aureus* o estafilococos coagulasa negativa (Joklik *et al.*, 1992; Livermore, 1995; Mossova y Mobashery, 1998; Peterson *et al.*, 1999). Voladri y Kernodle, (1998) reportaron β -lactamasa de tipo B en *S. aureus*, la cual está codificada en el material genético del fago del grupo II. Con lo anterior se pueden apreciar

las diferentes posibilidades que tienen los microorganismos para adquirir una característica que les confiera una ventaja para sobrevivir.

La resistencia llamada intrínseca se debe a la producción de PBPs, las cuales son ensambladas dentro de la membrana celular, con sitios activos en el espacio periplasmático, su función enzimática es de transpeptidasas, transglicolasas y carboxipeptidasas. Estas enzimas deben su nombre a que se unen covalentemente con la penicilina en el sitio activo de la serina. Algunas bacterias llegan a tener alteraciones en las PBP, lo que puede hacerlas menos susceptibles a la acción bactericida de antibióticos β -lactámicos (Mossova y Mobashery, 1998).

Es importante mencionar que los tipos de resistencia a β -lactámicos anteriormente descritos se observan únicamente durante la fase de crecimiento (Joklik *et al.*, 1992).

Otro mecanismo de resistencia a penicilina de *S. aureus* es el llamado "tolerancia a penicilina" en el cual la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de penicilina es baja y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) es alta e involucra procesos relacionados con autolisinas (Sabath, 1977; Haldane *et al.*, 1977).

Bayles (2000) establece dos procesos inducidos por penicilina: la lisis celular y la muerte celular, los cuales se dan en diferentes etapas de crecimiento bacteriano. Mientras la lisis inducida por penicilina se da durante el proceso de división celular, la muerte inducida por penicilina ocurre cuando la bacteria está en fase estacionaria. Bayles propone un modelo en el que existe un proceso de regulación de autolisinas, las cuales tapan o bloquean las porinas de la pared celular. Estas porinas sirven para transportar mureína hidrolasa y otras enzimas al espacio extracelular. Tales rutas de salida están controladas por antiporinas, cuya función es evitar que se libere el contenido celular. En otras palabras evita que la célula se plasmolice. Dicho bloqueo está regulado por un operón y permite que la célula sobreviva en presencia de la penicilina.

Los estudios de la fisiología bacteriana han generado conocimientos acerca de los mecanismos de resistencia a los antibióticos, los cuales ponen en perspectiva los riesgos que esto implica. Para ello es necesario conocer los modelos de transmisión de resistencia y los factores que contribuyen a la emergencia de microorganismos patógenos resistentes (Richet, 2001).

La demanda y el modo en que las personas emplean los antibióticos son importantes en la selección de microorganismos resistentes a antibióticos, la cual se atribuye a la práctica de la automedicación. Generalmente, la mayoría de las personas ignoran que los resfriados leves son causados por virus, automedicándose antibiótico como preventivo o para disminuir los síntomas (Vaden *et al.*, 2003)

Existe una relación entre el incremento de uso de antibiótico en hospitales y la frecuencia de microorganismos resistentes. Dicha relación puede ser la evidencia de selección de mutantes durante la terapia, (Guillemot, 1999; Vaden *et al.*, 2003). La resistencia no sólo involucra al microorganismo tratado en la infección, también involucra a la flora bacteriana comensal del paciente que puede ser transmitida entre individuos (Guillemot, 1999). Lo anterior conduce al desarrollo de nuevos antibióticos que pretenden disminuir la selección de cepas resistentes (Chopra, 1998).

Las pruebas de susceptibilidad son una clave importante para determinar la sensibilidad o resistencia que los microorganismos tienen hacia los antibióticos. Tradicionalmente, este tipo de pruebas en laboratorios clínicos de microbiología se enfocan en el desarrollo de métodos estandarizados que tengan resultados reproducibles (Sanders, 1991).

El método más común para determinar la susceptibilidad microbiana es el método de Kirbi-Bauer, en donde se forman zonas de inhibición en una caja con agar que contiene la bacteria en crecimiento. En el método de microdilución en agar se puede determinar tanto la sensibilidad como la CMI y en realidad representa un bajo costo por el número de cepas que se pueden probar en diferentes concentraciones del antibiótico. Por otro lado, los métodos con agar son inapropiados, para ciertos antibióticos como la sulfametazina y para microorganismos de crecimiento lento (Holloway *et al.*, 1996).

Du Toit (2000), basándose en la técnica de ELISA, desarrolló un método en que se conjugan la microdilución y las zonas de inhibición, siendo una variante que demostró tener un alto índice de confiabilidad.

S. aureus, se ha convertido en un microorganismo causante de infecciones nosocomiales debido a la selección de cepas resistentes. La determinación correcta de la sensibilidad que este microorganismo tiene a los antibióticos β -lactámicos ha llevado al

desarrollo de nuevas técnicas de susceptibilidad como una prueba de aglutinación llamada *Slides Staph Kit*, que es una combinación de látex y eritrocitos, para la detección del factor de aglutinación, proteínasa A y otros inmunógenos específicos de *S. aureus*, propuestos por Wichelhaus *et al.*, (1999) para diferenciar *S. aureus*-meticilina resistente (MRSA) de *S. aureus*-meticilina sensible (MSSA).

En los métodos automatizados que abarcan la identificación bacteriana y la susceptibilidad bacteriana pueden haber errores que llevan a la selección inadecuada de un antibiótico, por ello, la exactitud depende de la sensibilidad y la actualización del equipo (Ribeiro *et al.*, 1999).

ANTECEDENTES

En 1961 se identificaron por primera vez, cepas de infecciones estafilococales resistentes a meticilina. Estas cepas tienen la característica de producir β -lactamasa lo que las hace resistentes a penicilina. Sin embargo, existe también el hecho de la producción de PBPs, las cuales pueden ser de baja o alta afinidad a la meticilina. La más importante es la PBP 2 que es inducida por la presencia de antibióticos β -lactámicos (Murakami *et al.*, 1987).

En un estudio realizado por Ross *et al.* (1974) en pacientes intra hospitalarios y ambulatorios, encontraron que la resistencia de *S. aureus* a penicilina dentro de hospitales fue de 95% y en ambulatorios de 84%. Hassam *et al.* (1978) encontró que hubo un incremento del 16 al 50 % de cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina en el periodo comprendido de 1952 a 1978; determinó que, en cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones de la piel o subcutáneas, el porcentaje de resistencia a penicilina fue de 81%, de las 200 cepas probadas ninguna fue resistente a meticilina, gentamicina o cloranfenicol (Hassam *et al.*, 1978).

Estudios realizados en diferentes países, muestran que *S. aureus* es de los microorganismos aislados con mayor frecuencia, tanto del personal como del medio ambiente hospitalario. Aunado a esta frecuencia, está también la variedad de infecciones que causa en pacientes hospitalizados (Al Masaudi *et al.*, 1991; De Sousa *et al.*, 1998; Lesky *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 1998).

La persistencia de este microorganismo es consecuencia de la resistencia que expresa a antibióticos y germicidas (Al Masaudi *et al.*, 1991). Por otro lado la epidemiología en los casos de catarrros persistentes o intermitentes causados por *S. aureus* tratados con antibióticos, contribuye a la selección y transmisión de resistencia a antibióticos (Kluytmans *et al.*, 1997).

En México Ponce de León *et al.* (1999) reportaron la existencia de diferentes microorganismos como *Escherichia coli*, *Candida spp.* y *S. aureus* entre otros, como causantes de infecciones intrahospitalarias, las cuales han disminuido por el establecimiento de programas preventivos y la sanitización de cuartos quirúrgicos antes y después de una intervención. Sin embargo, el registro del nivel de resistencia a los antibióticos de los microorganismos que sobreviven a estos procesos no se encontró. Así como el control de uso de antimicrobianos (Guillemot, 1999).

Existe evidencia suficiente de que la exposición a antibióticos permite la subsistencia de patógenos como *Streptococcus piogenens* resistentes. En hospitales se ha asociado el excesivo uso de antibióticos con el incremento en la frecuencia de infección de cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina, tanto dentro como fuera de hospitales (Ross *et al.*, 1974; Guillemont, 1999).

En estudios realizados en la Clínica Universitaria de Salud Integral (CUSI) de la FES Iztacala, Jiménez (1996) encontró 89.2% de cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina aisladas de tracto urinario y nasofaríngeo durante un período de 7 años. Un estudio posterior realizado por Monroy (1997) reportó 94% de cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina aisladas, en su mayoría, de vías urinarias y nasofaríngeo.

Aunque existen lineamientos para hacer pruebas de sensibilidad, hay divergencia en los puntos de ruptura o determinación de la CMI; pues éstos no son supervisados ni revisados periódicamente (Doern, 1992; Richet, 2000). En México, el control de registros de cepas resistentes es mínimo (Zaidi *et al.*, 1999; Richet, 2000)

El uso de antibióticos se ha extendido en el campo veterinario, en animales para consumo humano, como promotores de crecimiento, como medida preventiva y como terapia, con esto las especies bacterianas están expuestas constantemente a algún antibiótico, con la posibilidad de seleccionar cepas con resistencia a antibióticos en bacterias no patógenas, las

cuales, pueden transferir esa resistencia a las bacterias patógenas (Guillemot, 1999; Moller, 1999).

La resistencia microbiana a antibióticos es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por centros de prevención y control de enfermedades como un problema de salud pública (Richet, 2001).

Las penicilinas se evalúan con microorganismos de referencia, dicha evaluación garantiza la actividad del antibiótico contra la cepa de referencia. Sin embargo, no se considera que los microorganismos silvestres que causan enfermedades están expuestos a mutaciones y variaciones espontáneas que pueden contener información relacionada con resistencia a la penicilina. Por esto la evaluación de antibióticos en cepas aisladas de condiciones ambientales diferentes, nos dará una visión de lo importante que es la frecuencia de cambios que han producido resistencia en estos microorganismos con respecto al antibiótico.

Los profesionistas relacionados con el campo de la salud, saben de la importancia del uso adecuado de antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Sin embargo, se ha descuidado el hecho de que las variaciones genéticas de los microorganismos pueden conducir a que un fármaco útil en el presente pueda dejar de serlo en un futuro. El incremento de microorganismos resistentes a los fármacos implica una baja en la efectividad de estos últimos para eliminar a la bacteria, aún cuando su pureza (o potencia) siga manteniéndose en estándares altos. La claridad en estos conceptos biológicos auxiliará a los profesionistas relacionados con la producción de penicilina a tomar decisiones respecto a la producción y uso de antibióticos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la DL_{50} de Penicilina G Procaína, Penicilina G Sódica y la mezcla de ambas en cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas de diferentes ambientes.

Objetivos Particulares

- 1.- Obtener cepas de *Staphylococcus* de ambientes hospitalarios y casos clínicos.
- 2.- Tipificar los aislamientos.
- 3.- Realizar curva de crecimiento para cada uno de los aislamientos.
- 4.- Encontrar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Bactericida (CB) y encontrar la DL_{50} para cada una de las cepas, por medio de cuenta bacteriana en vaciado en placa mediante la técnica de dilución en caldo.

MATERIAL Y MÉTODO

1.- Obtención de cepas

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Juárez de México (HJM), se trabajaron 100 cepas presuntivas de *Staphylococcus aureus* procedentes del Laboratorio Central del HJM de pacientes de consulta externa cuyos orígenes fueron: faríngeo, nasal, urinario y vaginal y 73 cepas presuntivas de *S. aureus* de pacientes hospitalizados procedentes de catéter, líquido cefalorraquídeo, líquido auricular, sangre, faringe, herida drenada, oftálmico, ótico y nasal.

a) Corroboración de la identidad de las cepas.

Las cepas se identificaron mediante la aplicación de pruebas de tinción de Gram, catalasa, coagulasa y DNAsa. Las cepas catalogadas como *S. aureus* se sometieron a una identificación más estricta, con un esquema reducido de bioquímicas (trehalosa, manitol, maltosa, manosa, lactosa, sacarosa, N-acetilglucosamida, rafinosa, urea y Voges-Proskauer) y se almacenaron a -70°C .

b) Prueba de sensibilidad.

Las cepas plenamente identificadas como *S. aureus* se sometieron a la prueba de sensibilidad a Penicilina por el método de difusión en agar. Para ello se utilizaron discos de 10 U de Penicilina G Becton Dickinson® y se aplicó la prueba de ji cuadrada para saber si existe diferencia entre el número de cepas resistentes de origen interno y externo.

Se seleccionaron cepas cuyo diámetro de inhibición se ubicó entre los 13 y los 31 mm, a las cuales se les aplicó la prueba de sensibilidad por el método del replicador de Steers (Anexo 1) (NCCLS 2000), con el fin de seleccionar la concentración de antibiótico a probar.

c) Cinética de crecimiento.

Cada cepa se sembró en una caja con agar sangre por estría abierta y se incubó a 37° C durante 18 a 24 horas. Con un asa estéril se tomaron de 3 a 5 colonias y se sembraron en un tubo con los diferentes caldos de cultivo a probar, ajustando la turbidez a 0.5 en la escala nefelométrica de MacFarland. Además, para llevar a cabo la lectura de la cinética de crecimiento se utilizó un espectrofotómetro (Coleman ®Jr modelo 6 l20) ajustado a 625 nm. Así, la primera lectura correspondió al tubo ajustado a 0.5 de turbidez del nefelómetro de MacFarland. Los tubos se incubaron en baño maría a 37° C con agitación y se realizaron las lecturas cada hora hasta alcanzar el máximo crecimiento. Lo anterior se realizó para seleccionar las condiciones que permitieran apreciar la fase logarítmica de la cinética de crecimiento. Éstas se determinaron en diferentes medios de cultivo tales como: Caldo nutritivo, (CN), caldo Müller Hinton (CMH), Caldo Soya Trypticaseína (CST), Caldo Soya Trypticaseína enriquecido con 5% de extracto de levadura (CST5).

2.-Determinación de la DL₅₀ por el método de Concentración Mínima Inhibitoria

a) Preparación del inóculo

Cada cepa plenamente identificada se sembró en una caja con agar nutritivo por estría abierta y se incubó a 37° C de 18 a 24 horas. Con un asa estéril se tomaron de 3 a 5 colonias y se sembraron en un tubo con 5 ml de CST enriquecido con 0.5 % de extracto de levadura, los tubos se incubaron en baño maría a 37° C y con agitación por un período de 2 horas. Posteriormente se centrifugaron a 1000 r.p.m. durante 15 minutos, la pastilla de cada tubo se resuspendió con solución salina y se ajustó el inóculo con el espectrofotómetro a 0.08 de absorbancia a 625nm. Se tomó el volumen necesario y se llevó a un matraz Erlenmeyer con CMH para obtener una población aproximada de 1×10^6 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro, correspondiente al inóculo inicial.

b) Preparación del antibiótico

Se prepararon soluciones stock con una concentración de 1280 µg/ml de cada tipo de penicilina: Penicilina G Procaína (PGP), Penicilina G Sódica (PGS) y mezcla de

Penicilina G Procaína y Penicilina G Sódica 3:1 (MPS) y se almacenaron a -70° C hasta su uso.

De la solución stock de PGP, PGS y MPS se tomaron 125 μ l y se diluyeron en 9.875 ml de CMH, alcanzando una concentración de 16 μ g/ml, posteriormente se hicieron diluciones hasta obtener las concentraciones de 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06 y 0.03 μ g/ml.

Para realizar esta prueba se tomaron 2.5 ml de cada concentración a las que se les agregó un volumen de 2.5 ml de inóculo bacteriano con una población de 1×10^6 UFC/ml, con lo que se obtuvo una población de aproximadamente 5×10^5 UFC/ml desafiada con un rango de concentración final de penicilinas de 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, 0.01 μ g/ml (Tabla 1).

Tabla 1. Preparación de tubos con antibiótico y microorganismo para la determinación de la DL_{50} .

Tubo	Volumen de CMH con antibiótico	Concentración μg/ml de antibiótico	Inoculo 1×10^6 UFC	Concentración final de antibiótico μg/ml
1	2.5 ml	16	2.5ml	8
2	2.5 ml	8	2.5ml	4
3	2.5 ml	4	2.5ml	2
4	2.5 ml	2	2.5ml	1
5	2.5 ml	1	2.5ml	0.5
6	2.5 ml	0.5	2.5ml	0.25
7	2.5 ml	0.25	2.5ml	0.12
8	2.5 ml	0.12	2.5ml	0.06
9	2.5 ml	0.06	2.5ml	0.03
10	2.5 ml	0.03	2.5 ml	0.01

Los tubos se incubaron a 37° C durante 24 horas, al término de la incubación, se revisaron y se registró la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que corresponde al tubo donde no se observó turbidez. A partir de éste último, a cada uno de los tubos sin crecimiento visible se les realizó una cuenta viable, tomando 100 µl y diluyéndolos en 9.9 ml de solución salina. Después se sembraron 100 µl de esta dilución en una caja con agar para antibiótico número 1, la cual se incubó durante 24 horas a 37° C para encontrar la Dosis Letal Media (DL₅₀), que corresponde a la muerte de la mitad de la población que se inculó en cada tubo.

c) Controles

La última dilución de cada penicilina así como un tubo con medio de cultivo se incubaron para verificar su esterilidad (controles negativos) y un tubo con microorganismo como prueba de promoción de crecimiento (control positivo). Las pruebas se anularon cuando hubo crecimiento en los controles negativos o que no hubiera crecimiento en el control positivo.

El control de pureza de la cepa se verificó cuando se hizo la cuenta de los inóculos inicial y final, las cuentas de los tubos claros y la cuenta de un tubo con turbidez elegido al azar. La prueba se anuló si se observaba un crecimiento colonial diferente a *S. aureus*.

Para comparar el efecto de las diferentes penicilinas en las cepas de *S. aureus* se realizó un análisis de varianza de una vía.

3.- Determinación del aumento en la resistencia al antibiótico de una cepa sensible.

Una cepa francamente sensible fue incubada por 24 hrs. a 37 °C en CMH que contenía antibiótico en concentración menor a la CMI, llevando a cabo 4 resiembras bajo las mismas condiciones. Posteriormente se resembró en agar, para verificar la pureza de la cepa. Finalmente se determinó la CMI por el método de dilución en caldo.

RESULTADOS

1. Identificación

Setenta y tres de las 173 cepas donadas por el Laboratorio Central del HJM, se corroboraron con las pruebas de tinción de Gram, catalasa, coagulasa y DNAsa como *S. aureus*. De las cepas confirmadas 41 provinieron de pacientes externos y 32 de pacientes internos. A 42 de estas mismas cepas se les aplicó una 2ª corroboración mediante identificación bioquímica (Anexo 1), en la cual todas ellas resultaron ser *S. aureus* (Tabla 2). Confirmadas posteriormente por el personal del Laboratorio de Microbiología del Hospital Juárez de México, con pruebas serológicas usando Slidex Staph-Kit de bioMérieux sa ®, Datos no mostrados.

Tabla 2. Identificación de las cepas originalmente identificadas como *Staphylococcus aureus* en el HJM. E= Externa, I= Interna, HEMO= Hemocultivo, LCFR= liquido cefalorraquídeo, ESPEC=Expectoración, OFTA= Oftálmico, HD= Drenado de herida, LART= Liquido articular, LBRON= Liquido bronquial, G = Gram, CA= Catalasa, CO= Coagulasa, D= DNA'sa

CEPA	FUENTE	ORIGEN	G	CA	CO	D	RESULTADO	CORROBORACION ID. BIOQUÍMICAS
1	E	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
2	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. sp.</i>	No se aplicó
3	E	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
4	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
5	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
6	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
7	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
8	E	NASAL	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
9	E	NASAL	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
10	E	NASAL	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
11	E	NASAL	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
12	E	URO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
13	E	VAGINAL	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
16	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
18	E	VAGINAL	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
19	E	URO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
20	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
21	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
22	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
23	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
24	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó

CEPA	FUENTE	ORIGEN	G	CA	CO	D	RESULTADO	CORROBORACION ID. BIOQUÍMICAS
25	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
26	E	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
27	E	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
28	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
29	E	VAGINAL	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
32	E	VAGINAL	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
33	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
34	E	URO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
35	E	URO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
36	E	URO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
37	E	URO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
38	E	URO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
39	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
42	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
44	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
45	E	VAGINAL	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
46	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
47	E	VAGINAL	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
48	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
49	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
51	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
52	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
53	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
54	E	VAGINAL	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
55	E	VAGINAL	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
56	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
57	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
58	E	NASAL	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
59	E	VAGINAL	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
60	E	FARINGEO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
61	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
62	E	FARINGEO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
63	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
64	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
65	E	FARINGEO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
66	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
67	E	FARINGEO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
68	E	FARINGEO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
69	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
70	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
71	E	VAGINAL	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
72	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
73	E	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
74	E	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
75	E	VAGINAL	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
76	E	VAGINAL	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
77	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
78	E	URO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
79	E	VAGINAL	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
90	E	VAGINAL	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
92	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
95	E	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó

CEPA	FUENTE	ORIGEN	G	CA	CO	D	RESULTADO	CORROBORACION ID. BIOQUÍMICAS
96	E	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
97	E	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
98	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
99	E	SEMEN	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
100	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
101	E	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
102	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
103	E	FARINGEO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
104	E	VAGINAL	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
105	E	VAGINAL	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
106	E	URETRA	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
107	E	ESPECTO.	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
108	E	ESPECTO.	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
110	E	NASAL	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
111	E	NASAL	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
112	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
113	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
114	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
116	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
117	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
118	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
119	E	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
120	E	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
121	E	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
122	E	FARINGEO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
130	E	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
131	E	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus.</i>	Se corroboró
1	I	HEMO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
2	I	HEMO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
3	I	HEMO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
4.	I	LCFR	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
5	I	LCFR	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
6	I	LCFR	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
7	I	HEMO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
8	I	HEMO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
9	I	HEMO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
10	I	LCFR	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
11	I	LCFR	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
12	I	HEMO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
13	I	LCFR	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
14	I	HEMO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
15	I	HEMO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
16	I	HEMO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
17	I	HEMO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
20	I	HEMO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
22	I	HEMO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
23	I	HEMO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
24	I	CATETER	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
25	I	CATETER	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
26	I	CATETER	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
27	I	HEMO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
28	I	HEMO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró

CEPA	FUENTE	ORIGEN	G	CA	CO	D	RESULTADO	CORROBORACION ID. BIOQUÍMICAS
30	I	ESPEC	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
31	I	LART	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
32	I	HEMO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
33	I	LCFR	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
34	I	HEMO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
35	I	NASAL	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
36	I	NASAL	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
37	I	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
38	I	OFTA	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
39	I	ESPEC	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
40	I	FARIN	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
41	I	HD	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
42	I	ESPEC	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
43	I	ESPÉC	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
44	I	FARINGEO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
45	I	HEMO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
46	I	HEMO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
47	I	FARIN	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
48	I	CATE	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
49	I	HEMO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
50	I	OFTA	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
51	I	OFTA	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
52	I	URO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
53	I	LART	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
54	I	FARIN	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
55	I	URO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
56	I	CATE	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
57	I	FARINGEO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
58	I	OTICO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
59	I	ABSCESO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
60	I	LBRON	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
61	I	OTICO	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
62	I	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
63	I	HEMO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
64	I	HEMO	+	+	-	+	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
65	I	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
66	I	URO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
67	I	CATETER	+	+	-	-	<i>Staph. Sp.</i>	No se aplicó
69	I	HEMO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
70	I	HEMO	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
71	I	LCFR	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
72	I	LCFR	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
73	I	LCFR	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
74	I	LCFR	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
75	I	LCFR	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
76	I	LCFR	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	No se aplicó
77	I	LCFR	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró
78	I	LCFR	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	Se corroboró

2. Pruebas de sensibilidad

De las 73 cepas identificadas como *S. aureus*, se encontraron 64 cepas resistentes, 3 indeterminadas y 6 sensibles a la penicilina. Cabe hacer notar que aunque hubo una cantidad similar de cepas resistentes entre pacientes externos e internos, las cepas sensibles provinieron en su mayoría, de pacientes externos (Tabla 3).

Tabla 3. Sensibilidad de las cepas de *S. aureus*, por el método de difusión en agar usando discos con 10U de penicilina G. Las cepas se consideraron resistentes cuando el halo de inhibición fue menor a 20 mm, indeterminada cuando éste midió entre 20 y 29 mm y sensible con un halo mayor de 29 mm. Según el criterio de NCCLS. (Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico). S/H sin halo de inhibición.

CEPA	FUENTE	ORIGEN	HALO DE INHIBICIÓN (mm)	RESULTADO
1	E	URO	11	Resistente
3	E	URO	16	Resistente
5	E	FARINGEO	16	Resistente
6	E	FARINGEO	14	Resistente
9	E	NASAL	13	Resistente
10	E	NASAL	31	Sensible
13	E	VAGINAL	15.5	Resistente
18	E	VAGINAL	14	Resistente
26	E	URO	16.5	Resistente
27	E	URO	14.5	Resistente
28	E	FARINGEO	14	Resistente
32	E	VAGINAL	16	Resistente
33	E	FARINGEO	15.5	Resistente
39	E	FARINGEO	19	Resistente
42	E	FARINGEO	11.5	Resistente
44	E	FARINGEO	18	Resistente
47	E	VAGINAL	30	Sensible
51	E	FARINGEO	19	Resistente
56	E	FARINGEO	16.5	Resistente
57	E	FARINGEO	14.5	Resistente
58	E	NASAL	17	Resistente
61	E	FARINGEO	15	Resistente
69	E	FARINGEO	23	Indeterminada
71	E	VAGINAL	22	Indeterminada
73	E	URO	15.5	Resistente
74	E	URO	14	Resistente
75	E	VAGINAL	14.5	Resistente
76	E	VAGINAL	16.5	Resistente
90	E	VAGINAL	31	Sensible
92	E	FARINGEO	11	Resistente
95	E	URO	11	Resistente
96	E	URO	16	Resistente

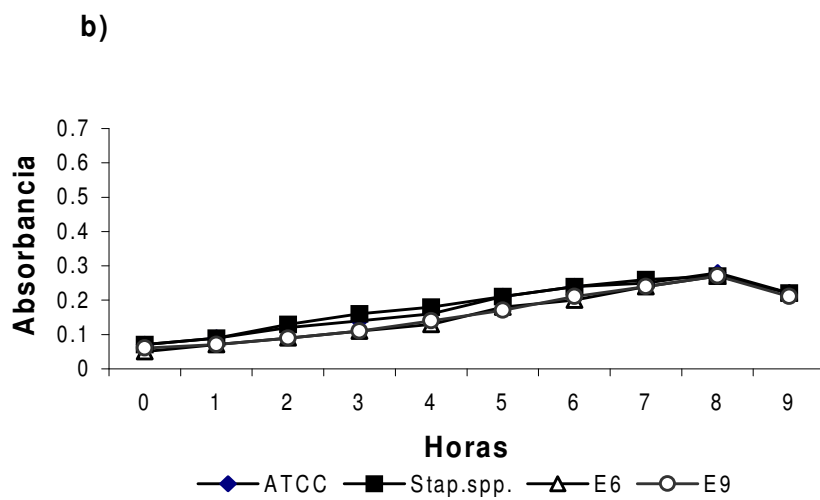
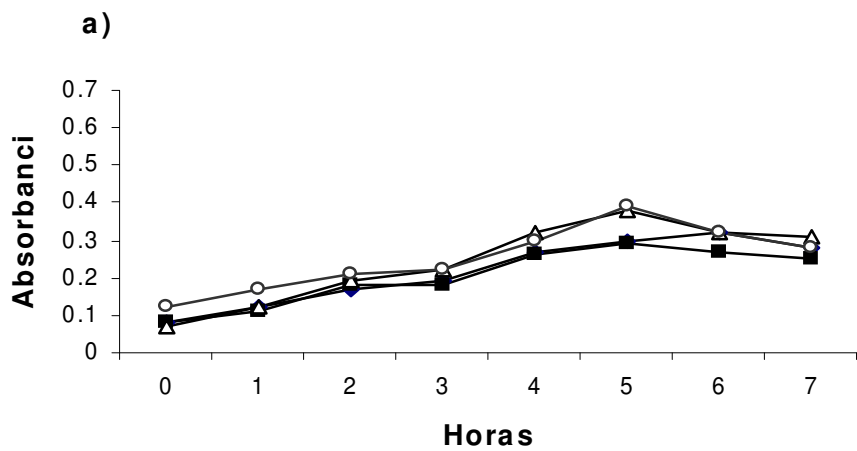
CEPA	FUENTE	ORIGEN	HALO DE INHIBICIÓN (mm)	RESULTADO
97	E	URO	13	Resistente
101	E	URO	13	Resistente
111	E	NASAL	17	Resistente
112	E	FARINGEO	15	Resistente
113	E	FARINGEO	11	Resistente
119	E	URO	31	Sensible
120	E	URO	13	Resistente
121	E	URO	14	Resistente
131	E	FARINGEO	30	Sensible
7	I	HEMO	S/H	Resistente
9	I	HEMO	S/H	Resistente
11	I	LCFR	S/H	Resistente
23	I	HEMO	15	Resistente
24	I	CATETER	S/H	Resistente
25	I	CATETER	21	Indeterminada
28	I	HEMO	15	Resistente
30	I	ESPEC	16	Resistente
31	I	LART	13	Resistente
34	I	HEMO	S/H	Resistente
35	I	NASAL	14	Resistente
36	I	NASAL	15	Resistente
37	I	URO	S/H	Resistente
38	I	OFTA	15	Resistente
41	I	HD	16.5	Resistente
44	I	FARINGEO	16.5	Resistente
46	I	HEMO	16	Resistente
53	I	LART	15.5	Resistente
60	I	LBRON	11	Resistente
62	I	URO	S/H	Resistente
65	I	URO	30.5	Sensible
66	I	URO	13	Resistente
69	I	LCFR	16	Resistente
70	I	LCFR	S/H	Resistente
71	I	LCFR	S/H	Resistente
72	I	LCFR	17.5	Resistente
73	I	LCFR	14	Resistente
74	I	LCFR	17	Resistente
75	I	LCFR	S/H	Resistente
76	I	LCFR	S/H	Resistente
77	I	LCFR	16	Resistente
78	I	LCFR	17	Resistente

El resultado de la prueba estadística de ji cuadrada indica que si hay diferencia entre el número de cepas resistentes aisladas de pacientes externos y cepas resistentes aisladas de pacientes internos corroborando que la resistencia de *S. aureus* a penicilina se da con mayor frecuencia dentro de hospitales. ($P = 7.38$, y $\alpha 0.025$).

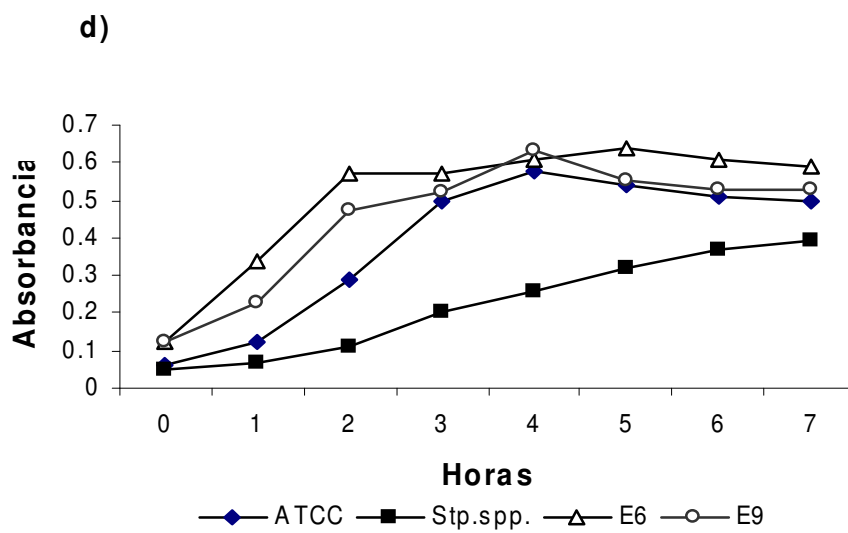
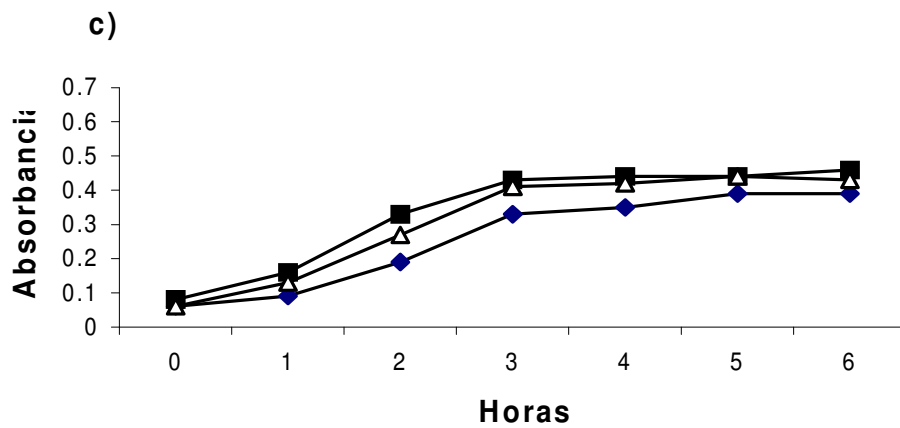
3. Selección del medio de cultivo previo al medio de prueba.

Para la selección del medio de cultivo se registró la curva de crecimiento de la cepa *S. aureus* ATCC 6538 P como referencia, las cepas problema E6 y E9 y *Staphylococcus sp* como control externo. Se observó que en todos los medios de cultivo probados, la fase de crecimiento exponencial se alcanza después de la 2ª hora de incubación. Sin embargo, la duración de dicha fase fue variable de acuerdo al medio de cultivo utilizado. La fase exponencial en CN duró 3 horas, en CMH duró 6 horas, en CST se extendió por 3 horas y en CST5 se prolongó por 1 hora solamente (Gráfica 1), por lo que este último medio se seleccionó para llevar a cabo las pruebas de determinación de la DL₅₀.

A cada una de las cepas seleccionadas se les determinó su cinética de crecimiento, y no se observó diferencia entre ellas (Anexo 2).



Grafica 1. Cinética de crecimiento de *S. aureus* en 4 medios de cultivo a) Caldo Nutritivo, b) Caldo Müller Hinton, c) Caldo Soya Trypticaseína y d) Caldo soya Trypticaseína enriquecido con 5% de extracto de levadura. Las lecturas se registraron cuando se alcanzó la fase estacionaria.



Grafica 1. Continuación

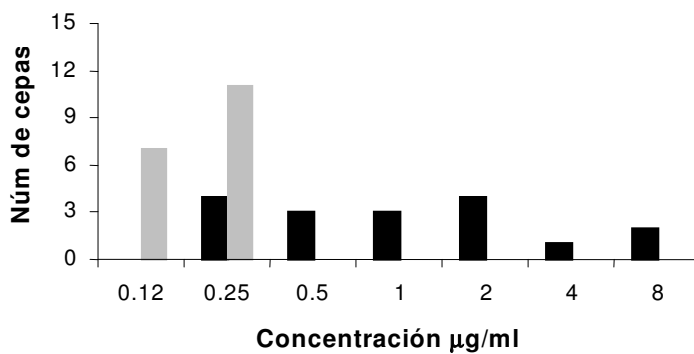
4. Selección de la concentración de penicilina para determinar la DL₅₀

Esta selección se realizó por el método del replicador de Steers, en donde adicionalmente se encontró la sensibilidad o resistencia y la CMI de cada cepa seleccionada. En esta prueba de sensibilidad, el NCCLS establece que una cepa es resistente cuando crece a una concentración igual o mayor a 0.12 µg/ml de penicilina.

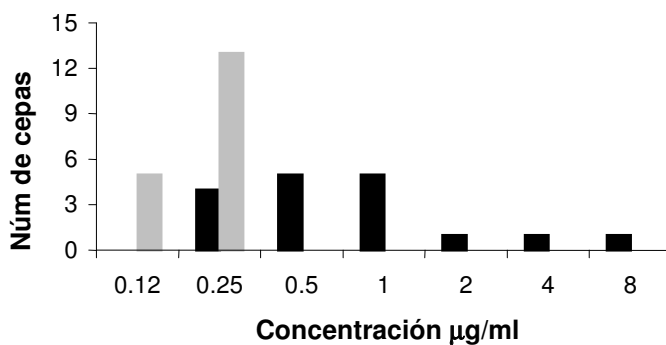
Se encontraron 17 cepas externas y 19 internas resistentes, 7 cepas externas y 1 interna sensible a Penicilina G Procaína (PGP), Penicilina G Sódica (PGS) y a la Mezcla de PGP y PGS 3:1. (Anexo 3).

La CMI para las cepas de origen externo fue variable, encontrando desarrollo en concentraciones mayores a 0.5 µg /ml, mientras que las cepas de origen interno fueron inhibidas a bajas concentraciones de las diferentes penicilinas (Gráfica 2).

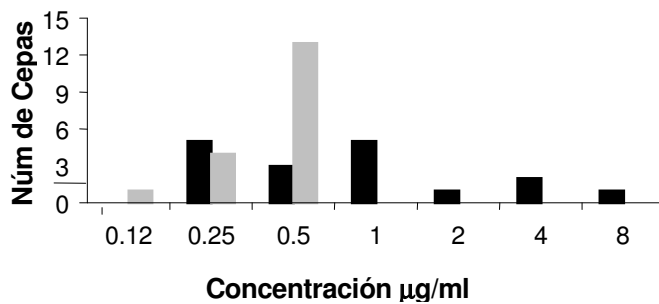
a) CMI Replicador de Steers PGP



b) CMI Replicador de Steers PGS



c) CMI Replicador de Steers MPS



■ Cepas externas ■ Cepas internas

Gráfica 2. Concentración Mínima Inhibitoria de Penicilina G Procaína (PGP), Penicilina G Sódica (PGS) y Mezcla de PGP Y PGS 3:1 (MPS) de las cepas seleccionadas.

5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida (CB)

El rango de concentración para cada tipo de penicilinas por el método de dilución en caldo, fue de 0.25 $\mu\text{g/ml}$ a 8 $\mu\text{g/ml}$ para cepas resistentes o indeterminadas, y para las cepas sensibles fue de 0.01 $\mu\text{g/ml}$ a 0.25 $\mu\text{g/ml}$.

En general se encontraron mayor número de cepas con $\text{CMI} \geq 8 \mu\text{g/ml}$ por lo menos en un tipo de penicilina. Las cepas E61, E26, I41, I44, I25 e I66 la CMI fue $\geq 8\mu\text{g/ml}$ en los tres tipos de penicilina.

La CMI de 3 cepas fue menor a la concentración mínima probada (0.25 $\mu\text{g/ml}$)

La CB no se presentó (NP) en la mayoría de las cepas, cabe mencionar que en los casos de las cepas E5, E6, E18, I46, I72 e I78 la CB es la misma que la CMI (Tabla 4).

En 11 cepas de pacientes externos y 9 de pacientes internos se encontraron resultados contrarios a los esperados, ya que después de determinada la CMI o la CB se observó crecimiento evidente (o recuperación de UFC), por lo menos en una de las tres penicilinas.

En las cepas sensibles la CMI es predominantemente de 0.06 $\mu\text{g/ml}$, siendo éste el límite para poder clasificarlas como sensibles bajo los parámetros de este método (sensible con crecimiento evidente igual o mayor a 0.06 $\mu\text{g/ml}$).

En la mayoría de estas cepas sensibles la CMI es la misma que la CB o se presentó en la concentración mayor inmediata (Tabla 4).

El análisis de varianza de una vía indicó que no hubo diferencia significativa entre el efecto de la PGP, PGS y MPS en cada cepa, con un valor crítico para F de 3.6823 y α 0.05.

Tabla 4. CMI y CB a los diferentes tipos de penicilina, E= cepas de pacientes de consulta externa, I = cepas de pacientes internos, (*) cepas sensibles, PGP = Penicilina G Procaína, PGS = Penicilina G Sódica, MPS = mezcla de PGP y PGS, NP = No presentó.

PGP mg/ml			PGS mg/ml		MPS mg/ml	
CEPA	CMI	CB	CMI	CB	CMI	CB
E5	1	2	<0.25	<0.25	4	NP
E6	1	1	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
E39	2	NP	8	NP	8	NP
E51	2	8	4	NP	4	NP
E57	8	NP	>8	NP	4	NP
E61	>8	NP	>8	NP	>8	NP
E69	0.5	NP	0.5	NP	0.5	4
E9	8	NP	8	NP	8	NP
E58	8	NP	4	NP	8	NP
E13	>8	NP	8	NP	8	NP
E18	4	NP	1	1	>8	NP
E32	8	NP	>8	NP	>8	NP
E71	8	NP	2	NP	2	NP
E75	4	NP	8	NP	8	NP
E76	>8	NP	4	8	>8	NP
E3g	1	2	0.5	8	0.5	1
E26	>8	NP	>8	NP	>8	NP
I23	4	NP	4	NP	8	NP
I28	2	NP	4	NP	2	NP
I46	1	NP	1	NP	2	2
I69	8	NP	>8	NP	>8	NP
I41	>8	NP	>8	NP	>8	NP
I44	>8	NP	>8	NP	>8	NP
I30	1	8	1	4	1	8
I35	1	NP	0.5	4	2	8
I36	<0.25	0.5	<0.25	0.5	<0.25	8
I38	8	NP	>8	NP	>8	NP
I53	8	NP	4	NP	>8	NP
I25	>8	NP	>8	NP	>8	NP
I31	8	NP	8	NP	>8	NP
I66	>8	NP	>8	NP	>8	NP
I72	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5
I73	4	NP	4	NP	4	NP
I74	>8	NP	>8	NP	>8	NP
I77	2	NP	8	NP	2	NP
I78	0.5	4	0.5	0.5	0.5	4
C4*	>0.25	NP	0.25	0.25	0.25	0.025
C5*	0.25	NP	<0.01	<0.01	>0.25	NP
E10*	0.06	0.06	0.25	NP	0.12	0.12
E47*	0.12	0.12	0.12	NP	0.06	0.25
E90*	0.12	0.12	0.12	0.25	0.12	0.12
E119*	0.12	0.12	0.25	0.25	0.25	0.25
E131*	0.25	NP	0.12	0.12	0.25	NP
I65*	0.12	0.25	0.06	0.12	0.12	0.12

6. Determinación de la Dosis Letal Media DL₅₀

De las cepas seleccionadas sólo a 11 se les determinó la DL₅₀, 5 cepas de pacientes externos y 6 cepas de pacientes internos, determinándose con mayor frecuencia en MPS en la mayor concentración probada 8 µg/ml, seguida de PGS a concentraciones variables. La cepa I 65 es una cepa sensible, por lo que 0.25 µg/ml es la máxima concentración de prueba para este tipo de cepas (Tabla 5).

Tabla 5. DL₅₀ de cepas de *S. aureus*, se indica la concentración (µg/ml) en donde se recuperaron aproximadamente 2.5 X10⁵ UFC. E= Externa; I = Interna. PGP = Penicilina G Procaína; PGS = Penicilina G Sódica; MPS = mezcla de PGP y PGS (3:1). NP = No presentó

CEPA	PGP	PGS	MPS
E3	NP	NP	8
E5	NP	0.5	NP
E58	NP	NP	8
E69	NP	1	8
E75	4	NP	NP
I23	NP	NP	8
I30	NP	8	1
I36	NP	NP	2, 4
I38	8	NP	NP
I72	NP	2	NP
I65	NP	0.25	NP

6. Aumento de la CMI de una cepa sensible a penicilina a partir de resiembra en medio de cultivo con penicilina.

La cepa I65 sensible en los tres métodos usados, después de resembrarla en caldo MH con penicilina en concentraciones inferiores a CMI determinada inicialmente, aumento la CMI y la CB (Anexo 4).

DISCUSIÓN

La diferencia que hubo en porcentaje de las cepas identificadas como *S. aureus* entre el Laboratorio Central del HJM y el Laboratorio de Microbiología se debió a que existen otras cepas del género que también son coagulasa +, aunque ésta prueba se considera como un “estandar” para identificar *S. aureus* (Mahudeau *et al.*, 1997; Du Toit *et al.*, 2000). Por ello debe considerarse la posibilidad de aislar otras especies, que dan positivo con esta misma prueba tal como *S. intermedius* (Mahoudeau *et al.*, 1997). Asimismo, la calidad del plasma influye en el tiempo y en la formación del gel, dado por la reacción, lo que puede originar la interpretación errónea de la prueba (Holliday, 1999), por lo que se ha sugerido la aplicación de pruebas más sensibles. Debido a lo anterior, incluimos en nuestro trabajo la prueba de DNAsa dentro del marco de pruebas básicas para la identificación selectiva de *S. aureus*. Además se implementó una serie de pruebas bioquímicas para corroborar las identificaciones, ya que el uso de paquetes comerciales para la identificación del género de *Staphylococcus* se considera incompleto (Kawamura *et al.*, 1998). Esto explica por qué la cantidad de cepas de *S. aureus* con las que se trabajó en el Laboratorio de Microbiología, fue menor que las originalmente aportadas por el Laboratorio Central del HJM.

Con la prueba estadística de χ^2 se evidenció que el número de cepas resistentes en ambientes hospitalarios es diferente al número de cepas resistentes de origen externo; aunque cabe hacer notar que los grados de resistencia son parecidos. Esto conlleva a suponer que hay un mal manejo del antibiótico tanto adentro como fuera del hospital (Guillemot, 1999). En este último caso, las personas se automedican, lo hacen por tratamiento de una enfermedad igual o parecida, como prevención, porque no consideran necesaria la prescripción médica o bien suponen que una gripe es generada sólo por bacterias, lo cual también es una suposición muy común, entre algunos médicos (Vaden *et al.*, 2003). Por otro lado, considerar a esta prueba de sensibilidad como determinante para asegurar o descartar el uso de un antibiótico es un error (Doer, 1992), ya que las condiciones en que se realiza la prueba son diferentes a las que existen cuando se produce la infección.

El porcentaje de pacientes ambulatorios infectados con *S. aureus* no ha aumentado en los últimos años, considerando los registros de Jiménez (1996) y Monroy (1997).

En los diferentes medios de cultivo probados se observó que el crecimiento de las cepas aisladas y ATCC de *S. aureus* es igual en cada medio de cultivo. Sin embargo el momento en que se alcanza la fase lag y la duración de la fase exponencial es diferente, para cada medio de cultivo. Por lo que se eligió el CST5 en el que la primera fase es poco perceptible y por lo tanto la fase exponencial inició casi de manera inmediata, esto se debe a la gran disponibilidad de nutrimentos proporcionados, lo cual promueve una tasa de división más activa. Debido a esto, la duración de la fase exponencial es de un tiempo corto. Sin embargo para los fines de nuestro trabajo, la división celular, que incluye la síntesis de pared celular es importante pues es en esta etapa donde la penicilina tiene el efecto bactericida.

Las técnicas usadas para la determinación del efecto de la penicilina tuvieron diferentes etapas. Para la sensibilidad, se utilizó la prueba de difusión en agar mencionada anteriormente, para la selección de concentración de antibiótico, se utilizó el replicador de Steers y la dilución en caldo se utilizó para la determinación de CMI, CB y DL₅₀.

Con la primera técnica se encontró que hay diferentes grados de resistencia permitiendo el crecimiento incluso hasta el borde del disco. Este método es el de uso más común para evaluar la sensibilidad o resistencia de *S. aureus*.

La sensibilidad determinada por el replicador de Steers, es un método en donde se pueden trabajar 20 cepas en una caja con agar y antibiótico, lo cual disminuye los falsos positivos. Este método se usó para determinar la mínima y máxima concentración de antibiótico a probar en las cepas de *S. aureus*. Se observó que la concentración de antibiótico necesario para inhibir el crecimiento de las cepas externas fue mayor que el necesario para inhibir a las cepas internas. En general, se observa que las cepas externas son resistentes a los dos tipos de penicilina y a la mezcla probada.

Las cepas sensibles, tanto de origen interno como externo, son francamente sensibles, es decir, no hubo crecimiento en el rango de concentración que determinan la sensibilidad menor a 0.12 µg/ml teniendo como control negativo a la cepa ATCC 6538 P (sensible) y ATCC 29213 como control positivo. Existe diversidad de la CMI de cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina y también grados de sensibilidad que están entre 0.05-12.5 µg/ml de benzilpenicilina (Sabath, 1976).

La comparación de los resultados obtenidos con la prueba de difusión en agar y la del replicador de Steers no mostraron una equivalencia entre el diámetro del halo de inhibición y la concentración a la que se inhibe el crecimiento. Sin embargo, ambas pruebas arrojaron el mismo número de cepas resistentes y sensibles. Esto mismo se observa tanto en cepas aisladas de pacientes externos como en las de pacientes internos.

Por el método del replicador, el grado de resistencia se hizo más evidente debido a que se probaron varias concentraciones de antibióticos. Sin embargo, la no equivalencia antes mencionada puede deberse a que en el método de difusión radial, la cepa se expande en el agar y el disco con antibiótico se coloca posteriormente. Aquí, es importante el tiempo de difusión del antibiótico en el agar y el tiempo de división de la cepa, también influyen los componentes del medio de cultivo. Mientras que en el método del replicador de Steers la bacteria se pone en contacto inmediatamente con el antibiótico, lo que disminuye el tiempo que tiene la cepa para activar algún mecanismo que inhiba la penicilina. En este método también debe considerarse el grado de dilución del antibiótico, la estabilidad del mismo. En ambos métodos debe cuidarse la concentración del inóculo. Reafirmando lo probado por Du Toit (2000), quien comparó métodos de difusión en agar, microdilución en caldo y microdilución en gel, usando *M. luteus* y gramicidina; la prueba de difusión en agar es la menos adecuada para la determinación de parámetros como CMI, CB y la DL_{50} .

Las penicilinas probadas actúan de la misma manera sobre las cepas, es decir que no hay diferencia significativa en su actividad contra las cepas de *S. aureus*. Sin embargo, algunas cepas externas e internas tuvieron un comportamiento diferente al supuesto, pues se esperaba que el número de UFC disminuyera conforme la concentración de antibiótico aumentaba, lo cual no se dió en todos los casos. Estas cepas mostraron una curva de mortalidad no monotónica, pues en lugar de mantenerse sin crecimiento en concentraciones mayores a la CMI, presentaron mayor crecimiento con concentraciones superiores a la mínima. La curva de una resistencia neta, está dada por la turbidez de los tubos en todas las concentraciones probadas. La curva de un comportamiento que podemos llamar normal o monotónica, es aquella en la que el número de microorganismos disminuye gradualmente al aumentar la concentración de antibiótico.

En el caso de las cepas sensibles, el comportamiento de las cepas ante las penicilinas probadas fue en general homogéneo y con una tendencia monotónica. Exceptuando las

cepas I65 y E90 cuyas curvas de mortalidad también mostraron el comportamiento atípico señalado anteriormente.

La mayoría de los estudios realizados a *S. aureus* están basados en la sensibilidad o resistencia a meticilina, otro antibiótico inhibidor de la enzima β -lactamasa, cuya actividad provee resistencia a la penicilina. También se han identificado fagos estafilococales que producen β -lactamasa del tipo A (Skernodle, 1998) los cuales pueden conferir resistencia a la penicilina. Sin embargo la actividad β -lactamasa no es el único camino por el cual *S. aureus* resiste o inactiva a la penicilina, pues *S. aureus* genera PBPs. La producción de estas proteínas es una característica intrínseca de *S. aureus* que le permite resistir a la meticilina (Boyce, 1987), aunque también considera a la producción de β -lactamasa como muy importante para la inactivación de este antibiótico (Boyce, 1987).

Podríamos suponer que las cepas resistentes a Penicilina G tienen esta característica, ya sea porque producen β -lactamasa o porque las PBPs neutralizan el efecto del antibiótico o por la existencia de ambos mecanismos. Por ello, se esperaba que las cepas resistentes a penicilina soportaran cualquier concentración del antibiótico. Sin embargo existieron casos en donde la dosis relativamente bajas de penicilina eliminaron totalmente a cepas consideradas resistentes.

Si consideramos la letalidad por plasmólisis, ésta se da por porinas y enzimas defectuosas que transitan por la membrana o bien por la lisis celular durante la primera fase de crecimiento. Esto se debe a un defecto en la síntesis de la mureína hidrolasa y en ambos casos, la síntesis de estas enzimas está estimulada por la presencia de la penicilina, lo que conduce a la muerte bacteriana; se da en diferentes fases del crecimiento bacteriano (Bayles, 2000). Lo anterior puede ser una explicación de la eficacia de la penicilina en diferentes fases de crecimiento, ya que la producción de β -lactamasa depende de varias señales proteolíticas, al igual que la eficacia de las proteínas de unión a penicilina (Archer *et al.* 2001; Zhang *et al.*,2001).

En las cepas donde hubo comportamientos no monotónicos, podemos suponer que la concentración de antibiótico estimula la síntesis de β -lactamasa o la síntesis de PBPs de alta afinidad, ya que la recuperación de UFC a concentraciones mayores fue, en algunos casos hasta 10 veces superior al inoculado. Drlica (2001) considera que hay concentraciones de antibiótico que seleccionan a las cepas resistentes. A esta concentración la llama “ventana

de selección”, la cual es identificada también como “concentración preventiva de mutantes”. Lo anterior puede explicar nuestros resultados, ya que después de la supuesta CMI y CMB se recuperaron microorganismos, por lo que se puede suponer que la concentración estimula un mecanismo contra el antibiótico de tal manera que se obtiene un incremento de la resistencia. Conforme va sintetizándose β -lactamasa o bien las PBPs actúan, la concentración de antibiótico va eliminando parte de la población y al mismo tiempo agotándose, seleccionando entonces cepas resistentes. Como la concentración del antibiótico no es la misma, pues parte de éste se ha utilizado en la población bacteriana que ha muerto, puede haber selección de resistentes e iniciarse un ciclo de divisiones que conduce al aumento en el número de UFC recuperadas.

Los términos de tolerancia o resistencia aún no están bien definidos en la literatura, ya que Sabath *et al.* (1977) hablan de tolerancia cuando una cepa de *S. aureus* sobrevive a grandes cantidades de antibiótico y presenta CMI o CB a bajas concentraciones y que esta característica está relacionada con las autolisinas, pues demostró que en una cepa no tolerante de *S. aureus* hay un incremento en la síntesis de autolisina, mientras que en cepas tolerantes esta síntesis no se da, después de la adición de nafcidin. Bayles (2000) relaciona la capacidad del microorganismo para sobrevivir a altas concentraciones con el término de resistencia.

En los tubos donde el crecimiento fue evidente, confirmamos que la cepa fue resistente, cuando la cepa se recuperó de los tubos claros con concentraciones mayores a la CMI o la CB se le consideró como tolerante tomando en cuenta las características de las cepas con respecto al comportamiento que tuvieron ante la exposición a la penicilina.

Comparando las pruebas de dilución en caldo con la del replicador, no existe consistencia en los resultados en cuanto a la concentración a la que son resistentes. Esto puede deberse a que en el medio líquido la cepa encuentre nutrientes con más disponibilidad, lo que promueve la reproducción de la bacteria en un tiempo menor y más homogéneamente que en el medio sólido. Por otro lado, las condiciones del medio líquido que rodea al microorganismo también pueden resultar desventajosas para la bacteria, ya que el antibiótico está en contacto con toda la superficie celular, provocando un efecto bactericida

a menos que las bacterias tengan los mecanismos que las protejan, tales como la producción de β -lactamasa y proteínas de unión a penicilina.

Con respecto a las cepas sensibles, considerando los tres métodos, podemos decir que hay consistencia en los resultados, pues fueron sensibles en todos los métodos probados. En el método de dilución en caldo se obtuvieron datos interesantes, como el crecimiento de la cepa a una concentración mayor establecida por la NCCLS para este método, la cual es de 0.06 $\mu\text{g/ml}$, con lo que podemos sugerir que dichas cepas son resistentes en potencia. Es decir, que de alguna manera, y bajo circunstancias específicas pueden manifestar resistencia a la penicilina.

Teóricamente la DL_{50} debe ser mayor que la CMI y menor a la CB, lo cual no se cumplió.

En las cepas E58, I23 e I38 podríamos sugerir que estas cepas están dentro del concepto anterior, ya que en la CMI se esperaba que hubiera sobrevivientes, en estos casos el número de UFC recuperados corresponde a la DL_{50} y es la misma concentración a la que se encontró la CMI. El resto de las cepas están fuera del concepto ya que la DL_{50} se determinó en concentraciones mayores a la CB caracterizando a estas cepas por comportamiento no monotónico, estas tienen quizá características genéticas las cuales se expresan de modo específico a las diferentes concentraciones de antibiótico a las que se les retó.

Existen datos en donde la administración de 2 antibióticos son efectivos y el tratamiento es eficaz. Sin embargo, tratamientos con un solo antibiótico de diferente naturaleza no son igualmente efectivos contra cepas tolerantes y sensibles. Voorn *et al.* (1991) demostró que una combinación de cloxacilina (β -lactámico) y gentamicina (aminoglucosido) son igualmente efectivos para cepas de *S. aureus* tolerante y no tolerante, mientras que por separado no tienen el mismo efecto. Sin embargo, la cloxacilina tuvo un efecto más pronunciado que la gentamicina, en cepas tolerantes y no tolerantes.

Un antibiótico puede ser más efectivo en una cepa que en otra, como menciona Guillemot (1999), para *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, cuando se da tratamiento con betalactámico, la resistencia se incrementa, aumentando la CMI para penicilina G.

Lo anterior muestra que, aún siendo la misma especie, las cepas tienen respuestas diferentes ante un mismo antibiótico.

La cepa I69 sensible por las tres técnicas, fue sometida a concentraciones inferiores a la CMI (0.01 µg /ml) al someterla a la prueba de dilución en caldo por segunda ocasión se comprobó que en las tres penicilinas la CMI aumentó después del tratamiento. Es importante señalar que esta cepa sensible presentó curvas mortales no monótono en PGS y MPS antes del tratamiento, el cual se conservó en PGS y se presentó en PGP, la CB se mantuvo después de determinada.

Autores como Viano *et al.* (1979) encontraron que concentraciones de antibióticos β-lactámicos por debajo de la CMI afectan propiedades antigénicas de *Salmonella spp.*, Lorian y Atkinson (1976) demostraron que *S. aureus* tuvo alteraciones en la parte interna de la pared celular cuando se cultiva en concentraciones menores a la CMI de penicilina. Doss *et al.* (1993) demostraron que concentraciones inferiores a la CMI de lincomicina y clinomicina inhiben la producción de coagulasa y hemolisina, por otro lado Ohlsen *et al.* (1998) demostraron que la producción de toxinas alfa y delta hemolisina se estimuló cuando se expusieron a concentraciones sub CMI de meticilina. Las anteriores afirmaciones conducen a la importancia de mantener una dosis de antibiótico adecuada para evitar variaciones en las cepas, que puedan ser perjudiciales al hombre.

El análisis de varianza de una vía indica que no hay diferencia significativa de la actividad antimicrobiana entre los dos tipos de penicilina y la mezcla de ambas.

Se hicieron cálculos necesarios para obtener la concentración a probar independientemente de la potencia o pureza de cada penicilina. La diferencia básica entre PGP y PGS es la sustitución de un Hidrógeno (H) por una molécula de Sodio (Na) en el ácido carboxílico del anillo β-lactámico, ésta le confiere la características de cristalina y de solubilidad, pues en los preparados farmacológicos con presentación inyectable la PGP forma una suspensión y la PGS una solución. Debido a esto, la concentración máxima de PGP en la sangre se obtiene en un periodo alrededor de 2 horas. Para la PGS, esta concentración máxima se alcanza en 30 minutos. En la mezcla se esperaba que por la diferente solubilidad de las penicilinas el efecto de la PGP continuara al efecto de la PGS, lo cual explicaría las curvas mortales no monótonas encontradas. Sin embargo, estas respuestas se encontraron en las pruebas realizadas con un solo tipo de penicilina, por lo que las curvas no monótonas se

deben a algún otro mecanismo de resistencia a la penicilina y no a la diferencia de solubilidades de las mismas.

En resumen:

La purificación de una muestra es indispensable para la identificación correcta de una cepa.

La implementación de DNAsa como prueba preliminar para la identificación de *S. aureus* resulta adecuada.

El método de difusión en agar es adecuado para conocer la sensibilidad o resistencia de *S. aureus*.

El porcentaje de cepas resistentes intra-hospitalarias es mayor que las cepas resistentes externas.

Las curvas de crecimiento fueron homogéneas en todas las cepas, lo que significa que *S. aureus*, independientemente de la fuente y origen de aislamiento posee la misma dinámica de crecimiento. Obteniendo en menor tiempo la fase exponencial en el medio de cultivo enriquecido con extracto de levadura.

La prueba de Replicador de Steers o dilución en agar es un método preliminar para la determinación de la CMI.

Estadísticamente no hay diferencia del efecto de PGP, PGS y MPS sobre cepas de *S. aureus*.

La prueba de dilución en caldo es necesaria para la determinación de la CMI CB, e indispensable para la DL₅₀.

CONCLUSION

Al elegir el antibiótico se puede seleccionar una cepa sensible y al mismo tiempo potencialmente resistente, esta resistencia se evidenciará cuando el antibiótico sea administrado a una concentración determinada. Por lo anterior, para conocer el grado de sensibilidad a la penicilina es más recomendable la prueba de dilución en caldo, determinando la CMI y la DL50 sobre las cepas aisladas de diferentes ambientes.

Con la prueba de dilución en caldo se evidenció que una cepa resistente puede presentar dos comportamientos, 1) no monotónicos y 2) por gradiente y ambos pueden darse en cepas de ambientes internos y externos.

Anexo 1. Esquema de bioquímicas aplicadas a las cepas identificadas previamente como *S. aureus*, con tinción de Gram, Catalasa, Coagulasa y DNAsa positivos. E = cepas externas, I = cepas internas

Cepa	Trehalosa	Manitol	Manosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa	N-acetil	Rafinosa	V/P	Urea
ATCC 6538	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
3G	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
4C	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
5C	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E9	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E13	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E18	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E26	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
E32	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
E39	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
E47	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E51	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
E57	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
E58	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E61	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E69	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
E71	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
375	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E76	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
E90	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
E119	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
E131	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
I23	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
I25	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
I28	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
I30	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
I31	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
I35	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
I36	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
I38	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
I41	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
I44	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
I46	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
I153	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
I65	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
I66	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
I69	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
I72	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
I73	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
I74	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
I77	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
I78	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Anexo 2. Cinética de crecimiento para cada cepa identificada como *S. aureus*. En Caldo Soya Trypticaseína enriquecido con 5% de extracto de levadura. Durante un periodo de 8 horas leídas a 625 nm . E, C= cepas de pacientes externos. I = pacientes internos.

CEPA														
HORA	E3	4C	5C	E5	E6	E9	E10	E13	E18	E26	E32	E39	E47	
1	0.11	0.12	0.11	0.12	0.12	0.12	0.12	0.1	0.11	0.11	0.07	0.075	0.06	
2	0.29	0.25	0.24	0.3	0.34	0.23	0.34	0.26	0.31	0.28	0.19	0.22	0.16	
3	0.51	0.54	0.5	0.55	0.57	0.47	0.58	0.49	0.55	0.52	0.45	0.5	0.39	
4	0.58	0.62	0.61	0.6	0.57	0.52	0.6	0.63	0.57	0.55	0.58	0.53	0.57	
5	0.6	0.65	0.66	0.62	0.61	0.63	0.64	0.65	0.61	0.57	0.6	0.55	0.56	
6	0.58	0.64	0.59	0.62	0.64	0.55	0.65	0.6	0.62	0.58	0.63	0.57	0.59	
7	0.53	0.61	0.59	0.59	0.61	0.53	0.63	0.61	0.61	0.58	0.63	0.57	0.59	
8	0.56	0.59	0.54	0.56	0.59	0.53	0.61	0.61	0.59	0.57	0.61	0.51	0.52	

CEPA													
HORA	E51	E57	E58	E61	E69	E71	E75	E76	E90	E119	E131	ATCC6538P	
1	0.06	0.06	0.08	0.65	0.8	0.06	0.07	0.07	0.08	0.06	0.07	0.06	
2	0.17	0.14	0.17	0.2	0.2	0.175	0.185	0.2	0.22	0.17	0.18	0.12	
3	0.44	0.39	0.33	0.49	0.43	0.42	0.42	0.47	0.48	0.44	0.39	0.29	
4	0.52	0.52	0.53	0.52	0.64	0.55	0.55	0.55	0.53	0.52	0.56	0.5	
5	0.52	0.52	0.6	0.52	0.63	0.6	0.6	0.565	0.57	0.52	0.55	0.58	
6	0.54	0.57	0.62	0.55	0.64	0.63	0.63	0.62	0.55	0.56	0.51	0.54	
7	0.57	0.57	0.61	0.57	0.64	0.62	0.62	0.61	0.54	0.58	0.51	0.51	
8	0.54	0.5	0.6	0.53	0.64	0.63	0.6	0.62	0.5	0.56	0.5	0.5	

CEPA													
HORA	I23	I25	I28	I30	I31	I35	I36	I38	I41	I44	I46	I53	I65
1	0.06	0.06	0.07	0.07	0.06	0.06	0.08	0.08	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06
2	0.19	0.17	0.15	0.21	0.21	0.14	0.21	0.16	0.15	0.17	0.17	0.19	0.24
3	0.44	0.34	0.36	0.46	0.46	0.37	0.49	0.35	0.37	0.34	0.33	0.41	0.47
4	0.54	0.51	0.55	0.59	0.56	0.6	0.63	0.5	0.61	0.52	0.5	0.61	0.5
5	0.56	0.54	0.6	0.63	0.57	0.6	0.63	0.54	0.62	0.55	0.52	0.61	0.53
6	0.54	0.51	0.55	0.59	0.53	0.56	0.58	0.5	0.58	0.51	0.48	0.58	0.46
7	0.57	0.52	0.59	0.62	0.53	0.59	0.61	0.49	0.61	0.53	0.49	0.6	0.49
8	0.57	0.52	0.58	0.62	0.52	0.58	0.59	0.5	0.59	0.52	0.5	0.59	0.49

CEPA													
HORA	I66	I69	I72	I73	I74	I77	I78	ATCC6538P					
1	0.08	0.08	0.07	0.09	0.06	0.09	0.1	0.06					
2	0.26	0.21	0.2	0.24	0.17	0.2	0.24	0.15					
3	0.51	0.49	0.45	0.52	0.38	0.39	0.47	0.38					
4	0.57	0.54	0.64	0.57	0.6	0.55	0.57	0.49					
5	0.58	0.57	0.64	0.6	0.62	0.6	0.6	0.5					
6	0.54	0.53	0.58	0.52	0.6	0.55	0.55	0.47					
7	0.54	0.52	0.61	0.6	0.62	0.57	0.56	0.49					
8	0.52	0.51	0.61	0.58	0.61	0.6	0.59	0.43					

Anexo 3. Selección de la concentración de prueba para determinar la DL_{50} de cada cepa por el método de Replicador de Steers. P= Penicilina G Procaína, S= Penicilina G Sódica, M= mezcla de Penicilina G Procaína y Penicilina G Sódica (3:1). C= crecimiento N= no se observó crecimiento. ATCC 6538 p y ATCC 29213, Controles de referencia. 0.12 μ /ml resistente a Penicilina G.

Cepas	8 μ g/ml	4 μ g/ml	2 μ g/ml	1 μ g/ml	0.5 μ g/ml	0.25 μ g/ml	0.12 μ g/ml	0.06 μ g/ml	0.03 μ g/ml
Externas	PSM	PSM	PSM	PSM	PSM	PSM	PSM	PSM	PSM
E3	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC	CCC
4C	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
5C	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
E5	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC
E6	NNN	NNN	NNN	NNN	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC
E9	NNN	NNN	NNN	NCN	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC
E10	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
E13	NNN	NNN	NNN	CNC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC
E18	NNN	CNN	CNN	CNC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC
E26	NNN	NNN	NNN	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC
E32	NNN	NNN	CNN	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC
E39	NNN	NNN	CNN	CCN	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC
E47	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
E51	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	CCC	CCC	CCC	CCC
E57	NNN	NNN	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC
E58	NNN	NNN	NNN	NNN	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC
E61	CNN	CCC	C CC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC
E69	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	CCC	CCC	CCC	CCC
E71	NNN	NNN	NNN	NNN	CCN	CCC	CCC	CCC	CCC
E75	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	CCC	CCC	CCC	CCC
E76	NNN	CNC	CNC	CNC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC
E90	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
E119	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
E131	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
ATCC6538P	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
ATCC29213	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	CCC	CCC	CCC
Cepa	8 μ g/ml	4 μ g/ml	2 μ g/ml	1 μ g/ml	0.5 μ g/ml	0.25 μ g/ml	0.12 μ g/ml	0.06 μ g/ml	0.03 μ g/ml
Internas	PSM	PSM	PSM	PSM	PSM	PSM	PSM	PSM	PSM
I23	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC	CCC
I25	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC
I28	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC	CCC
I30	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC
I31	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC	CCC
I35	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC
I36	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC
I38	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC	CCC
I41	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC	CCC
I44	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC	CCC
I46	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC	CCC
I53	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC	CCC
I65	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
I66	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC	CCC
I69	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC	CCC
I72	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	CCC	CCC	CCC
I73	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC	CCC
I74	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	NCC	CCC	CCC	CCC
I77	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	NCC	CCC	CCC	CCC
I78	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNC	CCC	CCC	CCC
ATCC6538P	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
ATCC29213	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	CCC	CCC	CCC

Anexo 4. Continuación

I53	0.25	0.5	1	2	4	8	µg/ml
PGP							175
PGS					218	71	
MPS							

I25	0.25	0.5	1	2	4	8	µg/ml
PGP							
PGS							
MPS							

I31	0.25	0.5	1	2	4	8	µg/ml
PGP							325
PGS							348
MPS							

I66	0.25	0.5	1	2	4	8	µg/ml
PGP							
PGS							
MPS							

I72	0.25	0.5	1	2	4	8	µg/ml
I							
PGS					187	377	
MPS					818	758	
					INC	356	

I73	0.25	0.5	1	2	4	8	µg/ml
PGP							
PGS							INC 403
MPS							

I74	0.25	0.5	1	2	4	8	µg/ml
PGP							
PGS						INC	403
MPS							

I77	0.25	0.5	1	2	4	8	µg/ml
PGP					INC		351
PGS						INC	403
MPS					INC	INC	INC

I78	0.25	0.5	1	2	4	8	µg/ml
PGP			14	1			0
PGS			4	8	2		0
MPS		3	4	2			0

*C4	0.01	0.03	0.06	0.12	0.25	µg/ml
PGP						
PGS						
MPS						

*C5	0.01	0.03	0.06	0.12	0.25	µg/ml
PGP						108
PGS		0	0	0	0	
MPS						

*E10	0.01	0.03	0.06	0.12	0.25	µg/ml
PGP					0	0
PGS						210
MPS						0

*E47	0.01	0.03	0.06	0.12	0.25	µg/ml
PGP				0	0	
PGS				112	109	
MPS			INC	63	0	

*E90	0.01	0.03	0.06	0.12	0.25	µg/ml
PGP				0	476	
PGS				329	0	
MPS						

*E119	0.01	0.03	0.06	0.12	0.25	µg/ml
PGP				0	0	
PGS						
MPS						

*E131	0.01	0.03	0.06	0.12	0.25	µg/ml
PGP					123	
PGS					4	
MPS					33	

*I65	0.01	0.03	0.06	0.12	0.25	µg/ml
PGP					0	
PGS					0	30
MPS					0	14

I65**	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	µg/ml
PGP			87	91	0	0	0	0	
PGS			5	49	320	0	0	0	
MPS				38	0	0	0	0	

BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F.M., (1999) Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *International J. of Antimicrobial Agents*, 12: 279-285
- Ahmed, A.O.A., VAN Belkum, A., Fahal, A.H., Abu Elnor, A.E., Abougroun, E.S.A.M., VandenBergh, M.F.Q., Zijlstra, E.E. and Verbrugh, H.A. (1998). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and epidemiology of surgical-site infections in a Sudanese University Hospital. *J. of Clinical Microbiol.*, 36 12: 3614-3618.
- Al Masaudi, S.B., Roussell, A.D. and Day, M. J. (1991) Comparative sensitivity to antibiotics and biocides of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* strain isolated from Saudi Arabia and Great Britain. *J. Applied Bacteriology*, 71: 331-338
- Archer, G. L and Bosilevac, J.M. (2001). Signaling Antibiotic resistance in Staphylococci. *Science*, 42 (1):1915-1916.
- Balows, A., Hausler, J.W. Jr., Hermann, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J. (1992) *Manual of clinical Microbiology*, Fifth edition. American society for Microbiology. Washinton, D.D.
- Barry, A.L. y Thornsberry, C. (1987) *Manual de Microbiología Clínica*. 4ª. Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. Pag. 380-388
- Bayles, K.W. (2000) The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends in Microbiology*, 8 (6): 274-278.
- Boyce, J.M. and Medeiros, A.A. (1987) Role of B-lactamase in expression of resistance by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, Sep., 1426-1428.
- Chopra, I. (1998) Research and development of antibacterial agents. *Curren Opinion in Microbiology*, 495-501
- De Sousa, M.A.A., Sanches, I.S., Ferro, M.L. , Vaz, M.J., Saravia, Z., Tendeiro, T., Serra, J. and De Lencastre, H. (1998) Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J. of Clinical Microbiol.*, 36 (9): 2590-2596.
- Doern, G. (1992) In vitro activite of loracarbef and effects of susceptibility test methods. *The American Journal of Medicine*, 92.Suppl. 6A-15S.

- Drlica, K. (2001) A strategy for fighting antibiotic resistance. *ASM News*, 67(1): 27-33.
- Du Toit, E.A. and Rautenbach, M. (2000) A sensitive standardized micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. *J. of Microbiological Methods*, 42: 159-165
- Doss, S.A., Tillotson, G.S. and Emyes, S.G.B. (1993) Effect of sub-inhibitory concentrations of antibiotics on the virulence of *Staphylococcus aureus*. *J. Applied Bacteriol.*, 75: 123-128
- Francioli, M., Bille, J., Glauser, M.P. and Moriellon, P. (1991) B-lactam resistance mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. of Infectious Diseases*, 63: 515-523.
- Giesbrecht, P., Kersten T., Maidhot, H. and Wecke, J. (1998) Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in presence of penicillin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (4): 1371-1414.
- Guillemot, D. (1999) Antibiotic use in humans and bacterial resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 2:494-498
- Haldane, E.V. and Affias S. (1977) Penicillin-tolerant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, July 2 p. 39
- Hassam, A.Z., Shaw E.J., Shooter, R.A. and Caro, D.B. (1978) Changes in antibiotic sensitivity in strains of *Staphylococcus aureus*, 1952-78. *British Medical Journal*, 2 : 536-537.
- Holliday, M.G., Ford, M., Perry, J.D. and Gould, S.F.K. (1999) Rapid identification of *Staphylococcus aureus* by using fluorescent staphylocoagulase assay. *J. of Clinical Microbiol.*, 37 (4): 1190-1192.
- Holloway, Y.Y., Snijder, J.A.M. and Schiphuis, J. (1996) Inexpensive 4-hour micro-agar dilution Susceptibility determination method. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 40 (12): 2792-2795.
- Jiménez Martínez, M.E. (1996) Patrones de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas de pacientes de la Clínica Universitaria Iztacala durante 7 años Tesis profesional ENEP Iztacala UNAM.
- Joklik, W.K., Willet, H.P., Amos, D.B. and Wlfer, C. (1992) *Zinsser Microbiology* 20th. Edition. Ed. Appleton & Lange. Norwalk, Connecticut. U.E.A.

- Kawamura, Y., Hou X-G, Sultana, F., Hirose, K., Miyake, M., Shu S-E and Ezaki, T. (1998) Distribution of *Staphylococcus* species among human clinical specimens and emended description *Staphylococcus caprae*. J. of Clinical Microbiol., 36(7): 2038-2042
- Kluytmans, J. Van Belkum A. and Verbrugh, H. (1977) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology underlying mechanisms, and Associated risks. Clin. Microbiol. Reviews, 10 (3): 505-520.
- Kumate, J. 1981. *Antibióticos y quimioterapia*. Francisco Méndez Cervantes México pp 83, 84, 90 y 91.
- Lennette, E., Balows, A., Hauseler, W.J. y Truant, J.P. 1982. *Manual de Microbiología Clínica*, Editorial Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- Leski, T., Oliveira, K., Santos Sánchez, I., De Sousa, M.A., Hryniewicz, W. and De Lencastre, H. (1998) Clonal Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Poland. J. of Clinical Microbiol., 36 (12): 3532-3539.
- Lorian, V. and Atkinson, B. (1976) Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on cross walls of cocci. Antimicrob. Agents and Chemother., 9 (6): 1043-1055
- Livermore, D. (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clinical Microbiol. Reviews, 8 (4): 557-584.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. 1997. *Brock Biología de los microorganismos*. 8va. Edición. PRENTICE HALL IBERIA, Madrid.
- Mahoudeau, I., Delabranche, X., Prevost G., Monteil, H. and Piemont, Y. (1997) Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans. J. of Clinical Microbiol., 35 (8): 2153-2154.
- Monroy, P.E. (1997) Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. Tesis para Maestro en Ciencias en Microbiología. FES Cuautitlan UNAM. México.
- Mossova, I. and Mobashery S., (1998) Synthesis and diversification of bacterial penicillin-binding protein and β -lactamases. Antimicrob. Agents and Chemother., 42 (1): 1-17.
- Murakami, K., Nomura, K., Doi, M. and Yoshida, T. (1987) Production of low-affinity penicillin-Binding Protein by Low and High-resistance groups of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents and Chemother., 31 (9): 1307-1311.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000.

- Ohlsen, K., Ziebuhr, W., Koller, K-P., Hell, W., Wichelhaus, T.A. and Hacker, J. (1998) *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 42 (11):2817-2823
- Petersson, A.C., Kamme, C. and Miorner, H. (1999) Disk with high oxacillin content discriminates between methicillin-resistant and borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in disk diffusion assays using a low salt concentration. *J. of Clinical Microbiol.*, 37 (6): 2047-2050.
- Ponce de León, S., Rancel, F.M.S., Elias, L.J.I., Romero, O.C., Huertas, J.M. (1999) Infecciones nosocomiales: tendencias seculares de un programa de control en México. *Salud Publica de México*, (41) sup.1. s5-s11.
- Ribeiro, J., Vieira, D.F., King T., D'arezzo, J.B. and Boyce, J.M. (1999) Misclassification of susceptible strains of *Staphylococcus aureus* as methicillin resistant *S. aureus* by rapid automated susceptibility testing system. *J. of Clinical Microbiol.*, 37 (5): 1619-1620
- Richet, H.M. (2001) Better antimicrobial resistance surveillance efforts are needed. *ASM*, 57 (6): 304-309.
- Ross, S., Rodríguez, W., Controni, G. and Khan, W. (1974) Staphylococcal susceptibility to penicillin G. *JAMA*, 229 (8): 1075-1077.
- Sabath, L. D., Garner, C., Wilcox, C. and Finland, M. (1976) Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 9 (8): 962-969.
- Sabath, L.D. Laverdiere, M., Wheeler, N., Blazevic, D. and Wilkinson, B.J. (1977) A new type of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 8009: 443-447.
- Sanders, C.C. (1991) A problem with antimicrobial susceptibility tests. *Features*, 57 (4): 187-190.
- Vanden Eng, J., Marcus, R. Haldler, J.I., Imhoff, B., Vugia, D.J., Cieslak, P.R., Zell, E., Dennen, V., McCombs, K.G., Zansky, S.M., Hawkins, M.A. and Besser, R.E. (2003) Consumer attitudes and use of antibiotics. *Emerging Infectious Diseases*, 9 (9): 1128-1134.
- Viano, I., Martinetto, P, Valtz, A., Santiano, M and Barbaro, S. (1979) Variability of immune response induced by bacteria treated with subminimal inhibitory concentrations of fosfomicin. *Reviews of Infectious Diseases*, 1 (5): 858-861.

- Voladri, R.K.R. and Kernodle, S.D. (1998) Characterization of a chromosomal gene encoding type β -lactamase in phage group in isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 48 (12): 3163-3168.
- Voorn, G.P., Thompson, J., Goessens, W.H.F., Schmal-Bauer, W., Broeders, P.H.M. and Michel, M.F. (1991) Role of tolerance in cloxacillin treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J. of Infectious Diseases*, 163: 640-643
- Wichelhaus, T.A., Kern, S., Schäfer, V. and Brade, V. (1999) Rapid detection of epidemic strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. of Clinical Microbiology*, 37(s3) 690-693.
- Zaidi, M., Martin, G. y Rosado, R. (1999) Epidemia de neumonía asociada a ventilación mecánica en Mérida Yucatán. *Salud Pública de México*, 41 sup.1. s38-s43.
- Zhang, H.Z., Hackbarth, C.J. and Chambers, H.F. (2001) A Proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to β -lactams in Staphylococci. *Science*, 291: 1962-1965.

