

300627
18
24



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U. N. A. M.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

"ANALISIS EPIDEMIOLOGICO, MICROBIOLOGICO Y
MOLECULAR DEL ESTAFILOCOCO RESISTENTE A
METICILINA EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL
EN MEXICO"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA KATHUR PALOMERAS YABUR

Director de Tesis:
Q.B.P. GUADALUPE MORALES



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 está 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.

El presente trabajo fué realizado en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

Bajo la asesoría de :

**Dr. José Sifuentes Osornio
Investigador Nacional
I N N S Z**

**La presente tesis se llevó a cabo bajo la
dirección académica de:**

Q. B. P. GUADALUPE MORALES MEZA

I N D I C E

1.	ANTECEDENTES	1
1.1.	INTRODUCCION	1
1.2.	FACTORES DE RIESGO	3
1.3.	RESERVORIOS	4
1.4.	INFECCIONES POR ERM ADQUIRIDAS EN LA COMUNIDAD	4
1.5.	CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS DEL ERM	5
1.6.	FACTORES FÍSICOS Y QUÍMICOS QUE AFECTAN LA EXPRESION DE LA RESISTENCIA A METICILINA EN ESTAFILOCOCO	6
1.6.1.	Temperatura	6
1.6.2.	pH del medio de cultivo	6
1.6.3.	Osmolaridad del medio de cultivo	6
1.6.4.	Luz visible	7
1.6.5.	Agentes quelantes e iones divalentes	7
1.6.6.	Antibióticos β -lactámicos en el medio de cultivo	7
1.7.	MECANISMOS DE RESISTENCIA HACIA β -LACTAMICOS	7
1.7.1.	Mecanismo Mediado Enzimáticamente	7
	Proteínas enlazantes de penicilinas	8
1.7.2.	Resistencia Intrínseca	9
	Proteína Enlazante de Penicilina 2a ó 2'	9
	Inducción de PEP2a	10
	Otros factores	10
	Pared celular	11
1.7.3.	Tolerancia	12
1.8.	SENSIBILIDAD INTERMEDIA A OXACILINA	13
1.9.	GENÉTICA DEL ERM	15
1.9.1.	Genoma estafilocócico	15
1.9.2.	Genética de la resistencia a meticilinas	17
	Penicilinas	18
	PEP2a	19
	Otros loci genéticos	19
1.10.	MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE ERM	20
1.11.	SISTEMAS DE TIPIFICACION EPIDEMIOLÓGICA	22
2.	OBJETIVOS	26
3.	HIPÓTESIS	27
4.	DISEÑO DEL ESTUDIO	28
5.	MATERIAL Y MÉTODOS	29

5.1.	POBLACION Y PERIODO DEL ESTUDIO	29
5.2.	PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACION	30
	5.2.1. Morfología Colonial	30
	5.2.2. Morfología Microscópica	30
	5.2.3. Prueba de Catalasa	30
	5.2.4. Prueba de Coagulasa	31
	5.2.5. Fermentación de Manitol	31
	5.2.6. Sensibilidad a Novobiocina	31
	5.2.7. Determinación de DNAsa	31
	5.2.8. Confirmación de especie	31
	5.2.8.1. API Staph Trac	31
	5.2.8.2. API 20 GP	31
5.3.	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA	32
	5.3.1. Detección de la resistencia a oxacilina	32
	5.3.2. Confirmación de la resistencia a oxacilina	33
	5.3.3. Determinación de CMB	33
	5.3.4. Pruebas de sinergismo entre oxacilina y ácido clavulánico	33
5.4.	ANALISIS DE PLASMIDOS	33
6.	RESULTADOS	35
	6.1. Prevalencia y distribución	35
	6.2. Sitio de aislamiento	36
	6.3. Características epidemiológicas	37
	6.4. Microbiología	39
	6.5. Pruebas de sensibilidad	39
	6.6. Análisis de plásmidos	45
7.	DISCUSION	51
8.	CONCLUSION	55
9.	APENDICES	57
9.1.	APENDICE I. METODO PARA DETERMINAR SENSIBILIDAD POR DIFUSION DE DISCOS (KIRBY BAUER)	57
	9.1.1. Principio	
	9.1.2. Medios y reactivos	
	9.1.3. Cepas control	
	9.1.4. Procedimiento	
	9.1.5. Interpretacion	
	9.1.6. Control de calidad	
	9.1.7. Manejo de los discos	
9.2.	APENDICE II. METODO PARA DETERMINAR SENSIBILIDAD POR DILUCION EN MICROCALDO (MICRODILUCION)	61
	9.2.1. Principio	

9.2.2. Equipo e instrumental	
9.2.3. Medio de cultivo	
9.2.4. Cepas control	
9.2.5. Solución de antimicrobianos	
9.2.6. Preparación de microplacas	
9.2.7. Preparación del inóculo	
9.2.8. Inoculación e incubación de las placas	
9.2.9. Interpretación	
9.3. APENDICE III. METODO PARA DETERMINAR CONCENTRACION MINIMA BACTERICIDA (CMB) POR MICRODILUCION	64
9.3.1. Introducción	
9.3.2. Principio	
9.3.3. Materiales y reactivos	
9.3.4. Subcultivo de las placas del MIC	
9.3.5. Lectura	
9.3.6. Interpretación	
9.4. APENDICE IV. METODO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) Y LA CONCENTRACION MINIMA BACTERICIDA (CMB) DEL SINERGISMO ENTRE ACIDO CLAVULANICO Y OXACILINA POR MICRODILUCION	65
9.4.1. Principio	
9.4.2. Soluciones de antimicrobianos	
9.4.3. Preparación de las placas	
9.4.4. Inoculación	
9.4.5. Lectura	
9.4.6. Determinación de CMB	
9.5. APENDICE V. METODO PARA LA EXTRACCION ALCALINA DE DNA PLASMIDO Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	67
9.5.1. Introducción	
9.5.2. Materiales y equipo	
9.5.3. Procedimiento para preparar DNA plásmido	70
9.5.4. Electroforesis en gel de agarosa	71
9.5.4.1. Principio	
9.5.4.2. Procedimiento	
10. BIBLIOGRAFIA	74

1. ANTECEDENTES

1.1. INTRODUCCION

Poco después de que los antibióticos se introdujeron en la medicina clínica, aparecieron cepas resistentes de S.aureus aisladas de muestras clínicas, y este organismo ha continuado respondiendo de esta manera a la introducción de nuevas drogas. Durante los años cincuentas, las infecciones estafilocócicas causadas tanto por estafilococo coagulasa positivo (EC+), como por estafilococo coagulasa negativo (EC-), eran tratadas con penicilina. Esta terapia se volvió ineficaz debido a la aparición de cepas resistentes a este antibiótico, es decir, productoras de penicilinas, una enzima β -lactamasa que inactiva penicilinas (35). En 1959, se inició la comercialización de la meticilina, la primera penicilina semisintética resistente a la penicilinas, y que en la actualidad se considera como uno de los marcadores de sensibilidad de Staphylococcus a los antibióticos β -lactámicos (66). Esta ofrecía una solución a este problema terapéutico, sin embargo, un año después de que la meticilina comenzó a utilizarse clínicamente, se reconoció el primer brote de estafilococo resistente a meticilina (ERM) en Inglaterra (38). Este germen pronto se convirtió en una importante causa de infecciones nosocomiales en el mundo. Durante la década de los sesentas, la resistencia a meticilina parecía ocurrir naturalmente, como un fenómeno esporádico de pobre significado clínico, tanto en pacientes hospitalizados, como en aquellos que habían recibido tratamiento con otros antimicrobianos diferentes de meticilina en grandes cantidades. Sin embargo a partir de 1968, hubo un aumento importante en la frecuencia de aislamiento del ERM a nivel internacional, el cuál se prolongó hasta principios de los años setentas (34). En Zurich, en 1968, se informó que el 17% de las infecciones estafilocócicas fueron causadas por ERM (5); en Londres se informó el 4.1% (16) y en Dinamarca el 10% (24). En Estados Unidos, este tipo de infecciones no fueron reportadas, sino hasta finales de los años sesentas, en un hospital de Boston (4). A mediados de los setentas, hubo en todo el mundo, un decremento general de la incidencia de ERM, aunque los problemas resurgieron otra vez en la última mitad de esta década. Entre 1976 y 1981 hubo, en los

Estados Unidos, un aumento en el aislamiento de ERM de 2.4 a 4.9% (31).

Para 1980 ya se habían detectado brotes por ERM en Londres (11), Dublín (59), Sudáfrica (70), Australia (63), Medio Oriente (70) y Grecia (11).

La mayoría de las infecciones causadas por ERM son adquiridas intrahospitalariamente, y las más comunes fueron: infecciones respiratorias (20-38%), infecciones de heridas quirúrgicas (22- 30%), infecciones de músculo y piel (9-16%), infecciones del tracto urinario (8-12%), infecciones de huesos y articulaciones (9-11%), septicemias de origen desconocido (3-10%), e infecciones misceláneas (4-8%) (42).

Las infecciones de heridas, músculo y piel, parecen ser las que intervienen más en la diseminación del ERM debido a que las secreciones entran en contacto con las manos del personal hospitalario (47), y de ahí su fácil diseminación.

La existencia de ERM es un problema real en México, sobre todo en hospitales de tercer nivel, en donde se ha detectado desde 1981. En el hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional del IMSS, la resistencia en 1981 a dicloxacilina fue de 5.7% para EC+ y de 12.1% para EC-, estos valores se elevaron en 1985 a 11.4% y 14.23% respectivamente (26). En el Hospital Infantil de México, Alpuche-Aranda y cols (1) informaron que la resistencia a metilicina en Staphylococcus aureus aislados de 1986 a 1989, con metodología apropiada, fue del 5% en los microorganismos asociados a infecciones adquiridas en la comunidad y del 24% en aquellos aislados en el hospital. Esta resistencia es muy alta y superior a la reportada por Giraud y col (28), a dicloxacilina 16% para Staphylococcus aureus y 19% para EC- en 1983-1984, lo cual probablemente se deba al empleo de un antibiótico que falla en la detección de la resistencia a metilicina como la dicloxacilina. Recientemente Aragon y col (2) informaron resistencia a metilicina del 5% en EC+ y del 34% en EC-. En el Hospital de Infectología del Centro Médico La Raza del IMSS, la resistencia para cefalotina fue de 25% en 1987. En unidades de neonatología, el EC- suele ser la causa más frecuente de infecciones, pero todas las cepas han sido sensibles a dicloxacilina y cefalotina (10). Por otra parte, el 29% de las cepas de EC-, aisladas de la orina de adultos fue resistente a dicloxacilina (57). Se ha informado que en el Hospital Angeles del Pedregal el 5% de las cepas de EC+ y el 43% de EC- son resistentes a metilicina (2).

El Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INNSZ) es un hospital de tercer nivel de atención a la salud, que cuenta con 160 camas y que atiende a pacientes adultos con problemas quirúrgicos y de medicina interna, en el cual durante 1981 el 13% de las cepas EC+ y el 21% de EC- fueron resistentes a meticilina, con un incremento al 14% y 23% respectivamente para 1987 (28).

1.2. FACTORES DE RIESGO

Los brotes nosocomiales, en los cuales se ha observado un alto porcentaje (a veces arriba del 50%) de infecciones por ERM. ocurren sobre todo en hospitales grandes, de tercer nivel de atención y afiliados a Universidades. En hospitales más pequeños, se han encontrado esporádicamente algunos cultivos que presentan resistencia a meticilina, pero no se han publicado reportes, ya que su *diseminación* y persistencia es mínima. Las razones que explican ésta distribución son: en los hospitales grandes de tercer nivel, se atienden a pacientes de alto riesgo, internados en unidades de cuidados especiales (quemados, terapia intensiva y traumatología), y que por lo general se encuentran recibiendo varios antibióticos en altas dosis. Además, al existir un contacto frecuente entre los empleados del hospital y los pacientes de estas salas se dan las condiciones para que el microorganismo pueda ser transmitido inadvertidamente por éstos a otros pacientes (34).

En resumen, los principales factores de riesgo asociados con la adquisición del ERM intrahospitalariamente se consideran: la administración de dos o más antibióticos (76); concentración de pacientes de alto riesgo en unidades de terapia intensiva (34); pacientes hospitalizados por tiempo prolongado (39); pacientes que han sufrido alguna cirugía u otro procedimiento invasivo (39); pacientes con tejidos dañados, en presencia de cuerpos extraños (71). Todos estos factores proveen un medio ambiente favorable para la *diseminación* del ERM una vez que éste es introducido al hospital, ya sea a través de pacientes transferidos de otros hospitales, a través de personal que trabaja simultáneamente en más de un hospital y en menor grado, a través de la comunidad (34).

1.3. RESERVORIOS

Una vez que se introduce el ERM en un hospital es muy difícil de erradicar, y su reservorio está constituido por: a) pacientes infectados o colonizados; b) personal hospitalario, el cual puede llegar a ser portador nasal del ERM durante los brotes epidémicos, aunque la prevalencia de estos portadores es baja (menos del 2% de los empleados vigilados) (76) y c) objetos inanimados, ya que la contaminación de instrumentos, superficies y aire no se detecta con facilidad, sobre todo en las unidades de alto riesgo (76).

1.4. INFECCIONES POR ERM ADQUIRIDAS EN LA COMUNIDAD

Estos reservorios pueden extenderse a la comunidad cuando los pacientes infectados o colonizados son dados de alta, o tienen contacto con hospitales vía unidades de urgencias (11). Recientemente, se han detectado como reservorios comunitarios a los individuos adictos a drogas que se administran por vía intravenosa en Detroit, EE UU (39), que adquirieron infecciones estafilocócicas en septiembre de 1981 y correspondieron al 38% de las infecciones adquiridas en ese lapso (69). En este brote comunitario, los adictos a drogas correspondieron, aproximadamente, al 60% de los pacientes con ERM. El resto, conformado por los no adictos, tenía antecedentes de haber sido hospitalizados al menos un año antes de haber adquirido la infección. En el caso de los adictos, el principal factor asociado con la adquisición del ERM fue el uso excesivo de agentes antimicrobianos. Estudios realizados en varias muestras de diferentes tipos de heroína, demostraron que no existe un determinado tipo asociado con la adquisición de infecciones debidas a ERM (69). En el caso de los no adictos, la transmisión se facilitó por las enfermedades subyacentes y la hospitalización previa. Simultáneamente con el brote comunitario, surgieron brotes nosocomiales en los hospitales del área (69).

1.5. CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS DEL ESTAFILOCOCO RESISTENTE A METICILINA.

Dentro de las características más importantes del ERM se encuentran: una concentración mínima inhibitoria (CMI) de meticilina \geq a 16 $\mu\text{g/ml}$, y a oxacilina o nafcilina, \geq a 8 $\mu\text{g/ml}$; son cepas de crecimiento lento y presentan pleomorfismo; frecuentemente son multirresistentes; estos microorganismos son capaces de adquirir plásmidos que les proporcionan resistencia a aminoglucósidos, cloranfenicol y otros antibióticos con actividad antiestafilocócica (44); producción de penicilinas y presentan resistencia cruzada a todos los antibióticos β -lactámicos, incluyendo penicilinas y cefalosporinas; aunque su virulencia es la misma que la del estafilococo sensible a meticilina (ESM) (76), puede llegar a causar enfermedades serias y muerte, debido a su difícil control (68); la resistencia a meticilina es más común en EC- que en EC+ (77); los ERM se consideran también resistentes a todas las penicilinas penicilinasas-resistentes (cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina y nafcilina y a las cefalosporinas) (44) y su característica más importante es la heterogeneidad fenotípica en cuanto a la expresión de la resistencia, es decir, solamente raras células (1 en 10^4 a 10^8) expresan el carácter resistente y crecen en presencia de altas concentraciones de la droga (50 $\mu\text{g/ml}$). La mayoría de las células aparecen susceptibles a concentraciones terapéuticas, relativamente bajas de droga (1 a 5 $\mu\text{g/ml}$). Entonces, las cepas heterogéneas pueden ser consideradas como compuestas por dos poblaciones: células relativamente susceptibles y células altamente resistentes. Una minoría de las cepas son homogéneas, es decir, las células son uniformes en la expresión de la resistencia y pueden crecer en altas concentraciones de la droga. Por otro lado, las cepas homogéneas están compuestas por una población simple de células, las cuales tienden a ser altamente resistentes.

Hartman y Tomasz han clasificado a las cepas resistentes en categorías de homogéneas y heterogéneas, basándose en la eficiencia de su crecimiento en placas, definido como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de agar conteniendo la droga, dividido por el número de UFC en placas de agar libre de droga, multiplicado por 100% (13).

Ocasionalmente el EC- puede observarse aparentemente susceptible in vitro a cefalosporinas de primera generación, aunque para fines de tratamiento, se les considera resistentes (77). La resistencia a cefalosporinas en estafilococos es difícil de detectar. Existe evidencia física de aislamientos de S. aureus resistente a meticilina que no responden in vivo a tratamiento con cefalosporinas (43). El mismo fenómeno se ha sugerido también para S. epidermidis. Si la resistencia a nafcilina, oxacilina ó meticilina se demuestra, las cepas pueden ser reportadas como resistentes a todas las cefalosporinas, tales como cefazolina o cefalotina.

Los ERM suelen ser particularmente sensibles a : vancomicina, rifampicina, trimetoprim-sulfametoxazol (71), teicomicina, fosfomicina y ac. fusídico (31,44), aunque el más efectivo parece ser vancomicina, y mezclas sinergistas de ésta con otros antibióticos, por ello es el antibiótico de elección en el caso de un brote de ERM (47).

1.6. FACTORES FISICOS Y QUIMICOS QUE AFECTAN LA EXPRESION DE LA RESISTENCIA A METICILINA

1.6.1. TEMPERATURA: La expresión de la resistencia se aumenta si las cepas se cultivan a temperaturas menores de 35°C, y es suprimida a temperaturas mayores de 43°C. Cepas heterogéneas que parecen homogéneas y altamente resistentes a 30°C, rápidamente asumen características de heterogeneidad al incubarlas a 37°C (13).

1.6.2. pH DEL MEDIO DE CULTIVO: A un pH de 5.2 o menor, la resistencia no se expresa, sin embargo a un pH de 7.4 la expresión de la resistencia se aumenta. El efecto del pH causa supresión de la resistencia, pero no eliminación de la característica genética (68). Una cepa homogénea puede aparecer susceptible a pH de 5.2, pero asume la expresión homogénea de resistencia cuando el pH se aumenta a 7.0.

1.6.3. OSMOLARIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO: La adición de NaCl o sacarosa, a medio de cultivo, al igual que las bajas temperaturas, realzan la expresión de la resistencia por efectos en la subpoblación susceptible, no en la resistente. Estas condiciones protegen a las células susceptibles, las cuales entonces pueden crecer a concentraciones de droga que de otra manera serían letales (13).

1.6.4. LUZ VISIBLE: Al disminuir la cantidad de luz visible, se aumenta la expresión de la resistencia, aunque este efecto solo se observa en las células no pigmentadas, ya que el pigmento (β - carotenoide) protege a estas células (68).

1.6.5. AGENTES QUELANTES Y CATIONES DIVALENTES: En algunas cepas la expresión genética de la resistencia es suprimida por la presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y la de otros agentes quelantes. Esta es restaurada con la adición de cationes divalentes (Ca^{+2} y Mg^{+2}), lo que indica que estos iones tal vez funcionan como cofactores en el metabolismo de las células. Estos efectos también se observan en cepas sensibles, aunque en menor magnitud (13).

1.6.6. ANTIBIOTICOS β -LACTAMICOS EN EL MEDIO: El aumento en la expresión genética resultante del pase en antibióticos difiere de los otros factores. El pase en antibióticos elimina la subpoblación susceptible y selecciona la subpoblación altamente resistente (homogénea). La característica homogénea persiste en estas células seleccionadas por el antibiótico, pero es inestable, con subcultivos repetidos en un medio libre de droga, revierte a su forma heterogénea.

Todos estos factores que favorecen la expresión de la resistencia en cepas heterogéneas, tienen poco efecto en la resistencia de las cepas homogéneas (13).

1.7. MECANISMOS DE RESISTENCIA A BETA-LACTAMICOS EN ESTAFILOCOCO

Se reconocen tres mecanismos por los cuales el estafilococo puede mediar su resistencia hacia antibióticos β -lactámicos.

1.7.1. MECANISMO MEDIADO ENZIMATICAMENTE.

Es el más conocido, y su ejemplo más importante es la resistencia a penicilina. Este mecanismo se basa en la inactivación del antibiótico por una enzima β -lactamasa, debido a lo cual se crea una competencia entre la actividad del antibiótico para causar la muerte celular y la producción por parte de la célula de enzimas que inactiven al antibiótico antes de que éste cause cambios irreversibles en la misma (68). Para entender el

mecanismo de inhibición de β -lactamasas, es necesario conocer como interactúan los antibióticos β -lactámicos con sus blancos en la célula, así como que la acción de la β -lactamasas con los β -lactámicos es muy similar a la interacción con enzimas que producen la pared celular.

La "red" macromolecular que se encuentra alrededor de la bacteria es llamada peptidoglicano, la que consta de una cadena corta de péptidos que se enlazan cruzadamente a un polisacárido largo formado de unidades alternantes de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. El componente péptido está constituido de los siguientes aminoácidos: L-ala, D-glu, L-lis, D-ala, D-ala (21).

El peptidoglicano está directamente unido por enlaces covalentes a ácido teicóico o teicurónico. La síntesis de la red ocurre en etapas, y es solamente la última, la del enlazamiento cruzado, la que se lleva a cabo fuera de la membrana. Una nueva pared celular se construye por el enlace cruzado de péptidos adyacentes y adición de nuevas unidades a la cadena de peptidoglicano creciente, con la ayuda de una enzima transpeptidasa. La transpeptidación es el sitio de acción de la penicilina y de otros antibióticos β -lactámicos (35).

Tipper y Strominger propusieron en 1965 que la penicilina actuaba como un análogo estérico de la porción terminal D-ala de la cadena pentapéptida en el crecimiento del peptidoglicano (35). La unión de las penicilinas por un enlace covalente da como resultado la inactivación de la transpeptidasa. En la última década, esta hipótesis demostró ser correcta. Las enzimas que llevan a cabo las reacciones para producir la pared celular, han sido llamadas, en años recientes: proteínas fijadoras de penicilinas (PFP). La formación de un complejo acil-enzima también ocurre cuando las β -lactamasas interactúan con las penicilinas. Las β -lactamasas pueden ser formas evolucionadas de las enzimas que sintetizan peptidoglicanos, ya que éstas y las transpeptidasas tienen gran similitud en su secuencia de aminoácidos. La reacción básica de β -lactamasas con una penicilina consiste en la hidrólisis del anillo cíclico amida del núcleo de penicilina, permitiendo la producción de peniciloatos inactivos antibacterially (35).

Proteínas fijadoras de penicilinas. Las cepas susceptibles de estafilococo producen cuatro o cinco PFPs: 1, 2, 3, 3' y 4 con pesos moleculares de aproximadamente 85, 80, 75,

70 y 45 Kilodaltons. La función fisiológica específica o funciones de las PFPs estafilocócicas como transpeptidasas, endopeptidasas y carboxipeptidasas (las actividades enzimáticas que poseen las PFPs) no han sido definidas completamente (13). Algunas PFPs son esenciales para el crecimiento y supervivencia de la célula, y otras no lo son. Las PFPs esenciales se deducen de experimentos en los cuales se construyen mutantes letales condicionales deficientes en PFP y en los que los enlaces entre antibióticos β -lactámicos y PFP están correlacionados con sus concentraciones mínima inhibitoria y mínima letal in vitro.

La PFP4, que probablemente sirve como transpeptidasa in vivo, pero que también tiene actividad carboxipeptidasa in vitro, no es esencial. La naturaleza esencial de las otras PFPs está en discusión (13).

1.7.2. RESISTENCIA INTRINSECA.

El segundo mecanismo es el más complejo, es llamado resistencia intrínseca, heteroresistencia o resistencia inducible (39). En este mecanismo no hay inactivación del antibiótico, por lo general es constante y viene acompañado por la resistencia mediada enzimáticamente (68), y se basa en la producción de una nueva PFP que no está presente en el estafilococo sensible. Esta PFP adicional de 78 kilodaltons es llamada PFP2a ó PFP2' y tiene una baja afinidad de enlace para antibióticos β -lactámicos. Se presume que esta PFP2a puede llevar a cabo las funciones de las otras PFPs en concentraciones de antibiótico que inactivan a estas últimas (33). La proteólisis limitada de PFP2a de cepas diferentes de EC+ y EC- sean homo o heterogéneas, producen fragmentos péptidos similares (13). En contraste con las otras PFPs las cuales enlazan antibióticos β -lactámicos a bajas concentraciones, las PFP2a los enlaza sólo a relativamente altas concentraciones. Se presume que la PFP2a puede sustituir a PFPs esenciales cuando éstas han sido saturadas con droga y por lo tanto, pueden llevar a cabo las funciones necesarias para el ensamble de la pared celular.

Todavía no se ha resuelto si la PFP2a es un derivado de las otras PFPs, aunque la proteólisis limitada de una PFP2a radiomarcada, genera fragmentos péptidos que

difieren de aquellos producidos por las PFPs 1, 2 y 3, sugiriendo que la PFP2a no está relacionada cercanamente con las otras PFPs estafilocócicas. Paradójicamente, aunque PFP2a es producida por cepas homo y heterogéneas, el grado en que se expresa la resistencia en cada una de ellas varía enormemente dependiendo de una gran variedad de factores y esto se debe a que la PFP2a es una enzima inducible (13).

1.7.2.1. Inducción de la PFP2a. En algunas cepas los antibióticos β -lactámicos inducen la PFP2a y su producción difiere de acuerdo a las condiciones de crecimiento. La inducibilidad puede ser controlada por genes regulatorios presentes en plásmidos que codifican para la producción de penicilinas. Las cepas penicilinas negativas también pueden ser inducidas para producir PFP2a, posiblemente debido a la localización cromosomal de algunos de los genes regulatorios de penicilinas (79).

La inducibilidad y diferencia en las cantidades de PFP2a producida puede tener cierto significado en la expresión heterogénea de la resistencia. Sin embargo no existe correlación entre la inducibilidad o cantidad de PFP2a y la característica de resistencia. La producción de PFP2a puede ser constitutiva y la cepa puede ser heterogénea. Las células pueden ser inducidas a producir grandes cantidades de PFP2a y de pronto lisarse bajo la exposición de bajas concentraciones de antibiótico (33).

El enlace que se forma entre antibióticos β -lactámicos y la PFP2a es similar para cepas homogéneas y heterogéneas y no es alterado por las condiciones, así como la adición de NaCl al medio, que aumenta la expresión de la resistencia. Como se menciona anteriormente la PFP2a ya sea de cepas homo o heterogéneas es muy similar estructuralmente hablando de cepa a cepa, no importando el nivel al cual se exprese la resistencia (13).

1.7.2.2. Otros Factores. Debido a la dificultad para relacionar la producción de PFP2a con el nivel de expresión de la resistencia, Hartman y Tomasz (36) han postulado la existencia de un segundo factor, al cual llamaron factor X, responsable de la resistencia a meticilina en conjugación con la PFP2a. Este factor puede actuar dentro del mecanismo autolítico, el cual controla la degradación de la pared celular y puede mediar la lisis de células estimuladas por β -lactámicos, por lo tanto puede jugar un papel importante en el fenómeno de tolerancia.

1.7.2.3. Pared Celular. La pared celular, junto con la PFP2a y el factor X puede tener un papel en la expresión de la resistencia a meticilina. Sabath (67) observó en 1970 que después de la selección por antibióticos, las células fueron más resistentes a la lisis por lisostafina que las células originales. Sin embargo, no se observaron diferencias en la composición química de la pared de células sensibles y resistentes (13).

Cepas resistentes a meticilina tienen una carga superficial menos negativa que las cepas sensibles, lo que ha sido atribuido a diferencias en el contenido de ácido teicóico. Wilkinson et al (81) examinaron varias cepas sensibles y resistentes, encontraron que aunque las cepas resistentes poseen bajos niveles de ácido teicóico en su pared celular, la deficiencia en ácido teicóico, no resulta en resistencia a meticilina. No se encontraron nuevos polímeros de pared celular en las cepas resistentes. En NaCl y el EDTA inhibieron la autólisis en ambas cepas, resistentes y sensibles.

En una cepa homorresistente la exposición al antibiótico disminuye los enlaces cruzados dentro de la pared celular del 90 al 60%. La disminución de éstos, y la O-acetilación, ya sea en preparaciones crudas de pared, pared purificada o péptidoglicano resultaron similarmente sensibles a la digestión por autolisina o lisostafina tanto para cepas resistentes como sensibles. Entonces, las propiedades de la pared celular (si existen) que confieren la resistencia a meticilina, no han sido identificadas en material libre de células (13).

La explicación puede ser que la degradación de la pared en todas las células, comparadas con la pared celular aislada es regulada. Regiones de la pared celular bacteriana pueden ser topográficamente diferentes in vivo, y tener diferentes sensibilidades. La síntesis del peptidoglicano por células resistentes en un medio deficiente, que permite la síntesis de la pared pero no el crecimiento de la célula da sensibilidad a meticilina. Sin embargo, la síntesis en células creciendo da como resultado, resistencia a meticilina (74).

1.7.3. TOLERANCIA

El tercer mecanismo, la tolerancia, ocurre cuando hay una diferencia (≥ 32) muy grande entre la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de un antibiótico frente a una cepa (71). La mayoría de las cepas tienen un ratio de 1 a 4, y pocas lo poseen alrededor de 32. La razón para esta diferencia parece ser una disminución en la actividad de enzimas autolíticas debido a la presencia de un factor inhibidor de autolisinas. El problema clínico de este mecanismo consiste en que los organismos tolerantes, parecen estar asociados con infecciones estafilocócicas importantes, en las cuales al no producirse una actividad bactericida a bajas concentraciones de antibiótico, hay una falla en el tratamiento, además la tolerancia puede ser cruzada con cefalosporinas, vancomicina o ambos, por tanto, debe utilizarse un segundo antibiótico, que actúe en alguna otra parte del metabolismo de la bacteria diferente de la pared celular o a los mecanismos que la mantienen (68). Otro problema adicional, es que el carácter genético es relativamente inestable, desapareciendo en estudios prolongados de laboratorio (parece ser que un bacteriófago transfiere la característica de tolerancia de una cepa a otra).

Existen también, problemas técnicos para demostrar la tolerancia, y son debidos a la posible confusión con los siguientes fenómenos: persistencia (después de una noche de incubación, algunos organismos sensibles, menos de 0.1% del inóculo, no han muerto, ya que no se encontraban activos metabólicamente); efecto paradójico (en algunos cocos gram positivos, el rango letal puede disminuir, conforme la concentración de antibióticos se aumenta) y defectos en la técnica de la prueba (ya que la determinación de CMB depende de muchos factores: tamaño de inóculo, medio de cultivo utilizado, temperatura, tamaño de la muestra antes de la incubación y otros factores que pueden dar resultados falsos. La diferencia entre estos efectos consiste en que, los microorganismos persistentes muestran supervivencia debido a la inactivación metabólica y los tolerantes debido a un incremento en la actividad autolítica y la presencia de un inhibidor de las autolisinas bacterianas (68).

Comparando los tres mecanismos de resistencia encontramos que: la resistencia producida por β -lactamasas ocurre en presencia de muy altas concentraciones de

antibiótico, es selectiva a antibióticos β -lactámicos, se expresa fenotípicamente en el 99.9% de las células de una cepa, es estable, las cepas que lo poseen crecen rápidamente y la probabilidad de ocurrencia en hospitales es del 80 al 90%. La resistencia intrínseca, también, se encuentra limitada a antibióticos β -lactámicos, aunque su expresión fenotípica es mínima, aproximadamente de 10^{-5} , los cultivos en este caso crecen lentamente, la característica de resistencia también es estable y su ocurrencia en hospitales es mínima (1-8%), aunque en el caso de epidemias nosocomiales, puede llegar hasta un 30 ó 40%. La tolerancia no se presenta únicamente frente a antibióticos β -lactámicos y su expresión fenotípica es un poco mayor que la de la resistencia intrínseca (10^{-2}), los cultivos crecen rápidamente y pierden la característica de resistencia con facilidad dependiendo de las condiciones de almacenamiento de los organismos y en algunos hospitales su ocurrencia ha sido aproximadamente del 44% (68).

1.8. SENSIBILIDAD INTERMEDIA A OXACILINA.

Como se mencionó anteriormente se consideran ERM, a aquellas cepas que poseen el mecanismo de resistencia intrínseca, con una CMI de oxacilina \geq a $16 \mu\text{g/ml}$. Sin embargo, ya que debido a la heterogeneidad fenotípica de las cepas resistentes, y a que requieren manipulaciones específicas de cultivo, se han desarrollado algunas modificaciones a los métodos tradicionales de detección. Estas modificaciones han permitido la detección de cepas que han sido clasificadas como con resistencia límite o intermedia con una CMI de oxacilina de 2 a $8 \mu\text{g/ml}$, después de 48 horas de incubación. Estudios subsecuentes de estas cepas con inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam, o ambos) han mostrado que la resistencia a las penicilinas penicilinasas-resistentes es mediada por la producción de cantidades excesivas de β -lactamasa. Dado que, no son intrínsecamente resistentes, es concebible que una infección por una de estas cepas, puede ser adecuadamente tratada con una penicilina penicilinasas-resistente. Una forma de determinar en el laboratorio si la terapia es adecuada, consiste en obtener la CMB de estos antibióticos frente a las cepas problema. Estudios realizados en el Centro Médico de la Universidad de Nebraska entre septiembre

de 1986 y mayo de 1987, mostraron por dos métodos: determinación de CMB y estudios de curva letal, que estas cepas además de ser hiperproductoras de β -lactamasa, poseen una CMB muy elevada en comparación con su CMI, por lo que son cepas marcadamente tolerantes (82). McDougal y Thornsberry (1986) (56) han recomendado que estas cepas sean consideradas resistentes a meticilina. Sin embargo, designarlas de esta manera implica tomar precauciones para su aislamiento y tratamiento con vancomicina. Dado el costo del aislamiento del paciente, y el costo y toxicidad potencial de la vancomicina, son necesarias investigaciones subsecuentes para resolver estas cuestiones terapéuticas y epidemiológicas.

Una cuestión importante es definir cual es la correlación que tienen estos resultados con la eficacia del antibiótico en estudios in vivo. Sea cual fuere la técnica utilizada in vitro, debe correlacionar con estudios in vivo para poder resolver en cualquier momento discrepancias entre técnicas y resultados (82,56).

Las cepas de bajo nivel de resistencia no producen la PFP2a de baja afinidad que está asociada con la resistencia a meticilina y no contienen DNA que por hibridación reconozca al determinante de la RM. El bajo nivel de resistencia en S. aureus es un fenómeno bioquímica y genéticamente distinto de la verdadera RM y pueden ser consideradas como sensibles a antibióticos β -lactámicos. El problema radica en saber diferenciar correctamente a aquellas de las que son verdaderamente resistentes.

In vivo, bioquímica y genéticamente, las cepas de bajo nivel de resistencia fueron sensibles (12). La determinación de la presencia de la PFP2a o estudios de hibridación de DNA son atractivas posibilidades para diferenciar a una cepa verdaderamente resistente de otra con bajo nivel de resistencia, pero no existe la tecnología para permitir que estas pruebas se lleven a cabo de rutina en un laboratorio clínico. Una propiedad que puede ser útil clínicamente para determinar si una cepa es resistente, es la presencia de una subpoblación altamente resistente y su emergencia frente a la exposición de antibióticos β -lactámicos. Por tanto, pueden emplearse pruebas confirmatorias basadas en la selección de subpoblaciones resistentes que pueden crecer en altas concentraciones de antibiótico. Las condiciones de cultivo utilizadas para aumentar la expresión de la resistencia a meticilina, pueden promover la producción o actividad de β -lactamasas, con

hidrólisis de las penicilinas resistentes a β -lactamasas, por tanto se requiere una concentración más alta de antibiótico para inhibir el crecimiento de estas cepas. Entonces, la adición de un inhibidor de β -lactamasas al antibiótico resistente a β -lactamasa causa una disminución en la CMI de la cepa. Otro posible mecanismo es que el sistema autolítico puede ser alterado de alguna manera, como se ha sugerido para cepas verdaderamente resistentes a meticilina. Sin embargo, en presencia de NaCl o de una temperatura de incubación más baja, estas cepas pueden sobrevivir a una concentración de antibióticos β -lactámicos sobre los puntos de corte convencionales para sensibilidad. Por tanto, la resistencia a bajo nivel, es probablemente un artefacto de los métodos de prueba, y no es importante clínicamente, sin embargo, deberán realizarse estudios clínicos para confirmar esto. Las cepas que expresan bajo nivel de resistencia, aparecen como completamente sensibles en estudios *in vivo*, y no tienen ninguno de los marcadores de los ERM por lo que las infecciones causadas por éstas cepas pueden ser efectivamente tratadas con antibióticos β -lactámicos (12).

1.9. GENÉTICA DEL ESTAFILOCOCO RESISTENTE A METICILINA

1.9.1. GENOMA ESTAFILOCOCCICO.

Un poco después de la introducción de los antibióticos en la práctica clínica, se hizo aparente la capacidad del estafilococo para adaptarse a la presencia de drogas. Durante 1940 y 1950, se pensaba que la resistencia era originada solamente por mutación y selección. Pero, a partir de la observación de que la resistencia a penicilina puede perderse irreversiblemente, se demostró que la producción de penicilinas es debida a la presencia de plásmidos (72). Desde entonces, se han acumulado evidencias de que la resistencia hacia algunos antibióticos es mediada por plásmidos, aunque existen organismos resistentes a otros antibióticos que carecen de estos. La organización del genoma estafilocócico es de gran importancia para la evolución de este microorganismo en cualquier cambio de medio ambiente. Estudios recientes de mapeo cromosomal por fusión protoplástica han demostrado que el cromosoma del estafilococo consta de una

molécula simple y circular de DNA de 2 a 4×10^9 daltons la cual contiene 1.6×10^6 pares de nucleótidos, además de otros elementos genéticos que incluyen: plásmidos, transposones, profagos, etc. (62). El mapa cromosómico se divide en 18 segmentos en base a la secuencia de cotrasformación de marcadores específicos. Se sugiere que el cromosoma contiene cerca de 5 mil genes. Solamente se han mapeado, hasta ahora, algunos genes nutricionales y de resistencia a antibióticos, así como sitios de ataque de fagos y sitios de inserción de plásmidos y transposones.

Los plásmidos son los principales portadores de la resistencia a antibióticos en estafilococo, y se han identificado tres tipos: el primero está formado de plásmidos pequeños de 1.5 a 5 kb de tamaño y con 10 a 50 copias; cada uno contiene un determinante de resistencia simple para tetraciclina, estreptomina, cloranfenicol, macrólidos, kanamicina y sales de cadmio y éstos pueden replicarse en otras especies de gram positivos. Un segundo tipo consta de plásmidos más grandes de 25 a 35 kb de tamaño; con aproximadamente 5 copias por célula; estos típicamente portan resistencia a penicilina o a iones inorgánicos y no se ha observado que se repliquen en otros géneros. Recientemente se ha identificado un tercer tipo, parecido al segundo, que se forma de plásmidos conjugativos también grandes (40 a 60 kb) que típicamente portan resistencia a gentamicina, penicilina, neomicina, compuestos cuaternarios de amonio como bromuro de etidio y algunas veces trimetoprim. Como en las bacterias gram negativas, muchos de los genes de resistencia en estafilococo son portados por transposones y por lo tanto pueden existir tanto en plásmidos o bien integrados al cromosoma. Se incluyen determinantes de resistencia a eritromicina, espectinomina, penicilina (β -lactamasa), gentamicina y probablemente también metilina.

Otros genes accesorios pueden ser portados por elementos genéticos variables: los genes estructurales de la estafiloquinasa y de la enterotoxina A, parecen existir también en transposones.

Ciertos estudios realizados en 1984 en el Reino Unido (17), a fin de tipificar cepas de ERM epidémico, por medio de análisis de plásmidos, determinaron, aparte de factores de resistencia cromosomales, plásmidos de gran peso molecular (15-23 Mdal) que conferían resistencia a gentamicina, propamidina, bromuro de etidio, etc. Algunas cepas

tenían también un plásmido más pequeño (3 Mdal) que confería resistencia a cloranfenicol y otros plásmidos crípticos, de 1 Mdal. En otros estudios, realizados en hospitales de Singapur (29), entre 1982 y 1985, los resultados indicaron que todas las cepas analizadas tenían resistencia cromosomal a gentamicina, kanamicina, estreptomina, eritromicina y sulfonamidas. La mayoría contenía también plásmidos de gran tamaño de 18, 20 y 22 Mdal, junto con plásmidos más pequeños de 1.6 y 1.8 Mdal. Todos estos plásmidos codificaban para la resistencia a otros agentes antimicrobianos.

El estafilococo puede intercambiar material genético por varios mecanismos, incluyendo transducción generalizada, transformación mediada por DNA ya sea de células intactas o protoplastos, conjugación mediada por plásmidos y fusión protoplásmica. La transferencia conjugativa se ha demostrado con plásmidos, pero no con el cromosoma. El estafilococo también intercambia plásmidos con especies de Bacillus y Streptococcus (62). Estos procesos probablemente han sido los responsables de la diseminación de los marcadores de la resistencia a antibióticos dentro de la población estafilocócica de la naturaleza. Por procedimientos de cultivos mezclados, in vitro, se observó alta frecuencia de transferencia, lo que sugiere que ésta puede ser mediada por bacteriófagos (72).

1.9.2. GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A METICILINA

La genética de la resistencia a metilina es tan compleja como su bioquímica y ha sido objeto de controversia desde su detección en 1960. La confusión inicial de si el determinante genético mec, de la resistencia a metilina residía en plásmidos o en el cromosoma, ha sido resuelta. La evidencia de localización plasmídica, fue indirecta y basada en características de eliminación espontánea e inducida de mec de cepas resistentes. De cualquier modo, algunas condiciones asociadas con la eliminación, transducción y transformación de mec sugirieron que el determinante era cromosomal. La transformación de mec por DNA cromosomal, pero no por plásmidos, y la elucidación de su mapa de localización ha demostrado conclusivamente que el

determinante es cromosomal. Ningun alelo equivalente a mec existe en cepas sensibles (75). Las características de resistencia de ERM a otros antibióticos, varía a través del tiempo y de la geografía (72), y en muchos casos hay también variación en cuanto a la localización de la resistencia, ya sea en plásmidos, en el cromosoma o en ambos, lo que indica la presencia de transposones (41).

1.9.2.1. Penicilinas. Un fragmento del mec de 2.3 Mdal hibridiza con fragmentos de plásmido de penicilinas de cepas sensibles y resistentes y con dos fragmentos de 331 Mdal conteniendo el determinante para la resistencia a mercurio en el plásmido de penicilinas. Estos fragmentos pueden ser secuencias de inserción que a veces permiten al mec funcionar como un elemento transferible. Lyon y Skurray (49) reportaron la identificación de secuencias similares repetidas en plásmidos que codifican para la resistencia a metales pesados y a β -lactamasa, en DNA cromosomal de cepas resistentes a metilina y en un transposon que media la resistencia a mercurio.

La presencia de una secuencia de inserción compartida en el mec y en el plásmido de penicilinas permite observar asociaciones entre la producción de penicilinas y la resistencia a metilina. Por ejemplo, recipientes menos efectivos para la transducción de mec requieren la presencia tanto de un determinante cromosomal, como plásmido para la producción de β -lactamasa y la eficiencia de la transferencia es más baja en presencia de un inhibidor de β -lactamasa. La expresión de la resistencia puede ser suprimida por un mutante no inducible de un plásmido de penicilinas (15). Recipientes de S. epidermidis menos efectivos para mec dependen en parte de la presencia del determinante para la resistencia a mercurio. Las secuencias de inserción, por tanto, pueden controlar la integración de mec dentro de DNA cromosomal y plasmídico, y puede explicar los experimentos en los cuales mec ha sido asociado con marcadores no enlazados y con plásmidos (15).

La interrelación entre el determinante de penicilinas, mec, PFP2a y la expresión de la resistencia son sorprendentes. Como se discutió, la producción de penicilinas, o la presencia del determinante de penicilinas es un requerimiento del recipiente para la transducción de mec. El plásmido de penicilinas imparte inductibilidad a la PFP2a.

La secuencia de DNA del fragmento de 9.3 Mdal que codifica para PFP2a tiene una homología con el del gene de penicilinas. Las mutaciones que alteran la inductibilidad del plásmido de penicilinas, suprimen la expresión de la resistencia a meticilina. Una prueba de DNA que hibridiza con el mec, también reconoce que es probable una secuencia de inserción en un plásmido de penicilinas. Entendiendo las bases de esas interacciones puede ayudar a comprender los factores que regulan la expresión de la resistencia a meticilina.

1.9.2.2. PEP2a. El producto proteínico, o productos codificados por mec no han sido bien definidos, pero la PFP2a probablemente está codificada dentro de este determinante. El grupo Matsuhashi (53) ha donado un fragmento de DNA de 9.3 Mdal de una cepa resistente en una de E. coli, este fragmento codifica para la resistencia a tobramicina y el gene estructural de la PFP2a. Dado que la PFP2a clonada no fue inducida por antibióticos β -lactámicos, el sitio regulatorio no está presente en el fragmento de 9.3 Mdal o no funciona en la E. coli. La secuencia de nucleótidos sugiere que es el producto de la fusión de una región regulatoria derivada de un gene de penicilinas y un gene ancestral que codifica la estructura de PEP2a.

1.9.2.3. Otros loci genéticos. Los determinantes genéticos físicamente distintos a mec, pueden alterar la expresión de la resistencia. La primera indicación de que marcadores no ligados a mec podrían alterar la expresión de la resistencia a meticilina vino de estudios de Cohen et al (14), ellos encontraron que la resistencia a meticilina puede ser suprimida por mutaciones en los genes regulatorios de los plásmidos de penicilinas inducibles. Berger-Bachi (6) encontraron que la inserción cromosomal de un transposon dentro de una cepa de S. aureus resistente a meticilina produce transductantes 50 ó 100 veces más sensibles a meticilina. Los sitios de inserción no fueron ligados al mec (41). Tomasz (78) también encontró que un transposon de resistencia a eritromicina insertado dentro de una cepa homogénea produce células heterogéneas en la expresión de la resistencia. Estas células producen PFP2a en cantidades normales. La transformación de DNA en esos derivados heterogéneos en las cepas originalmente homogéneas, produce

resistencia heterogénea. Estos estudios proporcionaron futuras evidencias de un segundo foco regulatorio (factor X) de resistencia a meticilina al lado del gene estructural de PEP2a (13).

1.10. METODOS PARA LA DETECCION DEL ERM

En cuanto a los métodos más utilizados en la actualidad para la detección del ERM, se consideran: difusión en agar, microdilución, dilución en agar, y métodos rápidos con instrumentos automáticos (77). Dada la naturaleza heterogénea de estas cepas, pueden obtenerse fácilmente resultados erróneos, si las condiciones de las pruebas sólo favorecen el desarrollo de la subpoblación sensible, que crece con mayor rapidez (3). Para estimular la expresión fenotípica de la resistencia intrínseca de la subpoblación resistente, que crece más lentamente, a través de los años se ha sugerido hacer diversas modificaciones a los ensayos de sensibilidad:

Utilizar inóculos mayores. Utilizando colonias frescas de un cultivo de 18 a 24 horas de incubación y preparando los inóculos un poco más cargados que en los métodos que señalados.

Añadir NaCl al medio de cultivo. De 2 a 5%, dependiendo del método que se utilice para la detección.

Incubar a temperatura de 35°C o menor. Los cultivos deben ser incubados a temperaturas por debajo de los 37°C para favorecer el crecimiento de las bacterias resistentes. Una temperatura de 35°C es razonable para uso de rutina, pero si la resistencia es muy esperada, deben usarse temperaturas de 30°C.

Incubar por 48 horas. Para permitir el desarrollo de la subpoblación resistente, aunque en este punto hay que tomar en cuenta la especie, ya que las especies coagulasa positivas, con 48 horas de incubación pueden hiperproducir β -lactamasa, y confundir la detección de cepas verdaderamente resistentes (22,13).

El aumento en la concentración de NaCl y del inóculo, puede reducir el tiempo de incubación a 24 horas, sin afectar la CMI resultante de las cepas de estafilococo sensibles (22). Aunque se prefiere esperar hasta las 48 horas para detectar cepas con sensibilidad intermedia (43).

La oxacilina es generalmente el agente antimicrobiano de elección en estas pruebas, ya que es más estable que otras penicilinas resistentes a β -lactamasas y por lo general detecta mejor la heterorresistencia. Sin embargo, la elección puede depender de las características particulares de la cepa (45). Cloxacilina y dicloxacilina no deben usarse. nafcilina tampoco debe usarse si el medio contiene sangre (60). Coudron y colegas han sugerido que la metilina puede detectar resistencia en S. epidermidis, mejor que la oxacilina (18).

En este momento, la detección confiable de ERM parece más segura a través de los métodos de dilución: Microdilución (MIC) utilizando caldo Müeller-Hinton suplementado con cationes divalentes (Ca (100 μ g/ml y Mg 50 μ g/ml) y 2% de NaCl, se incuba a 35°C por 24 horas como mínimo. Este método parece detectar con confiabilidad el ERM, presentando un CMI de metilina mayor o igual a 16 μ g/ml y una CMI de oxacilina o nafcilina mayor o igual a 8 μ g/ml (39).

Un procedimiento que puede ser utilizado alternativamente de escrutinio y para confirmación es el de dilución en agar, que utiliza agar Müeller-Hinton suplementado con 4% de NaCl, con metilina (10 μ g/ml), oxacilina o nafcilina (6 μ g/ml). Un inóculo de aproximadamente 10^4 UFC, obtenido de una suspensión con turbidez semejante al 0.5 de McFarland, se coloca en la superficie del agar, se incuba a 35°C durante 24-48 horas. El crecimiento en la placa indica una cepa con resistencia intrínseca (39).

Las pruebas de difusión de discos, son poco exactas, debido a que los discos aceptados por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica, no tienen correlación con los valores que se obtienen por el método de microdilución. Por tanto, para mejorar la confiabilidad de los resultados por este método, se aconseja, además de las consideraciones antes mencionadas: utilizar discos de oxacilina o metilina (o ambos), observar con cuidado las zonas de inhibición para identificar colonias pequeñas que puedan desarrollarse en éstas y reincubar por 48 horas en total, si aparece alguna zona de tamaño intermedio (77).

Se han realizado numerosos estudios para estandarizar y comparar estos métodos, pero los resultados difieren en función del tipo de laboratorio en que se realicen los estudios, su localización, el tipo de cepa, etc. Estudios realizados recientemente (1988) por Pfaller

et al (64), indican los siguientes valores de sensibilidad, valor predictivo negativo, especificidad y valor predictivo positivo de los métodos de detección por difusión de discos de Kirby-Bauer y por dilución en agar (tomando en cuenta todas las modificaciones sugeridas por Thornsberry y colegas) comparadas con el método de referencia: Microdilución.

	Difusión en agar	Dilución en agar
Sensibilidad	94	95-97
V P N*	98	99
Especificidad	67	64-74
V P P**	32	30-37

*Valor predictivo negativo.

**Valor predictivo positivo.

Estos datos indican que ambos métodos pueden ser útiles como métodos de escrutinio para detectar resistencia a metilicina, con la condición de que todas las cepas que resulten resistentes sean confirmadas por microdilución, esto es debido al gran número de resultados falsos resistentes que pueden presentarse. En el caso de difusión de discos, la manipulación de los mismos y los criterios de interpretación son más difíciles de estandarizar, por otro lado, el método de dilución en agar ha sido muy recomendado por varios autores como el mejor método de escrutinio para detectar ERM (64). La elección de un método de escrutinio depende de la capacidad técnica del laboratorio que desea identificar este tipo de microorganismo, sin embargo, debería contarse con una alternativa para confirmación (MIC) intralaboratorio, o bien, confirmar en laboratorios cercanos con mayores recursos.

1.11. SISTEMAS DE TIPIFICACION EPIDEMIOLOGICA

Debido a su ubicuidad, es deseable algunas veces separar cepas de estafilococo en tipos o grupos. La tipificación se indica generalmente para detectar la fuente de un brote nosocomial o comunitario, o la fuente de una intoxicación estafilocócica por alimentos.

Se han propuesto una gran variedad de técnicas, pero las más utilizadas incluyen: tipificación serológica, perfiles bioquímicos (biotipificación), perfiles de sensibilidad antimicrobiana (antibiogramas), patrones de sensibilidad a bacteriofagos (fagotipificación) y métodos de tipificación de DNA (perfiles plásmidos, análisis de restricción de enzimas de DNA cromosomal o plásmido con endonucleasas e hibridización de DNA).

La **tipificación serológica**, basada en la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos a ácido teicóico de la pared celular del estafilococo (71), ha mostrado ser de valor, pero debido a las dificultades de preparar los antisueros específicos y de estandarizar los métodos, es raramente utilizada. La **biotipificación** es utilizada principalmente con especies de EC-, ya que las cepas de S. aureus son relativamente homogéneas bioquímicamente. La biotipificación incluye la detección de hemólisis, lipólisis, proteólisis, producción de pigmentos, fermentación de lactosa, identificación de β -hemolisinas y la utilización de un sistema miniaturizado de pruebas bioquímicas como es el caso del sistema API (API Staph Ident y API Staph Trac). El problema principal que implica el uso de los sistemas anteriores en estudios epidemiológicos es que estos fueron desarrollados con el propósito de la diferenciación de especies y no subespecies o delineación de cepas, como resultado el número de biotipos diferentes para cualquier especie dada es limitado y la mayoría de los aislados clínicos están contenidos dentro de pocos biotipos distintos (54).

El **antibiograma** puede ser utilizado epidemiológicamente ya que es determinado de rutina en el laboratorio y se han establecido procedimientos altamente estandarizados. La emergencia de una cepa de estafilococo con un patrón de sensibilidad único puede ser una señal importante para el microbiólogo y puede proveer un marcador por el que se pueden detectar cepas similares. Debe ser reconocido, sin embargo, que los patrones de sensibilidad pueden ser fuertemente influenciados por la amplitud del uso de antibióticos dentro de una localidad dada, por lo que los resultados pueden variar considerablemente de una comunidad a otra. Por tanto, los antibiogramas son las técnicas más utilizadas dentro de un área determinada y no en áreas geográficas a gran escala. Los perfiles de sensibilidad pueden variar aún dentro de una institución,

haciendo la identificación de las cepas más difícil.

Desafortunadamente, existen algunos problemas que limitan su utilidad, los principales son: a) una gran proporción de aislados nosocomiales son resistentes a múltiples antibióticos, por tanto se limita el número de antibiogramas únicos observados en una institución; b) día a día existe una variación considerable en los antibiogramas, que pueden resultar en variaciones analíticas en los métodos, y c) la expresión de la resistencia a antibióticos en algunas cepas puede ser inestable (65).

El sistema más establecido para la tipificación epidemiológica de estafilococo es la **fagotipificación**. Desde 1952 esta técnica ha encontrado un amplio uso, y se ha establecido un sistema internacional para controlar los fagotipos y los procedimientos (PffLS Staphylococcus Reference Laboratory) (59). No es, sin embargo, un sistema estático, y debe responder a la emergencia de nuevas cepas que no sean tipificables. Entonces los bacteriófagos utilizados en la serie estándar de tipificación varían y se extienden a través de los años. Este factor debe ser considerado cuando se comparan los patrones de años previos con los actuales. La mayoría de las series estándar, sólo incluyen bacteriófagos para *S. aureus* (45). Se han definido tres características que deben poseer los sistemas de fagotipificación para ser útiles epidemiológicamente: a) debe tipificar o lisar un gran número de cepas; b) debe ser reproducible; diferentes aislados derivados de la misma clona bacteriana, deben dar reacciones esencialmente idénticas, y c) debe discriminar cepas relacionadas epidemiológicamente de las no relacionadas (54).

La determinación de **perfiles de plásmidos** de estafilococo por electroforesis en gel de agarosa parece ser un método prometedor para la identificación de cepas o poblaciones clonales. Sin embargo, esta propuesta está muy por debajo del alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos. En ocasiones, pueden observarse variaciones en el perfil plásmido dentro de una cepa. Muchas de las especies de estafilococo demuestran perfiles plásmidos complejos, permitiendo una variación considerable entre cepas. Algunas cepas pueden portar de 5 a 10 plásmidos diferentes (45). Se puede llevar a cabo además, una subsecuente identificación de los plásmidos individuales aislados por tratamiento con enzimas endonucleasas o enzimas de restricción y determinación de

los fragmentos formados, también por electroforesis en gel de agarosa, lo que proporciona un perfil más depurado de cada una de las cepas, ya que algunos plásmidos pueden tener el mismo peso molecular, presentarse en el gel en la misma posición y sin embargo tener secuencias de nucleótidos diferentes. Las técnicas de **hibridización de DNA** están también basadas en las propiedades físicas únicas del DNA, tomando ventaja de la fidelidad de los pares de bases, uno puede inequívocamente establecer que dos plásmidos son idénticos utilizando un fragmento de DNA o un plásmido entero de una de las cepas como una prueba marcada en un ensayo de hibridización Southern. Este método correlaciona bien con la fagotipificación y ofrece una alternativa para tipificar aislados que no puedan ser fagotipificados (58).

2. OBJETIVOS

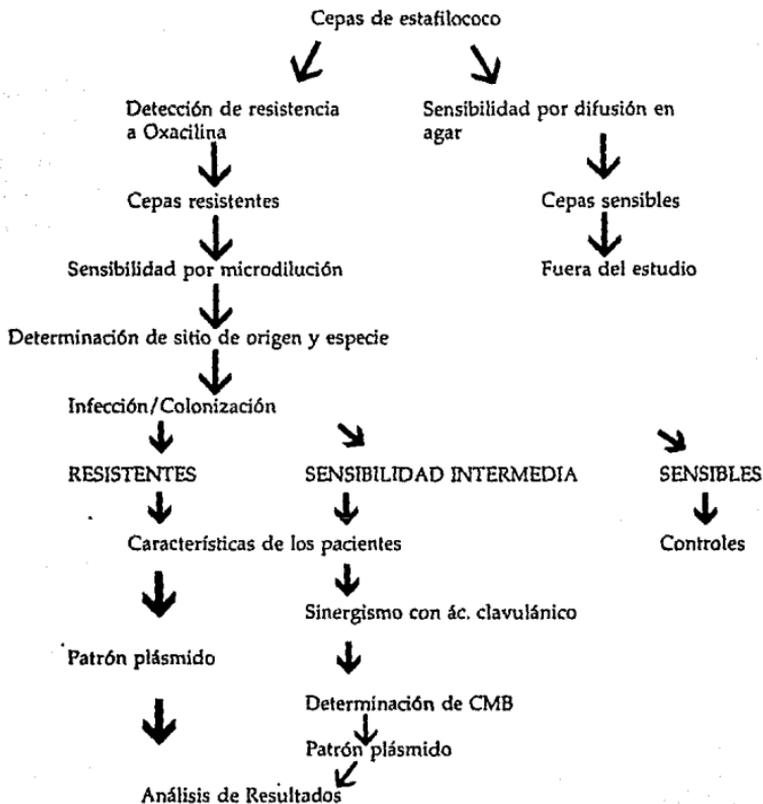
- 2.1. Determinar la prevalencia y distribución por especie de ERM causante de infecciones nosocomiales en el INNSZ de julio de 1988 a junio de 1989.**
- 2.2. Poner en práctica un procedimiento sensible y de fácil ejecución para la detección y confirmación de la resistencia a meticilina accesible y de uso generalizado en hospitales de segundo y tercer nivel.**
- 2.3. Determinar las características bacteriológicas de los microorganismos resistentes a meticilina y de aquellos con sensibilidad intermedia.**
- 2.4. Determinar el comportamiento de estos microorganismos frente a otros antibióticos con aplicación potencial en las infecciones por ERM.**
- 2.5. Determinar las características epidemiológicas de los pacientes con aislamiento de ERM.**
- 2.6. Obtener el perfil de plásmidos de los microorganismos resistentes o con sensibilidad intermedia a meticilina como método de tipificación.**

3. HIPOTESIS

- 3.1. La prevalencia del ERM en el INNSZ es semejante a aquella informada por otros hospitales de tercer nivel en México y en otros países.
- 3.2. El método que se utilizará tendrá mayor sensibilidad para la detección de ERM que el método de uso común en el INNSZ.
- 3.3. Se espera encontrar mayor frecuencia de EC- como ERM, principalmente S. epidermidis, el cual procederá primordialmente de secreciones de heridas.
- 3.4. Los ERM que se aislen de los pacientes hospitalizados en el INNSZ serán predominantemente heterorresistentes y presentarán resistencia cruzada con aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclina, así como susceptibilidad a ciprofloxacina, rifampicina, trimetoprim-sulfametoxazol y vancomicina.
- 3.5. Se espera que la prevalencia de las cepas con sensibilidad intermedia (cepas tolerantes e hiperproductoras de β -lactamasas) en el INNSZ sea tan alta como la resistencia a meticilina.
- 3.6. Los pacientes con infección o colonización por ERM tendrán como factores de riesgo aquellos previamente descritos.
- 3.7. Se espera encontrar un patrón uniforme así como un mayor número de plásmidos en aquellos microorganismos completamente resistentes a meticilina que en los organismos con sensibilidad intermedia.

4. DISEÑO DEL ESTUDIO

Este es un protocolo retrolectivo, observacional y abierto, donde se incluyen los microorganismos resistentes a meticilina como sujetos de estudio, los cuales fueron detectados en el Laboratorio de Microbiología Clínica del INNSZ.



25. MATERIAL Y METODOS

5.1. POBLACION Y PERIODO DEL ESTUDIO.

Se utilizaron en el estudio cepas de estafilococo aisladas de todo tipo de cultivos, obtenidas del Laboratorio de Microbiología Clínica del Departamento de Infectología del INNSZ de julio de 1988 a junio de 1989*. Las cepas fueron presuntivamente identificadas como estafilococo y luego se probaron por el método de dilución en agar (Ver apéndice I) para detectar resistencia a oxacilina.

La resistencia se confirmó por el método de microdilución (MIC) (ver apéndice II). Se obtuvieron los siguientes datos (de entrevistas personales cuando fue posible) de cada uno de los pacientes de los cuales se aisló el ERM:

- a) Fecha de aislamiento del germen
- b) Edad y sexo
- c) Fecha de internamiento
- d) Tiempo de estancia en el Hospital
- e) Diagnóstico de ingreso (enfermedades asociadas)
- f) Tipo de cultivo (sangre, vías urinarias, catéteres, vías aéreas, secreciones, tejidos blandos, diálisis y líquidos de cavidades normalmente estériles (LCNE))
- g) Administración de antimicrobianos desde cuatro semanas antes de la detección del germen:
- h) Procedimientos invasivos, relacionados con el tipo de cultivo, practicados al menos cuatro semanas antes del aislamiento.

El ERO se consideró causante de infección en las siguientes condiciones: i) sangre: aislamiento de EC-RO en más de dos muestras tomadas en sitios diferentes, el EC+RO cuando se aisló, cuando menos, en un frasco de hemocultivo. ii) orina: aislamiento de 10^4 o más unidades formadoras de colonias (UFC) de estafilococo como germen único en un urocultivo obtenido de chorro medio, con o sin leucocituria, en los pacientes con

* Las cepas aisladas desde Julio de 1988 a Enero de 1989 fueron guardadas en papel con Caldo Soya Tripticasa y 20% de Glicerol y almacenadas a -20°C, recuperándose después para la detección de la resistencia a oxacilina.

sonda vesical la muestra se obtuvo por punción de la sonda y se consideró 10^2 UFC/ml como mínimo (29,75). iii) catéteres intravasculares y prótesis: para los primeros se consideró como positivo la presencia de más de 15 UFC, después del rodamiento de un segmento de dos pulgadas de la punta del catéter en una caja con medio de cultivo (41). iv) secreciones broncopulmonares: se consideró solo al EC+RO en las siguientes muestras: expectoración con más de 25 leucocitos y menos de 10 células epiteliales por campo 10X en un examen microscópico (49), aspirado transtraqueal, y broncoscopia (cuando fue el germen predominante). v) heridas con evidencia de inflamación, secreción purulenta y el aislamiento del ERO como agente único o como organismo predominante en infecciones mixtas. vi) En líquidos obtenidos de cavidades normalmente estériles se consideró infección al aislamiento del ERO, siempre y cuando hayan desarrollado en más de un medio de cultivo, asociado a: líquido de diálisis peritoneal con un mínimo de 100 leucocitos/ mm^3 ; derrame pleural con un pH menor a 7.3, una relación de proteínas del líquido pleural con las proteínas plasmáticas de 0.5 g, o más de 10,000 leucocitos/ mm^3 (53,14) y líquido cefalorraquídeo con 100 leucocitos/ mm^3 ó más y 100 mg/dl de proteínas (6).

5.2. PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACION.

5.2.1. **Morfología Colonial.** Esta se observó en placas de agar sangre de carnero tratando de identificar colonias cremosas, opacas, de color blanco o amarillo, posiblemente hemolíticas, circulares, con bordes regulares, de 1 a 3 mm de diámetro, después de 24 h de incubación a 37°C.

5.2.2. **Morfología Microscópica.** Se hizo un frotis de la colonia y se tiñó por el método de Gram (39). Se observaron cocos de 0.5 a 1.5 μm en diámetro, gram positivos y dispuestos, por lo general, en forma de racimos.

5.2.3. **Mediante la prueba de Catalasa.** El estafilococo posee esta enzima que descompone el peróxido de hidrógeno, liberando oxígeno libre, por tanto, debe resultar invariablemente positiva. Se determinó colocando una colonia con un aplicador dentro de una gota de H_2O_2 (78).

5.2.4. Prueba de Coagulasa en tubo. Llevada a cabo inoculando 0.5 ml de plasma humano heparinizado, diluido 1:2 con solución salina, con una colonia de estafilococo.

Las cepas coagulasa positivas generalmente producen un coágulo visible dentro de las primeras 4 horas de incubación a 35°C. Si la prueba es aún negativa después de éste tiempo se saca de la estufa y se deja a temperatura ambiente hasta las 24 h que puede ser considerada negativa. Esto es debido a que las bacterias pueden producir enzimas fibrinolíticas a altas temperaturas que disuelven el coágulo formado después de las 4 horas (76).

5.2.5. Fermentación de Manitol. La mayoría de las cepas de S. aureus, en contraste con los EC-, pueden fermentar manitol y formar ácido (76,78).

5.2.6. Sensibilidad a Novobiocina. Esta es una prueba presuntiva para la identificación de S. saprophyticus, aunque existen otras dos especies de EC- resistentes a novobiocina (S. cohnii y S. xylosus), las cuales, por lo general, no tienen significado clínico. Se inoculó una placa de agar sangre de carnero con una suspensión con turbidez semejante al 0.5 de McFarland, se colocó un disco con 5 µg de novobiocina (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, M. D.) y se incubó a 35°C por 18-24 h. Las cepas resistentes mostraron un halo de inhibición igual o menor a 16 mm (76).

5.2.7. Determinación de DNAsa. Solamente el S. aureus es productor de DNAsa termoestable. Esta enzima, hidroliza DNA, aún después de haberla expuesto al calor (76). Se inoculó con las cepas una placa de agar DNAsa (Bioxon), se incubó por 48 h a 37°C, se agregó azul de toluidina a la superficie de la placa y se dió como positivo la aparición de un halo color violáceo alrededor del inóculo.

5.2.8. La confirmación de la especie en el estafilococo resistente a oxacilina por microdilución se llevó a cabo con micrométodos comerciales (API 20 GP y API Staph Trac, Analytab Products, Plainview,N.Y.).

5.2.8.1. API Staph Trac. Es un micrométodo de identificación rápida para especies de estafilococo y ciertos micrococos. Contiene 20 microcúpulas con 19 sustratos y un control negativo. Después de la inoculación, las tiras se incubaron en aerobiosis a 37°C por 24h.

5.2.8.1. API 20 GP. Es otro sistema de identificación tanto para estafilococo como estreptococo del grupo D, y también consta de 20 pruebas bioquímicas.

5.3. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

A todas las cepas de estafilococo aisladas en el INNSZ durante el período de estudio se les determinó antibiograma por el método de difusión en agar (Ver apéndice I) a los siguientes antibióticos: nitrofurantoina, gentamicina, amikacina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, penicilina (Bigaux Diag., México, D. F.) y Vancomicina (Difco, Detroit, Mich.).

5.3.1. DETECCION DE LA RESISTENCIA A OXACILINA.

La sensibilidad a penicilinas resistentes a penicilinas se determinó por el método de dilución en agar utilizando oxacilina. Desde junio de 1988 a febrero de 1989 se utilizaba agar Müller-Hinton suplementado con 7 µg/ml de oxacilina (Bristol), 50 µg/ml de iones Ca^{+2} , 25 µg/ml de iones Mg^{+2} y 4% de NaCl. Partiendo de un cultivo de 24-48 horas se preparaba una suspensión en solución salina, con turbidez semejante al 0.5 del patrón de McFarland, con ésta se humedecía un hisopo, y se depositaba sobre la superficie del agar. Se incubaba por 48 horas a 35°C, reportándose como resistencia al crecimiento masivo de la superficie inoculada. A partir de marzo de 1989 se realizaron algunas modificaciones: Se utilizó oxacilina 2µg/ml*, 100 µg/ml de iones Ca^{+2} , 50 µg/ml de iones Mg^{+2} y 4% de NaCl. Se partió de un cultivo fresco (18-24 horas) para preparar una suspensión con turbidez semejante al estándar 0.5 de McFarland, de ésta se tomó una alícuota de 10 µl (10^4 UFC) para inocular las placas con agar y éstas se incubaron a 30°C por 48 horas. En estas condiciones sólo crece la subpoblación de estafilococo resistente a oxacilina, por tanto se reportaron como resistentes todas aquellas cepas en las que se observó crecimiento de una o más colonias (34,43).

Se utilizó como control sensible S. aureus ATCC 29213 y como control resistente un S. epidermidis resistente a oxacilina aislado en el hospital (INNSZ 1).

* La concentración de oxacilina recomendada es de 6 µg/ml, pero con la finalidad de detectar todas aquellas cepas con sensibilidad intermedia, la concentración de oxacilina se disminuyó a 2 µg/ml.

5.3.2. CONFIRMACION DE LA RESISTENCIA A OXACILINA.

A todas las cepas que resultaron resistentes a oxacilina por el método de escrutinio, se les realizaron ensayos de sensibilidad por microdilución (Ver apéndice II) para confirmar el resultado de resistencia a oxacilina obtenido por difusión en agar (56), de acuerdo con las recomendaciones de la NCCLS: utilizar caldo Müeller-Hinton suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de Ca^{+2} , 25 $\mu\text{g/ml}$ de Mg^{+2} y 2% de NaCl; incubar a 30°C y por 24 y 48 horas, dependiendo de la especie, en S.aureus por 24 horas (ya que esta especie puede producir β -lactamasas en cantidades excesivas, con incubación prolongada y aumentar la CMI (57). Se utilizaron como controles S.aureus ATCC 29213 y S. faecalis ATCC 29212.

5.3.3. DETERMINACION DE CMB.

A las cepas con sensibilidad intermedia a oxacilina por microdilución (CMI de 2-8 $\mu\text{g/ml}$) se les determinó su concentración mínima bactericida (CMB) a penicilina, oxacilina y vancomicina, para detectar tolerancia (Ver apéndice III), comparándola con la CMB de cepas resistentes (CMI >16 $\mu\text{g/ml}$) y de cepas sensibles (CMI <2 $\mu\text{g/ml}$).

5.3.4. PRUEBAS DE SINERGISMO ENTRE OXACILINA Y ACIDO CLAVULANICO.

Se determinó el efecto de un inhibidor de β -lactamasas (ác. clavulánico) en la CMI y CMB de oxacilina de las cepas con sensibilidad intermedia, utilizándose concentraciones de 4, 2, 1, 0.5, y 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de ác. clavulánico frente a concentraciones variables de oxacilina de 0.12 a 128 $\mu\text{g/ml}$ (Ver apéndice IV).

5.4. ANALISIS DE PLASMIDOS.

Se llevó a cabo determinación del perfil de plásmidos de 37 cepas de ERO y 10 cepas con SI por un método de extracción alcalina (22) modificado para estafilocos (Ver apéndice

V). Las cepas se cultivaron en caldo L por a 37°C por 16-18 h. Se centrifugaron y el precipitado se lavó una vez con 1 ml de buffer TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA disódico, pH 7.5). Después de centrifugar otra vez, el paquete celular se resuspendió en 100 μ l de buffer TEG (50 mM glucosa, 10 mM EDTA y 25 mM de tris-HCl, pH 8) conteniendo 130 μ g/ml de lisostafina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), se incubó a -70°C por 10 min, se descongeló a temperatura ambiente y se incubó a 37°C por 30 min. Las células se lisaron con 200 μ l de una solución detergente (SDS 1% y NaOH 0.2 M), agitándose suavemente y manteniéndose en hielo por 5 min. Después se añadieron 150 μ l de acetato de sodio 3 M (pH 4.8), se mezcló por inversión y se mantuvo 1 h en hielo, para permitir la precipitación de la mayor parte de las proteínas, RNA de alto peso molecular y DNA cromosomal. Se centrifugó por 5 min hasta que se obtuvo un sobrenadante casi claro. Se transfirieron 400 μ l del sobrenadante a un tubo limpio y se mezcló con 1 ml de etanol al 95% enfriado a -20°C durante 30 min, después de lo cual se obtuvo un precipitado, que se centrifugó, se dejó secar y se resuspendió en 30 μ l de buffer TES (30 mM Tris, 5 mM EDTA y 50 mM NaCl, pH 8) conteniendo 40 μ g/ml de RNAsa pancreática libre de DNAsa (Sigma). Se mezcló con 5 μ l de mezcla colorante (0.035 mM EDTA, 0.05 mg/ml Azul de bromofenol glicerol al 50%) y se aplicó a un gel de agarosa (0.8% p/v) para electroforesis a 80 V por 4 horas aproximadamente, en buffer Tris-borato (89 mM Tris (pH 8.2), 2.5 mM EDTA disódico (pH 8) y 89 mM de ácido bórico). Como marcador de peso molecular se aplicó el DNA fago lambda, digerido con Hind III. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) durante 30 min y se fotografió sobre un transiluminador de luz UV con una cámara Polaroid con película tipo 55, con exposición de 3 segundos.

6. RESULTADOS

6.1. PREVALENCIA Y DISTRIBUCION.

Durante el periodo de estudio se aislaron 961 cepas de estafilococo, 355 EC+ (37%) y 606 EC- (63%), de las cuales 83 (8.6%) resultaron resistentes a oxacilina por el método de escrutinio (23 EC+ y 60 EC-). La resistencia se confirmó en 40 (4.16 %) de estas cepas (3 EC+ y 37 EC-) y en 13 (1.35 %) la sensibilidad resultó intermedia (SI) (1 EC+ y 12 EC-). En la tabla 1 se describe la relación de la distribución por especie de acuerdo al resultado obtenido por microdilución. Solamente a tres de las 23 cepas de EC+ resistentes por el método de escrutinio se les confirmó la resistencia y una fue sensible.

TABLA 1

DISTRIBUCION DE LOS ESTAFILOCOCOS AISLADOS EN EL INNSZ DURANTE JULIO DE 1988
A JUNIO DE 1989.

E S P E C I E	NO.	Resistente por el		RESISTENTE		INTERMEDIO		S E N S I B L E	
		Método de Escrutinio		no.	%	no.	%	no	%
<u>S. aureus</u>	355	23	(6.5%)	3	(0.8)	1	(0.2)	355	(99)
ECN	606	60	(9.9%)	37	(6.1)	12	(2.0)	557	(92)
Novo sensible	568	53	(9.3%)	36	(6.3)	12	(2.1)	520	(91)
Novo resistente	38	7	(18.4%)	1	(2.6)	-	(-)	37	(97)
TOTAL	961	83	(8.6%)	40	(4.2)	13	(1.4)	908	(94)

6.2. SITIO DE AISLAMIENTO:

El sitio de origen de las 83 cepas resistentes por el método de escrutinio se describe en la tabla 2 y se agrupan de acuerdo al resultado del método de confirmación (MIC). Las cepas con resistencia confirmada provinieron principalmente de tejidos blandos, vías urinarias y líquido de diálisis, siendo en su mayoría (92.5%) EC-; las cepas con SI se aislaron de tejidos blandos y vías aéreas, entre otras, fueron en su mayoría (92%) EC- y las cepas que resultaron sensibles se recuperaron de tejidos blandos, vías aéreas, sangre y con predominio de los EC+ (63%).

T A B L A 2

**SITIOS DE ORIGEN DE 83 CEPAS DE STAFILOCOCO QUE DESARROLLARON EN AGAR
CON OXACILINA (2µg/ml)**

SITIO DE ORIGEN	RESISTENTES ($\geq 16 \mu\text{g/ml}$)		INTERMEDIAS (2-8 $\mu\text{g/ml}$)		SENSIBLES ($\leq 1 \mu\text{g/ml}$)	
	coag. (+)	coag. (-)	coag. (+)	coag. (-)	coag. (+)	coag. (-)
SANGRE	3	3	1	-	5	2
VIAS						
URINARIAS	-	6	-	2	2	5
CATETERES	-	3	-	2	1	-
VIAS						
AEREAS	-	3	-	3	7	-
SECRECIONES	-	1	-	-	-	-
TEJIDOS						
BLANDOS	-	11	-	4	4	4
DIALISIS	-	6	-	1	-	-
L.C.N.E.*	-	4	-	-	-	-
T O T A L	3	37	1	12	19	11

*L.C.N.E.: Líquidos de cavidades normalmente estériles.

Al determinar si el microorganismo fue colonizante o infectante encontramos que el 50% de los estafilococos resistentes a oxacilina (RO) y el 53% de aquellos con SI fueron infectantes, lo que indica un verdadero significado clínico. Todos los EC+ se encontraron asociados a verdaderas infecciones. Estos datos se muestran en la tabla 3.

T A B L A 3
PROPORCION DE ESTAFILOCOCO NO SENSIBLE A OXACILINA INFECTANTE

CARACTERISITICA	RESISTENTE coagulasa		INTERMEDIO coagulasa		TOTAL coagulasa	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
COLONIZANTE	-	20	-	6	-	26
INFECTANTE	3	17	1	6	4	23

6.3. CARACTERISTICAS EPIDEMIOLOGICAS:

Las características epidemiológicas de los pacientes de quienes se obtuvieron los microorganismos con resistencia confirmada y con sensibilidad intermedia se muestran en la tabla 4. Las cepas RO correspondieron a 30 pacientes con 38 infecciones y las cepas con SI a 10 pacientes y con 11 infecciones. El tiempo de evolución, el tipo de enfermedades asociadas, la administración previa de antibióticos, la edad y sexo fueron semejantes en ambos grupos.

TABLA 4
CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON AISLAMIENTO DE ESTAFILOCOCO
RESISTENTE A OXACILINA (CM[≥ 2 μ g/ml])

CARACTERÍSTICA	ESTAF. R O	ESTAF. S I
Número de Pacientes	30	10
Número de Infecciones	38	11
Edad Promedio (rango)	42 (17-76)	40 (26-66)
Sexo F(%):M(%)	13 (44)-17 (56)	5 (50)-5(50)
Tiempo promedio de internamiento previo a detección	23 días	29 días
ENFERMEDADES ASOCIADAS (%)		
Insuf. Renal Crónica	9 (22)	3 (23)
Colagenopatías	7 (17)	1 (7.7)
Neoplásias Hematológicas	4 (9.7)	2 (15.4)
Hepatopatías Crónicas	6 (14.6)	1 (7.7)
Diabetes Mellitus	4 (9.7)	1 (7.7)
Cirugía de Tubo Digestivo	3 (7.3)	2 (15.4)
Otras*	7 (17.0)	3 (23)
Administración previa de antibióticos (4 semanas)	68.4%	77%
Procedimientos invasivos previos** (4 semanas)	40.0%	8.0%

* Otras: Fibrosis Pulmonar, Mielofibrosis, Leptopirosis, HIV(+), Pneumonía basal, Hipertensión arterial, Cryptococosis y Pseudotumor cerebral con derivación.

** Procedimientos invasivos relacionados al tipo de cultivo.

6.4. MICROBIOLOGIA:

En cuanto a la identificación final de los estafilococos no sensibles a oxacilina, en la tabla 5 se observa que la especie más común fue S. epidermidis, seguido por otros EC-sensibles a novobiocina, como el S. hominis y el S. haemolyticus, y en menor proporción se encontraron S. aureus y EC-resistentes a novobiocina (S. cohnii).

T A B L A 5

IDENTIFICACION DE ESTAFILOCOCO NO SENSIBLE A OXACILINA

E S P E C I E	RESISTENTES		INTERMEDIOS	
	No.	(%)	No.	(%)
<u>S. aureus</u>	3	(7.5)	1	(7.7)
<u>S. epidermidis</u>	22	(55.0)	12	(92.3)
<u>S. hominis</u>	6	(15.0)		
<u>S. haemolyticus</u>	6	(15.0)		
<u>S. warneri</u>	1	(2.5)		
<u>S. simulans</u>	1	(2.5)		
<u>S. cohnii</u>	1	(2.5)		
TOTAL	40		13	

6.5. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD:

La sensibilidad antimicrobiana realizada por difusión en agar en las 83 cepas con resistencia mostró que: el 100 % de las cepas fueron resistentes a penicilina, el 52 % a eritromicina, el 46 % a gentamicina, el 40 % a cloranfenicol, el 28 % a tetraciclina y el 14 % a amikacina. Los antibióticos con mejor actividad contra estas cepas fueron: nitrofurantoina (1.2 %) y vancomicina (2.4%). En la tabla 6 se muestra la sensibilidad por

microdilución de las mismas 83 cepas (aquí los resultados se expresan en términos de CMI 50 y CMI 90, es decir la CMI que inhibe al 50 y al 90 % de las cepas respectivamente). Se distribuyeron en tres grupos: las cepas RO, aquellas con SI y las sensibles a oxacilina. Como puede observarse, las cepas RO mostraron resistencia a otros antibióticos, además de la oxacilina: gentamicina 82 %, eritromicina 75 %, clindamicina 72 %, amikacina 55 % y fueron totalmente sensibles a vancomicina. Eritromicina mostró una MIC 50 notablemente menor frente a las cepas sensibles a oxacilina, cotrimoxazol reveló pobre actividad frente a las RO y SI y muy buena susceptibilidad en las sensibles, rifampicina mostró escasa resistencia en los tres grupos, a diferencia de clindamicina que fue pobremente activa contra los diferentes grupos, amikacina fue más activa que gentamicina tanto en las cepas resistentes como en las intermedias y finalmente, observamos 27 % de resistencia a ciprofloxacina en ERO. Las cepas sensibles solamente presentaron resistencia a penicilina y los CMI 50 y 90 se encontraron en los límites más bajos del rango. En la figura 6.5.2 se esquematizan los niveles de sensibilidad en los tres grupos de cepas.

T A B L A 6

SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR MICRODILUCION DE TRES POBLACIONES DE ESTAFILOCOCO (RESISTENTE, INTERMEDIO Y SENSIBLE A OXACILINA)
(C M I en $\mu\text{g/ml}$)

	RESISTENTES (40)			INTERMEDIOS (13)			SENSIBLES (30)			
	Rango	C	M	Rango	C	M	Rango	C	M	I
		50	90		50	90		50	90	
PENICILINA	≤ 0.25 - ≥ 16	16	16	≤ 0.25 - ≥ 16	2	16	≤ 0.25 - ≥ 16	0.5	8	
OXACILINA	16- ≥ 32	32	32	2-8	4	8	≤ 0.5 -1	0.5	1	
VANCOMICINA	≤ 0.5 -8	1	2	≤ 0.25 -2	0.5	1	≤ 0.5 -2	1.0	1	
ERITROMICINA	≤ 0.12 - ≥ 8	8	8	≤ 0.12 - ≥ 8	8	8	≤ 0.12 -8	0.12	8	
COTRIMOXAZOL*	≤ 1.25 - ≥ 80	40	80	≤ 1.25 - ≥ 80	10	40	≤ 1.25 - ≥ 80	1.25	80	
RIFAMPICINA**	≤ 0.5 - ≥ 32	0.5	32	≤ 0.5 -16	0.5	2	≤ 0.5 -16	0.5	2	
CLINDAMICINA	≤ 0.25 - ≥ 16	16	16	≤ 0.25 - ≥ 16	16	16	≤ 0.25 - ≥ 16	0.25	16	
AMIKACINA	≤ 1 - ≥ 64	8	64	≤ 1 - ≥ 64	8	32	1- ≥ 32	2.0	32	
GENTAMICINA	≤ 0.25 - ≥ 16	16	16	≤ 0.25 - ≥ 16	4	16	≤ 0.25 - ≥ 16	0.25	16	
CIPROFLOXACINA	≤ 0.06 - ≥ 4	0.25	4	≤ 0.06 -2	0.12	0.5	≤ 0.06 - ≥ 4	0.12	2	
TETRACICLINA	≤ 0.5 - ≥ 32	2	32	≤ 0.5 - ≥ 32	2	32	≤ 0.5 - ≥ 32	0.5	32	

* Trimetoprim-sulfametoxazol.

** Concentración mínima detectada en sangre.

TABLA 7
PORCENTAJE DE RESISTENCIA POR MICRODILUCION DE TRES POBLACIONES DE ESTAFILOCOCO

ANTIBIOTICO	RESISTENTE (40)	INTERMEDIOS (13)	SENSIBLES (30)
	%	%	%
PENICILINA	100	100	100
VANCOMICINA	0	0	0
ERITROMICINA	75	61	27
COTRIMOXAZOL	37	8	7
RIFAMPICINA	18	8	7
CLINDAMICINA	72	54	23
AMIKACINA	55	15	10
GENTAMICINA	82	38	23
CIPROFLOXACINA	27	0	3
TETRACICLINA	20	31	13

En la tabla 8 se muestra la actividad letal de penicilina, oxacilina y vancomicina contra las 13 cepas con SI, comparado con 10 cepas RO y 10 cepas sensibles. Se observó que en las RO no existe diferencia entre la CMI y CMB para penicilina, oxacilina y vancomicina. En las cepas sensibles a oxacilina la diferencia para penicilina fue de 2 títulos, para oxacilina de uno y para vancomicina de dos. En cambio, en el caso de las cepas con SI la diferencia entre CMI y CMB para penicilina fue de tres o más títulos, para oxacilina de dos o más y para vancomicina de dos títulos.

TABLA 8
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACION MINIMA BACTERICIDA (CMB) PARA PENICILINA, OXACILINA Y VANCOMICINA

SENSIBILIDAD	No de cepas	C				M				I			
		Pe		Oxa		Pe		Oxa		Pe		Oxa	
A		50	90	50	90	50	90	50	90	50	90	50	90
RESISTENTES	10	≥16	≥16	≥32	≥32	1	2	≥16	≥16	≥32	≥32	2	4
INTERMEDIOS	13	2	≥1	4	8	≥0.5	1	≥16	≥16	≥32	≥32	1	2
SENSIBLES	10	≥0.25	2	≥0.5	2	1	1	1	8	1	2	1	1

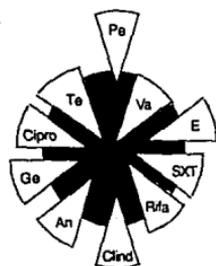
El efecto sinergista del ácido clavulánico en la CMI y la CMB de oxacilina de cepas RO y con SI se muestra en la tabla 9. En las cepas resistentes la CMI de oxacilina no se ve afectada por el aumento en la concentración de ácido clavulánico y es por esto que no hubo necesidad de realizar CMB. En las cepas con SI al aumentar la concentración de ácido clavulánico, tanto la CMI como la CMB disminuyen proporcionalmente. La figura 6.5.3 muestra los mecanismos de resistencia y el efecto sinergista con el ácido clavulánico.

TABLA 9
SINERGISMO ACIDO CLAVULANICO-OXACILINA

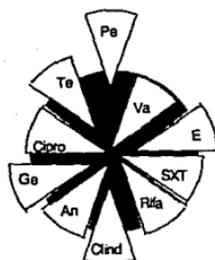
CONC. DE ACIDO CLAVULANICO ($\mu\text{g/ml}$)	HIPERPRODUCTORAS DE β -LACTAMASA (13)				RESISTENTES (40)			
	C M I		C M B		C M B		C M B	
	50	90	50	90	50	90	50	90
0.0	4	8	64	128	≥ 128	≥ 128	-	-
0.25	2	8	16	128	≥ 128	≥ 128	-	-
0.50	0.5	4	16	64	≥ 128	≥ 128	-	-
1.00	0.25	2	16	32	≥ 128	≥ 128	-	-
2.00	≤ 0.06	0.12	2	32	≥ 128	≥ 128	-	-
4.00	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	16	≥ 128	≥ 128	-	-

Un fenómeno semejante a la tolerancia se observó, solamente, en las cepas con SI y se vio afectado por la adición de ácido clavulánico de la siguiente manera: la tolerancia aumentó de un 15% en aquellas pruebas sin ácido clavulánico a un 30% en aquellas con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ y finalmente a 46% en pruebas con 4 $\mu\text{g/ml}$.

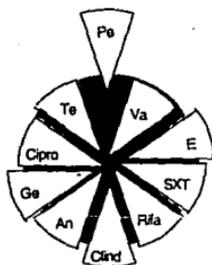
Niveles de Sensibilidad por microdilución



Cepas de ERO



Cepas de estafilococo
con SI



Cepas ESO

FIGURA 6.5.2. Niveles de sensibilidad de cepas ERO, con SI y sensibles.

Pa: penicilina; Va: vancomicina; E: eritromicina; SXT: cotrimoxazol; Rifa: rifampicina; Clind: clindamicina;
An: amikacina; Ge: gentamicina; Cipro: ciprofloxacina y Te: tetraciclina.

MECANISMOS DE RESISTENCIA

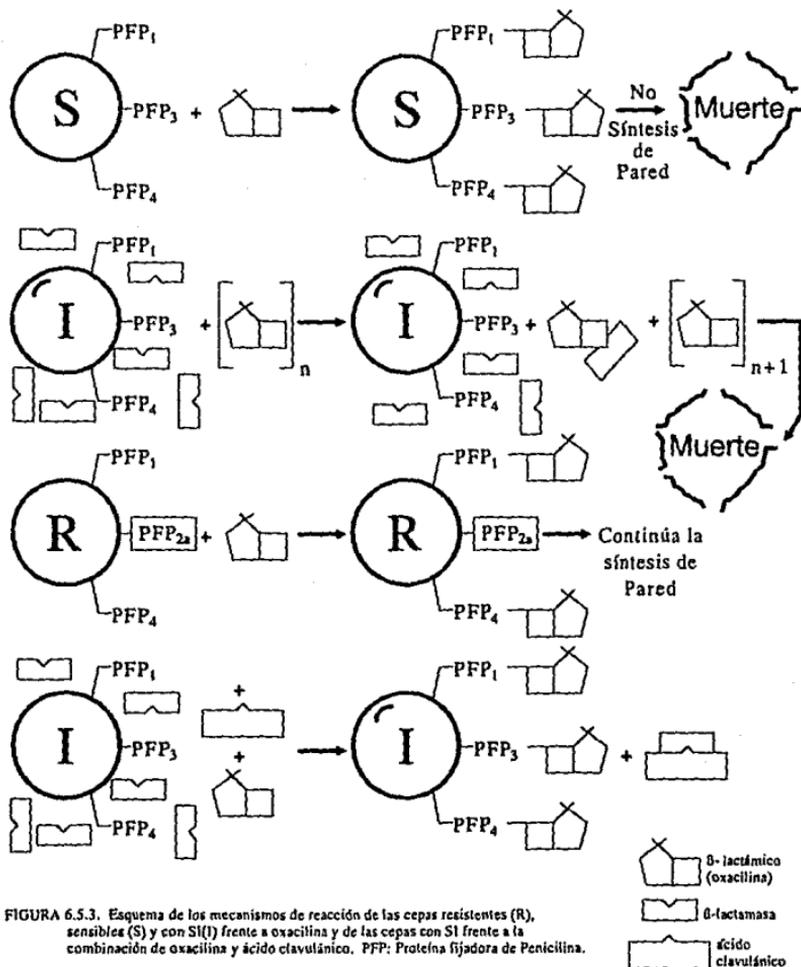


FIGURA 6.5.3. Esquema de los mecanismos de reacción de las cepas resistentes (R), sensibles (S) y con SI(I) frente a oxacilina y de las cepas con SI frente a la combinación de oxacilina y ácido clavulánico. PFP: Proteína fijadora de Penicilina.

T A B L A 10
RELACION CMI/CMB DE OXACILINA EN 13 CEPAS DE ESTAFILOCOCO CON
SENSIBILIDAD INTERMEDIA

CONC. DE ACIDO CLAVULANICO(μ g/ml)	Núm. de cepas con CMI/CMB \geq 32	% de Tolerantes
0.0	2	15
0.25	2	15
0.50	4	30
1.00	6	46
2.00	5	38
4.00	6	46

6.6. ANALISIS DE PLASMIDOS.

En el análisis de plásmidos se observó una gran variedad de estos fragmentos de DNA no cromosómico tanto en las cepas RO como con SI, destacaron los siguientes hallazgos: se encontraron 140 plásmidos en las 37 cepas RO que se analizaron (3.7 plásmidos por cepa en promedio) a diferencia de 31 plásmidos en 10 cepas con SI (3.1 plásmidos por cepa) (P=0.26, T student); en la tabla 11 se observa que el 28% de las cepas resistentes tuvieron seis o más plásmidos, en tanto que, sólo en el 10% de aquellas con SI se observó este mismo patrón.

T A B L A 11
CORRELACION DEL NUMERO DE PLASMIDOS CON LA RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD INTERMEDIA
A OXACILINA EN ERO.

No. de Plásmidos	No. de Cepas Resistentes	No. de Cepas Intermedias
1	10	3
2	7	2
3	4	2
4	5	1
5	1	1
6 ó más	10	1

En las cepas RO y con SI existen tres grupos de plásmidos, de acuerdo a su peso molecular (ver tabla 12). El primer grupo, compuesto por plásmidos de 1 a 2 Mdal, lo poseen 19 cepas RO y 4 con SI; el segundo, con plásmidos de 2.10 a 15.0 Mdal, lo tienen 18 cepas RO y 7 con SI y el tercero por plásmidos de más de 15 Mdal, 37 cepas RO y 7 con SI.(Ver figuras 6.6.1, 6.6.2, 6.6.3 y 6.6.4). En las cepas con sensibilidad intermedia no se encontraron plásmidos con pesos moleculares menores de 1.10, de 1.4 a 2.00 y de 15.5 a 25.0 Mdal.

T A B L A 12

PESOS MOLECULARES DE LAS CEPAS RO Y CON SI A OXACILINA

Mdal	RESISTENTES No. de cepas	INTERMEDIAS No. de cepas
1.00-1.10	6	-
1.25-1.35	10	5
1.40-2.00	12	-
2.10-2.50	7	3
2.60-3.00	10	3
3.25-4.40	6	4
5.00-7.00	5	1
7.50-15.0	7	2
15.5-20.0	6	-
22.5-25.0	7	-
28.0-33.0	12	2
>33	27	7

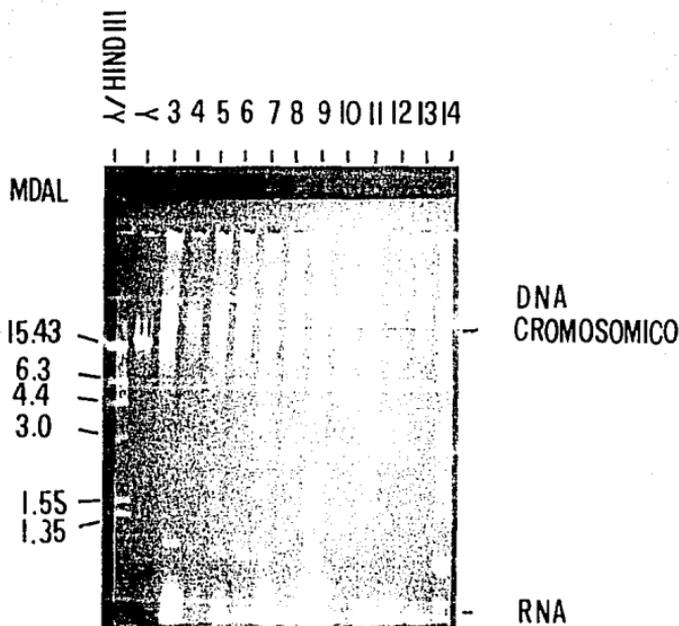


Figura 6.6.1 Electroforesis en gel de agarosa de DNA plásmido extraído de cepas de ERO. En el primer canal se encuentran los fragmentos del fago lambda digerido con Hind III (los valores de peso molecular de cada uno de los fragmentos se señalan del lado izquierdo). En el segundo canal se encuentra el mismo fago lambda pero sin digestión. En los canales 3 a 14 se encuentra el perfil plásmido de 12 cepas de ERO. El DNA cromosómico y el RNA remanentes de la extracción se señalan del lado derecho. Se observan plásmidos de pesos moleculares muy variados.

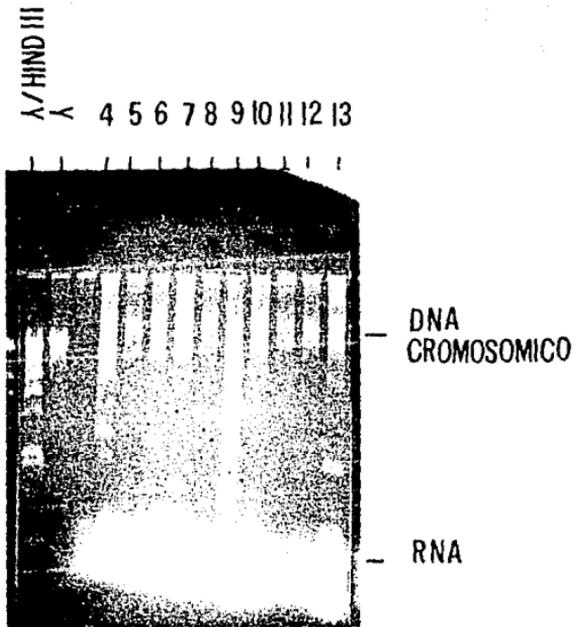


Figura 6.6.2 Electroforesis en gel de agarosa de DNA plásmido extraído de cepas de ERO. En los canales 4 a 13 se encuentra el perfil plásmido de 10 cepas de ERO.

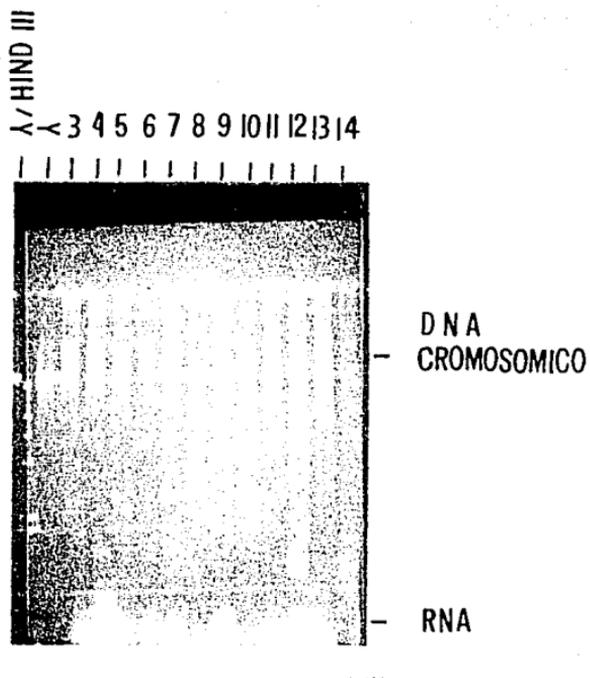


Figura 6.6.3 Electroforesis en gel de agarosa de DNA plásmido extraído de cepas de ERO. En los canales 3 a 14 se encuentra el perfil plásmido de 12 cepas de ERO.

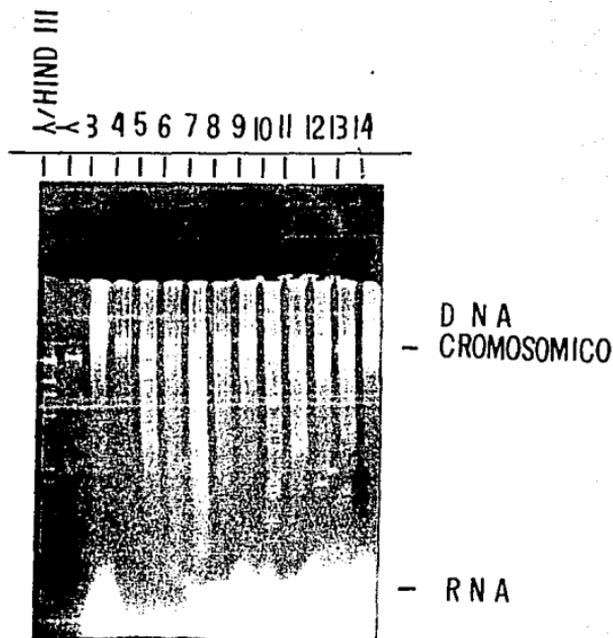


Figura 6.6.4 Electroforesis en gel de agarosa de DNA plásmido extraído de cepas de ERO y de estafilococo con SI. En los canales 10 y 14 se encuentran dos cepas de ERO y en los canales 3 a 9 y 11 a 13 cepas de estafilococo con SI. Se observa un menor número de plásmidos en las cepas de estafilococo con SI.

7. DISCUSION

La resistencia a meticilina existe en el INNSZ, aunque su prevalencia es baja y ocurre sobre todo en S. epidermidis. El sistema de escrutinio utilizado parece ser más sensible que los que se han empleado, y permitió detectar además de las cepas resistentes, otras cepas con sensibilidad intermedia, las cuales en realidad deben considerarse como resistentes a expensas de la hiperproducción de β -lactamasas y de la tolerancia a β -lactámicos que presentan in vitro. Los microorganismos que resultaron resistentes a oxacilina mostraron también un patrón de multirresistencia a aminoglucósidos y macrólidos. Los estafilococos resistentes contuvieron mayor número de plásmidos que aquellos con sensibilidad intermedia.

En el INNSZ, la incidencia de ERO es baja comparada con los resultados reportados por Alpuche-Aranda (24% en infecciones nosocomiales del Hospital Infantil de México entre 1986-1989) (1). Encontrándose las siguientes diferencias: utilización del método de dilución en agar, empleo de meticilina como antibiótico de escrutinio y población pediátrica. Giraud y col. (16% para S. aureus y 19% para EC- en el INNSZ entre 1983-1984) (28) y Guiscafré y col. (0-20% para S. aureus y 12-14% para EC- en el Hospital Pediátrico del CMN del IMSS entre 1979-1985) (32). Esto pudo deberse a que el antibiótico utilizado en esos casos fue la dicloxacilina, un antibiótico que se sabe falla en la detección del ERM (45).

Es importante mencionar que en las cepas de S. aureus se observó un mayor número de falsos positivos en el método de escrutinio que en las de EC-, dado que sólo en el 18% de los S. aureus se confirmó la resistencia. Este fenómeno puede explicarse por el hecho de que, en estos organismos se favorece la producción de β -lactamasas, después de incubación a 30°C por 24 h, de esta manera el exceso de β -lactamasa puede hidrolizar ligeramente a las penicilinas penicilinasas-resistentes (22,13) utilizadas en el procedimiento de escrutinio, es por esto que al realizar el antibiograma por microdilución estos organismos resultan sensibles.

Los resultados de este estudio concuerdan con los de otros trabajos en el sentido de que los ERO provienen predominantemente de infecciones de tejidos blandos (biopsias,

secreciones de heridas, absesos y post-mortem) (63,76). Por otro lado, se encontró un número considerable de ERO proveniente de vías urinarias y líquido de diálisis peritoneal, predominantemente EC-, lo que indica una posible relación con catéteres urinarios o de diálisis infectados. Todos los S. aureus resistentes fueron aislados de hemocultivos, esto es de gran importancia porque las bacteremias son las infecciones más graves, y el manejo de estas infecciones se complica cuando el germen infectante es resistente a los antibióticos de uso habitual.

Los factores de riesgo que se han asociado con la adquisición del ERO en estudios de casos y controles son: estancia hospitalaria mayor de dos semanas (19,8); administración previa de uno o más antibióticos (19,76) e infección de herida quirúrgica. En los pacientes con ERO y con estafilococo SI se observó un tiempo de internamiento previo a la detección de 23 y 29 días respectivamente, los pacientes recibieron antibióticos en un 68.4 % y 77 % respectivamente y el 40 % de aquellos con cepas resistentes tuvieron procedimientos invasivos durante las cuatro semanas anteriores a la detección del estafilococo, lo cual concuerda con los resultados reportados. Sin embargo, en los pacientes con aislamiento de estafilococo SI solamente el 8 % tuvo procedimientos invasivos. Se desconoce el significado de este fenómeno y conviene realizar mayor investigación para definir el valor de ello.

Generalmente los EC- han sido considerados como colonizantes o contaminantes, pero los resultados de este estudio muestran que más del 40 % de estos microorganismos estuvieron asociados a verdaderas infecciones.

La resistencia a oxacilina no se encontró asociada a una especie de estafilococo en particular, es decir, que su distribución es consecuencia del predominio de EC-.

Los resultados del antibiograma por microdilución mostraron multiresistencia a aminoglucósidos y macrólidos, seguramente en relación a la existencia de numerosos plásmidos en estos organismos, como lo han informado otros autores (54,62). Es interesante el hecho de que cotrimoxazol y rifampicina, que han sido reportados previamente como opciones de tratamiento contra ERO (71,52), en este estudio presentaron una resistencia del 37 %, y del 18 % respectivamente, esto sugiere que cotrimoxazol no es en realidad una buena alternativa en las infecciones por ERO en el

INNSZ. Se observó sensibilidad del 100 % a vancomicina, y se midió su CMB sin observar tolerancia por lo que éste evidentemente es el antibiótico de primera elección (47) a pesar de que se asocia con toxicidad renal y un alto costo.

Se observaron diferencias entre la CMI 50 y CMB 50 (dos o más títulos) de: penicilina en las cepas sensibles a oxacilina y en aquellas con SI; oxacilina sólo en las cepas con SI y vancomicina en ninguno de los grupos. De los estafilococos con SI solamente dos presentaron tolerancia a oxacilina (CMI/CMB \approx 32). Es por esto que, ante la duda, este tipo de organismos deben considerarse como resistentes, aún cuando no presenten una CMI elevada.

En las pruebas de sinergismo entre ácido clavulánico y oxacilina en el grupo de estafilococo con SI fue claro que conforme se aumentó la concentración del inhibidor de β -lactamasas, la CMI a oxacilina disminuyó, no obstante, la CMB a bajas concentraciones de ác. clavulánico no se vio afectada, lo cual semeja el fenómeno de tolerancia. Sin embargo, con una concentración \approx 2 μ g/ml de ácido clavulánico hubo una disminución importante (de 16 a 2 μ g/ml) en la CMB. Esto puede deberse a que a mayor concentración de ácido clavulánico, mayor inhibición de β -lactamasa, por lo tanto la CMI disminuye, acentuando la diferencia. Al emplear bajas concentraciones de ácido clavulánico, las β -lactamasas logran inactivar parcialmente a la oxacilina, deteniendo el crecimiento celular, sin muerte, resultando una CMI baja y una CMB alta. A concentraciones más altas de ácido clavulánico se bloquea totalmente la actividad de las β -lactamasas y de esta forma se hace aparente un microorganismo "sensible".

Como previamente se ha descrito, mientras más multiresistencia, mayor número de plásmidos. Al comparar las cepas RO y con SI encontramos que en las primeras se observaron un gran número de plásmidos con pesos moleculares muy variados, mientras que en las segundas, los plásmidos están mejor distribuidos en tres grupos, es decir, que contienen plásmidos de bajo, mediano y gran peso molecular, y que existen muchos plásmidos presentes en las cepas RO que no aparecen en las cepas con SI. Este es un fenómeno que se describe por primera ocasión, dado que previamente, se ha descrito la diferencia en el contenido de plásmidos entre las cepas resistentes y sensibles a oxacilina (54,62).

No se encontró una distribución uniforme de plásmidos que nos revelara la posibilidad de un brote, aún cuando, por los procedimientos de identificación, pudimos deducir que en un hospital de baja prevalencia de ERO el germen predominante es S. epidermidis, lo que en un momento dado podría confundirse con un brote, sin embargo, se ha informado un aumento en el aislamiento de este germen como agente causal de infecciones estafilocócicas (48,51,65).

Se intentó encontrar una relación entre el número de plásmidos y la resistencia hacia algunos antibióticos, sobre todo aminoglucósidos, macrólidos, cotrimoxazol y en el caso de los organismos hiperproductores de β -lactamasas, hacia penicilina, sin embargo, todos las cepas tuvieron un patrón de plásmidos heterogéneo, sin relación con la resistencia. Estos resultados son difíciles de interpretar ya que un mismo plásmido puede presentar diferentes formas topoisoméricas con diferente movilidad cada uno, produciendo bandas distintas (83). Además, los procedimientos de concentración de DNA, las condiciones de la electroforesis y su interpretación son factores difíciles de estandarizar para poder comparar los resultados con los de otros estudios. La digestión por endonucleasas (enzimas de restricción) y las pruebas de conjugación podrían ayudar a diferenciar entre formas topoisoméricas de un mismo plásmido (54).

8. CONCLUSIONES

- 8.1. La prevalencia de ERO es baja en el INNSZ comparada con aquella informada por otros hospitales de tercer nivel de atención médica en México.
- 8.2. El método utilizado como escrutinio fue más sensible para la detección de ERO que el método que se utilizaba previamente. Aunque ocurrieron un número importante de falsos positivos de S. aureus.
- 8.3. El ERO más importante en el INNSZ fue S. epidermidis y se aisló principalmente de infecciones de tejidos blandos, seguido de infecciones de las vías urinarias y de diálisis peritoneal.
- 8.4. Los ERO aislados de los pacientes hospitalizados en el INNSZ fueron heteroresistentes y presentaron multirresistencia cruzada con aminoglucósidos y macrólidos. A diferencia de lo que se esperaba, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina y rifampicina no parecen ser buenas alternativas terapéuticas en las infecciones por este germen, por lo que vancomicina sigue siendo la mejor opción de tratamiento.
- 8.5. Se encontraron cepas de estafilococo con sensibilidad intermedia debida a tolerancia e hiperproducción de β -lactamasas, que en realidad son resistentes a la acción de las penicilinas penicilinasas-resistentes, y su prevalencia fue notablemente más baja que la de ERO.
- 8.6. Los pacientes con infección o colonización por ERO y por estafilococo con SI tuvieron los mismos factores de riesgo: administración de antimicrobianos, hospitalización previa y procedimientos invasivos previos.

- 8.7. No se encontró un patrón uniforme de plásmidos en ERO ni en los estafilococos con SI, que indicara la existencia de una epidemia. Se encontró relación entre el número de plásmidos existentes y la multirresistencia a aminoglucósidos, macrólidos y trimetoprim-sulfametoxazol, en aquellos estafilococos completamente resistentes a oxacilina.

9. APENDICES

9.1. APENDICE I

METODO PARA DETERMINAR SENSIBILIDAD POR DIFUSION EN AGAR (KIRBY-BAUER)

9.1.1. **PRINCIPIO:** El método de difusión en agar se llevó a cabo agregando una cantidad conocida de agente antimicrobiano a un disco de papel absorbente de 6 mm de diámetro. Se colocó el disco sobre agar previamente inoculado con el microorganismo y se observa una zona de crecimiento inhibido alrededor del disco en los microorganismos sensibles. Este zona debe tener una relación lineal demostrada con la CMI para la mayoría de los antibióticos, medida por pruebas de sensibilidad por microdilución. La NCCLS realiza una evaluación continua al procedimiento, lo que permite mantener esta correlación.

9.1.2. **MEDIOS Y REACTIVOS:** El medio de cultivo empleado fue agar MÜeller Hinton a pH de 7.2 a 7.4 (25), discos con los antibióticos a probar, hisopos estériles y pinzas o aparato aplicador de discos.

9.1.3. **CEPAS CONTROL:** Deben usarse cepas control como el *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), y *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853).

9.1.4. **PROCEDIMIENTOS (3,45):**

9.1.4.1. Con una asa se tomaron 4 o 5 colonias aisladas¹, del mismo tipo morfológico y se inoculan en un tubo con caldo MÜeller-Hinton.

9.1.4.2. Se incubó a 37°C, hasta que apareció una leve turbidez (2 a 5 horas).

9.1.4.3. Se ajustó la concentración bacteriana, a una turbidez comparada con el 0.5 de la escala de McFarland. El ajuste se puede hacer directamente sin necesidad de incubar, aunque no es muy recomendable.

9.1.4.4. Se inoculó el agar MH con un hisopo humedecido con la suspensión bacteriana

¹ Esta técnica ha sido diseñada para practicarse sólo con bacterias de crecimiento rápido.

² Es necesario tener la cepa problema aislada, identificada y en estado de pureza.

quitando el exceso de caldo presionándolo y girándolo sobre la pared interna del tubo y se inoculó en forma masiva la placa en tres direcciones para obtener un sembrado uniforme que abarque toda la superficie del medio.

9.1.4.5. La caja inoculada se dejó reposar por 3 a 5 minutos, para que el inóculo seque.

9.1.4.6. Colocación de los discos.

a) De 6 a 7 discos pueden distribuirse uniformemente en la caja de tal manera que se pueda prevenir una superposición de las zonas de inhibición y separados del borde de la caja por unos 15 mm.

b) Colocar los discos y presionarlos ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto completo con la superficie.

c) Dejar reposar la placa durante 15 minutos.

9.1.4.7. Invertir la caja e incubar en estufa a 37°C durante 16-20 h.

9.1.4.8. Medir los halos de inhibición con vernier, regla o plantilla por el fondo de la caja.

9.1.5. INTERPRETACION: Los halos de inhibición en mm son comparados con los diámetros de inhibición de estándares interpretativos:

Diámetros de la zona de inhibición de estándares interpretativos y correlación aproximada con CMI por Microdilución

ANTIBIOTICO(Carga del disco)	Zona de inhibición en mm			Correlación aproximada con MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	R	I	S	R	S
Nitrofurantoina (300 μg)	<14	15-16	>17	>10	25
Gentamicina (10 μg)	<12	13-14	>15	> 8	< 6
Amikacina (30 μg)	<14	15-16	>17	> 32	<12
Vancomicina (30 μg)	< 9	10-11	>12	-	< 5
Eritromicina (15 μg)	<13	14-17	>18	> 8	< 2
Tetraciclina (30 μg)	<14	15-18	>19	>16	< 4
Cloranfenicol (30 μg)	<12	13-17	>18	>25	<12.5
Penicilina (10 U)	<28	-	-	-	<0.1

Del NNCLS de 1989.

9.1.6. CONTROL DE CALIDAD: Los diámetros de la zona de inhibición para el control de calidad de las pruebas de sensibilidad por difusión de discos en agar MÜeller-Hinton sin sangre u otros suplementos para las cepas control: S. aureus ATCC 25923, E. coli ATCC 25922 y P. aeruginosa ATCC 27853 son los siguientes:

Zona diámetro límite (mm)

ANTIBIOTICO (Carga del disco) S. aureus ATCC 25923 E. coli ATCC 25922 P. aeruginosa ATCC 27853

Nitrofurantofra (300 µg)	18-22	20-25	-
Gentamicina (10 µg)	19-27	19-26	16-21
Amikacina (30 µg)	20-26	19-26	18-26
Vancomicina (30 µg)	15-19	-	-
Eritromicina (15 µg)	22-30	-	-
Tetraciclina (30 µg)	19-28	18-25	-
Cloranfenicol (30 µg)	19-26	21-27	-
Penicilina (10 U)	26-37	-	-
Oxacilina (1 µg)	18-24	-	-
Cotrimoxazol (1.25/23.75 µg)	24-32	24-32	-

9.1.7. MANEJO DE LOS DISCOS: Los discos se deben mantener en congelación (-20°C) para guardado de varias semanas o meses y en refrigeración (4-8°C) para guardado de días y ponerlos a temperatura ambiente durante 1 ó 2 horas antes de utilizarlos. Descartar los discos vencidos.

Las causas más comunes de error en los resultados son:

- 9.1.7.1. Preparación defectuosa del medio de MÜeller-Hinton suplementada con calcio y magnesio o uso de otros medios de cultivo.
- 9.1.7.2. Inadecuada conservación de los medios de cultivo y sensidiscos.
- 9.1.7.3. Inóculo bacteriano incorrecto.
- 9.1.7.4. Exceso de bacterias en el hisopo al aplicar la suspensión bacteriana.
- 9.1.7.5. No respetar los tiempos de inoculación.
- 9.1.7.6. Exceso de incubación antes de aplicar los sensidiscos.
- 9.1.7.7. Alteración de los antibióticos:
 - a) Inactivación
 - b) Concentración
 - c) Difusión
- 9.1.7.8. Cambio en la temperatura de la estufa de incubación.
- 9.1.7.9. Empleo de cultivos con mezclas de bacterias.
- 9.1.7.10. Lectura del resultado antes de las 16 horas o después de las 18 horas de

incubación.

9.1.7.11. Error en las medidas de las zonas de inhibición.

9.1.7.12. Falta de cepas control.

9.2. APENDICE II

METODO PARA DETERMINAR SENSIBILIDAD POR MICRODILUCION (NCCLS)

9.2.1. **PRINCIPIO:** Los cultivos bacterianos se exponen a diluciones seriadas de cada agente antimicrobiano a probar, después de lo cual, la concentración de droga que inhibe el crecimiento se determina por inspección visual.

9.2.2. **EQUIPO E INSTRUMENTAL:** Se emplearon placas de plástico moldeado con 8 hileras de 12 pocillos pequeños (0.2 ml) de fondo en forma de U y esterilizadas con óxido de etileno, micropipetas y microdilutores calibrados a 50 μ l y espejo de lectura.

9.2.3. **MEDIO DE CULTIVO:** Se empleó caldo Müeller-Hinton suplementado con 100 μ g/ml de iones Ca^{+2} , 50 μ g/ml de Mg^{+2} y 4% de NaCl. Para determinar la CMI de trimetoprim-sulfametoxazol, el caldo Müeller-Hinton se complementó con sangre hemolizada de caballo (80).

9.2.4. **CEPAS CONTROL:** Se utilizaron como cepas control: S. aureus ATCC 29213 y Streptococcus faecalis ATCC 29212. Cuyos valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a algunos antibióticos se muestran en la siguiente tabla:

Rangos aceptables de Control de Calidad de CMI (μ g/ml) para cepas de referencia.

ANTIBIOTICO	C M I (μ g/ml)	
	<u>S. aureus</u> ATCC 29213	<u>S. faecalis</u> ATCC 29212
Penicilina	0.25-1.0	1.0-4.0
Oxacilina	0.12-0.5	8.0-32
Vancomicina	0.5-2.0	1.0-4.0
Estromicina	0.12-0.5	1.0-4.0
Cotrimoxazol (T/S)	0.5/9.5	0.5/9.5
Rifampicina	0.008-0.03	1.0-4.0
Clindamicina	0.06-0.25	4.0-16
Amikacina	1.0-4.0	64-256
Gentamicina	0.12-1.0	4.0-16
Ciprofloxacina	-	-
Tetraciclina	0.25-1.0	8.0-32

9.2.5. SOLUCION DE ANTIMICROBIANOS: La cantidad a pesar de cada uno de los antibióticos para preparar las soluciones stock, depende de la potencia de la sal y de la concentración absorbida en sangre de cada uno de los antibióticos. En la siguiente tabla se muestran los disolventes, diluyentes, concentración y potencia de los antibióticos empleados:

ANTIBIOTICO	LABORATORIO	POTENCIA	CONCENTRACION	DISOLVENTE	DILUYENTE
Penicilina	Bristol	1555	32 µg/ml	Agua Desion.	Agua Desion.
Oxacilina	Bristol	857	64 µg/ml	Agua Desion.	Agua Desion.
Vancomicina	Lilly	985	64 µg/ml	Agua Desion.	Agua Desion.
Eritromicina	Abbott	685	16 µg/ml	Etanol 95%	Agua Desion.
Cotrimoxazol	Roche	1000/100	16/300 µg/ml	HCl0.5N/NaOH0.05N	Agua Desion.
Rifampicina*	Bristol	993	64 µg/ml	Metanol	Agua Desion.
Clindamicina	Up John	847	32 µg/ml	Metanol	Agua Desion.
Amikacina	Bristol	905	128 µg/ml	Agua Desion.	Agua Desion.
Gentamicina	Sheramex	643	32 µg/ml	Agua Desion.	Agua Desion.
Ciprofloxacina	Miles	858	8 µg/ml	Agua Desion.	Agua Desion.
Tetraciclina	Bristol	995	64 µg/ml	Agua Desion.	Agua Desion.

* La solución de rifampicina debe cubrirse para evitar su oxidación.

La fórmula para determinar el peso es la siguiente:

$$\text{Peso} = \frac{\text{Concentración} \times \text{Volumen}}{\text{Potencia}} \times 1000$$

Las soluciones stock se prepararon y congelaron en alícuotas, de tal manera que se descongeló solamente la cantidad a utilizarse cada vez. Estas se mantuvieron congeladas aproximadamente un mes y una vez descongeladas no volvieron a congelarse.

9.2.6. PREPARACION DE MICROPLACAS: Las placas están formadas por 8 columnas (de la A a la H) de 12 hileras cada una (del 1 al 12). Se colocaron 50 µl de medio de cultivo de la columna B hacia abajo. A continuación se colocaron 50 µl de la solución stock de antibiótico en las columnas A y B, se procedió a diluir con el microdilutor desde la columna B, hasta la G, agitando perfectamente cada columna (la H no se toca) y se desecharon los 50 µl sobrantes. El microdilutor se lavó perfectamente después de

cada dilución, para evitar que el antibiótico cristalizara en él, se esterilizó a la flama y se dejó enfriar para volverlo a usar. La columna H debe contener la bacteria sin antibiótico como control de calidad de crecimiento.

9.2.7. PREPARACION DEL INOCULO: Se hizo una suspensión en caldo BHI con un cultivo fresco de las cepas (18-24 h de incubación) hasta obtener una turbidez del 0.5 de McFarland. De esta suspensión se tomaron 10 μ l y se transfirieron a un tubo con 10 ml de PBS (NaCl 0.8%, KH_2PO_4 0.02%, Na_2HPO_4 0.3% y KCl 0.02%), para lograr una concentración final de 1.5×10^8 UFC/ml.

9.2.8. INOCULACION E INCUBACION DE LAS PLACAS: Las placas se inocularon en todos los pocillos con 50 μ l de la suspensión. En cada una de las placas debe ir la cepa control. Una vez inoculadas se incubaron a 37°C por 16-18 h y se cubrieron con papel estano para evitar contaminaciones y/o evaporación del medio de cultivo.

9.2.9. INTERPRETACION: Después de la incubación se procedió a la lectura de las placas, con ayuda del espejo. La CMI se tomó como la menor concentración sin turbidez visible o un botón de células en el fondo del pocillo. El valor de CMI de corte para determinar a las cepas resistentes se tomó de las tablas del NCCLS (1989).

9.3. APENDICE III

METODO PARA DETERMINAR CONCENTRACION MINIMA BACTERICIDA (CMB) A PARTIR DE MICRODILUCION (46).

9.3.1. **INTRODUCCION:** La CMB de un antibiótico es la concentración que es letal cuando menos para el 99.9% de un inóculo bacteriano estandarizado.

9.3.2. **PRINCIPIO:** Pocos antibióticos inhiben el crecimiento bacteriano sin matar a los microorganismos, pero la mayoría de los antibióticos modernos exhiben una actividad letal menor. La concentración de droga que inhibe el crecimiento es muy cercana a la concentración que produce la muerte de la bacteria (con diferencia de 1 ó 2 diluciones). En algunas situaciones, existe gran diferencia entre las concentraciones inhibitorias y letales, lo que sugiere tolerancia al antibiótico. La tolerancia ha sido operacionalmente definida como una diferencia de al menos 1:32.

9.3.3. **MATERIALES Y REACTIVOS:** Además de los mismos reactivos y materiales que se utilizan en la determinación de MIC se necesitaron:

- Placas de agar sangre de carnero
- Pipetas calibradas a 10 μ l y puntas estériles.

9.3.4. **SUBCULTIVO DE LAS PLACAS DEL MIC:** Cada una de las placas de agar sangre de carnero se dividió en 8 partes y en ellas se subcultivaron 10 μ l de las diluciones del antibiótico. Las placas se incubaron a 35°C por 18 horas.

9.3.5. **LECTURA:** Las placas se leen tomando como CMB la dilución anterior a la que se observe el crecimiento de al menos dos colonias.

9.3.6. **INTERPRETACION:** El número de células en el inóculo para el MIC fue de 1.5 x 10⁵ UFC/ml. En 10 μ l entonces hay 1500 colonias. Si el antibiótico destruyó al 99.9% de éstas, la CMB será aquella en la que se observe crecimiento de al menos una colonia.

9.4. A P E N D I C E IV

METODO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) Y LA CONCENTRACION MINIMA BACTERICIDA (CMB) DEL SINERGISMO ENTRE ACIDO CLAVULANICO Y OXACILINA POR MICRODILUCION (3).

9.4.1. **PRINCIPIO:** Existen cepas con sensibilidad intermedia, el mecanismo de resistencia de estas cepas no es el mismo que el de las cepas verdaderamente resistentes, y se cree que consiste en la hiperproducción de β -lactamasas. La manera más sencilla de confirmarlo, es observando el efecto en la CMI y CMB de oxacilina frente a diferentes cantidades de un inhibidor de β -lactamasas como el ácido clavulánico.

El equipo, instrumental, medio de cultivo y cepas control son los mismos utilizados en microdilución.

9.4.2. **SOLUCIONES DE ANTIMICROBIANOS:** Se necesitan 150 ml de medio de cultivo para oxacilina (caldo Müeller-Hinton suplementado con $100 \mu\text{g}$ de Ca^{+2} , $50 \mu\text{g}$ de Mg^{+2} y 4% de NaCl), 20 ml de solución stock ($16\mu\text{g}/\text{ml}$) de ácido clavulánico (Boecham), disuelto en el MH y 10 ml de solución stock ($256\mu\text{g}/\text{ml}$) de oxacilina (Bristol).

9.4.3. **PREPARACION DE LAS PLACAS:** Se colocan las placas en posición vertical, sólo son necesarias 7 columnas (de la A a la G). Las diluciones de ácido clavulánico serán de 4 a $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$, una hilera para oxacilina sin inhibidor y la otra para el control. Las diluciones de oxacilina serán de 128 a $0.12 \mu\text{g}/\text{ml}$. Ambos antimicrobianos se diluirán 1:2 cada vez. El procedimiento es el siguiente:

- a) Se colocan $50 \mu\text{l}$ de medio de cultivo (sin ác. clavulánico) de las columnas B a la G (menos en la hilera 1).
- b) Se agregan $50 \mu\text{l}$ de la solución stock de ác. clavulánico en la columna A y B (menos en 1).
- c) Se procede a diluir de la columna B a la E (F y G no se tocan), eliminando los $50 \mu\text{l}$ sobrantes.

d) Se colocan 50 μ l de la solución stock de oxacilina en la hilera 1 y 2.

e) Se procede a diluir de la hilera 2 a la 11 (la 12 no se toca), eliminando los 50 μ l sobrantes.

La concentración de ác. clavulánico en la columna A será de 4 μ g/ml y la de oxacilina en la hilera 1 de 168 μ g/ml, ambas antes de inocular. En este momento las placas están listas para inocularse o congelarse a -40°C al igual que las soluciones de antimicrobianos sobrantes.

9.4.4. **INOCULACION:** De la misma manera que para microdilución.

9.4.5. **LECTURA:** Las lecturas deben realizarse a las 24 y 48 horas, registrando la CMI de oxacilina (comenzando a contar por 168 μ g/ml) en presencia de 4, 2, 1, 0.5, 0.25 y 0 μ g/ml de ác. clavulánico. La CMI de ác. clavulánico se lee en la línea 12.

NOTA: Para que las lecturas sean válidas, el control debe tener una CMI entre 0.12 y 0.5 μ g/ml de oxacilina.

9.4.6. **DETERMINACION DE CMB:** Para determinar la CMB a partir del método de Microdilución, se divide una caja de petri de gelosa sangre de carnero en 8 partes. Después de leer la CMI a las 48 horas, se toman 10 μ l de cada pozo y se siembran en cada una de las partes de la caja. Sólo se siembran 7 diluciones arriba del primer pozo con crecimiento. Se necesita una caja para cada una de las concentraciones de ác. clavulánico. Las cajas se incuban a 37°C por 24 horas y se leen de la misma forma que en microdilución.

9.5. APENDICE V

METODO PARA LA EXTRACCION ALCALINA DE DNA PLASMIDO DE ESTAFILOCOCO Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

9.5.1. INTRODUCCION.

Los plásmidos son moléculas circulares de DNA con doble cadena, covalentemente cerrada, las cuales se encuentran en el citoplasma de los procariotes. Su organización es parecida a la del cromosoma bacteriano, con genes que aseguran su replicación, mantenimiento y distribución a células hijas durante la división celular (43). Son elementos de DNA con autonomía replicativa, es decir, pierden el marcador espontánea y frecuentemente, sobre todo después de la acción de agentes físicos o químicos. Esta pérdida es irreversible, perdiéndose dos o más caracteres simultáneamente (21).

Algunos plásmidos, generalmente los de bajo peso molecular, pueden encontrarse en múltiples copias en una célula bacteriana simple, mientras que los plásmidos más grandes generalmente tienen una replicación restrictiva y existen en pocas copias. Puede haber genes codificados en plásmidos no esenciales, los cuales promueven la conjugación, y la transferencia de plásmidos a una célula receptora. Los plásmidos grandes son los que con mayor frecuencia contienen estos determinantes de conjugación. Los plásmidos más pequeños pueden ser transferidos o movilizados por un plásmido conjugativo (43) entre bacterias del mismo o de diferentes géneros. Generalmente todas las funciones requeridas para la transferencia, incluyendo la síntesis del pili, están codificadas en genes del mismo plásmido. Entonces, después de transferirse a un segundo huésped, estos genes pueden capacitar al receptor (transconjugante) para convertirse en donador en otra ronda de conjugación. Este proceso puede ser repetido varias veces (43).

Los plásmidos pueden transportar genes que codifican para otras funciones además de la transferencia y replicación, como la resistencia a antibióticos y la producción de toxinas, adhesinas, enzimas metabólicas, etc. Los plásmidos que contienen secuencias

que codifican para la resistencia a antibióticos son conocidos como factores R o R plásmidos. Recientemente se ha descubierto que la resistencia a antibióticos mediada por plásmidos es frecuentemente portada en transposones, que son segmentos de DNA que pueden insertarse por sí mismos en varios sitios del genoma, independientemente del proceso de recombinación ordinario. Dentro del transposon se encuentran genes relativos a funciones de inserción. Los transposones pueden contener también genes que codifican para la producción de toxinas. La promiscuidad de los transposones brincando de un DNA a otro, ya sea a un plásmido, cromosoma o fago, es el factor principal en la diseminación de la resistencia a antibióticos (43).

La mayoría de los plásmidos que se encuentran en aislados clínicos se denominan "crípticos", por que los productos de sus genes no han sido aún determinados. La distribución de los plásmidos crípticos en casi todos los géneros de bacterias de importancia clínica, sirven como una especie de marcadores de la cepa. La técnica de la "huella digital" de plásmidos explota la propiedad de muchas especies bacterianas de transportar un "exceso de equipaje" y se ha convertido en un arma poderosa para investigar epidemias. El principio de esta técnica es que los aislados de la misma cepa contienen el mismo número de plásmidos, con los mismos pesos moleculares, y tienden a tener fenotipos similares, mientras que aquellos aislados fenotípicamente distintos también tienen diferentes "huellas digitales" (43,21).

El procedimiento de extracción alcalina se basa en la estructura del DNA plásmido, cadenas supercoloidales covalentemente cerradas que no se desnaturalizan bajo la exposición a un pH alcalino(22).

9.5.2. MATERIALES Y EQUIPO.

Fueron necesarios tubos de polipropileno tipo Eppendorf (1.5 ml), microcentrífuga capaz de generar 8-10 000 x g, micropipetas de 2-10, 10-100 y 100-1000 μ l, puntas estériles, una unidad para electroforesis horizontal submarina (Maxiphor, LKB), una fuente de poder (EPS 500/400, Pharmacia), un transiluminador de luz UV (UVP, INC.), una cámara Polaroid MD4 con película tipo 55 (43) y los siguientes reactivos:

SOLUCION 1.

EDTA (0.5 M, pH 8.0)	0.2 ml
Tris (1 M Tris hidrocloreto, pH 8.0)	0.25 ml
Glucosa (20% p/v)	0.45 ml
Agua destilada	9.5 ml

SOLUCION 2.

NaOH (10 N)	0.2 ml
Dodecil sulfato de sodio (20% p/v en agua)	0.5 ml
Agua destilada	9.3 ml

SOLUCION 3.

Acetato de sodio, 3 M, pH 4.8. Para 100 ml, 0.3 moles de acetato de sodio (rehidratado) y 50 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 4.8 con ácido acético glacial. El volumen final de 100 ml se alcanza con agua destilada.

BUFFER TE.

10 mM Tris pH 7
0.1 mM EDTA

BUFFER TES.

30 mM Tris, pH 8.0
5 mM EDTA
50 mM NaCl

MEZCLA COLORANTE.

Glicerol	50 ml
EDTA(0.5 M)	7 ml
Azul de Bromofenol	5 mg

Llevar a 100 ml con agua destilada.

ETANOL AL 95%, - 20°C.**AGAROSA (SIGMA).**

0.8% (p/v) en buffer Tris-borato, calentada a fuego directo y enfiada a 60°C (54).

BUFFER TRIS-BORATO (1x hecha de una solución stock 10x)

89 mM Tris, pH 8.2
2.5 mM Na₂EDTA, pH 8
89 mM de Acido Bórico.

BROMURO DE ETIDIO.

Solución stock de 10 mg/ml; concentración final aproximadamente de 0.5 a 1 µg/ml en agua destilada.

CALDO L.

Bacto-Tripton (peptona)	1 %
Extracto de Levadura	0.5 %
NaCl	0.5 %
Ajustar pH a 7.3	

SOLUCION CONCENTRADA DE RNAsa.

1 mg/ml (Sigma) en buffer TES, calentar a ebullición durante 15 min. hacer alícuotas de 50 μ l y congelar a -20°C hasta su utilización.

SOLUCION STOCK DE LISOSTAFINA.

1 mg/ml (Sigma) en buffer TE.

ESTANDARES DE PESO MOLECULAR.

Fago Lambda digerido con Hind III

9.5.3. PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR DNA PLASMIDO. (Modificado del método de Birnborn and Doly (22)).

9.5.3.1. Se cultivaron las cepas durante 16-18 h (a la zona estacionaria del crecimiento celular) en 5 ml de caldo L (medio de cultivo mínimo suplementado con antibióticos y requerimientos nutricionales apropiados). Se transfirió el cultivo a un tubo de microcentrifuga y se centrifugó por 10 min (10 000 x g). Se decantó el sobrenadante y se lavó una vez con buffer TE decantando y eliminando las últimas gotas con papel secante (60).

9.5.3.2. Se diluyó la solución stock de lisostafina a una concentración final de 130 μ g/ml en la solución 1. Se suspendió el precipitado celular en 100 μ l de la solución 1 con lisostafina mezclándose por inversión o con un vortex. Se congeló a -70°C durante 10 min y se dejó a temperatura ambiente hasta descongelación (18) introduciéndose en un baño o estufa a 37°C, por 30 min. En esta etapa la pared celular se debilita por la acción de la enzima en los enlaces que la constituyen.

9.5.3.3. Se añadieron 200 μ l de la solución 2, y se mezcló muy suavemente por inversión solamente, dejando en hielo por 5 min. La solución se volvió clara y viscosa, como resultado de la lisis celular y desnaturalización de los ácidos nucleicos, debida a la

elevación del pH hasta valores de 12-12.5 (21).

9.5.3.4. Se añadieron 150 μ l de la solución 3, mezclando por inversión, y manteniendo durante 1 h en hielo. En esta etapa de neutralización precipitan con el SDS las proteínas, el RNA de alto peso molecular y el DNA cromosomal, que al renaturalizarse lo hace en forma desordenada dando lugar a agregados que arrastran a las demás macromoléculas.

9.5.3.5. Se centrifugan los tubos por 5 min y se transfieren 400 μ l del sobrenadante en un tubo de microcentrifuga limpio. Se añade 1.0 ml de etanol enfriado a -20°C mezclando por inversión y dejando a -20°C por 30 min. En este lapso precipitan las moléculas de DNA y de RNA y proteínas que no hayan precipitado con la solución 3.

9.5.3.6. Se centrifugaron los tubos congelados, con los tubos orientados en la centrífuga de tal manera que el precipitado se depositó en el mismo lugar en cada tubo. Se decantó el sobrenadante, teniendo cuidado de no dislocar la pequeña cantidad de DNA precipitado en la pared del tubo. Se lavó el precipitado añadiendo de 1 a 2 ml de etanol al 95% a -20°C a cada tubo, sin dislocar el precipitado. El tubo se invirtió y se drenó inmediatamente sin permitir que el precipitado se resuspendiera.

9.5.3.7. Se secaron los tubos perfectamente al vacío para eliminar el alcohol residual, utilizando un desecador al vacío (si no se dispone de uno, pueden ser secados al aire a temperatura ambiente durante varias horas).

9.5.3.8. El precipitado se suspendió en 50 μ l de buffer TES, con 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNAsa pancreática libre de DNAsa e incubó a 37°C por 30 min.

9.5.3.9. Se tomaron 10 μ l de la preparación de DNA y se añadieron 5 μ l de la mezcla colorante, aplicando al gel como se explica a continuación.

9.5.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

9.5.4.1. **PRINCIPIO:** Las moléculas de DNA y RNA son capaces de migrar en un gel de agarosa empujadas por corriente eléctrica. El grado de migración es inversamente proporcional al peso molecular, por lo tanto moléculas de diferente tamaño aparecen como bandas diferentes en el gel. El peso molecular de un plásmido se puede extrapolar de una curva obtenida trazando la distancia migrada desde el origen contra el logaritmo

del peso molecular de los plásmidos de tamaño conocido, los cuales deben correrse simultáneamente en el mismo gel (50). El grado de migración depende además de la corriente aplicada, al sistema buffer en que se corre y del tamaño de poro del gel.

9.5.4.2. PROCEDIMIENTO:

9.5.4.2.1. Se unieron las placas de vidrio con los espaciadores, manteniéndolas unidas firmemente con sujetadores. Se pipetearon 2 ml de agarosa fundida entre las placas para sellar el fondo del molde y se dejó solidificar a temperatura ambiente por 10 minutos.

9.5.4.2.2. Se colocó el peine, evitando que éste llegara al fondo del molde, fijándolo con los sujetadores. Se vertió la agarosa remanente con cuidado en el molde, evitando la formación de burbujas. El gel se dejó solidificar a temperatura ambiente.

9.5.4.2.3. Se quitaron los sujetadores, las placas, espaciadores y peine con mucho cuidado para no romper el gel. El exceso de agarosa se eliminó con un hisopo empapado de buffer Tris-borato.

9.5.4.2.4. Los electrodos se colocaron en ambos extremos de la cámara, sujetándolos con tela adhesiva. La corriente migra del polo negativo al positivo. Ambos extremos de la cámara fueron llenados con buffer Tris-borato.

9.5.4.2.5. Las muestras de DNA, incluyendo el estándar, se colocaron con pipetas delgadas o tubos capilares.

9.5.4.2.6. Se conectaron los electrodos a la fuente de poder y se corrió a 80 V (aproximadamente a 100 Amp) por 4 a 5 horas. La extensión de la migración fue seguida observando el recorrido del colorante. La fuente de poder se apagó cuando el colorante alcanzó el final del gel.

9.5.4.2.7. Se transfirió el gel a una bandeja que con 200 ml de agua mezclada con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se utilizaron guantes cuando el gel teñido se manipuló con este potente mutagénico.

9.5.4.2.8. Después de teñir por 30 minutos, el gel se transfirió a una bandeja con agua por 5 min. para desteñir. En ese momento el gel está listo para ser visto y fotografiado a través de un transiluminador de luz UV y la cámara Polaroid, manteniendo el

obturador abierto por 5 segundos. Se utilizaron siempre goggles o lentes especiales cuando el gel se observó a través del transiluminador para prevenir quemaduras de córnea.

9.5.4.2.9. Una vez tomada la fotografía, el gel y la solución de tinte y destintado se neutralizaron con hipoclorito de sodio al 10% y se desecharon.

* Digestión de fago lambda por Hind III.

1. Tomar 20 μ l de fago lambda (BFI)
2. Agregar 5 μ l de buffer de Hind III 10 x (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM de NaCl, 7 mM de MgCl₂)
3. Agregar 20 U de la enzima de restricción Hind III (aproximadamente de 1 a 2 μ l).
4. Mantener 1 h a 37°C, y después 10 min a 60-70°C, para inactivar la enzima. Se congela a -20°C.
5. Para correr, se toman 5 μ l de lambda/Hind III, se agregan 5 μ l de mezcla colorante y se lleva a 20 μ l con buffer TES.

10. BIBLIOGRAFIA

- (1) Alpuche-Aranda C., Avila-Figueroa, C., Espinosa de los Monteros, L., Gomez-Barreto, D., Santos-Preciado, J. (1989). Patrón de sensibilidad antimicrobiana de S. aureus en un hospital pediátrico: prevalencia de resistencia a meticilina. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.; 46:700-704.
- (2) Aragón-Hernández, T., Magaña, A., Alanis, A. (1988). Incidencia de cepas de Staphylococcus sp resistentes a meticilina en un hospital de tercer nivel en México. XIII Congreso Internacional de Infectología, Guadalajara, Jal., 11-16, noviembre.
- (3) Barry, L. A. (1976) Antimicrobial Susceptibility Tests. Principles and Practice. Lea & Febrieger Editors. Philadelphia, E. U. pp. 89-91.
- (4) Barrett, F. F., McGehee Jr R. F. & Finland, M. (1968) Methicillin-resistant Staphylococcus aureus at Boston City Hospital. N. Engl. J. Med.; 279:441-448.
- (5) Benner, E. J. & Kayser, F. H. (1968). Growing clinical significance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet ii, 741-744.
- (6) Berger-Bachi, B. (1983). Insertional inactivation of Staphylococcal methicillin resistant by Tn551. J. Bacteriol.; 154:479-487.
- (7) Birnhoim, H. C. and J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res.; 7:15-13-1523.
- (8) Boyce, J. M., Laundry, M., Deetz, T. R., Dupont, H. L. (1980). Epidemiological studies of an outbreak of nosocomial methicillin-resistant S. aureus infections. Infect. Control; 2:110-116.
- (9) Brown, E., Wensel, R. P. and Hendley, O. (1989) Exploration of the Microbial Anatomy of Normal Skin by Using Plasmids Profiles of Coagulase-negative Staphylococci: Search for the Reservoir of Resident Skin Flora. J. Infect. Dis.; 160:644-650.
- (10) Calderón, E. J. (1985) Septicemia Neonatal por Staphylococcus epidermidis. Med. Bol. Hosp. Infant. Méx.; 44:511-520.
- (11) Casewell, M. H., (1986) Epidemiology and Control of the 'modern' methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J. Hosp. Infect.; 7:1-11.

- (12) Chambers, H. F., Archer, G. and Matsuhash, M. (1989) Low level Methicillin Resistance in Strains of S. aureus. Antimicrob. Agents Chemoter.;33:424-428.
- (13) Chambers, H. F. (1988) Methicillin-resistant staphylococci. Clin. Microb. Rev.;1:173-186.
- (14) Cohen, S., Gibson, C. J. and Sweeney, H. M. (1972). Phenotyping suppression of methicillin-resistance in Staphylococcus aureus by mutant noninducible penicillinase plasmids. J. Bacteriol.; 112:682-689.
- (15) Cohen, S. and Sweeney, H. M. (1970) Transduction of methicillin resistance in Staphylococcus aureus dependent on an unusual specificity of the recipient strain. J. Bacteriol; 104:1158-1167.
- (16) Colley, E. W., McNicol, M. W. & Bracken, P. M. (1965). Methicillin-resistant Staphylococci in a general hospital: Lancet i, 595-597.
- (17) Cookson, B., Talsania, H., Naidoo, J., Philips, I.(1986) Strategies for typing and properties of Epidemic Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Eur. J. Clin. Microbiol. 5:702-709.
- (18) Coudron, P. E., Jones, D.L., Dalton, H. P. et al (1986): Evaluation of laboratory tests for detection of methicillin-resistant S. aureus y S. epidermidis. J. of Clin. Microbiol. 24:764-769.
- (19) Crosley, K., Loesch, D., Landesman, B., Mead, M., Strate, M.(1979). An outbreak of infections caused by strains of S. aureus resistant to methicillin and aminoglycosides. I. Clinical studies. J. Infect. Dis.;139:273-279. .
- (20) Daifuku, R. S. (1984) Association of rectal and urethral colonization with tract urinary infection in patients with inwelling catheters. J.A.M.A.;252:2028-2030.
- (21) Del Rey Calero (1976) Microbiología e Inmunología de las Enfermedades Infecciosas. Ed. Marban. Madrid, España pp 11-13.
- (22) Dillon, L. K., Howe, S. E. (1984) Early detection of oxacillin-resistant staphylococcal Strains with hypertonic broth diluent for Microdilution Panels. J. Clin. Microbiol; 19:473-476.
- (23) Donawitz, G. R., Mandell, G. L. (1979) Acute pneumonia. En Mandell, G. L. Principles and Practice of infectious diseases. A Wiley Medical Publication, U.S.A.; pp 489-502.

- (24) Erikson, K. R. (1967). Paper presented at the VI Int. Congress of Chemotherapy, Vienna.
- (25) Escobar-Gutierrez, A. (1977). Importancia del medio de cultivo sobre el tamaño del halo de inhibición en las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. *Investigación Médica Internacional*. 4 suplemento 1.
- (26) Franco, J. H. (1979) Infections of skeletal prostheses. En Bennet, J. V. *Hospital Infections*. Little Brown and Company, U.S.A.; pp 321-333.
- (27) Garibaldi, R. A., Burke, J. P., Dickman, M. L., Smith, C. B. (1974) Factor predisposing to bacteriuria during inwelling urethral catheterization. *N. Engl. J. Med*; 291:215-219.
- (28) Giraud, M. C., Calva, J.J., Huazano, F., Ponce de León, S., Ruiz-Palacios, G. (1986). Patrones de susceptibilidad a 19 antimicrobianos de gérmenes aislados de hemocultivos en un hospital de referencia de la ciudad de México. *Rev. Invest. Clin*; 38:7-14.
- (29) Grubb, W. B., Townsend, D. E., Ashdown, S., Tija, T., McGlahan, C., Leng, T. (1986) Genetics Analysis of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Singapore Hospitals. *Eur. J. Clin. Microbiol*; 5:728-730.
- (30) Good, J. T., Taryle, D. A., Maulitz, R. M., Kaplan, R. L., Sahn, S. A. (1980). The diagnostic value of pleural fluid pH. *Chest*; 55:59.
- (31) Guenther, S. H. and Wenzel, R. P. (1984). In vitro activities of Teichomycin, Fusidic Acid, Flucloxacillin, Fosfomycin and Vancomycin against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemoter.*; 26:268-269.
- (32) Guiscafré, H. G. (1985) Infecciones Estafilocócicas. González, N. S. *Infectología Clínica*. Editorial Trillas. México pp 557-569.
- (33) Hackbarth, C. J. and Chambers, H. F. (1989) Methicillin-Resistant Staphylococci: Genetics and Mechanisms of Resistance. *Antimicrob. Agents Chemoter.*; 33:991-992.
- (34) Haley, R. W., Hightower, E. W., Khabbas, R. F., Thornsberry, C., Martone, W. J., Allen, J. R., Hughes, J. M. (1982) The emergence of methicilli-resistant Staphylococcus aureus infections in United States Hospitals. *Ann. Int. Med.*; 97: 297-308.
- (35) Harold, C. N. (1985) Contribution of Beta-Lactamases to Bacterial Resistance and Mechanisms to Inhibit Beta-lactamases. *Amer. J. Med.*; 79:2-12.

- (36) Hartnman, B. J. and Tomasz, A. (1986). Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of S. aureus. *Antimicrob. Agents Chemoter*; 29:85-92.
- (37) Hinshaw, H. C. (1985) *Enfermedades del tórax*. 4th. Ed. Editorial Interamericana. México. pp 695-704.
- (38) Jevons, M. P. (1961). "Celbenin" resistant Staphylococci. *Br. Med. J.*; i:124-125.
- (39) Jorgensen, J. H. (1986). Laboratory and Epidemiologic experience with Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the USA. *Eur. J. Clin. Microbiol*; 5: 693-696.
- (40) Kado, C. I. and Liu, S. T. (1981) Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *J. Bacteriol.*; 145:1365-1373.
- (41) Kayser, F. H., Berger-Bachi, B. and Beck, W. D. (1986) Genetics of multiply-resistant Staphylococcus aureus. *J. Hosp. Infect.*; A:19-27.
- (42) Kayser, F. H. (1975) Methicillin-resistant Staphylococcus aureus From 1965 to 1975. *The Lancet*;2:650-652.
- (43) Koneman, E. W., Allen, S. D. et al (1988) *Gram-positive Cocci*. From: *Diagnostic Microbiology*. Third Edition. Ed. Lippincott. pp 311-528.
- (44) Lacey, R. W. (1975) Antibiotic resistance plasmids of Staphylococcus aureus and their clinical importance. *Bacteriol. Rev.*;39:1-32.
- (45) Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, Jr and Truant, J. P. Editors. (1985). *Manual of Clinical Microbiology*, 3erd Ed. American Society for Microbiology. Washington, D. C. pp 151
- (46) Lennette, E. H., Taylor, P. C., et al (1983) Determination of minimum bactericidal concentration of oxacillin for S. aureus: Influence and Sigrificance of technical factors. *Ant. Agents and Chem.* 23:142-150.
- (47) Locksley, R. M., Cohen, M.L., Quinn, T. C., Tompkins, L. S., Coyle, M. B., Kirihara, J. M., Counto, G. W. (1982) Multiply Antibiotics-resistant Staphylococcus aureus: Introduction, transmission, an evolution of Nosocomial Infections. *Ann. In. Med*; 97:317-324.
- (48) Lowy, F. D., Hammer, S. M. (1983) Staphylococcus epidermidis Infections. *Ann. Int. Med.* 99:834-839.
- (49) Lyon, B. R. and Skurray, R. (1987). Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: genetic basis. *Microbiol. Rev.*; 51:88-134.

- (50) Macirna, F. L., Kopecko, K. R., Jones, D. J., Ayers S. R. and McCowen. (1978). A multiple plasmid-containing E. coli strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid*. 1:417-422.
- (51) Maki, D. G., Weisse, C. E., Sarafin, H. W. (1977) A semiquantitative culture Method for identifying intravenous catheter-related infection. *N. Engl. J. Med.*;296:1305-1309.
- (52) Maple, P. A. C., Hamilton-Miller, J. M. T., Brumfitt, W. (1989). World-wide antibiotic resistance in methicillin-resistant S. aureus. *J. Hosp. Infect.* 7(supl A):37-46.
- (53) Matsushashi, M., Song, M. D. et al (1986). Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause hihg resistance to beta-lactam antibiotics in S. aureus. *J. Bacteriol.*; 167:975-980.
- (54) Mayer, L. W. (1988) Use of Plasmid Profiles in Epidemiologic Surveillance of Disease Outbreak, and Tracing the Transmission of Antibiotic Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* ;1:228-243.
- (55) McFaddin, J. F. (1980) Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana. Argentina. pp 287.
- (56) McDougal, L. K. and Thornsberry, T. (1986) The role of Beta-lactamase in Staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J. Clin. Microbiol*; 23:832-839.
- (57) Morán, E. R. Aislamiento e identificación de estafilococos coagulasa negativos en urocultivos. Tesis de posgrado. QFB 1986 UNAM.
- (58) Mulligan, M. E., Kwok, R. Y., Citron, D. M., John, J. F., Smith, P. D. (1988) Immunoblots, Antimicrobial Resistance, and Bacteriophage Typing of Oxacillin-Resistant Staphylococcus aureus *J. Clin. Microbiol.*; 26:2395-2401.
- (59) Mulvey, M., Arbuthnott, D. C., Coleman, D. C. (1986) Molecular Typing of Methicillin and Gentamicin Resistant Staphylococcus aureus in Dublin. *Eur. J. Clin. Microbiol.*; 5:719-725.
- (60) National Committee of Clinical Laboratory Standars: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Publication M7-A. Villanova, P. A. NCCLS (1985).
- (61) National Committée of Clinical Laboratory Standars: The new NCCLS susceptibility documents. *Antimicrob. Newsletter*. 6(1):1-8 (1989).

- (62) Novick, R. P. (1990) Staphylococci. En Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. MICROBIOLOGY. 4th Ed. J. B. Lippincott Company. pp 539-550.
- (63) Pavillard, R., Harvey, K., Douglas, D. (1982). Epidemic of hospital acquired infection due to methicillin-resistant S. aureus in major victorian hospitals. Med. J. Aust. 1:451-454.
- (64) Pfaller, M. A., Dougals, S. Wakefield, P. D., Stewart, B. (1988) Evaluation of Laboratory Methods of the clasification of Oxacillin-resistant and oxacillin-susceptible Staphylococcus aureus Amer. J. Clin. Path. ; 89:120-125.
- (65) Pfaller, M. A., Herwaldt, L. A. (1988) Laboratory, Clinical and Epidemiological Aspects of Coagulase-Negative Staphylococci. Clin. Microbiol. Rev.; 1:281-299.
- (66) Rolinson, G. N., Stevens, S., Batchelor, F. R., Woods, J. C., Chain, E. B. (1960). Bacteriological studies on a new penicillin-BRL. 1241. Lancet; 2:564-567.
- (67) Sabath, L. D., Leaf, C. D., Gerstein, D. A. and Finland, M. (1970). Altered cell walls of S. aureus resistant to methicillin. Nature (London) 225:1074.
- (68) Sabath, L. D. (1982) Mechanism of Resistant to β -Lactam Antibiotics in Strains of Staphylococcus aureus. Ann. In. Med; 97:339-344.
- (69) Saravoltz, L. D., Pohold, D. J., Atkings, L. M. (1982) Community Acquired Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Infections. A new source for nosocomial outbreaks. Ann. In. Med; 97:325-329.
- (70) Scragg, J. N., Applebaum, P. C., Govender, D. A. (1978). The spectrum and infection and sensitivity of organisms isolated from african and indian children in a durban hospital. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:325-328.
- (71) Sheagren, J. N. (1984) Staphylococcus aureus. The persistant pathogen. The New Engl. J. of Med.; 311:1437-1442.
- (72) Sjöstrom, J., Löfdahl, S. & Philipson, L. (1975) Transformation reveals a chromosomal locus of the gene(s) for methicillin resistance in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol.; 123:905-915.
- (73) Smith, J. M. (1979) Staphylococcus aureus. En Mandell, G. L. Principles and Practice of infectious diseases. A Wiley Medical Publication, U.S.A. pp 1530-1552.
- (74) Smith, P. F. and Wilkinson, B. J. (1981). Dofferential methicillin susceptibilities of peptidoglycan syntheses in methicillin-resistant S. aureus. J. Bacteriol.; 123:905-915.

- (75) Stewart, G. C., and Roseblum, E. D. (1980) Genetic behavior of the methicillin-resistant determinant in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol; 144:1200-1202.
- (76) Thompson, R. L., Cabezudo, I and Wenzel, R. P. (1982) Epidemiology of Nosocomial Infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Ann. Int. Med; 97:309-317.
- (77) Thornsberry and Jorgensen, J. H.(1982) Identificación de Estafilococos resistentes a meticilina. Center of Disease Control. Simposium: Vancomicina e infecciones por Estafilococo resistente a meticilina.
- (78) Tomasz, A., Kornblum, J. and Hartman, B. J. (1986). Program Absts. 26th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. abstr. no. 519.
- (79) Ubukata, K., Yamashita, N., and Koono, M. (1985) Occurrence of beta-lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chem.; 27:851-857.
- (80) Washington, J. A. (1985).II. Susceptibility test: broth dilution. In: Lennette, E. H., Ballows, A., Hausler, W. J. Jr., Shadomy, H. J., ed. Manual of microbiology, 4th ed. Washington, D. C. American Society of Microbiology: 967-971.
- (81) Wilkinson, B. J., Dorlan, K. J. and Sabath, L. D. (1978). Cell wall composition and associated properties of methicillin-resistant S. aureus strains. J. Bacteriol.; 136:976-982.
- (82) Woods, G. L., Yam, P (1988) Bactericidal Activity of Oxacillin against Beta-Lactamase-Hyperproducing Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents and Chem; 32:1614-1618.
- (83) Zuccarelli, A. J., Roy, I., Harding, G. D. and Couperus, J. J. (1990) Diversity and Stability of Restriction Enzyme Profiles of Plasmid DNA from Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbiol.; 28:97-102.