



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“DETECCIÓN DEL FACTOR DE ADHESIÓN INTERCELULAR
(ica) EN CEPAS DE *Staphylococcus spp*, AISLADAS DE
CATÉTERES DE PACIENTES DE HEMODIÁLISIS”**

T E S I S

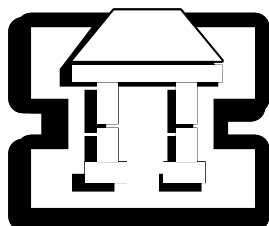
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

KEREN HAPUC GORDILLO MUÑOZ

**DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. ERIC MONROY PÉREZ**



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La presente tesis fue realizada en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de la Salud Integral (CUSI), Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, bajo la dirección del M. en C. Eric Monroy Pérez.

AGRADECIMIENTOS:

A la U.N.A.M por haberme otorgado un sitio en la FES Iztacala, para de esta manera cumplir con uno de mis sueños.

Al M. en C. Eric Monroy Pérez por su valioso apoyo académico, que fue fundamental para el desarrollo de este estudio.

A mis sinodales; la M. en C. Gloria Luz Paniagua Contreras, al Dr. Sergio Vaca Pacheco, al Dr. Sergio Chazaro Olvera, y a la Biól. Susana González Almazan, por sus valiosos comentarios que contribuyeron para la realización de este trabajo.

A todos ellos muchas gracias.

DEDICATORIA:

A mis padres: Laura Gordillo Álvarez y Juana Muñoz Cumplido

A mis hermanos: Neftali, Suri Saday y Bed-zader.

Muchas gracias

*El ideal esta en ti, el obstáculo para
su cumplimiento esta también en ti .(Carlyle)*

INDICE

PAGINA

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
Enfermedades renales	8
Infecciones en los pacientes de hemodiálisis	10
Participación del operón de adhesión intercelular (<i>ica</i>) de <i>Staphylococcus</i> spp. en la formación de la biopelícula en los catéteres	11
Participación de los genotipos <i>fnbA</i> y <i>fnbB</i> en la adhesión epitelial	13
Morfología y características generales de <i>Staphylococcus aureus</i>	14
Patogenia de <i>S. aureus</i>	17
Resistencia bacteriana a la meticilina	17
ANTECEDENTES	21
OBJETIVO GENERAL	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS	51

RESUMEN

La contaminación de los catéteres en los pacientes de hemodiálisis por cepas de *Staphylococcus aureus* representa un factor de riesgo de adquirir bacteremias. En la formación de la película bacteriana en el interior de los túneles de los catéteres se requiere de un polisacárido adhesivo intercelular (PIA), sintetizado por enzimas codificadas por el operón de adhesión intercelular (*ica*). El objetivo de este estudio fue detectar los genotipos *icaAB*, *femB*, *mecA*, *fnbA* y *fnbB* en un grupo de cepas de *Staphylococcus aureus* previamente obtenidas de los catéteres de pacientes de hemodiálisis (n = 42) y de las fosas nasales de portadores asintomáticos (n = 66). En las cepas SARM (*S. aureus* resistente a meticilina) (n = 8) obtenidas de los catéteres, el operón *icaAB* fue detectado en 7 cepas (85.7%), *mecA* y *femB* en 8 (100 %) en cada caso, mientras que en las cepas SASM (*S. aureus* sensible a meticilina) *icaAB* fue detectado en el 23.8% (n = 10) y *femB* en el 100% (n = 42). Para las cepas SARM obtenidas de las fosas nasales de los portadores asintomáticos, *icaAB* fue detectado en el 80 % (n = 8), *mecA* y *femB* en el 100% (n = 10), en cada caso, mientras que en las cepas SASM *icaAB* fue detectado en el 76.7% (n = 43) y *femB* en el 100% (n = 56). En las cepas SARM (n = 8) obtenidas de los catéteres, el gen *fnbA* fue detectado en el 100% (n = 8) y *fnbB* en el 25% (n = 2), mientras que en las cepas SASM (n = 34) *fnbA* fue detectado en el 11.7% (n = 4) y *fnbB* no se identificó. Para las cepas SARM (n = 10) recuperadas de las fosas nasales de los portadores asintomáticos, *fnbA* fue detectado en el 40 % (n = 4) y *fnbB* en el 20% (n = 2), mientras que en las cepas SASM (n = 56) *fnbA* fue detectado en el 5.3% (n = 3) y *fnbB* en el 3.5% (n = 2). La elevada frecuencia de los genotipos identificados, principalmente en las cepas de *S. aureus* provenientes de los catéteres, demostró la necesidad de establecer programas de prevención que ayuden a disminuir los principales factores de riesgo de contaminación bacteriana en los catéteres de los pacientes.

INTRODUCCIÓN

Enfermedades Renales

La Insuficiencia Renal Crónica (IRC) ocurre como consecuencia de la pérdida progresiva del filtrado glomerular y de mecanismos renales y sistémicos, que en la actualidad la padecen 750 personas por cada millón de habitantes (Bernardo, D. J. 2001). En condiciones normales el riñón filtra diariamente 180 litros de plasma, de los cuales el 99% son reabsorbidos y regresados a la circulación, el resto son desechos que el organismo no necesita y se eliminan en forma de orina (Bernardo, D. J. 2001). En la IRC el riñón es incapaz de manejar estos volúmenes, debido a la pérdida de funcionalidad de las nefronas, por lo que hay retención de líquidos y solutos (sodio, potasio, calcio, urea) con grandes repercusiones orgánicas, siendo necesario el tratamiento sustitutivo, como diálisis o trasplante (Bernardo, D. J. 2001). Cada año comienzan tratamiento con diálisis entre 80-120 personas por millón de habitantes convirtiéndose la Insuficiencia Renal Crónica en un problema sanitario, social y económico de primera magnitud (Bernardo, D. J.2001).

Son múltiples las causas capaces de producir el deterioro renal, dentro de las cuales, la diabetes mellitus ocupa el primer lugar a nivel mundial, la hipertensión arterial en segundo lugar, y luego se encuentran enfermedades como la glomerulonefritis (proceso inflamatorio de la unidad funcional del

riñón), la pielonefritis (infección de la vía urinaria superior) y las enfermedades quísticas del riñón (Schrier, W.R. 1989).

La prevalencia de la diabetes mellitus en el mundo occidental oscila entre el 5 a 7%, estimándose que en el año 2025 existirán un total de 300 millones de diabéticos (American Diabetes Association, 1989).

Existen 3 alternativas terapéuticas para el tratamiento de los pacientes con IRC, que son; la diálisis peritoneal en sus diferentes modalidades, la hemodiálisis y la mejor opción en pacientes aptos, el trasplante renal. Actualmente una de las alternativas más usadas en todo el mundo es la hemodiálisis (Withwort, J. 1990). El propósito de la hemodiálisis es sustituir la función filtradora y limpiadora del riñón, extrae del cuerpo la sal, exceso de líquidos y desechos tóxicos. Ayudando a mantener en el paciente un control de la presión arterial y el equilibrio de electrolitos séricos como sodio, potasio, calcio y cloruro (Withwort, J.1990). El procedimiento de la diálisis se realiza mediante un acceso vascular, que puede ser un catéter insertado en una vena o bien a través de una fístula arteriovenosa, ya sea con tejidos naturales o con injertos, a través de los cuales se extrae la sangre con una bomba y se hace circular con un filtro o dializador para que sea depurada de sustancias tóxicas. Al término, la sangre ya depurada, libre de toxinas se

regresa al organismo, este procedimiento se hace dos o tres veces por semana con una duración de 4 horas (Withwort, J. 1990).

Los catéteres intravasculares son dispositivos plásticos que permiten acceder al compartimiento intravascular a nivel central. Varían en su diseño y estructura según se utilicen (días) en forma temporal o permanente (semanas o meses), así como también con el material con el que son fabricados, en el número de lúmenes y en el motivo por el cual se instalan. El uso de estos dispositivos ha sido de gran utilidad clínica, ya que permiten un acceso rápido y seguro al torrente sanguíneo para la administración de medicamentos, fluidos y nutrición parenteral. Además permiten en pacientes críticos una monitorización venosa central o pulmonar (Allon, M. 2004).

Infecciones en los pacientes de hemodiálisis

La inserción de catéteres vasculares en los pacientes con IRC representa la principal alternativa de tratamiento por ejemplo en los Estados Unidos de Norte América aproximadamente 75 000 de los 300 000 pacientes de hemodiálisis utilizan catéteres vasculares (Tokards, J.L. 2000; Reddan, D. 2002).

La presencia de catéteres en los pacientes de hemodiálisis constituye un factor de riesgo de contraer bacteremia (Krishnasami, *et al.*, 2002 ; Allon, M.

2004), pudiendo ocasionar complicaciones como shock séptico, endocarditis, ostiomelitis, o abscesos epidurales que en determinado momento pueden resultar fatales para los pacientes (Tanriover, B. *et al.*, 2000; Braun, M. 2000). En los EUA anualmente se reportan de 7,000 a 15,000 episodios de bacteremias relacionadas con los catéteres (Allon, M. 2004). La fuente principal de las bacteremias en los pacientes de hemodiálisis se debe al desarrollo de una película bacteriana en el interior de los túneles de los catéteres (Donlan, R.M. 2001). Se ha reportado que en las bacteremias relacionadas con los catéteres se han aislado bacterias como; *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* metilina resistente (MRSE). *Enterococcus* spp, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp, entre otras (Jefferys, A., *et al.*, 2003; Poole, C.V., *et al.*, 2004).

Participación del operón de adhesión intercelular (*icaA*) de *Staphylococcus* en la formación de la biopelícula en el interior de los catéteres

En la formación de la película bacteriana por *S. aureus* y *S. epidermidis* se necesita de un polisacárido adhesivo intercelular (PIA), sintetizado por enzimas codificadas por el operón de adhesión intercelular (*ica*) (Von Eiff, C.1999; Ziebuhr, W. *et al.*, 1997).

En *S. epidermidis*, las enzimas responsables de la producción de PIA son codificadas por el operón *ica*, que comprende los genes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* y el gen regulador *icaR* (Heilmann, C. *et al.*, 1996; Gerke, C. *et al.*, 1998). El gen *icaA* codifica la enzima N-acetilglucosaminiltransferasa que sintetiza el polímero de N-acetilglucosamina, y el gen *icaD* aumenta notablemente la actividad de la enzima N-acetilglucosaminiltransferasa.

La interacción funcional entre *icaA* e *icaD* podría ser necesaria para la unión entre los residuos de N-acetilglucosamina en la posición β -1,6. Aún no se conoce el papel específico de *icaB*, aunque se sugiere que podría codificar para un deacetilasa que remueve algunos grupos acetilos, originando residuos de glucosamina cargados positivamente. La coexpresión de *icaA*, *icaD*, e *icaC* causa la síntesis de cadenas más largas de poli-N-acetilglucosamina, que la coexpresión de de los genes *icaA* e *icaD*. (Gerke, C. *et al.*, 1998).

Las películas bacterianas de los catéteres pueden ser erradicadas farmacológicamente mediante la administración de una solución de antibiótico con anticoagulante, sin necesidad de reemplazar el catéter (Haimi-Cohen, Y. *et al.*, 2001; Boorgu, R. *et al.*, 2000). Se ha descrito que del 40 al 60% de los pacientes de hemodiálisis son portadores de *S. aureus* en las fosas nasales, por lo que la mayoría de las infecciones por esta bacteria son ocasionadas por la misma flora de los convalecientes (Martín, L.J.V. *et al.*, 2004).

Participación de los genotipos *fnbA* y *fnbB* en la adhesión epitelial

La adhesión de *S. aureus* a las células epiteliales humanas es considerada el primer paso en el proceso de colonización e infección (Kluytmans, J. *et al.*, 1997; Mongodin, E. *et al.*, 2002).

En *Staphylococcus aureus* existe una familia de adhesinas llamadas MSCRAMMs ("componentes microbianos de superficie reconocidas como moléculas adhesivas de matriz"), que son las responsables de la adhesión a los componentes extracelulares de la matriz del hospedero, como fibrinógeno, fibronectina y el colágeno (Kluytmans, J. *et al.*, 1997; Navarre, W. and Schneewind, O. 1999). La unión a la fibronectina es mediada por dos proteínas estrechamente relacionadas, FnBPA y FnBPB, codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB*, respectivamente (Flock, J. 1987; Jonsson, K. *et al.*, 1991).

Las proteínas FnBPA y FnBPB median la adherencia de *S. aureus* a células epiteliales humanas incluyendo el epitelio de vía aérea, células endoteliales y fibroblastos, que puede causar posteriormente la internalización de la bacteria (Dziewanowska, K. 1999).

Se ha descrito que los genotipos *fnbA* y *fnbB* de *S. aureus* se encuentran asociados con enfermedades invasivas, incluyendo endocarditis, la artritis primaria séptica y/o osteomielitis (Peacock, S. 2000).

La presencia de *S. aureus* en los carriles nasales de los humanos, parece jugar un papel importante en la epidemiología y patogénesis de enfermedades (Toshkova, K. *et al.*, 2001). Se ha descrito que la prevalencia de *S. aureus* en los carriles nasales de poblaciones adultas se encuentra entre el 30 % y el 50 %. Entre estos individuos el 20-35 % lleva a la bacteria como portadores persistentes o estables, y el 30-70 % son designados como portadores intermitentes (Kluytmans, J. *et al.*, 1997).

Morfología y características generales de *Staphylococcus aureus*

El genero *Staphylococcus* pertenece a la familia Micrococaceae, son cocos Gram positivos que miden de 0,5 a 1µm, son inmóviles, no forman esporas, pili ni flagelos, aerobios o anaerobios facultativos, catalasa positivos, y capaces de crecer en un medio con cloruro sodico al 10%, a pH 4.5-9 y a una temperatura que va desde 18° hasta 40°C. El nombre *Staphylococcus* se deriva del griego *Staphyle*, que significa “en racimo de uvas” debido al patrón de crecimiento que estos presentan. El género comprende en la actualidad a 32 especies y 15 subespecies, muchas de las cuales se encuentran como flora normal en los humanos (boca, orofaringe, nasofaringe y piel). En los medios de cultivo forma colonias opacas, redondas, regulares, convexas y de color

amarillo dorado debido a la producción de carotenoides, sin embargo se ha demostrado que este pigmento no se produce en presencia de glucosa.

Bajo condiciones anaeróbicas fermenta manitol, xilosa, lactosa, sucrosa, glicerol y maltosa con producción de ácido, coagulan el plasma, además de que suelen producir hemólisis en el medio de gelosa sangre (Novick, R. 1993).

Staphylococcus aureus produce enzimas y toxinas que son consideradas como potenciales factores de patogenicidad. Entre las enzimas que produce se encuentran: catalasa, cuagulasa, hialuronidasa, β -lactamasa, lipasa y nucleasa.

Las toxinas producidas por los estafilococos patógenos son: exotoxinas, leucidina, toxina exfoliativa, toxina 1 del síndrome de shock toxico (TSST-1) y enterotoxinas (tabla 1) (Novick, R.1993). Estos microorganismos están presentes en la piel y en las mucosas de los humanos, otros mamíferos y aves.

Pero si la flora normal se altera, por ejemplo tras la administración de antibióticos de amplio espectro, o si se introduce gérmenes patógenos en un medio normalmente estéril, pueden producirse infecciones.

Factores de virulencia	Efectos biológicos
Componentes de la estructura Cápsula Peptidoglicano Acido teicoico Proteína A Membrana citoplásmica	Inhibe la quimiotaxis y la fagocitosis; inhibe la proliferación de las células mononucleares; facilita la adherencia a cuerpos extraños. Proporciona estabilidad osmótica; estimula la producción de pirógenos endógenos (actividad de tipo endotoxina); quimioatrayente leucocitario (formación de abscesos); inhibe la fagocitosis. Regula la concentración catiónica de la membrana celular; se une a la fibronectina Inhibe la organización al unirse a los receptores Fc de IgG ₁ , IgG ₂ , e IgG ₄ ; quimioatrayente leucocitario; anticomplemento Barrera osmótica; regula el transporte hacia el interior y el exterior de la célula; lugar de enzimas biosintéticas y respiratorias.
Toxinas Citotoxinas ($\alpha, \beta, \delta, \gamma$ y leucocidina de P-V) Toxinas exfoliativas (ETA, ETB) Enterotoxinas (A-E, G-I) Síndrome del shock tóxico Toxina-1	Tóxicas para muchas células, incluyendo a los leucocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos. Proteasas séricas que rompen los puentes intercelulares en el estrato granuloso de la epidermis. Superantígeno (estimula la proliferación de las células T y la liberación de citocinas); estimula la liberación de mediadores inflamatorios en los mastocitos, aumentando el peristaltismo intestinal y la pérdida de líquidos, así como la aparición de náuseas y vómitos. Superantígeno (estimula la proliferación de las células T y la liberación de citocinas); produce la extravasación o la destrucción celular de las células endoteliales.
Enzimas Coagulasa Catalasa Hialuronidasa Fibrinolisisina Lipasas Nucleasas Penicilasa	Convierte el fibrinogeno en fibrina. Cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno . Hidroliza los ácidos hialurónicos en el tejido conectivo, facilitando la diseminación de los estafilococos en los tejidos Disuelve los coágulos de fibrina Hidroliza los lípidos Hidroliza el ADN Hidroliza las penicilinas

Tabla 1. Factores de patogenicidad de *Staphylococcus* spp.

Patogenia de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un patógeno capaz de provocar infecciones como; faringoamigdalitis, de vías urinarias, otitis, impétigo, foliculitis, celulitis, bacteremia, endocarditis, neumonía, osteomielitis, pielonefritis, síndrome de la piel escaldada, síndrome del shock tóxico (Conterno, L. 1988), e inclusive infecciones por dispositivos médicos o cuerpos extraños como; catéteres intravenosos y de diálisis peritoneal, fístulas para hemodiálisis, articulaciones prostéticas e implantes de mama (Acher, G. 2000).

Resistencia bacteriana a la meticilina

En la actualidad el tratamiento de las infecciones de *Staphylococcus aureus* asociadas a los catéteres constituye un serio problema de salud, debido principalmente a la selección de cepas resistentes a los antibióticos (Paniagua-Contreras, G.L. 2006). El mecanismo más importante de resistencia bacteriana a los antibióticos β -lactámicos es debido a la producción de β -lactamasas (BL). Estas enzimas hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico, originando un compuesto sin actividad antibacteriana (ácido peniciloico) (Sykes & Mathew, 1996). Las β -lactamasas pueden ser codificadas por plasmidos, o como en el caso de algunas bacterias Gramnegativas por el cromosoma bacteriano. En las bacterias Grampositivas

las β -lactamasas se excretan extracelularmente y destruyen el antibiotico antes de que entren en contacto con la superficie de la célula (Sykes & Mathew, 1996)

Otro de los mecanismos de resistencia que presentan las bacterias a los antibióticos β -lactámicos es debido a mutaciones cromosomicas que alteran la cantidad o afinidad de proteínas de membrana externa llamadas PBPs (por Penicillin Binding Proteins). La introducción en 1960 de la meticilina un compuesto derivado de la penicilina y resistente a la β -lactamasa, fue seguida rápidamente por la aparición de cepas resistentes (Harfman & Tomasz, 1984; Fasola, E.L. *et al.*, 1995). El mecanismo de resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus* (SARM) se debe a la producción de una PBP2a (Penicillin Binding Protein) de 78kDa codificada por el gen cromosómico *mec*, con baja afinidad por la meticilina y a la mayoría de los antibióticos β -lactamicos (De Lancaster, H. *et al.*, 1994).

La meticilina fue introducida en 1959 como la primera generacion de penicilinas semisintéticas para el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus* resistente a penicilina. A solo dos años de su introducción fue descrita la primera cepa de *S. aureus* meticilina resistente (SARM) y en 1963 la primera cepa de SARM nosocomial epidémica (Guerra, J. 1997; Siguas, A. 1997). Desde entonces, numerosas epidemias por SARM han ocurrido tanto

en países desarrollados como subdesarrollados (Vásquez, H. 1997; Lewy, I.1998).

La frecuencia de resistencia a las penicilinas (PRP) en este género se ha incrementado significativamente en los EE.UU., Japón, España, Bélgica, etc. Sólo unos pocos agentes antimicrobianos están disponibles para el tratamiento de estas infecciones (vancomicina), por ser microorganismos resistentes a antibióticos de otras familias como los aminoglucocidos, los macrolidos y las quinolonas (Echeverría, J. 1997). Aunque el término resistencia a meticilina incluye resistencia a derivados β -lactámicos, las cepas SARM presentan en general, resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos. Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) deben considerarse resistentes a todos los β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de betalactamasa). En EE.UU. la proporción de SARM comunicados al NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance) aumento del 2% en 1975 a 35% en 1996. En Japón encontraron que el 60% de 7000 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en 1992-1993 eran SARM (Echevarria, J. 1997). Se estima que, actualmente, en EE.UU. el 25% de lo *S. aureus* nosocomiales son SARM. En Europa la prevalencia varía mucho de un país a otro, siendo superior en los países del sur y en Irlanda. En un estudio

multicentrico sobre cepas aisladas de hemocultivos en 1999, la prevalencia de SARM oscilaba entre el 0% (Dinamarca, Islandia) y el 53% (Grecia). En España, desde 1986 a 1996, la prevalencia de SARM en cepas hospitalarias, aumento desde el 1,5% al 17,9% y también era diferente entre unas regiones y otras (Echevarria, J. 1997).

ANTECEDENTES

- En un estudio realizado en 1997 en el Instituto de Infectología de Bulgaria realizado por Ziebuhr y cols. detectaron que el 85% de 52 cepas de *S. epidermidis* aisladas de las fosas nasales y 11% de 36 cepas saprofitas adheridas al material plástico de los catéteres, eran portadoras del cluster de adhesión intercelular *ica*
- Arciola y cols. del Instituto Ortopedico de Italia en el 2005, reconocieron la importancia del polisacárido de adhesión bacteriano a biomateriales, como catéteres, y el papel crucial que juegan en las infecciones hospitalarias. Estos autores encontraron que el 57% de 400 cepas de *S.aureus* y *S. epidermidis* analizadas aisladas de prótesis ortopédicas asociadas a infecciones, fueron portadoras del factor *ica*, que codifica para un polisacárido de adhesión intercelular.
- Mongodin y cols. en el 2002 demostraron que el primer paso en el proceso de colonización e infección bacteriana es la adherencia a las células epiteliales humanas. Detectaron que la adhesión microbiana a la fibronectina es mediada por dos proteínas, FnBPA y FnBPB, codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB*, respectivamente. Estos autores reportaron que el 97% de 32 cepas clínicas, aisladas de secreciones de

las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística y neumonía, poseían los genes *fnbA* y *fnbB*.

- En un estudio realizado, en el Hospital Universitario de Nuestra Señora de Candelaria, Tenerife España en el 2000, por Martínez-López y cols. reportaron que la incidencia de resistencia de las cepas de *Staphylococcus* spp. a la muporocina se había incrementado de 7.7% en 1998 a 19% en el año 2000.
- Martínez-López y cols. en el 2002, utilizando un método de PCR Multiplex, se detectaron el gen *icaAB* en el 89% de 58 cepas de *Staphylococcus* spp. seleccionadas al azar y el 42% de 7 cepas aisladas de catéteres provenientes del Servicio Médico Oncológico (Hospital Universitario de Nuestra Señora de Candelaria, Tenerife España), en cuanto a los genes de resistencia a meticilina *mecA* se detectaron en 96% (n=56) de las cepas de *Staphylococcus* spp. seleccionadas al azar y en el 28% (n=2) provenientes de catéteres.
- Nashev y cols. en el 2004 comprobaron la presencia de el gen *fnbA* en el 100% de 44 cepas de *S. aureus* provenientes de portadores asintomaticos nasales e infecciones de la piel y el gen *fnbB* en el 36.7%.

- En otro estudio utilizando el Método de PCR Multiplex para localizar los genes *icaAB* y *mecA* realizado por el Grupo de Investigadores sobre Antimicrobianos y Microorganismos del Hospital Charles Nicole en Francia, compararon cepas de *Staphylococcus* spp. provenientes de diferentes sitios (sepsis, dispositivos intravasculares y manos de voluntarios sanos), por ejemplo ellos encontraron que el 77% de 39 de cultivos de cepas provenientes de sepsis portaban el gen *icaAB* y el 77% el gen *mecA*. El 68% de 44 cepas provenientes de dispositivos intravasculares portaban el gen *icaAB* y el 84% el gen *mecA*. Con respecto a las 16 cepas provenientes de las manos de voluntarios sanos y se encontró el gen *icaAB* en un 37% y el gen *mecA* en el 25%.

OBJETIVO GENERAL

Detectar el cluster de adhesión intercelular *icaAB* en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM) y en cepas de *Staphylococcus aureus* susceptibles a la meticilina (SASM) previamente obtenidas de los catéteres de pacientes de hemodiálisis y de las fosas nasales de portadores asintomáticos.

Objetivos Particulares

- Identificar el gen *mecA* en las cepas SARM provenientes de los catéteres de pacientes de hemodiálisis y de las fosas nasales de los portadores asintomáticos.
- Detectar los genotipos *fnbA* y *fnbB* que codifican el fenotipo de adhesión a células epiteliales humanas en las cepas SARM y SASM de los catéteres y de las fosas nasales.

Determinar la resistencia a los antibióticos en las cepas SARM y SASM pacientes de hemodiálisis y de las fosas nasales de los portadores asintomáticos por el método de Kirby-Bauer

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron 42 cepas de *Staphylococcus aureus* previamente aisladas de catéteres de pacientes que acudieron al servicio de hemodiálisis del Centro Medico La Raza y 66 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de los carriles nasales de pacientes asintomáticos.

Determinación de la resistencia a la meticilina por las cepas de *S. aureus* analizadas

Para probar la resistencia a la meticilina se utilizaron discos impregnados con 1 µg de oxacilina. Las cepas de *S. aureus* fueron sembradas formando un tapiz en el medio de Mueller Hinton y posteriormente se colocó el disco impregnado con el antibiótico y se incubó a 37°C por 24 horas. Al término se procedió a realizar la lectura del halo de inhibición observada.

Siembra de las muestras y extracción de DNA para la reacción de PCR

Las cepas bacterianas fueron sembradas en el medio de agar S-110 por el método de estría cruzada y se incubaron a 37° C por 24 horas. Obtenido el crecimiento bacteriano óptimo, por medio de un asa estéril se tomó una

muestra considerable y se depositó en un tubo de rosca de 16 x 150 que contenía 2ml de agua desionizada estéril. Posteriormente los tubos con las cepas se mezclaron en un vortex por 20 segundos y se hirvieron por 20 minutos (baño maría). Los tubos se sacaron del baño maría y se depositaron en contenedores con hielo por 10 minutos. Posteriormente se depositó 1 ml de la muestra en un tubo eppendorff estéril y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos. Al término se separó el sobrenadante con una pipeta de 1000 µl y se depositó en otro tubo eppendorff nuevo y estéril, el DNA se encontró en el sobrenadante. Finalmente el tubo el DNA templado se etiquetó y se guardó a -20°C para su posterior utilización.

Detección de *icaAB*, *mecA* y *femB* en las cepas de *S. aureus* por PCR multiplex

El método de PCR multiplex y los oligonucleótidos (Tabla 2) que nosotros utilizamos para la detección de los genes de *Staphylococcus aureus* han sido previamente descritos (Martín-López, J.V. 2004). El volumen final de la mezcla de reacción para PCR fue de 25 µl, la cual contenía 3 µl de DNA templado, 4 µl de agua libre de nucleasa estéril, 1 µl de cada uno de los 6 oligonucleótidos a una concentración de 10 pmol (*icaAB*), 60 pmol (*femB*) y 5 pmol (*mecA*) (todos los primers fueron de Sigma-Genosys), 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™

Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del DNA fue realizado en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 66°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos). posteriormente 5 ciclos (desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineación a 64°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos) y 25 ciclos (desnaturalización a 94°C, 45 segundos, alineación a 50°C y 45 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C.

Primer	Gen	Secuencia de DNA	Concentración
icaA-S	<i>icaAB</i>	5'-AAACTTGGTGCGTTACAGG-3'	40 pmol
icaA-E		5'-TCT GGGCTTGACCATGTTG-3'	
femB1	<i>femB</i>	5'-TTACAGAGTTAACTGTTACC -3'	60 pmol
femB2		5'-ATACAAATCCAGCACGCTCT -3'	
MecA1	<i>mecA</i>	5'-GTAGAAATGACTGAACGTCGGATAA -3'	5 pmol
MecA2		5'-CCAATTCACATTGTTTCGGTCTAA -3'	

Tabla 2. Primers utilizados para la amplificación de los genes por PCR multiplex.

Detección de *fnbA* y *fnbB* en las cepas de *S. aureus* por PCR multiplex

El método de PCR multiplex y los oligonucleótidos (Tabla 3) que nosotros utilizamos para la detección de los genes de las cepas de *Staphylococcus* han sido previamente descritos (Nashev, D. *et al.*, 2004). El volumen final de la mezcla de reacción para PCR fue de 25 μ l, la cual contenía 2 μ l de DNA templado, 19 μ l de agua libre de nucleasa estéril, 1 μ l de cada uno de los 4 oligonucleótidos a una concentración de 25 pmol (todos los primers fueron de Sigma-Genosys), 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaqTM Ready-To-GoTM PCR beads). La amplificación del DNA fue realizado en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 50°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C.

Primer	Gene	Secuencia de ADN	Concentración
fnbA	<i>fnbA</i>	5'-GCGGAGATCAAAGACAA-3' 5'-CCATCTATAGCTGTGTGG-3'	25 pmol
fnbB	<i>fnbB</i>	5'-GGAGAAGGAATTAAGGCG-3' 5'-GCCGTCGCCTTGAGCGT-3'	25 pmol

Tabla 3. Primers utilizados para la amplificación de los genes *fnbA* y *fnbB* por PCR multiplex.

Electroforesis

Después de la amplificación, 10 µl de cada muestra fue analizada por electroforesis en geles de agarosa al 2% bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miniampers por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (BrEt) y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK). La PCR fue considerada como positiva cuando una banda o bandas de tamaño igual al de nuestras cepas controles de referencia fueron observadas y no extra bandas. La cepa de referencia utilizada fue *S. aureus* ATCC 29213 .

Susceptibilidad a los antibióticos de las cepas de *S. aureus* analizadas

Se determinó la susceptibilidad a 12 antibióticos (cefalotina, carbenicilina, ampicilina, trimetoprim con sulfametoxazol, cefotaxima, cloranfenicol, pefloxacina, gentamicina, netilmicina, nitrofurantoína, amikacina y ceftriaxona) por el método de Kirby-Bauer.

RESULTADOS

Pacientes de hemodiálisis

Se analizaron 42 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas previamente de los catéteres tipo Mahurkar de pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) que habían acudido al servicio de hemodiálisis de un hospital de tercer nivel de atención. Todos los pacientes presentaron infección en el sitio de inserción de los catéteres que se caracterizó por enrojecimiento, dolor y supuración de un olor desagradable. La edad de los pacientes se encontró comprendida entre los 40-60 años. El 52.2% de ellos correspondió al sexo masculino (N = 22) y el 47.8% al femenino (N = 20) (figura 1).

Portadores asintomáticos

Se estudiaron sesenta y seis cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de las fosas nasales de portadores asintomáticos. La edad de los individuos se encontró entre los 18 a 24 años. El 42.4% (N = 28) correspondió al sexo masculino y el 57.6% (N = 38) al sexo femenino (figura 2).

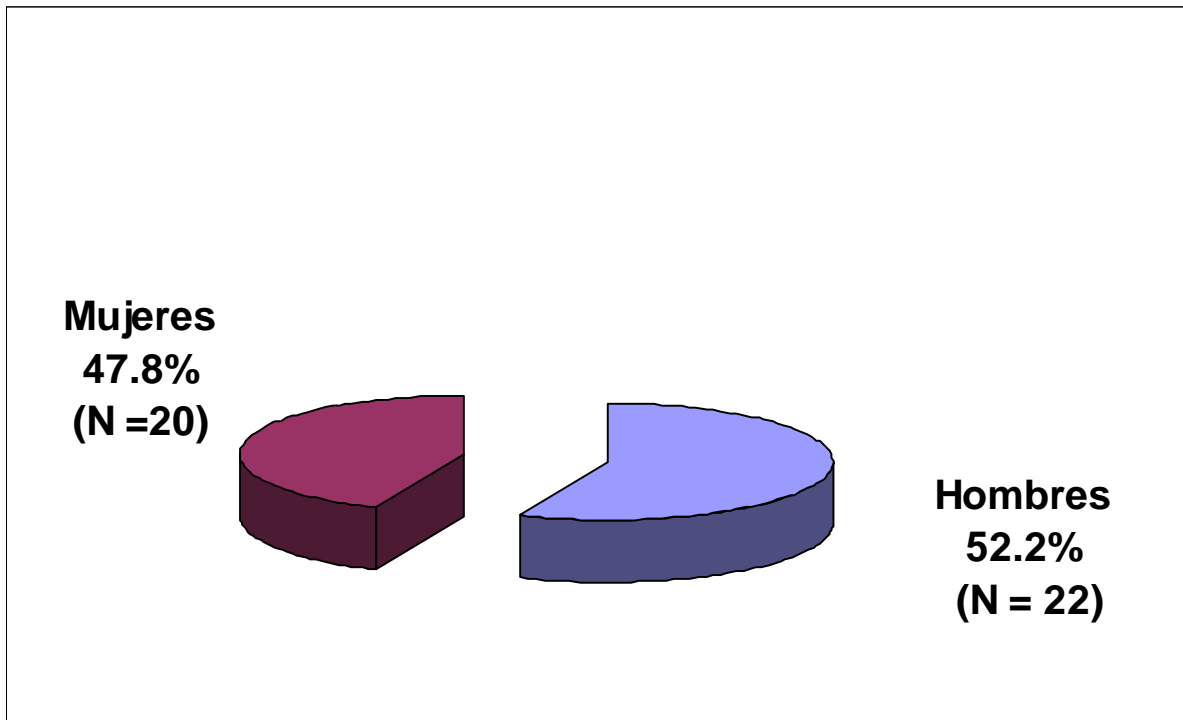


Figura 1. Distribución de los pacientes de hemodiálisis por sexo.

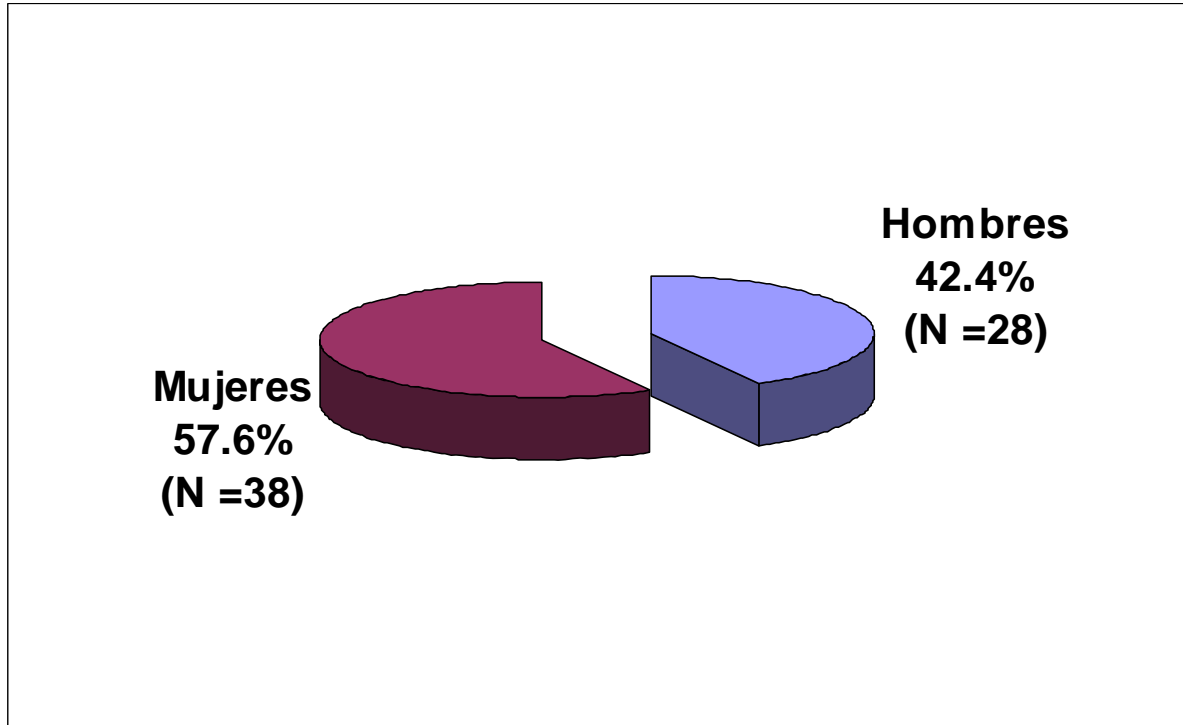


Figura 2. Distribución de los individuos asintomaticos por sexo.

Determinación de la resistencia a la meticilina por las cepas de *S. aureus* analizadas

La resistencia a la meticilina por medio de discos impregnados con 1 µg de oxacilina fue detectada en el 19% (N = 8) de las cepas de *S. aureus* (SARM) provenientes de los catéteres de los pacientes con IRC (figura 3) y en el 15.1% (N = 10) de las cepas de *S. aureus* (SARM) recuperadas de las fosas nasales de los portadores asintomáticos (figura 4).

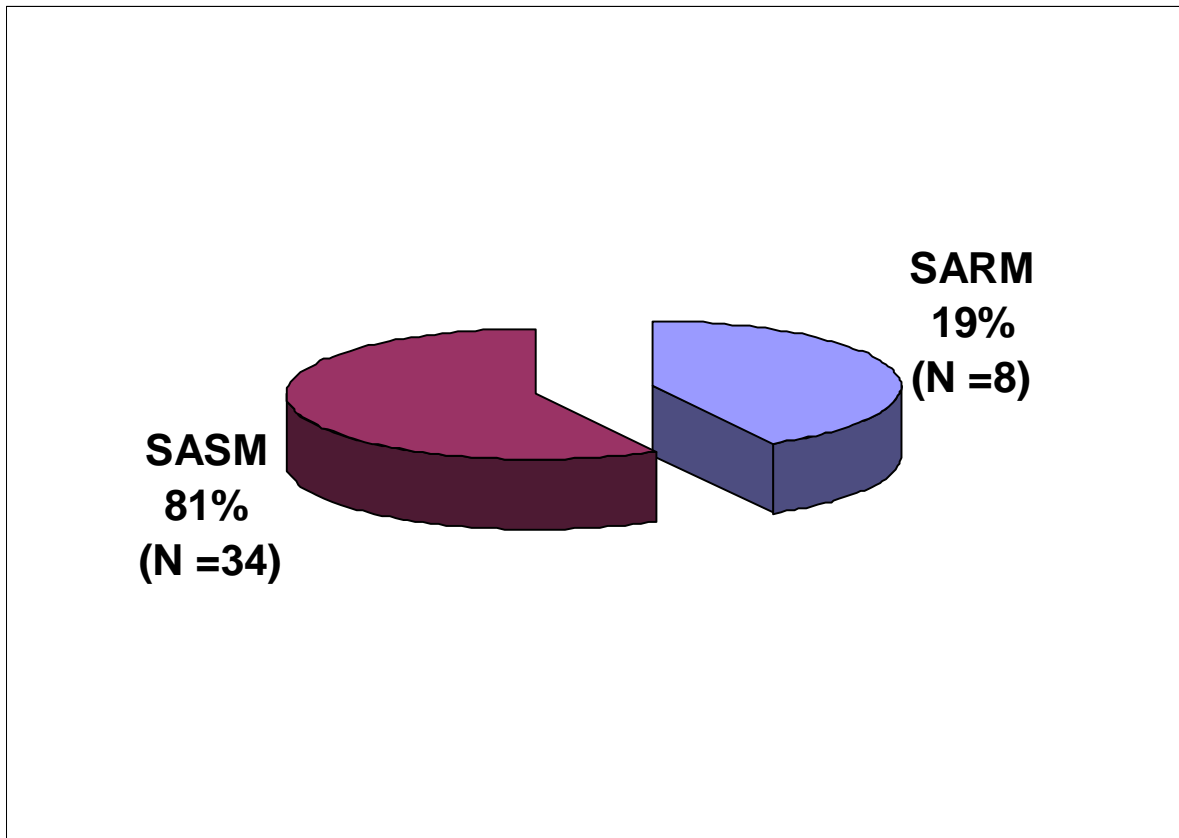


Figura 3. Resistencia a meticilina por cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de los catéteres.

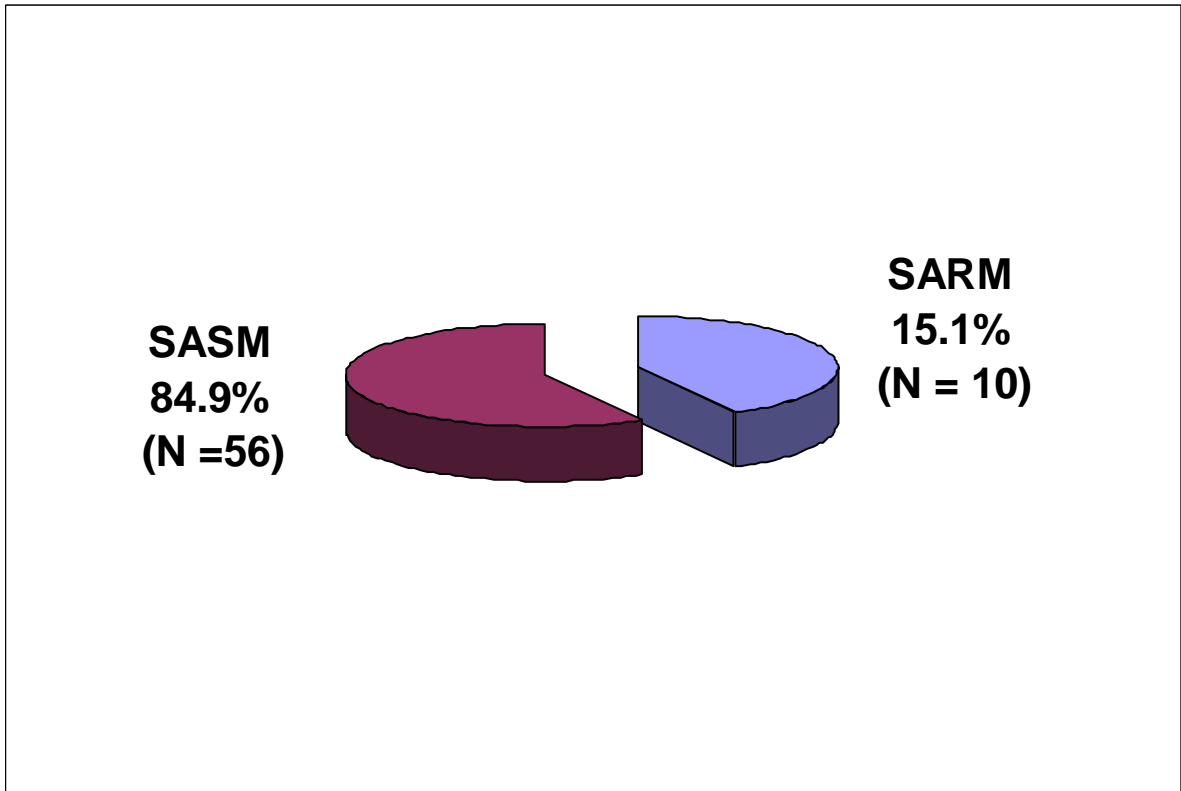


Figura 4. Resistencia a meticilina por cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de las fosas nasales de portadores asintomaticos.

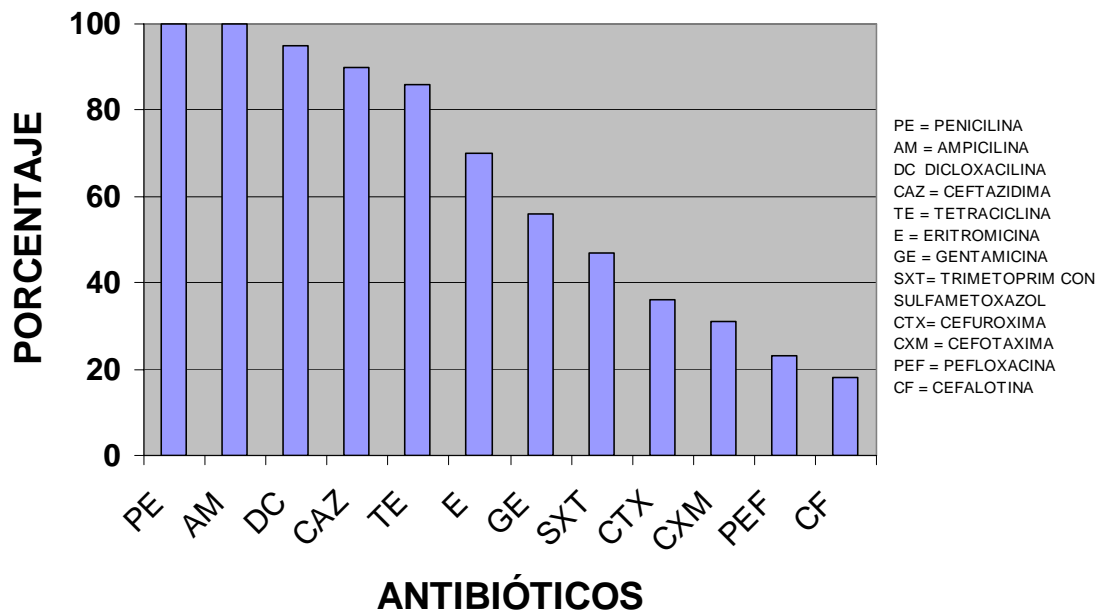


Figura 5. Resistencia a antibióticos de las cepas de *Staphylococcus aureus* (SARM y SASM) recuperadas de los catéteres.

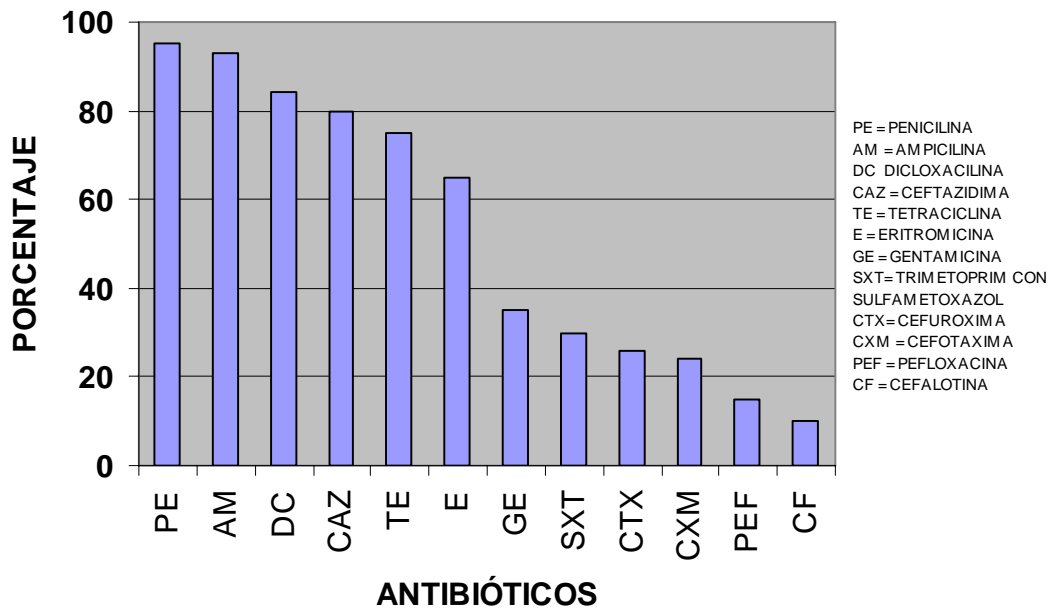


Figura 6. Resistencia a antibióticos de las cepas de *Staphylococcus aureus* (SARM y SASM) recuperadas de las fosas nasales de portadores asintomáticos.

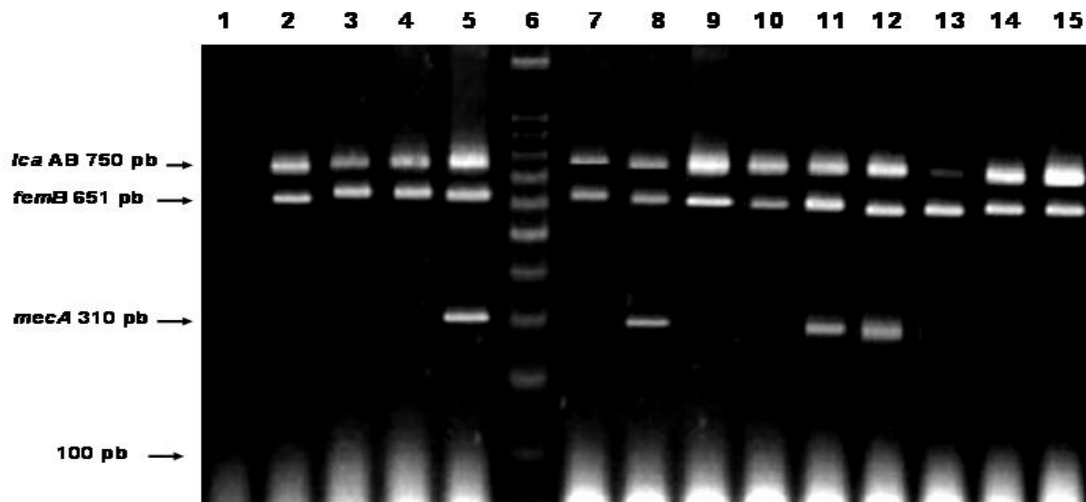
Detección de los genotipos *icaAB*, *mecA* y *femB* en las cepas SARM y SASM provenientes de los catéteres de pacientes de hemodiálisis y en las fosas nasales de portadores asintomáticos por PCR multiplex

En las cepas SARM (N = 8) obtenidas de los catéteres, el operón *icaAB* fue detectado en 7 cepas (85.7%) (tabla 4, fotografía 1), *mecA* en y *femB* en 8 (100 %) en cada caso, mientras que en las cepas SASM *icaAB* fue detectado en el 23.8% (N = 10) (tabla 4, fotografía 1) y *femB* en el 100% (N = 42).

Para las cepas SARM obtenidas de las fosas nasales de los portadores asintomáticos, el cluster de adhesión intercelular *icaAB* fue detectado en el 80 % (N = 8) (tabla 4, fotografía 1), *mecA* y *femB* en el 100% (N = 10), en cada caso, mientras que en las cepas SASM *icaAB* fue detectado en el 76.7% (N = 43) (tabla 4, fotografía 1) y *femB* en el 100% (N = 56).

<i>Staphylococcus aureus</i> provenientes de los catéteres de pacientes de hemodiálisis (N = 42)				<i>Staphylococcus aureus</i> provenientes de las fosas nasales de portadores asintomáticos (N = 66)			
Meticilina resistentes (N = 8)		Meticilina susceptibles (N = 34)		Meticilina resistentes (N = 10)		Meticilina susceptibles (N = 56)	
Genotipo	% (N)	Genotipo	% (N)	Genotipo	% (N)	Genotipo	% (N)
<i>icaAB</i>	87.5 (7)	<i>icaAB</i>	29.4(10)	<i>icaAB</i>	80 (8)	<i>icaAB</i>	76.7 (43)
<i>mecA</i>	100 (8)	<i>mecA</i>	0 (0)	<i>mecA</i>	100 (10)	<i>mecA</i>	0 (0)
<i>femB</i>	100 (8)	<i>femB</i>	100 (34)	<i>femB</i>	100 (10)	<i>femB</i>	100 (56)

Tabla 4. Detección de los genotipos *icaAB*, *mecA* y *femB* por PCR multiplex en las cepas SARM y SASM recuperadas de los catéteres de pacientes de hemodiálisis y de las fosas nasales de los portadores asintomáticos.



Fotografía 1. Detección de *icaAB*, *femB* y *mecA* en *S. aureus* por PCR multiplex. Línea 1; control negativo (sin DNA). Línea 2: *icaAB* y *femB* de *S. aureus* ATCC 29213 (Control positivo, meticilina susceptible). Línea 3, 4, y 7: *icaAB* y *femB* de *S. aureus* aisladas de catéteres. Línea 5 y 8: *icaAB*, *femB* y *mecA* de *S. aureus* aisladas de catéteres. Línea 6: MWM 50-bp ladder. Línea 9, 10, 13-15 *icaAB* y *femB* de *S. aureus* aisladas de portadores asintomáticos. Líneas 11 y 12: *icaAB*, *femB* y *mecA* de *S. aureus* aisladas de portadores asintomáticos.

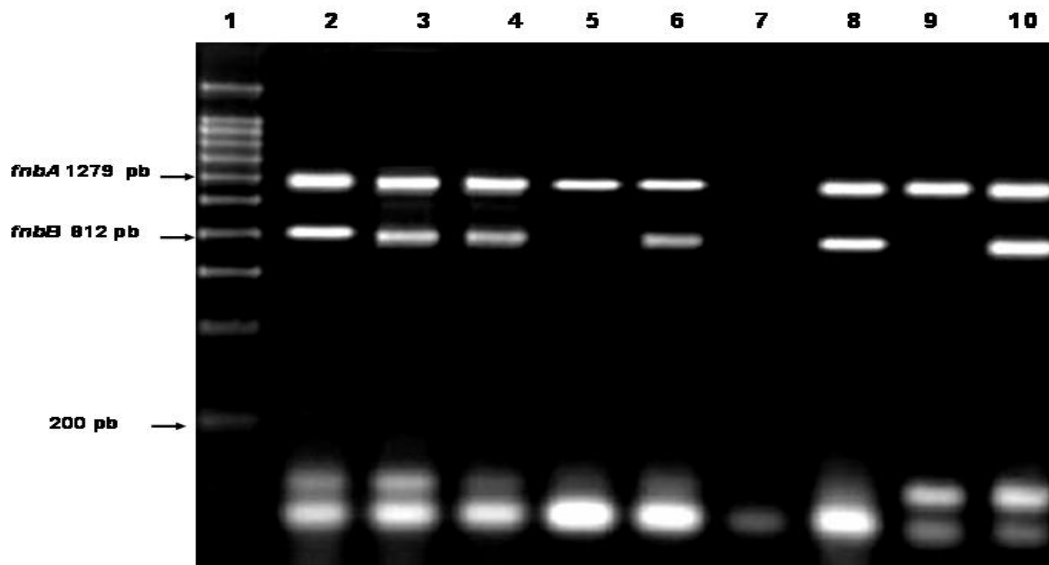
Detección de los genotipos *fnbA* y *fnbB* en las cepas SARM y SASM provenientes de los catéteres de pacientes de hemodiálisis y en las fosas nasales de portadores asintomáticos por PCR

En las cepas SARM (N = 8) obtenidas de los catéteres, el gen *fnbA* fue detectado en el 100% (N = 8) (tabla 5, fotografía 2) y *fnbB* en el 25% (N = 2), mientras que en las cepas SASM (N = 34) *fnbA* fue detectado en el 11.7% (N = 4) y *fnbB* no se identificó.

Para las cepas SARM (N = 10) recuperadas de las fosas nasales de los portadores asintomáticos, *fnbA* fue detectado en el 40 % (N = 4) (tabla 5, fotografía 2) y *fnbB* en el 20% (N = 2), mientras que en las cepas SASM (N = 56) *fnbA* fue detectado en el 5.3% (N = 3) y *fnbB* en el 3.5% (N = 2).

<i>Staphylococcus aureus</i> provenientes de los catéteres de pacientes de hemodiálisis (N = 42)				<i>Staphylococcus aureus</i> provenientes de las fosas nasales de portadores asintomáticos (N = 66)			
Meticilina resistentes N = 8		Meticilina susceptibles N = 34		Meticilina resistentes N = 10		Meticilina susceptibles N = 56	
Genotipo	% (N)	Genotipo	% (N)	Genotipo	% (N)	Genotipo	% (N)
<i>fnbA</i>	100 (8)	<i>fnbA</i>	11.7 (4)	<i>fnbA</i>	40 (4)	<i>fnbA</i>	5.3 (3)
<i>fnbB</i>	25 (2)	<i>fnbB</i>	0 (0)	<i>fnbB</i>	20 (2)	<i>fnbB</i>	3.5 (2)

Tabla 5. Detección de los genotipos *fnbA* y *fnbB* por PCR en las cepas SARM y SASM recuperadas de los catéteres de pacientes de hemodiálisis y de las fosas nasales de los portadores asintomáticos.



Fotografía 2. Detección de *fnbA* y *fnbB* en *S. aureus* por PCR. Línea 1; MWM 50-bp ladder; Línea 2: *icaAB* y *femB* de *S. aureus* ATCC 29213 (Control positivo, meticilina susceptible). Línea 3, 4, y 7: *icaAB* y *femB* de *S. aureus* aisladas de catéteres. Línea 5 y 8: *icaAB*, *femB* y *mecA* de *S. aureus* aisladas de catéteres.. Línea 9, 10, 13-15 *icaAB* y *femB* de *S. aureus* aisladas de portadores asintomáticos. Líneas 11 y 12: *icaAB*, *femB* y *mecA* de *S. aureus* aisladas de portadores asintomáticos.

Resistencia a antibióticos en las cepas SARM y SASM provenientes de los catéteres de pacientes de hemodiálisis y en las fosas nasales de portadores asintomáticos

En la figura 5 se aprecia que el 100% de las cepas SARM y SASM recuperadas de los catéteres fue resistente a la penicilina y ampicilina (en cada caso), el 95% a la dicloxacilina, 90% a ceftazidima, 86% a tetraciclina, 70% a

eritromicina, 56% a gentamicina, 47% a trimetoprim con sulfametoxazol, 36% a cefotaxima, 31% a cefuroxima, 23% a pefloxacina y 18% a cefalotina.

En la figura 6 se aprecia que el 95% de las cepas SARM y SASM recuperadas de las fosas nasales de portadores asintomáticos fue resistente a la penicilina, el 93% a ampicilina, el 84% a la dicloxacilina, 80% a ceftazidima, 75% a tetraciclina, 65% a eritromicina, 35% a gentamicina, 30% a trimetoprim con sulfametoxazol, 26% a cefotaxima, 24% a cefuroxima, 15% a pefloxacina y 10% a cefalotina.

DISCUSIÓN

Pacientes estudiados

Para el desarrollo de este trabajo analizamos 42 cepas de *S. aureus* aisladas previamente de los catéteres de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica (IRC) (figura 1) y 66 cepas recuperadas de las fosas nasales de portadores asintomáticos (figura 2). La contaminación de los catéteres de los pacientes de hemodiálisis por cepas de *Staphylococcus aureus* representa un grave problema de salud, (Hoen, B. *et al.*, 1995, Taylor GD. *et al.*, 1998) que pueden originar complicaciones como shock séptico, endocarditis, osteomielitis, artritis séptica, o abscesos epidurales que comprometen la vida de los pacientes (Nassar, G. & Ayus J.C. 2001). En los Estados Unidos de Norte América anualmente se registran entre 87,500 y 350,000 episodios de bacteremias relacionadas con los catéteres (Braun, B.I. *et al.*, 2003) constituyendo la mayor causa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes de hemodiálisis (Pastan, S.D., *et al.*, 2002).

Se ha descrito que del 40 al 60% de los pacientes de hemodiálisis son portadores de *S. aureus* en las fosas nasales, por lo que la mayoría de las infecciones por esta bacteria son ocasionadas por la misma flora de los convalescientes (Boelaert, J.R. & Van Landuyt, H.W. 1993).

Determinación de la resistencia a la meticilina por las cepas de *S. aureus* analizadas

En este trabajo describimos que el 19% (N = 8) de las cepas de *S. aureus* provenientes de los catéteres de los pacientes con IRC (figura 3) y el 15.1% (N = 10) de las cepas de *S. aureus* recuperadas de las fosas nasales de los portadores asintomáticos fueron resistentes a la meticilina (SARM) (figura 4). Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM), contienen en el cromosoma el gen *mec*, el cual codifica para una proteína de membrana llamada PBP2a (Penicillin Binding Protein) que le confiere resistencia frente a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, debido a la baja afinidad que posee para estos agentes (Chambers, H.F. 1997). En los últimos años ha ocurrido un incremento de las cepas de *Staphylococcus* resistentes a la meticilina (SARM), por ejemplo en los hospitales de EUA en el año de 1975 al año de 1991 ocurrió un incremento en el porcentaje de las cepas de SARM del 2.4% al 29% (Archer, GL. 1998). La presencia de cepas SARM en los catéteres de los pacientes de hemodiálisis constituyen un riesgo de salud, que en determinado momento puede ocasionar bacteremia, por ejemplo en un estudio realizado en 94 pacientes de hemodiálisis, en el cual se determinó los factores de riesgo de las bacteremias asociadas con los diferentes tipos de accesos permanentes como; fístulas

arteriovenosas (AV) y grafts de politetrafluoroetileno (PTFE), se aisló en el 54% a SASM, en el 22% a SARM y en el 3% a *Staphylococcus epidermidis* (no se detectó la resistencia a la meticilina) (Bonomo, R.A. *et al.*, 1997). Nuestros datos contrastan con los reportados por Poole y cols., quienes detectaron cepas de SARM en 29 catéteres, SARM en 5 catéteres y a SASM en 10 catéteres (Poole, C.V. *et al.*, 2004). En otro estudio realizado en 50 pacientes de hemodiálisis en el cual se determinaron los factores de riesgo de las bacteremias asociadas a catéteres, se aisló en 15 catéteres a SARM y en 13 a SASM (Lee, S.C. *et al.*, 2004).

Detección de los genotipos *icaAB*, *mecA* y *femB* en las cepas SARM y SASM provenientes de los catéteres de pacientes de hemodiálisis y en las fosas nasales de portadores asintomáticos por PCR multiplex

En este trabajo describimos que de las 8 cepas SARM obtenidas de los catéteres, el operón *icaAB* fue detectado en 85.7% (N = 7) (tabla 4, fotografía 1), *mecA* y *femB* en el 100 % (N = 8, en cada caso), y en las cepas SASM *icaAB* fue detectado en el 23.8% (N = 10) y *femB* en el 100% (N = 42), mientras que de las 10 cepas SARM obtenidas de las fosas nasales de los portadores asintomáticos, el cluster de adhesión intercelular *icaAB* fue detectado en el 80 % (N = 8) (tabla 4, fotografía 1), *mecA* y *femB* en el 100% (N = 10, en cada caso), y para las cepas SASM *icaAB* fue

detectado en el 76.7% (N = 43) y *femB* en el 100% (N = 56). Nuestros datos contrastan con los encontrados en un estudio realizado en 65 cepas de *S. aureus* (7 de catéteres) recuperadas de diferentes procesos infecciosos de pacientes del Hospital Nuestra Señora de Candelaria, Tenerife, España. Estos autores encontraron que 52 cepas (89.7%) de las 58 aisladas de procesos infecciosos portaron el cluster *icaAB*, el 96.5% (N = 56) mostró *mecA*, 89.7% *icaAB* (N = 52) y 61.5% (N = 40) presentó ambos genes (*icaAB* y *mecA*). De las 7 cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres, solamente en 2 se detectó al cluster *icaAB*, pero no se identificó a *mecA* (Martín-López JV. 2002). Frebourg y cols. han reportado una elevada frecuencia de los aislamientos clínicos que acarrean el locus *ica* y también el gen *mecA* (Frebourg, N.B. *et al.*, 2000).

La presencia del opéron de adhesión intercelular (*ica*) que participa en la formación de la película bacteriana en los catéteres de los pacientes de hemodiálisis ha sido identificado, no solamente en cepas de *S. aureus*, sino también en *S. epidermidis* (Martín-López, *et al.*, 2004.), como lo demuestra el trabajo realizado por Arciola y cols. en el Instituto Ortopédico Rizzoli, Italia (2001) en 91 cepas de *Staphylococcus* (68 *S. epidermidis* y 23 *S. aureus*) aisladas de catéteres intravenosos de pacientes con infecciones y en 10 cepas

de *S. epidermidis* recuperadas de riñón y mucosas de voluntarios sin enfermedad. Estos autores detectaron que el 49% de las cepas de *S. epidermidis* y el 61% de las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres fueron positivos por PCR para *icaA* e *icaD*, mientras que en las cepas de *S. epidermidis* recuperadas de las mucosas de individuos sanos, no se identificó el operón *ica* (Arciola, C.R. *et al.*, 2001)

Detección de los genotipos *fnbA* y *fnbB* en las cepas SARM y SASM provenientes de los catéteres de pacientes de hemodiálisis y en las fosas nasales de portadores asintomáticos por PCR

En este trabajo describimos que en nuestras cepas SARM (N = 8) obtenidas de los catéteres, el gen *fnbA* fue detectado en el 100% (N = 8) (tabla 5, fotografía 2) y *fnbB* en el 25% (N = 2) y para las cepas SASM (N = 34) *fnbA* fue detectado en el 11.7% (N = 4) y *fnbB* no se identificó, mientras que para las cepas SARM (N = 10) recuperadas de las fosas nasales de los portadores asintomáticos, *fnbA* fue detectado en el 40 % (N = 4) (tabla 5, fotografía 2) y *fnbB* en el 20% (N = 2) y para las cepas SASM (N = 56) *fnbA* fue identificado en el 5.3% (N = 3) y *fnbB* en el 3.5% (N = 2). Nuestros datos son similares con los reportados en un estudio realizado en 44 cepas de *Staphylococcus aureus* recuperadas de las fosas nasales de pacientes sanos, en donde los genes *fnbA* y *fnbB* fueron identificaron por PCR

multiplex. Estos autores detectaron que el 100% (N = 44) de las cepas fue positivo para *fnbA* y el 40% para *fnbB* (Nashev, D. *et al.*, 2004) Mongodin y cols. reportaron que el 97% (N = 32) de las cepas de *S. aureus* aisladas de secreciones respiratorias de pacientes con fibrosis quística y neumonía nosocomial fueron portadoras de los genes *fnbA* y *fnbB*, demostrando que las proteínas FnBPs participan de manera importante en la adherencia a células epiteliales de vías respiratorias, y que la proteína A y el factor clumping no juega un rol importante en este proceso (Mongodin, E. *et al.*, 2002). Peacock *et al.* en 2000, ha descrito que la presencia de ambos genes parece ser un importante factor en la patogénesis por *S. aureus*.

Resistencia a antibióticos en las cepas SARM y SASM provenientes de los catéteres de pacientes de hemodiálisis y en las fosas nasales de portadores asintomáticos

Nosotros en este trabajo reportamos que la mayoría de las cepas SARM y SASM recuperadas de los catéteres de los pacientes de hemodiálisis y de los carriles nasales de los portadores sanos fue resistente a la penicilina, ampicilina, dicloxacilina, ceftazidima, tetraciclina y eritromicina (figura 5 y 6).

La marcada resistencia a los antibióticos, principalmente a los β -lactámicos detectada en nuestras cepas (SARM de los catéteres y de los portadores sanos) puede deberse a la combinación de dos factores primordiales, la producción de β -lactamasas, en donde los *Staphylococcus aureus* pueden producir

diferentes tipos de β -lactamasas que tienen diferentes afinidad sobre las penicilinas y cefalosporinas (Livermore, D.M. 2001) y la mutación de las PBPs (Penicillium Binding Proteín), debido a que las cepas SARM contienen en el cromosoma el gen *mec*, el cual codifica para una proteína de membrana llamada PBP2a (Penicillin Binding Protein) que le confiere resistencia frente a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, debido a la baja afinidad que posee para estos agentes (Chambers, H.F. 1997). En los últimos años ha ocurrido un incremento de las cepas de *Staphylococcus* resistentes a la meticilina (SARM y SERM), por ejemplo en los hospitales de EUA en el año de 1975 al año de 1991 ocurrió un incremento en el porcentaje de las cepas de SARM del 2.4% al 29% (Archer, G.L. 1998) . En la ciudad de México en un estudio realizado en 296 cepas de *S. aureus* y 212 de *Staphylococcus* coagulasa negativa colectadas en pacientes del Instituto Nacional de Pediatría durante 1998-1999 y 127 cepas de *S. aureus* y 786 cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa colectadas en pacientes del Hospital Infantil de México, Federico Gómez durante 1998-2000, se encontró que el 100% de las cepas de SARM y SERM coagulasa negativa fueron resistentes a la oxacilina, amoxicilina-clavulanato, ticarcilina-clavulanato, cefepime, ceftriaxona e imipinem (Jaimes, E.C. *et al.*, 2002). En este estudio los antibióticos más eficaces contra las cepas fueron la vancomicina, teicoplanin y linezolid.

CONCLUSIONES

1. El 19% de las cepas de *S. aureus* (SARM) provenientes de los catéteres de los pacientes con IRC y el 15.1% de las cepas de *S.* recuperadas de las fosas nasales de los portadores asintomáticos fueron resistentes a la meticilina.
2. En las cepas SARM obtenidas de los catéteres el operón *icaAB* fue detectado en 87.5% y *mecA* y *femB* en el 100% .
3. El operón *icaAB* fue identificado en el 23.8% de las cepas SARM obtenidas de los catéteres y el gen *femB* en el 100%.
4. Para las cepas SARM obtenidas de las fosas nasales de los portadores asintomáticos, el cluster de adhesión intercelular *icaAB* fue detectado en el 80% y *mecA* y *femB* en el 100%, en cada caso.
5. *icaAB* fue detectado en el 76.7% y *femB* en el 100% de las cepas SARM recuperadas de los carriles nasales.
6. En las cepas SARM obtenidas de los catéteres, el gen *fnbA* fue detectado en el 100% y *fnbB* en el 25%.
7. Para las cepas SARM obtenidas de los catéteres *fnbA* fue detectado en el 11.7%.

- 8.** El gen *fnbA* fue detectado en el 40 % de las cepas SARM recuperadas de las fosas nasales de los portadores asintomáticos, y *fnbB* en el 20%.
- 9.** En las cepas SASM recuperadas de los carriles nasales *fnbA* fue detectado en el 5.3% y *fnbB* en el 3.5%.
- 10.** La mayoría de las cepas SARM y SASM aisladas de los catéteres y de los carriles nasales fueron resistentes a la penicilina, ampicilina, dicloxacilina, ceftazidima tetraciclina y eritromicina.

REFERENCIAS

1. Abraham, E.P.; Chain, E; Fletcher, C.M.; Floyer, H.W.; Gardner, A.D.; Healtley, N. G. and Jenings, M.A.1941. Further observations on penicillin Lancet 2:177-188.
2. Allon, M. 2004. Dialysis catheter-related bacteremia: Treatment and Prophylaxis. Am J.Kidney Dis. 5:779-791.
3. Amabile, C. 1988. La resistencia bacteriana a los antibióticos. Ciencia y Desarrollo. 80: 57-68.
4. American Diabetes Association. Consensus Development Conference on Diabetic Foot Wound Care (Consensus Statment). Diabetes Care 1999; 22: 1353-1360.
5. Archer GL.1998. *Staphylococcus aureus*: A well-armed pathogen. *Clin Infect Dis*.26:1179-1181.
6. Arciola C.R. Baldassari, L. Montanaro, L.2000. Presence of icaA and icaD Genes and Slime Production in a Collection of Stapylococcal Strains from Catheter-Associated Infections. Journal of Clinical Microbiology.39.6:2151-2156.

7. Bernardo, D. J. 2001. Insuficiencia Renal Cronica. Medicina. Facultad de Medicina. UNNE.
8. Boelaert JR, Van Landuyt HW. Godard CA.1993.Nasal mupirocina ointment decreases the incidence of *Staphylococcus aureus* bacteraemias in hemodialysis patients. *Nephrol. Dial Transplant.* 8:235-239.
9. Bonomo, RA. Rice, D. Whalen, C. Linn,D. Eckstein, E. Shales, DM.1997. Risk factors associated with permanent acces-site infections in chronic hemodialysis patients. *Infection control and hospital epidemiology.* 18:757-761.
10. Boorgu R, Dubrow AJ, Levin NW. Adjuntive antibiotic/anticoagulante lock therapy in the treatment of bacteremia associated with the use of a subcutaneously implanted hemodialysis accses device. *ASAIO J.* 2000;46:767-770.
11. Braun BI, Kritchevsky SB, Wong ES, Solomon SL, Steele L, Richards CI, Simons BP.2003.Preventing central venous catheter-associated primary bloodstream infections: characteristics of practices among hospitals participating in the evaluation of processes and indicators in infection control (EPIC) study. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24:926-934.

12. Bryan, L. E. 1980. Mechanisms of Plasmid mediated Drug Resistance. En: Stuattard, C. And K.R. Roozee (eds).Plasmids and Transposons: Enviromental effects and Maintenance Mechanisms”. Academic Press. New York. pp.57-81.
13. CDC *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin United States 2002. MMWR 2002: 51: 565-7
14. Chambers HF.1997. Meticillin resistance in staphylococci. Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 10:781-791
15. Conterno L. O. Wey S.B. Castelo A. Risk factors for mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Control Hosp.Epidemial.*1998: 19;32-37.
16. De Lancaster, H. De Jonge BLM. Mathews PR, Tomasz, A.1994. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.*33:7-24.
17. Dudley,M.1995.Bacterial resistance mechanism to beta-lactam antibiotics: assessment of management strategies. *Pharmacotherapy*, 15; IPT 2, 95-145.
18. Donland, RM.2001.Biofilm formation: A clinical relevant microbiologic proces. *Clin Infect. Dis.* 33: 1387-1392.
19. Dziewanowska, K., Patti, J., Deobald, C., Bayles, K., Trumble, W. and Bonach, G. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are

required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. Infect. Immun. 1999;67;4673–4678).

20. Echeverria JE, Ore L, Zerpa R, Campana C, Quispe V, Tamariz J, Prada A, Guerra H, Casas J. 1997. Prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus* strains, in Hospitalized patients and susceptibility to Teicoplanin in Lima Peru. 20th International Congress of Chemotherapy. Sidney- Australia. International Society of Chemotherapy.

21. Fasola, E. L., C.F. Fasching & L.R. Peterson. 1995. Molecular correlation between in vitro and in vivo activity of beta-lactam and beta-lactamase inhibitor combinations against methicillin-resistant in *Staphylococcus aureus*. J. Lab. Clin. Med. 125:200-211.

22. Flock, J. Fromann, G. Jonsson, K. Guss, B. Signäs, C. Nilsson, B. Raucci, G. Hook, M. Wadström, T. Lindberg, M. 1987. Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. EMBO J. 6,2351-2357.

23. Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF. 2000. PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. J Clin Microbiol 38:877–880.

24. Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O, Götz F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of

the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* 1998;273: 18586–18593.

25. Guerra J, Sánchez I.1997. *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina en el Hospital Carrión. *Boletín de la Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales-SPEIT*.6:40.

26. Handwerger S, Raucher B, Altarac D.1993.Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin. *Clin Infects Dis*.16: 7570-5.

27. Haimi-Cohen Y, Husain N, Menean J, Karayalcin G, Lehrer M, Rubin LG.2001. Vancomycin and ceftazidime bioactivities persist for at 2 weeks in the lumen in ports; Simplifying treatment of port-associated bloodstream infections by using the antibiotic lock technique. *Antimicrob Agents Chemother*. 45:1565-1567.

28. Hartman, B. J. & A. Tomasz. 1984. Low-affinity penicillin binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol*. 158:513-516.

29. Hoen B, Kressler M, Hestin D, Mayeux D. Risk factors for bacterial infections in chronic hemodialysis adult patients: a multicenter prospective survey. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:377-381. Taylor GD, McKenzie M, Buchanan-Chell M, Caballo L, Chui L, Kowalewska-Grochowska K. Central

venous catheters as a source of hemodialysis-related bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1998; 19:643-646.

30. Jaimes EC, De los Monteros LEE, Beltrán RA.2002. Epidemiology of drug resistace: The case of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci infections. *Sal. Pub Mex.* 44:108-112

31. Jefferys A, Chow JSF, Suranyi MG. 2003. Acute vascular access catheters for hemodialysis complications limiting technique survival. *Nefrology.*8:16-20.

32. Jonsson, K. Signäs, H. Müller, H. Lindberg, M. 1991. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur J. Biochem.*202, 1041-1048.

33. Kluytmans, J., van Belkum, A. and Verbrugh, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997;10:505–520.

34. Krishnasami Z. Carlton D. Bimbo L. Management of hemodialysis catheter related bacteremia with an adjunctive antibiotic lock solution. *Kidney Int.* 2002;61:1136-1142

35. Lee SC, Chen KS, Tsai CJ, Lee CC, Chang HY, See LC, Kao YC, Chen SC, Wang CH. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections related to central venous catheters for hemodialysis. *Infect Control Hosp. Epidemiol.* 2004;25:678-).
36. Livermore DM. 2001. Antibiotic resistance in staphylococci. *Inter. J Antimicrob. Agents.* 16:S3-S10
37. López-Sandoval, Ma G. Alonso-Trujillo, J. Pineda-Olvera, J. Paniagua-Contreras, G.L.2001. Contaminación por *Staphylococcus aureus* en la unidad de hemodiálisis, descripción de su resistencia a antibióticos. *Desarrollo Cientif Enfem.* 9.6: 163-167.
38. Lowy F.1998. *Staphylococcus aureus* Infections. *The New England Journal of Medicine.* 339: 520-532.
39. Lucas GM, Lechtzin N, Puryear DW *et al.*1998. Vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcomes. *Clin Infect Dis.* 26:1127-1133.
40. Maclean, I. 1939. M. & B. 693 and Pneumococci. *Lancet* 1:562-568.

41. Martin-Lopez, JV. Diez-Gil, Morales, M. Mendez-Alvarez, S. 2002. Detection of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates Harboring the *ica* Gene Cluster Needed for Biofilm Establishment. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol.40: 1569-1570.
42. Martin-Lopez, JV. Diez-Gil, O. Morales, M. Batista, N. Villar, J. 2004. Simultaneous PCR detection of *ica* cluster and methicilin and mupirocina resistance genes in catheter-isolated *Staphylococcus*. *International Microbiology* 7:63-66.
43. Mongodin, E. Bajolet, O. Cutrona, J. Bonnet, N. Dupuit, F. Puchelle, E. Benzmann, S. 2002. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infection and Immunity* 70:620-630.
44. Monroy, P.E. Paniagua-Contreras, G.L. Vaca, P.S. Gonzalez-Almazan, S.E. 2003. Comparación de la efectividad de antibioticos β -lactámicos en cepas de *Staphylococcus aureus*. *Rev Hosp Gral*. 6.1:7-12.
45. Murray, R.; Kilham, L.; Wilcox, C. & Finland, M. 1964. Development of streptomycin resistance of Gram-negative bacilli in vitro and during treatment. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med* 63:470-474.
46. Murray, R.P. 2002. *Microbiologia Medica*. 4ª edición. Elsevier. Madrid España. pp191-212.

47. Nashev, D., Toshkova, K., Isrina, S., Salasia, O., Hassan, A., Lämmle, C., Zschöck, M. 2004. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiology Letters*. 233:45-52.
48. Navarre, W. and Schneewind, O. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999; 63:174–229.
49. Nassar GM, Ayus JC. 2001. Infectious complications of the hemodialysis access. *Kidney Int.* 60:1-13.
50. Novick, R. P. 1993. A. L. Sonenshein, J.A. Hoch & R. Losick. *Staphylococcus, Bacillus subtilis y other Gram-positive bacteria*. Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, American Society for Microbiology, USA. Pp. 17-33.
51. Paniagua-Contreras Gloria Luz, Ma. Cristina Rodríguez-Zamora, Eric Monroy-Pérez, Hermila Hernández-Alvarez, y Sergio Vaca-Pacheco. Susceptibilidad *in vitro* a antibióticos por cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas de catéteres de pacientes de hemodiálisis. *Nefrol. Mex.* 2006;27(4):122-126.
52. Pastan S.D, Soucie M, McClellan, W.M. 2002. Vascular access and increased risk of death among hemodialysis patients. *Kidney Int.* 62:620-626.

53. Peacock, S., Day, N., Thomas, M., Berendt, A. and Foster, T. 2000. Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J. Infect.* 41:23–31
54. Pérez-Roth, E. Claverie-Martín, F. Villar, J. Méndez-Álvarez, S. 2001. *Journal of Clinical Microbiology.* 39.11: 4037-4041.
55. Poole CV, Carlton D, Bimbo L, Allon M. 2004. Treatment of catheter-related bacteraemia with and antibiotic lock protocol: effect of bacterial pathogen. *Nephrol Dial Transplant.* 19: 1237-1244.
56. Reddan D, Klassen P. Frankenfield DL. National profile of practice patterns for hemodialysis vascular access in the United States. *J AM Soc Nephrol.* 2002;13:2117-2124.
57. Roubicek C. Brunet P, Mallet MN, Dussol B, Gonzales A, Andrieu D, *et al.* 1995. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: prevalence in a hemodialysis center and effect on bacteremia. *Nephrologie.* 16(3): 229-232.
58. Schrier, W.R. 1989. *Manual de Nefrología. Diagnóstico y Tratamiento.* 2 Edición. Salvat Editores. Barcelona España. p351.
59. Sigvas A, Salazar N, *et al.*, Susceptibilidad del *Staphylococcus* en un servicio de medicina. *Boletín de la Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales-SPEIT.* 1997;6:41.

60. Sykes, R.B. & M.Mathew.1996. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2:115-157.
- 61.Taylor GD, McKenzie M, Buchanan-Chell M, Caballo L, Chui L, Kowalewska-Grochowska K. 1998. Central venous catheters as a source of hemodialysis-related bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol.*19:643-646.
- 62.Tanriover B. Carlton D, Saddekni S. Bacteremia associated with tunneled dialysis catheters: Comparison of two treatment strategies *Kidney Int.* 2000;57:2151-2155.
63. Toshkova, K., Annemüller, C. and Lämmler, C. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001:202, 17–24.
- 64.Tokars JJ, Miller ER. Alter MJ. Arduino MJ. National surveillance of dialysis-associated diseases in the United States,2001. *Sem. Dial.* 2004.17:310-319.
65. Von Eiff, C., C. Heilmann, and G. Peters. 1999. New aspects in the molecular of polymer-associated infections due to staphylococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18:843–846.

66. Wenzel RP, Nettleman MD, Jones RN Pfaller MA.1991. Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*: implications for the 1990's and effective control measures. Am J Med.91:suppl3B:221S-227.
- 67.Withworth, J.M.1990. Enfermedades Renales. Editorial El manual Moderno. 688pp.
68. Ziebuhr, W. Heilmann, C. Götz, F. Meyer, P. 1997. Detection of the intercellular Adhesion Gene Cluster (*ica*) and Phase Variation in *Staphylococcus epidermidis* Blood Culture Strains and Mucosal Isolates. Infection and Immunity.65:890-896.