

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**BÚSQUEDA DEL GEN VANA (LIGASA) EN MICROORGANISMOS RESISTENTES A
VANCOMICINA AISLADOS DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL PARA CONSUMO HUMANO**

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

PAOLA ROSALES TORRES

MÉXICO, D.F.

AÑO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis representa un parteaguas entre una etapa muy enriquecedora y el camino que el tiempo obliga. En toda la experiencia universitaria y la conclusión del trabajo de tesis, ha habido personas que merecen las gracias porque sin su valiosa aportación no hubiera sido posible este trabajo y también hay quienes las merecen por haber plasmado su huella en mi camino.

A mis padres, Luis Pedro Rosales y María del Carmen Torres, por su apoyo, amor y confianza en la realización de mis sueños. A mi abuelita y segunda madre, Dulce María Álvarez, por ser la luz que siempre alumbra mi camino y por su incondicional amor y complicidad. Esta tesis es suya.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por darme las bases para mi realización profesional.

A la maestra Raquel Ortega Muñoz por su asesoría técnica y al Profesor Luciano Hernández por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo.

Al Dr. Fernando Montiel Aguirre, por su incondicional apoyo, conocimiento y alegrías que me brindo, porque sin él, este trabajo jamás hubiese sido terminado.

Finalmente quiero dedicar de una manera muy especial la realización de esta tesis, en memoria de una mujer maravillosa, llena de un increíble conocimiento y una singular manera de ser, la maestra Biserka Sveshtarova (q.e.p.d), por su valioso apoyo, dedicación y por darme el honor de trabajar con ella.

ÍNDICE

Jurado asignado e información del sustentante	2
Agradecimientos	3
Índice	4
Resumen	6
Introducción	8
▪ Antecedentes Generales	8
▪ Antecedentes Particulares	15
Justificación del trabajo experimental	18
Hipótesis del trabajo experimental	19
Objetivos	20
▪ Objetivo General	20
▪ Objetivos Particulares	20
Material y Métodos	21
▪ Diagrama General de Trabajo	21
▪ Metodología	22
➤ Muestreo	22
➤ Pre – enriquecimiento	22
➤ Enriquecimiento	23

➤	Determinación de la morfología macroscópica y microscópica	23
➤	Tinción de Gram	24
➤	Caracterización de microorganismos	24
➤	Identificación con pruebas bioquímicas “Tiras API”	24
➤	Extracción de DNA total por el método del Nucleo Spin Food Kit	25
➤	Técnica de PCR	26
	Resultados y Discusión	27
▪	Identificación Bioquímica	29
	Conclusión	36
	Anexo I	37
	Anexo II	39
▪	Material y Equipo	39
	Anexo III	42
▪	Soluciones	42
▪	Preparación de medios	45
	Anexo IV	46
	Referencias	49

“Búsqueda del gen *vanA* (ligasa) en microorganismos resistentes a vancomicina aislados de alimentos de origen animal para consumo humano”

RESUMEN

Actualmente solo dos antibióticos del grupo de los glucopeptidos tienen uso clínico. Primero se obtuvo a la vancomicina que fue aislada en 1956 de un actinomiceto *Streptomyces orientales*, (actualmente *Amycolatopsis orientales*).

El otro componente del grupo es la teicoplanina (aislado en 1978) obtenido de *Actinoplanes teichomyceticus*. Ambos constituyen la única alternativa relativamente efectiva para el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus* metilicina-resistente, *Corynebacterium jeikeium* y cepas de *Streptococcus pneumoniae* con resistencia de alto nivel a betalactámicos.

Luego de un gran incremento en el uso de la vancomicina, se ha observado el desarrollo de resistencia en *Enterococcus* sp. e incluso en *S. aureus*. Esto hace necesario el desarrollo de nuevas drogas y el control en el uso de la vancomicina, para ser reservada para los casos en que es estrictamente necesaria.

Se sabe que la vancomicina es un antibiótico de espectro restringido fundamentalmente a bacterias Gram positivas. Actúa a nivel de la biosíntesis de la pared celular de bacterias en división, inhibiendo la síntesis del peptidoglicano en su segunda fase, un estadio previo al momento de acción de los betalactámicos.

Se han reconocido hasta el momento siete fenotipos de resistencia a la vancomicina, denominados de la siguiente manera:

vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanF, vanG.

Se describen a continuación los tres tipos principales de resistencia a vancomicina en *Enterococcus* sp.:

- **Resistencia de tipo vanA.** Es de alto nivel, inducible por glucopéptidos, plasmídica y transferible. Se observa especialmente en *Enterococcus faecium* y en menor medida en *E. faecalis*. Produce resistencia cruzada entre los 2 glucopéptidos.
- **Resistencia de tipo vanB.** Es de bajo nivel, inducible, cromosómica y no transferible. Suele implicar sólo resistencia a vancomicina. Se ha observado especialmente en *E. faecium* y menos en *E. faecalis*.
- **Resistencia de tipo vanC.** es de bajo nivel, cromosómica, no transferible y con poca repercusión clínica. Es sólo fenotípicamente resistente para vancomicina.

Este trabajo consiste en hacer un aislamiento de microorganismos que provengan de muestras de carne de cerdo y de carne de pollo para consumo humano, en medios selectivos que contengan una concentración mínima inhibitoria del antibiótico. Una vez aislados, se proceda a caracterizar a los que resulten resistentes (tinción de Gram y características bioquímicas mediante "tiras API").

Después, se extrae el DNA de los microorganismos seleccionados para investigar la presencia de una secuencia del gen **vanA** a través de la técnica de PCR, y así determinar si en estos microorganismos existe uno de los principales genes conocidos, involucrados en la resistencia al antibiótico.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES GENERALES

La vancomicina, es un glucopéptido de estructura compleja (figura 1). Su acción es bactericida ya que inhibe la síntesis de la pared celular de las bacterias, uniéndose con gran afinidad a los precursores de esta estructura. Su modo de acción es el impedir la actividad de las transpeptidasas por impedimento estérico (1).

Tiene gran efectividad sobre microorganismos Gram positivos, como por ejemplo *S.aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*; sin embargo, tiene poca efectividad sobre microorganismos Gram negativos, debido a que el tamaño de la pared celular de estos microorganismos es más gruesa gracias a su doble membrana lipídica, lo que le impide atravesarla (2).

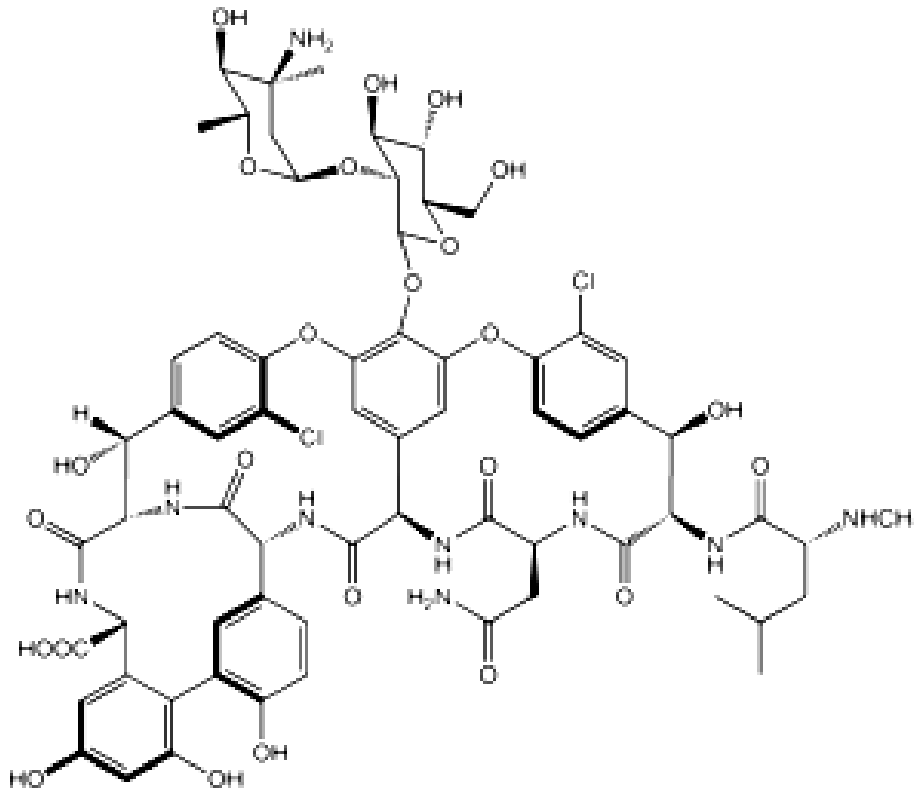


FIGURA 1: FÓRMULA DE LA VANCOMICINA (3)

A continuación se presenta una tabla con las propiedades físicas de la vancomicina:

TABLA I: PROPIEDADES FÍSICAS DE LA VANCOMICINA (4).

INFORMACIÓN GENERAL	
FÓRMULA GENERAL	C=66, H=75, Cl=2, N=9, O=24
PROPIEDADES FÍSICAS	
ESTADO DE AGREGACIÓN	LÍQUIDO
APARIENCIA	LÍQUIDO INCOLORO, O CRISTALES
DENSIDAD	1.049 Kg/m ³
MASA	1449.3 g/mol

La administración de la vancomicina debe ser por vía endovenosa ya que por vía oral no es bien absorbida, se distribuye de manera adecuada por casi todos los fluidos corporales y es excretada en un 90% por los riñones (5).

Cuando hay problemas en pacientes que padecen insuficiencia renal, debe tenerse mucha precaución porque podría acumularse en los riñones y alcanzar niveles tóxicos (6).

La nefrotoxicidad es poco frecuente si se administra en dosis adecuadas; sin embargo puede presentarse ototoxicidad (sordera) que en la mayoría de los casos desaparece cuando se suspende el uso del fármaco (7).

Debido a esta toxicidad y su gran potencia, es preferible limitar su uso a infecciones severas y resistentes a otros antibióticos, como es el caso de las infecciones por estafilococos resistentes a penicilina (8).

Su administración se asocia con frecuencia a una erupción intensa y pruriginosa, que modifica el color y la textura de la piel, que cesa al suspender la administración del fármaco y es conocida como el síndrome del cuello rojo o escaldado. La infusión rápida de la vancomicina puede causar apnea y bradicardia por lo que debe administrarse lentamente durante un periodo mayor a una hora (9).

La vancomicina ha estado disponible para uso clínico desde hace muchos años, pero pronto fue desplazada por otros antibióticos mucho más eficaces y menos tóxicos. La aparición de la resistencia al antibiótico meticiclina como es el caso de *S. aureus*, permitió que resurgiera el uso de la vancomicina (10),

En los años de la década de 1950 cuando existían pocas opciones para el tratamiento de infecciones por estafilococos resistentes a penicilina, la compañía de EC Kornfield con la participación de Eli Lilly inició un programa dirigido a descubrir antibióticos que tuvieran una actividad contra estos microorganismos patógenos (11, 12, 13).

En el año de 1952 un misionero en Borneo envió una muestra de tierra a su amigo, el Dr. C. Kornfield. De esta muestra pudo aislarse el microorganismo *Streptomyces orientalis* que produjo la sustancia conocida en ese entonces como “compuesto 05865”, el cual resultó tener actividad contra microorganismos Gram positivos incluyendo a los estafilococos resistentes a penicilina, así como algunos organismos anaerobios incluyendo *Clostridium sp.* (14, 15, 16).

En ese tiempo se habían iniciado los experimentos *in vitro* para determinar si la actividad del compuesto 05865 podía ser preservada a pesar de los intentos por inducir la resistencia. Después de muchos experimentos realizados se pudo sugerir que el compuesto 05865 era seguro y efectivo para uso en humanos (17, 18).

Antes de que las pruebas clínicas empezaran, el compuesto se apodaba “Lodo de Mississippi” debido a su color café, por lo que fue necesario purificarlo. Un cambio a partir de la precipitación del ácido pícrico al pasar sobre una resina de intercambio iónico, provocó una mejora que dio como resultado un antibiótico denominado “Vancomicina” (proveniente de la palabra “vencer”) que después fue puesto a disposición para pruebas clínicas (19, 20).

Como se sabe, la teicoplanina (figura 2) es un es un antibiótico usado en la profilaxis y tratamiento de infecciones serias causadas por bacterias Gram positivas. Es un antibiótico glucopeptídico con espectro de acción similar que la vancomicina. Según su mecanismo de acción es bactericida, por inhibir la síntesis del peptidoglucano necesario para la síntesis de la pared bacteriana. Presenta la misma potencia y eficacia que la vancomicina pero menor ototoxicidad que ésta (21, 22).

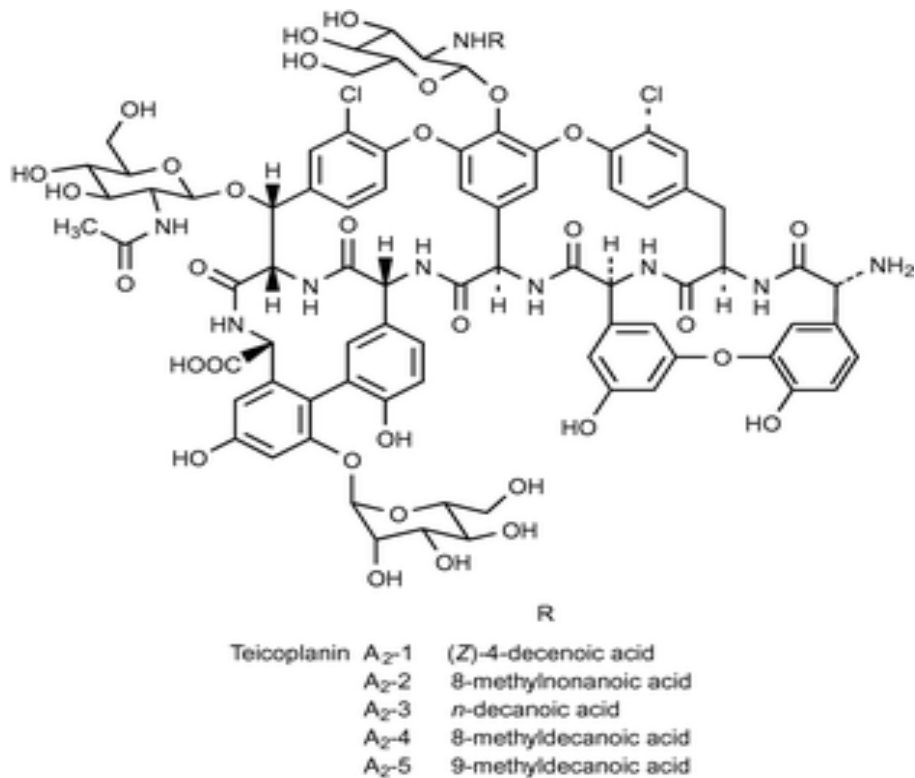


FIGURA 2: FÓRMULA DE LA TEICOPLANINA (3)

La teicoplanina, al igual que la vancomicina, se excreta por los riñones y una de sus principales ventajas contra la vancomicina es que tiene mayor penetración tisular, alcanza una buena concentración en riñón, pulmón, piel y huesos; aunque no alcanza niveles útiles en LCR (líquido ceforraquídeo). Y aunque los efectos adversos en la teicoplanina son más leves en comparación con la vancomicina, si causa neutropenia, trombocitopenia y aumento transitorio de transaminasas y fosfatasa alcalina (23).

Los enterococos a pesar de formar parte de la flora intestinal de los individuos sanos, son uno de los principales patógenos nosocomiales. La especie aislada con mayor frecuencia es *Enterococcus faecalis* (80 – 90%), seguida de lejos por *Enterococcus faecium* (5 – 10%) (24, 25).

Los enterococos son intrínsecamente resistentes a un gran número de antibióticos incluyendo β -lactámicos, lincosaminas, aminoglucósidos y, además, presentan una gran capacidad para adquirir nuevas resistencias (26).

La amplia diseminación de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina durante la década de los ochenta determinó la necesidad de incrementar el uso de la vancomicina y, coincidiendo con esta circunstancia, aparecen en 1986 las primeras cepas de enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) (27, 28).

El mecanismo de acción de los antibióticos glucopéptidos como la vancomicina y la teicoplanina se basa fundamentalmente en su unión al dipéptido terminal D-alanina-D-alanina del precursor del peptidoglucano, previniendo así que ocurra la transpeptidación. Existen diferentes fenotipos de resistencia a los glucopéptidos en *Enterococcus*, producidos por diferentes determinantes genéticos de resistencia, denominados vanA, vanB, vanC, vanD, vanE y vanG (29).

Los enterococos desarrollan resistencia a la vancomicina alterando sus precursores peptidoglucanos, a los cuales los antibióticos glucopéptidos ya no se pueden unir. De los fenotipos reconocidos para ERV, los fenotipos vanA y vanB son los más significativos desde el punto de vista clínico (30).

El fenotipo van A de resistencia a glucopéptidos se caracteriza por presentar resistencia inducible de alto nivel tanto a la vancomicina como a la teicoplanina. Genéticamente este fenotipo se debe a la presencia del transposón **Tn1546**, descrito por primera vez en *E. faecium*. El transposón Tn1546 se encuentra generalmente en plásmidos transferibles aunque, ocasionalmente, puede encontrarse en el cromosoma (31).

El mecanismo de resistencia a glucopéptidos es complejo, interviniendo en él siete genes diferentes localizados en el transposón Tn1546; vanA, vanR, vanS, vanH, vanX, vanY y vanZ (32). (figura 3)

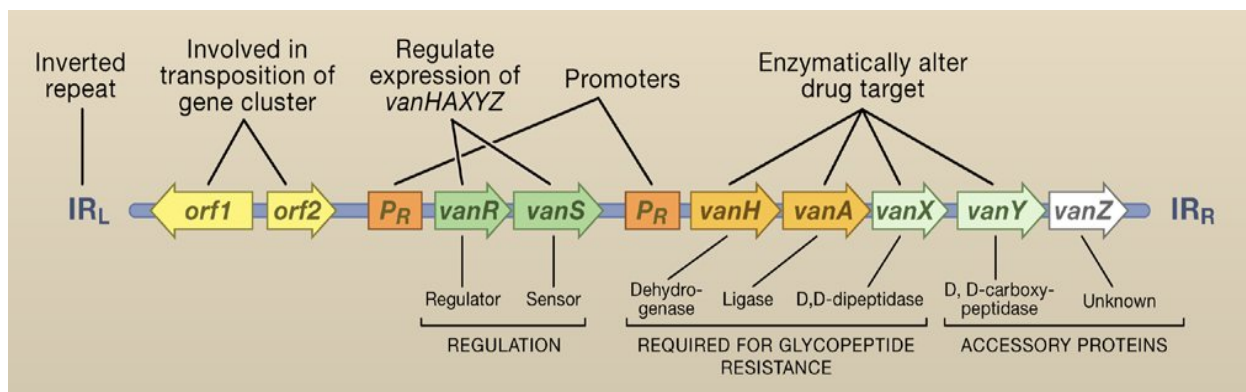


FIGURA 3: ELEMENTOS GENÉTICOS QUE INTERVIENEN EN EL MECANISMO DE RESISTENCIA A GLUCOPÉPTIDOS(33)

El gen principal para la resistencia es *vanA* (Anexo I, p.36), que codifica para una proteína que actúa como D-alanina-D-lactato ligasa. Este metabolito, que presenta baja afinidad por los glucopéptidos, sustituirá a la D-alanina-D-alanina (diana de los glucopéptidos) en el peptidoglucano (34).

Para que se produzca la resistencia a los glucopéptidos son necesarias, además, al menos dos proteínas adicionales: *vanH* y *vanX*. *vanH* es una deshidrogenasa necesaria para reducir el piruvato en D-Lactato, sustrato necesario para la actividad de *vanA*; *vanX* es una dipeptidasa que hidroliza el dipéptido D-alanina-D-alanina impidiendo, por tanto, su incorporación al peptidoglucano. *vanR* y *vanS*, por otro lado, constituyen un sistema regulador de dos componentes, que regula la expresión de *vanA*, *vanH*, y *vanX*. Tanto la vancomicina (figura 4), como la teicoplanina son capaces de activar este sistema de regulación induciendo la expresión del mecanismo de resistencia (35).

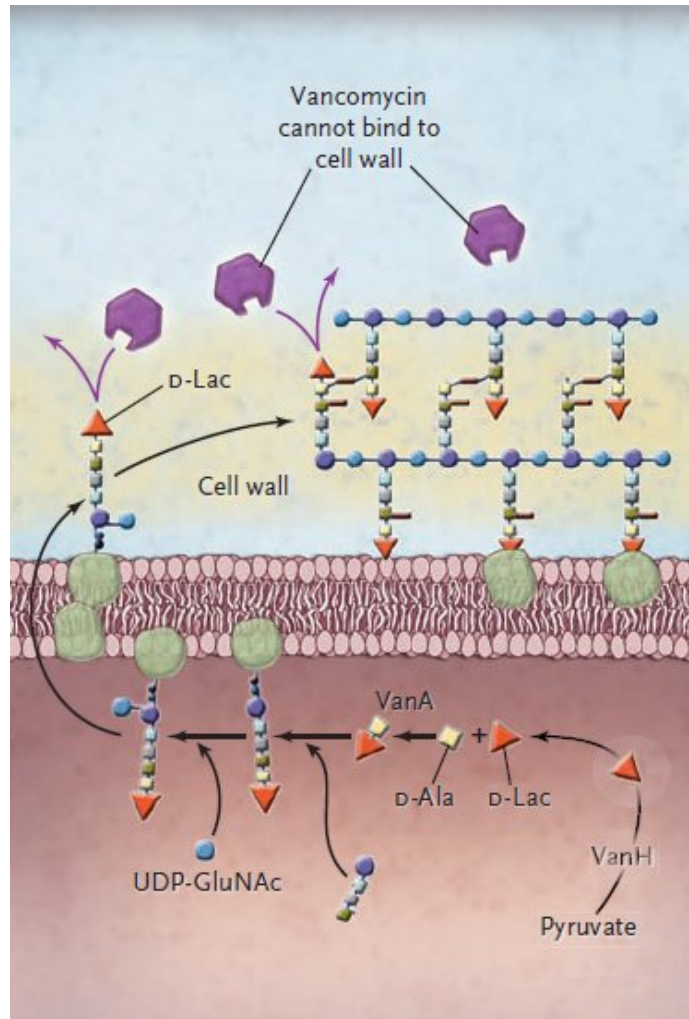


FIGURA 4: MECANISMO DE RESISTENCIA A VANCOMICINA (36)

Staphylococcus aureus es la principal especie patógena de su género, causa común de infecciones diversas, tanto de origen comunitario como hospitalario. Las cepas SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) se identificaron de forma casi inmediata tras la introducción de la meticilina en tratamientos terapéuticos. Los primeros brotes de infección nosocomial se describieron en hospitales europeos al inicio de los años sesenta. Desde entonces, su prevalencia ha ido aumentando en la mayoría de las áreas geográficas (37).

La variabilidad de *S. aureus*, la rápida respuesta adaptativa frente a cambios del medio, y su continua adquisición de determinantes de resistencia antibiótica, han hecho de éste un residente habitual del hábitat hospitalario, donde origina problemas de multiresistencia importantes (38).

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. A través de diversos mecanismos, estos aislados presentan resistencia al cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, lincosaminas, aminoglucósidos e, incluso, quinolonas, describiéndose cada vez con mayor frecuencia brotes SARM sensibles sólo a los glucopéptidos (39).

El género *Staphylococcus* se clasifica, junto con los géneros *Micrococcus*, *Stomatococcus* y *Planococcus* dentro de la familia *Micrococcaceae*, que incluye a los cocos Gram-positivos catalasa-positivos (40).

Se han descrito, al menos, tres mecanismos de resistencia de *S. aureus* a los β -lactámicos, en muchas ocasiones relacionados entre sí, como son: producción de β -lactamasas, fenómenos de tolerancia y resistencia por proteínas fijadoras de penicilina (PBP) modificadas o supernumerarias, conocida como resistencia intrínseca a meticilina (41).

La expresión fenotípica de la resistencia a la meticilina es compleja, diferenciándose inicialmente dos tipos de cepas, unas con resistencia homogénea, o de alto nivel, y otras con resistencia heterogénea, que representan la forma más habitual. En este caso, sólo una población minoritaria de células expresaría dicha cualidad. Además, resulta necesario, para una buena expresión de la resistencia, una serie de condiciones de cultivo adecuadas (pH neutro, medios hipertónicos, incubación prolongada a 35 °C etc.) (42).

Aunque la vancomicina o la teicoplanina siguen siendo el tratamiento de elección frente a una cepa SARM, en los últimos tiempos se ha descrito un fenómeno de disminución de sensibilidad de varias especies de estafilocos a estos antibióticos, incluyendo a *S. aureus*. La resistencia de *S. haemolyticus* a la vancomicina y/o teicoplanina ya fue descrita en 1987 y ocurre con cierta frecuencia. El plásmido que codifica la resistencia a vancomicina en el género *Enterococcus* ha sido transferido *in vitro* por conjugación a *S. aureus*, por lo que algunos trabajos recientes en los EEUU y Japón reportan el aislamiento de cepas de *S. aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina (43).

ANTECEDENTES PARTICULARES

En la actualidad se sabe que los antibióticos utilizados como promotores del crecimiento de animales, han contribuido a crear uno de los principales reservorios de bacterias resistentes a diversos antibióticos. Estos promotores son adicionados en el alimento para consumo animal y constituyen un problema serio en la salud pública debido a que tienen una potencial extensión a humanos, ya sea por el consumo de alimentos de origen animal o por contacto directo con animales; también porque hay extensión de bacterias resistentes a partir de los animales al medio ambiente (44).

Cuando ciertos glucopéptidos se utilizaron como promotores de crecimiento (por ejemplo, la avoparcina), comenzó también el uso de antibióticos de este tipo en la clínica (por ejemplo, la vancomicina), para el tratamiento de infecciones nosocomiales ocasionadas por bacterias multiresistentes. Sin embargo, posterior al uso de la vancomicina empezó la aparición de enterococos resistentes a la misma (45).

La resistencia a antibióticos puede ser de dos tipos, natural o adquirida. La resistencia intrínseca o natural significa que cada miembro de una especie bacteriana puede ser resistente a algún antibiótico sin ninguna alteración genética adicional, mientras que la adquirida evoluciona a través de alteraciones genéticas en el genoma propio de un microorganismo, o por la transferencia horizontal de genes de resistencia localizados sobre varios tipos de elementos móviles de DNA (46).

Hay un número diferente de elementos de DNA que explica la transferencia de resistencia a antibióticos, como por ejemplo, los plásmidos que pueden ser transmitidos por conjugación, profagos, transposones, integrones, etc. Los genes resistentes frecuentemente se encuentran en los plásmidos o integrados a un transposón, o están insertados en un integrón (47).

Los transposones son elementos genéticos móviles que codifican para la enzima transposasa con sitios específicos para inserciones y escisiones (48).

Las bacterias contienen un gran número de elementos transponibles que pueden categorizarse en cuatro de los principales grupos, de acuerdo a los mecanismos de transposición. Las categorías se describen a continuación:

Clase 1: Son secuencias de inserción las cuales usualmente requieren de una única proteína para que ocurra la transposición. Por ejemplo, el transposón TN10.

Clase 2: Consiste en la inserción de secuencias con pequeñas inversiones repetidas en las cuales la transposición ocurre por replicación y requiere de dos productos genéticos. Por ejemplo el transposón TN3.

Clase 3: Es un bacteriofago transponible.

Clase 4: Consiste en un transposón y un mecanismo de inserción variable, el cual no entra en ninguna de las otras tres clases (49).

Por otro lado, los integrones son otro tipo de elementos genéticos que consisten de una enzima integrasa con un sitio específico de acción (50).

Además, los integrones están compuestos por tres elementos esenciales: un gen que codifica para una enzima integrasa, un sitio de recombinación primario y un promotor. Son uno de los mecanismos más comunes por los cuales se obtienen genes de resistencia a antibióticos (51).

Si resumimos los elementos necesarios para que se dé la resistencia a antibióticos, se pueden incluir los siguientes escenarios:

1. Un plásmido o transposón que codifique para la resistencia a varios antibióticos diferentes (agrupaciones de genes).
2. Un gen que codifique para un mecanismo bioquímico que genere resistencias a varias familias de antibióticos.
3. Un gen de resistencia que codifique para resistencia a un grupo de antibióticos que estructuralmente no estén relacionados (52).

La vancomicina tiene actividad antibacterial por la ruptura de la D-Ala-D-Ala del precursor del peptidoglicano y evitar la incorporación del mismo dentro de la pared celular en crecimiento (53, 54).

De acuerdo a la información proporcionada por El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales en México, los enterococos resistentes a vancomicina causan mas del 21% de las infecciones enterocócicas nosocomiales que se dan en un año (55, 56).

Como se sabe, este incremento de enterococos resistentes a vancomicina está relacionado con animales de granja que fueron alimentados con avoparcina, por lo que en 1997 la Unión Europea prohibió el uso de avoparcina como promotor del crecimiento en animales (57, 58).

En el caso de las bacterias Gram positivas resistentes a glucopéptidos, preocupan especialmente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (59, 60). Por lo que en 1999, la oficina de Alimentos y Medicamentos (FDA de EEUU) aprobó el uso del antibiótico quinupristina – dalfopristina, que es una combinación sinérgica de dos antibióticos estreptogramínicos para uso intravenoso en personas infectadas con enterococos resistentes a vancomicina, principalmente *E. faecium* (61).

Otro antibiótico utilizado es la daptomicina, el cual es activo en bacterias Gram positivas, aerobias y anaerobias que son multiresistentes a antibióticos (62, 63).

La vancomicina, la teicoplanina y el linezolid, tienen un espectro semejante al de la daptomicina, ya que ésta es de amplio espectro, con efecto bacteriostático y con efectos adversos moderados (siendo mayor para la vancomicina por su posible neurotoxicidad) (64).

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Debido a la preocupación tan grande que existe actualmente por el incremento de microorganismos resistentes a antibióticos, y sabiendo que el uso de la vancomicina ha sido reservado para casos muy particulares, se decidió utilizar a la vancomicina para investigar la posible resistencia a este antibiótico en bacterias aisladas a partir de alimentos para consumo humano (carne molida de cerdo y carne molida de pollo).

Se sabe también que actualmente se han reconocido siete fenotipos de resistencia a vancomicina, y que el fenotipo vanA es uno de los tres más frecuentes en dicha resistencia, por lo que se intentó detectar la posible presencia del “**gen vanA (ligasa)**” que además genera una secuencia nucleotídica más larga mediante la técnica de PCR, en comparación con los tipos van B o van C.

HIPÓTESIS

“El cultivo de microorganismos provenientes de muestras de alimentos para consumo humano (carne molida de cerdo y carne molida de pollo) en un medio selectivo que contenga al antibiótico vancomicina, permitirá seleccionar a microorganismos resistentes a este antibiótico y detectar la posible presencia del “**gen vanA (ligasa)**”, que es uno de los genes involucrados en la transmisión de resistencia.”

OBJETIVO GENERAL

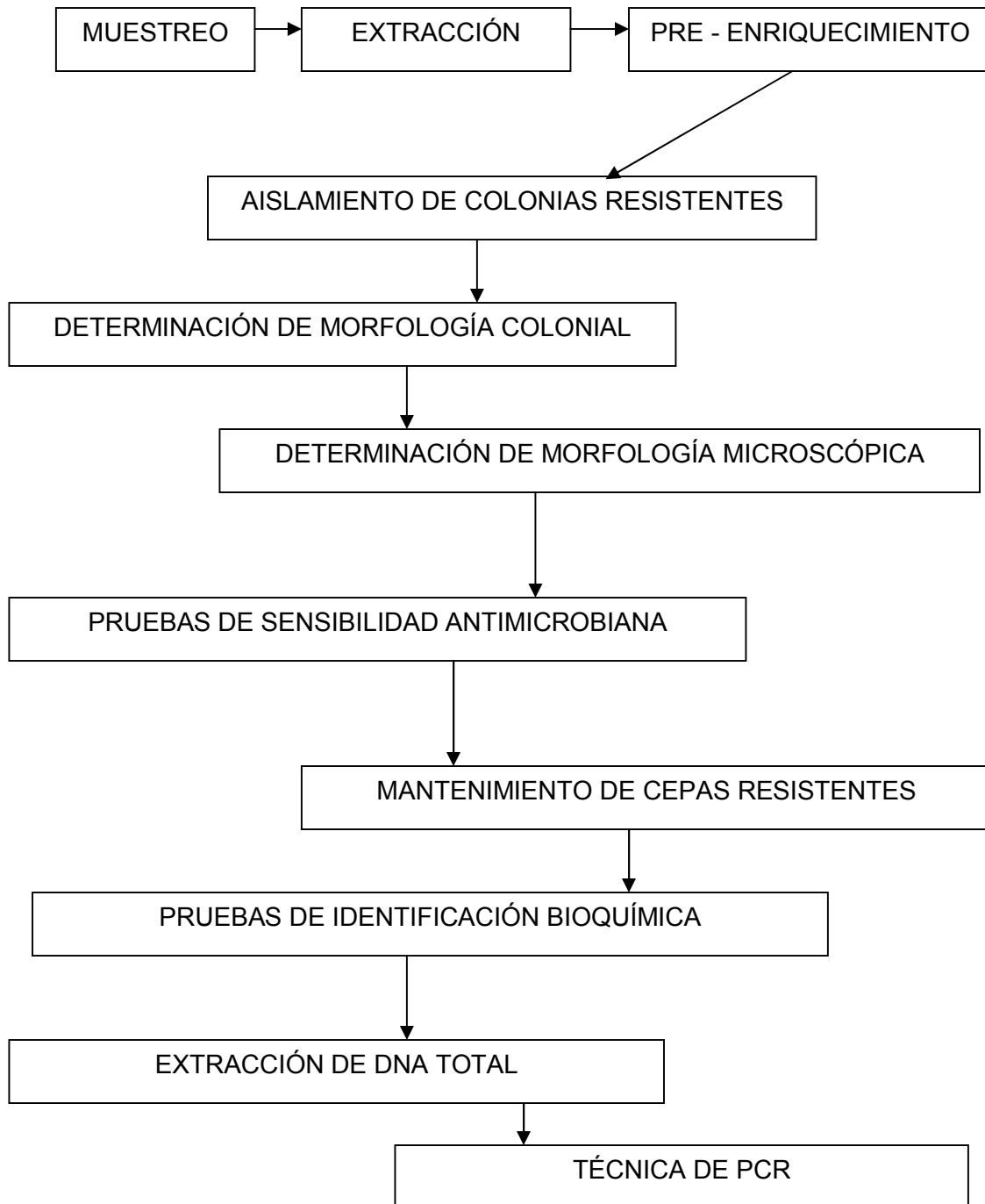
Aislar microorganismos que provengan de muestras de alimentos de origen animal para consumo humano, que tengan la característica de ser resistentes al antibiótico vancomicina.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar a los microorganismos aislados resistentes a vancomicina mediante pruebas bioquímicas.
2. Obtener DNA total a partir de las cepas puras aisladas.
3. Identificar, mediante la técnica de PCR, la presencia del “**gen vanA (ligasa)**”, que es uno de los genes que confieren a los microorganismos, la resistencia al antibiótico vancomicina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diagrama General de Trabajo



Metodología

Muestreo

Se recolectaron muestras frescas de carne molida de pollo y carne molida de cerdo adquiridas en tiendas de una cadena de supermercados, en venta al menudeo.

Las muestras fueron tomadas con guantes y colocadas en bolsas de plástico Ziploc con su etiqueta correspondiente.

Se transportaron en una hielera a temperatura de 4°C hasta su posterior uso (2 horas después).

Pre – enriquecimiento

En condiciones asépticas, se realizaron cortes de cada una de las muestras en trozos pequeños con bisturí estéril; se pesaron 10 gramos de carne molida de pollo y de carne molida de cerdo respectivamente.

En bolsas estériles para stomacher se colocaron 90 mililitros de agua peptonada, enseguida se adicionaron a cada bolsa 10 gramos de carne previamente pesados.

Posteriormente se colocaron las bolsas dentro del stomacher y se homogeneizaron durante 3 pulsos de 30 segundos.

El homogenizado se transfirió a un matraz estéril de 250 mililitros y se incubó a 37°C en agitación constante durante 24 horas, para favorecer el crecimiento de las bacterias que pudieran estar estresadas por la baja temperatura y por la manipulación de la muestra.

Enriquecimiento

De cada una de las muestras diferentes, se tomó un mililitro del homogenizado anterior y se inocularon en tubos que contenían 9 mililitros de caldo cerebro corazón, se incubaron a 37°C durante 24 horas para obtener una mayor cantidad de microorganismos para nuestro estudio.

Al término del tiempo, se realizaron diluciones del cultivo anterior con agua peptonada al 0.1% (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000) de cada una éstas se tomó un mililitro y se colocó en medio selectivo de BHI adicionado con vancomicina (30 µg/mL), por la técnica de extendido en placa. Se incubaron a 37°C por 24 - 48 horas.

Después de la incubación se tomaron muestras de las colonias aisladas para realizar prueba de pureza (tinción de Gram).

Una vez verificada la pureza de la colonia, se tomó el resto y se inoculó en tubos con caldo BHI adicionado con vancomicina (30µg/mL) y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

De cada una de las muestras, se realizaron stocks y se congelaron con medio selectivo (BHI adicionado con vancomicina) para su preservación.

En el refrigerador se conservaron las cepas aisladas para las siguientes pruebas.

Determinación de la morfología macroscópica y microscópica

Morfología Macroscópica

Se observaron las cajas para ver el crecimiento y determinar la morfología colonial (borde, color, tamaño, etc.), para poder tomar 50 colonias diferentes de cada una de las muestras.

Morfología Microscópica

Se realizó una tinción diferencial de GRAM para saber si se tenían cocos o bacilos, positivos o negativos.

Tinción de Gram

Se toma una colonia aislada del medio y se hace un frotis sobre el porta objeto, se pasa ligeramente por la flama para fijar.

Se añade unas gotas de cristal violeta sobre el frotis, se deja actuar durante 1 minuto y se lava con agua.

Se añade lugol, se deja actuar durante 1 minuto y se lava con una solución de alcohol – acetona.

Finalmente se añade safranina, se deja actuar 30 segundos y se lava con agua.

Se deja secar, y se observa al microscopio 1000X.

Caracterización de microorganismos

Identificación con Pruebas Bioquímicas

Tira API (Anexo IV)

De los tubos de caldo selectivo que contienen los microorganismos resistentes a vancomicina aislados, se toma una muestra de 5 mL y se centrifugan a 10,000 rpm. durante 5 minutos.

Se elimina el sobrenadante, y el precipitado se resuspende en 10 mL de solución salina estéril.

La cámara para tiras se abre, y se adiciona agua estéril, de tal manera que se llenen los pocillos vacíos con agua, para mantener la humedad.

De la muestra de microorganismos se toman 10 µL para cada una de las pruebas.

Para algunas pruebas se requiere adicionar aceite mineral, hasta llenar por completo el pocillo.

Posteriormente se coloca la tira dentro de la cámara húmeda y se incuba a 37°C durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, se revela cada una de las pruebas con los reactivos para cada tipo de ensayo.

- Para el caso de la muestra proveniente de carne molida de cerdo (muestra C10) que fue el único coco obtenido, se le realizó adicionalmente la prueba de la catalasa que consistió en lo siguiente:
 - En un tubo de ensayo limpio y estéril, se agregan 500 µL del cultivo puro, y después se añaden unas gotas de agua oxigenada al 3% y se observa si hay formación de burbujas, en cuyo caso la prueba se considera positiva. (Se sabe que esta prueba es positiva para el género *Staphylococcus sp.* y negativa para el género *Streptococcus sp.*)

Extracción de DNA total por el método del “Nucleo Spin Food Kit”

1. Adicionar 800 µL de muestra en un tubo de microcentrifuga de 2 mL, agregar 550 µL de buffer CF, y añadir 10 µL de proteinasa K.
2. Incubar a 65°C por 30 min.
3. Centrifugar en una microcentrifuga a velocidad máxima por 10 minutos a temperatura ambiente, y transferir 300 µL de sobrenadante a un tubo nuevo.
4. Adicionar 300 µL de buffer C4 y 200 µL de etanol, mezclar en vórtex por 30 segundos.
5. Colocar una columna núcleo spin en un tubo colector de 2 mL, agregar a la columna el contenido del tubo anterior, y centrifugar a 11000 rpm por un minuto a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
6. Adicionar 400 µL de buffer CQW a la columna, centrifugar a 11000 rpm por un minuto a temperatura ambiente. Descartar sobrenadante.

7. Adicionar 700 μL de buffer C5 a la columna, centrifugar a 11000 rpm por 2 minutos. Descartar sobrenadante.
8. Adicionar 200 μL de buffer C5 a la columna, centrifugar a 11000 rpm por 2 minutos. Descartar sobrenadante.
9. Colocar la columna en tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, y eluir el DNA con 100 μL de buffer CE (calentado a 70°C), e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
10. Centrifugar a 11000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. El sobrenadante usarlo para PCR.
11. Revelar el DNA obtenido por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (1 g de agar/ 100 mL de buffer de corrida) utilizar como marcador de peso molecular DNA λ (cortado con HinDIII y EcoRI). Teñir el gel en solución de bromuro de etidio (concentrado), visualizado con luz UV.

Técnica de PCR

Se adicionan 500 ng de DNA a un volumen final de 50 μL de mezcla de PCR [20mM Tris (pH 8.3), 1.5mM MgCl_2 , 2.5mM KCl, 50 μM trifosfato desoxiribonucleosido, 2 μL de cada par de primer, 1 μL de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen)]. Se incluye un control negativo sin DNA.

La amplificación de DNA se lleva a cabo en un termociclador con el siguiente ciclo térmico: desnaturalización de 3 min a 94°C, seguida por 40 ciclos de 30 s a 94°C, 120 s a 62°C, 120 s a 72°C, 6 min a 72°C. La mezcla se guarda a 4°C. Los productos de PCR se revelarán por electroforesis en un gel de agarosa 1% (1 g de agar/ 100 mL de buffer de corrida) utilizando como marcador de peso molecular DNA λ (cortado con HinDIII y EcoRI). El gel se tiñe en solución de bromuro de etidio (concentrado), visualizado con luz UV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A las muestras aisladas a partir de la carne molida de cerdo y de la carne molida de pollo, se les hicieron una prueba de pureza antes de poder utilizarlas para la extracción del DNA.

A continuación se observan los resultados de la tinción de Gram, de algunas de las cepas aisladas resistentes al antibiótico vancomicina, de las que se obtuvieron colonias puras.

TABLA I: TINCIÓN DE GRAM DE LAS 10 MUESTRAS SELECCIONADAS DEL AISLADO A PARTIR DE CARNE MOLIDA DE CERDO.

# MUESTRA	TIPO MUESTRA	FORMA	TAMAÑO	GRAM
1	Cerdo	Bacilo	Pequeño	Positivo
2	Cerdo	Bacilo	Pequeño	Positivo
3	Cerdo	Bacilo	Pequeño	Positivo
4	Cerdo	Bacilo	Pequeño	Positivo
5	Cerdo	Bacilo	Pequeño	Positivo
6	Cerdo	Bacilo	Mediano	Positivo
7	Cerdo	Bacilo	Mediano	Positivo
8	Cerdo	Bacilo	Largo	Positivo
9	Cerdo	Bacilo	Pequeño	Positivo
10	Cerdo	Diplococo	Pequeño	Positivo

TABLA II: TINCIÓN DE GRAM DE LAS 10 MUESTRAS SELECCIONADAS DEL AISLADO A PARTIR DE CARNE MOLIDA DE POLLO.

1	Pollo	Bacilo	Mediano	Positivo
2	Pollo	Bacilo	Pequeño	Positivo
3	Pollo	Bacilo	Pequeño	Positivo
4	Pollo	Bacilo	Pequeño	Positivo
5	Pollo	Bacilo	Mediano	Positivo
6	Pollo	Bacilo	Mediano	Positivo
7	Pollo	Bacilo	Pequeño	Positivo
8	Pollo	Bacilo	Mediano	Positivo
9	Pollo	Bacilo	Mediano	Positivo
10	Pollo	Bacilo	Mediano	Positivo

Las muestras resaltadas en negro, se utilizaron para la etapa de extracción de DNA y amplificación de la secuencia nucleotídica con la técnica de PCR.

También se observó que para el caso de las muestras de carne de cerdo, casi todas las colonias resultaron ser bacilos Gram (+) por lo que para la extracción de DNA se eligieron un bacilo Gram (+) y un coco Gram (+) que fue el único que se obtuvo.

Para el caso de las muestras de carne de pollo, todas las muestras obtenidas resultaron ser bacilos Gram (+) por lo que la selección de la muestra para la extracción de DNA fue la que presentó mejor crecimiento y se decidió utilizar solo una muestra.

En este análisis de Gram se puede observar que en el caso de los dos tipos de carne que se utilizaron, la mayoría de las colonias que son resistentes a vancomicina tienen la particularidad de ser bacilos Gram (+), ya que solo se obtuvo un coco gram (+). Esto resultó fuera de lo esperado ya que sabemos que los *Enterococcus sp.* son el género de microorganismos que comúnmente se encuentra y que son resistentes a vancomicina.

Para estas tres muestras se hizo un análisis morfológico de las colonias, y a continuación se presentan los resultados obtenidos.

TABLA III: ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS MUESTRAS REPRESENTATIVAS

MUESTRA	FORMA	BORDE	ELEVACION	TEXTURA	COLOR
C8	Circular puntiforme	Entero	Convexa	Butirosa	Blanco cremoso
C10	Circular puntiforme	Ondulado	Elevada	Butirosa	Blanco cremoso
P3	Circular	Entero	Elevada	Butirosa	Blanco cremoso

A las muestras se les asignó una clave para poder diferenciarlos, la letra "C" es para las muestras que proceden de la carne de cerdo, y la letra "P" para la muestra que procede de la carne de pollo; el número asignado corresponde al número de muestra de la que provenía antes de hacer la selección para la extracción de DNA, y esta clave continúa para las siguientes pruebas que se les hicieron.

Como se puede observar en la tabla III a pesar de que las muestras no son las mismas, los resultados morfológicos de sus colonias arrojaron muchas similitudes, lo que nos permitió sentir que exceptuando la muestra "C10" que es un diplococo, las otras dos muestras que son bacilos gram (+) podrían ser del mismo género. Esto se confirmó con las pruebas bioquímicas que se hicieron posteriormente a la tinción de Gram.

Identificación Bioquímica

Después de hacer el análisis de las colonias con la tinción de Gram, se procedió con un análisis bioquímico de las tres cepas para poder realizar una identificación de las mismas, para lo que se utilizaron tiras "API" (Anexo IV).

La identificación se consideró presuntiva debido a que los resultados que arrojaron las pruebas no fueron 100% precisas, al existir cierta discrepancia entre los resultados obtenidos y los que se esperaban.

Por lo que se obtuvo un porcentaje de confiabilidad en las tres tiras, de aproximadamente 70%.

En la siguiente figura podemos apreciar las tres tiras “API” con los resultados obtenidos para las tres cepas.



FIGURA I: PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN MEDIANTE TIRAS “API”

Los resultados obtenidos de todas las pruebas bioquímicas realizadas se agruparon en una tabla (Anexo IV), la cual nos arrojó de manera presuntiva el género de las cepas evaluadas.

En el caso particular de la cepa C10, en la prueba adicional de la catalasa, el resultado fue positivo ya que se pudo observar claramente la formación de burbujas en el tubo de ensayo, lo que nos permitió descartar la posibilidad de que el género de la cepa fuera presuntivamente *Streptococcus* sp.

Ahora, como se puede observar en la tabla de resultados, se confirmó que las dos cepas (P3 y C8) resultaron pertenecer al mismo género, el cual fue "*Corynebacterium sp.*"; mientras que la cepa C10 resultó ser del género "*Staphylococcus sp.*".

Este último resultado no fue tan sorprendente, debido a que recientemente se han encontrado cepas de *Staphylococcus sp.* resistentes a vancomicina, por lo que pudimos corroborar que efectivamente se encuentran cepas de este género con resistencia al antibiótico.

Una vez que se concluyó la identificación y pureza de las cepas, se procedió con la extracción del DNA total.

Esta extracción no se hizo con la técnica frecuentemente utilizada, ya que se tuvo acceso a un Kit especial para la extracción de DNA procedente de bacterias cultivadas a partir de muestras de alimento; la cual no solo simplifica el tiempo de extracción, si no que los resultados obtenidos son usualmente mas confiables, además de que el DNA extraído está más purificado.

Una vez obtenido el extracto, se procedió a analizar dicho DNA en un gel de agarosa, y se reveló con un transiluminador de UV.

A continuación se muestran dos figuras de los geles de agarosa revelados, en las cuales se puede apreciar claramente la banda de los fragmentos correspondientes al DNA genómico que se obtuvo en las cepas C10 y P3.



FIGURA II: BANDA DE LOS FRAGMENTOS DE DNA GENÓMICO OBTENIDO DE LA CEPA "C10".

Como se puede observar en la figura II, el fragmento obtenido para la cepa C10 es de alto peso molecular y muy poco fragmentado, incluso es mayor que el fragmento mas alto presente en el marcador de pesos moleculares (DNA del fago λ cortado con la enzima HindIII y EcoRI), por lo que se considera que el DNA que se obtuvo de esta cepa es de muy alto peso molecular.

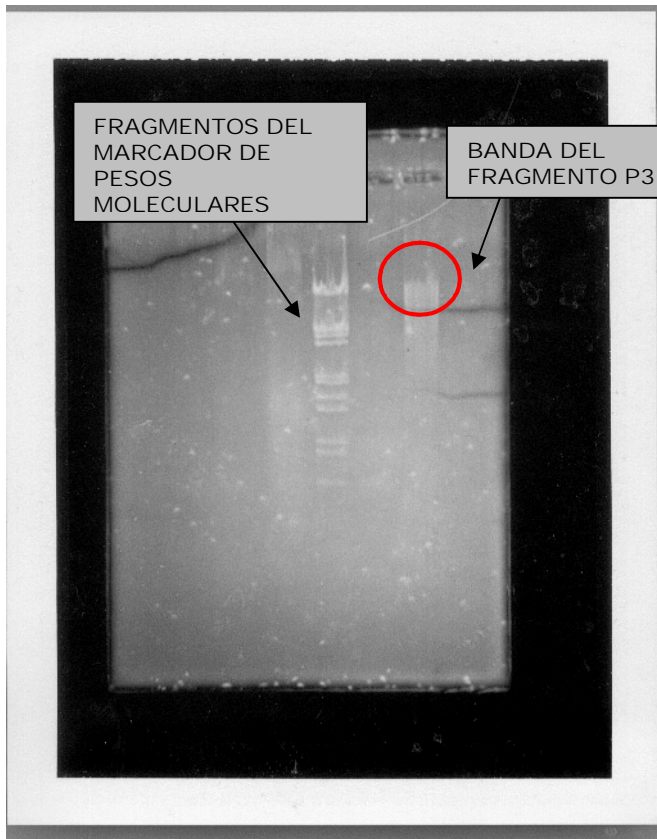


FIGURA III: BANDA DE LOS FRAGMENTOS DE DNA GENÓMICO OBTENIDO DE LA CEPA “P3”.

La banda obtenida para la cepa P3 parece ser ligeramente de menor peso molecular en comparación a la cepa C10. La banda que se obtuvo para la cepa C8 fue muy similar a la cepa proveniente de la muestra de carne de pollo.

Ya que se obtuvo la muestra de DNA proveniente de las tres cepas, y se confirmó a través de los geles que está presente el DNA genómico y a una concentración adecuada, entonces se procedió con la técnica de PCR, para amplificar y corroborar la presencia del gen *vanA* en estos microorganismos resistentes a vancomicina.

Como ya se mencionó, los primers para este gen amplifican una secuencia nucleotídica mas larga en comparación con los primers para los otros genes involucrados en la resistencia a vancomicina (Anexo I, p.36).

Sin embargo, sólo una de las cepas resultó positiva para este gen, la cual fue la cepa C10 proveniente de la carne de cerdo, y la cual presuntamente es del género *Staphylococcus sp.*

En la siguiente figura se puede apreciar la banda del material amplificado que se obtuvo al correr la muestra de PCR obtenido de la cepa C10 en un gel de agarosa después de ser visualizado con luz UV.

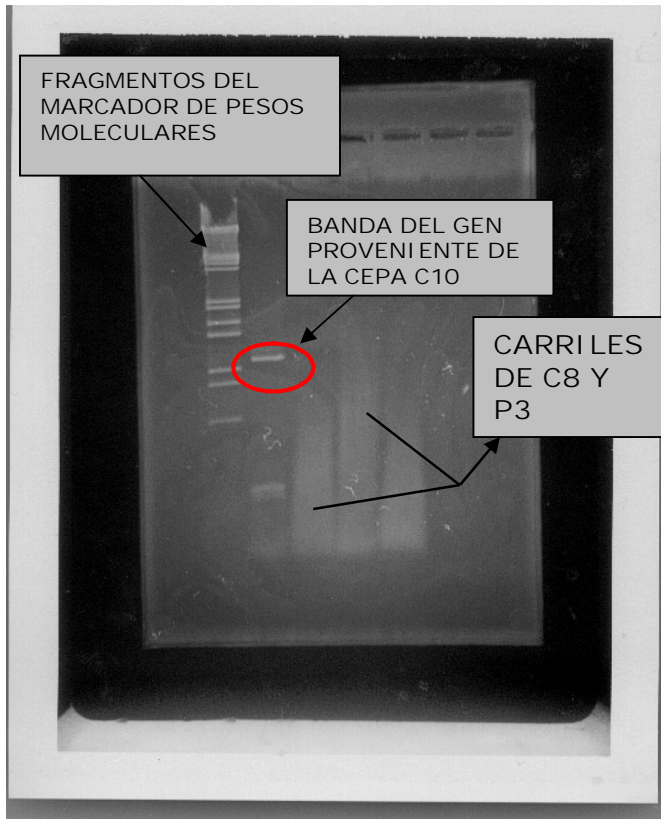


FIGURA IV: BANDA DEL GEN AMPLIFICADO CON LA TÉCNICA DE PCR OBTENIDO DE LA CEPA "C10", Y LAS CEPAS "C8" Y "P3" (QUE NO AMPLIFICARON).

En la figura IV, se aprecia claramente la banda amplificada del gen proveniente de la cepa C10 (presuntamente *Staphylococcus sp.*) de aproximadamente 1010 nucleótidos de longitud, la cual nos indica que la cepa presenta en su secuencia nucleotídica el gen *vanA* que le otorga a dichas bacterias la característica de ser resistente a vancomicina.

Sin embargo, para las cepas P3 y C8 siendo ambas presuntamente *Corynebacterium sp.* no hubo amplificación del gen *vanA*, por lo tanto esto nos indica que este gen en específico no les otorga a dichas cepas la característica de ser resistente a vancomicina. Sin embargo, esto indica que necesariamente algún otro gen involucrado en la resistencia a este antibiótico es el que les otorga la característica.

Se ha demostrado en otros trabajos experimentales (65) que el género *Corynebacterium sp* presenta resistencia al antibiótico vancomicina, sin embargo no se han descubierto aún los genes involucrados en dicha resistencia; lo que sí se sabe, es que tienen genes de resistencia a vancomicina diferentes a los que presentan el género *Enterococcus sp.* Es por eso que los primers que se utilizan para DNA de enterococos no los reconocen.

Finalmente, se puede decir que a través del experimento se consiguió obtener cepas resistentes al antibiótico de interés provenientes de muestras de alimento de origen animal utilizadas para consumo humano y, además, se logró encontrar el gen *vanA* en una de las tres cepas que se analizaron; siendo este gen uno de los mas importantes y frecuentemente encontrado en la problemática actual de resistencia al antibiótico vancomicina.

CONCLUSIÓN

Se encontró la existencia de microorganismos resistentes al antibiótico vancomicina en muestras aisladas a partir de alimentos de origen animal para consumo humano. Se encontró, además, que uno de los tres microorganismos seleccionados contenía en su secuencia genética al gen *vanA*, el cual le proporcionó la característica de resistencia.

De los microorganismos seleccionados se encontraron dos géneros diferentes, los cuales fueron *Corynebacterium sp.* y *Staphylococcus sp.*, microorganismos que presentan actualmente una notoria resistencia a vancomicina.

Es preocupante que esta situación sigue en aumento, y que cada día se acortan más las alternativas de uso de antibióticos en presencia de infecciones graves, además, las dinámicas de la resistencia microbiana a los antibióticos son complicadas e incluyen la interacción entre los patrones del uso de los antibióticos, aislamientos, organismos específicos y mecanismos de resistencia.

Un mejor entendimiento de los mecanismos de resistencia a vancomicina, el uso de un antibiótico apropiado, una estricta adherencia a las medidas de control de infecciones, la vigilancia de la emergencia de cepas resistentes y la identificación de nuevos agentes antimicrobianos para estas infecciones son algunos de los pasos que se deben de cuidar para controlar la amenaza de resistencia a la vancomicina.

ANEXO I

A continuación se presenta la secuencia completa del gen vanA y en ella se indica donde empieza dicho gen (codón de iniciación) y donde termina (codón de terminación), además, están subrayados los nucleótidos a donde hibridan los primers (vanA y vanA1) para amplificar un fragmento aproximado de 1029 pares de bases, muy cercano al fragmento que se obtuvo de 1010 pares de bases.

```
1 gatatcgta cgcttcatgt gccgctcaat acggatacgc actatattat cagccacgaa
61 caaatacaga gaatgaagca aggagcattt cttatcaata ctgggocgcg tccacttgta
121 gatacctatg agttgggtta agcattagaa aacgggaaac tgggocggtgc cgcattggat
181 gtattggaag gagaggaaga gttttctac tctgattgca ccaaaaaacc aattgataat
241 caatthttac ttaaacttca aagaatgcct aacgtgataa tcacaccgca tacggcctat
301 tataccgagc aagcgttgcg tgataccgtt gaaaaaacca taaaaaactg tttggatttt
361 gaaaggagac aggagcatga atagaataaa agttgcaata ctgtttggg gttgctcaga
421 ggagcatgac gtatcggtaa aatctgcaat agagatagcc gtaacatta ataaagaaaa
481 atacgagccg ttatacattg gaattacgaa atctggtgta tggaaaatgt gcgaaaaacc
541 ttgocgaggaa tgggaaaacg acaattgcta ttcagctgta ctctcggcg ataaaaaat
601 gcacggatta cttgttaaaa agaaccatga atatgaaatc aaccatgttg atgtagcatt
661 ttcagctttg catggcaagt cagggaaga tggatccata caaggctctgt ttgaattgct
721 cggatccct tttgtaggct gcgatattca aagctcagca attgtatgg acaaatcgtt
781 gacatacatc gttgcaaaaa atgctgggat agctactccc gccttttggg ttattaataa
841 agatgatagg ccggtggcag ctacgtttac ctatcctgtt tttgtaagc cggcgcgttc
901 aggctcatcc ttcggtgtga aaaaagtcaa tagcgcggac gaattggact acgcaattga
961 atcggcaaga caatatgaca gcaaaatctt aattgagcag gctgtttcgg gctgtgaggt
1021 cggttgtgcg gtattgggaa acagtgccgc gttagttgtt ggcgaggtgg accaaatcag
1081 gctgcagtac ggaatctttc gtattcatca ggaagtcgag ccggaaaaag gctctgaaaa
```

1141 cgcagttata accgttcccg cagaccttc agcagaggag cgaggacgga tacaggaaac
1201 ggcaaaaaaaaa atatataaag cgctcggctg tagaggctca gcccgtgtgg atatgtttt
1261 acaagataac ggccgcattg tactgaacga agtcaatact ctgcccgggt tcacgtcata
1321 cagtcgttat ccccgatga tggccgctgc aggtattgca cttcccgaac tgattgaccg
1381 cttgatcgtat ttagcgtaa **agggg***tgata* agcatggaaa taggatttac tttttagat
1441 gaaatagtac acggtgttcg ttgggacgct aaatatgcca cttgggataa tttcaccgga
1501 aaaccgggtg acggttatga agtaaatcgc attgtaggga catacgagtt ggctgaatcg
1561 cttttgaagg caaaagaact ggctgctacc caagggtacg gattgcttct atgggacggt
1621 taccgtccta agcgtgctgt aaactgttt atgcaatggg ctgcacagcc ggaaaataac
1681 ctgacaaagg aaagtatta tccaatatt gaccgaactg agatgattc aaaaggatac
1741gtggcttcaa aatcaagcca tagccgcg

- Los nucleótidos resaltados en negro y escritos en cursiva representan el inicio y terminación del gen vanA.
- Los nucleótidos subrayados representan a los primers vanA y vanA1 para PCR.

ANEXO II

Material y Equipo

1. Balanza analítica. (Sartorius BP 310P)
2. Espátulas.
3. Matraces erlenmeyer de diferentes capacidades.
4. Probetas de diferentes capacidades.
5. Vasos de precipitado de diferentes capacidades.
6. Pipetas de diferentes capacidades.
7. Propipetas.
8. Micropipetas de diferentes capacidades.
9. Puntas estériles.
10. Tubos de ensayo de 13 * 100
11. Cajas Petri estériles.

12. Mecheros Fisher.
13. Tripiés.
14. Telas de asbesto.
15. Filtros de membrana.
16. Asas bacteriológicas.
17. Tubos de microcentrifuga.
18. Portaobjetos.
19. Tiras API. (Biomérieux 214119)
20. Stomacher. (Homogenizador stomacher 80 Micro – Biomaster)
21. Vortex (Novamix 16700)
22. Autoclave.
23. Incubadora. (Thermolyne 41900)
24. Microscopio. (Zeiss Western Germany 2004J29037)

25. Baño eléctrico.

26. Estufas eléctricas. (Nuova II stirnate, Thermolyne SP 18425)

27. Cámara de electroforesis.

28. Transiluminador de Luz UV.

29. Termociclador (PCR). (Perkin Elmer Gene Amp PCR system 2400)

ANEXO III

Soluciones

1. Peptona. (Bioxon 0054R84)
2. Agua destilada, Agua desionizada, Agua estéril.
3. Medio BHI. (BD Bioxon 211200)
4. Antibiótico Vancomicina. (Sigma – Aldrich)
5. Cristal violeta.
6. Lugol.
7. Safranina.
8. Alcohol – Acetona. (JT Baker)
9. Alcohol puro, Alcohol 96°.
10. Solución salina.
11. Aceite mineral.

12. Buffer de corrida (10x):
Fosfato de sodio (pH = 7) 100 mM
EDTA 10 mM

13. Buffer de carga:
Sacarosa 37%
EDTA 50 mM
Azul de bromofenol 0.1 %
SDS 0.1 %

14. Buffer T – B (5x):
Tris base (pH = 8) 59 g
Ácido Bórico 27.5 g
EDTA 3.72 g
H₂O 1000 mL

15. Buffer T – E:
Tris – HCl (pH = 7.5) 0.010 M
EDTA 0.001 M

16. Bromuro de Etidio.

17. Marcador de PM (DNA y PCR): DNA λ (Hind III)

18. Kit de reactivos para DNA. (Nucleo Spin Food Trial Kit, Macherey – Nagel, K3090 – 1, Clontech)

19. Kit de reactivos para PCR: (Invitrogen PCR reagent system 10198-018)

Primers: vanA (5'-ATGAATAGAATAAAAGTTGCAATAC-3')

vanA1 (5'-CCCCTTTAACGCTAATACGAT-3')

Preparación de medios

Agua peptonada: 0.1 g peptona / 100 mL de agua destilada (se preparan 300 mL de agua peptonada).

Se agrega 0.1 g de peptona en un matraz erlenmeyer, se adicionan 100 mL de agua destilada, y después se esteriliza el matraz en autoclave.

Caldo BHI: 37 g de medio BHI / 1 L de agua destilada (se preparan 100 mL de caldo BHI).

Se adicionan 3.7 g de medio BHI y se adiciona 100 mL, se calienta para disolver totalmente y se transfieren 10 mL a cada tubo de ensayo que se utilice. Se esterilizan en autoclave.

Medio selectivo en cajas: medio BHI (se preparan 550 mL) + Agar (18 g / L de agua destilada) + Vancomicina (a una concentración de 30 µg/ mL).

Se preparan los 550 mL de caldo BHI y se le agrega la cantidad requerida de Agar en polvo, se calienta hasta que se disuelva totalmente y se esteriliza, se deja enfriar hasta 50°C para adicionar la vancomicina; mientras se prepara la solución de vancomicina y se esteriliza en filtro de membrana, una vez lista la solución se adiciona al medio aún caliente de BHI y Agar, se mezclan bien; después se vierten en las cajas Petri correspondientes y se deja gelificar.

Medio selectivo en caldo: medio BHI (se preparan 90 mL) + Vancomicina (30 µg vancomicina / mL de agua destilada).

Se preparan 90 mL de caldo BHI, se calienta hasta que se disuelva completamente, se esteriliza en autoclave, y se adiciona la vancomicina, cuando la temperatura del caldo alcanza los 50°C, una vez mezclado bien, se adiciona 3 mL a cada tubo de ensayo.

ANEXO IV

IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS RESISTENTES AL ANTIBIÓTICO VANCOMICINA

Cepa: C8 (a partir de carne molida de cerdo)

Identificación bioquímica: "*Corynebacterium sp.*"

Tira API utilizada: **api 20E**

VP	Citrato	Lactosa	Maltosa	Glucosa	Sacarosa	Xilosa	Manosa	Fructuosa	RM
-	+	+	V	+	V	-	-	+	-

Indol	Movimiento	Urea	Manitol	H ₂ S
+	-	V	-	+

Oxidasa	Esculina	Aerobiosis	Oxido fermentación	Esporas	Producción de gas	Nitratos
+	-	+	+	-	-	V

Fosfatasa alcalina	Pirazina amidasa	B - glucoronidasa	Tirosina
+	+	+	V

Cepa: P3 (a partir de carne molida de pollo)

Identificación bioquímica: "*Corynebacterium sp.*"

Tira API utilizada: **api 20E**

RM	VP	Citrato	Lactosa	Maltosa	Glucosa	Sacarosa	Xilosa	Manosa	Fructuosa
-	-	+	+	+	+	-	-	+	+

Indol	Movimiento	Urea	Manitol	H2S
+	-	v	-	+

Oxidasa	Esculina	Aerobiosis	Oxido fermentación	Esporas	Producción de gas	Nitratos
+	-	+	+	-	-	+

Fosfatasa alcalina	Pirazina amidasa	B - glucuronidasa	Tirosina
-	-	+	v

Cepa: C10 (a partir de carne molida de cerdo)

Identificación bioquímica: "***Staphylococcus sp.***"

Tira API utilizada: **api staph**

Citrato	Lactosa	Maltosa	Glucosa	Sacarosa	Rafinosa	Oxidasa
+	+	+	+	+	+	+

Esculina	NaCl	Indol	Movimiento	Urea	Catalasa
+	+	+	-	+	+

Aerobiosis	Esporas	Producción de gas	VP	Nitritos
+	-	-	-	-

REFERENCIAS

1. Marraffa J, Guharoy R, Duggan D, Rose F, Nazeer S. Vancomycin induced thrombocytopenia: a case proven with rechallenge. *Pharmacotherapy* 2003; 23:1195–8.
2. Apisarnthanarak A, Khoury H, Reinus WR, Crippin JS, Mundy LM. Severe *Clostridium difficile* colitis: the role of intracolonic vancomycin? *Am J Med* 2002; 112:328–9.
3. Harrison. *Principios de Medicina Interna*; 16ª edición, Mc.GrawHill. Interamericana, 2006; vol I, págs. 884-885, 894-895, 897.
4. <http://old.iupac.org/publications/compendium/index.html>.
5. Apisarnthanarak A, Razavi B, Mundy LM. Adjunctive intracolonic vancomycin for severe *Clostridium difficile* colitis: case series and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2002; 35:690–6.
6. Liu C, Chambers HF. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3040–5.
7. Lefort A, Garry L, Depardieu F, Courvalin P, Fantin B. Influence of VanD type resistance on activities of glycopeptides in vitro and in experimental endocarditis due to *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3515–8.
8. Schwaber MJ, Wright SB, Carmeli Y, et al. Clinical implications of varying degrees of vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:657–64.
9. Depardieu F, Bonora MG, Reynolds PE, Courvalin P. The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Mol Microbiol* 2003; 50:931–48.
10. Charles PG, Ward PB, Johnson PD, Howden BP, Grayson ML. Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2004; 38:448–51.
11. Levine D. Vancomycin: a History. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 42:S5–12.
12. Geraci JE, Heilman FR, Nichols DR, Ross GT, Wellman WE. Some laboratory and clinical experiences with a new antibiotic, vancomycin. *Mayo Clin Proc* 1956; 31:564–82.
13. McGuire JM, Wolfe RN, Ziegler DW. Vancomycin, a new antibiotic. II. In vitro antibacterial studies. *Antibiot Annu* 1955; 3:612–8.

14. Griffith RS, Peck FB Jr. Vancomycin, a new antibiotic. III. Preliminary clinical and laboratory studies. *Antibiot Annu* 1955; 3:619–22.
15. Anderson RCGR, Higgins HM Jr, Pettinga CD. Symposium: how a drug is born. *Cincinnati J Med* 1961; 42:49–60.
16. Griffith RS. Vancomycin: continued clinical studies. *Antibiot Annu* 1956–1957:118–22.
17. Geraci JE, Heilman FR, Nichols DR, Wellman WE. Antibiotic therapy of bacterial endocarditis. VII. Vancomycin for acute micrococcal endocarditis: preliminary report. *Mayo Clin Proc* 1958; 33:172–81.
18. Kirby WM, Perry DM, Bauer AW. Treatment of staphylococcal septicemia with vancomycin: report of thirty-three cases. *N Engl J Med* 1960; 262:49–55
19. Farber BF, Moellering RC Jr. Retrospective study of the toxicity of preparations of vancomycin from 1974 to 1981. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23:138–41.
20. Brummett RE. Ototoxicity of vancomycin and analogues. *Otolaryngol Clin North Am* 1993; 26:821–8.
21. Wood MJ. Comparative safety of teicoplanin and vancomycin. *J Chemother* 2000; 12(Suppl 5): 21–25.
22. Campoli-Richards DM, Brogden RN, Faulds D. Teicoplanin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. *Drugs* 1990; 40(3): 449–486.
23. Atahan E, Gul M, Ergun Y, Eroglu E. Vascular graft infection by *Staphylococcus aureus*: efficacy of cefazolin, teicoplanin and vancomycin prophylaxis protocols in a rat model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 34(2): 182–187.
24. Depardieu F, Bonora MG, Reynolds PE, Courvalin P. The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Mol Microbiol* 2003; 50:931–48.
25. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:686–707.
26. Mundi LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 513-522.

27. Sakoulas G, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Adaptation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the face of vancomycin therapy. Clin Infect Dis 2006; 42(Suppl 1):S40–50 (in this supplement).
28. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:275–80.
29. Manson JM, Keis S, Smith JM, Cook GM. A clonal lineage of VanA-type *Enterococcus faecalis* predominates in vancomycin-resistant enterococci isolated in New Zealand. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 798-799.
30. Woodford N. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. Microb Drug Resist 2001; 229-236.
31. Sengelov G, Agerso Y, Halling-Sorensen B, Baloda SB, Andersen JS, Jensen LB. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. Environ Int 2003; 28: 587-595.
32. Perichon B, Reynolds P, Courvalin P. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1997; 2016-2018.
33. Arias C, Murray B. Antibiotic resistant bugs in the 21st century. New England Journal of Medicine 2009; 360(5): 439-443.
34. Anónimo. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twelfth informational supplement. NCCLS 2002; 21: Documento M100-S12.
35. Aubry-Damon H, Legrand P, Brun-Buisson C, Astier A, Soussy CJ, Leclercq R. Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Role of an infection control program and changes in aminoglycoside use. Clin Infect Dis 1997; 25:647-653.
36. Alekshun M, Levy S. Molecular mechanisms of antivacterial multidrug resistance. Cell 2007; 128: 1037-1050.
37. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother 1997; 40:135-136.
38. Giamarellou H, Galani I, Grecka P, Giamarellou H. Actividad comparativa *in vitro* y efecto letal de trovafloxacin, DU-6859a, levofloxacin y sparfloxacin frente a *Staphylococcus aureus*. Clin Drug Invest. 1997; 14:530-533.

39. Olmos A, Sánchez R, Navarro JC, Camarena JJ, Birlanga MJ, Nogueira JM. Eficacia del antibiotipado en la detección precoz de brote nosocomial de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM). Resumen Sesiones nº 17. VII Reunión de la SEIMC. Madrid. 1997.
40. Olmos A, Camarena JJ, Nogueira JM, Navarro JC, Risen J, Sánchez R. Application of an optimized and highly discriminatory method based on arbitrarily primed PCR for epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infections. J Clin Microbiol 1998; 36:1128-1134.
41. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically- Fourth edition; Approved Standard 1997; 17(2)M7-A4.
42. White D, Zhao S, Sudler R, Ayers S, Friedman S, Wagner D. The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. The New England Journal of Medicine 2001; 16: 1147-1154.
43. Paulsen I. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. Current Opinion in Microbiology 2003; 6: 446-451.
44. Sorrensen T, Blom M, Monnet D, Espersen F. Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. The New England Journal of Medicine 2001; 16: 1161-1166.
45. McDonald C, Rossiter S, Mackinson C, Johnson S. Quinupristin-Dalfopristin-resistant *Enterococcus faecium* on chicken and in human stool specimens. The New England Journal of Medicine 2001; 16: 1155-1160.
46. Normark H. Evolution and spread of antibiotic resistance. Blackwell Science 2002; 252: 91-106.
47. Goossens H, Jabes D, Rossi R, Lammens C, Privitera G, Courvalin P. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and in vitro susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. J. Antimicrob. Chemother 2003; 51: 1112-1115.
48. Mazel D, Davies J. Antibiotic resistance in microbes. Cell. Mol. Life Sci. 1999; 56: 742-754.
49. Young J, An S, Jin S, Chul Y. Phenotypic and Genotypic Differences of the Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Humans and Poultry in Korea. The Journal of Microbiology 2007; 45: 466-472.

50. Arias C, Singh K, Panesso D, Murray B. Time-Kill and Synergism Studies of Ceftobiprole against *Enterococcus faecalis*, Including Lactamase-Producing and Vancomycin-Resistant Isolates. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* 2007; 51: 2043-2047.
51. Aarestrup F. Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides. *J. Clin. Microbiol* 2000; 38: 2774–2777.
52. Bonora M, Ligozzi M, Bragagnolo L, Goglio A, Guazzotti G, Fontana R. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates causing hospital outbreaks in northern Italy belong to the multilocus sequence typing C1 lineage. *Microb. Drug Resist* 2004; 10: 114–123.
53. Bonten M, Willems R, Weinstein R. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?. *Lancet Infect. Dis.* 2004; 1: 314–325.
54. Lafaurie M, Perichon B, Lefort A, Carbon C, Courvalin P, Fantin B. Consequences of VanE-type resistance on efficacy of glycopeptides in vitro and in experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2826–30.
55. Brown R, Townsley A, Amyes S. Diversity of Tn1546 elements in clinical isolates of glycopeptide-resistant enterococci from Scottish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001; 45: 1309–1311.
56. Donelli G, Guaglianone E. Emerging role of *Enterococcus* spp. in catheter-related infections: biofilm formation and novel mechanisms of antibiotic resistance. *J. Vasc. Access* 2004; 5: 3–9.
57. Donelli G., Paoletti C, Baldassarri, Guaglianone E. Sex pheromone-response, clumping and slime production in enterococcal strains isolated from occluded biliary stents. *J. Clin. Microbiol* 2004; 42: 3419–3427.
58. Charles PG, Ward PB, Johnson PD, Howden BP, Grayson ML. Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2004; 38:448–51.
59. Guardabassi L, Dalsgaard A. Occurrence, structure, and mobility of Tn1546-like elements in environmental isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Appl. Environ. Microbiol* 2004; 70: 984–990.

60. Byl B, Jacobs F, Wallemacq P. Vancomycin Penetration of Uninfected Pleural Fluid Exudate after Continuous or Intermittent Infusion. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2015–2017.
61. Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:327–32.
62. Gobernado M. Daptomicina. Un antibiótico reevaluado. *Sociedad Española de Quimioterapia* 2007; 20: 11-18.
63. Rand K, Houck H. Daptomycin synergy with rifampicin and ampicillin against vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53:530-532.
64. King A. The *in vitro* activity of daptomycin against 514 Gram-positive aerobic clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48:219-223.
65. Soriano J. *Corynebacterium*. *Antimicrob Chemother* 2009; 63(2): 353-356.