



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETECCIÓN FENOTÍPICA DE FORMACIÓN DE BIOFILMS EN
CEPAS CLÍNICAS DE *Staphylococcus epidermidis*
OBTENIDAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS CON
INFECCIONES NOSOCOMIALES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ADA NELLY GALICIA CAMACHO



MÉXICO, D.F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: EDUARDO BONILLA ESPINOSA
VOCAL: PROFESOR: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ
SECRETARIO: PROFESOR: ROBERTO CABRERA CONTRERAS
1er. SUPLENTE: PROFESOR: SANTIAGO AVILA RIOS
2° SUPLENTE: PROFESOR: MARGARITA MENA ZEPEDA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE PATOGENICIDAD BACTERIANA; 3° PISO, TORRE DE
INVESTIGACIÓN, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

ASESOR DEL TEMA

DR. ROBERTO CABRERA CONTRERAS

SUPERVISOR TÉCNICO

BIOL. RUBEN MORELOS RAMIREZ

SUSTENTANTE

ADA NELLY GALICIA CAMACHO

Agradecimientos

Durante la realización de este trabajo de tesis, se contó con el apoyo de una beca del programa de apoyo PAPIIT con número de registro: IN201009-3.

Al Dr. Roberto Cabrera Contreras y al Biol. Rubén Morales Ramírez del laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, facultad de Medicina, UNAM.

Al Dr. Enrique Meléndez Herrada del departamento de Microbiología y Parasitología de la facultad de Medicina, UNAM.

Dedicatorias

A mis padres

A Manolo

A mis abuelos

A mi tío Rogelio

A mi Rongo

*A todos ellos y a quienes no aparecen,
muchas gracias.*

Índice

Página

1. Resumen	1
2. Planteamiento del problema	2
3. Objetivos	2
4. Hipótesis del trabajo	4
5. Marco teórico.....	5
5.1. Introducción.....	6
5.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	7
5.2.1. Características bioquímicas y de cultivo	7
5.2.2. Importancia clínica	8
5.3. Biofilm	11
5.3.1. Definición	11
5.3.2. Formación del biofilm.....	12
5.3.3. Resistencia a los agentes antimicrobianos en biofilm por <i>Staphylococcus epidermidis</i> y su alternativa de tratamiento.....	15
6. Cepas bacterianas.....	19
7. Metodología.....	21
7.1. Identificación de cepas bacterianas	22
7.2. Sensibilidad a los antimicrobianos	23
7.2.1. Sensibilidad a Cefoxitina por el método de difusión simple en disco	23
7.2.2. Siembra directa en placas tamiz para resistencia a oxacilina	24
7.2.3. Prueba de resistencia inducible a clindamicina.....	25
7.3. Detección de cepas de <i>S. epidermidis</i> formadoras de biofilm.....	27
7.3.1. Preparación del colorante rojo congo	27
7.3.2. Preparación de medio BHI.....	27
7.3.3. Preparación de medio rojo congo	28
7.3.4. Siembra de cepas clínicas de <i>S. epidermidis</i>	28

7.4. Almacenamiento de cepas	28
8. Resultados.....	29
9. Análisis estadístico	48
10. Discusión.....	51
11. Conclusiones	54
12. Referencias	56
13. Apéndice.....	64
13.1. Agentes antimicrobianos	65
13.2. Pruebas bioquímicas y metabólicas	69
13.3. Colorante Rojo Congo.....	72
13.4. Materiales.....	73

1. Resumen

Staphylococcus epidermidis forma parte de la microbiota normal de la piel y de las mucosas del ser humano, aunque también es uno de los patógenos nosocomiales más frecuentemente aislados de pacientes en todo el mundo. En México, en el Servicio de Pediatría y en las unidades de cuidados intensivos neonatales se encuentra a *S. epidermidis*, como el primer lugar causal de infecciones nosocomiales, debido a que tiene la capacidad de formar biofilms generalmente en procedimientos invasivos, como la utilización de algún biomaterial o una cirugía. Los biofilms se forman por comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos adheridos a una superficie inerte o tejido vivo, brindándole al microorganismo resistencia a los antimicrobianos y a los mecanismos de defensa del hospedero [1-5].

En el trabajo experimental se caracterizaron 298 cepas de *S. epidermidis* del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPer) y 34 del Hospital General “Gonzalo Castañeda Escobar” del ISSSTE (HGC), obtenidas durante un periodo de 5 años de pacientes hospitalizados con infección nosocomial; a las cuales se les determinó la capacidad de formar biofilm, mediante el uso de placas con medio de Agar Rojo Congo, así como su antibiograma para 14 agentes antimicrobianos.

Se obtuvieron los siguientes resultados, de las 298 cepas de *S. epidermidis* aisladas en el INPer el 31% fueron consideradas formadoras de biofilm y en el HGC, el 35%. En los patrones de sensibilidad/resistencia a los agentes antimicrobianos de las cepas formadoras de biofilm del INPer, se observó mayor resistencia a 11 antimicrobianos comparativamente con las cepas no formadoras; además, el 59% de las cepas formadoras presentaron resistencia a 11 de los 14 marcadores estudiados. En el caso del HGC, las cepas no formadoras de biofilm presentaron una resistencia ligeramente mayor hacia 7 antimicrobianos a diferencia de las formadoras donde solo 2 de las 12 cepas fueron más resistentes; sin embargo, el 42% de las cepas formadoras de biofilm fueron resistentes a 8 de

los 14 marcadores de resistencia estudiados. Aunque hay un patrón contrario al de las cepas del INPer, se observó que la resistencia fue muy alta tanto para las cepas formadoras como para las no formadoras de biofilm. También se encontró que la mayor cantidad de cepas resistentes a oxacilina mediada por el gen *mecA* en el INPer fueron las productoras de biofilm, lo contrario al HGC, donde las cepas que fueron *mecA* positivo se detectaron con mayor porcentaje en las cepas no formadoras de biofilm. Además, se observó que parece existir una mayor relación entre las cepas formadoras de biofilm y la resistencia a metilicina, en el caso del INPer se encontró del 80% y para el HGC del 50%.

La diferencia en los porcentajes de cepas de *S. epidermidis* productoras de biofilm en ambos hospitales no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Las cepas aisladas de catéter fueron en las que con mayor frecuencia se detectó la formación de biofilm. Existe una mayor resistencia a los antimicrobianos en las cepas del INPer formadoras biofilm que las no formadoras ($p < 0.033$), pero en el HGC no existe diferencia estadísticamente significativa entre la resistencia de las cepas formadoras y no formadores de biofilm ($p > 0.09$). La frecuencia de cepas clínicas de *S. epidermidis* B+ resistentes a metilicina en el INPer y en el HGC fue de 80 y 50%, respectivamente.

2. Planteamiento del problema

- ¿Cuál es la frecuencia de cepas de *Staphylococcus epidermidis* productoras de biofilm, aisladas de pacientes con infecciones nosocomiales, comparativamente de dos instituciones de salud?
- ¿Cuáles son los patrones de sensibilidad/resistencia a los agentes antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus epidermidis* productoras de biofilm comparativamente con las no productoras?

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Detectar fenotípicamente la formación de biofilm en cepas clínicas de *Staphylococcus epidermidis* obtenidas de pacientes hospitalizados con infecciones nosocomiales comparativamente del Hospital General “Gonzalo Castañeda Escobar” y del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”, de la ciudad de México.

3.2. Objetivos particulares

- Localizar cuáles son los sitios de infección de los pacientes en donde se encuentre la mayor cantidad de cepas clínicas aisladas de *Staphylococcus epidermidis* formadoras de biofilm.

- Evaluar los patrones de sensibilidad/resistencia a los agentes antimicrobianos de las cepas clínicas de *Staphylococcus epidermidis* formadoras de biofilm comparativamente contra las no formadoras.
- Determinar la frecuencia de cepas clínicas de *Staphylococcus epidermidis* formadoras de biofilm resistentes a meticilina.

4. Hipótesis

- La frecuencia con la que se encuentran en los hospitales cepas de *Staphylococcus epidermidis* productoras de biofilm, será mayor al 40%, según reportes internacionales.
- Las cepas de *Staphylococcus epidermidis* recuperadas de los sitios de infección: catéter y herida quirúrgica, son más frecuentemente productoras de biofilm que las cepas aisladas de otros sitios de infección (orina, sangre, líquido cefalorraquídeo, secreción de herida, absceso).
- Las cepas de *Staphylococcus epidermidis* productoras de biofilm presentan mayor resistencia a los agentes antimicrobianos que las cepas no productoras.

5. Marco teórico

5.1. Introducción

Las Infecciones Nosocomiales (IN) representan un problema de salud creciente, con grandes repercusiones económicas. En México, la ocurrencia de estas infecciones oscila entre 8 y 16 casos por cada 100 pacientes hospitalizados, son más frecuentes en niños menores de un año y en adultos mayores. Los microorganismos involucrados son varios, pero el Sistema de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales de Estados Unidos de América (EUA) reconoce a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCoN) como los patógenos nosocomiales más frecuentemente aislados de pacientes de la unidad de cuidados intensivos. En México, según el tipo de hospital y el sitio de infección, las especies de *Staphylococcus* en conjunto son uno de los grupos más frecuentes, representan alrededor del 20% de los principales microorganismos asociados a mortalidad en infecciones nosocomiales en reportes del año 2003. En el Servicio de Pediatría y en las unidades de cuidados intensivos neonatales, los SCoN, principalmente *S. epidermidis*, ocupan el primer lugar como causa de septicemias relacionadas a la colocación de catéteres en niños inmunodeprimidos y además, sus patrones de sensibilidad a los antibióticos de uso común, muestran un aumento progresivo de resistencia a los antimicrobianos. La asociación de *S. epidermidis* en las IN se debe principalmente a la capacidad que tiene de formar biofilm, generalmente en procedimientos invasivos, por ejemplo como la utilización de catéteres o algún otro dispositivo médico o en una cirugía [1, 2, 5-8].

La palabra “biofilm” es utilizada tanto en textos en inglés como en español, en vez de su traducción: biopelícula o biocapa. Además, algunos artículos refieren el término de “slime”, como biofilm, pero en la mayoría de la literatura, se utiliza este término para referirse únicamente a la matriz polisacárida en la cual las bacterias están embebidas [5].

5.2. *Staphylococcus epidermidis*

Los *Staphylococcus* pertenecen a la familia *Micrococcaceae*, del género *Staphylococcus* se localizan 32 especies y 15 subespecies, las de mayor importancia clínica son seis: 1 *Staphylococcus* coagulasa positivo: *S. aureus* y 5 especies de SCoN: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis* y *S. schleiferi*. *Staphylococcus epidermidis* es el que más frecuentemente se aísla del grupo de los SCoN [9, 10].

S. epidermidis forma parte de la microbiota normal de la piel y mucosas del ser humano y de otros mamíferos, es la especie más frecuentemente aislada de los epitelios humanos y fundamentalmente coloniza las axilas, la cabeza y las fosas nasales. Es un coco Gram positivo con diámetro de 0.5 a 1.5 μm . Las células que provienen de un crecimiento en placas con medio sólido con agar presentan un patrón que asemeja a un racimo de uvas, sin embargo, en tinciones directamente de muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares, tétradas o en cadenas cortas (9, 11, 12).

5.2.1. Características bioquímicas y de cultivo

- Catalasa positivo
- Coagulasa negativo
- No fermenta manitol, pero si sacarosa, maltosa, β -d-fructosa
- Ureasa positivo
- Sensible a novobiocina (MIC > -1.6 $\mu\text{g/mL}$)
- Crece en un medio que contiene cloruro de sodio al 10%
- Aerobio facultativo
- Citocromo-oxidasa negativo
- No es pigmentado
- Inmóvil
- Quimiorganotrófico

- Temperatura óptima de crecimiento es de 35-37°C
- No es formador de esporas

Crecimiento en placas de gelosa sangre: colonias translúcidas, blanco-grisáceas; no hemolíticas; las cepas productoras de exopolisacárido se adhieren a la superficie del medio de cultivo. El diámetro de las colonias es de 2-4mm, convexas, de bordes regulares y de consistencia butirácea (como mantequilla) [12-14].

5.2.2. Importancia clínica

S. epidermidis, es considerado un importante patógeno oportunista debido a que la mayoría de las infecciones que causa son de origen nosocomial. A menudo se convierte en uno de los agentes infecciosos importantes en los pacientes inmunodeprimidos (como pacientes con cirugía, quemaduras graves, cáncer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), nacimiento prematuro, etcétera). Representa la causa más común de infecciones asociadas a dispositivos médicos, tales como: catéteres, sondas, implantes oculares, válvulas cardíacas prostéticas y prótesis ortopédicas, que sirven de vía de entrada en el cuerpo humano, puesto que generalmente las cepas que provocan estas infecciones suelen proceder de la flora endógena del paciente o del personal de salud; se le aísla con regularidad de puntas de catéter, sangre, heridas quirúrgicas, abscesos y líquido cefalorraquídeo. Aunque las infecciones de *S. epidermidis* rara vez se convierten en enfermedades mortales, su frecuencia, y el hecho de que son muy difíciles de tratar, representan una pesada carga para el sistema de salud pública. Las infecciones del torrente sanguíneo ocurren en por lo menos de 4-5 de cada 1000 inserciones de catéteres venosos centrales que se realizan en pacientes en cuidados intensivos de los EUA, por lo menos el 22% de estas infecciones son causadas por *S. epidermidis*; también, en segundo lugar después de *S. aureus*, causa aproximadamente el 13% de las infecciones de endocarditis de válvula protésica (EVP), con una alta tasa de abscesos intracardiacos (38%) y el 24% de mortalidad. En cuanto a las

infecciones de prótesis articulares, *S. epidermidis* se aísla con mucha frecuencia (19–37.5%). Sin embargo, EVP y otras complicaciones graves son raras entre las infecciones por *S. epidermidis*, por lo que las infecciones que causa esta bacteria son predominantemente subagudas y crónicas [11, 15, 16].

A diferencia de *S. aureus*, *S. epidermidis* generalmente no suele causar infecciones que comprometan severamente a los pacientes. Esto se debe a la diferencia en el número de sus factores de virulencia, en *S. epidermidis* son menos en comparación con *S. aureus*; como se aprecia en la tabla 1, la mayoría de los factores de virulencia de *S. epidermidis* están relacionados a la formación de biofilm, el cual es considerado el principal factor de virulencia de esta bacteria.

Tabla 1. Factores de virulencia de *Staphylococcus epidermidis*

Factor de virulencia	Gen	Función
Formación del biofilm a través de la unión primaria a las superficies abióticas		
AtlE	<i>atlE</i>	Una abundante autolisina bifuncional y adhesina que afecta a la hidrofobicidad de superficie
Aae	<i>aae</i>	Una autolisina bifuncional y adhesina
Ácidos teicóicos	Varios genes	Aumentan la unión a fibronectina
Formación del biofilm a través de la unión primaria a proteínas de la matriz		
SdrF	<i>sdrF</i>	Unión a colágeno
SdrG (conocido como Fbe)	<i>sdrG</i> (conocido como <i>fbe</i>)	Unión a fibrinógeno
SdrH	<i>sdrH</i>	Presunta función única de unión
AtlE y Aae	<i>atlE</i> y <i>aae</i>	Unión a varias proteínas de ECM
Embp (proteína de unión a matriz extracelular)	<i>embp</i>	Unión a fibronectina y media la acumulación del biofilm en algunas cepas PIA y Aap negativas y evita la fagocitosis por macrófagos
Agregación intercelular		
PNAG (también conocido como PIA)	<i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>icaB</i> a <i>icaC</i>	Una adhesina polisacárida intercelular
Proteína asociada al biofilm Bap (conocida como Bhp)	<i>bap</i> (conocido como <i>bhp</i>)	Una adhesina intercelular proteínica

Proteína asociada a la acumulación Aap	<i>aap</i>	Un precursor de la adhesina intercelular proteínica
Ácidos teicóicos	Varios genes	Componentes de la matriz del biofilm
Exopolímeros de protección		
PNAG	<i>icaA, icaD, icaB y icaC</i>	Protege de IgG, AMPs, fagocitosis y complemento
PGA	<i>capA, capB, capC y capD</i>	Protege de AMPs y fagocitosis
Resistencia a AMPs		
Proteasa SepA	<i>sepa</i>	Participa en la degradación del AMP
Dlt, VraF y VraG	<i>dltA, dltB, dltC, dltD, mprF, vraF y vraG</i>	Tiene función en la D-alanilación de los ácidos teicóicos (Dlt) y presunta exportación de AMP (VraF y VraG)
Sistema Aps	<i>apsR</i> (conocida como <i>graR</i>), <i>apsS</i> (conocida como <i>graS</i>) y <i>apsX</i>	Detecta AMPs y regula los mecanismos de resistencia AMP
Toxinas		
PSMs	<i>psmA, psmδ, psmε, hld, psmβ1 y psmβ2</i>	Citolisinas pro-inflamatorias
Exoenzimas		
Metaloproteasa o elastasa (SepA)	<i>sepA</i>	Participa en la maduración de lipasa, resistencia AMP y, potencialmente, el daño al tejido
Glutamilendopeptidasa y serin proteasa (GluSE, SspA y Esp)	<i>sspA</i>	Degradación del fibrinógeno y el factor C5 del complemento.
Otros factores		
Estafiloferrinas	locus <i>sfna</i>	Sideróforos (adquisición del hierro)
SitA, SitB y SitC	<i>sitA, sitB y sitC</i>	Un importador de hierro

AMP, péptidos antimicrobianos; IgG, inmunoglobulina G; PGA, ácido poli-γ-glutámico; PNAG, poli-N-acetylglucosamina; PSM, modulina fenol-soluble.

Modificada de Otto M. 2009 (11).

En general, el éxito de *S. epidermidis* como patógeno se atribuye a su capacidad de adherirse a superficies y permanecer allí, bajo la cubierta de un material extracelular que lo protege, el biofilm, que representa un foco de infección de difícil erradicación.

5.3. Biofilm

5.3.1. Definición

Los biofilms representan una forma habitual de crecimiento de los microorganismos en la naturaleza, son comunidades de microorganismos que crecen embebidos o rodeados en una matriz de exopolisacáridos adheridos a una superficie inerte o tejido vivo, brindándole a aquellos microorganismos de interés médico resistencia a los antibióticos y a los mecanismos de defensa del hospedero, haciendo difícil su erradicación [3, 5].

La composición del biofilm formado por los *Staphylococcus* es heterogénea; está formada esencialmente de las células microbianas y de la sustancia polimérica extracelular (SPE) que representa entre el 50 y el 90% del carbono orgánico total y se puede considerar la materia prima de la matriz del biofilm. La SPE del biofilm está compuesta principalmente por la adhesina polisacáridica intercelular (PIA, por sus siglas en inglés), que es un polímero cargado positivamente de poli-N-acetilglucosamina (PNAG) con enlaces glucosídicos β -1, 6; en menor cantidad, el ácido teicóico extracelular y proteínas. La arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida, presenta canales que sirven para la comunicación entre células y para el flujo de agua, nutrientes y oxígeno hasta las zonas más profundas del biofilm [17- 23].

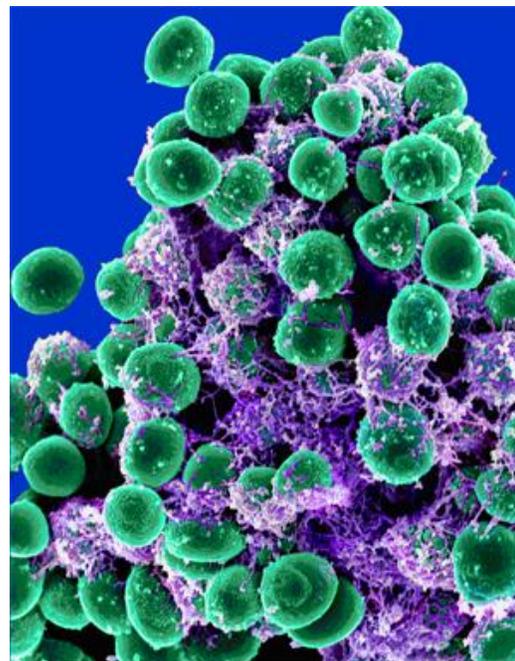


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de biofilm de *S. epidermidis*, (<http://www.niaid.nih.gov>)

La PIA, contribuye significativamente a la virulencia bacteriana en la infección relacionada con dispositivos médicos, puesto que desempeña un papel importante en la adherencia entre las bacterias. Además, media la protección contra las defensas innatas del huésped, evita la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares. Sin embargo, las propiedades antifagocíticas aún no se han atribuido a una molécula específica. Además, existen cepas que no forman el biofilm mediante PIA (PIA-negativos) sino que utilizan adhesinas intercelulares de naturaleza proteica; como se detallará más adelante [19, 23-25].

4.3.2. Formación de biofilm

El mecanismo exacto de la formación del biofilm por *S. epidermidis*, no es claro; sin embargo se ha descrito en 4 pasos: unión, acumulación, maduración y desprendimiento (figura 2), que son fisiológicamente diferentes entre sí y requieren de factores diferentes. Los dos primeros pasos, unión y acumulación, están definidas, pero acumulación y desprendimiento aún no están bien caracterizados [5, 27].

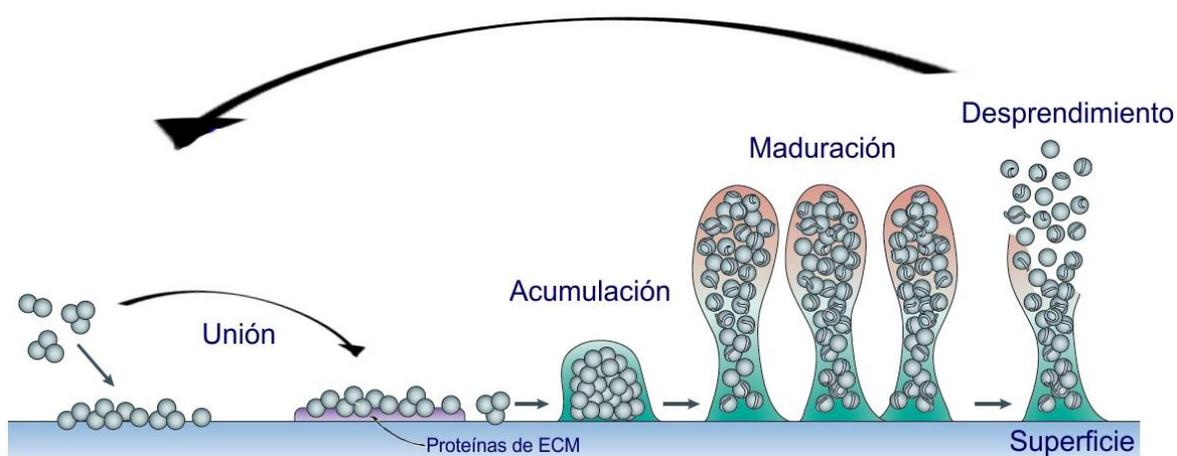


Figura 2. Pasos para la formación de biofilm por *S. epidermidis*.
Modificada de Otto M. 2009 [11].

Unión

El primer paso para la formación de biofilm, es la adhesión a la superficie, ya sea un tejido o un biomaterial. Esta unión puede ocurrir directamente sobre la superficie de un biomaterial, inmediatamente después de su implantación o en la superficie del tejido o del biomaterial cubierto o acondicionado por proteínas de la matriz extracelular (ECM).

La unión a superficies no acondicionadas es de carácter hidrofóbico, depende de las características físicas de la superficie del biomaterial y de la superficie bacteriana. *S. epidermidis* tiene proteínas específicas que median esta unión, la más abundante es la autolisina AtlE y menor cantidad la Aae que además de tener función de adhesina, modifican la hidrofobicidad de la superficie. Otra proteína involucrada es la proteína de superficie estafilococal (Ssp1), que forma hebras de proteínas en la superficie de *S. epidermidis*. El segundo tipo de unión, a superficies acondicionadas, es específica, puesto que es proteína-proteína, proteína de la ECM con proteínas de la bacteria. El acondicionamiento de la superficie del biomaterial con proteínas como fibrinógeno, fibronectina, vitronectina y colágeno promueven la adhesión de *S. epidermidis* a la superficie gracias a que tiene varias adhesinas conocidas como “componentes de la superficie microbiana de reconocimiento de moléculas de la matriz adhesiva” (MSCRAMMs, por sus siglas en inglés), las cuales pueden unirse a las proteínas de la ECM. Algunas MSCRAMMs se observan en la tabla 1. No todas las proteínas favorecen esta adhesión, por el contrario la bloquean, como es el caso de la albúmina (5, 7, 25-28).

Acumulación

Después de la adhesión inicial, el biofilm continúa su desarrollo a través de la agregación intercelular, que esta mediada por diversas moléculas dependiendo si *S. epidermidis* es PIA negativo o positivo. La mayoría de las cepas clínicas aisladas de *S. epidermidis* son PIA positivos; la PIA es el principal componente de

la adhesión intercelular para la acumulación en multicapas del biofilm de *S. epidermidis*. La PIA es sintetizada por proteínas codificadas en el operón *ica* (adhesión intercelular), compuesto por cuatro genes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* y un gen que regula su expresión *icaR* [23, 29-31].

Los genes *icaA* e *icaD* codifican para una N-acetilglucosamina transferasa que produce una cadena de monómeros de N-acetilglucosamina (GlcNAc), la sola expresión de *icaA* produce una actividad enzimática baja, pero la coexpresión con *icaD* incrementa su actividad; el alargamiento depende presuntamente de *icaC*, que también la exporta hacia la superficie celular. Posteriormente, una PIA deacetilasa codificada por *IcaB*, se encarga de la desacetilación parcial de los residuos de GlcNAc, introduciendo cargas positivas en el polímero, importantes para la superficie de unión de PNAG y de sus diversas funciones biológicas en la formación del biofilm. Debido a este proceso, del total de la PIA producida, el 80-85% es N -acetilado, con cargas negativas, mientras que el resto es no N-acetilado, con carga positiva debido a los grupos amino (Fig. 3). La producción de PNAG está sujeta al regulador “Quorum Sensing”, un sistema de regulación bacteriana dependiente de la densidad celular, que produce moléculas que sirven como señales que inducen diferentes procesos en la célula. [23, 29-32].

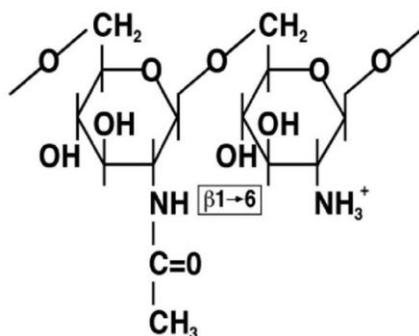


Figura 3. Estructura de PIA. Otto, M. 2008 [7].

La fase de acumulación de las cepas que son PIA negativas, está mediada por proteínas, Aap, Embp y Bhp (Bap en *S. aureus*). La Aap se ha encontrado aproximadamente en el 90% de las cepas de *S. epidermidis*, y puede sustituir a la PIA como adhesina intercelular, forma estructuras similares a las fibrillas en la superficie de *S. epidermidis* y requiere de la activación proteolítica para inducir la

formación de biofilm. La Embp, además de unirse a fibronectina y evadir la fagocitosis por macrófagos, es suficiente para la acumulación del biofilm en cepas PIA y Aap negativas, combinando sus propiedades adhesivas y de unión a proteínas de la ECM. A diferencia de Aap, la Bhp se ha encontrado entre 15-45% de las cepas de *S. epidermidis*. Esta adhesina, también induce la acumulación del biofilm en ausencia de PIA [7, 26, 33].

Maduración y desprendimiento

Durante la maduración se adquiere la estructura tridimensional, con canales para el suministro de nutrientes a las células de todas las capas del biofilm. El mecanismo de esta formación no es claro como el de las dos fases anteriores. Se ha sugerido que el Quórum Sensing controla péptidos surfactantes en la estructura de los biofilms, las PSMs, que conducen a la separación de grupos de células formando los canales [11, 26].

El desprendimiento del biofilm es importante para la diseminación de las bacterias a otros sitios de infección, puede producirse por el desprendimiento de células individuales o grupos grandes de células. El desprendimiento controlado mantiene un cierto espesor de biofilm, este mecanismo es controlado por el sistema quorum sensing. Los mecanismos que intervienen en este proceso pueden ser de varios factores: fuerzas mecánicas, como el flujo sanguíneo; cese de la producción de adhesinas y enzimas que destruyen la matriz o surfactantes como péptidos PSMs. Las células que se han desprendido como consecuencia del crecimiento pueden volver rápidamente al fenotipo planctónico, es decir, células vegetativas en estado libre [7, 21, 35].

5.3.3. Resistencia de *Staphylococcus epidermidis* a los antimicrobianos en el biofilm y su alternativa de tratamiento

Los microorganismos presentes en los biofilms son muy resistentes a una amplia variedad de agentes antimicrobianos, antisépticos y desinfectantes, en

comparación a las células planctónicas, con una disminución de más de 1000 veces en la sensibilidad reportada. Los mecanismos por los que adquieren resistencia son adicionales y diferentes a los de las células planctónicas, son multifactoriales y varían para cada especie, dependiendo de las características estructurales y fisiológicas del biofilm así como de sus células individuales. Esta resistencia tiene importantes consecuencias clínicas, más del 60% de las infecciones bacterianas están asociadas a formación de biofilms y en general, el éxito del tratamiento depende, del uso de elevadas dosis de antimicrobianos y/o la retirada del biomaterial implantado. Las bacterias que forman parte de los biofilms recuperan la sensibilidad original de la cepa bacteriana una vez que se dispersan de la misma, es por esta razón que algunas veces fracasa el tratamiento con antimicrobianos del paciente, a pesar de que en las pruebas en el laboratorio de sensibilidad a los antibióticos estén correctas, sin embargo, algunos determinan la resistencia del biofilm por la sensibilidad de las células planctónicas más resistentes [5, 35, 36]. Los mecanismos de resistencia de *S. epidermidis* en el biofilm a los agentes antimicrobianos se siguen investigando, pero pueden ser uno o más de los que se mencionan en la tabla 2.

El principal problema en el tratamiento de infecciones relacionadas a dispositivos médicos, es que los antibióticos son seleccionados por su capacidad para matar las células planctónicas. Además, los estafilococos planctónicos resistentes a la meticilina (un antibiótico de primera elección frente a estafilococos), están siendo aislados de muestras clínicas con mayor frecuencia, haciendo más difícil de tratar las infecciones asociadas a biofilms. Aproximadamente el 80% de las cepas de *S. epidermidis* aisladas de las infecciones nosocomiales son resistentes a la meticilina, y la mayoría son resistentes a otros antibióticos. Se ha desarrollado en los últimos años una gran cantidad de estrategias dirigidas a destruir o evitar la formación de biofilms bacterianos, algunas se describen en la tabla 3. Sin embargo, la mayoría de las veces es necesaria la retirada del biomaterial para aliviar la infección [5, 7, 36].

Tabla 2. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en el biofilm formado por *Staphylococcus epidermidis*

Mecanismo de resistencia Características		Principales agentes antimicrobianos afectados	Referencias
Impermeabilidad del biofilm a los agentes antimicrobianos	Las moléculas de antimicrobianos deben difundir a través de la matriz del biofilm para inactivar las células recubiertas. La matriz constituye una barrera que reduce la difusión de estas moléculas hacia el interior del biofilm, lo cual depende de la estructura del biofilm y de las características del antimicrobiano. Producción de grandes cantidades de enzimas inactivadoras de antibióticos, como β -lactamasas, se acumulan en la matriz del biofilm produciendo gradientes de concentración que pueden proteger a las células.	Aminoglucósidos β -lactámicos Glicopéptidos linezolid, rifampicina o la clindamicina y macrólidos	35, 37-39
Tasa alterada de crecimiento	Las bacterias en los biofilms presentan una tasa de crecimiento más lenta en comparación con las células planctónicas, retrasando la acción de los antimicrobianos. La limitación de nutrientes genera diferentes regiones en las biocapas con mayor y menor tasa de crecimiento. Estas regiones con menor crecimiento presentan menor sensibilidad a la actividad bactericida de los agentes antimicrobianos.	Beta-lactámicos Ciprofloxacino	37-39
Microambiente	En el interior del biofilm existen diferentes variables como la pO_2 , pCO_2 , pH, interfiriendo en la acción de los antimicrobianos. La limitación de oxígeno podría explicar el 70% o más de la protección de las células de la región más profunda del biofilm, debido a la baja absorción del antibiótico por la falta de oxigenación de las células.	Aminoglucósidos Beta-lactámicos	35, 37-41
Quorum-Sensing	El Quorum-Sensing produce moléculas que sirven como señales que inducen la expresión conjunta de mecanismos, por ejemplo, en respuesta a la presión antibiótica, los cuales no están claros.	Inhibidores del Quorum-sensing (<i>agr</i>)	37, 38, 40
Elementos genéticos de transferencia horizontal	Los biofilms, son ambientes ideales para la transferencia horizontal de genes, debido al contacto célula-célula, favoreciendo la diseminación de genes de resistencia a agentes antimicrobianos		32, 37,38, 40

Tabla 3. Estrategias dirigidas a destruir o evitar la formación de biofilms bacterianos.

Estrategias anti-biofilm	Ejemplos	Referencias
Interferir con los factores esenciales del biofilm	<p>Enzima que puede degradar la PIA de estafilococos, esta PIAsa (dispersina B), ha sido encontrada en <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>.</p> <p>Anticuerpos específicos contra proteínas de unión, como los dirigidos hacia Aap o al SdrG.</p> <p>Interferir con la comunicación bacteriana célula-célula (<i>quorum-sensing</i>).</p>	15, 40, 42, 43,
Modificación de las características del biomaterial	Cubrir la superficie de los dispositivos médicos con antibióticos u otras sustancias antibacterianas, con el objetivo de prevenir la formación de biofilm mediante la eliminación de las primeras bacterias colonizadoras.	15, 38,39
Otros	Procedimientos específicos de higiene durante la inserción de catéteres, para prevenir la infección por cepas del personal de salud, el uso profiláctico de antibióticos sistémicos durante la cirugía	15
	Métodos electro-químicos han sido propuestos como medio para prevenir la formación de biofilms y también para mejorar la actividad de los antimicrobianos. El uso de pulsos electromagnéticos puede potenciar la actividad de la gentamicina frente a biocapas de 5 días de <i>S. epidermidis</i> .	38, 40
	Los ultrasonidos se han usado para potenciar la penetración de los antimicrobianos en las biocapas bacterianas. Exposiciones a pulsos de ultrasonidos de 48 h para biocapas de <i>S. epidermidis</i> , potencian la actividad de gentamicina.	5, 38, 40

6. Cepas bacterianas

6.1. Cepas bacterianas

Las cepas de estafilococos fueron obtenidas del Hospital General “Gonzalo Castañeda Escobar” del ISSSTE y del Hospital de Gineco-obstetricia del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” y aisladas de diferentes sitios de infección (catéter, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), herida quirúrgica y otros) de pacientes con infección nosocomial hospitalizados, durante un periodo de 5 años (2005-2010).

Cepas de referencia de uso internacional:

- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (RP62A)
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Cepas de control interno

- Cepa clínica de *Staphylococcus saprophyticus* INPer 416
- Cepa clínica de *Staphylococcus haemolyticus* INPer 458

7. Metodología

7.1. Identificación de cepas bacterianas

La identificación inicial de las cepas de estafilococos provenientes de hospital se determinó mediante un equipo automatizado, MicroScan, utilizando un panel específico. Además el biotipo se verificó por medio de la visualización de las características macroscópicas y microscópicas de las colonias desarrolladas en medios de cultivo artificiales y de algunas pruebas bioquímicas [10, 44]; se realizaron las siguientes (para las metodologías de cada prueba ver el apéndice 13.2):

- Producción de la enzima coagulasa

Los estafilococos pueden dividirse en 2 grupos, en *Staphylococcus* coagulasa positiva y *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCoN), esto de acuerdo a la capacidad de producir coagulación en plasma por acción de la enzima coagulasa. Un resultado negativo de la prueba indica que se trata de un SCoN, pudiendo ser *S. epidermidis*.

- Fermentación de manitol

Esta prueba también nos ayuda a separar *S. aureus* (manitol +) de los SCoN (manitol -). La fermentación del manitol es realizada por *S. aureus* y detectada por su producción de ácidos orgánicos, haciendo virar el medio de cultivo de color rosado a amarillo por la presencia del indicador de pH rojo de fenol. *S. epidermidis* no fermenta el manitol, por lo que el medio de cultivo no cambiará de color.

- Sensibilidad a novobiocina

Esta prueba se utiliza como método de rutina para diferenciar a las 2 especies principales del grupo de los SCoN: *S. epidermidis*, sensible al antimicrobiano, de *S. saprophyticus* que es resistente; se utilizan discos con novobiocina conteniendo 5 µg, colocados sobre placas de medio de cultivo MH; un halo de inhibición menor o igual a 16 mm de diámetro significa resistencia.

- Producción de la enzima ureasa

Permite la diferenciación de cepas de *S. epidermidis* (ureasa +) de cepas de *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* (ureasa -). Esta prueba se basa en la detección de la enzima ureasa, la cual hidroliza la urea en dos moléculas de amoníaco, alcalinizando el medio y poniéndose de manifiesto con un virre del color amarillo a rosa intenso del medio AU, conteniendo el indicador de pH rojo de fenol.

7.2. Sensibilidad a los antimicrobianos

Se determinó el antibiograma para 14 antimicrobianos mediante un equipo automatizado MicroScan, utilizando un panel específico descrito en la sección de materiales.

Los 14 antibióticos que se determinaron fueron: Amoxicilina/ácido clavulánico “Amx/Cl”, ampicilina “Amp”, cefazolina “Cfz”, ciprofloxacino “Cip”, clindamicina “Cl”, Eritromicina “Er”, gentamicina “Gen”, imipenem “Imp”, oxacilina “Ox”, penicilina “Pen”, rifampicina “Rif”, tetraciclina “Tet”, trimetoprim/sulfametoxazol “Tr/S” y vancomicina “Van”.

Además, se realizaron otras pruebas de laboratorio para determinar los patrones de sensibilidad/resistencia a 3 agentes antimicrobianos específicos que se describen a continuación:

7.2.1. Sensibilidad a cefoxitina por el método de difusión simple en disco

El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) de EUA, recomienda el uso de la prueba de susceptibilidad con disco de cefoxitina (CFX-DD), como un método más preciso para predecir la resistencia a oxacilina mediada por el gen *mecA* en los estafilococos [45-47]. El método

estándar de difusión por disco de cefoxitina conteniendo 30 µg se interpreta considerando los siguientes límites en los halos de inhibición:

Tabla 4. Valores de corte para interpretación de la prueba de CFX-DD

Valores de corte (diámetros del halo de inhibición)		
Microorganismo	Resistente	Sensible
<i>S. aureus</i>	≤ 19 Mm	≥ 20 Mm
SCoN	≤ 24 Mm	≥ 25 Mm

Modificado de CLSI M100-S20 [46].

-Procedimiento:

Preparar una suspensión bacteriana igual a la utilizada en la prueba de sensibilidad a novobiocina (ver apéndice 13.2.3). Humedecer un hisopo de rayón y sembrar de forma homogénea y masiva en placas de Petri sin división con gelosa BHI. Empleando pinzas rectas estériles, colocar el disco de cefoxitina de 30 µg en la superficie del medio de cultivo e incubar a 37°C por 24hrs.

7.2.2. Siembra directa en placas tamiz para determinar resistencia a oxacilina (MH+Ox, 6µg/mL).

Esta prueba se realiza para detectar resistencia de cepas bacterianas a oxacilina o para confirmar resultados realizados con otros métodos fenotípicos, pero no es confiable y recomendable para cepas de SCoN. Los criterios de interpretación desarrollados por CLSI para pruebas de resistencia a oxacilina a este grupo de agentes antimicrobianos en el grupo de los SCoN, se basan en la detección del gen *mecA* en cepas bacterianas resistentes, por ejemplo la prueba

con disco de cefoxitina [45-47]. Sin embargo en el presente trabajo, esta prueba tamiz se realizó porque las pruebas para las cepas clínicas de las diferentes especies de estafilococos aisladas en los hospitales se procesaron en conjunto en el laboratorio, haciendo una comparación entre las 2 pruebas con las que se determinan las cepas resistentes a oxacilina.

-Procedimiento:

Preparar solución madre de oxacilina 6 mg /mL: Pesar 0.1044g y disolver en 15 mL de agua estéril desionizada y esterilizar por filtración en membrana de ésteres de celulosa con diámetro de poro de 0.22µm (Millex GS-Millipore).

Preparación de 500 mL de medio de cultivo Mueller-Hinton-Oxacilina MH-OX (6µg/mL): Pesar 19g de agar MH y 20g de NaCl en un matraz Erlenmeyer de 1L. Agregar 500 mL de agua destilada, llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en olla de presión a 121 °C durante 15 min. Enfriar en baño de agua a temperatura de 45°C y agregar 0.5 mL de la solución madre de oxacilina 6 mg /mL. Homogeneizar el medio de cultivo y vaciar en placas de Petri de 3 divisiones. Incubar a 37 °C durante 24 hrs y almacenar en refrigeración a 4°C.

Utilizar la suspensión bacteriana de la prueba anterior para colocar una asada aproximadamente de 10 µL de la suspensión bacteriana ajustada en una placa de gelosa MH-OX (6µg/mL), distribuir homogéneamente la muestra con ayuda de un hisopo de rayón en el medio e incubar a 37°C por 48 hrs.

Interpretación de la lectura: el crecimiento de por lo menos una colonia es una prueba positiva de resistencia a oxacilina.

7.2.3. Prueba de resistencia inducible a clindamicina o “Prueba D”

La resistencia a la eritromicina de los estafilococos puede estar codificada por medio de los genes *erm* o *msrA*; la mediada por *erm* hace que los

estafilococos puedan presentar resistencia inducible a eritromicina mediada por la clindamicina y podrían aparecer susceptibles en la prueba simple de difusión con disco, hecho que pondría en riesgo la quimioterapia correcta del paciente. Es por esta razón que se deben de detectar estas cepas que muestran la inducción de resistencia a macrólidos mediada por clindamicina o prueba D positiva, para poder brindar un tratamiento con macrólidos adecuado para el paciente.

-Procedimiento:

Utilizar la suspensión bacteriana de la prueba de sensibilidad a cefoxitina para humedecer un hisopo de rayón y sembrar de forma homogénea y masiva en placas de Petri sin división con gelosa BHI. Colocar el disco de clindamicina de 2µg a 15-26 mm del borde del disco de eritromicina de 15µg. Incubar a 37°C por 24hrs.

*El halo de inhibición en forma de letra D (en forma achatada) se considera como prueba positiva.

Nota: Las pruebas para determinar los perfiles de sensibilidad/resistencia a cefoxitina (7.3.1) y a macrólidos (7.3.3), se pueden realizar en conjunto en la misma placa de gelosa BHI, colocando los discos con antibióticos de la siguiente manera:

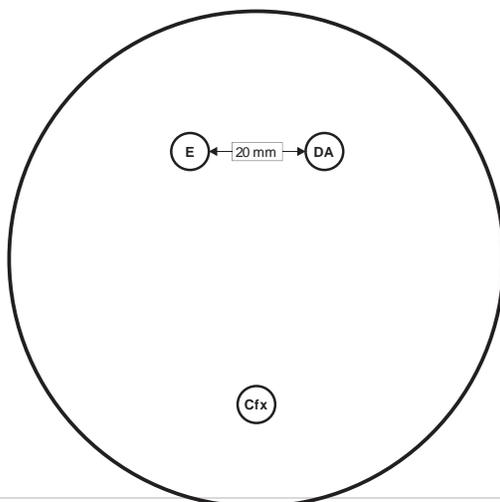


Figura 4. Colocación de discos de E, DA y Cfx para prueba D (arriba) y para CFX-DD (abajo).

7.3. Detección de cepas *S. epidermidis* formadoras de biofilm

La detección de biofilm producido por las cepas de *Staphylococcus epidermidis* se realizó por medio de la siembra directa en placas con medio de agar Rojo Congo (ARC), el cual contiene gelosa de Cerebro-Corazón, (47g/L) complementado con colorante rojo Congo (0.8 g/L) y sacarosa (36 g/L) [48]. La capacidad de formación de la biopelícula se puso de manifiesto mediante el desarrollo de colonias de color negro (prueba positiva) y las cepas no productoras, mostraron un color rojo (prueba negativa).

Este método, descrito por primera vez por Freeman et al, en 1989, se basa en una evaluación cromática que, aunque no es cuantitativo, es rápido, sensible, reproducible y las colonias permanecen viables en este medio diferencial; el mecanismo de acción es desconocido, pero se sabe que el cambio de color solo se produce hacia las últimas etapas de la incubación, lo que sugiere que un producto del metabolismo secundario puede estar involucrado [49].

-Procedimiento:

La siembra se realizó en lotes de aproximadamente 40 cepas cada 2 semanas, preparando 250 mL de medio de cultivo para tal efecto.

7.3.1. Preparación de la solución de colorante rojo congo:

Pesar 0.2g de colorante rojo Congo y disolver en 40 ml de agua desionizada; pasar por un filtro Millipore de membrana de celulosa con diámetro de poro de 0.22µm para esterilizar la solución y depositar en un tubo falcon estéril.

7.3.2. Preparación de medio de cultivo de gelosa BHI:

Pesar en una balanza granataria 11.75 g de agar BHI y 9 g de sacarosa, depositar en un matraz de 500mL, agregar 210 mL de agua destilada, llevar a ebullición hasta disolver completamente y esterilizar a 121 °C durante 15 min. Mantener en baño María a 45°C.

7.3.3. Preparación de ARC:

Vaciar la solución de rojo Congo en el matraz que contiene el medio de gelosa BHI estéril, manteniéndolo a temperatura de 45°C para homogeneizarlo; vaciar en cajas de Petri de 3 divisiones, dejar enfriar a temperatura ambiente e incubar a 37°C por 24 hrs para realizar la prueba de esterilidad y posteriormente almacenar en refrigeración a 4°C, por un periodo no mayor a 15 días.

7.3.4. Siembra de cepas clínicas de *S. epidermidis*:

Tomar una asada de cada una de las cepas de *S. epidermidis* y sembrar en ARC por estría cruzada para tener colonias aisladas. Incubar durante 24 hrs a 37°C, posteriormente otras 24 hrs a temperatura ambiente.

Interpretación de la lectura:

- El desarrollo de colonias de *S. epidermidis* de color negro, de consistencia seca y cristalina, significa prueba positiva.
- Las cepas de *S. epidermidis* con desarrollo de colonias color rojo, significan una prueba negativa;

7.4. Almacenamiento de cepas clínicas de *S. epidermidis*:

Preparar medio de gelosa BHI en cajas de Petri sin división y sembrar masivamente con un hisopo de rayón embebido de la suspensión de cada una de las cepas clínicas ya identificadas e incubar a 37° durante 24 hrs. Agregar 5 mL de leche descremada al 20% estéril para cosechar el crecimiento bacteriano, colocar 1 mL de esta suspensión bacteriana en 5 crioviales, de 2 a 3 crioviales de cada cepa se almacenan a -80°C en un ultracongelador (Revco) y el resto se liofiliza para su conservación adecuada y prolongada, con el propósito de formar un cepario que se use de referencia para futuros estudios.

8. Resultados

8.1. Resultados de la identificación de las cepas bacterianas

Las cepas de *Staphylococcus epidermidis* obtenidas de los dos hospitales estudiados, se sometieron inicialmente a pruebas fenotípicas confirmatorias para verificar que el biotipo reportado por cada institución correspondiera al de *S. epidermidis*; se utilizaron las siguientes pruebas bioquímicas confirmatorias para diferenciar *S. epidermidis* de las otras cuatro especies comunes de *Staphylococcus*:

Tabla 5. Pruebas aplicadas para la identificación de las especies de *Staphylococcus*

Prueba	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. schleiferi</i>
Coagulasa	+	-	-	-	-	-
Manitol	+	-	d	d	-	-
Resistencia a novobiocina	-	-	-	+	-	-
Ureasa	d	+	-	+	d	-

d: 11 a 89% de cepas positivas.

Fuente: Modificada de: Peniche E y Garza R. 1993 [10] y de Demo M et. al. 1999 [44].



Figura 5. a) coagulasa +

b) coagulasa -

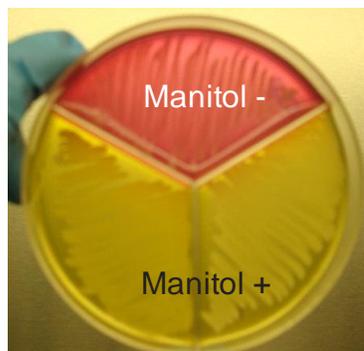


Figura 6. Fermentación de manitol

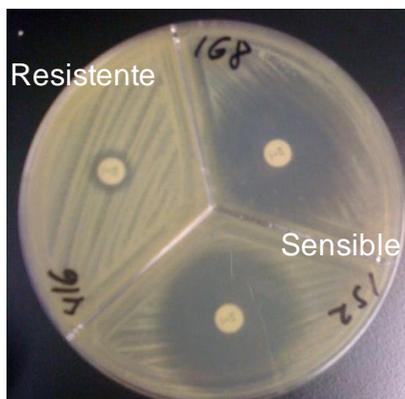


Figura 7. Sensibilidad a novobiocina Figura 8. Producción de enzima ureasa

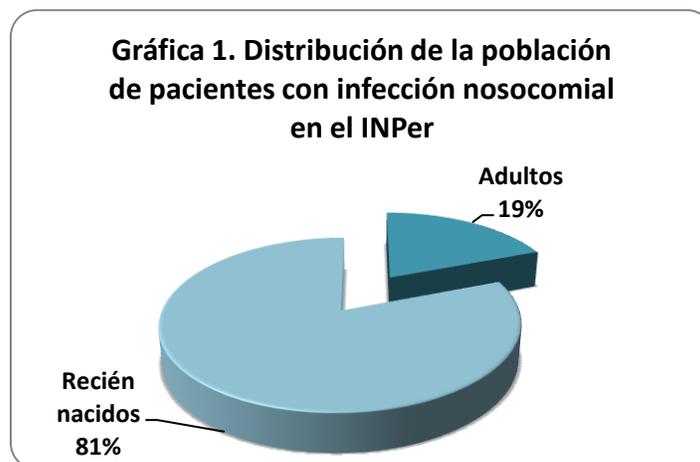
Fotos tomadas en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana.3° piso. Torre de investigación. Facultad de Medicina. UNAM.

Con estas pruebas bioquímicas confirmatorias, se seleccionaron un total de 298 cepas de *S. epidermidis* del INPer y 34 del HGC, que se utilizaron en este estudio.

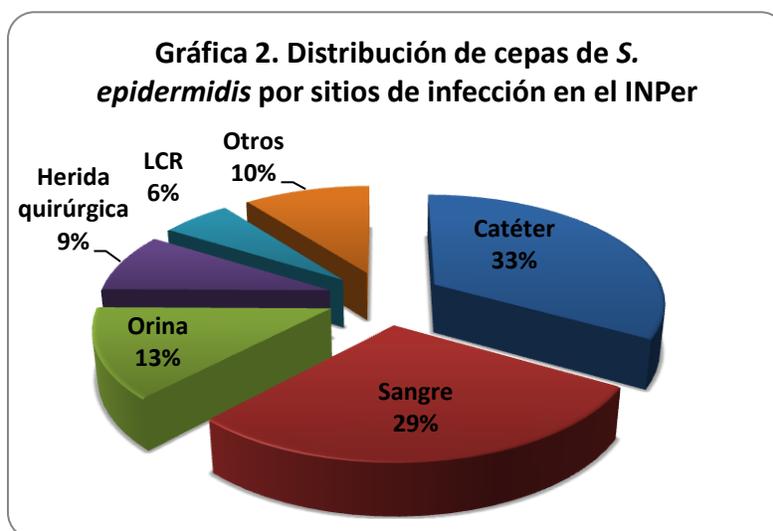
8.2. Cepas bacterianas: población hospitalizada de estudio

De las cepas de *S. epidermidis* seleccionadas por pruebas confirmatorias, la distribución tanto de la población de los pacientes de quienes se aislaron, así como de sus sitios de infección y aislamiento por año fue la siguiente:

La población captada en el INPer es principalmente de recién nacidos, por tratarse de un hospital de concentración, el 19% que corresponde a la población adulta, son madres hospitalizadas que requirieron internamiento porque presentaron algún factor de riesgo durante su embarazo (Gráfica 1).

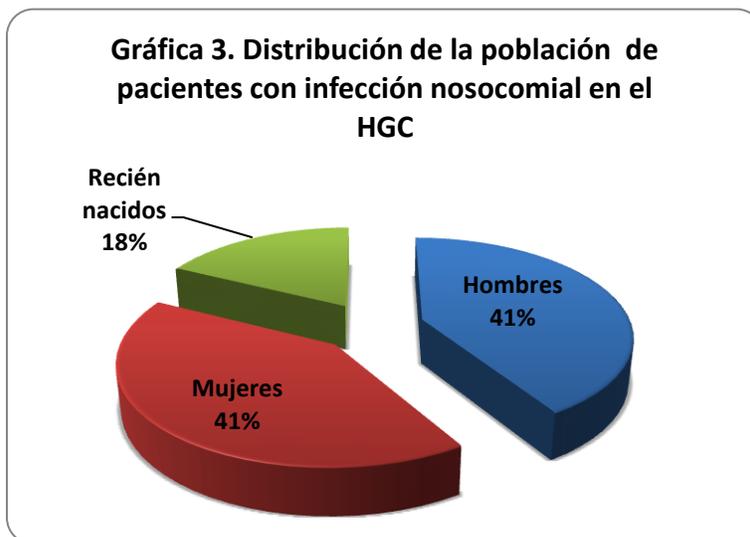


Las cepas de *S. epidermidis* que se aislaron del INPer con mayor frecuencia (33%) fueron las provenientes de catéteres, lo que se puede relacionar con la incidencia de infecciones asociadas a dispositivos médicos (gráfica 2).

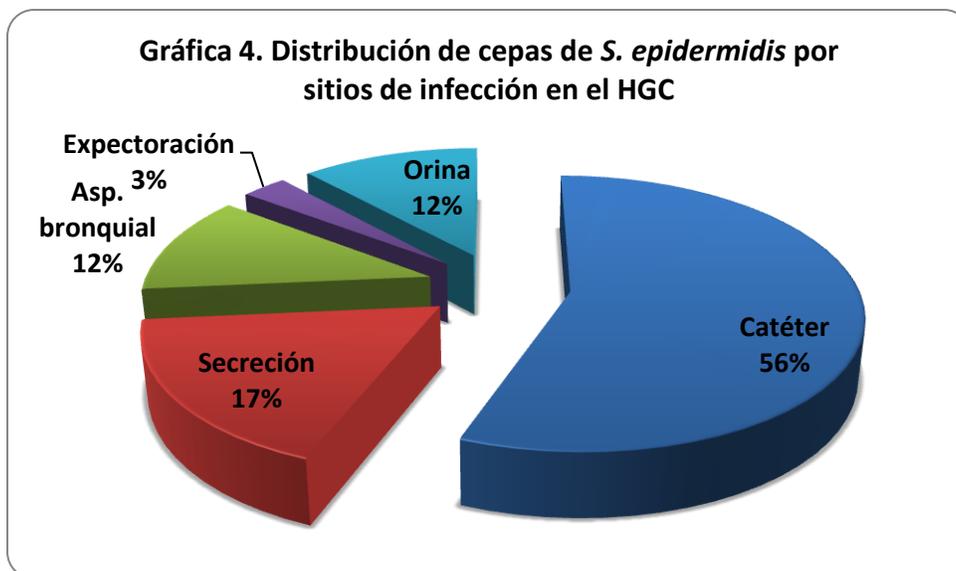


Otros: Conjuntival 3.4%, líquido de ascitis 1.3%, líquido pleural 0.7%, líquido peritoneal 0.7%, aspirado bronquial 0.7%, aspirado de celulitis 1%, absceso 0.7%, aspirado de tejidos blandos 1%, aspirado intraabdominal 0.7%.

En el HGC, un hospital general, la población es más diversa, siendo los recién nacidos los de menor porcentaje, la distribución de los pacientes adultos es la misma, tanto para hombres como para mujeres (gráfica 3).



Igual que en el INPer, las cepas de *S. epidermidis* aisladas de catéter fueron las que se obtuvieron con mayor frecuencia; sin embargo, los demás sitios de infección de donde se obtuvieron las cepas clínicas son diferentes a los del INPer (gráfica 4).



Las cepas de *S. epidermidis* del HGC se aislaron exclusivamente en el año 2005; en el caso del INPer, las cepas se obtuvieron en un periodo de cinco años como a continuación se describe:

Tabla 6. La distribución por año de las cepas de *S. epidermidis* obtenidas en ambos hospitales es la siguiente:

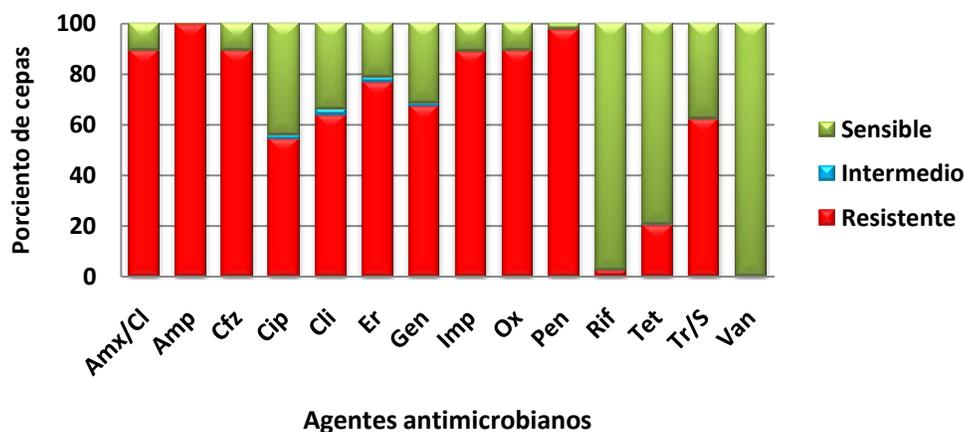
Hospital	Año	# de cepas
HGC	2005	34
INPer	2006	44
INPer	2007	120
INPer	2008	62
INPer	2009	57
INPer	2010	15

8.3. Patrones de sensibilidad/resistencia a diversos agentes antimicrobianos

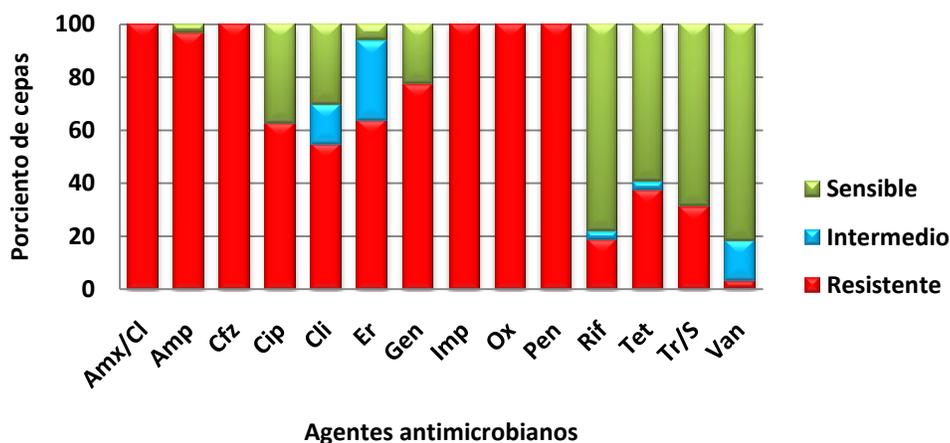
8.3.1. Antibiotipo

El antibiotipo determinado para 14 antimicrobianos mediante el uso de un equipo automatizado MicroScan para ambos nosocomios, se muestra en las gráficas 5 y 6. Se observa que en ambos hospitales existe una elevada resistencia (superior al 80%) para 6 antimicrobianos en común (Amx/Cl, Amp, Cfz, Imp, Ox y Pen).

Gráfica 5. Antibiotipo de cepas de *S. epidermidis* aisladas de pacientes con infección nosocomial del INPer



Gráfica 6. Antibiotipo de cepas de *S. epidermidis* aisladas de pacientes con infección nosocomial del HGC



8.3.2. Sensibilidad a Cefoxitina por el método de difusión simple en disco (CFX-DD)

Según el CLSI, la resistencia a cefoxitina se interpreta como presencia del gen *mecA* (*mecA* +), es decir, que las cepas *mecA*+ son resistentes a oxacilina codificada por el gen *mecA* [46].

De las 298 cepas de *S. epidermidis* aisladas del INPer, el 59% (175) fueron *mecA*+. Las 34 cepas de *S. epidermidis* aisladas del HGC, también el 59% (20) presentaron el gen *mecA* (Ver fig. 9).

8.3.3. Siembra directa en placas tamiz para determinar la resistencia a oxacilina

El 77% (229) de las cepas de *S. epidermidis* del INPer fueron resistentes a oxacilina y del HGC 88% (30). Esta prueba aunque no está recomendada por el CLSI para los SCoN, se realizó para contrastar el mayor número de cepas de *S. epidermidis* que se detectan por esta prueba de menor especificidad, comparativamente con una prueba más específica y confiable como la anterior (CFX-DD) [45, 47].

8.3.4. Prueba de resistencia inducible a clindamicina o “Prueba D”

Para ambos hospitales, INPer y HGC, solo 3 cepas dieron positivo a la Prueba D, 1 y 9% para cada institución, respectivamente. (Ver fig. 9). Estas cepas se reportan como resistentes o como sensibles, pero con resistencia inducible por clindamicina, es decir, que durante la terapia con clindamicina podría desarrollarse resistencia [46].



Figura 9. a) Prueba D negativa y resistencia a cefoxitina; b) Prueba D negativa y sensibilidad a cefoxitina; c) Prueba D positiva y sensibilidad a cefoxitina. Fotos tomadas en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana.3° piso. Facultad de Medicina, UNAM.

8.4. Cepas de *S. epidermidis* formadoras de biofilm

8.4.1. Agar rojo congo

Las cepas de *S. epidermidis* productoras de biofilm forman colonias de color negro en ARC (fig. 10.a), aunque se observaron varias tonalidades desde muy negro hasta rojo muy oscuro. Así mismo, las cepas no productoras de biofilm presentaron colonias rojas (fig. 10.b), con tonalidades desde rojo intenso hasta cercano a rosa (tabla 6) [50]. Para facilitar la cuantificación más precisa de la observación del color de las colonias, éstas no se clasificaron por cada tonalidad, sino que se agruparon y registraron únicamente en colonias rojas o en negras.

De las 298 cepas de *S. epidermidis* aisladas del INPer el 31% (92) formaron colonias de coloración negra en la prueba de ARC y fueron consideradas formadoras de biofilm o positivas (B+); el 69% (206) presentaron colonias de color rojo, consideradas como no formadoras de biofilm o negativas (B-). En el HGC, el 35%, (12) y el 65% (22) de las cepas de *S. epidermidis* fueron productoras y no productoras de biofilm, respectivamente.

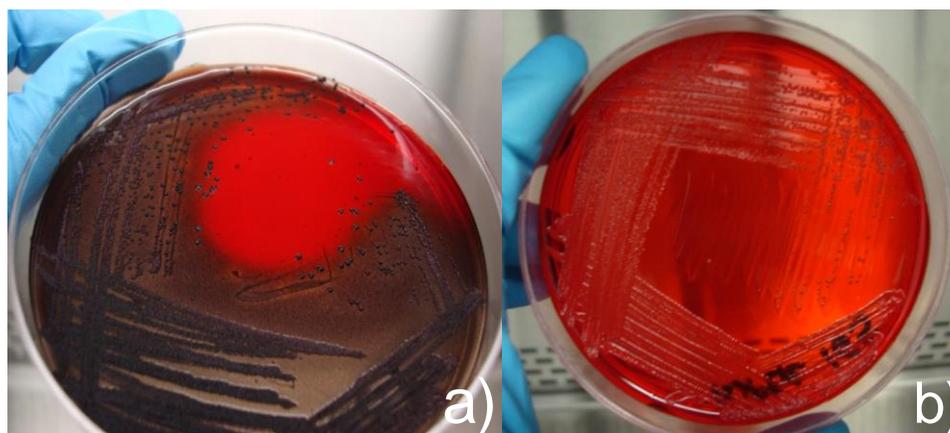
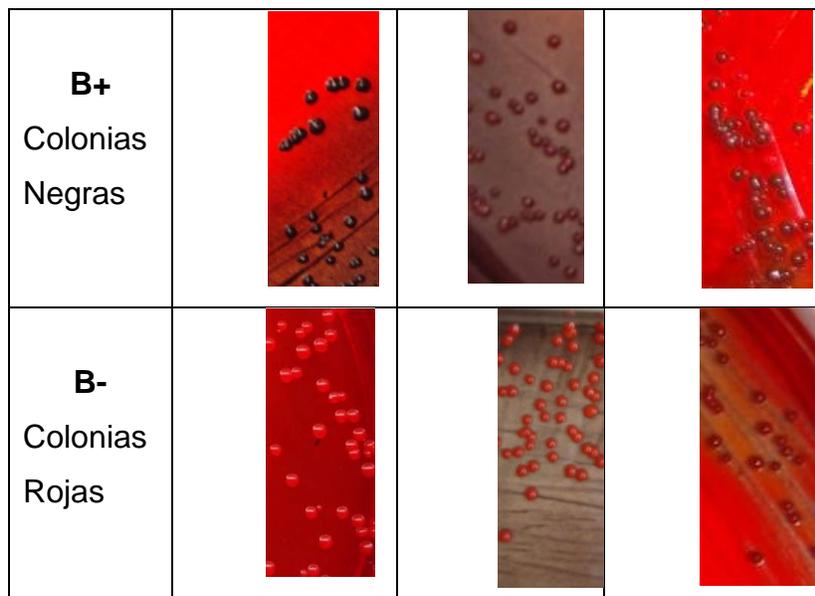


Figura 10. Cepas de *S. epidermidis* en ARC: a) formadora de biofilm b) no formadora de biofilm. Fotos tomadas en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana.3° piso. Torre de investigación. Facultad de Medicina, UNAM.

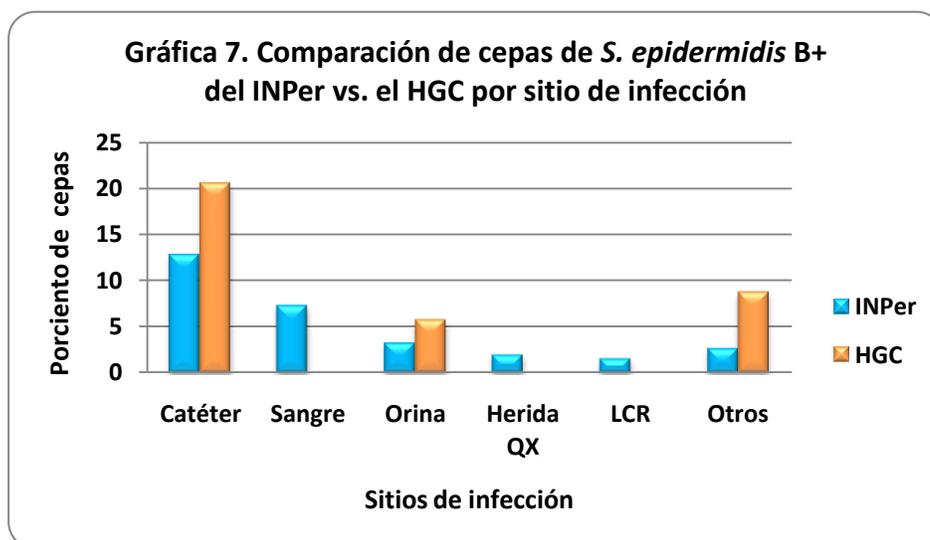
Tabla 7. Escala de tonalidades de colores de las colonias de *S. epidermidis* en ARC.



Fotos tomadas en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana.3° piso. Torre de investigación. Facultad de Medicina, UNAM.

8.4.2. Sitio de infección

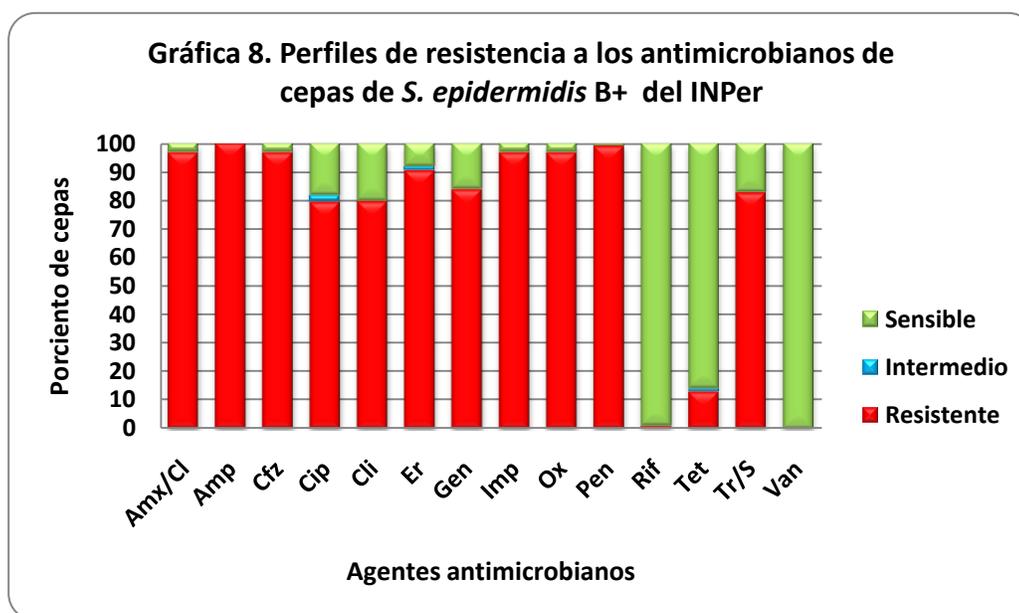
Para ambos hospitales se determinó el porcentaje de cepas productoras de biofilm para los diferentes sitios de infección estudiados; en la gráfica 7 se observa que hay un mayor número de aislamientos de *S. epidermidis* B+ en las aisladas para catéter en ambos hospitales.



8.4.3. Producción de biofilm y sensibilidad antimicrobiana

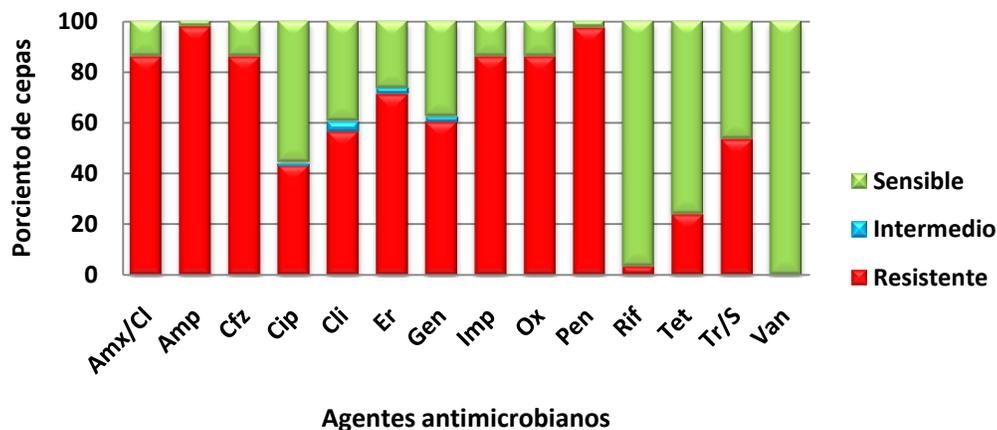
8.4.3.1. Perfiles de resistencia

En ambos hospitales se presenta resistencia hacia la mayoría de los antibióticos usados como se muestra a continuación: en primer lugar, en el INPer, las cepas de *S. epidermidis* B+, presentan resistencia superior al 70% para 11 antibióticos (Amx/Cl, Amp, Cfz, Cip, Cli, Er, Gen, Imp, Ox, Pen y Tr/S) (gráfica 8).



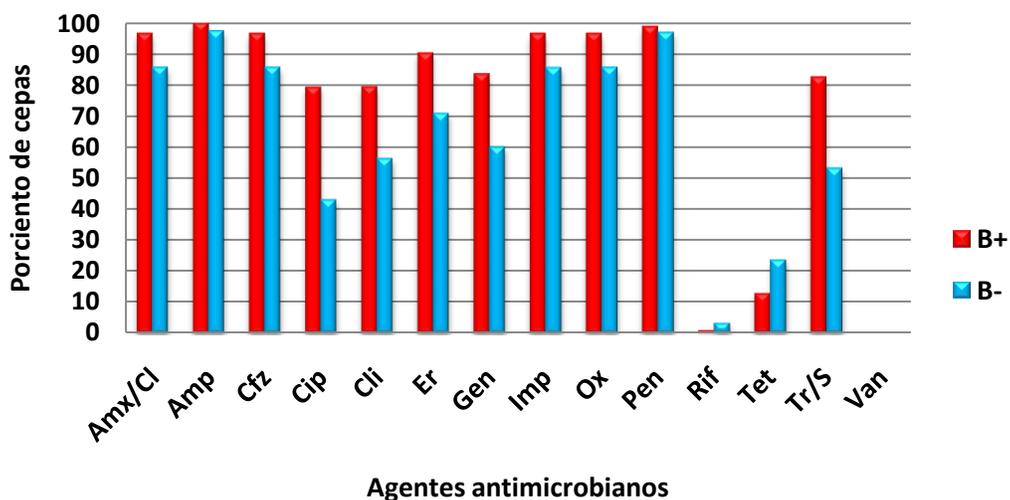
Las cepas *S. epidermidis* B- (gráfica 9) presentan resistencia hacia 7 agentes (Amx/Cl, Amp, Cfz, Er, Imp, Ox y Pen). Los antibióticos con mayor sensibilidad son 3 (Rif, Tet y Van).

Gráfica 9. Perfiles de resistencia a los antimicrobianos de cepas de *S. epidermidis* B- del INPer

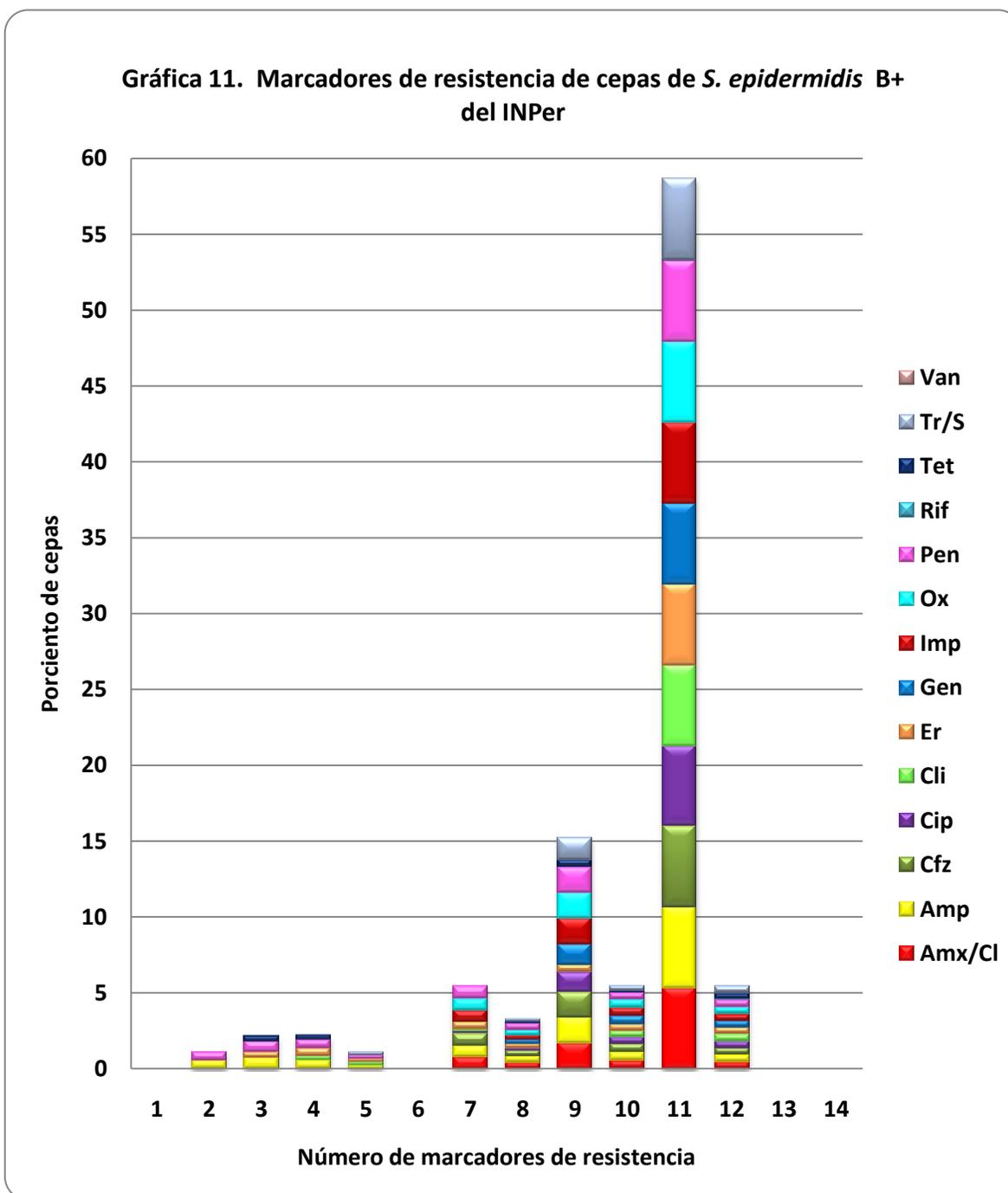


Al comparar cualitativamente los perfiles de resistencia a los diversos agentes antimicrobianos de las cepas *S. epidermidis* B+ contra las B- del INPer, se observó una diferencia en la resistencia mayor al 20% en las cepas B+ para 5 agentes (Cip, Cli, Er, Gen y, Tr/S) y aproximadamente del 10% para 4 agentes (Amx/Cl, Cfz, Imp y Ox) en comparación con las B-; solo en el caso de Rif y Tet, las cepas B- demostraron ser más resistentes (gráfica 10).

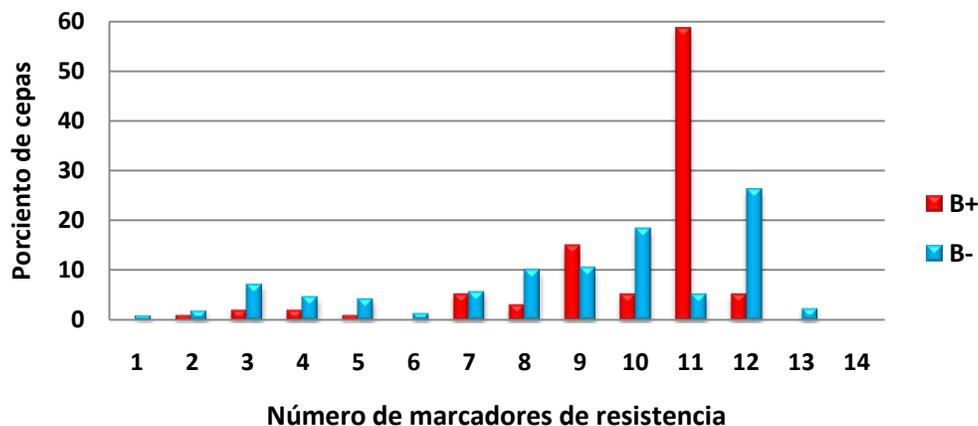
Gráfica 10. Comparación de perfiles de resistencia a los antimicrobianos de cepas de *S. epidermidis* B+ vs. B- del INPer



En cuanto a los marcadores de resistencia, el 59% de las cepas de *S. epidermidis* B+ del INPer, son resistentes a 11 de los 14 antimicrobianos estudiados (Amx/Cl, Amp, Cfz, Cip, Cli, Er, Gen, Imp, Ox, Pen y Tr/S) (gráfica 11). En comparación con las cepas B- en las que solo el 5% son resistentes a 11 de los 14 agentes antimicrobianos (gráfica 12).

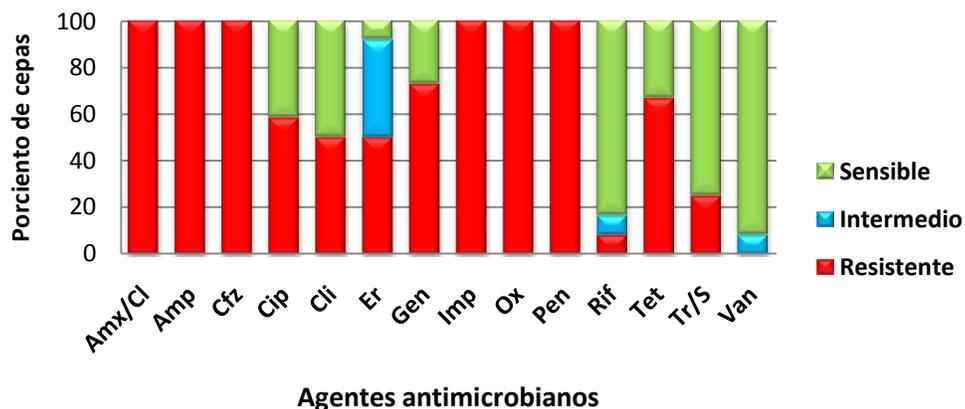


Gráfica 12. Comparación de marcadores de resistencia de cepas de *S. epidermidis* B+ vs. B- del INPer

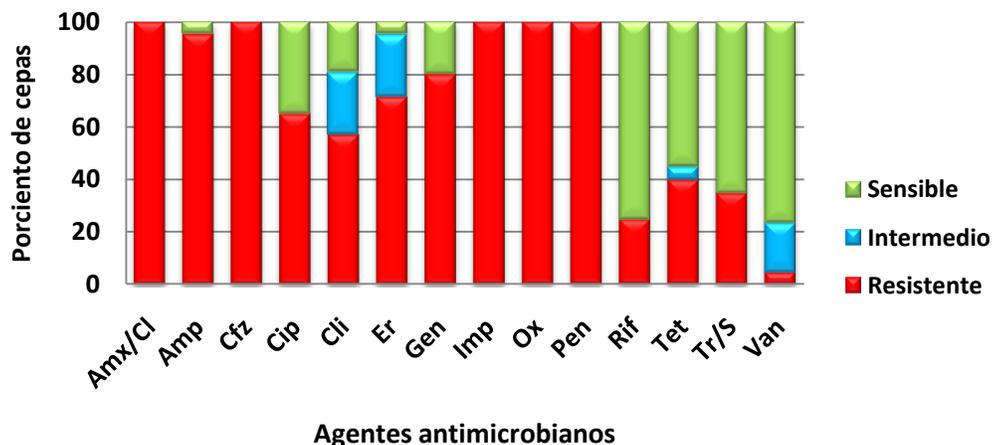


En el HGC, las cepas de *S. epidermidis* presentan perfiles de resistencia hacia 7 agentes (Amx/Cl, Amp, Cfz, Gen, Imp, Ox y Pen) y 8 agentes (Amx/Cl, Amp, Cfz, Er, Gen, Imp, Ox y Pen) con porcentajes superiores al 70% en cepas productoras como en las no productoras de biofilm, respectivamente. Los antibióticos a los cuales las cepas de *S. epidermidis* presentan mayor sensibilidad son 3 (Rif, Tr/S y Van) (gráficas 13 y 14).

Gráfica 13. Perfiles de resistencia a los antimicrobianos de cepas de *S. epidermidis* B+ del HGC

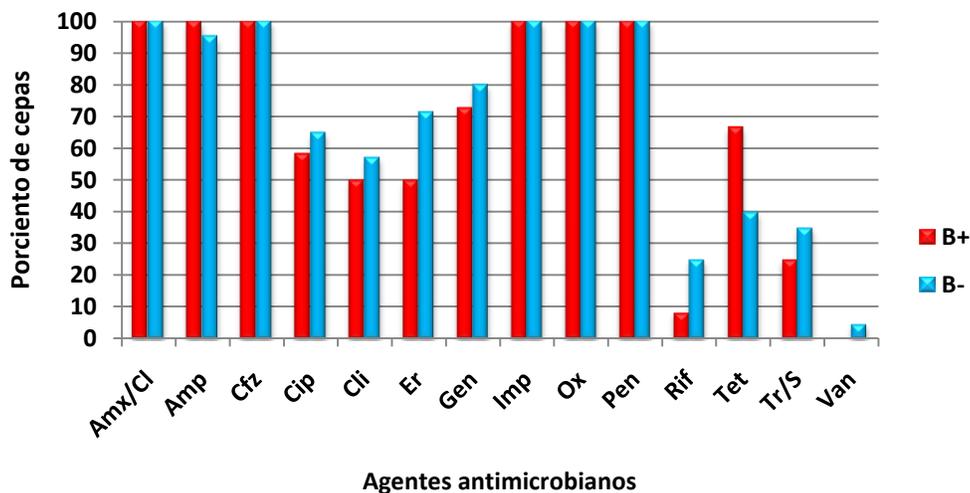


Gráfica 14. Perfiles de resistencia a los antimicrobianos de cepas de *S. epidermidis* B- del HGC

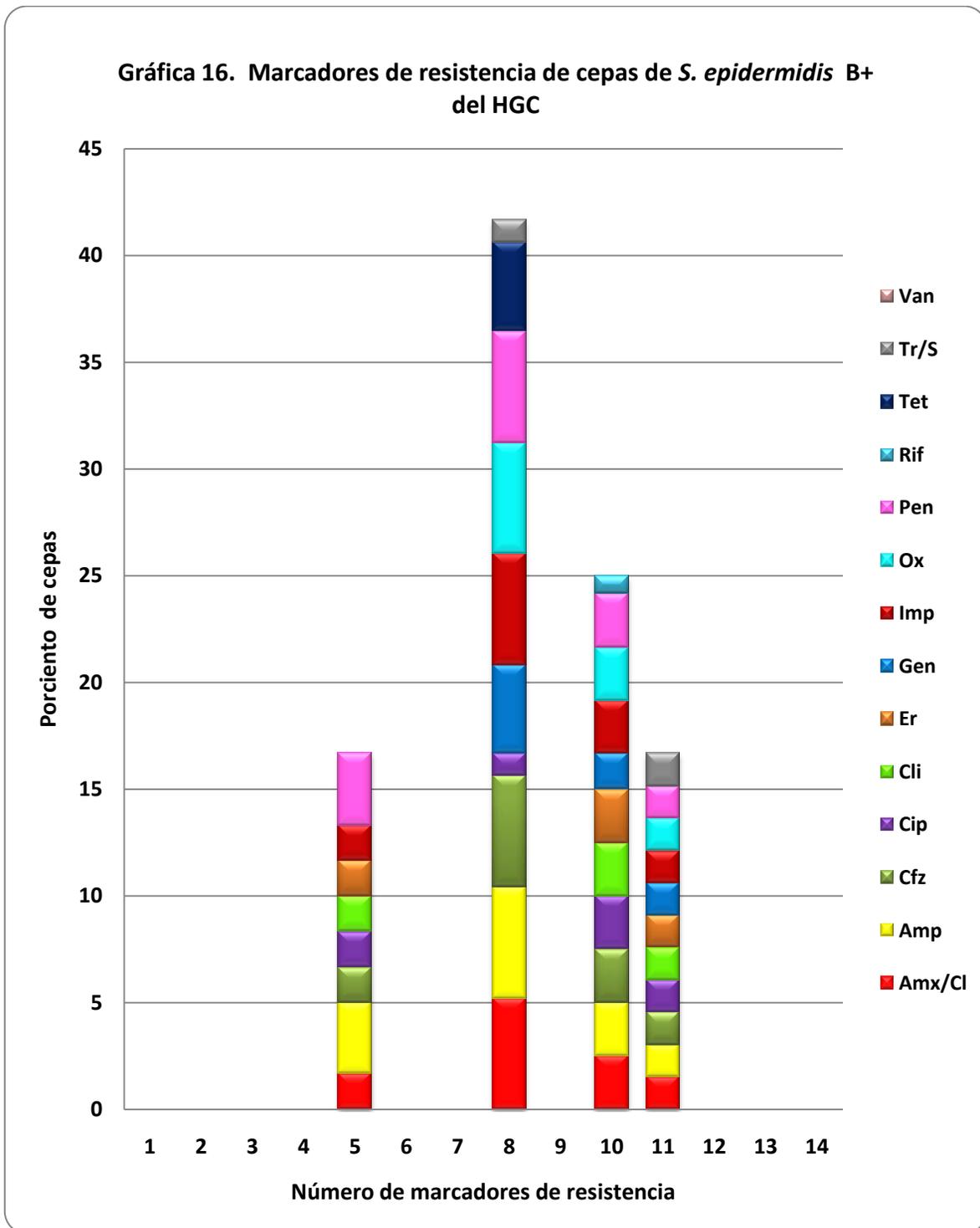


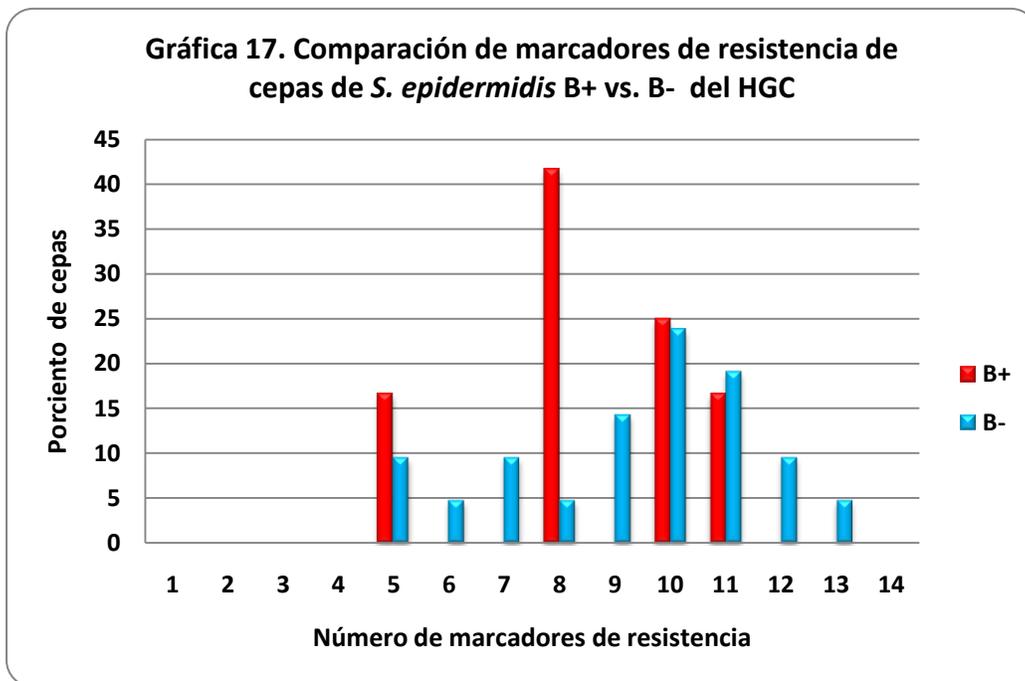
La comparación de los perfiles de resistencia a los antimicrobianos de las cepas B+ contra las B-, mostró que solamente las cepas formadoras son más resistentes para Amp y Tet; sin embargo, las cepas no productoras presentaron mayor resistencia para 7 agentes (Cip, Cli, Er, Gen, Rif, Tr/S y Van), contrariamente a lo observado con las cepas del INPer (gráfica 15).

Gráfica 15. Comparación de perfiles de resistencia a los antimicrobianos de cepas de *S. epidermidis* B+ vs. B- del HGC

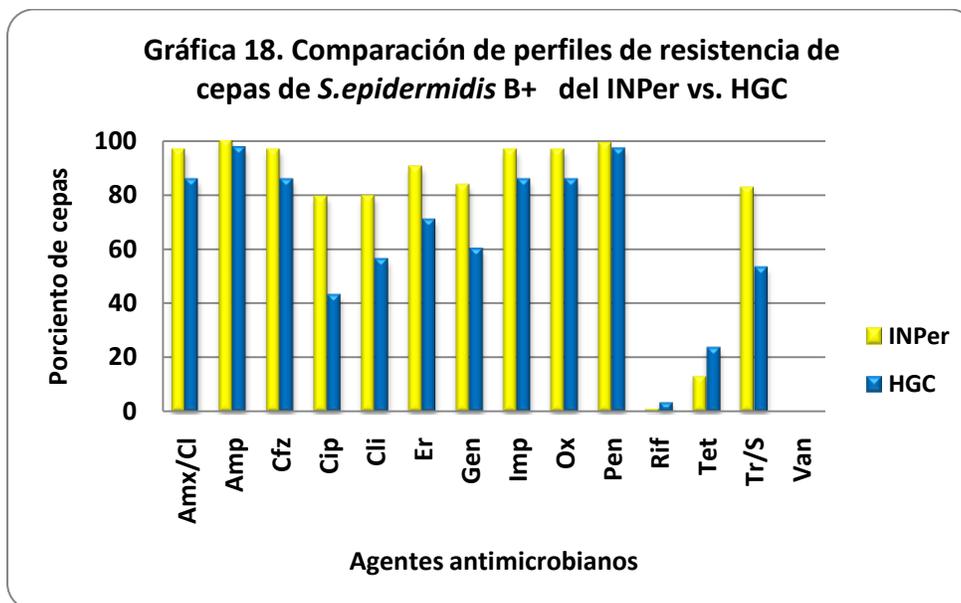


Además, el 42% de las cepas B+ son resistentes a 8 antimicrobianos en comparación con las B- en las que es solo el 5% a los mismos, (gráfica 16 y 17).



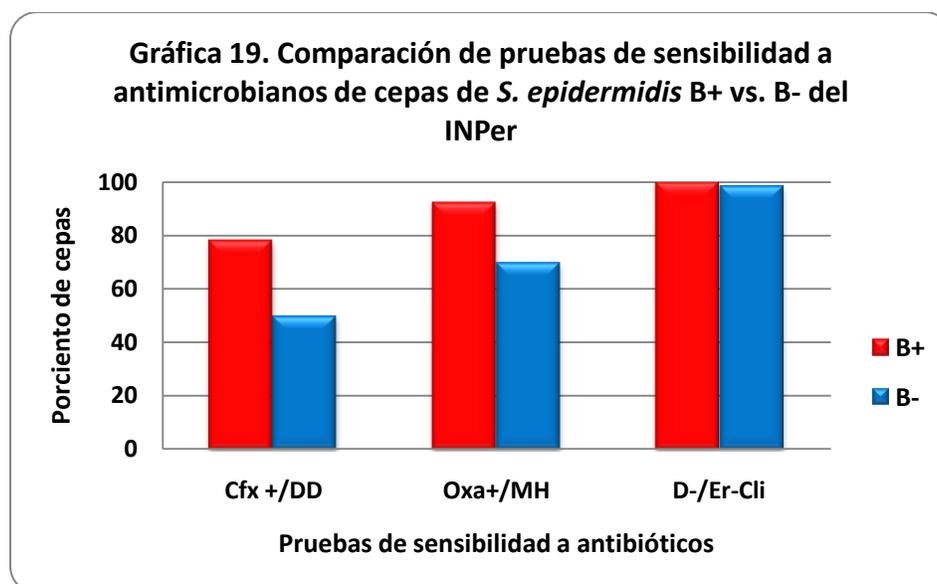


En la gráfica 18, se observa que existe una resistencia ligeramente mayor de cepas de *S. epidermidis* hacia la mayoría de los agentes antimicrobianos en el INPer comparativamente que en el HGC.

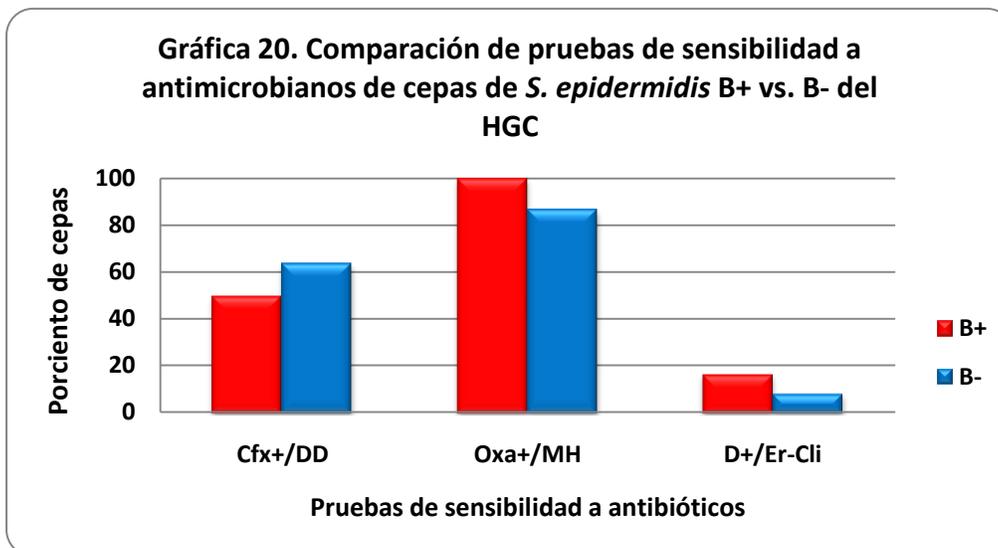


8.4.3.2. Biofilm y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

En la gráfica 19, se observa que existe un mayor porcentaje en el INPer (80%) de cepas de *S. epidermidis* B+ con posibilidad de tener el gen *mecA*+, se corroboraron por su resistencia a cefoxitina en disco mediada por *mecA*, en comparación con las no productoras que fue del 50%. El 94% de las cepas de *S. epidermidis* B+ y el 70% de las B- fueron resistentes a oxacilina en placa y en la “prueba D” ninguna de las cepas B+ ni B- presentaron resistencia inducida a macrólidos inducida por clindamicina (D-);

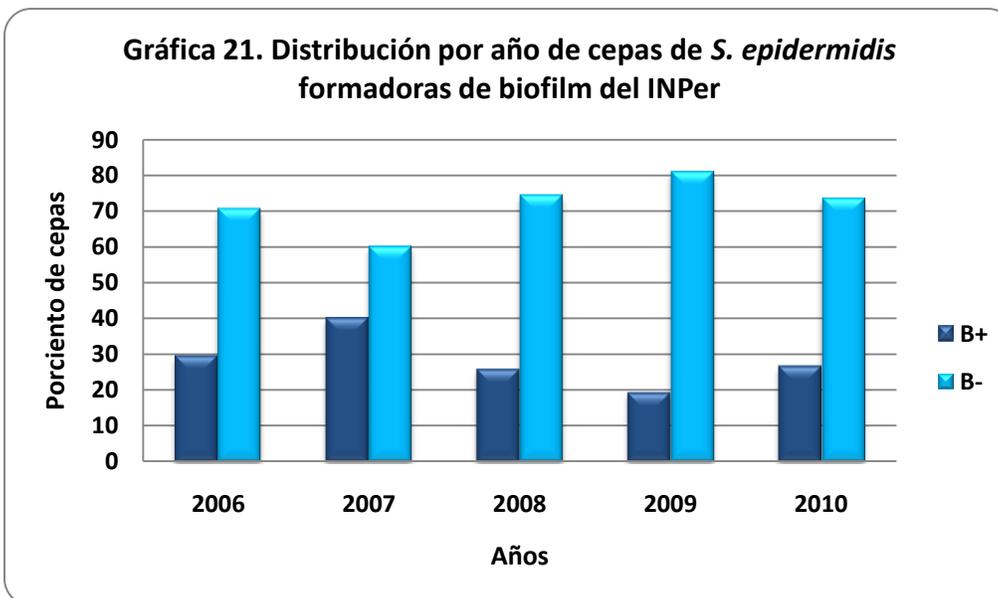


Por el contrario, en el HGC las cepas de *S. epidermidis* que presentan mayor resistencia a cefoxitina en disco son las cepas no productoras de biofilm (64 %); pero las cepas de *S. epidermidis* B+ presentaron el 100% de resistencia a oxacilina en placa y el 17% fueron resistentes a macrólidos inducida por clindamicina, comparadas con las B- con 87% y 8% para estas dos pruebas, respectivamente (gráfica 20).



8.5 Frecuencia anual de cepas de *S. epidermidis* B+ intrahospitalarias

Se observó que no hay gran variación en el porcentaje de aislamiento de cepas de *S. epidermidis* B+ en el INPer para cada año, aunque se observó un pico de aumento en 2007 y enseguida una tendencia a la disminución. Las cepas B- se incrementan a partir de 2008 y disminuyen ligeramente en el 2010 (gráfica 21).



9. Análisis estadístico

Para comparar la diferencia de los porcentajes entre las cepas de *S. epidermidis* B+ y las B- se empleó el análisis estadístico de χ^2 , una probabilidad de $\leq 5\%$ fue considerada como estadísticamente significativa. Los valores estimados de p fueron calculados usando el software EPI-INFO, versión 6.04.

- Número de cepas (%) obtenido de *S. epidermidis* B+ en ambos hospitales:

	INPer	HGC	χ^2	p
b+	30.872	35.29	0.28	0.598442

- Número de cepas (%) resistentes de *S. epidermidis* B+ vs. B- en el INPer:

INPer	B+	B-	χ^2	p
Amx/Cl	93.5	79.1	9.53	0.002016
Amp	100	97.1	1.46	0.227313
Cfz	93.5	79.1	9.53	0.002016
Cip	79.4	43.2	33.49	0.000001
Cli	71.8	49	13.31	0.000263
Er	81.5	61.7	11.5	0.000696
Gen	83.7	60.2	16	0.000063
Imp	92.4	78.6	8.48	0.003597
Ox	93.5	79.1	9.53	0.002016
Pen	98.9	96.6	0.57	0.451825
Rif	1.1	3.4	0.57	0.451825
Tet	13	23.8	4.51	0.033725
Tr/S	82.6	53.4	23.13	0.000001

- Número de cepas (%) resistentes de *S. epidermidis* B+ vs. B- en el HGC:

HGC	B+	B-	χ^2	p
Amx/Cl	91.7	86.4	0.01	0.921709
Amp	100	91	0.5	0.479536
Cfz	91.7	91	0.31	0.57671
Cip	58.3	59.1	0.1	0.747681

Cli	50	54.5	0.06	0.799681
Er	50	68.2	0.45	0.500747
Gen	66.7	72.7	0	0.9815
Imp	91.7	91	0.31	0.5767
Ox	83.3	86.4	0.07	0.788528
Pen	100	95.5	0.31	0.57671
Rif	8.3	22.7	0.34	0.560946
Tet	66.7	36.4	2.86	0.090697
Tr/S	25	31.8	0	0.981519

10. Discusión

Se estudiaron los patrones de sensibilidad/resistencia de todas las cepas de *S. epidermidis* obtenidas de pacientes con IN de dos hospitales, para así obtener un panorama general sobre cuáles son los antimicrobianos que representan un problema de resistencia en cada nosocomio, Así se determinó la sensibilidad de las cepas a 14 antimicrobianos, los cuales son los que más comúnmente se administran en los hospitales contra las bacterias Gram positivas [51]; tal como se observó anteriormente, en ambos hospitales existe una elevada resistencia para 6 antimicrobianos en común, todos pertenecientes al grupo de los β -lactámicos; lo anterior tiene relación con los resultados de las pruebas de resistencia a oxacilina (Cfx/DD y Ox-MH), en ambos hospitales la frecuencia de cepas de *S. epidermidis* resistentes a oxacilina, es decir, resistentes a los β -lactámicos, fue similar en cada prueba, en la primera, las cepas *mecA*+ representaron el 59%, pero para la segunda, se observó que existe más del 15% de cepas resistentes a oxacilina que en la prueba anterior (INPer, el 77% y HGC 88%); lo que significa que el 59% son cepas de *S. epidermidis* resistentes oxacilina mediadas por el gen *mecA*, y el resto son resistentes probablemente por otros mecanismos. Además, en ambos hospitales las cepas sensibles a eritromicina con resistencia inducible a clindamicina, cepas D+, fueron escasas.

Mediante la prueba de ARC, el 35 % de las cepas de *S. epidermidis* aisladas del HGC y 31% del INPer fueron consideradas B+; este último porcentaje es un poco más alto en comparación a otro estudio realizado en una unidad de cuidados intensivos neonatales de un hospital de EUA, en el que las cepas de *S. epidermidis* B+ aisladas fue del 25% [52]; en otros estudios el porcentaje reportado se encuentra entre el 40 y el 50% de cepas B+ obtenidas mediante esta prueba [49, 50, 53]. Las cepas de *S. epidermidis* de estos trabajos fueron aisladas de catéteres, sangre y dispositivos ortopédicos, si se hace una comparación únicamente con las cepas aisladas de catéteres de ambos hospitales, los porcentajes (13% del INPer y 21% del HGC) tampoco se asemejan a los publicados, son menores; estas cepas obtenidas fueron tanto las que más frecuentemente se aislaron, así como las que se detectaron con mayor porcentaje

de B+ de todos los sitios de infección, estos datos son comúnmente obtenidos porque la mayoría de las IN causadas por *S. epidermidis* están relacionadas con la formación de biofilm sobre los dispositivos médicos como los catéteres [5].

En cuanto a los patrones de sensibilidad/resistencia, en el INPer las cepas de *S. epidermidis* B+ se diferencian, principalmente, de las B- en la resistencia a otros grupos diferentes al de los β -lactámicos, como aminogucósidos, quinolonas, etcétera. En el HGC, la resistencia de las cepas de *S. epidermidis* B+ y B- es similar, sin embargo, y en caso contrario a lo visto en el INPer, en algunos antimicrobianos (no beta-lactámicos) las cepas B- fueron más resistentes. Además, en ambos nosocomios, el 59% de las cepas B+ son resistentes a 11 antimicrobianos, lo cual es una cifra alta, pues más del 50% de las cepas además de tener la capacidad de formar biofilm son resistentes a la mayoría de los antibióticos de uso común. Los antibióticos Rif, y Van son a los que afortunadamente las cepas de *S. epidermidis* son más sensibles en ambos hospitales, éstos son los que alternativamente se están usando actualmente para tratar las IN relacionadas a la presencia de biofilm [5, 7, 54].

Se sabe que las cepas productoras de biofilm son más resistentes a la oxacilina [21], en el INPer las cepas resistentes a oxacilina mediada por *mecA*, fueron determinadas con mayor frecuencia en las cepas B+ contrariamente al HGC, donde las cepas que fueron *mecA+* se detectaron en mayor porcentaje en las cepas B-. Sin embargo, estudios realizados en *S. aureus* [55], indican una relación entre la producción de biofilm y la resistencia a meticilina de un 38%, y en los resultados de este trabajo, existe una relación de este tipo, pero en el 80% en el INPer y 50% en el HGC.

11. Conclusiones

Conclusiones

- Se detectó fenotípicamente la formación de biofilm en un total de 332 cepas clínicas de *S. epidermidis*, obtenidas de pacientes hospitalizados con infecciones nosocomiales del Hospital General “Gonzalo Castañeda Escobar” y del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”.
- La diferencia en la frecuencia de cepas de *S. epidermidis* B+ en el INPer y en el HGC, no fue estadísticamente significativa ($p>0.05$).
- En las cepas aisladas de catéter fue donde se encontró con mayor frecuencia, cepas B+ que en otros sitios de infección.
- Las cepas de *S. epidermidis* tanto B+ como B- presentaron el fenómeno de multi-resistencia a los diversos grupos de agentes antimicrobianos estudiados.
- En el INPer, las cepas B+ fueron más resistentes a 11 de los 14 agentes antimicrobianos estudiados, comparativamente con las B- ($p<0.033$). Por el contrario, en el HGC, la diferencia no fue significativa ($p>0.092$) para ningún agente antimicrobiano, es decir, la resistencia es igual, no importa si las cepas forman o no biofilm.
- Se encontró un número más elevado de marcadores de resistencia en las cepas B+ que en las B-.
- La frecuencia de cepas clínicas de *S. epidermidis* B+ resistentes a metilina en el INPer y en el HGC fue de 80 y 50%, respectivamente.

12. Referencias

1. Cáceres GU, Pérez HM, Ugalde JH,* Gamboa IA. Complicaciones asociadas a la colocación de catéteres umbilicales en neonatos. *Rev Mex Pediatr* 2007; 74(2): 70-73.
2. Martínez H, Anaya V, Gorbea MC. Infecciones nosocomiales en un servicio de pediatría de un hospital de tercer nivel. *Rev Mex Pediatr* 2001; 68 (2); 56-65.
3. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49:711–745.
4. Sutherland I. Biofilm exopolisacaridos: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001; 147: 3-9.
5. Mack D, Horstkotte M, Rhonde H, Knobloch J. Coagulase-negative staphylococci. En: Pace JL, Rupp ME, Finch RG. *Biofilms, Infections, and Antimicrobial Therapy*. Taylor & Francis Group. Broken Bound Parkway NW. 2006. pp 109-132
6. Anaya VE, Gómez DJ, Martínez García JM, Galán A, Galicia GV, Veloz I. Nivel de conocimiento de los trabajadores de la salud sobre infecciones nosocomiales y su prevención. *Enf Inf Microbiol* 2009; 29 (1): 20-28.
7. Otto, Michael. Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322: 207-228.
8. Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) 2009. SSA.
9. Staphylococcus y microorganismos relacionados.. En: Murray, Patrick R; et al. *Microbiología Médica*. 4°ed.Elsevier. Madrid España. 2002 pp: 198-212.
10. Peniche E y Garza R: La importancia clínica de los estafilococos coagulasa negativa y su identificación en el laboratorio. *Lab acta* 1993; 5(2): 77-82.
11. Otto Michael. Staphylococcus epidermidis- the 'accidental' pathogen. *Microbiology*. 2009; 7: 555-567.
12. Forbes B, Sahn D, Weissfeld AS. Bailey & Scott. Diagnóstico microbiológico. Medica Panamericana Buenos Aires, Argentina. 2004. Traducción de la 11a ed. de: *Diagnostic microbiology*, 2002
13. Holt, J. G. et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9° edition. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, USA. 1994.

14. <http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish/chapter13.htm>, 2009
15. Otto Michael, Vuong. C. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection* 2002; 4: 481–489.
16. Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, Scherpe S, Davies AP, Harris LG, Horstkotte MA, Knobloch JK, Rangunath C, Kaplan JB, Mack D. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 2007; 28: 1711–1720.
17. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 1996; 178:175–183.
18. Vuong C, Voyich JM, Fischer E, Braughton K, Whitney AR, DeLeo F, Otto M. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cellular Microbiology* 2004; 6(3): 269–275.
19. Jabbouri S. & Sadovskaya I. Characteristics of the biofilm matrix and its role as a possible target for the detection and eradication of *Staphylococcus epidermidis* associated with medical implant infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 59(3): 280-291.
20. Oliveira A & Cunha ML. Bacterial biofilms with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2008; 14: 4, 572-596.
21. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:881-90.
22. Tolker-Nielsen T., Molin S. Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbiol Ecol* 2000, 40, 75-84.
23. Rohde H, Frankenberge S, Zähringer U and Mack D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to

- Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol* 2009; 89(1): 103-111.
24. Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, Knobloch JK-M, Heilmann C, Herrmann M & Mack D. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* 2005; 55: 1883–1895
25. Cramton S. & Götz F. Biofilm development in *Staphylococcus*. En: Ghannoum M. & O'Toole G. *Microbial biofilms*. ASM Press, Washington, D. C. 2004, pp: 64-84.
26. Fey P. & Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiology* 2010; 5(6): 917-33.
27. Mack D, Bart, Bartscht K, Fischer C, Rohde H, De Grahl C, Dobinsky S, Horstkotte MA, Kiel K & Knobloch J. Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Meth enzymol* 2001; 336: 215-239.
28. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48:585–617.
29. Fey P. & Handke L. Current perspectives on the regulation of the *ica* operon and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. En: Pace JL, Rupp ME, Finch RG. *Biofilms, Infections and Antimicrobial Therapy*. Taylor & Francis Group. Broken Bound Parkway NW. 2006. pp 187-203.
30. Gerke C, Kraft A, Süßmuth R, Schweitzer O and Götz F. Characterization of the *N*-Acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* 1998; 273(29): 18586–18593.
31. O'Gara JP & Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol* 2001;50(7):582-7.
32. Vuong C, Gerke C, Somerville G, Fischer ER & Otto M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 2003; 188: 706–718.

33. Christner M, Franke G, Schommer N, Wendt U, Wegert K, Pehle P, Kroll G, Schulze G, Buck F, Mack D, Aepfelbacher M and Rohde H. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol Microbiol* 2009; 75, 187–207.
34. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(9):881-890.
35. Smith Anthony W. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 1539–1550.
36. Fitzpatrick F, Humphreys H and O’Gara JP. The genetics of staphylococcal biofilm formation—will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 967–973.
37. Rodríguez JM y Pascual A. Actividad de los antimicrobianos en biocapas bacterianas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26(2):107-14
38. Høiby N, Bjarnsholta T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Intl J Antimicrobl Agents* 2010; 35:322–332.
39. Donlan RM & Costerton W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2):167–193.
40. Mah TC & O’Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS in Microbiology* 2001; 9 (1): 34-39.
41. Cotter JJ, O’Gara JP, Mack D and Casey E. Oxygen-mediated regulation of biofilm development is controlled by the alternative Sigma Factor B in *Staphylococcus epidermidis*. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75 (1):261–264.
42. Jeffrey B, Kaplan JB, Ragunath C, Velliyagounder K, Fine DH and Ramasubbu N. Enzymatic Detachment of *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2633–2636.
43. Hoiby N, Bjarnsholta T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Intl J Antimicrobl Agents* 2010; 35:322–332.

-
44. Demo, M; Quinones, J; Martin, V. Claves dicotómicas para la identificación de *Staphylococcus* aislados de leche Bovina.; Rev Latinoam Microbiol 1999; 41(2):53-7.
 45. RCC Cabrera CR. Ramírez P.M, Morelos R.R Meléndez H.E. Evaluación Of Three Phenotypic Test vs Duplex (Coa&mecA) PCR For Detection of Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains From Patients With Nosocomial Infections (NI) in a Mexican General Hospital intersc Conf Antimicrob Agents Chemother. (ICAAC) 2006, D-836: 165-167 Abstract
 46. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; twentieth Informational Supplement. 2010. M100-S20. Vol. 30 No.1
 47. Cavalieri SJ. Estafilococos. En: Cavalieri SJ, Harbeck RJ, McCarter YS, Ortez JH, Rankin ID, Sautter R. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. 2005. pp: 103-117.
 48. Arciola CR, Baldassarri L and Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J Clin Microbiol 2001; 39(6): 2151–2156.
 49. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol 1989;42:872-874.
 50. Arciola CR, Campoccia D, Gamberinia S, Cervellatia M, Donatia E, Montanaro L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. Biomaterials 2002; 23:4233–4239.
 51. Cabrera CR, Ramírez PM, Morelos RR, Meléndez HE, Tobías M, Palapa RM, Romero BT, García CME, Hernández PR. Frecuencia Etiológica y Patrones de Sensibilidad/Resistencia de Bacterias Gram Positivas (BGP) involucradas en Infecciones Nosocomiales (IN). Enf Infec Microbiol 2005;25(Supl. 1):S76

-
52. De Silva GD, Kantzanou M, Justice A, Massey R, Wilkinson AR, Day NP and S. J. Peacock SJ. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 2002; 40(2):382–388.
 53. Bozkurt H, Kurtoglu MG, Bayram Y and Berkta M. Correlation of slime production investigated via three different methods in coagulase-negative Staphylococci with crystal violet reaction and antimicrobial resistance. *J Inter Med Res* 2009; 37:121-128.
 54. Cabrera Contreras R. Morelos RR, A. Galicia, Meléndez HE. Antibiotic Susceptibility and Biofilm Production and Correlation to Methicillin Resistant Genotype of *Staphylococcus epidermidis* Strains from Mexican Hospital. San Diego, CA, USA. The 110th. General Meeting of the American Society for Microbiology. 2010: 2036 Abstract.
 55. Kwon AS, Park GC, Ryu SY, Lim DH, Lim DY, Choi CH, Park Y, Lim Y. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 68–72.

Referencias del apéndice

1. Control de crecimiento microbiano. En: Madigan MT, Martinko JM, Parker J; Brock. *Biología de los microorganismos*. 10ª ed. Pearson Educación, S. A., Madrid, 2004. pp: 687-718.
2. McCarter YS. Modo de acción de los antimicrobianos. En: Cavalieri SJ, Harbeck RJ, McCarter YS, Ortez JH, Rankin ID, Sautter R. *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. 2005. pp:3-13.
3. http://bibmed.ucla.edu/ve/edocs_bmucla/MaterialDidactico/farmacologia/sulfamidas.pdf, 2010

4. Mac Faddin, Jean F. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3a ed. Buenos Aires. Médica Panamericana, 2003. pp: 98-109, 397-408.
5. Cavalieri SJ. Estafilococos. En: Cavalieri SJ, Harbeck RJ, McCarter YS, Ortez JH, Rankin ID, Sautter R. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. 2005. pp:103-117.
6. <http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish/chapter13.htm>, 2010
7. http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Rojo+Congo&lang=. 2010
8. <http://books.google.com.mx/books>. 2010.
9. http://www.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/memorias/Extenso/TA/EO/TAO-07.pdf, 2010

13. Apéndice

13.1 Agentes antimicrobianos

Algunos grupos de agentes antimicrobianos utilizados en la práctica clínica son [1-3]:

- **β -lactámicos:**

En las células susceptibles, las moléculas beta-lactámicas se unen a las proteínas de unión de penicilina (PBPs), que son enzimas codificadas por el gen *mecA* y son necesarias para la síntesis de la pared celular. La unión de las moléculas beta-lactámicas a las PBPs, bloquea su función. Esto produce paredes celulares debilitadas o defectuosas y conduce a la lisis celular y muerte; los agentes beta-lactámicos son bactericidas.

- **Macrólidos:**

Los macrólidos (eritromicina, azitromicina, claritromicina, etc.) son generalmente bacteriostáticos. Se adhieren a la subunidad ribosómica 50S provocando la terminación del crecimiento de la cadena proteica y la inhibición de la síntesis de proteínas.

- **Aminoglucósidos:**

Entre los aminoglucósidos más utilizados clínicamente están la estreptomina, neomicina, gentamicina, kanamicina y tobramicina. Tienen un efecto bactericida; Se unen a la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas, ya sea porque esta adhesión al ribosoma evita que la subunidad 30S se adhiera al RNAm o porque la presencia del aminoglucósido en el ribosoma provoca errores de lectura del RNAm, resultando en la inserción errónea de aminoácidos en la proteína o en la interferencia con la capacidad de los aminoácidos para unirse unos con otros.

- **Quinolonas:**

Las quinolonas como: ácido nalidíxico, cinoxacina, norfloxacina, ciprofloxacina, son inhibidores de ácidos nucleicos, son agentes bactericidas, interfieren con la síntesis del DNA debido a que bloquean las subunidades A de la DNA girasa, que es una enzima que participa en el superenrollamiento negativo del DNA relajando la tensión producida por un superenrollamiento positivo. Las quinolonas modernas son derivados sintéticos del ácido nalidíxico.

- **Tetraciclinas:**

Las tetraciclinas (tetraciclina, minociclina y doxiciclina) son bacteriostáticas, inhiben la síntesis de proteínas: se unen a la subunidad 30S del ribosoma y bloquean la adherencia del tRNA. De este modo, se impide el alargamiento de la cadena peptídica en formación, porque ya no se pueden unir más aminoácidos a la cadena de proteínas que está en crecimiento, por lo tanto la síntesis de proteínas es inhibida.

- **Lincosamidas:**

Son inhibidores de la síntesis de proteínas (ejemplos: lincomicina y clindamicina), se unen a la unidad 50S, compiten con el cloranfenicol por el sitio de unión al ribosoma y su acción bacteriostática es similar, inhiben la formación de las uniones peptídicas, pero además producen una rápida destrucción de los polirribosomas.

- **Sulfonamidas:**

Las sulfonamidas, como el sulfametoxazol, son análogos estructurales del ácido paraaminobenzoico (PABA), por lo que actúan compitiendo con él por la enzima dihidropteroato sintetasa, impidiendo la síntesis de ácido fólico; al no contar con éste, la síntesis de ácidos nucleicos se inhibe, por lo que este antimicrobiano tiene un efecto bacteriostático.

- **Diaminopirimidinas**

Estos antimicrobianos, como la trimetoprima bloquean también la síntesis del ácido fólico, también tienen efecto bacteriostático, pero en un lugar diferente en el que actúan las sulfamidas; interfieren con la síntesis de purinas, pirimidinas y algunos aminoácidos al bloquear la formación del ácido fólico inhibiendo a la enzima dihidrofolato reductasa.

- **Anfenicoles**

Son antimicrobianos, como el cloranfenicol, de efecto bacteriostático, inhiben la síntesis de proteínas, se unen a la subunidad ribosomal 50S impidiendo la formación de uniones peptídicas de la proteína en crecimiento.

- **Ansamidas**

Son agentes de efecto bacteriostático, son inhibidores de ácidos nucleicos, como la rifampicina. Inactiva la RNAPolimerasa uniéndose a ésta en forma no covalente, produciendo en la enzima un cambio conformacional que la inactiva, bloqueando así la síntesis de ARN.

- **Glucopéptidos**

También son inhibidores de la síntesis de la pared celular, son bactericidas. Un ejemplo es la vancomicina; es bactericida, su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de la pared impidiendo la formación del peptidoglicano de la pared celular, uniéndose al péptido terminal D-alanina-D-alanina del precursor del peptidoglicano, bloqueando la transpeptidación y alterando la permeabilidad de la pared celular de la bacteria.

13.2. Pruebas bioquímicas [4-6]

13.2.1. Producción de la enzima coagulasa

Permite diferenciar *S. aureus* (coagulasa positivo) del resto de las especies de *Staphylococcus* (coagulasa negativo). La coagulasa, producida por *S. aureus*, se produce en dos formas diferentes: coagulasa libre, (enzima extracelular) producida cuando se cultiva el organismo en caldo nutritivo, y la coagulasa fija o factor de aglutinación, permanece fija a la pared celular de la bacteria.

Se utilizó la prueba en tubo para detectar la presencia de la enzima libre, en la cual la coagulasa libre reacciona con una sustancia similar a la trombina, CFR, para formar un producto semejante a la trombina, que actúa sobre el fibrinógeno para producir un coágulo de fibrina.

Procedimiento

Preparar tubos de ensayo de 10 x 75 mm con 0.5 mL de plasma de conejo e inocular con 2- 4 colonias del microorganismo de prueba de un cultivo del día anterior en medio de gelosa BHI. El tubo se incubó en baño María a 37°C durante 4 horas para tomar la lectura inicial, posteriormente se realizan las lecturas periódicamente hasta las 24 horas de incubación.

Interpretación:

Microorganismo	Cepa	Resultado
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Coágulo en el tubo (+)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	Sin coágulo en el tubo (-)

13.2.2. Fermentación de manitol

El manitol es el único azúcar que puede ser fermentado por las cepas consideradas patógenas del género bacteriano *Staphylococcus*, como *S. aureus*, el cual fermenta el manitol. La fermentación de este azúcar da productos secundarios ácidos, que son detectados en el medio de gelosa ASM, un medio selectivo y diferencial. La producción de ácidos proveniente de la fermentación del manitol se observa por el viraje del indicador de pH presente en el medio, el rojo fenol, el cual tiene un color rojo cereza cuando el pH está arriba de 8.5, vira de amarillo a rojo entre los pH 6,9 a 8,5 y es amarillo brillante a pH 6,9 o más bajo. *S. epidermidis* no fermenta el manitol, por lo que el medio no se tornará de color amarillo, sino que dará lugar a colonias pequeñas rodeadas de un halo púrpura.

Procedimiento:

Preparar medio de gelosa ASM, según la etiqueta del envase del producto, en cajas de Petri de 3 divisiones y sembrar por estría cerrada en toda la superficie del medio las cepas de estudio, posteriormente incubar 24 hrs a 37°C y realizar las lecturas:

Interpretación:

Microorganismo	Cepa	Resultado
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Colonias con pigmento amarillo característico y halo de color amarillo (manitol positivo).
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	Colonias blancas, sin halo amarillo (manitol negativo).

13.2.3. Prueba de sensibilidad a novobiocina

Esta prueba se utiliza como método de rutina para diferenciar a las 2 especies principales del grupo de los SCoN: *S. epidermidis* que es sensible en contraste de *S. saprophyticus* que es resistente.

Procedimiento:

Preparación de suspensión bacteriana: Preparar medio de gelosa BHI en cajas de Petri con 3 divisiones, descongelar las cepas de estudio y sembrar de cada muestra una asada, incubar a 37°C durante 24 hrs. Preparar una la suspensión bacteriana de cada cepa en 2 mL de solución salina al 0.85% y ajustar a una turbidez de 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) en el densitómetro (Densimat). Posteriormente, colocar una asada aproximadamente de 10 uL de la suspensión bacteriana ajustada en una placa de gelosa MH, distribuir la muestra homogéneamente con ayuda de un hisopo de rayón en el agar e incubar a 37°C por 24hrs.

Realizar lectura: se considera sensible con halo de inhibición superior a 16 mm de diámetro.

13.2.4. Producción de la enzima ureasa

La urea es hidrolizada por la acción de la enzima ureasa para dar dos moléculas de amoníaco, en solución, la urea se hidroliza a carbonato de amonio como producto final. La ureasa es una enzima importante relacionada con la descomposición de los compuestos orgánicos; es sintetizada por ciertas bacterias sin tomar en consideración la presencia o la ausencia de la urea.

El amoníaco proporciona alcalinidad al medio, que puede observarse por el vire del indicador de pH rojo de fenol, que cambia de amarillo a rosa intenso a pH 6.8 o mayor.

Procedimiento:

Preparar medio base de gelosa AU en cajas de Petri sin división y sembrar por estría cruzada las cepas de *S. epidermidis* de prueba. Incubar 24 h a 37°C y realizar lectura:

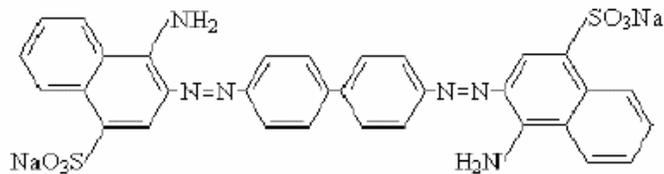
Interpretación:

Microorganismo	Cepa	Resultado	
		Ureasa	Color
Cepa clínica de control interno de <i>S. haemolyticus</i>	INPER 456	-	Amarillo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	+	Rosa intenso

13.3. Rojo congo

Colorante azoico utilizado para probar la presencia de ácido hidroclicórico en el contenido gástrico, se utiliza en histología para determinar la presencia de amiloidosis [7]. También se utiliza para teñir algodón en la industria textil.

El colorante rojo congo en solución neutra o básica es rojo y azul en solución ácida. La forma neutra del colorante es la siguiente [8, 9]:



<http://www.uaemex.mx>

Toxicidad:

- Posible riesgo de efectos adversos sobre el feto.
- Probable carcinogénico.
- Causa irritación en ojos y piel.

13.4 Materiales

13.4.1. Medios de cultivo

- Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI). OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England. Lote: 559821
- Agar Muller Hinton (MH). BBL. Becton Dickinson Diagnostic. Cockeysville, MD. USA. Lote: 1283006
- Agar Sal y Manitol (ASM). OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England. Lote: 613165
- Base agar urea (AU) Difco. Difco laboratorios. Detroit MI. USA. Lote: 131678
- Agar técnico Difco. Difco laboratorios. Detroit MI. USA. Lote: 55282JD.

13.4.2. Reactivos

- Colorante Rojo Congo. Sigma-Aldrich, Co. St. Louis MO. Lote: MKBB0292
- Colorantes para tinción de Gram. Hycel de México. S.A. de C.V. Lote 179982
- Sacarosa. Baker Analyzed. J.T. Baker, México. Lote: D03340
- Cloruro de sodio. Baker Analyzed. J.T. Baker, México. Lote: E19C61
- Oxacilina, sal sódica monohidratada (862µg de oxacilina/mg). Sigma-Aldrich, Co. St. Louis MO. Lote:085K1923
- Discos para antibiograma: novobiocina 5 µg., clindamicina 2µg., eritromicina 15µg. y cefoxitina 30 µg. OXOID LTD., Basingstoke, Hampshire, England
- Plasma de conejo BBL. Becton, Dickinson and Company. Maryland, USA
- Alcohol etílico 96°. Científica Vela Quin. México
- Leche descremada SVELTIS- Nestlé Argentina.
- Aceite de inmersión. Hycel de México. S.A. de C.V.

13.4.3. Equipos e instrumental

- Balanza analítica SA 120 (120 x 0.001g). Scientech. Accuracy Class II. Boulder, Co. USA
- Balanza granataria digital (1200x 0.1g) Ohaus. Florham Park, NJ. USA.
- Microscopio óptico. Carl Zeiss. México
- Gabinete de seguridad biológica Class II, Type A2 Nuaire. Fernbrook Lane Plymouth. MN. USA
- Ultracongelador Ultima II Revco. Revco Technologies Asheville, NC. USA
- Baño de agua BM-80T. Aparatos de laboratorio BG. México
- Incubadora bacteriológica 7750 D. Fisher Scientific. Isotemp Incubator. USA
- Olla de presión 21L Presto. Steele. México
- Liofilizadora Looock 12. Labconco. Labconco Corporation. Kansas city. MO.USA
- Densitómetro Densimat. Biomérieux SA. Francia
- Equipo automatizado MicroScan. American MicroScan, Mahwah, N.J.
- Panel de identificación del biotipo. Positive BP Combo 20; DADE Berhing, Sacramento, CA.
- Panel para determinar el antibiotipo. Positive BP Combo 20; DADE Berhing, Sacramento, CA.)

13.4.4. Consumibles

- Crioviales Corning. Catálogo 430658. Corning inc. NY. USA
- Guantes de nitrilo. Tronex Healthcare Industries. Parsippany, NJ USA
- Unidades de filtración Millex-GS estériles 0.22µm con membrana de ésteres de celulosa MF Millipore. Bedford, MA. USA. Lote RGCN48007
- Bastón de polipropileno estéril para cosechar bacterias TXB181. Daigger
- Hisopos de rayón de mango de plástico estériles. CIID S.A. de C.V.
- Pipetas serológicas estériles de 1, 2 y 5 mL. Greiner bio-one.
- Tubos de ensayo 16x 150 con rosca, 13 x100, PYREX

- Tubos de ensayo 13 x100, PYREX
- Matraces Erlenmeyer de vidrio PYREX de 1L, 500 mL, 250 mL.
- Tubos cónicos tipo falcon de 50 mL estériles
- Cajas de Petri de 100 x 15mm sin división, desechables y estériles. S y M. laboratorios. S.A. de C.V. México.
- Cajas de Petri de 100 x 15mm con 3 divisiones, desechables y estériles. S y M. laboratorios. S.A. de C.V. México.
- Mechero de flama alta tipo Fisher
- Asas bacteriológicas de nicromel y portasas de acero
- Portaobjetos de vidrio de 26 x 76 mm, espesor de 0.8-1.1mm. Corning
- Jeringa de plástico 10 mL Terumo. Terumo Medical Corporation. USA
- Rollo de gasa simple de 91cm x 91cm. Prolaf. Productos La Fuente de Tlaxcala. S.A. de C.V. México.
- Algodón plegable tipo absorbente Chapultepec. Kendall de México. S.A. de C.V. México.