



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

*Staphylococcus aureus*: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y  
DETECCIÓN MOLECULAR POR PCR DE PRODUCCIÓN DE  
COAGULASA (*coa*), DE *BIOFILM* (*icaA*) Y RESISTENCIA A  
ANTIBIÓTICOS (*mecA*) EN CEPAS AISLADAS DE PACIENTES  
CON INFECCIÓN NOSOCOMIAL

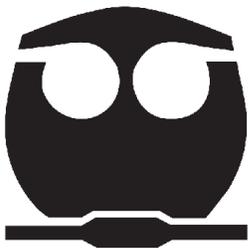
**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

**NORMA GISELA MORALES RAMÍREZ**



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE	Profesor: Raúl Garza Velasco
VOCAL	Profesor: Herminia de Jesús Loza Tavera
SECRETARIO	Profesor: Roberto Cabrera Contreras
1er SUPLENTE	Profesor: Alejandro Camacho Cruz
2do SUPLENTE	Profesor: Ruth Edith Martin Fuentes

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Torre de Investigación 3er piso, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

**ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Roberto Cabrera Contreras

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

Biol. Rubén Morelos Ramírez

**SUSTENTANTE**

Norma Gisela Morales Ramírez

## ÍNDICE

	Página
1. Resumen.....	1
2. Planteamiento del problema.....	3
3. Objetivos.....	4
4. Hipótesis.....	4
5. Marco teórico	
5.1 <i>Staphylococcus</i> .....	5
5.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
5.3 <i>Biofilm</i> (Biopelícula).....	13
5.3.1 Formación del <i>biofilm</i> .....	15
5.3.2 Operón <i>ica</i> .....	17
5.3.3 Determinación de la capacidad formadora de <i>biofilm</i> .....	18
5.4 Antibióticos y resistencia antimicrobiana.....	19
5.4.1 Antibióticos.....	19
5.4.1.1 Grupo $\beta$ -lactámico.....	22
5.4.2 Resistencia a los antimicrobianos.....	23
5.4.2.1 Resistencia a $\beta$ -lactámicos.....	25
5.4.2.2 Gen <i>mecA</i> .....	25
5.4.3 Evaluación de la sensibilidad a los antimicrobianos.....	27

	<b>Página</b>
<b>6. Metodología</b>	
6.1 Caracterización fenotípica	
6.1.1 Identificación bacteriana	
6.1.1.1 Tinción de Gram.....	<b>29</b>
6.1.1.2 Fermentación del manitol.....	<b>31</b>
6.1.1.3 Producción de la enzima catalasa.....	<b>32</b>
6.1.1.4 Producción de la enzima coagulasa.....	<b>33</b>
6.1.2 Detección de la capacidad formadora de <i>biofilm</i> por el método en placa de Agar Rojo Congo (ARC).....	<b>35</b>
6.1.3 Pruebas de resistencia a antibióticos	
6.1.3.1 Prueba de resistencia a cefoxitina en disco por el método de difusión simple.....	<b>38</b>
6.1.3.2 Resistencia a los antibióticos por el método de concentración mínima inhibitoria.....	<b>40</b>
6.2 Detección molecular	
6.2.1 Extracción de ADN.....	<b>41</b>
6.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	<b>42</b>
6.2.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	<b>48</b>
<b>7. Resultados.....</b>	<b>52</b>
<b>8. Análisis estadístico.....</b>	<b>65</b>
<b>9. Discusión.....</b>	<b>69</b>
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>74</b>
<b>11. Referencias.....</b>	<b>75</b>

**Apéndices**

<b>A</b>	Cepas bacterianas.....	<b>82</b>
<b>B</b>	Diseño de oligonucleótidos para la detección molecular por PCR.....	<b>84</b>
<b>C</b>	Validación bioinformática de los oligonucleótidos de <i>icaA</i> utilizados en la prueba de PCR.....	<b>95</b>
<b>D</b>	Materiales y Reactivos.....	<b>97</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>5-1</b>	Tinción de Gram. Morfología microscópica de <i>Staphylococcus spp.</i> .....	<b>5</b>
<b>5-2</b>	Morfología macroscópica de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>6</b>
<b>5-3</b>	Hemólisis producida por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>9</b>
<b>5-4</b>	Micrografía electrónica de barrido del <i>biofilm</i> de <i>S. aureus</i> crecido <i>in vitro</i> .....	<b>15</b>
<b>5-5</b>	Fases de la formación del <i>biofilm</i> .....	<b>16</b>
<b>5-6</b>	Anillo $\beta$ -lactámico.....	<b>22</b>
<b>5-7</b>	Representación del gen <i>mecA</i> .....	<b>26</b>
<b>6-1</b>	Etapas de la PCR.....	<b>44</b>
<b>6-2</b>	Amplificación exponencial del ADN en la PCR.....	<b>45</b>
<b>6-3</b>	Programa AURMECOA (amplificación de <i>mecA</i> y <i>coa</i> ).....	<b>47</b>
<b>6-4</b>	Programa SAICA582 (amplificación de <i>icaA</i> ).....	<b>48</b>
<b>6-5</b>	Electroforesis en gel de agarosa.....	<b>49</b>
<b>6-6</b>	Localización de los amplicones de los genes <i>mecA</i> , <i>coa</i> e <i>icaA</i> en un gel de agarosa al 1%.....	<b>51</b>
<b>B-1</b>	Localización de los amplicones de los genes <i>mecA</i> y <i>coa</i> de <i>S. aureus</i> Mu50, en un gel de agarosa al 1%.....	<b>91</b>
<b>B-2</b>	Localización del amplicón del gen <i>icaA</i> de <i>S. aureus</i> Mu50, en un gel de agarosa al 1%.....	<b>93</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

7-1	Distribución porcentual de cepas clínicas de <i>S. aureus</i> por sitio de infección.....	54
7-2	Distribución porcentual del gen <i>mecA</i> en cepas clínicas de <i>S. aureus</i> .....	54
7-3	Comparación de la resistencia a cefoxitina y oxacilina con base en la presencia del gen <i>mecA</i> en cepas clínicas de <i>S. aureus</i> .....	56
7-4	Porcentaje de formación de <i>biofilm</i> en cepas clínicas de <i>S. aureus</i> .....	58
7-5	Comparación de la formación de <i>biofilm</i> con base en la presencia del gen <i>mecA</i> en cepas clínicas de <i>S. aureus</i> .....	58
7-6	Distribución de las cepas de <i>S. aureus</i> con base en la presencia del gen <i>mecA</i> y formación de <i>biofilm</i> .....	59
7-7	Comparación de la resistencia a cefoxitina y oxacilina con base en la presencia del gen <i>mecA</i> y formación de <i>biofilm</i> en cepas de <i>S. aureus</i> .....	60
7-8	Perfiles de resistencia a antibióticos en cepas de <i>S. aureus mecA</i> (+) (%).....	61
7-9	Perfiles de resistencia a antibióticos en cepas de <i>S. aureus mecA</i> (-) (%).....	61
7-10	Perfiles de resistencia a antibióticos en cepas de <i>S. aureus</i> formadoras de <i>biofilm</i> (%).....	62
7-11	Perfiles de resistencia a antibióticos en cepas de <i>S. aureus</i> no formadoras de <i>biofilm</i> (%).....	62
7-12	Perfiles de resistencia/sensibilidad a antibióticos de cepas de <i>S. aureus mecA</i> (+) B(+) (%).....	63
7-13	Perfiles de resistencia/sensibilidad a antibióticos de cepas de <i>S. aureus mecA</i> (+) B(-) (%).....	63
7-14	Perfiles de resistencia/sensibilidad a antibióticos de cepas de <i>S. aureus mecA</i> (-) B(+) (%).....	64
7-15	Perfiles de resistencia/sensibilidad a antibióticos de cepas de <i>S. aureus mecA</i> (-) B(-) (%).....	64

## ÍNDICE DE CUADROS

5-1	Factores de virulencia del género <i>Staphylococcus</i> .....	7
5-2	Tipos de factores de virulencia de <i>S. aureus</i> y su función.....	9
5-3	Enfermedades causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
5-4	Componentes del operón <i>ica</i> y sus funciones.....	17
5-5	Clasificación de los antibióticos según su origen.....	19
5-6	Clasificación de los antibióticos según su estructura química.....	20
5-7	Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción.....	21
5-8	Antibióticos $\beta$ -lactámicos.....	23
5-9	Componentes del operón <i>mec</i> y sus funciones.....	26
6-1	Interpretación de la prueba de resistencia a cefoxitina (30 $\mu$ g) en cepas de <i>S. aureus</i> (CLSI).....	39
6-2	Elementos de la PCR.....	43
6-3	Oligonucleótidos utilizados en la PCR.....	46
7-1	Características macroscópicas y microscópicas de <i>S. aureus</i> .....	52
7-2	Principales pruebas bioquímicas para la diferenciación de <i>S. aureus</i> de otras especies de <i>Staphylococcus</i> .....	53
7-3	Perfil de resistencia/sensibilidad a cefoxitina y oxacilina en cepas <i>mecA</i> (+) y <i>mecA</i> (-).....	55
7-4	Valores de sensibilidad y especificidad de los métodos de cefoxitina en disco y oxacilina por concentración mínima inhibitoria.....	56
7-5	Fenotipo de formación de <i>biofilm</i> en placas de ARC.....	57
7-6	Porcentaje de resistencia/sensibilidad a dos antimicrobianos en cepas de <i>S. aureus</i> de acuerdo a la presencia del gen <i>mecA</i> y formación de <i>biofilm</i> .....	60
8-1	Prueba No 1.- Comparación entre cepas <i>mecA</i> (+) y <i>mecA</i> (-).....	66
8-2	Prueba No 2.- Comparación entre cepas B(+) y B(-).....	67
8-3	Prueba No 3.- Comparación entre cepas <i>mecA</i> (+) B(+) y <i>mecA</i> (+) B(-).....	67
8-4	Prueba No 4.- Comparación entre cepas <i>mecA</i> (-) B(+) y <i>mecA</i> (-) B(-).....	68

## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARC</b>	Agar rojo Congo
<b>ASM</b>	Agar sal y manitol
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BHI</b>	Infusión de cerebro corazón (Brain heart infusion)
<b>CLSI</b>	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute)
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>CRF</b>	Factor de reacción con la coagulasa (coagulase reacting factor)
<b>HGC</b>	Hospital General "Dr. Gonzalo Castañeda Escobar" (ISSSTE). Cd de México
<b>ISSSTE</b>	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
<b>INPer</b>	Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes", SSa
<b>MSCRAMMs</b>	Componentes de la superficie bacteriana que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz extracelular
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NIH</b>	National Institutes of Health
<b>PIA</b>	Polisacárido de adhesión intercelular (polysaccharide intercelular adhesin)
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
<b>PBP2a</b>	Proteína alterada de unión a la penicilina (altered penicillin binding protein)
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente
<b>SASM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a la meticilina
<b>SCCmec</b>	Casete cromosómico estafilocócico (staphylococcal cassette chromosome)
<b>SCoN</b>	Estafilococos coagulasa negativa
<b>TCP</b>	Placas para cultivo de tejido

## 1. RESUMEN

*Staphylococcus aureus* es una bacteria que produce una gran diversidad de factores de virulencia y es causante de varias enfermedades infecciosas. La importancia del estudio de este microorganismo se debe al surgimiento de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM) y a otros antibióticos, además de su elevada frecuencia en la producción de infecciones nosocomiales.

En el presente trabajo se evaluaron 97 cepas clínicas de *S. aureus*, obtenidas en el Hospital General “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar” del ISSSTE (México, D.F.) durante un periodo de 16 meses (agosto de 2004 a diciembre de 2005), las cuales fueron aisladas a partir de pacientes con infección nosocomial. Al ordenar las cepas de acuerdo al sitio de infección, se encontró al catéter como el principal sitio (40.2%), seguido de vías respiratorias (25.8%), heridas quirúrgicas (10.3%), piel (9.3%), vías urinarias (7.2%), hemocultivo (4.1%) y otros sitios (3.1%). Para la identificación de este microorganismo se utilizó la prueba de la coagulasa en tubo y la detección del gen *coa* por PCR, observándose que un 94% de las cepas produjeron esta enzima y que el gen *coa* se encontraba presente en el 100% de las cepas estudiadas.

Por otra parte, se realizaron dos pruebas fenotípicas para estudiar la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos: el método de difusión en disco utilizando discos de cefoxitina (30  $\mu$ g) y la determinación de la concentración mínima inhibitoria a oxacilina; además, se detectó la presencia del gen *mecA* mediante PCR. Se obtuvo una resistencia a cefoxitina en el 39% de las cepas, y a oxacilina, en el 50%; al realizar el cálculo de sensibilidad y especificidad en ambos métodos, se encontró un 97% de sensibilidad para los dos métodos y una mayor especificidad (92%) en el método de disco de cefoxitina. En la prueba molecular por PCR se detectó la presencia del gen *mecA* en el 35% de las cepas.

Además se evaluó la formación de *biofilm* por el método en placa de agar rojo Congo (ARC), el 56% de las 97 cepas fueron productoras de *biofilm* y en la amplificación por PCR del gen *icaA*, se encontró que todas estas cepas lo presentaron. Al relacionarse a las cepas de acuerdo con la presencia del gen *mecA* y capacidad para formar *biofilm*, se observó el predominio de cepas formadoras de *biofilm*, que no presentan el gen *mecA* (45%).

También se elaboraron perfiles de resistencia a 17 antimicrobianos, utilizando el método de determinación de la CMI. El análisis estadístico incluyó una prueba Z, para comparar los porcentajes de resistencia entre los dos grupos de cepas de *S. aureus* estudiados. Primero se compararon los perfiles de resistencia de las cepas *mecA*(+) y *mecA*(-), obteniéndose una diferencia significativa para 11 antibióticos y observándose una mayor resistencia en cepas *mecA*(+). A continuación se realizó la comparación numérica entre los perfiles de resistencia de las cepas formadoras y las no formadoras de *biofilm*; observándose una diferencia significativa para 8 antibióticos y una mayor resistencia en cepas no formadoras de *biofilm*. Posteriormente, se compararon los perfiles de resistencia de las cepas *mecA*(+) formadoras y no formadoras de *biofilm*, sin encontrarse una diferencia significativa entre estos dos grupos. Finalmente, se analizaron los perfiles de resistencia de las cepas *mecA*(-) formadoras y no formadoras de *biofilm*; sólo se encontró una diferencia significativa en dos antibióticos, por lo que se dedujo que la formación de *biofilm* no es un factor que influye en la resistencia a los antibióticos.

Estas determinaciones son importantes en la detección de cepas de *S. aureus* aisladas a partir de infección nosocomial, ya que nos proporcionan datos útiles sobre su resistencia a los antibióticos y su capacidad formadora de *biofilm*. La aplicación de esta metodología en los hospitales resultaría de gran utilidad para elegir oportunamente un tratamiento adecuado en los casos de infección nosocomial causados por este patógeno.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Qué proporción de cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de infecciones nosocomiales posee el gen *mecA*?

¿Qué relación hay entre la presencia del gen *mecA* y la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos?

¿Cuál de las pruebas fenotípicas para estudiar la resistencia a agentes  $\beta$ -lactámicos (método de difusión simple en disco y determinación de la CMI) es más confiable para una detección indirecta de la presencia del gen *mecA*?

¿Es posible determinar la capacidad formadora de *biofilm* por el método en placa de Agar Rojo Congo (ARC) en cepas clínicas de *S. aureus*?

¿Qué proporción de cepas clínicas de *S. aureus* tiene la capacidad para formar *biofilm*?

¿Qué relación hay entre la presencia del gen *icaA* y la detección de la capacidad formadora de *biofilm* por el método en placa de ARC?

¿Existe alguna relación entre la formación de *biofilm* y la resistencia a los antibióticos?

### 3. OBJETIVOS

Utilizar la técnica de PCR, para determinar la presencia de los genes: *coa*, *icaA* y *mecA*, relacionados con producción de la enzima coagulasa, formación de *biofilm* y resistencia a los antibióticos, en cepas de *S. aureus* provenientes de pacientes con infección nosocomial, de un hospital de la Ciudad de México.

Evaluar la correlación entre las pruebas fenotípicas (coagulasa en tubo, resistencia a cefoxitina por el método de difusión simple, determinación de la CMI de oxacilina y el método en placa de ARC) y las pruebas moleculares (presencia de los genes: *coa*, *mecA* e *icaA*).

Evaluar el método en placa de Agar Rojo Congo (ARC) para detectar la capacidad formadora de *biofilm* en cepas clínicas de *S. aureus*.

Evaluar la relación que existe entre la presencia del gen *icaA* y la formación de *biofilm* en cepas clínicas de *S. aureus*.

Determinar la relación existente entre la producción de *biofilm* y la resistencia a antibióticos.

### 4. HIPÓTESIS

- Si el gen *mecA*, que codifica para la proteína alterada de unión a penicilina, se encuentra presente en el genoma de las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, éstas tendrán una mayor resistencia a los antibióticos del grupo  $\beta$ -lactámico y posiblemente de algunos otros grupos.

- Si el gen *icaA*, que codifica para la enzima N-acetil-glucosaminil transferasa, está presente en el genoma de las cepas clínicas de *S. aureus*, éstas serán capaces de producir *biofilm*.

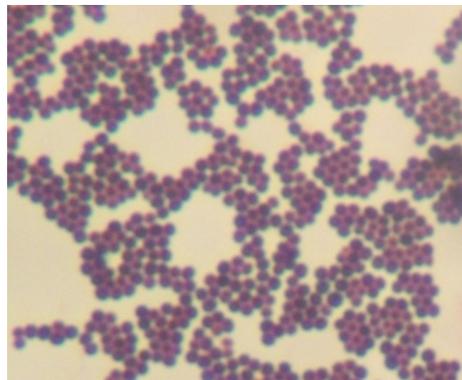
- Si una cepa clínica de *S. aureus* es capaz de formar *biofilm*, entonces tendrá una mayor resistencia y multirresistencia a los antibióticos.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 *Staphylococcus*

El nombre del género *Staphylococcus* fue propuesto por el cirujano inglés Alexander Ogston en 1882, al observar en el microscopio pequeños cocos gram positivos en muestras purulentas de enfermos; el término proviene de las palabras griegas “*Staphyle*”, que significa racimo de uvas y “*kokkos*” que se refiere a un grano o semilla [1,2].

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae*; son bacterias Gram-positivas esféricas que miden de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y forman grupos irregulares (racimos) debido a que poseen varios ejes de división. No forman esporas, carecen de movilidad y son resistentes a la desecación por calor [3]. (Figura 5-1)



**Figura 5-1. Tinción de Gram. Morfología microscópica de *Staphylococcus spp.***

Foto: Norma G. Morales R.

Entre las diferentes enzimas que produce esta bacteria, la catalasa permite diferenciar a *Staphylococcus aureus* de otros géneros de cocos Gram positivos (*Enterococcus sp.* y *Streptococcus sp.*); la coagulasa diferencia a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus intermedius* de otras especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, etc.) [3,4].

Estos microorganismos son quimiorganotróficos, ya que utilizan materia orgánica como fuente de carbono y energía. Con excepción de la especie *S. saccharolyticus*, la cual es anaerobio estricto, las demás son anaerobias facultativas, característica que les permite utilizar un metabolismo aerobio o anaerobio dependiendo del oxígeno disponible en el ambiente [3].

La mayoría de las especies de *Staphylococcus* son capaces de crecer en presencia de altas concentraciones de sal (NaCl 10%) y se desarrollan en un amplio intervalo de temperaturas (10 a 45°C) y pH (4.2 a 9.3); teniendo como condiciones óptimas de crecimiento una temperatura de  $37\pm 1^\circ\text{C}$  y un pH de  $7.3\pm 0.2$  [3,5,6].

Los requerimientos nutricionales de *Staphylococcus* son sencillos, por lo que no necesitan nutrientes especiales y son capaces de crecer en medios de cultivo simples. En medios sólidos se observan como colonias circulares de 1-2 mm de diámetro, con borde entero, convexas, de consistencia cremosa, con una superficie lisa y brillante. El color de las colonias puede variar desde blanco hasta el amarillo intenso, debido a la producción de pigmentos carotenoides en la membrana celular [3,5] (Figura 5-2).



**Figura 5-2. Morfología macroscópica de *Staphylococcus aureus***

Foto modificada: Rodolfo Parulan Jr. 2011

Estas bacterias colonizan comúnmente la piel y tejidos blandos de los seres humanos y de algunos mamíferos; pueden producir enfermedades leves en la piel, abscesos, infecciones piógenas e incluso septicemia. Comúnmente, son relacionados con infecciones nosocomiales asociadas a la colocación de dispositivos plásticos: como catéteres, prótesis, sondas y líneas intravasculares, entre otros [3,5].

El género *Staphylococcus* se compone aproximadamente por 30 especies y pueden clasificarse en dos grupos con base en su capacidad para producir la enzima coagulasa:

- Estafilococos coagulasa positiva: *S. aureus*, *S. intermedius*.
- Estafilococos coagulasa negativa (SCoN): *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. warneri*, *S. hominis*, etc.

De las 30 especies de *Staphylococcus* existentes, sólo tres de ellas son las de mayor importancia clínica: *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, aunque hay otras que también pueden causar infecciones con menor frecuencia. Estos microorganismos poseen diversos factores de virulencia, los cuales se clasifican en 2 grupos: estructurales y no estructurales [3,5-7].

**Cuadro 5-1. Factores de virulencia del género *Staphylococcus***

Estructurales	No estructurales	
	Enzimas	Toxinas
-Ácido teicóico	-Beta lactamasa	-Citotoxinas
-Cápsula	-Catalasa	-Enterotoxinas
-Peptidoglicano	-Coagulasa	-Toxina epidermolítica (Exfoliatina)
-Proteína A	- DNAsa	-Toxina del Síndrome del Choque Tóxico (TSS)
- <i>Biofilm</i>	-Fibrinolisisina	
	-Hialuronidasa	
	-Lipasa	

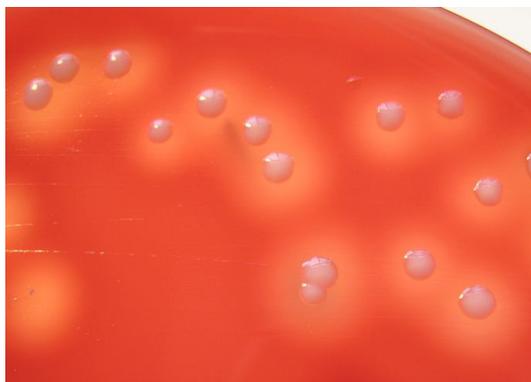
## 5.2 *Staphylococcus aureus*

En 1884, Anton J. Rosenbach aisló dos cepas diferentes de *Staphylococcus* y las nombró de acuerdo a la pigmentación que observó en las colonias: *S. aureus*, de la palabra latina “*aurum*” (oro) para describir el color amarillo del pigmento y *S. albus* (ahora *S. epidermidis*) de la palabra “*albus*” (blanco) [8].

*S. aureus* es una de las tres especies más importantes del género *Staphylococcus* y uno de los principales patógenos que infectan al ser humano. Es oportunista y una causa común de infecciones hospitalarias y comunitarias, que afecta principalmente a grupos de población susceptibles como niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos, frecuentemente hospitalizados [5,7].

Este microorganismo se caracteriza por su capacidad para producir la enzima coagulasa y una DNAsa termoestable (termonucleasa), así como por su capacidad para fermentar el manitol; estas características se utilizan en el laboratorio como pruebas bioquímicas de identificación y permiten la diferenciación entre especies de estafilococos. La identificación de esta bacteria también se puede realizar mediante métodos de biología molecular, tales como la amplificación por PCR de un fragmento del gen *coa*, responsable de codificar la producción de la enzima coagulasa [4,9].

En medio de cultivo sólido, *S. aureus* forma colonias con coloraciones amarillas muy variables, lo que se debe a la producción de pigmentos carotenoides. En gelosa sangre se puede observar hemólisis tipo beta alrededor de las colonias, debido a la acción de hemolisinas [3] (Figura 5-3).



**Figura 5-3. Hemólisis producida por *Staphylococcus aureus***

Fotografía modificada: Nathan Reading 2011

En particular, *S. aureus* posee una gran variedad de factores de virulencia (componentes estructurales, toxinas y enzimas), los cuales facilitan la colonización de nuevos hábitats y le confieren un alto grado de patogenicidad, convirtiéndolo en el agente causal de numerosas enfermedades infecciosas [3,7,10] (Cuadro 5-2).

**Cuadro 5-2. Tipos de factores de virulencia de *S. aureus* y su función**

<b>Componentes estructurales</b>	
<b>Componente</b>	<b>Función</b>
<b>Ácido teicoico (polisacárido A)</b>	Sirve para adherirse a superficies mucosas a través de su unión con la fibronectina; componente mayoritario del tejido conjuntivo.
<b>Cápsula</b>	Inhibe la opsonización y fagocitosis.
<b>Peptidoglicano</b>	Atrae leucocitos polimorfonucleares y activa el complemento. Estimula la producción de pirógenos endógenos.
<b>Proteína A</b>	Inhibe la opsonización y fagocitosis. Tiene afinidad por la porción Fc del anticuerpo IgG.
<b>Componentes no estructurales</b>	
<b>Componente</b>	<b>Función</b>
<b>- Enzimas</b>	
<b>β-lactamasa</b>	Hidroliza el anillo β-lactámico en antibióticos de este grupo.

<b>Catalasa</b>	Evita la acción de los radicales tóxicos al degradar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.
<b>Coagulasa</b>	Cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina; se deposita fibrina en la superficie de los estafilococos, evitando así la fagocitosis.
<b>DNasa</b>	Hidroliza el ADN de bacterias muertas, haciendo que el pus sea más fluido.
<b>Fibrinolisisina</b>	Disuelve los coágulos de fibrina.
<b>Hialuronidasa</b>	Facilita la diseminación de <i>S. aureus</i> al hidrolizar los ácidos hialurónicos del tejido conjuntivo.
<b>Lipasa</b>	Hidroliza los lípidos, promoviendo la diseminación en el tejido cutáneo y subcutáneo.
<b>- Toxinas</b>	
<b>Citotoxinas</b>	Dañan las membranas de diversas células, causando destrucción tisular (hemolisina, leucocidinas y leucocidina de Pantón Valentine).
<b>Enterotoxinas</b>	Estimula el peristaltismo intestinal y actúa sobre el sistema nervioso central, produciendo vómito. Causante del síndrome de intoxicación alimentaria.
<b>Exfoliatina</b>	Producen la descamación generalizada del síndrome de la piel escaldada.
<b>Toxina del síndrome del choque tóxico (TSST-1)</b>	Superantígeno que activa una gran cantidad de linfocitos con una producción masiva de citocinas. La toxina se asocia con fiebre, y afección de múltiples sistemas.

*S. aureus* coloniza habitualmente la piel, garganta y narinas desde los primeros meses de vida; esta colonización puede durar varios años. Aproximadamente entre un 30% y 50% de la población en general es portadora de esta bacteria, lo cual es considerado un riesgo debido a que puede diseminarse con cierta facilidad y posteriormente desarrollar alguna enfermedad infecciosa [11-13].

La infección que ocasiona *S. aureus* en el humano puede ocurrir cuando se ve disminuida la capacidad del sistema inmune o por la ruptura, generalmente traumática, de las barreras físicas (en cirugías, diálisis y colocación de catéteres o dispositivos médicos). La transmisión de esta bacteria se produce por contacto directo y puede causar una gran diversidad de enfermedades a nivel hospitalario y en la comunidad, que van desde pequeñas lesiones en la piel hasta infecciones sistémicas mortales [7,10,14,15] (Cuadro 5-3).

**Cuadro 5-3. Enfermedades causadas por *Staphylococcus aureus***

Sistema	Enfermedades
<b>Sistema digestivo</b>	Intoxicación alimentaria.
<b>Sistema genito-urinario</b>	Cistitis, pielonefritis.
<b>Sistema nervioso</b>	Meningitis.
<b>Sistema esquelético</b>	Osteomielitis.
<b>Sistema respiratorio</b>	Neumonía.
<b>Sistema sanguíneo</b>	Bacteriemia, endocarditis, septicemia.
<b>Piel y tejidos blandos</b>	Abcesos, acné, celulitis, foliculitis, impétigo, infección de heridas, mastitis, síndrome de la piel escaldada.
<b>Multisistémica</b>	Síndrome del choque tóxico.

Se han desarrollado una serie de estrategias para combatir a esta bacteria, una de las cuales es el uso de antibióticos. En los años 40's se introdujo la penicilina, ésta fue muy útil para atacar a *S. aureus*, pero poco tiempo después se comenzaron a reportar cepas resistentes; debido a esto se empezaron a sintetizar nuevos antibióticos. En 1959 se introdujo la metilicina, derivado semisintético de la penicilina, con el fin de combatir a las cepas resistentes. En 1960 se reportó la primera cepa de *S. aureus* resistente a este antibiótico; esta cepa fue llamada *S. aureus* metiliclorresistente (SARM). Una gran parte de las cepas SARM no sólo

son resistentes a los  $\beta$ -lactámicos, sino también a otros tipos de antibióticos, lo cual dificulta su el tratamiento [5].

*S. aureus* puede desarrollar resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos por medio de dos mecanismos: inactivación enzimática del antibiótico, por acción de  $\beta$ -lactamasas y la modificación de las proteínas de unión a penicilina (PBP). Este último es el más importante en cepas SARM y se debe a la adquisición de un elemento genético móvil conocido como casete cromosómico estafilocócico (SCC*mec*), dentro del cual se encuentra el gen *mecA*, responsable de la síntesis de la proteína alterada de unión a penicilina (PBP2a), que tiene baja afinidad por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos [16,17].

En los últimos años, las cepas de SARM han aumentado y en ocasiones forman parte de la población endémica de los hospitales. *S. aureus* es reconocido como uno de los patógenos más importantes causante de infecciones nosocomiales en todo el mundo; las infecciones producidas por esta bacteria están asociadas a una mayor morbilidad y mortalidad que aquellas por *S. epidermidis* y otras especies [18-20].

### 5.3 “*Biofilm*” (biopelícula)

El término “*biofilm*” o biopelícula se refiere a comunidades bacterianas que se encuentran envueltas por una matriz extracelular y con capacidad para adherirse a superficies inertes o vivientes, lo cual constituye un modo de protección que permite la supervivencia de las bacterias en ambientes hostiles; por ejemplo, en los que faltan nutrientes o existe alta osmolaridad, anaerobiosis y bajas concentraciones de antibióticos o componentes del sistema inmune del hospedero (anticuerpos, macrófagos). El sarro dental y la placa residual de tanques y tuberías son algunos ejemplos de *biofilm* [21-22].

Varios son los microorganismos que tienen la capacidad para formar *biofilm*; entre ellos destacan: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus sp.*, *Streptococcus mutans* y *Haemophilus influenzae* [22].

El *biofilm* está compuesto por exopolisacáridos, ácido teicoico, proteínas y productos de la lisis de las bacterias, pero tiene como principal componente al agua, el cual constituye un 97% del contenido total [22,23].

La arquitectura de la matriz del *biofilm* no es sólida, sino que en su interior hay microcolonias rodeadas por canales que permiten el acceso de nutrientes, eliminación de desechos y la comunicación con otras microcolonias. Dentro del *biofilm* hay diferentes microambientes, los cuales tienen diversas concentraciones de nutrientes, oxígeno y pH; estas variaciones en el ambiente inducen que células ubicadas en diferentes regiones, tengan diversos patrones de expresión de genes [22-24].

La formación del *biofilm* depende de muchos factores; se ha observado que condiciones de anaerobiosis, aumento en la concentración de glucosa o cloruro de sodio y presencia de bajas concentraciones de antibióticos en el ambiente, inducen la formación del *biofilm* [22].

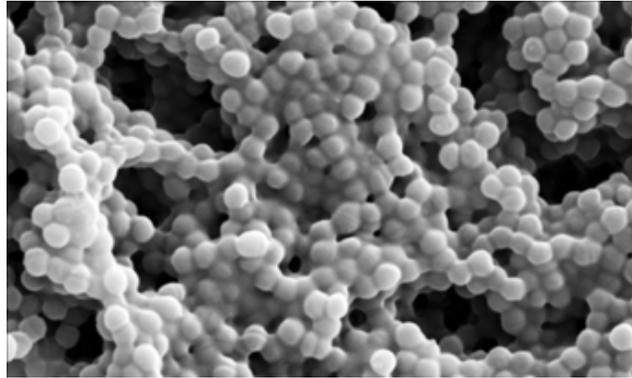
Las bacterias que no forman *biofilm* o que se encuentran fuera de éste, son sensibles a los antibióticos y a los mecanismos de defensa del hospedero; mientras que las células bacterianas que se encuentran dentro del *biofilm*, forman una capa impermeable que retarda la difusión de los antibióticos, disminuyendo su sensibilidad y por lo cual solo se ven afectadas las bacterias que se encuentran en la parte más superficial [24].

Al encontrarse dentro del *biofilm*, las bacterias sacrifican su capacidad de crecimiento y se encuentran en un estado metabólico reducido, por lo que impiden la acción de antibióticos que actúan a nivel de síntesis de proteínas o de la pared celular [22].

Las bacterias que producen *biofilm* pueden causar una gran cantidad de patologías en el ser humano, por ejemplo: caries dental, enfermedad periodontal, otitis media, infecciones del tracto biliar y endocarditis. Estas enfermedades son de curso crónico, persistente y de difícil eliminación [24,25].

Debido a la capacidad de *S. aureus* y *S. epidermidis* para producir *biofilm*, estas bacterias son capaces de adherirse a dispositivos plásticos (prótesis ortopédicas, válvulas cardíacas, marcapasos, lentes de contacto, injertos plásticos y dispositivos intravenosos). De hecho, se considera un factor de virulencia importante para el desarrollo de infecciones relacionadas a dispositivos médicos y representa un serio problema clínico debido a su difícil tratamiento [24-25].

En el ámbito hospitalario, *S. aureus* es la principal causa de septicemia relacionada con dispositivos médicos; esta infección es difícil de tratar y los dispositivos deben ser reemplazados con una mayor frecuencia [21] (Figura 5-4).



**Figura 5-4. Micrografía electrónica de barrido del *biofilm* de *S. aureus* crecido *in vitro***

Imagen modificada: E. Swogger, Center for *Biofilm* Engineering, Montana State University, Bozeman

### 5.3.1 Formación del *biofilm*

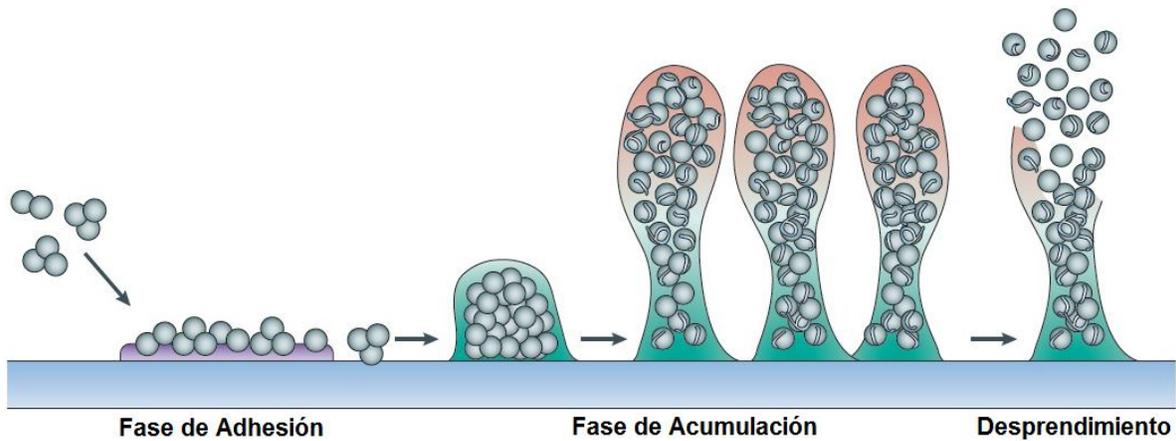
En cepas de *Staphylococcus*, el *biofilm* se forma en 2 fases:

- Adhesión
- Acumulación

a) *Fase de adhesión*.- Cuando un dispositivo médico es insertado, las proteínas presentes en la sangre (fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, etc.) recubren su superficie; cuando la bacteria entra al organismo y expresa los componentes de la superficie bacteriana que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz extracelular (MSCRAMMs), se unen de manera reversible a estas proteínas [21].

Algunos factores fisicoquímicos involucrados en este paso son: hidrofobicidad de la superficie, proteínas de adhesión y polisacáridos capsulares. Después de la adhesión, las bacterias se comienzan a multiplicar y en esta fase, la unión entre bacterias está poco organizada [22].

b) *Fase de acumulación.*- Inicia con la producción del polisacárido de adhesión intercelular (PIA, por sus siglas en inglés), el cual promueve que las bacterias se adhieran entre sí y formen múltiples capas con grupos de células (microcolonias), tomando la morfología característica de torres. En esta fase, adquiere una organización en forma de mosaico [21] (Figura 5-5).



**Figura 5-5. Fases de la formación del *biofilm***

Imagen modificada: Michael Otto, 2009 [26]

Una vez formado el *biofilm*, puede ocurrir un desprendimiento, el cual es útil para que la bacteria se disemine, y a su vez, controla el grosor del *biofilm*. Algunos factores que favorecen este desprendimiento son:

- Fuerzas mecánicas
- Suspensión de la producción de PIA
- Destrucción del *biofilm* por enzimas o surfactantes [21].

### 5.3.2 Operón *ica*

El PIA es un componente muy importante del *biofilm*, es un polímero de glucosamina con una estructura  $\beta$ -1,6-N-acetil-glucosamina y su síntesis está mediada por la expresión del operón *ica*. Este operón se compone por el gen regulador *icaR* y los genes *icaADBC* [21,22] (Cuadro 5-4).

**Cuadro 5-4.- Componentes del operón *ica* y sus funciones**

Componente	Función
<i>icaR</i>	Codifica para un represor transcripcional que regula la expresión del operón <i>ica</i> .
<i>icaA</i>	Codifica para la enzima N-acetil-glucosaminil transferasa, clave para la síntesis del PIA; utiliza UDP-N-acetilglucosamina como sustrato.
<i>icaD</i>	La coexpresión de <i>icaA</i> con <i>icaD</i> aumenta hasta 20 veces la actividad transferasa de la enzima, lo que se refleja en una mayor producción de <i>biofilm</i> .
<i>icaB</i>	Responsable de la deacetilación de la molécula de poli-N-acetilglucosamina, obteniéndose una carga positiva. La superficie celular de las bacterias tiene carga negativa, por lo que el PIA las adhiere entre sí.
<i>icaC</i>	Codifica una proteína de membrana que permite que se sinteticen cadenas más largas del polisacárido (mas de 20 residuos) y está involucrado en la translocación del polisacárido sintetizado a la superficie celular.

### 5.3.3 Determinación de la capacidad formadora de *biofilm*

Varios son los métodos de laboratorio que se han utilizado para la detección de la capacidad formadora de *biofilm*; algunos de ellos son prácticos, como el uso de placas de Agar Rojo Congo (ARC), y algunos otros, requieren de preparaciones más complejas, como la microscopía electrónica [22,27].

#### a) *Método en tubo de Christensen*

Se inocula un tubo que contenga caldo tripticaseína soya con la cepa a examinarse, se incuba durante 48 h a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  y después se decanta el contenido. Posteriormente, con una solución acuosa de azul de tripán (0.4%) se tiñe el *biofilm* adherido. Se elimina el exceso de colorante y se deja secar. Un resultado positivo se observa por la presencia de una capa teñida adherida al tubo [28,29].

#### b) *Método en placa de Agar Rojo Congo (ARC)*

La placa de agar rojo Congo (37 g/L BHI, 50 g/L sacarosa, 0.8 g/L rojo Congo) se inocula por estría cruzada con la cepa a examinarse. Se incuba durante 24 h a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  y después se incuba otras 24 h temperatura ambiente. Un resultado positivo se observa por la presencia de colonias negras [29].

#### c) *Placas para cultivo de tejido, TCP (Tissue culture plate)*

En placas de 96 pozos, se colocan alícuotas de 0.2 mL de caldo tripticaseína soya, inoculado con la bacteria (dilución 1:100, a partir de un cultivo de 18 h) y se incuba durante 18 h a  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . Se retira el caldo y se realizan 4 lavados con 0.2 mL de una solución buffer de fosfatos. Después se utiliza una solución de cristal violeta de Hucker, para teñir el *biofilm* que se haya formado, se retira el exceso de colorante y se deja secar. Por último se obtienen los valores de densidad óptica a una longitud de onda de 570 nm y se compara el valor obtenido, en una tabla que indica la intensidad de la formación de *biofilm* [30].

## 5.4 Antibióticos y resistencia antimicrobiana

### 5.4.1 Antibióticos

El origen de la palabra antibiótico, proviene del griego “*anti*”, que significa contra y “*bios*” que se refiere a la vida. Este término fue propuesto en 1942 por Selman A. Waksman y se utilizó para definir a aquellas sustancias químicas producidas por microorganismos, que a bajas concentraciones, inhiben el desarrollo o destruyen la vida de microorganismos; principalmente son compuestos de peso molecular intermedio o bajo [31].

En la actualidad, el término antibiótico también incluye a aquellas moléculas que no son de origen natural o que fueron modificadas químicamente. Estas moléculas pueden clasificarse de acuerdo a varios criterios (Cuadro 5-5, 5-6).

**Cuadro 5-5 Clasificación de los antibióticos según su origen**

Origen	Características	Ejemplos
<b>Naturales</b>	Son sintetizados por varias especies microbianas	Penicilina G Eritromicina Bacitracina Estreptomina Griseofulvina
<b>Semisintéticos</b>	Moléculas que se producen de forma natural y que posteriormente pasan por un proceso de modificación química	Ampicilina Amoxicilina Cefoxitina Rifampicina
<b>Sintéticos</b>	Moléculas que han sido sintetizadas en su totalidad en un laboratorio.	Sulfonamidas Quinolonas

[31-32]

**Cuadro 5-6 Clasificación de los antibióticos según su estructura química**

Nombre	Ejemplos
<b>β-lactámicos</b>	Ampicilina, Aztreonam, Cefalotina, Cefazolina, Cefepime, Cefoxitina, Imipenem, Meticilina, Meropenem, Penicilina.
<b>Aminoglucósidos</b>	Amikacina, Estreptomicina, Gentamicina, Tobramicina.
<b>Estreptograminas</b>	Quinupristina-Dalfopristina.
<b>Glucopéptidos</b>	Teicoplanina, Vancomicina.
<b>Lincosamina</b>	Clindamicina, Lincomicina.
<b>Macrólidos</b>	Azitromicina, Claritromicina, Eritromicina.
<b>Nitroimidazol</b>	Metronidazol, Tinidazol.
<b>Nitrofuranos</b>	Nitrofurantoína, Nitrofurazona, Furazolidona.
<b>Quinolonas</b>	Ácido nalidixico, Norfloxacin, Ciprofloxacina, Levofloxacina.
<b>Rifamicina</b>	Rifampicina.
<b>Sulfonamidas</b>	Sulfadiazina, Sulfametoxazol, Sulfadoxina.
<b>Tetraciclinas</b>	Doxiciclina, Metaciclina, Tetraciclina.

[33]

Los antibióticos forman un grupo diverso de sustancias con diferentes comportamientos farmacocinéticos y farmacodinámicos. Su mecanismo consiste en ejercer una acción específica sobre alguna estructura o función de la bacteria. (Cuadro 5-7).

**Cuadro 5-7 Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción**

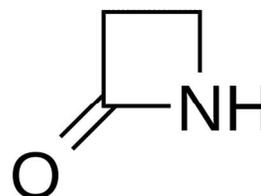
<b>Mecanismo</b>	<b>Descripción</b>	<b>Grupos de antibióticos</b>
<b>Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana</b>	Se inhibe la síntesis del peptidoglicano, por bloqueo del sitio catalítico de alguna enzima, o por la formación de complejos con determinados sustratos.	$\beta$ -lactámicos, glucopéptidos
<b>Inhibición de la síntesis proteica</b>	Se inhibe la traducción del material genético, bloqueando la síntesis de proteínas de la bacteria.	Aminoglucósido Tetraciclina Macrólidos Lincosamina
<b>Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos</b>	Se inhibe la actividad de enzimas dianas específicas, involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos.	Quinolona Rifamicina
<b>Formación de compuestos que dañan el ADN bacteriano</b>	Se forman compuestos inestables que dañan el ADN bacteriano.	Nitrofurano
<b>Acción sobre vías metabólicas</b>	Se inhibe competitivamente la utilización de un metabolito exógeno o endógeno.	Sulfonamidas

[32]

#### 5.4.1.1 Grupo $\beta$ -lactámico

En el año de 1928, Alexander Fleming descubrió la penicilina. Él se encontraba estudiando en su laboratorio las variantes cromógenas de *S. aureus*, después de un fin de semana de descanso, halló una placa de agar en la cual se había desarrollado un hongo que causó la lisis de la bacteria. Posteriormente, logró cultivar al hongo *Penicillium notatum* y demostró que producía la sustancia responsable de lisis a las bacterias, a la cual llamó penicilina. Fue hasta los años 40's cuando se comenzó a producir comercialmente la penicilina G y se utilizó en la terapéutica para tratar muchas infecciones, algunas graves y potencialmente mortales [31,35].

La penicilina G fue el primer representante de los  $\beta$ -lactámicos; este grupo fue nombrado de este modo debido a que su estructura química se caracteriza por poseer un anillo  $\beta$ -lactámico (Figura 5-6). Esta familia de antibióticos es la más numerosa y muy utilizada en la terapéutica actual, presenta escasa toxicidad y posee un amplio margen terapéutico, excepto en casos de alergia [35].



**Figura 5-6.**  
**Anillo  $\beta$ -lactámico**

Su mecanismo de acción consiste en inhibir la última etapa de la síntesis de la pared bacteriana y además induce un efecto autolítico. Estos antibióticos se unen de manera irreversible a las proteínas de unión a penicilina (PBP), las cuales tienen la función de realizar la transpeptidación de los puentes peptídicos que unen entre sí a los disacáridos conformados por N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico, provocando la interrupción de la síntesis de la pared celular. Esto ocasiona el debilitamiento de la pared celular de la bacteria y facilita su ruptura debido a la presión osmótica intracelular [36].

Esta familia de antibióticos es efectiva contra las bacterias Gram positivas, algunas Gram negativas y espiroquetas. No es efectivo contra micoplasmas, debido a que no poseen pared celular, ni contra bacterias intracelulares tales como *Chlamydia* y *Rickettsia* [34,36] (Cuadro 5-8).

**Cuadro 5-8. Antibióticos  $\beta$ -lactámicos**

Penicilinas		Cefalosporinas	
-Penicilina G	-Penicilina V	-Cefalotina	-Cefazolina
-Oxacilina	-Meticilina	-Cefuroxima	-Cefoxitina
-Ampicilina	-Amoxicilina	-Cefotaxima	-Ceftriaxona
-Ticarcilina	-Piperacilina	-Ceftazidima	-Cefepime
Carbapenémicos		Monobactámicos	
-Imipenem	-Meropenem	-Aztreonam	
-Ertapenem			
Inhibidores de las $\beta$ -lactamasas			
-Ácido clavulánico		-Tazobactam	-Sulbactam

[36]

#### 5.4.2 Resistencia a los antimicrobianos

La interacción constante entre las bacterias y los antibióticos ha tenido como consecuencia el desarrollo de mecanismos naturales de resistencia que disminuyen o impiden la acción de los antibióticos en la bacteria. La resistencia a los antimicrobianos representa un grave problema de salud pública que aumenta la mortalidad, morbilidad y los costos de hospitalización de los pacientes [37].

Algunos factores que favorecen el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos son: el uso indiscriminado e inadecuado de los antibióticos y el uso prolongado de éstos en la terapéutica [37]

Existen varios mecanismos de resistencia a los antibióticos en las bacterias Gram positivas, los cuales son:

- 1) *Inactivación enzimática del antimicrobiano.*- Puede ser por hidrólisis o por modificación de su estructura.
- 2) *Modificación del sitio blanco del antibiótico.*- Se produce una reducción de la sensibilidad de la diana frente al antimicrobiano.
- 3) *Sistemas de expulsión.*- Mecanismo por el cual se saca el antimicrobiano del interior celular [36].

Los responsables de los dos primeros mecanismos son genes de resistencia, los cuales se pueden haber originado por mutaciones en el genoma o por la adquisición de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones, secuencias de inserción). La adquisición de material genético se puede realizar por tres mecanismos:

- *Transducción.*- Transferencia de material genético de una bacteria a otra mediada por bacteriófagos.
- *Conjugación.*- Se realiza mediante la transferencia de material genético entre dos células bacterianas. Únicamente se transfiere una cadena de ADN.
- *Transformación.*- Se da en aquellas bacterias que son capaces de adquirir ADN exógeno del ambiente que les rodea e integrarlo a su cromosoma [37].

#### 5.4.2.1 Resistencia a $\beta$ -lactámicos

La resistencia a los  $\beta$ -lactámicos en bacterias Gram positivas se puede deber a 2 mecanismos:

##### 1) *Inactivación enzimática por acción de penicilinasas ( $\beta$ -lactamasas).*

Este tipo de resistencia se da cuando las bacterias adquieren un plásmido, el cual les confiere la capacidad para producir penicilinasas. Estas penicilinasas hidrolizan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, por lo que pierden su capacidad para unirse a las PBP; afectan principalmente a las penicilinas naturales y semisintéticas. Actúan en menor grado contra la meticilina.

El grado de resistencia está correlacionado por la concentración de enzima, afinidad por el  $\beta$ -lactámico y sus propiedades hidrolíticas. La producción de estas enzimas puede ser constitutiva o inducible; en los estafilococos, por lo general son inducibles.

##### 2) *Modificación de las PBP.*

Este mecanismo es muy frecuente en bacterias Gram positivas. Los  $\beta$ -lactámicos deben unirse a las PBP para ejercer su acción, por lo que cambios en las PBP implican una pérdida de afinidad hacia los  $\beta$ -lactámicos y por lo tanto una disminución en su actividad. Este tipo de resistencia es de origen cromosomal y se debe a la adquisición del gen *mecA* [38].

#### 5.4.2.2 Gen *mecA*

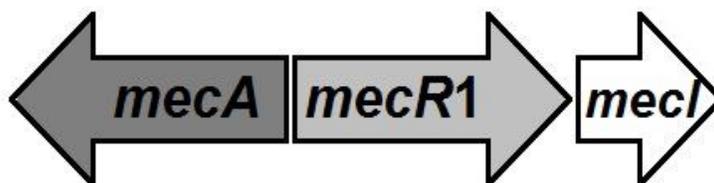
El gen *mecA* es el responsable de la resistencia a la meticilina en cepas de *S. aureus*, se encuentra localizado dentro del operón *mec* y forma parte del casete cromosómico estafilocócico (*SCCmec*); codifica para una proteína alterada de unión a penicilina (PBP2a) [38] (Cuadro 5-9).

La PBP tiene alta afinidad hacia los  $\beta$ -lactámicos, cuando éstos se le unen, provocan la interrupción en la síntesis de la pared celular y su posterior ruptura. La PBP2a presenta baja afinidad hacia estos antibióticos, lo que permite la supervivencia de las bacterias [38].

Al SCC*mec* se le conoce como una isla genética de resistencia a los antibióticos debido a que además de conferir resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, frecuentemente contiene otros genes que le confieren resistencia a tetraciclina, aminoglucósidos y macrólidos. Se han identificado alrededor de 8 tipos de SCC*mec* (I – VIII), los cuales se diferencian por su tamaño y otros elementos genéticos que los conforman [39,40].

**Cuadro 5-9.- Componentes del operón *mec* y sus funciones**

Componente	Función
<i>mecA</i>	Codifica la proteína alterada de unión a la penicilina (PBP2a), involucrada en la síntesis de la pared celular.
<i>mecR1</i>	Codifica una proteína transmembranal que detecta la presencia de antibióticos $\beta$ -lactámicos. Se encarga de inactivar a <i>mecl</i> .
<i>mecl</i>	Codifica un represor transcripcional que regula la expresión de <i>mecA</i> .



**Figura 5-7. Representación gráfica del gen *mecA***

El gen *mecA* es utilizado como marcador molecular para estudiar la resistencia a  $\beta$ -lactámicos, debido a que es una región altamente conservada entre las especies de estafilococos, como SARM y estafilococos coagulasa negativa (SCoN). No se conoce el mecanismo responsable de la transferencia de *mecA*, pero se cree que se realizó por transferencia horizontal entre especies de estafilococos que interactuaron con otros Gram positivos [38].

#### **5.4.3 Evaluación de la sensibilidad a los antimicrobianos**

La sensibilidad a los antimicrobianos en el laboratorio se ha evaluado por medio de diversos métodos, algunos ejemplos son: [37]

a) *Método de microdilución en caldo*.- Se utilizan placas con 96 pozos, en los cuales se coloca caldo inoculado con el microorganismo a estudiarse y el antibiótico a diferentes concentraciones; en este método se establece la concentración mínima inhibitoria (CMI). El uso de pequeños volúmenes facilita el procesamiento de una mayor cantidad de antibióticos, pudiéndose realizar de manera automatizada o semiautomatizada, utilizando programas de computación para realizar los informes de resultados.

b) *Método de difusión en disco (Kirby-Bauer)*.- En este método se utilizan pequeños discos de papel impregnados con el antibiótico a evaluarse, los cuales son colocados en una placa de agar con un inóculo conocido de la bacteria de estudio. Este método se utiliza para bacterias que crecen bien después de 12 a 18 h de incubación y solamente crecerán hasta donde el antibiótico no ejerza su efecto. El diámetro de inhibición se relaciona con una concentración inhibitoria, por lo que su tamaño está en función de la sensibilidad al antibiótico.

c) *E-test*.- Se utilizan tiras con un material inerte que presenta un gradiente de concentración antibiótica progresiva de 15 log en base 2, la cual se difunde en

agar Mueller Hinton; para esta prueba se utiliza un inóculo equivalente a una turbidez de 0.5, en la escala de McFarland. En la placa de agar se forma una elipse de inhibición, en la que se pueden leer los valores de CIM, en el punto de intersección entre la elipse y el eje de la tira.

En el caso específico de detección de resistencia a meticilina existen varios métodos utilizados:

a) *Oxacilina en placa*.- Se utilizan placas de agar Müller Hinton suplementadas con 4% de NaCl y 6 µg/mL de oxacilina. Estas placas se inoculan con una suspensión bacteriana equivalente a una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland. El crecimiento en el medio, indica resistencia hacia este antibiótico.

b) *Método de Kirby-Bauer*.- Se utilizan placas de Mueller Hinton con discos de oxacilina de 1 µg o cefoxitina de 30 µg. Primero se inocula la placa con una suspensión bacteriana equivalente a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland. Posteriormente, se incuba durante 24 horas a 35±1°C. Después de que transcurre el tiempo de incubación, se miden los halos de inhibición y los resultados se interpretan de acuerdo con los valores de corte establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) [47].

c) *Pruebas de aglutinación con partículas de látex*.- Están basadas en una reacción de aglutinación por medio de anticuerpos monoclonales que detectan la presencia de la PBP2a; la presencia de la aglutinación se puede observar a simple vista.

d) *Detección molecular del gen mecA por PCR*.- La técnica de PCR permite la amplificación de un segmento de ADN; en este caso se utilizan oligonucleótidos específicos para detectar la presencia del gen *mecA*, que después se visualiza por medio de una electroforesis en gel de agarosa.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Caracterización fenotípica**

#### **6.1.1 Identificación bacteriana**

El aislamiento y la preidentificación de las cepas bacterianas estudiadas se realizó en el Hospital General “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar” (HGC) del ISSSTE (México, D.F.) utilizando un equipo automatizado MicroScan. Las cepas fueron sembradas en placas con medio de cultivo de gelosa sangre de carnero al 5% y agar sal y manitol, posteriormente se trasladaron al laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Facultad de Medicina (UNAM). A continuación fueron sembradas en placas con gelosa BHI y se incubaron en una estufa microbiológica a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 horas. Para verificar su pureza se procedió a su identificación, estudiando su morfología típica; macroscópica, por medio del crecimiento en agar BHI y microscópicamente, por tinción de Gram. Se realizaron las principales pruebas bioquímicas (catalasa, coagulasa y fermentación de manitol) para confirmar el género y especie a los que pertenecían.

##### **6.1.1.1 Tinción de Gram**

La coloración de Gram es una tinción diferencial clásica que fue desarrollada originalmente en 1884 por Hans Christian Gram, mientras examinaba tejido pulmonar infectado con *Streptococcus pneumoniae*; él observó que unas cepas retenían mejor el colorante que otras. Este método fue modificado en 1921 por Hucker; adicionando oxalato de amonio a la solución de cristal violeta para aumentar su estabilidad [41].

Esta tinción se utiliza de forma rutinaria en los laboratorios de bacteriología para diferenciar las bacterias en dos grandes grupos, Gram positivas y Gram negativas, dependiendo del color que manifiesta la célula al finalizar la tinción. Además, se pueden observar al microscopio: la forma, el tamaño y agrupación de las bacterias.

*Fundamento:*

Se agrega una solución de cristal violeta (0.5%), la cual penetra en la pared celular de todas las bacterias. Después se añade el lugol (mordente) y éste forma un complejo con el cristal violeta, que se queda atrapado dentro de la pared celular. Posteriormente se decolora con una solución de alcohol acetona y finalmente se añade un colorante de contraste (safranina). En las bacterias Gram positivas, el complejo es retenido debido al grosor y al gran contenido de peptidoglicano (50 a 90%) de la pared celular, conservando la coloración morada del colorante primario (cristal violeta). En las bacterias Gram negativas, el proceso de decoloración produce la ruptura de la membrana lipídica externa y el complejo cristal violeta-lugol es liberado, por lo que se tiñe con la tonalidad rosa del colorante de contraste (safranina) [42].

*Procedimiento:*

*Preparación del frotis*

En un portaobjetos limpio y seco, se colocó una gota de agua estéril y utilizando un asa bacteriológica, se preparó una suspensión poco densa con el cultivo de 18 a 24 h de la cepa bacteriana a estudiar; se dejó secar a temperatura ambiente y después se fijó por medio de calor a la flama del mechero. Al enfriar, se añadieron unas gotas de solución de cristal violeta, suficiente para cubrir la muestra. Se dejó actuar durante 1 minuto y con agua se retiró el exceso de colorante. Posteriormente se adicionaron unas gotas de solución de lugol y se dejó actuar durante 1 minuto; después se enjuagó con abundante agua. Se agregaron unas gotas de solución de alcohol-acetona hasta decolorar y se eliminó el exceso con agua. Por último se añadieron unas gotas de solución de safranina y después de 1 minuto se enjuagó. La preparación se dejó secar y se colocó en el microscopio;

utilizando el objetivo de inmersión (100X), se registró la afinidad al colorante de Gram, forma y agrupación de las bacterias estudiadas.

Controles utilizados

Cepas de referencia	Gram	Características
<b><i>Staphylococcus aureus</i> (Mu50)</b> ATCC 700699	Positivo	Cocos Gram positivos
<b><i>Escherichia coli</i></b> ATCC 35218	Negativo	Bacilos Gram negativos

#### 6.1.1.2 Fermentación del manitol

Para la determinación de la fermentación del manitol, se emplea el agar sal y manitol (ASM); éste es un medio selectivo y diferencial que permite el aislamiento de cepas de *Staphylococcus spp.* y algunas cepas halofílicas.

##### *Fundamento:*

El agar sal y manitol contiene una alta concentración de cloruro de sodio (7.5%), por lo que solamente los microorganismos que toleran una alta presión osmótica, son capaces de crecer en este medio de cultivo. Adicionalmente, contiene manitol como hidrato de carbono fermentable. Si el microorganismo utiliza manitol como fuente de energía, éste será metabolizado y se producirán ácidos orgánicos que harán virar al indicador rojo de fenol, de un color rojo al amarillo (intervalo de vire: pH 6.4 a 8) [43].

##### *Procedimiento:*

Se preparó el ASM según las indicaciones del fabricante y se vació en cajas de Petri con 3 divisiones. Utilizando un asa bacteriológica, se sembraron las cepas a evaluar en cada cuadrante y después las cajas fueron incubadas en una estufa

microbiológica a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Posteriormente se realizó la lectura de los resultados. Un resultado positivo a la fermentación de manitol se observó por el vire del indicador de pH en el medio de cultivo, de un color rojo a un color amarillo, por la formación de ácidos orgánicos. Un resultado negativo se observó cuando el medio mantuvo el color rojizo inicial.

Controles utilizados

Cepas de referencia	Manitol	Características
<b><i>Staphylococcus aureus</i> (Mu50)</b> <b>ATCC 700699</b>	Positivo	Vire del rojo de fenol del medio a color amarillo
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i> (RP62A)</b> <b>ATCC 35984</b>	Negativo	Sin cambio de color en el medio. Color rojizo.

### 6.1.1.3 Producción de la enzima catalasa

Esta prueba se utiliza para diferenciar a los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* (catalasa positiva) de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (catalasa negativa).

*Fundamento:*

La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en agua y oxígeno.



Este mecanismo es una forma que tienen las bacterias para protegerse del efecto tóxico que tiene el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se produce por el metabolismo aerobio de los azúcares [4].

*Procedimiento:*

*Prueba directa en el medio de cultivo*

Se añadieron unas gotas de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% directamente sobre las colonias en gelosa BHI. Una reacción positiva se observó por la formación inmediata de burbujas debido a la producción de O<sub>2</sub>; en la reacción negativa no se generaron burbujas.

Controles utilizados

Cepas de referencia	Catalasa	Características
<b><i>Staphylococcus aureus</i> (Mu50) ATCC 700699</b>	Positiva	Formación instantánea de burbujas
<b><i>Enterococcus faecalis</i> [Portman] ATCC 29212</b>	Negativa	No se formaron burbujas

#### 6.1.1.4 Producción de la enzima coagulasa

Se realiza para probar la capacidad de una bacteria para coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa. La realización de esta prueba principalmente se utiliza para diferenciar a *S. aureus* (coagulasa positiva) de otras especies de estafilococos (coagulasa negativa).

*Fundamento:*

La coagulasa actúa sobre algunos constituyentes del suero para producir un coágulo de fibrina, que puede observarse a simple vista. *S. aureus* produce dos tipos de coagulasa:

a) *Endocoagulasa o coagulasa ligada*.- Ésta se encuentra unida a la pared celular de la bacteria y actúa sobre el fibrinógeno, provocando la formación de coágulos al mezclar una suspensión bacteriana con plasma citratado; se detecta por un procedimiento en portaobjetos.

b) *Exocoagulasa o coagulasa libre*.- Esta coagulasa actúa por activación de un factor de reacción con la coagulasa (CRF). Se forma un complejo coagulasa-CRF que reacciona con el fibrinógeno formando un coágulo; se determina mediante la prueba en tubo de ensayo [4].

*Procedimiento:*

*Prueba en tubo*

Se colocaron 0.5 mL de plasma de conejo en varios tubos de ensayo de 13x100 mm y se inocularon con varias colonias de un cultivo de 18 a 24 h de la cepa a evaluarse. Los tubos se incubaron en un baño de agua a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ , efectuando una lectura preliminar a las 4 h y realizando una la lectura final a las 24 h; en caso de que no haya formación de coágulo en la primera lectura. Las cepas coagulasa positiva formaron un coágulo en fondo del tubo, mientras que las cepas coagulasa negativa no formaron ningún coágulo.

Controles utilizados

Cepas de referencia	Coagulasa	Características
<b><i>Staphylococcus aureus</i> (Mu50) ATCC 700699</b>	Positiva	Formación de un coágulo definido
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i> (RP62A) ATCC 35984</b>	Negativa	Ausencia de coágulo

### 6.1.2 Detección de la capacidad formadora de *biofilm* por el método en placa de Agar Rojo Congo (ARC)

El método en placa de Agar Rojo Congo (ARC) fue descrito por Freeman en 1989, es el procedimiento cualitativo más rápido y sencillo, que se utiliza para la detección de la capacidad formadora de *biofilm*. Se realiza como método alternativo al método en tubo de Christensen, el cual tiene un procedimiento más laborioso [29].

Esta técnica originalmente fue utilizada para evaluar la formación de *biofilm* en cepas de *Staphylococcus epidermidis*, pero se ha propuesto que también pueda ser utilizada en *Staphylococcus aureus*, debido a la importancia de las infecciones que produce este microorganismo [44].

Se han hecho un gran número de modificaciones al método original en placa de ARC de Freeman, para adaptar la prueba a *S. aureus*, entre las cuales se encuentran:

- Cambio de la composición del medio
  - Adición de glucosa
  - Cambio del medio base [45]
- Extensión del tiempo de incubación de 48 a 72 horas, debido a que *S. aureus* tiene una síntesis de polisacáridos más lenta en comparación a *S. epidermidis* [46].

#### *Fundamento:*

El método se basa en favorecer la producción de *biofilm*, al utilizar un medio enriquecido y suplementarlo con sacarosa. No se conoce con exactitud el mecanismo por el cual las colonias toman una coloración negra al desarrollarse en este medio, pero se tiene la hipótesis de que está involucrado un producto secundario del metabolismo de azúcares o la interacción del rojo Congo con algún polisacárido componente del *biofilm* [29].

*Procedimiento:*

Se utilizó una formulación con 2% de glucosa, 2% de sacarosa y 0.8 g/L del colorante rojo Congo, recomendada para cepas clínicas de *S. aureus* [45].

*-Preparación de la solución de glucosa o sacarosa al 33.3%*

Se pesaron 50 g de glucosa o sacarosa y se disolvieron en 60 mL de agua desionizada. Después el volumen se llevó a 150 mL utilizando una probeta de 500 mL. La solución se esterilizó por filtración, utilizando una membrana de ésteres de celulosa, con diámetro de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore). El filtrado se guardó en un frasco de vidrio limpio y estéril.

*-Preparación de la solución de rojo Congo (para 125 mL de ARC)*

En un vaso de precipitados de 50 mL, se pesó 0.1 g de colorante rojo Congo, utilizando una balanza analítica. Se transfirió a un frasco de vidrio y se añadieron 20 mL de agua desionizada para disolver el colorante. El frasco se cerró con un tapón de algodón y posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

*-Preparación del ARC (para 125 mL de medio)*

Utilizando una balanza, se pesó 5.87 g de agar BHI en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. El medio se reconstituyó con 90 mL de agua desionizada y se calentó en el mechero para disolverlo. Después se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Dentro del gabinete de bioseguridad clase II, al matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía el agar BHI se le añadieron las siguientes soluciones: solución de Rojo Congo (20 mL), 7.5 mL de la solución de glucosa al 33.3% y 7.5 mL de la solución de sacarosa al 33.3%. Después se homogeneizó la mezcla y se vació en cajas de Petri con 3 divisiones.

NOTA: El ARC que se utilice en esta prueba, deberá ser de reciente preparación.

*-Evaluación de la capacidad formadora de biofilm*

Se sembró una colonia por estría cruzada para obtener colonias aisladas y la caja se incubó dentro de una estufa microbiológica a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 24 h. Transcurrido este tiempo se realizó la primera lectura y posteriormente la caja se mantuvo a temperatura ambiente. La segunda y tercera lectura se realizaron a las 48 y 72 horas respectivamente.

Un resultado positivo se observó por la presencia de colonias negras sobre las placas de ARC en un periodo máximo de 72 horas. La prueba se consideró negativa cuando las colonias sobre el medio, presentaron un color rojo.

Controles utilizados

Cepas de referencia	Producción de <i>biofilm</i>	Características
<b><i>Staphylococcus aureus</i> (Mu50) ATCC 700699</b>	Positivo	Colonias color negro
<b><i>Staphylococcus aureus</i> HGC 3</b>	Negativo	Colonias color rojo

### **6.1.3 Pruebas de resistencia a antibióticos**

#### **6.1.3.1 Prueba de resistencia a cefoxitina en disco por el método de difusión simple**

En esta prueba, se coloca un disco impregnado con cefoxitina (30µg) en una placa de Mueller Hinton con inóculo. Las cepas bacterianas susceptibles al antibiótico no crecen en la zona en donde se difundió el antibiótico y se observa un halo de inhibición. El tamaño del halo de inhibición, interpretado por su diámetro en mm, es un indicador de la resistencia o sensibilidad de esta bacteria al antibiótico [37].

##### *Procedimiento*

En un tubo de ensayo de 13x100 mm con 3 mL de solución salina estéril al 0.85%, se preparó una suspensión bacteriana utilizando un cultivo con crecimiento de 18 a 24 h a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ . La turbidez de la suspensión se ajustó a 0.5 unidades de McFarland, utilizando un densitómetro (Densimat, BioMérieux). Posteriormente se humedeció un hisopo estéril de rayón con la suspensión y se sembró en una placa de Mueller Hinton, haciendo movimientos de izquierda a derecha y rotando varias veces la caja de Petri, para homogeneizar el inóculo bacteriano. A continuación se colocó un disco de cefoxitina (30 µg) y se incubó en una estufa microbiológica, a un intervalo de temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Transcurrido este tiempo se realizaron las lecturas, midiendo con una regla los halos de inhibición (diámetro en mm) y realizando la interpretación según los valores de corte designados por el CLSI.(Cuadro 6-1)

**Cuadro 6-1.- Interpretación de la prueba de resistencia a cefoxitina (30 µg)  
en cepas de *S. aureus* (CLSI)**

Valores de corte	Interpretación
≤19 mm	Resistente a oxacilina
≥20 mm	Sensible a oxacilina

Controles utilizados

Cepas de referencia	Oxacilina	Características
<b><i>Staphylococcus aureus</i> (Mu50) ATCC 700699</b>	Resistente	Halo de inhibición ≤19 mm
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	Sensible	Halo de inhibición ≥22 mm

### **6.1.3.2 Resistencia a los antibióticos por el método de concentración mínima inhibitoria (CMI)**

Se determinó la resistencia a 17 antibióticos por medio del equipo automatizado MicroScan (Dade Behring), éste cuantifica la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizando el método de microdilución en caldo.

Para bacterias aerobias Gram positivas se prepara una suspensión bacteriana ajustada a una turbidez equivalente a la mitad del estándar de Mc Farland (0.5 McFarland), de la cual se toman 100  $\mu$ L y se colocan en 25 mL de agua estéril. Después se ocupan 115  $\mu$ L de esta solución para rehidratar los paneles utilizados para el estudio de sensibilidad antimicrobiana y posteriormente se incuban a 35°C, durante 16 a 20 horas.

Después del tiempo de incubación, los resultados pueden leerse manualmente o por medio de un equipo (autoSCAN); se cuantifica la concentración mínima inhibitoria (CMI) y se obtiene la interpretación de sensibilidad a los antibióticos (susceptible, intermedio, resistente).

El panel contiene pozos con diferentes concentraciones de diversos antibióticos (0.12 a 16  $\mu$ g/mL). Los antibióticos evaluados fueron: amoxicilina / ácido clavulánico (AmC), ampicilina (AM), cefazolina (CZ), cefotaxima (CTX), cefalotina (CF), ciprofloxacino (CIP), claritromicina (CLR), clindamicina (CC), eritromicina (E), gentamicina (GM), imipenem (IPM), oxacilina (OX), penicilina (P), rifampicina (RA), tetraciclina (Te), trimetoprim / sulfametoxazol (STX) y vancomicina (Va).

## 6.2 Detección molecular

### 6.2.1 Extracción de ADN

El ácido desoxirribonucleótido (ADN) es un polímero de nucleótidos, en donde cada nucleótido está compuesto por un azúcar de 5 carbonos (desoxirribosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato. Este polímero forma una cadena larga, que se une a otra cadena con secuencia complementaria y se arreglan en forma de doble hélice. Esta macromolécula posee la información genética de las células procariontes y eucariontes [48].

En el método de extracción que se utilizó en el laboratorio, primero se realizó una lisis enzimática utilizando lisostafina y lisozima, para liberar al ADN del interior celular, luego el ADN se centrifugó para separarlo de otros componentes celulares y otros provenientes del medio de cultivo. Después se agregó isopropanol, para eliminar proteínas, sales y grasas; además de precipitar el ADN. Se añadió alcohol etílico para secar la muestra y finalmente, se rehidrató el ADN con buffer TE 1X.

#### *Preparación de reactivos*

Solución de lisis A	
Agua grado biología molecular	920.0 µL
TRIS-HCl	10.0 µL
EDTA 0.5 M	20.0 µL
Lisozima [1mg/mL]	50.0 µL
<b>Volumen Total</b>	<b>1000 µL</b>

Solución de lisis completa	
Solución de Lisis A	195.0 µL
Buffer TE 1X	50.0 µL
Lisostafina [1 mg/mL]	5.0 µL
<b>Volumen Total</b>	<b>250.0 µL</b>

Las cepas fueron sembradas por estría cruzada en una placa de gelosa BHI y se incubaron en una estufa microbiológica a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. En un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 250.0 µL de solución de lisis completa y se añadió una asada cargada con el cultivo bacteriano de 24 h de crecimiento.

Se incubó en un equipo de baño de bloque metálico (Thermoblock) a 37°C durante 90 minutos. A continuación, el tubo se calentó dentro de un vaso con agua hirviendo a 95±1°C durante 10 minutos y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente; después se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos.

Dentro del gabinete de bioseguridad clase II, se recuperó la fase acuosa en un tubo tipo Eppendorf estéril de 0.6 mL. Se añadieron 300 µL de isopropanol a -20°C, la mezcla se homogeneizó y se mantuvo a esta temperatura, toda la noche. A la mañana siguiente, se retiró el isopropanol por decantación y se añadieron 100 µL de alcohol etílico al 70%. Se colocó en hielo durante 15 minutos y después se retiró el alcohol etílico mediante decantación. El ADN extraído se dejó secar durante 1 hora en el interior del gabinete de bioseguridad clase II. Posteriormente se agregó 50 µL de buffer TE 1X y se homogeneizó el ADN. Por último, se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **6.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La técnica de PCR (del inglés, Polymerase Chain Reaction) ha sido una herramienta muy importante en estudios de Biología Molecular y fue desarrollada en 1983 por Kary B. Mullis. Ésta técnica permite la amplificación *in vitro* de un segmento específico de ADN, permitiendo hacer millones de copias en poco tiempo [49].

El fundamento de esta técnica consiste en sintetizar muchas copias a partir de un ADN molde, utilizando una polimerasa capaz de funcionar bien a temperaturas elevadas. La polimerasa puede ser proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa) o de *Thermococcus litoralis* (Vent polimerasa), entre otras [50].

Al realizar la PCR se simula lo que sucede en la célula cuando se sintetiza el ADN. En un tubo se añaden los siguientes elementos, para formar un coctel: Taq polimerasa, el ADN que se quiere estudiar, los oligonucleótidos, desoxinucleótidos (dNTP's), además del buffer con magnesio ( $MgCl_2$ ) y otras sales [50-51]. Es un sistema completo que permite la correcta amplificación del material genético.

**Cuadro 6-2. Elementos de la PCR**

<b>Elemento</b>	<b>Función</b>	<b>Concentración requerida</b>
<b>Muestra inicial de ADN</b>	Sirve como molde y contiene la secuencia que se desea amplificar	$10^2$ a $10^5$ copias
<b>Oligonucleótidos</b>	Secuencias específicas de 18 a 30 pares de bases que determinan el sitio de ADN que será amplificado	0.1 a 1.0 $\mu$ M
<b>ADN polimerasa</b> (Taq polimerasa)	Enzima termoestable que sintetiza la cadena complementaria del ADN molde	2.0 – 2.5 U
<b>Desoxinucleótidos trifosfato (dNTP)</b> dATP, dTTP, dCTP y dGTP	Son los componentes que se utilizan para construir la nueva cadena de ADN	0.2 mM
<b>Buffer Tris-HCl con magnesio (<math>MgCl_2</math>) y otras sales (KCl)</b>	Contiene magnesio, el cual es importante para que la polimerasa realice su función. El KCl aumenta la actividad de la polimerasa un 40% a 60% aproximadamente.	Tris-HCl 10-50 mM, $MgCl_2$ 1.5-5.0 mM, KCl 6-50 mM

[50-51]

En la PCR se realizan diferentes ciclos de temperaturas de incubación. En cada ensayo se realizan aproximadamente 30 ciclos, en donde cada ciclo está compuesto por tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión.

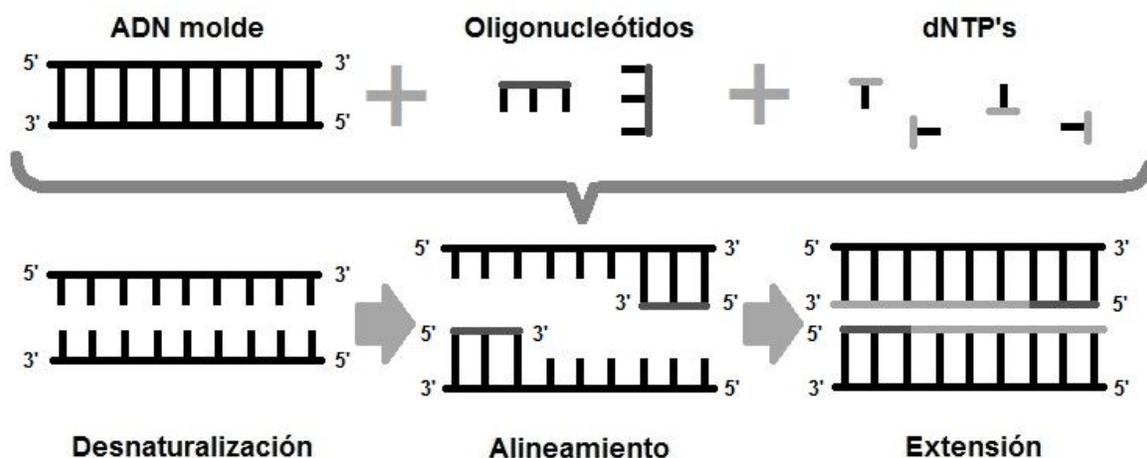
Antes de comenzar los ciclos, la PCR se inicia con un periodo previo (94.0°C), en el cual se relajan las posibles estructuras secundarias que tenga el ADN molde y después de los ciclos, se realiza un último alargamiento (72.0°C) para que todos los productos de amplificación estén terminados [50].

### **Etapas de la PCR**

- *Desnaturalización*.- El ADN se incuba a altas temperaturas (95°C) para romper los puentes de hidrógeno y de esa forma abrir la doble cadena, lo que da como resultado 2 cadenas sencillas (cadenas molde) con las cuales se puede llevar a cabo la reacción de amplificación.

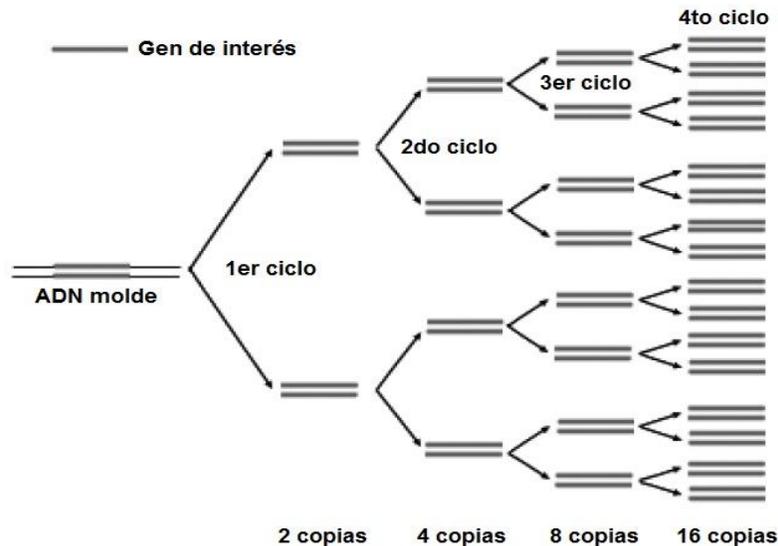
- *Alineamiento*.- Se realiza a una temperatura mas baja (entre 40°C y 60°C), para que los oligonucleótidos se unan a su secuencia complementaria, formando una pequeña región de doble cadena.

- *Extensión*.- Se lleva a cabo a una temperatura de 72°C, temperatura de máxima actividad de la ADN polimerasa. En esta etapa, la ADN polimerasa se une a la región de doble cadena que se formó en el paso anterior y continúa la síntesis de los fragmentos de ADN, incorporando los dNTP's en sentido 5' – 3' [49-50]



**Figura 6-1. Etapas de la PCR**

En los primeros ciclos se obtienen productos de mayor tamaño al calculado, sin embargo, al finalizar la reacción, se obtiene como producto mayoritario el fragmento esperado. La síntesis del ADN se realiza de forma exponencial, debido a que cada fragmento sintetizado (amplicón), sirve como molde para el siguiente ciclo [50].



**Figura 6-2. Amplificación exponencial del ADN en la PCR [48]**

### ***Ventajas de la PCR***

- *Especificidad.*- Solo se amplifica la sección de ADN determinada por los oligonucleótidos.
- *Sensibilidad.*- Se requiere de poco ADN para que se realice la amplificación.
- *Rapidez.*- Los resultados se obtienen en pocas horas [50].

### ***Procedimiento***

Los oligonucleótidos fueron diseñados en el laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, de la Facultad de Medicina (UNAM), utilizando el genoma de la cepa de referencia, *Staphylococcus aureus* (Mu50) ATCC700699. Esta secuencia se obtuvo de la base de datos GenBank, del National Center for Biotechnology

Information (NCBI) y cuenta con el número de acceso NC\_002758.2. El genoma es circular y tiene 2878 pares de bases. (Apéndice B)

**Cuadro 6-3. Oligonucleótidos utilizados en la PCR**

<b>Gen</b>	<b>Oligonucleótido (inicio)</b>	<b>Oligonucleótido (reversa)</b>
<b><i>coa</i></b>	AACTTGAAATAAAACCACAA	TACCTGTACCAGCATCTCTA
<b><i>icaA</i></b>	TCATATTTGTAAGTTGGTATCC	TCTGTCTGGGCTTGACCAT
<b><i>mecA</i></b>	ATGGCAAAGATATTCAACTA	GAGTGCTACTCTAGCAAAGA

Se utilizó una metodología para PCR estándar, en la cual se realizaron 2 mezclas de reacción por separado; la primera mezcla contenía oligonucleótidos para amplificar a los genes *mecA* y *coa*, mientras que la segunda mezcla solo contenía oligonucleótidos para el gen *icaA*.

*-Preparación de la mezcla de PCR*

Para 1 muestra

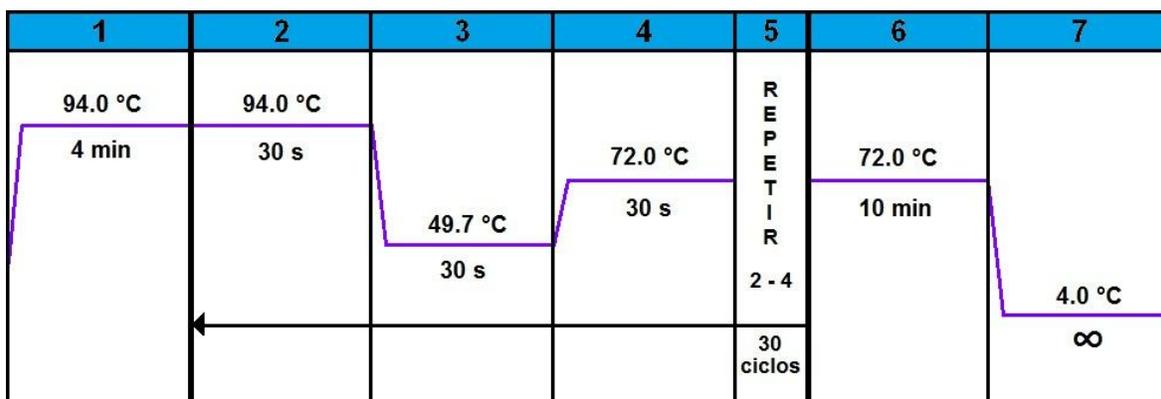
<b>Gen: <i>mecA</i> y <i>coa</i></b>		<b>Gen: <i>icaA</i></b>	
Agua grado biología molecular	2.125 µL	Agua grado biología molecular	8.125 µL
Buffer de Mg <sup>2+</sup>	2.5 µL	Buffer de Mg <sup>2+</sup>	2.5 µL
dNTP's	3.125 µL	dNTP's	3.125 µL
Oligo <i>mecA</i> -F	3.0 µL	Oligo <i>icaA</i> -F	3.0 µL
Oligo <i>mecA</i> -R	3.0 µL	Oligo <i>icaA</i> -R	3.0 µL
Oligo <i>coa</i> -F	3.0 µL	ADN	5.0 µL
Oligo <i>coa</i> -R	3.0 µL	Taq polimerasa	0.25 µL
ADN	5.0 µL	<b>Volumen Total</b>	<b>25.0 µL</b>
Taq polimerasa	0.25 µL		
<b>Volumen Total</b>	<b>25 µL</b>		

Los reactivos se mantuvieron a 4°C durante la preparación de la mezcla.

Primero se realizó el cálculo para el número de muestras a evaluar, incluyendo un control positivo y un control negativo. Se preparó la mezcla de reacción dentro del gabinete de bioseguridad clase II, utilizando micropipetas con puntas estériles para depositar los reactivos en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL. Se homogeneizó la mezcla y posteriormente se distribuyeron 20 µL en tubos de 0.2 mL para PCR de pared delgada. Se seleccionó uno de los tubos y se marcó como control negativo; a los demás tubos se les añadió 5 µL de ADN de *S. aureus*, purificado con la técnica antes descrita.

*-Amplificación del ADN*

Los tubos tipo Eppendorf que contenían las diversas muestras de ADN de *Staphylococcus aureus*, se acomodaron dentro del termociclador (Thermal Cycler C1000 BIORAD). Para la amplificación del gen *mecA* y *coa* se utilizó el programa “AURMECOA” y en el caso del gen *icaA* se ocupó el programa “SAICA582”, las condiciones a las cuales se realizó la amplificación se muestran en la figura 6-3 y 6-4, respectivamente. Estos programas fueron previamente estandarizados en el laboratorio.



**Figura 6-3. Programa AURMECOA.** Muestra las condiciones de amplificación de los fragmentos de *mecA* y *coa* en el termociclador.

1	2	3	4	5	6	7
94.0 °C 4 min	94.0 °C 30 s	58.2 °C 30 s	72.0 °C 30 s	R E P E T I R 2 - 4	72.0 °C 10 min	4.0 °C ∞
	←			30 ciclos		

**Figura 6-4. Programa SAICA582.** Muestra las condiciones de amplificación de los fragmentos de *icaA* en el termociclador.

Al finalizar el programa, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para detectar los fragmentos de ADN amplificados.

### 6.2.3 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica en la cual se fundamenta en la aplicación de una corriente eléctrica, para separar diferentes fragmentos de ADN con base en su longitud. Se emplea frecuentemente en laboratorios de bioquímica y biología molecular.

#### *Fundamento*

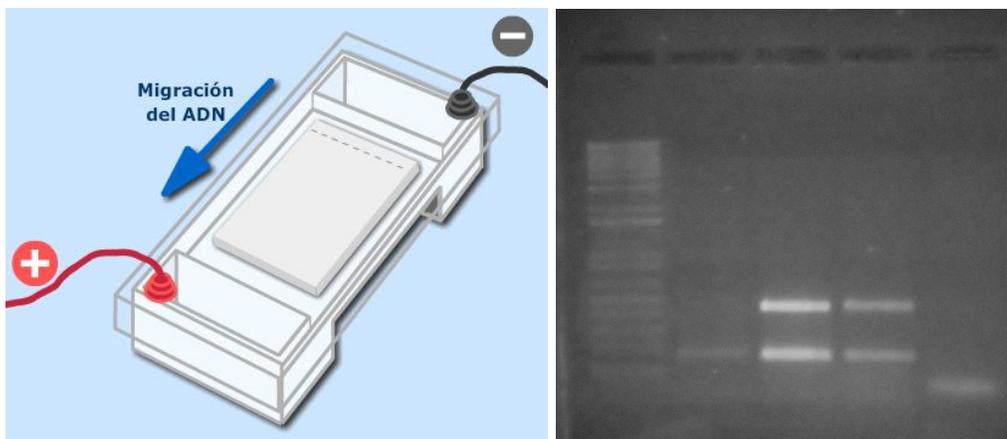
Se utiliza una corriente eléctrica para hacer que las moléculas migren a través de los poros de un gel; en el caso de la separación de ADN, se emplea un gel de agarosa. La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas, que se disuelve a 50-60°C y al enfriarse se solidifica, formando una malla microscópica [48].

Las moléculas de ADN migran hacia el polo positivo debido a que poseen una carga negativa por la presencia de los grupos fosfato. La velocidad con la que avanza la molécula en el gel depende de su longitud, porque éste debe pasar a través de los poros del gel. Los fragmentos más pequeños migran a una mayor

velocidad en comparación de aquellos que tienen un mayor tamaño. Otros factores que influyen en la velocidad de migración son: el voltaje aplicado y la concentración de agarosa del gel [52].

Para llevar a cabo la separación se necesita colocar el gel dentro de una cámara de electroforesis y sumergirlo en buffer, los buffer que se utilizan principalmente, son: TBE (Tris-boratos-EDTA) y TAE (Tris-acetato-EDTA). Este buffer sirve como conductor de electricidad y controla el pH. El avance del corrimiento se puede ver directamente si se agregan colorantes, como el azul de bromofenol, a las muestras de ADN que se amplificaron [48].

Para visualizar el ADN que se separa, comúnmente se utiliza bromuro de etidio; esta sustancia se intercala entre las pares de bases de la molécula de ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz UV; es altamente tóxico y mutagénico, por lo que se recomienda precaución en su uso. Su fluorescencia aumenta cuando se une a la molécula de ADN. Para calcular el tamaño aproximado de las bandas que se obtienen, en la corrida se añade por separado, un patrón de bandas de peso molecular conocido [48].



**Figura 6-5. Electroforesis en gel de agarosa [53]**

### *Procedimiento*

#### *- Preparación del gel de agarosa al 1%*

En una balanza analítica se pesaron 0.5 g de agarosa. Posteriormente la agarosa se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se añadieron 50 mL de buffer TAE 1X. Se colocó un vaso de precipitados invertido en la boca del matraz para contener la evaporación del buffer. El matraz se calentó suavemente con un mechero Fisher y se esperó a que se la agarosa se disolviera, evitando que hirviera. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 45°C, posteriormente dentro del gabinete de bioseguridad clase II, utilizando una micropipeta se añadieron 3.0 µL de una solución de bromuro de etidio (10 mg/mL) y se mezcló suavemente. Se armó la cámara de electroforesis colocando correctamente los peines y se vació lentamente la agarosa para evitar la formación de burbujas. Se dejó solidificar y con cuidado se quitaron los peines. A continuación se acomodó el gel en la cámara de electroforesis y se añadió buffer TAE 1X hasta la línea marcada.

#### *- Colocación de las muestras amplificadas por PCR*

Se colocó un pedazo de parafilm sobre la mesa para mezclar las muestras amplificadas por PCR y los reactivos para la electroforesis. Con una micropipeta se añadió una gota de 4.0 µL de agua grado biología molecular por cada muestra. Se agregaron 4.0 µL de buffer de carga (BlueJuice Gel Loading Buffer 2X) en cada gota de agua. Por último se adicionaron 5.0 µL de ADN (marcador molecular o amplificado de ADN de la PCR, según sea el caso). Con la micropipeta se aspiró ésta mezcla y se colocó en el pozo de gel correspondiente. Después de colocar las muestras se cerró la cámara.

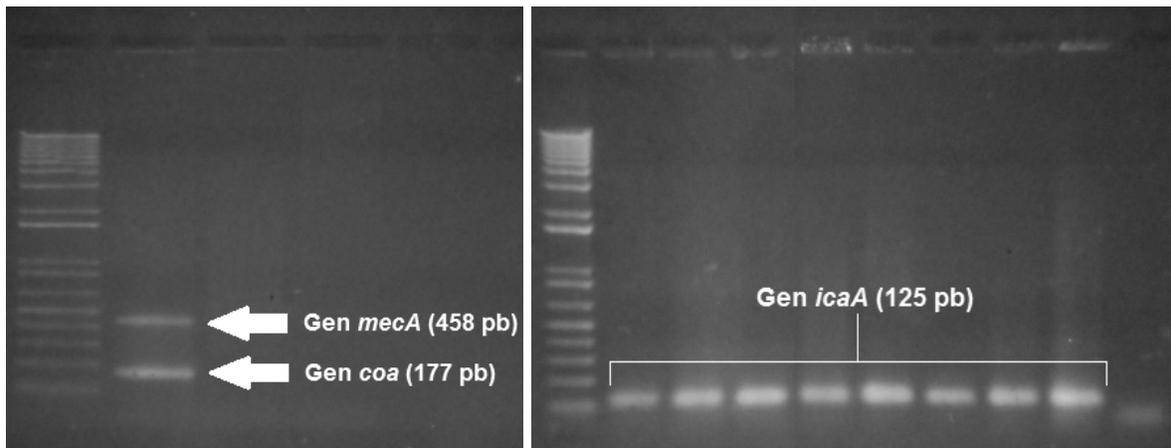
#### *- Corrimiento de las muestras*

Se conectó y se encendió la fuente de poder modelo EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech). Se ajustaron los parámetros de corrida a 95 V, 65 mA y 40 min. Se colocaron correctamente los cables de la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se puso a funcionar.

- *Revelado del gel*

Transcurrido el tiempo establecido de corrimiento (40 min), se apagó la fuente de poder, se retiró la tapa de la cámara de electroforesis y se sacó con cuidado el gel de agarosa. Se escurrió el exceso de buffer TAE 1X y se depositó en la superficie del transiluminador UV. Se encendió el transiluminador y se registró la presencia de las bandas de interés.

Gen	Tamaño del amplificado
<i>coa</i>	177 pb
<i>icaA</i>	125 pb
<i>mecA</i>	458 pb



**Figura 6-6. Localización de los amplicones de los genes *mecA*, *coa* e *icaA* en un gel de agarosa al 1%.**

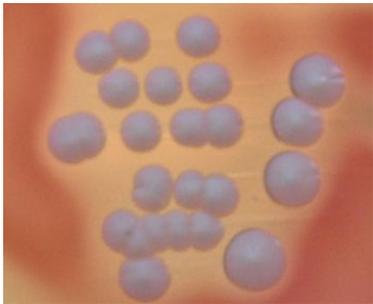
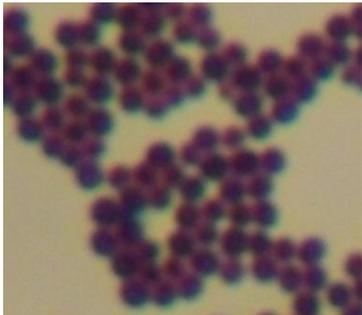
Para la prueba de especificidad de los oligonucleótidos de *icaA* (Apéndice C), se utilizaron cepas de otras especies de *Staphylococcus*, provenientes del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPer):

## 7.- RESULTADOS

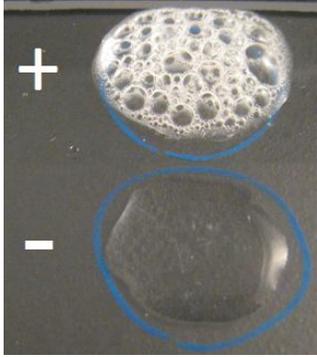
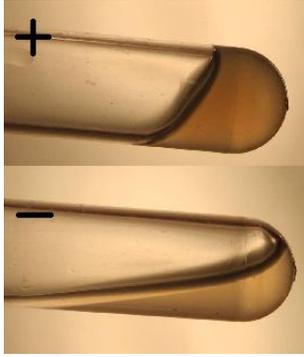
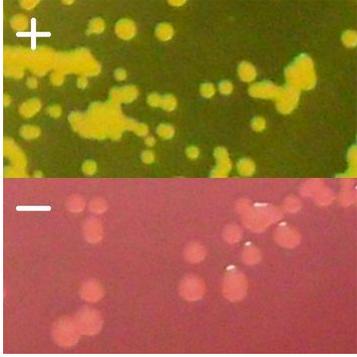
Se estudiaron un total de 97 cepas clínicas de *S. aureus*, las cuales fueron recolectadas en el Hospital General “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar” del ISSSTE (HGC) en el periodo comprendido entre el 20 de Agosto del 2004 y el 13 de Diciembre del 2005; éstas fueron aisladas principalmente de pacientes adultos con infección nosocomial (96 adultos/1 niño).

En el laboratorio, las cepas se examinaron por sus características macroscópicas y microscópicas; además, se realizaron diversas pruebas bioquímicas (Cuadro 7-1 y 7-2).

**Cuadro 7-1. Características macroscópicas y microscópicas de *S. aureus***

<b>Características macroscópicas</b>	<b>Forma de la colonia</b>	Circular	 <p>Foto modificada de ASM MicrobeLibrary/ Buxton</p>
	<b>Tamaño</b>	1-2 mm de diámetro	
	<b>Borde</b>	Entero	
	<b>Elevación</b>	Convexa	
	<b>Consistencia</b>	Cremosa	
	<b>Superficie</b>	Lisa y brillante	
	<b>Color</b>	Blanco a amarillo	
<b>Características microscópicas</b>	<b>Forma</b>	Cocos	 <p>Foto: Norma G.Morales R.</p>
	<b>Tamaño</b>	0.5 – 1.5 $\mu\text{m}$	
	<b>Gram</b>	Positivo	
	<b>Agrupación</b>	En racimos	

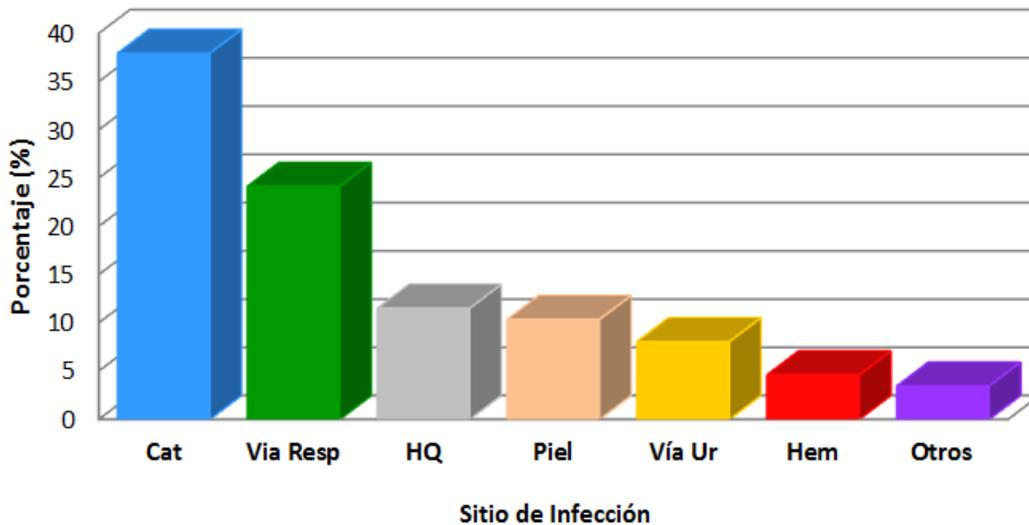
**Cuadro 7-2. Principales pruebas bioquímicas para la diferenciación de *S. aureus* de otras especies de *Staphylococcus***

Microorganismo	Catalasa	Coagulasa	Fermentación de manitol
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positiva	Positiva	Positiva (amarillo)
<i>Staphylococcus coagulasa negativa (SCon)</i>	Positiva	Negativa	Negativa (rojo o rosa)
<p><b>Catalasa</b></p> 		<p><b>Coagulasa</b></p> 	
		<p><b>Fermentación de manitol</b></p> 	
Fotos modificadas de ASM MicrobeLibrary / Reiner / Sturm		Foto: Norma G. Morales R.	

Las cepas bacterianas estudiadas presentaron las características macroscópicas y microscópicas descritas en el cuadro 7-1. En las pruebas bioquímicas realizadas (Cuadro 7-2), todas las cepas fueron catalasa positiva y fermentaron el manitol. En la prueba de coagulasa en tubo, 91 cepas (94%) presentaron la enzima coagulasa y 6 (6%) no la presentaron. En la prueba molecular de PCR, en todas las cepas se detectó una banda de 177 pb, correspondiente al gen *coa*.

Las cepas se aislaron de muestras clínicas procedentes de diversos sitios de infección, encontrándose los siguientes resultados: 39 (40.2%) provinieron de punta de catéter, 25 (25.6%) de vías respiratorias, 10 (10.3%) de herida quirúrgica, 9 (9.3%) de piel, 7 (7.2%) de vías urinarias, 4 (4.1%) de hemocultivo y 3 (3.1%) de otros sitios (Gráfica 7-1).

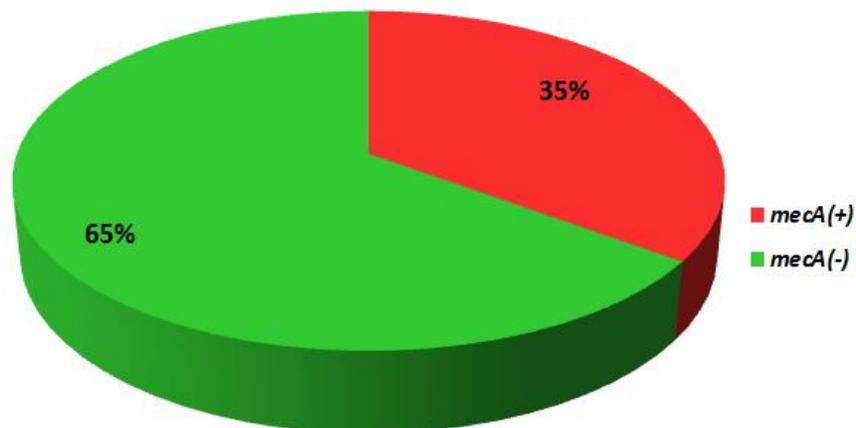
**Gráfica 7-1. Distribución porcentual de cepas clínicas de *S. aureus* por sitio de infección**



Cat – catéter; **Vía Resp** – Vías respiratorias; **HQ** – Herida quirúrgica; **Vía Ur** – Vías urinarias; **Hem** - Hemocultivo

En las cepas estudiadas se determinó la presencia del gen de resistencia a  $\beta$ -lactámicos (*mecA*) y del gen relacionado a formación de *biofilm* (*icaA*) mediante PCR. De las 97 cepas, 34 (35%) poseen el gen *mecA*, mientras que 63 (65%) no poseen este gen (Gráfica 7-2). Todas las cepas presentaron el gen *icaA*.

**Gráfica 7-2. Distribución porcentual del gen *mecA* en cepas clínicas de *S. aureus***



Para la detección fenotípica de cepas SARM, se utilizaron 2 métodos: determinación de la sensibilidad a cefoxitina en disco por el método de difusión simple y a oxacilina mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizando los paneles de MicroScan. En el Cuadro 7-3, se describen los resultados obtenidos con cada método.

**Cuadro 7-3. Perfil de resistencia/sensibilidad a cefoxitina y oxacilina en cepas *mecA*(+) y *mecA*(-)**

Gen	Antibiótico			
	Cefoxitina		Oxacilina	
	R	S	R	S
<i>mecA</i> (+)	33 (97%)	1 (3%)	33 (97%)	1 (3%)
<i>mecA</i> (-)	5 (8%)	58 (92%)	16 (25%)	47 (75%)

R – resistente      S – sensible

Con estos datos se realizaron cálculos de sensibilidad y especificidad para cada método fenotípico empleado, considerando la presencia del gen *mecA* por PCR, como estándar de referencia. Los cálculos se realizaron, utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{verdaderos positivos (VP)}}{\text{VP} + \text{falsos negativos}} \quad \text{Especificidad} = \frac{\text{verdaderos negativos (VN)}}{\text{VN} + \text{falsos positivos}}$$

En donde se interpreta como:

-**Verdaderos positivos.**- Número de cepas que presentaron el gen *mecA* y que mostraron resistencia al antibiótico.

-**Verdaderos negativos.**- Número de cepas que no presentaron el gen *mecA* y que mostraron sensibilidad al antibiótico.

-**Falsos negativos.**- Número de cepas que presentaron el gen *mecA* y que fueron detectados como sensibles al antibiótico.

**-Falsos positivos.**- Número de cepas que no contuvieron el gen *mecA* y que fueron detectados como resistentes al antibiótico.

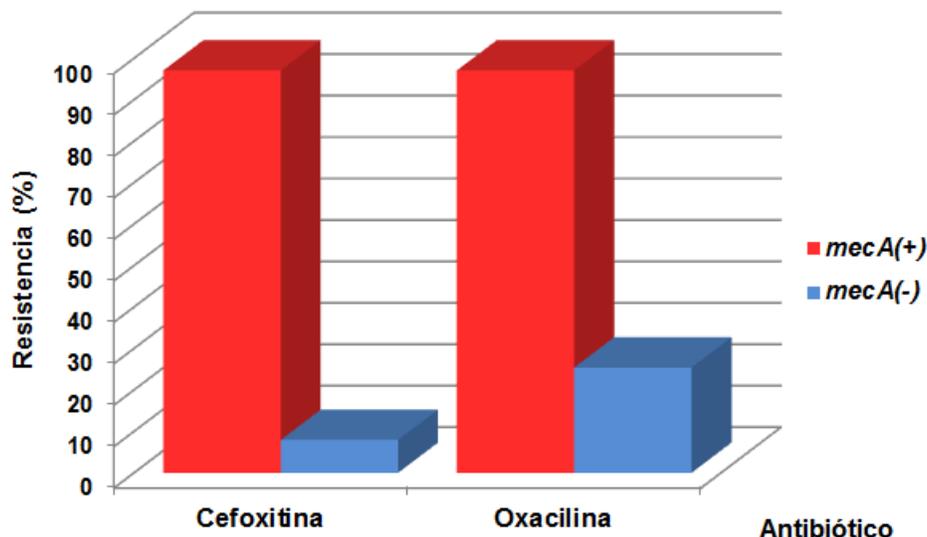
Los resultados de sensibilidad y especificidad de los métodos fenotípicos de resistencia a antibióticos, calculados mediante estas fórmulas, pueden observarse a continuación.

**Cuadro 7-4. Valores de sensibilidad y especificidad de los métodos de cefoxitina en disco y oxacilina por concentración mínima inhibitoria**

Determinación	Antibiótico	
	Cefoxitina	Oxacilina
Sensibilidad	97%	97%
Especificidad	92%	74%

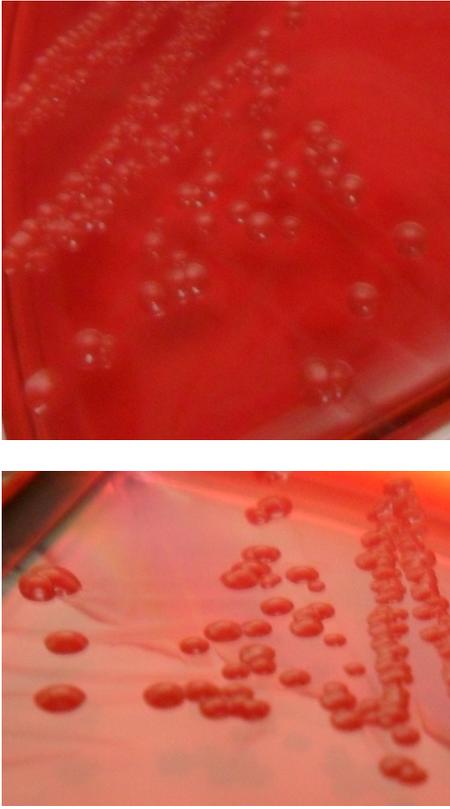
En la siguiente gráfica (Gráfica 7-3) se hace un comparativo entre la presencia del gen *mecA* y el porcentaje de resistencia detectado para cada uno de los métodos fenotípicos que se utilizaron.

**Gráfica 7-3. Comparación de la resistencia a cefoxitina y oxacilina con base en la presencia del gen *mecA* en cepas clínicas de *S. aureus***



Para la determinación experimental de la formación de *biofilm*, se realizó el método en placa ARC. Las cepas formadoras de *biofilm* (B+) se observaron como colonias negras, mientras que las cepas no formadoras de *biofilm* (B-) presentaron una coloración rosada o rojiza. En el cuadro 7-5 se pueden observar las diferencias fenotípicas según su formación de *biofilm*.

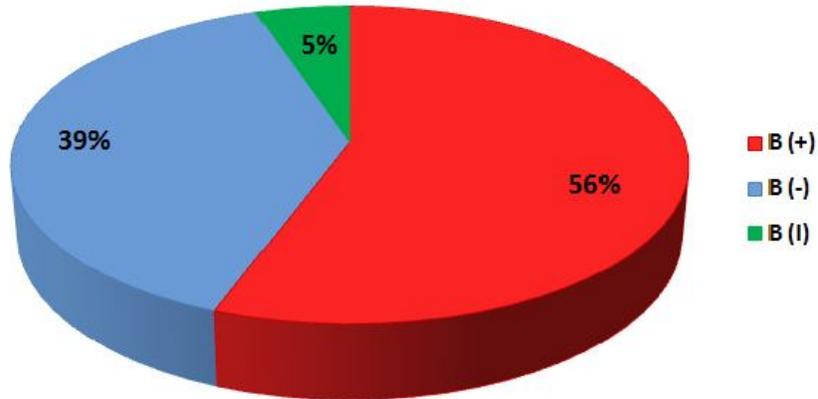
**Cuadro 7-5. Fenotipo de formación de *biofilm* en placas de ARC**

Cepas formadoras de <i>biofilm</i> (B+)	Cepas no formadoras de <i>biofilm</i> (B-)
<p data-bbox="370 716 669 751">Colonias color negro</p> 	<p data-bbox="919 716 1279 751">Colonias color rosa o rojo</p> 

Fotos: Norma G. Morales R.

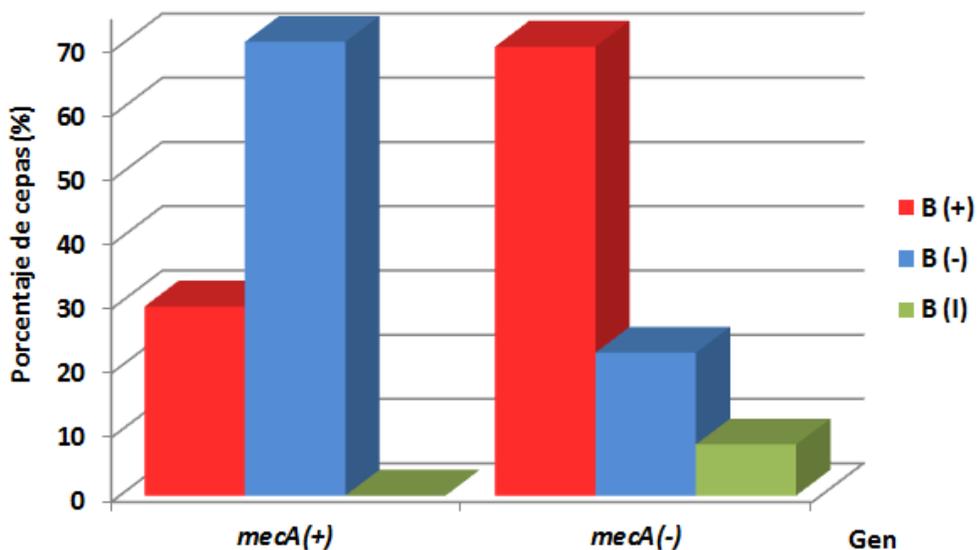
De las 97 cepas estudiadas, 54 (56%) son formadoras de *biofilm*, 38 (39%) fueron clasificadas como no formadoras de *biofilm* y 5 (5%) son indeterminadas (**B I**), debido a que su coloración no se registró dentro de los dos rangos de color establecidos (Gráfica 7-4).

**Gráfica 7-4. Porcentaje de formación de *biofilm* en cepas clínicas de *S. aureus***



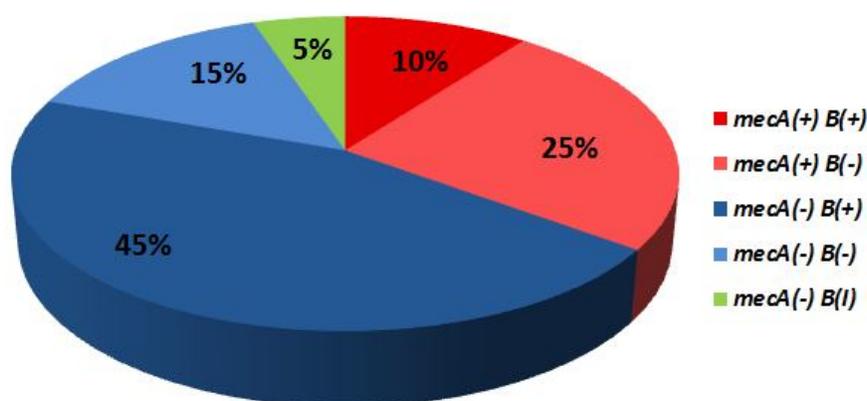
Para estudiar si existe una relación entre la resistencia a los antimicrobianos y la formación de *biofilm*, se compararon cepas de *S. aureus* de acuerdo a la presencia de gen *mecA* y formación de *biofilm*. De las 34 (35%) cepas *mecA*(+) (Gráfica 7-2), 10 (29%) son B+ y 24 (71%) son B-; de las 63 cepas *mecA*(-), 44 (70%) son B+, 14 (22%) son B- y 5 (8%) son B I (Gráfica 7-5).

**Gráfica 7-5. Comparación de la formación de *biofilm* con base en la presencia del gen *mecA* en cepas clínicas de *S. aureus***



En la Gráfica 7-6 se presentan las combinaciones de las 97 cepas clínicas de *S. aureus*, de acuerdo con la presencia del gen *mecA* y la formación de *biofilm*; 10 (10%) son *mecA*(+) B(+), 24 (25%) son *mecA*(+) B(-), 44 (45%) son *mecA*(-) B(+), 14 (15%) son *mecA*(-) B (-) y 5 (5%) son *mecA*(-) B (-). En la gráfica es posible observar que la mayoría de las cepas son *mecA*(-) B(+).

**Gráfica 7-6. Distribución de las cepas de *S. aureus* con base en la presencia del gen *mecA* y formación de *biofilm***



En el Cuadro 7-6, se muestran los porcentajes de resistencia/sensibilidad a cefoxitina y oxacilina de las diferentes combinaciones de cepas de *S. aureus*, con base en la presencia del gen *mecA* y a la formación de *biofilm*. Los métodos utilizados fueron: resistencia a cefoxitina por el método de difusión simple en disco y oxacilina por CMI, utilizando los paneles de MicroScan para la resistencia a los antibióticos y PCR para la detección del gen *mecA*.

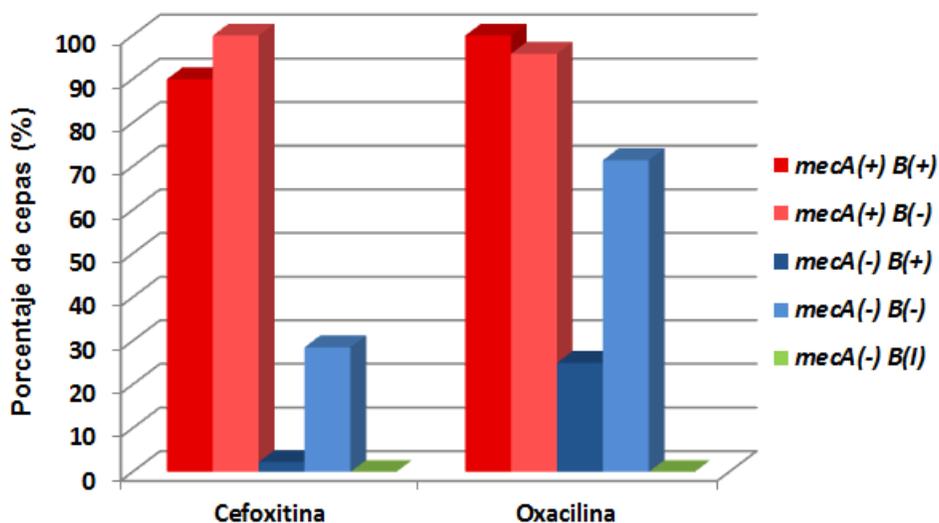
En la Gráfica 7-7 se utilizaron los datos de los porcentajes de resistencia para observar en cual categoría existe una mayor resistencia a los antibióticos.

**Cuadro 7-6. Porcentaje de resistencia y sensibilidad a dos antimicrobianos en cepas de *S. aureus* de acuerdo a la presencia del gen *mecA* y formación de *biofilm***

Gen – Form. <i>Biofilm</i>	Cefoxitina		Oxacilina	
	R	S	R	S
<i>mecA</i> (+) B(+)	9 (90%)	1 (10%)	10 (100%)	0 (0%)
<i>mecA</i> (+) B(-)	24 (100%)	0 (0%)	23 (96%)	1 (4%)
<i>mecA</i> (-) B(+)	1 (2%)	43 (98%)	11 (25%)	33 (75%)
<i>mecA</i> (-) B(-)	4 (29%)	10 (71%)	10 (71%)	4 (29%)
<i>mecA</i> (-) B(I)	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)	5 (100%)

R = resistente      S = sensible

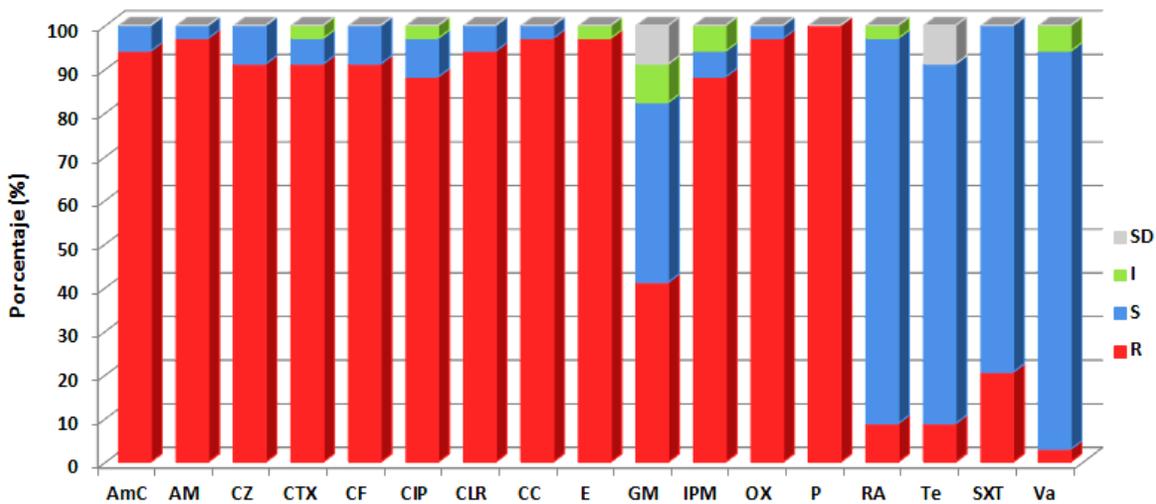
**Gráfica 7-7. Comparación de la resistencia a cefoxitina y oxacilina con base en la presencia del gen *mecA* y formación de *biofilm* en cepas de *S. aureus***



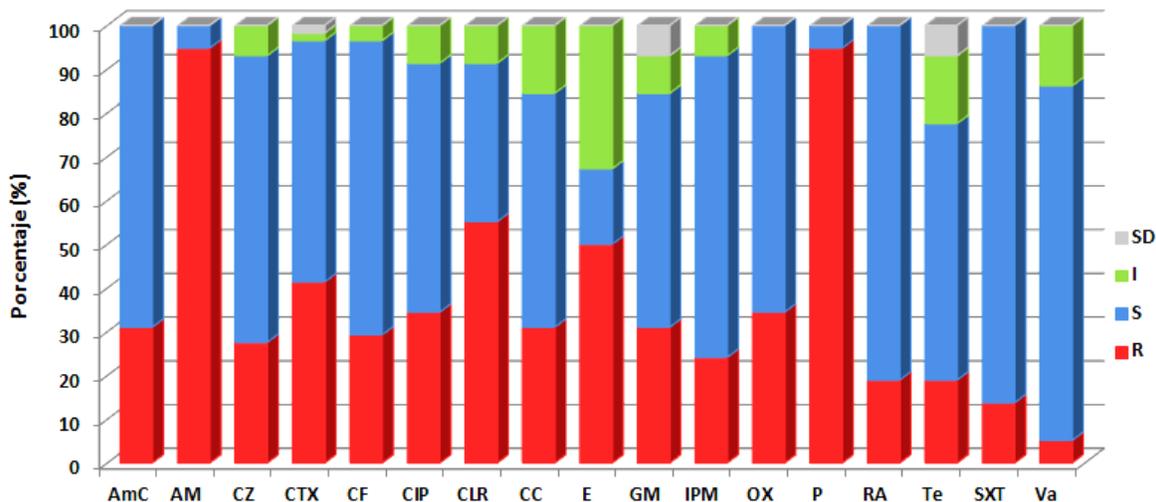
Se realizó la determinación de los perfiles de resistencia/sensibilidad a 17 antibióticos por medio del equipo automatizado MicroScan. Los antibióticos evaluados fueron: amoxicilina/ácido clavulánico (AmC), ampicilina (AM), cefazolina (CZ), cefotaxima (CTX), cefalotina (CF), ciprofloxacino (CIP), claritromicina (CLR), clindamicina (CC), eritromicina (E), gentamicina (GM), imipenem (IPM), oxacilina

(OX), penicilina (P), rifampicina (RA), tetraciclina (Te), trimetoprim/sulfametoxazol (STX) y vancomicina (Va). Los resultados obtenidos se registraron como: R=resistente, S=sensible, I=intermedio y SD=sin datos. Las gráficas 7-8 y 7-9 muestran los perfiles de resistencia/sensibilidad a los diferentes antibióticos en cepas de *S. aureus* de acuerdo con la presencia o ausencia del gen *mecA* (*mecA*(+), *mecA*(-))

**Gráfica 7-8. Perfiles de resistencia a antibióticos en cepas de *S. aureus mecA* (+)**

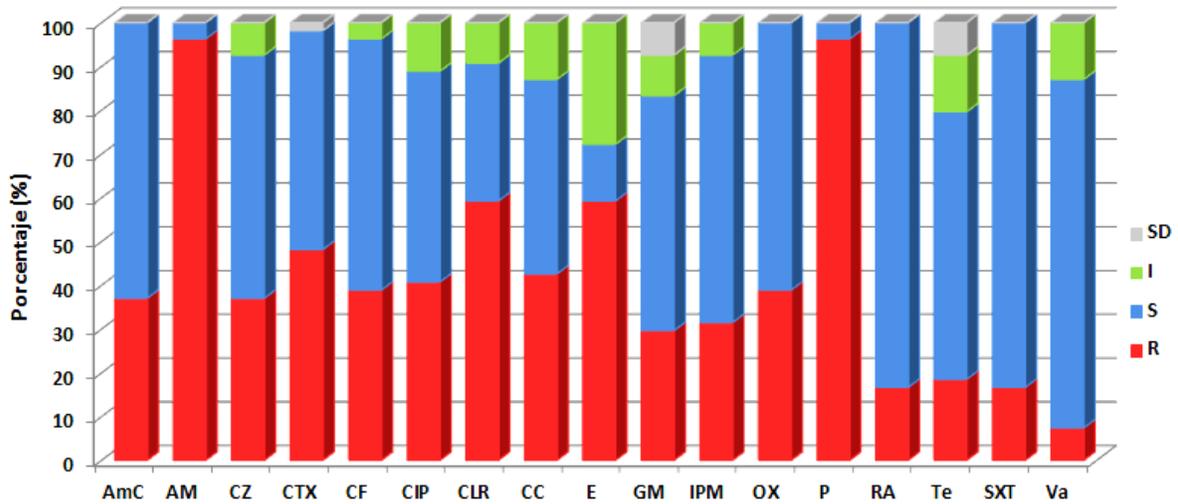


**Gráfica 7-9. Perfiles de resistencia a antibióticos en cepas de *S. aureus mecA* (-)**

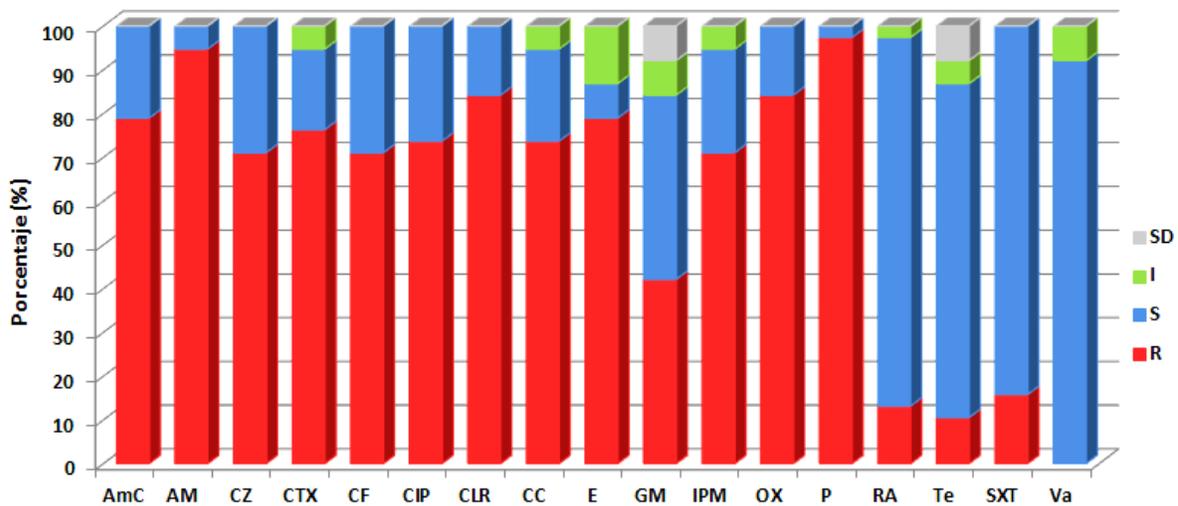


En las gráficas 7-10 y 7-11 se observan los perfiles de resistencia/sensibilidad en cepas de *S. aureus* formadoras y no formadoras de *biofilm*.

**Gráfica 7-10. Perfiles de resistencia a antibióticos en cepas de *S. aureus* formadoras de *biofilm***

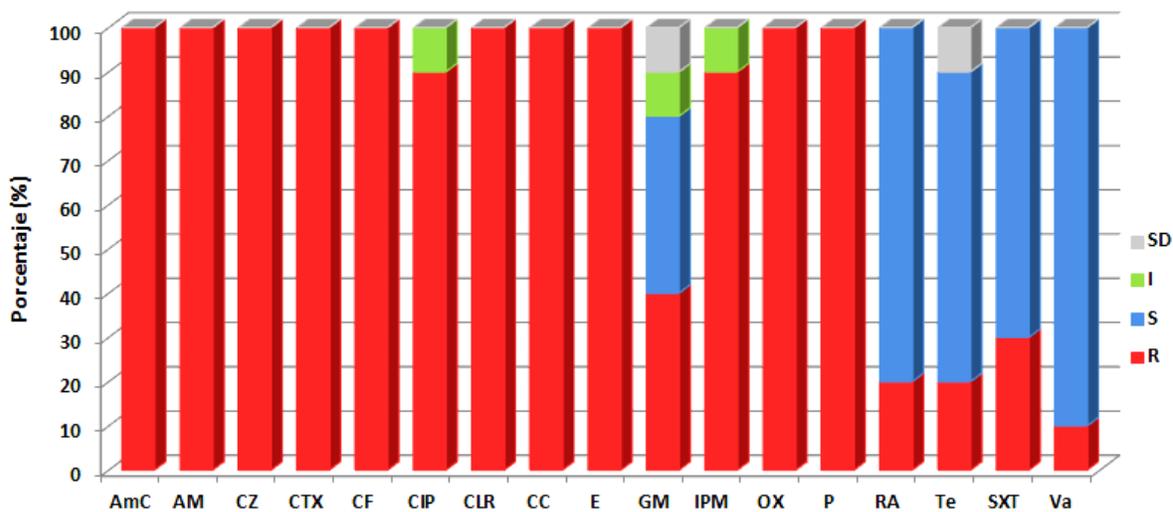


**Gráfica 7-11. Perfiles de resistencia a antibióticos en cepas de *S. aureus* no formadoras de *biofilm***

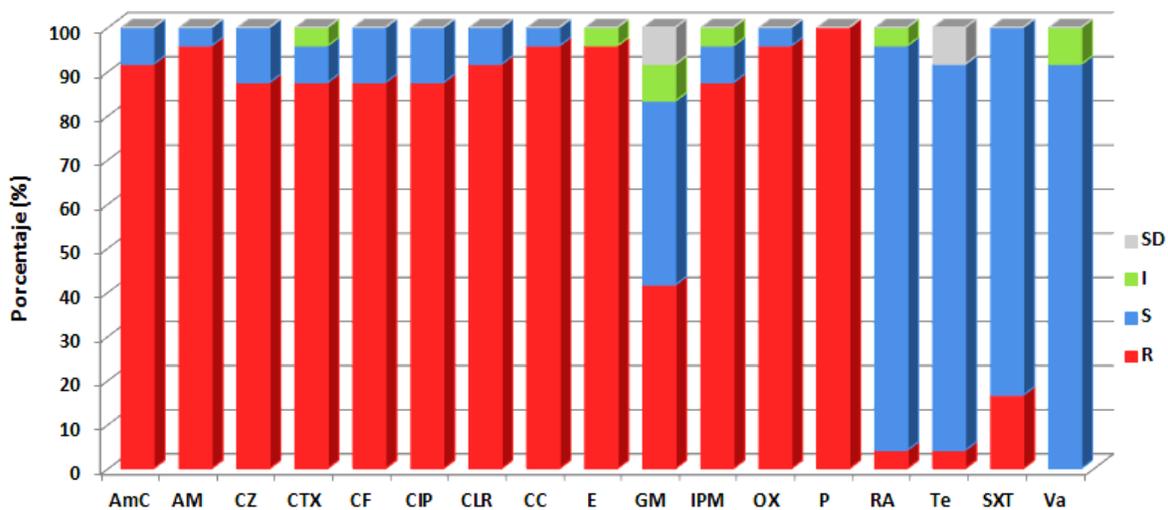


Las cepas estudiadas también se clasificaron en diferentes categorías con base en la presencia del gen *mecA* y formación de *biofilm* (Gráfica 7-12 – 7-15).

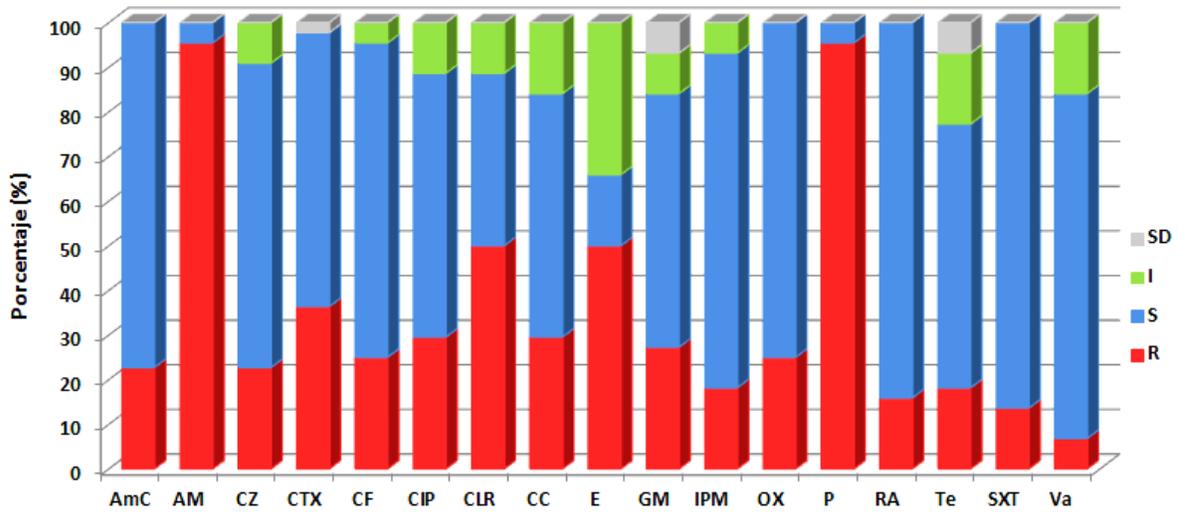
**Gráfica 7-12. Perfiles de resistencia/sensibilidad a antibióticos de cepas de *S. aureus mecA*(+) B(+)**



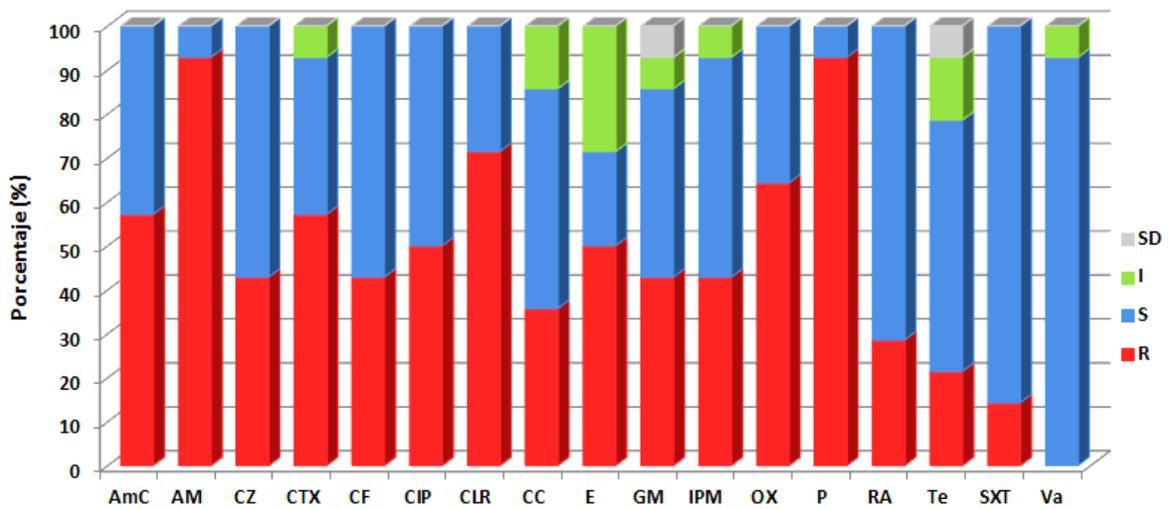
**Gráfica 7-13. Perfiles de resistencia/sensibilidad a antibióticos de cepas de *S. aureus mecA*(+) B(-)**



**Gráfica 7-14. Perfiles de resistencia/sensibilidad a antibióticos de cepas de *S. aureus* mecA(-) B(+)**



**Gráfica 7-15. Perfiles de resistencia/sensibilidad a antibióticos de cepas de *S. aureus* mecA(-) B(-)**



## 8.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de datos de resistencia a los antibióticos que se obtuvieron en la parte experimental, se utilizó una prueba de comparación de dos proporciones (Prueba Z). Esta prueba se utiliza para estudiar a dos grupos a los cuales se ha medido una variable cualitativa y tiene como propósito demostrar si hay diferencias estadísticas significativas entre los grupos. Este análisis se realizó con la supervisión de profesores del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM.

Para llevar a cabo el análisis, las cepas se dividieron en grupos con base en la formación de *biofilm* (**B (+)/B (-)**) y presencia del gen *mecA* (**mecA (+)/mecA (-)**). Las dos variables que se utilizaron fueron:

- 1.- *Resistente (R)*.- Para cepas con resistencia total e intermedia al antibiótico. Los valores de resistencia intermedia se incluyeron en este grupo, debido a que en la terapéutica, estas cepas se toman como resistentes. Esta variable es la de interés.
- 2.- *Sensible (S)*.- Para cepas sensibles al antibiótico.

En todas las pruebas realizadas se estableció una hipótesis nula (**H<sub>0</sub>**) y una hipótesis alterna (**H<sub>a</sub>**). La **H<sub>0</sub>** indica que no hay diferencia en la resistencia a los antibióticos entre los grupos estudiados, mientras que la **H<sub>a</sub>** muestra que si hay diferencia entre los grupos.

Primero se calcularon las proporciones para cada una de las variables (**p**- resistente, **q**- sensible) en cada grupo estudiado. Después se procedió a obtener el valor de **Z** con la siguiente fórmula:

$$Z = \frac{p_1 - p_2}{\sqrt{\hat{p} \hat{q} \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad \hat{p} = \frac{f_1 - f_2}{n_1 - n_2} \quad \hat{q} = 1 - \hat{p}$$

En donde:

**p** = proporción de resistencia calculada

**n** = número de cepas totales

**f** = número de cepas resistentes

Los números indican el grupo al cual pertenecen los valores calculados (1= primer grupo, 2=segundo grupo).

El valor de **Z** indica si se acepta o se rechaza la hipótesis nula (**Ho**). Para aceptar la **Ho**, el valor de **Z** debe encontrarse entre -1.96 y +1.96, lo que indicaría que no hay diferencia estadística en la resistencia a los antibióticos entre los grupos estudiados.

La **Ho**, se rechaza cuando el valor es  $< -1.96$  o  $> +1.96$ , en este caso se observaría una diferencia en la resistencia a los antibióticos entre los grupos estudiados [54].

### 8-1 Prueba No 1.- Comparación entre cepas *mecA*(+) y *mecA*(-)

Antib.	Cepas <i>mecA</i> (+)				Cepas <i>mecA</i> (-)				Z	Ho
	R	S	p1	q1	R	S	p2	q2		
<b>AmC</b>	32	2	0.9412	0.0588	18	40	0.3103	0.6897	5.8634	Rechazada
<b>AM</b>	33	1	0.9706	0.0294	55	3	0.9483	0.0517	0.5065	Aceptada
<b>CZ</b>	31	3	0.9118	0.0882	20	38	0.3448	0.6552	5.2809	Rechazada
<b>CTX</b>	32	2	0.9412	0.0588	25	32	0.4386	0.5614	4.7943	Rechazada
<b>CF</b>	31	3	0.9118	0.0882	19	39	0.3276	0.6724	5.4298	Rechazada
<b>CIP</b>	31	3	0.9118	0.0882	25	33	0.4310	0.5690	4.5604	Rechazada
<b>CLR</b>	32	2	0.9412	0.0588	37	21	0.6379	0.3621	3.2423	Rechazada
<b>CC</b>	33	1	0.9706	0.0294	27	31	0.4655	0.5345	4.9096	Rechazada
<b>E</b>	34	0	1.0000	0	48	10	0.8276	0.1724	2.5646	Rechazada
<b>GM</b>	17	14	0.5484	0.4516	23	31	0.4259	0.5741	1.0888	Aceptada
<b>IPM</b>	32	2	0.9412	0.0588	18	40	0.3103	0.6897	5.8634	Rechazada
<b>OX</b>	33	1	0.9706	0.0294	20	38	0.3448	0.6552	5.8625	Rechazada
<b>P</b>	34	0	1.0000	0	55	3	0.9483	0.0517	1.3483	Aceptada
<b>RA</b>	4	30	0.1177	0.8824	11	47	0.1897	0.8103	-0.9025	Aceptada
<b>Te</b>	3	28	0.0968	0.9032	20	34	0.3704	0.6296	-2.7330	Rechazada
<b>STX</b>	7	27	0.2059	0.7941	8	50	0.1379	0.8621	0.8516	Aceptada
<b>Va</b>	3	31	0.0882	0.9118	11	47	0.1897	0.8103	-1.3073	Aceptada

### 8-2 Prueba No 2.- Comparación entre cepas B(+) y B(-)

Antib.	Cepas B(+)				Cepas B(-)				Z	Ho
	R	S	p <sub>1</sub>	q <sub>1</sub>	R	S	p <sub>2</sub>	q <sub>2</sub>		
AmC	20	34	0.3704	0.6296	30	8	0.7895	0.2105	-3.9737	Rechazada
AM	52	2	0.9630	0.0370	36	2	0.9474	0.0526	0.3611	Aceptada
CZ	24	30	0.4444	0.5556	27	11	0.7105	0.2895	-2.5283	Rechazada
CTX	26	27	0.4906	0.5094	31	7	0.8158	0.1842	-3.1627	Rechazada
CF	23	31	0.4259	0.5741	27	11	0.7105	0.2895	-2.6984	Rechazada
CIP	28	26	0.5185	0.4815	28	10	0.7368	0.2632	-2.1127	Rechazada
CLR	37	17	0.6852	0.3148	32	6	0.8421	0.1579	-1.7115	Aceptada
CC	30	24	0.5556	0.4444	30	8	0.7895	0.2105	-2.3195	Rechazada
E	47	7	0.8704	0.1296	35	3	0.9211	0.1079	-0.7690	Aceptada
GM	21	29	0.3958	0.6042	19	16	0.5429	0.4571	-1.3276	Aceptada
IPM	21	33	0.3889	0.6111	29	9	0.7632	0.2368	-3.5486	Rechazada
OX	21	33	0.3889	0.6111	32	6	0.8421	0.1579	-4.3313	Rechazada
P	52	2	0.9630	0.0370	37	1	0.9737	0.0269	-0.2851	Aceptada
RA	9	45	0.1667	0.8333	6	32	0.1579	0.8421	0.1121	Aceptada
Te	17	33	0.3400	0.6600	6	29	0.1714	0.8286	1.7217	Aceptada
STX	9	45	0.1667	0.8333	6	32	0.1579	0.8421	0.1121	Aceptada
Va	11	43	0.2037	0.7963	3	35	0.079	0.9211	1.6403	Aceptada

### 8-3 Prueba No 3.- Comparación entre cepas *mecA*(+) B(+) y *mecA*(+) B(-)

Antib.	Cepas <i>mecA</i> (+) B(+)				Cepas <i>mecA</i> (+) B(-)				Z	Ho
	R	S	p <sub>1</sub>	q <sub>1</sub>	R	S	p <sub>2</sub>	q <sub>2</sub>		
AmC	10	0	1	0	22	2	0.9167	0.0833	0.941	Aceptada
AM	10	0	1	0	23	1	0.9583	0.0417	0.6552	Aceptada
CZ	10	0	1	0	21	3	0.8750	0.1250	1.1709	Aceptada
CTX	10	0	1	0	22	2	0.9167	0.0833	0.941	Aceptada
CF	10	0	1	0	21	3	0.8750	0.1250	1.1709	Aceptada
CIP	10	0	1	0	21	3	0.8750	0.1250	1.1709	Aceptada
CLR	10	0	1	0	22	2	0.9167	0.0833	0.941	Aceptada
CC	10	0	1	0	23	1	0.9583	0.0417	0.6552	Aceptada
E	10	0	1	0	24	0	1.0000	0.0000	-	Sin interpretación
GM	5	4	0.5556	0.4444	12	10	0.5455	0.4546	0.0513	Aceptada
IPM	10	0	1	0	22	2	0.9167	0.0833	0.941	Aceptada
OX	10	0	1	0	23	1	0.9583	0.0417	0.6552	Aceptada
P	10	0	1	0	24	0	1.0000	0.0000	-	Sin interpretación
RA	2	8	0.2	0.8	2	22	0.0833	0.9167	0.9621	Aceptada
Te	2	7	0.2222	0.7778	1	21	0.0455	0.9546	1.5114	Aceptada
STX	3	7	0.3	0.7	4	20	1.6667	0.8333	0.8761	Aceptada
Va	1	9	0.1	0.9	2	22	0.0000	1.0000	1.507	Aceptada

**8-4 Prueba No 4.- Comparación entre cepas *mecA*(-) B(+) y *mecA*(-) B(-)**

Antib.	Cepas <i>mecA</i> (-) B(+)				Cepas <i>mecA</i> (-) B(-)				Z	Ho
	R	S	p1	q1	R	S	p2	q2		
<b>AmC</b>	10	34	0.2273	0.7727	8	6	0.5714	0.4286	-2.4243	Rechazada
<b>AM</b>	42	2	0.9546	0.0455	13	1	0.9286	0.0714	0.3822	Aceptada
<b>CZ</b>	14	30	0.3182	0.6818	6	8	0.4286	0.5714	-0.7569	Aceptada
<b>CTX</b>	16	27	0.3721	0.6279	9	5	0.6429	0.3571	-1.7733	Aceptada
<b>CF</b>	13	31	0.2955	0.7046	6	8	0.4286	0.5714	-0.9243	Aceptada
<b>CIP</b>	18	26	0.4091	0.5909	7	7	0.5000	0.5000	-0.5983	Aceptada
<b>CLR</b>	27	17	0.6136	0.3864	10	4	0.7143	0.2857	-0.6825	Aceptada
<b>CC</b>	20	24	0.4546	0.5455	7	7	0.5000	0.5000	-0.2970	Aceptada
<b>E</b>	37	7	0.8409	0.1591	11	3	0.7857	0.2143	0.4762	Aceptada
<b>GM</b>	16	25	0.3902	0.6098	7	6	0.5385	0.4615	-0.9417	Aceptada
<b>IPM</b>	11	33	0.2500	0.7500	7	7	0.5000	0.5000	-1.7611	Aceptada
<b>OX</b>	11	33	0.2500	0.7500	9	5	0.6429	0.3571	-2.6936	Rechazada
<b>P</b>	42	2	0.9546	0.0455	13	1	0.9286	0.0714	0.3822	Aceptada
<b>RA</b>	7	37	0.1591	0.8409	4	10	0.2857	0.7143	-1.0526	Aceptada
<b>Te</b>	15	26	0.3659	0.6342	5	8	0.3846	0.6154	-0.1221	Aceptada
<b>STX</b>	6	38	0.1364	0.8636	2	12	0.1429	0.8571	-0.0614	Aceptada
<b>Va</b>	10	34	0.2273	0.7727	1	13	0.0714	0.9286	1.2955	Aceptada

## 7.- DISCUSIÓN

Se realizó la prueba de coagulasa y se obtuvo que el 94% de las cepas estudiadas produjeron esta enzima, en contraste con la prueba de PCR, en la cual el 100% de las cepas presentaron el gen *coa*; con estos resultados, se confirmó que la prueba de PCR es más confiable para la determinación de coagulasa en *S. aureus*. Además se comprobó el correcto funcionamiento y especificidad de los oligonucleótidos para el gen *coa*, que fueron diseñados en el laboratorio (Apéndice B y C).

Las cepas fueron clasificadas según el sitio de infección del cual procedían, (Gráfica 7-1). Los principales sitios de infección que se observaron en el Hospital General “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar”, fueron los provenientes de catéter y de vías respiratorias. Estos resultados coinciden con estudios de vigilancia epidemiológica, realizados por algunos investigadores en otros hospitales. En varios hospitales de Brasil y en el Instituto Nacional de Pediatría (México), se reportó que el uso de catéter es una de las principales causas que favorecen la adquisición de infecciones nosocomiales [55,56]. En el Centro Médico Nacional “La Raza” (México) y en el Hospital “Hermanos Ameijeiras” (Cuba), el principal sitio de infección fueron las vías respiratorias y en el Hospital Universitario “Carlos Haya” (España), predominaron las heridas quirúrgicas [57,58].

Las diferencias en la distribución de estos sitios de infección se pueden deber al tipo de población atendida y al nivel de atención del hospital. El Hospital General “Gonzalo Castañeda Escobar” es un hospital de segundo nivel y las cepas que se analizaron provinieron principalmente de personas adultas, sin embargo, estos resultados serían de utilidad en la aplicación de medidas correctivas en este hospital.

Para evaluar la resistencia a los antibióticos, se eligió al gen *mecA* como marcador molecular de resistencia a  $\beta$ -lactámicos y fue detectado mediante la amplificación de un segmento de 458 pb por PCR. A nivel internacional la detección molecular del gen *mecA* en *S. aureus* varía desde un 17% hasta un 96% [59-60]. En México se realizó una investigación en la que participaron varios hospitales de diferentes niveles de atención, en la cual se reportó un 38% de cepas resistentes a meticilina [61]. En nuestro estudio se halló un porcentaje similar, encontrándose el gen *mecA* en el 35% de las cepas clínicas estudiadas. El empleo frecuente de la PCR para detectar este gen, puede ser de gran utilidad en la vigilancia epidemiológica de los hospitales para encontrar variaciones en la resistencia a meticilina.

En la prueba de cefoxitina se obtuvo una sensibilidad de 97% y una especificidad del 92%, mientras que en la prueba de oxacilina (CMI) se obtuvo un 97% de sensibilidad y un 74% de especificidad. Estos resultados nos indican que tanto la prueba de cefoxitina como de oxacilina tienen la misma capacidad para detectar la presencia del gen *mecA*, pero el método de oxacilina presenta un mayor número de falsos positivos. Se observó que el método fenotípico de cefoxitina por difusión en disco es más preciso y confiable para detectar la resistencia a oxacilina mediada por el gen *mecA*. Debido al bajo valor de especificidad que se obtuvo en la prueba de oxacilina (CMI), no es recomendable utilizar esos valores para determinar la resistencia mediada por el gen *mecA*. En la investigación realizada por Baddour y colaboradores, *et al.* (2007), probaron el método de difusión simple con discos de oxacilina y cefoxitina, encontraron que ambos antibióticos tienen la misma sensibilidad. Al igual que en nuestro estudio, este grupo encontró una mayor especificidad al utilizar la prueba de cefoxitina en disco [62].

En la prueba en placa de ARC, se observó que el 56% de las cepas clínicas fueron formadoras de *biofilm*, mientras que el 39% no lo formaron y solo 5% fueron indeterminadas. Se encontró una proporción similar en estudios realizados por Yazdani *et al.* y Arciola *et al.*, en donde reportaron la producción de *biofilm* en el 54% y 61% de las cepas analizadas, respectivamente [63-64]. Ellos utilizaron

placas de ARC sin modificaciones, pero prolongaron el tiempo de incubación hasta las 72 horas, para una mejor definición de resultados; sus muestras provinieron de catéter y heridas. En otro ensayo realizado por Arslan y Özkardes, sólo encontraron que el 22% de las cepas de *S. aureus* fueron productoras de *biofilm* [65]. Utilizaron el método original de Freeman y sus cepas procedían principalmente del tracto respiratorio. Las diferencias en la producción de *biofilm* se pudieron deber al tiempo de incubación para la toma de resultados y al sitio de infección de la cepa analizada.

Hay pocos estudios sobre la relación directa entre la presencia del gen *icaA* y la formación de *biofilm* en cepas de *S. aureus*; algunos de los resultados que se han encontrado son contradictorios. En el ensayo de Cramton *et al.*, observaron una relación directa entre la formación de *biofilm* y la presencia del gen *icaA*, mientras que en otro estudio realizado por Arciola *et al.*, se halló que la presencia del gen no siempre implica la formación del *biofilm* [66]. En nuestro estudio se encontró que todas las cepas clínicas de *S. aureus* poseían el gen *icaA*, lo que concuerda con estudios de otros investigadores [64,66-67]. Estos hallazgos indican que aunque todas las cepas bacterianas contengan este gen, pocas cepas lo expresan para formar el *biofilm*.

En el presente estudio se investigó si existe una relación entre la formación de *biofilm* y la resistencia a los antibióticos en las cepas clínicas de *S. aureus*. Al correlacionar los resultados de la presencia del gen *mecA* (resistencia a antibióticos) y producción de *biofilm*, encontramos que de 34 cepas *mecA*(+), la mayoría no produjo *biofilm* (71%); mientras que de 63 cepas *mecA*(-), el 70% fueron productoras de *biofilm*. Se observó una relación inversa entre la presencia del gen *mecA* y la producción de *biofilm*. Estos resultados son semejantes a los encontrados en el estudio de Grinholc *et al.*, en el que se observó una mayor formación de *biofilm* en cepas que son *mecA*(-) [68]. En otro estudio realizado por Smith *et al.* (2008), no se encontró una diferencia significativa entre la formación de *biofilm* en cepas de SARM y de SASM, sugiriendo que no hay una correlación

entre la formación de *biofilm* y la resistencia a meticilina [69]. En un estudio comparativo entre dos hospitales de la Ciudad de México, realizado por Cabrera *et al.*, se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la producción de *biofilm* por el método en placa de ARC y la presencia del gen *mecA* [70].

Con base en la presencia del gen *mecA* y de la formación de *biofilm*, las 97 cepas clínicas estudiadas fueron clasificadas en 4 grupos. Se encontró que el mayor número de cepas (45%) fueron *mecA* (-) B (+).

Se obtuvieron los perfiles de resistencia/sensibilidad a 17 antimicrobianos con el objetivo de observar el comportamiento de la resistencia entre las cepas que presentan el gen *mecA* y aquellas que son productoras de *biofilm*. Los antimicrobianos estudiados fueron: AmC, AM, CZ, CTX, CF, CIP, CLR, CC, E, GM, IPM, OX, P, RA, Te, STX y Va.

En primer lugar, se compararon los perfiles de resistencia de las cepas *mecA*(+) y *mecA*(-); se observó que las cepas *mecA*(+) tienen una resistencia mayor al 90% para 10 antibióticos, mientras que en cepas *mecA*(-) solo dos antibióticos presentan este porcentaje de resistencia (Gráfica 7-8, 7-9). Se empleó la prueba Z para hacer la comparación del porcentaje de resistencia para 17 antibióticos entre estos dos grupos, observándose una mayor resistencia en cepas *mecA*(+). En el análisis estadístico se obtuvo una diferencia significativa para 11 antibióticos (AmC, CZ, CTX, CF, CIP, CLR, CC, E, IPM, OX, TE), de los cuales 5 pertenecen al grupo  $\beta$ -lactámico, 2 a los macrólidos, 1 a los carbapenémicos, 1 a las quinolonas, 1 a las tetraciclinas y 1 es un antibiótico misceláneo (Cuadro 8-1). Con estos resultados, observamos que la presencia del gen *mecA* es un factor muy importante para la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos; esto coincide con el estudio realizado por *Ubukata et al.*, en donde demuestra la correlación entre la presencia del gen *mecA* y la resistencia a los antibióticos de este grupo [71].

Después se realizó la comparación entre los perfiles de resistencia de las cepas B(+) y B(-); se observó en cepas B(-), una resistencia mayor al 70% para 12 de los antibióticos analizados, mientras que en las cepas B(+), solamente se observó una resistencia mayor al 70% para 2 antibióticos (Gráfica 7-10, 7-11). En la comparación que se realizó utilizando la prueba Z, se obtuvo una diferencia significativa en 8 antibióticos (AmC, CZ, CTX, CF, CIP, CC, IPM, OX) los cuales 5 son  $\beta$ -lactámicos, una quinolona, un macrólido y un carbapenémico. Se observó una mayor resistencia en B(-) (Cuadro 8-2).

Posteriormente, se compararon los perfiles de resistencia de las cepas *mecA*(+) B(+) y B(-); en las cepas *mecA*(+) B(+) se obtuvo una resistencia mayor o igual al 90% para 12 antibióticos, mientras que en las cepas *mecA*(-) B(-), sólo se encontró una resistencia similar para 7 antibióticos (Gráfica 7-12, 7-13). Al hacer la comparación de los porcentajes de resistencia por medio de la prueba Z, se comprobó que no existe una diferencia significativa entre estos grupos (Cuadro 8-3).

Finalmente, se estudiaron comparativamente los perfiles de resistencia de las cepas *mecA*(-) formadoras y no formadoras de *biofilm*; en las cepas *mecA*(-) formadoras de *biofilm* se encontró una resistencia mayor al 50% para 4 antibióticos, mientras que en las cepas *mecA*(-) no formadoras de *biofilm*, 8 antibióticos presentaron este porcentaje de resistencia (Gráfica 7-14, 7-15). Al utilizar la prueba estadística Z para comparar los porcentajes de resistencia, sólo se encontró una diferencia significativa en 2 antibióticos (AmC, OX), los cuales pertenecen al grupo de los  $\beta$ -lactámicos (Cuadro 8-4). Con estos resultados, observamos que la formación de *biofilm* no es un factor que determina la resistencia a los antibióticos.

## 8.- CONCLUSIONES

- Los sitios de infección más frecuentes fueron: catéter (40.2%) y vías respiratorias (25.8%).
- En el estudio realizado en la presente tesis, comprobamos que las pruebas de detección molecular tienen mayor precisión que las pruebas fenotípicas.
- La mayor parte de las cepas clínicas estudiadas (65%) no presentaron el gen *mecA*. Aquellas que si presentaron el gen presentaron una mayor resistencia a los antibióticos.
- La prueba de cefoxitina en disco es más confiable que la prueba de oxacilina por CMI para determinar la resistencia a meticilina mediada por el gen *mecA*.
- La mayoría de las cepas clínicas analizadas (56%) fueron productoras de *biofilm*.
- Todas las cepas de *S. aureus* presentaron el gen *icaA*, pero solo algunas lo expresaron con la formación de *biofilm in vitro*, por lo que tener este gen no implica necesariamente la formación de *biofilm*.
- Se observó una mayor formación de *biofilm* en cepas que no contuvieron el gen *mecA*.
- No se observó diferencia significativa en la resistencia a los antibióticos entre cepas formadoras y no formadoras de *biofilm*. El *biofilm* parece no ser un factor importante que determine la resistencia de las cepas clínicas de *S. aureus* estudiadas.

## REFERENCIAS

- 1.- **Classics in infectious diseases. "On abscesses". Alexander Ogston (1844-1929).** Rev Infect Dis. 1984; 6(1): 122-8
- 2.- Myles IA, Datta SK. ***Staphylococcus aureus*: an introduction.** Semin Immunopathol. 2012; 34(2): 181-4.
- 3.- Kloos WE & Schleifer, KH. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Baltimore: Williams & Wilkins; 1986.
- 4.- McFaddin JF. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.** 3ª ed. Editorial Médica Panamericana; 1993.
- 5.- Velazquez-Meza ME. **Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente.** Salud Pública Méx. 2005; 47(5): 381-387.
- 6.- **Microbial pathogen data sheets : *Staphylococcus aureus*.** MAF food safety, New Zealand. 2001.
- 7.- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. **Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg.** 18ª ed. El Manual Moderno; 2005.
- 8.- Orenstein A. **The discovery and naming of *Staphylococcus aureus*.** [acceso mayo 2012] Disponible en <http://www.antimicrobe.org/h04c.files/history/S-aureus.pdf>
- 9.- Shopsis B, Gomez M, Waddington M, Riehman M, Kreiswirth BN. **Use of coagulase gene (coa) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.** J Clin Microbiol. 2000; 38(9): 3453–6.
- 10.- Archer GL. ***Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen.** Clin Infect Dis. 1998; 26(5): 1179-81.
- 11.- Hamdan-Partida A, Sainz-Espuñes T, Bustos-Martínez J. **Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community.** J Clin Microbiol. 2010; 48(5): 1701-5.
- 12.- Custovic A, Sivic S, Ahmetagic S. **Epidemiological and microbiological control of hospital infections in surgical patients.** Med Arh. 2011; 65(5): 300-3.

- 13.- Stevens AM, Hennessy T, Baggett HC, Bruden D, Parks D, Klejka J. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage and risk factors for skin infections, Southwestern Alaska, USA.** Emerg Infect Dis. 2010; 16(5): 797–803.
- 14.- Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. **Comparison of community and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection.** JAMA. 2003; 290(22):2976-84.
- 15.- Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. **Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department.** N Engl J Med. 2006; 355(7): 666-74.
- 16.- Lowy FD. **Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*.** J Clin Invest. 2003; 111(9): 1265-73.
- 17.- Chambers HF, Deleo FR. **Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era.** Nat Rev Microbiol. 2009 Sep; 7(9): 629-41.
- 18.- Olaechea PM, Insausti J, Blanco A, Luque P. **Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales.** Med Intensiva. 2010; 34(4): 256–67.
- 19.- Miranda MG. **Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México.** Bol Med Hosp Infant Mex. 2011; 68(4): 262-70.
- 20.- **Prevención de las infecciones nosocomiales.** GUÍA PRÁCTICA 2ª ed. Organización Mundial de la Salud, 2003.
- 21.- Otto M. **Staphylococcal *Biofilms*.** Curr Top Microbiol Immunol. 2008; 322: 207–28.
- 22.- Diemond JBB, Miranda NG. ***Biofilm*: ¿amenaza latente o factor de protección? Estado del arte.** Enf Inf Microbiol. 2007; 27 (1): 22-28.
- 23.- Lasa I, del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. ***Biofilms* bacterianos e infección.** An Sist Sanit Navar. 2005; 28(2): 163-75.
- 24.- Betancourth M, Bolero JE, Rivera SP. **Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo.** Colomb Med. 2004; 35(3): 34-39.
- 25.- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. **Bacterial *biofilms*: a common cause of persistent Infections.** Science. 1999; 284 (5418): 1318-22.
- 26.- Otto M. ***Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen.** Nat Rev Microbiol. 2009; 7(8): 557-567.

- 27.- Oliveira A, Cunha ML. **Comparison of methods for the detection of *biofilm* production in coagulase-negative staphylococci.** BMC Res Notes. 2010; 3: 260.
- 28.- Christensen GC, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. **Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces.** Infect Immun. 1982; 37(1): 318-26.
- 29.- Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. **New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci.** J Clin Pathol. 1989; 42(8): 872-74.
- 30.- Christensen GD, Simpson WA, Yonger JJ, Baddor LM, Barrett FF. **Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices.** J Clin Microbiol. 1985; 22: 996-1006.
- 31.- García-Rodríguez JA, Gomis M, González J, Prieto J. **Historia de la antibioterapia.** [acceso junio 2012] Disponible en <http://www.sepeap.org/archivos/libros/antibioticos/1.pdf>
- 32.- Martínez JA, Sánchez F. **Mecanismo de acción de los antibióticos.** JANO. 2007; N°1.660: 28-34.
- 33.- **Generalidades de Antibióticos.** Libros virtuales IntraMed. [acceso junio 2012] Disponible en [http://www.intramed.net/sitios/librovirtual1/pdf/librovirtual1\\_50.pdf](http://www.intramed.net/sitios/librovirtual1/pdf/librovirtual1_50.pdf)
- 34.- Bado I, Cordeiro N, García V, Seija V, Vignoli R. **Temas de bacteriología y virología médica.** Oficina del Libro FEFMUR, 2008.
- 35.- Belloso WH. **Historia de los antibióticos.** Rev Hosp Ital B Aires. 2009; 29(2): 102-111.
- 36.- Sierra JM y J.Vila. **Mecanismos de acción y resistencia a los antimicrobianos en bacterias Gram-positivas.** [acceso julio 2012] Disponible en [http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2419/02.JMSO\\_ARTICLE\\_I.pdf;jsessionid=FEFBB56A212D08ECBB11FC01D23F057A.tdx2?sequence=2](http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2419/02.JMSO_ARTICLE_I.pdf;jsessionid=FEFBB56A212D08ECBB11FC01D23F057A.tdx2?sequence=2)
- 37.- Crespo MP. **La resistencia bacteriana: ¿estamos preparados para detectarla?.** Infectio. 2005; 9(1): 31-45

- 38.- Castellano MJ, Perozo AJ. **Mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Staphylococcus aureus***. Kasmera. 2010; 38(1): 18-35
- 39.- Deurenberg RH, Stobberingh EE. **The evolution of *Staphylococcus aureus***. Infect Genet Evol. 2008; 8(6): 747–63
- 40.- Malachowa N, DeLeo FR. **Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus***. Cell Mol Life Sci. 2010; 67(18): 3057-71.
- 41.- Beveridge TJ. **Use of the Gram stain in microbiology**. Biotech Histochem. 2001; 76(3): 111-8.
- 42.- Coico R. **Gram staining**. Curr Protoc Microbiol. 2005 Oct; apéndice 3C.
- 43.- Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, et al. **Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test**. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2010; 9: 23.
- 44.- Arciola CR, Campoccia D, Borreli AM, Donati ME, Montanaro L. **Congo red agar plate method: improved accuracy and new extended application to *Staphylococcus aureus***. New Microbiol. 2001; 24(4): 355-63.
- 45.- Knobloch JK, Horstkotte, Rohde H, Mack D. **Evaluation of different detection methods of *biofilm* formation in *Staphylococcus aureus***. Med Microbiol Immunol. 2002; 191(2): 101-6.
- 46.- Arciola, CR, Baldassarri L, 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): 2151–56.
- 47.- **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement**. M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Vol. 31. No. 1. Jan 2011.
- 48.- Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X. **Ecología Molecular**. Instituto Nacional de Ecología. 2007.
- 49.- Mullis KB. **The unusual origin of the polymerase chain reaction**. Sci Am. 1990; 262(4): 56-61

- 50.- Rodríguez IP, Barrera HA. **La reacción en cadena de la polimerasa a sus dos décadas de invención.** CIENCIA UANL. 2004. Vol VII (3): 323-35.
- 51.- **Alkmi Quick Guide for PCR. A laboratory reference for the Polymerase Chain Reaction.** Vol 1. 1999.
- 52.- Voet D., Voet JG, Pratt CW. **Fundamentos de bioquímica: La vida a nivel molecular.** 3ª ed. Editorial Médica Panamericana. 2006.
- 53.- Bioted, Biotecnología Educativa. Electroforesis. [acceso enero 2013]. Disponible en [http://www.bioted.es/medio\\_electroforesis.htm](http://www.bioted.es/medio_electroforesis.htm)
- 54.- Reynaga J. **Prueba de comparación de 2 proporciones.** [acceso noviembre 2012]. Disponible en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/censenanza/planunico/spii/antologia2012/5.pdf>
- 55.- Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, et al. **Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study.** J Clin Microbiol. 2011; 49(5): 1866-71.
- 56.- Hernández HG, González N, Castañeda JL, Arzate P, Saldaña C, Monroy A. **Infecciones nosocomiales en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) 2004-2005.** Acta Pediatr Mex. 2006; 27(6): 325-8.
- 57.- Ángeles U, Gayoso JA, Díaz RD, Velázquez Y, Marcial C, Zambrana MR, et al. **Factores de riesgo específicos en cada tipo de infección nosocomial.** Enf Inf Microbiol 2010; 30(3): 91-9
- 58.- Frometa I, Izquierdo FM, Lopez M. **Infecciones nosocomiales en un hospital del tercer nivel. Experiencia de 5 años.** Rev Cubana Med 2008; 47(3).
- 59.- Castellano MJ, Perozo AJ, Vivas R. **Detección fenotípica y molecular de resistencia a meticilina en *S. aureus*.** Kasmera. 2008; 36 (1): 28-38.
- 60.- Wilson M, Otth C, Medina G, Otth L, Fernández H, Arce M, et al. **Genotipos de *Staphylococcus aureus* con fenotipo meticilino resistente, aislados de pacientes del Hospital Base de Valdivia.** Rev Med Chile 2007; 135 (5): 596-601.

- 61.- Macías A. ***Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en México.** Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. [acceso septiembre 2013]. Disponible en <http://www.abev.com.br/controldeinfeccao/palestras/17h-alejandromacias-epidemiologianomexico.pdf>
- 62.- Baddour MM, AbuElKheir M, Fatani AJ. **Comparison of *mecA* polymerase chain reaction with phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Curr Microbiol. 2007; 55(6): 473-9.
- 63.- Yazdani R, Oshaghi M, Havayi A, Pishva E, Salehi R. **Detection of *icaAD* gene and *biofilm* formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections.** Iranian J Publ Health, 2006; 35(2): 25-28.
- 64.- Arciola CR, Baldassarri L, 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): 2151–6.
- 65.- Arslan S, Ozkardes F. **Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(1): 29-33.
- 66.- Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. **The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for *biofilm* formation.** Infect Immun. 1999; 67(10): 5427-33.
- 67.- Martín JV, Pérez E, Claverie F, Díez O, Batista N, Morales M, et al. **Detection of *Staphylococcus aureus* clinical isolates harboring the *ica* gene cluster needed for *biofilm* establishment.** J Clin Microbiol. 2002; 40(4): 1569-70.
- 68.- Grinholc M, Wegrzyn G, Kurlenda J. **Evaluation of *biofilm* production and prevalence of the *icaD* gene in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers.** FEMS Immunol Med Microbiol. 2007; 50(3): 375-9.
- 69.- Smith K, Perez A, Ramage G, Lappin D, Gemmell CG, Lang S. **Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.** J Clin Microbiol. 2008; 57(8): 1018-23.

**70.-** Cabrera CR, Morelos RR, Galicia A, Meléndez HE. **Antibiotic susceptibility and *biofilm* production and correlation to methicillin resistant genotype of *Staphylococcus epidermidis* strains from Mexican hospital.** The 110<sup>th</sup> general meeting of the American Society for Microbiology. 2010: 2036. Abstract.

**71.-** Ubukata K, Nakagami S, Nitta A, Yamane A, Kawakami S, Sugiura M, et al. **Rapid detection of the *mecA* gene in methicillin-resistant staphylococci by enzymatic detection of polymerase chain reaction products.** J Clin Microbiol. 1992; 30(7): 1728–33.

## APÉNDICE A

### Cepas bacterianas

Se utilizaron 97 cepas de *Staphylococcus aureus* obtenidas de pacientes con infección nosocomial, del Hospital General “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar” del ISSSTE (HGC), de la Cd de México. Como control interno de experimentación, se utilizó la cepa HGC 3; ésta fue aislada de una herida quirúrgica en un paciente adulto y previamente caracterizada fenotípicamente como se especifica a continuación.

Número	Microorganismo	Características
HGC 3	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>coa</i> (+), <i>mecA</i> (+) e <i>icaA</i> (+). Resistente a metilina. No productora de <i>biofilm</i> .

Por otra parte, se utilizaron 4 cepas de referencia, las cuales fueron adquiridas de la colección de cepas bacterianas de la ATCC (American Type Culture Collection) y tienen las siguientes características:

Número de catálogo ATCC	Microorganismo	Características
ATCC 700699	<i>Staphylococcus aureus</i> (Mu50)	<i>coa</i> (+), <i>mecA</i> (+) e <i>icaA</i> (+). Resistente a la metilina. Productora de <i>biofilm</i> .
ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>coa</i> (+), <i>mecA</i> (-) e <i>icaA</i> (+). Sensible a la metilina. Productora de <i>biofilm</i> .
ATCC 35984	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (RP62A)	<i>coa</i> (-), <i>mecA</i> (+) e <i>icaA</i> (+). Resistente a metilina. Productora de <i>biofilm</i> .
ATCC 35218	<i>Escherichia coli</i>	Bacilo Gram negativo
ATCC 29212	<i>Enterococcus faecalis</i> [Portman]	Coco Gram positivo, catalasa (-)

Se emplearon cepas clínicas de otras especies de *Staphylococcus*, obtenidas del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (**INPer**), S.Sa, para la validación de especificidad y sensibilidad de los oligonucleótidos del gen *icaA*, utilizados en esta tesis. (Apéndice C).

- **INPer 170** *Staphylococcus xilosus*
- **INPer 280** *Staphylococcus lugdunensis*
- **INPer 287** *Staphylococcus intermedius*
- **INPer 395** *Staphylococcus auricularis*
- **INPer 432** *Staphylococcus capitis*
- **INPer 434** *Staphylococcus warnerii*
- **INPer 454** *Staphylococcus saprophyticus*
- **INPer 458** *Staphylococcus haemolyticus*
- **INPer 468** *Staphylococcus hominis*
- **INPer 472** *Staphylococcus cohnii*
- **INPer 548** *Staphylococcus schleiferi*

## APÉNDICE B

### Diseño de oligonucleótidos para la detección molecular por PCR

Los oligonucleótidos son secuencias cortas de ADN de cadena sencilla que determinan el sitio del ADN molde que se amplificará. En la amplificación por PCR, se utilizan 2 tipos de oligonucleótidos:

- **Inicio (Forward)**.- Tiene la misma secuencia que se encuentra en una de las cadenas del ADN molde.
- **Reversa (Reverse)**.- Corresponde a la secuencia complementaria de la cadena del ADN molde. Se encuentra en la parte final del fragmento del gen que se quiere amplificar [48].

El diseño del par de oligonucleótidos es un paso muy importante que influye en la eficiencia y sensibilidad de la amplificación del ADN. Para su diseño, se deben tomar en cuenta varias condiciones:

- La longitud de cada oligonucleótido debe encontrarse entre 18 a 30 pares de bases.
- La secuencia de los oligonucleótidos candidatos a PCR deben ser altamente complementaria.
- La composición de guanina-citosina (G-C) debe estar entre 35% y 65%.
- Las secuencias de los oligonucleótidos candidatos a PCR no deben ser complementarios entre sí, esto evitará la formación de dímeros y horquillas.
- La concentración de cada oligonucleótido debe ser entre 0.1 a 1.5  $\mu\text{M}$ .
- Para que los oligonucleótidos tengan buena especificidad se debe evitar que se alineen con otro segmento de ADN diferente al que se desea amplificar y que se encuentre dentro del ADN de la bacteria
- La temperatura de alineamiento ( $T_a$ ) para los oligonucleótidos es aproximadamente 5°C menor a la temperatura de fusión ( $T_m$ ) calculada. Por lo general, se encuentra en el rango de 55 a 75°C y debe ser similar en ambos oligonucleótidos, evitando tener una diferencia mayor a 6°C.

Para el cálculo de la temperatura de fusión se utilizó la siguiente fórmula

$$T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$$

En donde:

**T<sub>m</sub>** = Temperatura de fusión

**A, T, G, C** = Número de nucleótidos de cada tipo presentes en el oligo.

Los oligonucleótidos utilizados para la detección de los genes de *coa*, *mecA* e *icaA* fueron diseñados en el laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Torre de Investigación, de la Facultad de Medicina (UNAM); utilizando como secuencia de referencia, el genoma de *Staphylococcus aureus* Mu50 (ATCC 700699). El ADN de este estafilococo es circular y consta de 2,878,529 pb; en la base de datos GenBank, tiene el número de acceso NC\_002758.2.

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el programa Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research). Disponible en <http://primer3.wi.mit.edu/>. Este programa es un algoritmo matemático y tiene entre sus funciones, la opción de sugerir pares de oligonucleótidos para PCR, tomando en cuenta varios parámetros, entre los cuales se encuentran: temperatura de alineamiento, tamaño del producto y el porcentaje de guanina-citosina.

Se seleccionaron un par de oligonucleótidos para cada gen y posteriormente se realizó un análisis bioinformático, utilizando el programa BLAST (National Center for Biotechnology Information – NCBI). Disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Este programa compara la secuencia de oligonucleótidos que se ingresa contra las secuencias completas de genomas bacterianos, que se encuentran en bases de datos de libre acceso; puede comparar secuencias de nucleótidos, proteínas y secuencias traducidas. Además proporciona información estadística para evaluar la significancia del alineamiento.

Se utilizó el programa BLAST para analizar los amplicones de cada gen seleccionado, después se revisaron los resultados obtenidos y así aseguramos

que la secuencia fuera específica para *S. aureus*. Posteriormente, se solicitó la síntesis los oligonucleótidos a una casa comercial y se procedió a estandarizar la PCR en el laboratorio.

## **Gen *coa***

El gen *coa* es el responsable de la producción de la enzima coagulasa, la cual tiene la función de coagular el plasma. El genoma de *S. aureus* Mu50, contiene este gen en la coordinación entre 264,636 – 266,612 pb y posee un tamaño total de 1,977 pb.

### ***Secuencia del gen *coa* en *S. aureus* Mu50***

Este gen se puede localizar en banco de datos del NCBI, su número de acceso es: 1120187 (GeneID).

```
ATGAAAAAGCAAATAATTTTCGCTAGGCGCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTTAC
ATGGGATAACAAAGCAGATGCGATAGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAATCAAGAG
TGAATGAGAAAAGTAAAAAGGGAGCTACTGTTTCAGATTATTACTATTGGAAAATA
ATTGATAGTTTAGAGGCACAATTTACTGGAGCAATAGACTTATTGGAAGATTATAA
ATATGGAGATCCTATCTATAAAGAAGCGAAAGATAGATTGATGACAAGAGTATTAG
GAGAAGACCAGTATTTATTAAAGAAAAAGATTGATGAATATGAGCTTTATAAAAAG
TGGTATAAAAAGTTCAAATAAGAACACTAATATGCTTACTTTCCATAAATATAATCT
TTACAATTTAACAATGAATGAATATAACGATATTTTTAACTCTTTGAAAGATGCAG
TTTATCAATTTAATAAAGAAGTTAAAGAAATAGAGCATAAAAATGTTGACTTGAAG
CAGTTTGATAAAGATGGAGAAGACAAGGCAACTAAAGAAGTTTATGACCTTGTTTC
TGAAATTGATACATTAGTTGTAACCTTATTATGCTGATAAGGATTATGGGGAGCATG
CGAAAGAGTTACGAGCAAACTGGACTTAATCCTTGGAGATACAGACAATCCACAT
AAAATTACAAATGAGCGTATAAAAAAAGAAATGATCGATGACTTAAATTC AATTAT
AGATGATTTCTTTATGGAGACTAAACAAAATAGACCGAATTTCTATAACAAAATATG
ATCCAACAAAACACAATTTTAAAGAGAAGAGTGAAAATAAACCTAATTTTGATAAA
TTAGTTGAAGAAACAAAAAAGCAGTTAAAGAAGCAGACGAATCTTGAAAAATAA
AACTGTCAAAAAATACGAGGAACTGTAACAAAATCTCCTGTTGTAAAAGAAGAGA
AGAAAGTTGAAGAACCCTCAATTACCTAAAGTTGGAAACCAGCAAGAGGTTAAACT
ACGGCTGGTAAAGCTGAAGAAACAACACAACCAGTGGCACAGCCATTAGTAAAAAT
TCCACAAGAAACAATCTATGGTGAAACTGTAAAAGGTCCAGAATATCCAACGATGG
AAAATAAAACGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCCGATTTTCTAACAATGGAA
CAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTATACTCAACCGACGACACCGAACCTAT
```

TTTAGAAGGTCTTGAAGGTAGCTCATCTA**AACTTGAAATAAAACCACAAGGTACTG  
AATCAACGTTGAAAGGTATTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAACCTCAA  
GCAACTGAAACAACAGAAGCTTCTCAATATGGTCCGAGACCGCAATTTAACAAAAC  
ACCTAAGTATGTGAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTA**TCCGTGAATACAACGATG  
GAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAGTGAAACAAATGCA  
TACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCACAGTATCATAACGGAGCTCGCCCAACACA  
AAACAAGCCAAGTGAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAG  
TATCATAACGGTGGTCTCGCCCAACACAAAAAAGCCAAGCAAAACAAATGCATACAAC  
GTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAA  
GCCAAGCAAAACAAATGCATATAACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCAT  
ACGGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGCGAAACAAATGCATACAACGTAACA  
ACACATGCAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAGCCAAG  
CGAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGGC  
CTAGAGTAACAAAATAA

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño	Temperatura de alineamiento
<b>coa-F</b>	AACTTGAAATAAAACCACAA	20 pb	50°C
<b>coa-R</b>	TACCTGTACCAGCATCTCTA	20 pb	58°C

En la secuencia del gen se resaltó en negritas la parte que corresponde al amplicón esperado, tiene un tamaño de 177 pb.

### **Análisis por el programa BLAST**

Microorganismo	Identidad	% ident. *	Producto
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> LGA251	177/177	100%	Proteína hipotética
<i>S. aureus</i> 04-02981	177/177	100%	Coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ECT-R 2	177/177	100%	Coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ED133	177/177	100%	Coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> M013	177/177	100%	Coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ED98	177/177	100%	Coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu3	177/177	100%	Precursor de la coagulasa

<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> JH1	177/177	100%	Precursor de la coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> JH9	177/177	100%	Coagulasa
<i>S. aureus</i> RF122	177/177	100%	Precursor de la coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50	177/177	100%	Coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> N315	177/177	100%	Coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 11819-97	175/177	99%	Coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> TCH130	173/177	98%	Coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> VC40	173/177	98%	Coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> USA300_TCH1516	173/177	98%	Precursor de la coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> str. Newman	173/177	98%	Precursor de la coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> NCTC 8325	173/177	98%	Coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> USA300_FPR3757	173/177	98%	Coagulasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> COL	173/177	98%	Coagulasa

\* % ident. – porcentaje de identidad con los oligonucleótidos propuestos para PCR.

Los resultados del análisis por el programa BLAST nos muestra que la secuencia se encuentra en diferentes especies de *S. aureus* de genomas reportados en GenBank y el producto esperado, está relacionado con la enzima coagulasa.

## Gen *mecA*

Este gen codifica una proteína alterada de unión a la penicilina (PBP2a) que presenta una baja afinidad hacia los antibióticos del grupo  $\beta$ -lactámico, lo que le da una resistencia a este tipo de antimicrobianos. En el genoma de *S. aureus* Mu50, se localiza en la cadena complementaria entre 44,992 – 46,998 pb y tiene una longitud total de 2007 pb.

### Secuencia del gen *mecA* en *S. aureus* Mu50

El número de acceso del banco de datos del NCBI es: 1120001 (GeneID).

```
ATGAAAAAGATAAAAATTGTTCCACTTATTTTAATAGTTGTAGTTGTCGGGTTTGG
TATATATTTTATGCTTCCAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTTGATGCAATTG
AAGATAAAAATTTCAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGAT
AATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCCGATAAAAATATATAATAGTTTtaggCGT
TAAAGATATAAACATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAAGTATCTAAAATAAAAAAC
GAGTAGATGCTCAATATAAAATTAAAACAAACTACGGTAACATTGATCGCAACGTT
CAATTTAATTTTGTAAAGAAGATGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGT
CATTATTCAGGAATGCAGAAAGACCAAAGCATAACATATTGAAAATTTAAAATCAG
AACGTGGTAAAATTTTAGACCGAAACAATGTGGAATTGGCCAATACAGGAACAGCA
TATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAAAGCAATCGC
TAAAGAACTAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAACAACAATGGATCAAATTTGGG
TACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAACCGTTAAAAAAATGGATGAATATTTA
AGTGATTTTCGCAAAAAAATTTTCATCTTACAACATAATGAAACAGAAAGTCGTAAC
TAACCTTAGGAAAAGCGACTTCACATCTATTAGGTTATGTTGGTCCCATTAACCTG
AAGAATTAACAACAAGAATATAAAGGCTATAAAGATGATGCAGTTATTGGTAAA
AAGGGACTCGAAAACTTTACGATAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGT
CACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAAAGA
AAAAAGATGGCAAAGATATTCAACTAACTATTGATGCTAAAGTTCAAAGAGTATT
TATAACAACATGAAAATGATTATGGCTCAGGTAAGTATCCACCCTCAAACAGG
TGAATTATTAGCACTTGTAAGCACACCTTCATATGACGTCTATCCATTTATGTATG
GCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGAAGATAAAAAAGAACCTCTGCTC
ACAAGTTCCAGATTACAACCTTCACCAGGTTCAACTCAAAAAATATTAACAGCAAT
GATTGGGTAAATAACAACAACATTAGACGATAAAACAAGTTATAAAATCGATGGTA
AAGGTTGGCAAAAAGATAAATCTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTG
GTAAATGGTAATATCGACTTAAAACAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTT
TGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAAATTTGAAAAAGGCATGAAAAAAC
TAGGTGTTGGTGAAGATATAACCAAGTGATTATCCATTTTATAATGCTCAAATTTCA
AACAAAAATTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTCAGGTTACGGACAAGGTGA
```

AATACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAATAATG  
 GCAATATTAACGCACCTCACTTATTAAAAGACACGAAAAACAAAGTTTGGGAAGAAA  
 AATATTATTTCCAAAGAAAATATCAATCTATTAAGTATGGTATGCAACAAGTCGT  
 AAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACCTTAATTGGCAAAT  
 CCGGTACTGCAGAAGTCAAATGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATTGGGTGG  
 TTTATATCATATGATAAAGATAATCCAAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGA  
 TGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAAATCTCAGGTAAAGTGTATG  
 ATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAA

Oligonucléotido	Secuencia	Tamaño	Temperatura de alineamiento
<b><i>mecA-F</i></b>	ATGGCAAAGATATTCAACTA	20 pb	52°C
<b><i>mecA-R</i></b>	GAGTGCTACTCTAGCAAAGA	20 pb	58°C

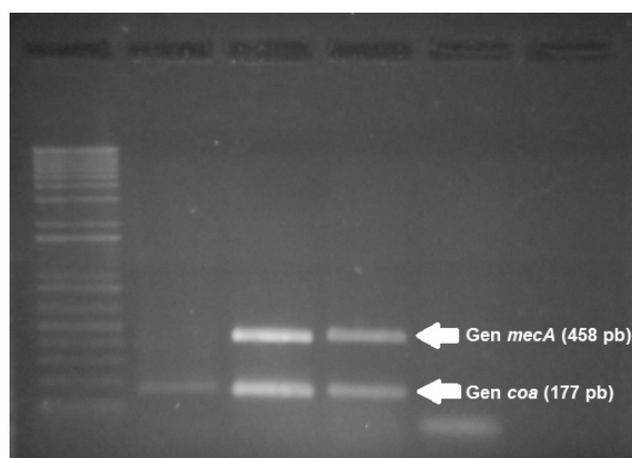
En la sección en negritas se resalta la secuencia del amplicón. Este posee un tamaño de 458 pb.

### **Análisis del programa BLAST**

Microorganismo	Identidad	% ident. *	Producto
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> EMRSA16	458/458	100%	PBP2a
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> A017934/97	458/458	100%	PBP2a
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> WW2703/97	458/458	100%	PBP2a
<i>S. aureus</i> 08BA02176	458/458	100%	PBP2a
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ST398	458/458	100%	PBP3
<i>S. aureus</i> 04-02981	458/458	100%	PBP2a
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> TW20	458/458	100%	PBP2a
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> HO 5096 0412	458/458	100%	PBP2a
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 11819-97	458/458	100%	PBP2a

<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> T0131	458/458	100%	Peptidoglicano glicosiltransferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> TCH60	458/458	100%	PBP2a
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> str. JKD6008	458/458	100%	PBP2a
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> JKD6159	458/458	100%	PBP2a
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MSHR1132	458/458	100%	PBP2a
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> M013	458/458	100%	PBP2a
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> USA300_TCH1516	458/458	100%	PBP2a
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu3	458/458	100%	PBP2a
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> JH1 chromosome	458/458	100%	Peptidoglicano glicosiltransferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> JH9 chromosome	458/458	100%	Peptidoglicano glicosiltransferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> USA300_FPR3757	458/458	100%	PBP2a

\* % ident. – porcentaje de identidad con os oligonucleótidos propuestos para PCR.



**Figura B1.- Localización de los amplicones de los genes *mecA* y *coa* de *S. aureus* Mu50, en un gel de agarosa al 1%. Realizado durante la estandarización de la PCR en**

el laboratorio. Foto: Norma G. Morales Ramírez

## Gen *icaA*

Codifica para la N-acetil-glucosaminil transferasa, enzima clave en la síntesis del polisacárido de adhesión intercelular (PIA), principal componente del *biofilm*. En el genoma de *S. aureus* Mu50, este gen se localiza entre 2,834,211 – 2,835,449 pb y tiene una longitud total de 1239 pb.

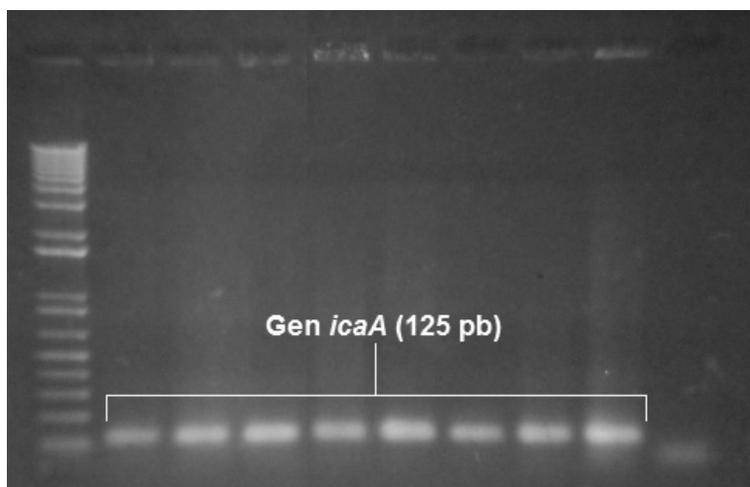
### **Secuencia del gen *icaA* en *S. aureus* Mu50**

Este gen posee el número de acceso 1122691 (GeneID) en el banco de datos del NCBI.

```
TTGCAATTTTTTAACTTTTTGCTTTTTTATCCTGTATTTATGTCTATTTACTGGAT
TGTCGGTTCAATTTATTTCTATTTTACCAGAGAAATTAGATATTCATTGAACAAGA
AGCCTGACATAAATGTGGATGAATTAGAAGGCATTACATTTTTACTTGCCTGTTAT
AACGAAAGTGAAACGATTGAAGATACGTTGTCTAATGTTCTTGCACTCAAATACGA
GAAGAAAGAAATTATTATCATTAAATGATGGAAGTTCAGATAATACAGCAGAACTCA
TCTATAAAATCAAAGAAAATAATGACTTTATTTTTCGTCGATTTACAAGAAAACAGA
GGTAAAGCCAACGCACTCAATCAAGGCATTAAACAGGCTTCATATGATTATGTAAT
GTGCTTGGATGCAGATACTATCGTTGATCAAGATGCACCATATTATATGATTGAGA
ATTTCAAACATGATCCAAAACCTTGGTGCAGTTACAGGTAATCCTAGAATTCGAAAT
AAGAGTTCATTTTTAGGTAAAATTCAAACGATAGAATATGCAAGTTTAATTGGCTG
TATTAAGCGAAGTCAGACACTTGCTGGCGCAGTCAATACTATTTTCGGGTGTCTTCA
CTCTATTTAAAAAAGTGCAGTTGTGCGACGTTGGCTACTGGGATACTGATATGATT
ACCGAAGATATTGCAGTTTCTTGGAATTGCATTTACGTGGATATCGTATTAAGTA
TGAACCGCTTGCCATGTGTTGGATGTTGGTTCCAGAAACATTGGGAGGTCTTTGGA
AGCAACGCGTGAGATGGGCTCAAGGGGGACACGAAGTATTACTACGAGACTTTTTT
AGCACAATGAAAACGAAAAGGTTTCCTTTATATATTTTGATGTTTGAGCAAATCAT
CTCAATTTTATGGGTATATATAGTGCTTCTATATTTAGGCTATTTGTTCATAACAG
CAAACCTTCTTAGACTATACATTTATGACATATAGTTTTTCAATATTTCTACTATCA
TCATTTACTATGACTTTTTATAAACGTTATTCAATTTACAGTCGCACTCTTTATTGA
TAGTCGCTACGAGAAAAAGAATATGGCTGGACTTCATATTTGTAAGTTGGTATCCGA
CAGTATACTGGATTATTAACGCAGCAGTAGTTCCTTGTGCGATTTCCAAAAGCATT
AAACGTAAGAAAGGTGGTTACGCAACATGGTCAAGCCAGACAGAGGGGAATACCCA
ACGCTAA
```

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño	Temperatura de alineamiento
<i>icaA-F</i>	TCATATTTGTAAGTTGGTATCC	22 pb	58°C
<i>icaA-R</i>	TCTGTCTGGGCTTGACCAT	19 pb	58°C

El amplicón obtenido tiene un tamaño de 125 pb.



**Figura B2.-** Localización del amplicón del gen *icaA* de *S. aureus* Mu50, en un gel de agarosa al 1%. Realizado durante la estandarización de la PCR en el laboratorio.

Foto: Norma G. Morales Ramírez

### **Análisis del programa BLAST**

Microorganismo	Identidad	% ident. *	Producto
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CM05	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MRSA131	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MRSA177	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> EMRSA16	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> M809	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa

<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> A017934/97	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> C101	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> C427	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> D139	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> M899	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> TCH130	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> LGA251	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> TW20	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> HO 5096 0412	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ECT-R 2	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> str. JKD6008	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> JKD6159	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ED133	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> M013	125/125	100%	N-acetil-glucosaminil transferasa

\* % ident. – porcentaje de identidad con los oligonucleótidos propuestos para la PCR.

En el análisis se observó que solo cepas de *S. aureus* presentaron el amplicón y todos los productos se relacionan con la formación de *biofilm*.

## APÉNDICE C

### Validación bioinformática de los oligonucleótidos de *icaA* utilizados en la prueba de PCR

Para la validación de sensibilidad y especificidad de los oligonucleótidos diseñados, se realizó un ensayo con la cepa de referencia de *S. aureus* Mu50 (ATCC700699) y en cepas de otras especies de *Staphylococcus*. La PCR se realizó como se describe en la sección de metodología y se utilizó el programa “SAICA582”, también descrito en dicha sección. Después se utilizó un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, que permitió la visualización de la banda de 125 pb correspondiente a *icaA*.

### Resultados de la estandarización de la PCR para el gen *icaA* con otras especies de *Staphylococci*

Número	Especie	Resultado
ATCC700699	<i>Staphylococcus aureus</i> Mu50	Se observó la banda de <i>icaA</i>
INPer 170	<i>Staphylococcus xilosus</i>	No se observaron bandas
INPer 280	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	No se observaron bandas
INPer 287	<i>Staphylococcus intermedius</i>	No se observaron bandas
INPer 395	<i>Staphylococcus auricularis</i>	No se observaron bandas
INPer 432	<i>Staphylococcus capitis</i>	No se observaron bandas
INPer 434	<i>Staphylococcus warnerii</i>	No se observaron bandas
INPer 454	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	No se observaron bandas
INPer 458	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	No se observaron bandas
INPer 468	<i>Staphylococcus hominis</i>	No se observaron bandas
INPer 472	<i>Staphylococcus cohnii</i>	No se observaron bandas
INPer 481	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	No se observaron bandas
INPer 548	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	No se observaron bandas

En este ensayo de PCR, solo se presentó la banda de 125 pb en la cepa de *S. aureus* Mu50, por lo que se comprueba la funcionalidad de los oligonucleótidos diseñados. Al no presentar la banda de *icaA* en otras especies de *Staphylococci*, nos indica que son específicos para esta especie.

## APÉNDICE D

### Materiales y Reactivos

#### Medios de Cultivo

- Agar infusión cerebro-corazón (BHI) OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England. Lote: 671010.
- Agar sal y manitol. OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England. Lote: 527182.
- Agar Mueller Hinton. BBL. Becton Dickinson an Company. Sparks, Maryland. USA. Lote: 3238759.

#### Reactivos

- **2-propanol**. Tecsiquim, México. D.F. Lote: TEC-073-VB-H.
- **Agarosa (UltraPure)**. INVITROGEN, Carlsbad, Cal. EUA. Lote: D012408.
- **Alcohol etílico absoluto**. Reasol, México. Lote: 6063.
- **Buffer de carga (10X BlueJuice)**. INVITROGEN, Carlsbad, Cal. EUA.  
Lote: 875288
- **Buffer de Mg<sup>2+</sup>**. AltaEnzymes Co. Calgary, Alberta, Canada. Lote: 101205.
- **Buffer TAE 1X**. INVITROGEN, Carlsbad, Cal. EUA. Lote: 920810.
- **Cloruro de sodio**. J.T. Baker, Xalostoc, México. Lote: E19C61.
- **Colorante rojo Congo**. Sigma-Aldrich, Co. St. Louis MO. Lote: MKBB0292.
- **Discos para antibiograma**. OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England.
  - Cefoxitina (30µg). Lote: 965081.
  - Clindamicina (2µg). Lote: 808826.
  - Eritromicina (15µg). Lote: 956476.
- **DNTP mix**. INVITROGEN, Carlsbad, Cal. EUA. Lote: 865302.
- **EDTA**. Sigma-Aldrich, Co. St. Louis MO, EUA. Lote: 044K0016
- **Glucosa**. Sigma-Aldrich, Co. St. Louis MO, EUA.
- **Kit para tinción de Gram**. Hycel de México. S.A de C.V. Lote: 179982.
- **Lisozima (5 mg/mL)**. Sigma-Aldrich, Co. St. Louis MO, EUA. Lote: 094K1454.

- **Lisostafina (5 mg/mL)**. Sigma-Aldrich, Co. St. Louis MO, EUA. Lote: 129K4020.
- **Marcador Molecular (1 KB Plus DNA Ladder)**. INVITROGEN, Carlsbad, Cal. EUA. Lote: 939786.
- **Oligonucleótidos**. INVITROGEN, Carlsbad, Cal. EUA.
  - *coa*-F Lote: 116135B02                      *coa*-R Lote: 116135B03
  - *ica*A-F Lote: 16708B08                      *ica*A-R Lote: 16708B09
  - *mec*A-F Lote: 116135A12                      *mec*A-R Lote: 116135B01
- **Peróxido de Hidrógeno al 3%**. ZUUM, Universal Productora S.A. de C.V. Lote: 1008022.
- **Plasma de Conejo**. Facultad de Medicina, UNAM. México. Lote: L1271011.
- **Sacarosa**. Baker Analyzed. J.T. Baker, México. Lote: D03340.
- **Solución de bromuro de etidio**. INVITROGEN, Carlsbad, Cal. EUA. Lote: 1241926.
- **Taq Polimerasa**. AltaEnzymes Co. Calgary. Alberta, Canada. Lote: 270506.
- **TRIS-HCl**. Research Organics Inc. Cleveland, Ohio, EUA. Lote: K17204.

Tris-HCl (1 M, pH=8)	
Tris-HCl	7.88 g
H <sub>2</sub> O	50 mL

EDTA (0.5 M, pH=8)	
EDTA	372.24 g
H <sub>2</sub> O	1000 mL

TE 1X (pH=7.6)	
Tris-HCl 1M	10 mL
EDTA 0.5M	2 mL
Aforar a 1000 mL	

## Equipos

- **Balanza analítica SA 120** (120 x 0.001g). Scientech. Accuracy Class II. Boulder, Co. USA.
- **Balanza granataria digital** (1200 x 0.1g). Ohaus. Florham Park, NJ. USA.
- **Baño de agua BM-80T**. Aparatos de laboratorio BG. México.
- **Densitómetro Densimat**. Biomérieux SA. Francia
- **Equipo automatizado MicroScan**. American Microscan, Mahwah. N.J.
- **Gabinete de Bioseguridad clase II, Tipo A2 Nuaire**. Fernbrook Lane Plymouth. MN. USA.

- **Incubadora bacteriológica 7750 D.** Fischer Scientific. Isotemp Incubator. USA.
- **Mechero de flama alta tipo Fischer.**
- **Microcentrífuga (Spectrafuge 16M).** Labnet International Inc. Edison, NJ. USA.
- **Microscopio óptico.** Carl Zeiss. México.
- **Olla de presión de 21L.** Presto. México
- **Termociclador (Thermal Cycler C1000).** BIORAD
- **Thermoblock (ECHOterm).** Torrey Pines Scientific Inc, San Marcos, CA. EUA

### **Consumibles**

- **Asas bacteriológicas de nicromel.**
- **Cajas de Petri de 100 x 15 mm sin división,** desechables y estériles. SyM. - Laboratorios. S.A. de C.V. México.
- **Cajas de Petri de 100 x 15 mm con 3 divisiones,** desechables y estériles. SyM. Laboratorios. S.A. de C.V. México.
- **Crioviales Corning.** Catálogo 430658. Corning Inc. NY. USA.
- **Guantes de nitrilo.** Tronex Healthcare Industries. Parsippany, NJ USA. Lote: 12R09S102
- **Hisopos de rayón estériles.** CIID S.A. de C.V.
- **Pipetas serológicas de 1,2 y 5 mL.** Greiner bio-one GmbH. Frickenhausen, Germany.
- **Puntas para micropipeta (10 µL, 250 µL y 1000 µL).** Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finland.
- **Tubos para microcentrífuga (0.2 mL, 0.6 mL y 1.5 mL).** IECSA Internacional de Equipos Científicos S.A. de C.V.

### **Material de Vidrio**

- Tubos de ensayo de 13 x 100. Kimble Chase, St. Vineland, NJ. USA.
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL, 500 mL y 1L. Kimble Chase, St. Vineland, NJ. USA.
- Portaobjetos de vidrio de 26 x 76 mm, espesor de 0.8 - 1.1 mm. Corning
- Probeta 100 mL. Kimble Chase, St. Vineland, NJ. USA.