



UNAM

Universidad Nacional Autónoma De México

Facultad De Estudios Superiores Iztacala

“DETECCIÓN DE GENES QUE CODIFICAN RESISTENCIA
PARA ANTIBIÓTICOS Y DESINFECTANTES EN CEPAS
CLÍNICAS DE *Staphylococcus aureus*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

Presenta

Oseguera Colin Ana Karen

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras



Los Reyes Iztacala, Edo. De México,

2014



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.

AGRADECIMIENTOS...

A mi directora de tesis, la **Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras** quien a pesar de que no llegue en el momento más oportuno me aceptó y abrió las puertas de su laboratorio, dándome la oportunidad de concluir esta gran etapa. Gracias porque a pesar de las adversidades me apoyó hasta el último momento, me guió, me motivó y me dio las bases del conocimiento que me permitieron llegar a la culminación de mi tesis para obtener el título de Bióloga.

A mis sinodales de tesis: **Dr. Eric Monroy Pérez, Dr. Sergio Vaca Pacheco, Biol. Alina Uribe García** y **Biol. Susana Esther Gonzáles Almazán**, quienes fueron un pilar importante para concluir este proyecto, apoyándome, aconsejándome y llevando a cabo las observaciones y correcciones para finalizar el trabajo.

A la **Biol. Patricia**, quien me brindó su amistad durante mi estancia en el laboratorio.

DEDICATORIAS...

Esta tesis está dedicada para las personas que más quiero en la vida, empezando por mi papá el **Sr. Luis Felipe Oseguera Muñoz** quien yo sé, se sentirá orgulloso y feliz de ver que su hija ha concluido esta etapa. Papá te amo con todo mi corazón y aunque el beneficio es para mí, tú fuiste mi más grande motivación y el poder entregarte ese título me hace muy feliz.

A mi abuelita **Ma. Guadalupe Muñoz** y mi madre adoptiva **Ma. Del Carmen Montoya** quienes estuvieron al pendiente desde que inicie la universidad, aconsejándome, motivándome y preocupándose por mí para que pudiera alcanzar este objetivo, gracias por su cariño las quiero muchísimo.

A mi mamita **Evangelina Colín** y mis hermanitos **Luis Oseguera** y **Mayra Oseguera** quienes van a sentirse muy contentos de saber que se cierra este proyecto para iniciar muchos nuevos, los quiero mucho y si no los tuviera cerca de mí tal vez nunca lo hubiera logrado, los admiro y me llena de satisfacción poder compartir con ustedes estos momentos de éxito.

A mi pequeñito bebe **Matias**, quien ahora se ha convertido en mi más grande motivación y quien me impulso a decir que ya era hora de terminar este proyecto, hijito te amo con todo mi ser.

A mis amigos **Erica, Ariadna, Chayo, Jimena, Denisse, Selene, Elías, Emmanuel,** y **Guille**, estupendos seres humanos que encontré en este trayecto y estuvieron siempre conmigo, gracias por tantos buenos momentos y espero podamos estar cerca para toda la vida, los quiero mucho.

ÍNDICE:

1.	RESUMEN	5
2.	INTRODUCCIÓN	6
2.1	Características de <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.2	Composición antigénica y factores de virulencia	7
2.3	Resistencia bacteriana a los antibióticos	9
2.4	Tratamiento.....	11
2.5	Diagnóstico.....	12
3.	ANTECEDENTES	14
4.	JUSTIFICACIÓN.....	15
5.	OBJETIVOS	16
5.1	Objetivo General	16
5.2	Objetivos Particulares	16
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
6.1	Origen de las cepas y extracción de ADN.....	17
6.2	Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> por PCR.....	17
6.3	Determinación de la susceptibilidad y/o resistencia a los diferentes antimicrobianos en las cepas de <i>S. aureus</i>	18
6.4	Determinación de la resistencia a la Meticilina	19
6.5	Detección de β -lactamasas	19
6.6	Detección del gen que confiere resistencia a meticilina (<i>mecA</i>)	19
6.7	Detección de los genes <i>tetM</i> , <i>tetO</i> , <i>tetK</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>aac(69)Ie-aph(20)Ia</i> y <i>blaZ</i> en las cepas de <i>S. aureus</i>	20
6.8	Detección de los genes <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i> , <i>mef</i> , <i>qacA</i> , <i>qacB</i> y <i>qacC</i> en las cepas de <i>S. aureus</i>	21
6.9	Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de agarosa.....	23
6.10	<i>spa</i> typing	23
7.	RESULTADOS	24
7.1	Pacientes estudiados.....	24
7.2	Identificación de <i>S. aureus</i>	25
7.3	Producción de β -lactamasas	27
7.4	Cepas MRSA	28

7.5	Fenotipos de resistencia a antibióticos en las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
7.6	Genotipos de resistencia a antibióticos en las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
8.	DISCUSION.....	41
8.1	Pacientes analizados	41
8.2	Contaminación de los catéteres por <i>S. aureus</i>	42
8.3	Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
8.4	Detección del gen <i>mecA</i>	44
8.5	Detección del gen <i>blaZ</i>	45
8.6	Detección de genotipos y fenotipos de resistencia a los antibióticos	46
9.	CONCLUSIONES	49
10.	LITERATURA CITADA.....	50

1. RESUMEN

Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la Meticilina (MRSA) pueden ocasionar múltiples enfermedades en el humano, que incluyen infecciones asociadas a los catéteres de pacientes de hemodiálisis. El tratamiento de las infecciones por cepas MRSA se ha complicado en los últimos años debido a que pueden acarrear otros genes que les confieren resistencia a otros antibióticos y desinfectantes. El objetivo del presente estudio fue correlacionar la presencia de genes que codifican resistencia para antibióticos y desinfectantes en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* aisladas de catéteres de pacientes de hemodiálisis. Se analizaron 21 cepas de *S. aureus* recuperadas de infecciones de catéteres de pacientes de hemodiálisis. Las cepas fueron identificadas por PCR mediante la detección del marcador cromosómico *spa* (X-región). Las cepas MRSA fueron identificadas por medio de discos impregnados con Oxacilina y las β -lactamasas mediante discos impregnados con Nitrocefina. Los fenotipos de resistencia a los antibióticos fueron determinados por el método de Kirby-Bauer. La detección de los genes que codifican resistencia a los antibióticos y desinfectantes se realizó por PCR convencional. El 90.4% (n=19) de las cepas fue MRSA. El 85.7%(n=18) de las cepas fue productora de β -lactamasas. El 100% (n= 21) de las cepas MRSA fue resistente a Penicilina, Ampicilina, Eritromicina y Cefepime, 95.2% (n=20) a Cefotaxima, 90.4% (n=19) a Dicloxacilina, 63.4% (n=14) a Levofloxacina, Cefalotina y Cefuroxima, en cada caso, 28.5% (n=6) a Gentamicina, 23.8% (n=5) a Trimetoprim con Sulfametoxazol y 9.52%(n=2) a Tetraciclina. El 100% (n=21) de las cepas de *S. aureus* fue portadora de los genes *ermA*, *ermB*, *blaZ*, *qacC*, *tetK* y *tetM*, el 71.4%(n=15) de *qacA* y *qacB*, 28.5% (n=6) de *tetO*, 14.2% (n=3) de *ermC* y *aac(6')Ie-aph(2'')Ia*, en cada caso y 4.7%(n=1) de *msrA*. Los genes *mef*, *vanA* y *vanB* no se encontraron presentes en ninguna de las cepas. La elevada frecuencia de los fenotipos y genotipos de resistencia a antibióticos y desinfectantes en las cepas estudiadas permitió a los médicos cambiar de estrategia para erradicar las infecciones por este patógeno y evitar complicaciones más severas que pudieran comprometer la vida de los pacientes.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, genes, antibióticos, resistencia, hemodiálisis.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Características de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un microorganismo de gran importancia médica. Desde hace años se le ha reconocido como uno de los principales agentes patógenos para el ser humano, responsable de altas tasas de mortalidad, puesto que origina un amplio espectro de enfermedades sistémicas e infecciones supurativas con una gravedad variable. Pertenece a la familia *Micrococcaceae*, género *Staphylococcus* (Bustos *et al.*, 2006). Actualmente el género *Staphylococcus* cuenta con 42 especies y 17 subespecies (Pahissa *et al.*, 2009).

Los estafilococos son cocos Grampositivos que miden de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, se encuentran aislados y en pares, tétradas, cadenas cortas y racimos irregulares con aspecto de uvas, como consecuencia de su división irregular, con forma próxima a una esfera perfecta. Son inmóviles, figuran entre los microbios no esporulados más resistentes, la mayoría no encapsulados y anaerobios facultativos, de crecimiento rápido (18-24hrs) a 45°C, estos organismos pueden tolerar desecación, calor, altas concentraciones de sal e incluso algunos antisépticos, poseen pigmentos durante su crecimiento (carotenoides), los cuales les dan una coloración amarilla-dorada (Lennette *et al.*, 1987). *S. aureus* es la única especie capaz de producir coagulasa (coagulan el plasma), generalmente catalasas positivos y fermentan azúcares a través de ácido láctico, la producción de coagulasa es uno de los factores de virulencia de más utilidad en la identificación de la especie (Freeman *et al.*, 1989).

Staphylococcus aureus es miembro de la flora bacteriana normal de la piel y el tracto respiratorio, glándulas cutáneas y mucosas, tracto intestinal y genitourinario, y también se encuentran en la flora de animales mamíferos y aves. Por lo general actúan como oportunistas causando infecciones cuando se altera el equilibrio entre la flora y el hospedero (Negroni *et al.*, 2009).

2.2 Composición antigénica y factores de virulencia

Staphylococcus aureus posee múltiples factores de virulencia; en su composición estructural en ocasiones cuenta con cápsula que le ayuda a inhibir la fagocitosis y la quimiotaxis, poseen una pared celular compuesta de peptidoglucano que actúa como endotoxina, que estimula la producción de pirógenos endógenos. Los ácidos teicoicos constituyen otro destacado componente de la pared que facilita la unión de *S. aureus* a las superficies mucosas, poseen un antígeno específico de especie, el **polisacárido A** presente en la pared celular y en dicha pared se encuentra la **proteína A** que le proporciona actividad antifagocítica. La superficie externa contiene un factor de agregación (coagulasa ligada) que le proporciona un destacado factor de virulencia (Negroni *et al.*, 2009).

S. aureus produce cinco toxinas citolíticas que suelen ser tóxicas para muchas células como eritrocitos, leucocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos; dos toxinas exfoliativas que rompen los puentes intercelulares del estrato granuloso de la epidermis, ocho enterotoxinas que estimulan la liberación de mediadores inflamatorios, aumentando el peristaltismo intestinal y la pérdida de líquidos, así como aparición de náuseas y vómitos; la toxina exfoliativa A y toxina-1 que producen la destrucción celular de células endoteliales; y la producción de siete enzimas que contribuyen a que sea esta la especie más virulenta de la familia *Micrococcaceae* (Cuadro 1) (Murray *et al.*, 2006).

Estos microorganismos ejercen su acción patógena por invasión directa y destrucción del tejido, mediante la producción de toxinas o por ambos mecanismos, entre las principales enfermedades que producen, encontramos; cutáneas (carbúnculos, pústulas, foliculitis, forúnculos, impétigo, infección de heridas y quemaduras). Estas infecciones suelen formar abscesos (lesión localizada con una cavidad de tejido necrótico lleno de supuración); mediadas por toxinas (síndrome de la piel escaldada, síndrome del shock tóxico). Aproximadamente el 50% de las cepas de *S. aureus* pueden secretar enterotoxinas que causan síntomas intestinales agudos cuando se ingieren en alimentos contaminados (intoxicación alimentaria); otras (artritis séptica, bacteremia, empiema, endocarditis, pielonefritis, osteomielitis y neumonía) (Murray *et al.*, 2006).

Los factores de virulencia de *S. aureus* participan en la adhesión y adquisición de nutrientes para el microorganismo y sirven también para evadir la respuesta inmune del huésped. Con base a esto los factores se han clasificado en tres categorías: 1) los involucrados en la adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; 2) aquellos que están involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la Leucocidina de Panton-Valentine (PVL), proteína A, lipasas, y polisacáridos capsulares; 3) los involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la toxina α , hemolisinas β , γ y δ (Bustos *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Principales factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*
(Tomado de Bustos *et al.*, 2006)

Estructurales	Enzimas	Toxinas
Peptidoglucano	Catalasa	Toxina α (Hemolisina α)
Proteína A	Hialuronidasa	Hemolisina β
Factores de adhesión	Lipasas	Hemolisina γ
Ácidos teicoicos	Coagulasa	Hemolisina δ
Polisacáridos capsulares	Nucleasas	Leucocidina de Pantone- Valentine (PVL)
	Proteasas	Enterotoxinas estafilocócicas (SE)
	Estafilocinasa	Toxina 1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1)
	Colagenasa	Toxinas exfoliativas (ETA y ETB)

2.3 Resistencia bacteriana a los antibióticos

En la actualidad resulta complicado prescribir el tratamiento médico adecuado para erradicar las infecciones bacterianas, debido a que las bacterias se han seleccionado como resistentes a los principales antibióticos de uso común. Los genes que codifican resistencia a antibióticos en *S. aureus* se encuentran frecuentemente en elementos genéticos móviles (plásmidos y fagos), lo que ha ocasionado la transferencia de la resistencia bacteriana de estos agentes entre cepas distintas (Jensen *et al.*, 1987).

Un microorganismo se selecciona como resistente a un antibiótico cuando puede crecer y reproducirse en presencia del mismo. La resistencia antimicrobiana puede ser natural o adquirida. Existen muchos mecanismos diferentes que pueden ser de origen genético y no genético, mediante los cuales los microorganismos pueden adquirir mecanismos de resistencia a los antimicrobianos; el producir enzimas que destruyen el antibiótico activo, por ejemplo las cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina G producen β -lactamasas que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico (Cuadro 2). Otro mecanismo de resistencia es debido a que las bacterias cambian su permeabilidad al antimicrobiano, por ejemplo cuando las tetraciclinas se acumulan en bacterias sensibles, pero no en las bacterias resistentes y por último los microorganismos pueden desarrollar un blanco estructural alterado para el medicamento, por ejemplo la resistencia cromosómica a los aminoglucósidos está asociada con la pérdida o alteración de alguna proteína específica sobre la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, el cual sirve como sitio de unión ante microorganismos sensibles (Jawetz *et al.*, 1990).

La resistencia a los antibióticos puede estar codificada por genes cromosómicos o genes plasmídicos. La resistencia cromosómica se debe a mutaciones. La resistencia codificada por plásmidos puede difundirse rápidamente de una cepa a otra, o de una especie a otra, por medio de la conjugación genética. Los plásmidos que portan genes que codifican resistencia para los antimicrobianos se denominan factores R. Un factor R puede tener distintos genes que codifiquen resistencia a antibióticos diferentes. La resistencia adquirida puede prevenirse limitando el uso no médico de los antibióticos, siendo más selectivos en el uso médico de los antibióticos y, en ciertas condiciones, administrando dos medicamentos al mismo tiempo (terapia combinada) (Ingraham *et al.*, 1998).

Cuadro 2. Principales antibióticos y mecanismos de resistencia por *S. aureus*.
(Tomado de Bustos *et al.*, 2006)

Antibiótico	Genes de resistencia	Producto del gen	Mecanismo de resistencia	Localización
Penicilina	<i>blaZ</i>	β -lactamasa	Hidrólisis enzimática del núcleo β -lactámico	Plásmidos: Tn552
β -lactámicos	<i>mecA</i>	PBP2a	Afinidad reducida al antibiótico	Cromosoma SSC- <i>mec</i> : Tn4291
Aminoglucosidos	<i>aacA-aphD</i>	Acetiltransferasa, fosfotransferasa	Modificación por acetilación o fosforilación	Cromosoma: plásmidos: Tn4001, Tn5404, Tn5405
Macrólidos, lincosamidas	<i>ermA, ermB, ermC</i>	Acarreadores ABC, Acetiltransferasa	Bomba de expulsión. Modificación por acetilación	Plásmidos
Tetraciclinas	<i>tetK, tetL, tetM</i>	Sistemas clase K, L y M	Bombas de expulsión protección ribosomal	Plásmidos, Tn916
Rifampicina	<i>rif</i>	RNA polimerasa	Mutación en la subunidad β del RNA polimerasa	Cromosoma
Ácido fusídico	<i>fusA, fusB</i>	Factor de elongación G	Alteración del factor de elongación G	Plásmidos
Quinolonas	<i>par</i> <i>gyrA</i> o <i>gyrB</i>	Componente ParC de la topoisomerasa IV componentes GyrA o GyrB de la girasa	Mutación en la subunidad A de la girasa y topoisomerasa IV	Cromosoma
Mupirocina	<i>mupA</i>	Isoleucil tRNA sintetasa	Producción de una isoleucil tRNA sintetasa modificada	Plásmidos
Trimetoprim-sulfametoxazol	<i>dfrA</i> <i>sula</i>	Dehidrofolato reductasa (DHFR) dehidropteroato sintasa	Afinidad reducida de la DHFR Sobreproducción de ácido p-aminobenzoico	Cromosoma Cromosoma: Tn4003
Glicopéptidos	<i>van</i>	Peptidoglicano alterado D-Ala-D-Lac	Se atrapa la vancomicina en la pared celular. Síntesis de un dipéptido que reduce la afinidad de la vancomicina	Cromosoma: Plásmidos: Tn 1546.
Oazolidinonas	<i>rrn</i>	rRNA 23S	Mutación en el dominio V del rRNA 23S, interfiere con la unión ribosomal	Cromosoma
Quinupristina dalfopristina (Q-D)	Q: <i>ermA, ermB, ermC</i> D: <i>vat, vatB</i>	Metilasa ribosomal Acetiltransferasa	Reduce la afinidad a la subunidad ribosomal 23S Modificación enzimática de la dalfopristina	Cromosoma: Plásmidos
Cloranfenicol	<i>cat</i>	rRNA 50S	Modificación por acetiltransferasa	Plásmidos
Fosfomicina	<i>fosB</i>	Glutación S Transferasa	Modificación en la síntesis de N-acetil murámico	Plásmidos

2.4 Tratamiento

Un agente antimicrobiano muestra toxicidad selectiva, y actúa mediante diferentes mecanismos de acción; existen los β -lactámicos que inhiben la síntesis del peptidoglucano (componente esencial de la pared celular), algunos ejemplos son: penicilinas, vancomicina, meticilina, ampicilina u oxacilina, agentes bactericidas que poseen alta toxicidad selectiva; los aminoglucósidos como gentamicina y estreptomina poseen una toxicidad selectiva baja y actúan como bactericidas alterando las funciones de membrana, modificando su permeabilidad y permitiendo que moléculas vitales salgan de la célula; los macrólidos como tetraciclina y eritromicina actúan como bactericidas inhibiendo la síntesis de proteínas y actuando sobre los ribosomas bacterianos, algunos antimetabolitos como el trimetoprim con sulfametoxazol bloquean una etapa de la biosíntesis de ácidos nucleicos o inhiben la síntesis de ácido fólico (componente necesario para la formación de proteínas estructurales y hemoglobina) (Jawetz *et al.*, 1990).

Las especies de *Staphylococcus aureus* multiresistentes tienen la capacidad de sobrevivir en dispositivos médicos. La resistencia a la eritromicina se asocia con la resistencia a otros macrólidos, tres genes (*ermA*, *ermB* y *ermC*) codifican transferasas resistentes a macrólidos, el gen *msrA* muestra un mecanismo de resistencia inducible a eritromicina mediante la codificación de un ATPasa. El uso generalizado de compuestos amonio cuaternario (*qac*) en hospitales contribuye a la aparición de bacterias resistentes a desinfectantes en varias especies de *S. aureus*, en diversos estudios se han identificado genes resistentes (*qacA*, *qacB* y *qacC*) (Zmantar *et al.*, 2011).

Los catéteres intravasculares son dispositivos plásticos que permiten acceso rápido y seguro al torrente sanguíneo, permitiendo administrar medicamentos, fluidos y nutrición parenteral. La presencia de catéteres en los pacientes, constituye un factor de riesgo de contraer bacteremia, debido a que *S. aureus* desarrolla una biopelícula hidrosoluble laxa compuesta de polisacárido que les permite adherirse al plástico, pudiendo ocasionar severas complicaciones en los pacientes (Gordillo, 2008).

2.5 Diagnóstico

Diferenciar a *S. aureus* de otros microorganismos es un procedimiento bastante sencillo, se llevan a cabo pruebas bioquímicas convencionales, prueba de la coagulasa, detección de catalasa, prueba específica de aglutinación con anticuerpos monoclonales, identificación de una DNAsa termoestable e identificación directa mediante técnicas de amplificación directa por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) utilizando genes exclusivos de la especie como *nuc*, *spa*, *rRNA*, *femA* y *femB*. Otras pruebas aunque no son específicas se llevan a cabo, como fermentación de manitol y producción de fosfatasa alcalina (Pahissa *et al.*, 2009).

El diagnóstico es fundamental con el aislamiento de *S aureus* de la lesión. El procedimiento utilizado en el tratamiento de una enfermedad debe diseñarse de tal manera que la oportunidad de curación sea la máxima y la de desarrollar resistencia sea mínima. Para esto es imprescindible determinar la susceptibilidad de un organismo a un antibiótico, para poder decidirse por una terapia y administrar el medicamento apropiado. Muchos antibióticos tienen efectos tóxicos sobre el hombre, y estos efectos deben considerarse y compararse con los beneficios posibles, ya que los antibióticos, además de destruir los microorganismos patógenos, con frecuencia también eliminan muchas bacterias de la flora natural del cuerpo (Jensen *et al.*, 1987).

Existen diversos antibióticos que pueden ser empleados para erradicar estas enfermedades, para ser efectivos deben poseer una toxicidad selectiva e inhibir o matar a los microorganismos sin dañar las células humanas. Los antimicrobianos actúan mediante diversos mecanismos de acción, dañando alguna estructura celular vital o inhibiendo una función metabólica esencial. Las modificaciones bioquímicas de la molécula básica del antibiótico dan lugar a fármacos con mejor actividad y propiedades farmacocinéticas. (Boyd *et al.*, 1983).

Los antibióticos son productos metabólicos producidos por los microorganismos que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos, existen sintéticos que son productos químicos fabricados en el laboratorio y los semisintéticos que son antibióticos modificados químicamente (Divo *et al.*, 1990).

Los antisépticos son sustancias empleadas en tejidos vivos, que previenen o impiden el crecimiento o la acción de los microorganismos por inhibición de su actividad o por la destrucción de ellos. Deben reunir suficiente actividad antimicrobiana y poseer una buena tolerancia local y general. Los desinfectantes son agentes antimicrobianos que poseen poca toxicidad selectividad y se emplean solamente sobre objetos inanimados o medios inertes. Algunos son tóxicos celulares protoplasmáticos con capacidad para destruir tejidos vivos (Negroni *et al.*, 2009).

Las cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles a los antimicrobianos son inhibidas fácilmente por antibióticos de amplio espectro, sin embargo, la emergencia de cepas multiresistentes a los antibióticos ha complicado el tratamiento médico. Por consiguiente es esencial que se analice la sensibilidad de las cepas aisladas frente a una variedad de agentes eficientes como parte del procedimiento de laboratorio para prescribir un tratamiento funcional (Jensen *et al.*, 1987).

3. ANTECEDENTES

Ghaznavi *et al.*, (2012) investigaron la susceptibilidad de 389 cepas (MRSA) a 18 antibióticos mediante el método de Kirby-Bauer y posteriormente lo correlacionaron con la presencia de genes de resistencia en las cepas mediante la técnica de PCR, reportaron que el 100% de las cepas fueron fenotípicamente resistentes a eritromicina, oxacilina y ciprofloxacina, y 100% susceptibles a vancomicina, alfopristina, tigeciclina y linezolid; 98.9% resistentes a clindamicina y 97.4% resistentes a gentamicina. En la detección de genes encontraron que el 100% de las cepas contenían uno o más genes de resistencia a los macrólidos y lincosamidas, encontraron el gen *ermA* en el 95.1% de las cepas; seguido de *ermC* en el 12.9% de las cepas; ninguna de las cepas presentó el gen *msrA*.

Mehrota *et al.*, (2000) realizaron un estudio para encontrar genes que codifican enterotoxinas causantes de múltiples enfermedades. Analizaron 176 cepas humanas de *S. aureus*, de las cuales solo 19 eran MRSA. Mediante la técnica de PCR detectaron en el 94.7% de las cepas el gen *mecA* responsable de la resistencia a la meticilina; el 100% de las cepas presentó el gen *femA*.

Rizzotti *et al.*, (2005) llevaron a cabo un estudio en donde evaluaron la actividad de cepas de enterococos y la actividad de resistencia a antibióticos (tetraciclina y eritromicina) y lo correlacionaron con la presencia de genes de resistencia a estos agentes. Por PCR. Identificaron los genes *tetK* (80.5%), *ermB* y *tetM* (66.7%) en las cepas estudiadas, mientras que en las 29 especies de enterococos los genes *tet* y *ermB* se encontraron aproximadamente en el 85% de las muestras.

Zmantar *et al.*, (2011) efectuaron un estudio para determinar la susceptibilidad a los antibióticos y resistencia al compuesto amonio cuaternario, utilizaron 49 cepas de *S. aureus*. Mediante técnica de PCR encontraron cepas multiresistentes a macrólidos y desinfectantes; encontraron la presencia de genes que codifican resistencia a eritromicina de la siguiente manera: *ermA* en 8% de las cepas; *ermB* en 14% de las cepas; *ermC* en 6% de las cepas y *msrA* en el 10% de las cepas; el 74% de las cepas presentó resistencia a cloruro de amonio cuaternario; el 100% de las cepas presentó al menos uno de los tres genes de resistencia. El 84% de las cepas portaron el gen *qacC* y el 4% de las cepas portó los tres genes *qac*.

4. **JUSTIFICACIÓN**

Debido a que en nuestro país en los últimos años se ha incrementado considerablemente la resistencia a la metilina por cepas de *S. aureus* (MRSA), el presente estudio contribuirá en establecer la frecuencia de las cepas MRSA relacionadas a infecciones de catéteres, así como la frecuencia de los genes que codifican resistencia para los antibióticos β -lactámicos, eritromicinas, tetraciclinas, vancomicina, aminoglucósidos y desinfectantes.

5. **OBJETIVOS**

5.1 Objetivo General

- Correlacionar la presencia de genes que codifican resistencia para antibióticos y desinfectantes en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, aisladas de catéteres de pacientes con hemodiálisis.

5.2 Objetivos Particulares

- Identificar el gen *mecA* que codifica la resistencia a la meticilina en las cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Identificar la resistencia a la meticilina en las cepas de *S. aureus* mediante discos impregnados con Oxacilina.
- Detectar la producción de β -lactamasas en las cepas de *S. aureus* mediante discos impregnados con una sustancia cromogénica (Nitrocefin).
- Determinar la resistencia a antibióticos en las cepas de *S. aureus* por el método de Kirby-Bauer.
- Detectar por PCR los genotipos que codifican la resistencia a eritromicina (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* y *mef*), tetraciclina (*tetM*, *tetO* y *tetK*), vancomicina (*vanA* y *vanB*), aminoglucósidos [(*aac(69)*/*le-aph(20)*/*la*)], β -lactamasas (*blaZ*) y desinfectantes (*qacA*, *qacB* y *qacC*) en un grupo de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de los catéteres de pacientes de hemodiálisis.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Origen de las cepas y extracción de ADN

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaran 21 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de los catéteres de pacientes infectados del servicio de hemodiálisis de un hospital público ubicado en el municipio de Tlalnepantla Edo. de México. La cepa de *S. aureus* ATCC-33592 fue utilizada como control positivo. Las cepas fueron sembradas en agar S-110 por el método de estría cruzada y se incubaron a 37°C por 24 horas. Obteniendo el crecimiento bacteriano óptimo, por medio de un asa estéril se tomó una muestra considerable y se depositó en un tubo de rosca con agua desionizada estéril. El inóculo fue agitado por medio de un vortex por 30 segundos y se colocó en baño maría durante 20 minutos. Al término, la muestra se colocó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante que contenía el ADN fue transferido a otro tubo estéril, y se guardó a -20° hasta su próxima utilización (Paniagua *et al.*, 2007).

6.2 Identificación de *Staphylococcus aureus* por PCR

Las cepas bacterianas de la especie *S. aureus* fueron identificadas por PCR mediante la detección de los marcadores cromosómicos *spa* y rRNA (Nashev *et al.*, 2004). Los oligonucleótidos utilizados fueron: *spa1* (CAAGCACCAAAAAGAGGAA), *spa2* (CACCAGGTTTTAACGACAT), rRNA1 (ACGGAGTTACAAAGGACGAC) y rRNA2 (AGCTCAGCCTTAACGAGTAC) (Integrated DNA Technologies). Para la amplificación por PCR de cada gen por separado se utilizaron las perlas PuRetaq™Ready-To-Go™ PCR (GE Healthcare), que contenían 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs, para un volumen final de 25µl por mezcla de reacción: 1µl de cada oligonucleótido (Sigma-Genosys), 20 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl (100 ng) de ADN molde. La amplificación del DNA se realizó en un Termociclador modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones para *spa*: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C. Para el gen rRNA las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización inicial a

94°C por 5 minutos, 37 ciclos (desnaturalización a 94°C por 40 segundos, alineación a 64°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 75 segundos). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C. El tamaño de los amplicones para rRNA fue de 1250 pb y para spa el tamaño fue distinto, debido al polimorfismo del gen.

6.3 Determinación de la susceptibilidad y/o resistencia a los diferentes antimicrobianos en las cepas de *S. aureus*

Cada cepa de *S. aureus* fue crecida en agar S-110 a 37°C por 24 horas. Posteriormente por medio de un hisopo estéril se tomó una muestra de cultivo y se inóculo sobre el medio de MH (Mueller Hinton) formando un tapiz. Finalmente se colocó un sensidisco con los 12 antibióticos y se incubó a 37°C por 24 horas. Las cepas se clasificaron como susceptibles o resistentes de acuerdo a los criterios de los halos de inhibición (Tabla 1) del fabricante (BIO-RAD).

No	Agente antimicrobiano	Siglas	Instructivo BIO-RAD, diámetro del halo de inhibición en mm		
			Resistente	Intermedio	Sensible
1	Dicloxacilina	DC	≤12	13-17	≥18
2	Eritromicina	E	≤13	14-22	≥23
3	Gentamicina	GE	≤12	13-14	≥15
4	Levofloxacin	LEV	≤13	14-16	≥17
5	Penicilina	PE	≤28	-	≥29
6	Tetraciclina	TE	≤14	15-18	≥19
7	Trimetoprim-Sulfametoxazol	SXT	≤10	11-15	≥16
8	Cefuroxima	CXM	≤14	15-22	≥23
9	Cefotaxima	CTX	≤14	15-22	≥23
10	Cefepime	FEP	≤14	15-17	≥18
11	Cefalotina	CF	≤14	15-17	≥18
12	Ampicilina	AM	≤28	-	≥29

Tabla 1. Instructivo BIO-RAD con las medidas de los halos de inhibición que permiten determinar si la cepa es resistente o susceptible.

6.4 Determinación de la resistencia a la Meticilina

La resistencia a la metilina se determinó mediante la prueba de difusión en disco de cefoxitina (BectonDickinson; zona de inhibición, ≤ 21 mm). Para lo cual, se sembró un tapiz de cada cepa en el medio S110 y se depositó un sensidisco sobre la superficie del medio. Posteriormente las cajas de incubaron a 37°C por 24 horas. Los criterios de susceptibilidad y/o resistencia BIO-RAD se aprecian en la tabla 2.

No	Agente antimicrobiano	Siglas	Instructivo BIO-RAD, diámetro del halo de inhibición en mm		
			Resistente	Intermedio	Sensible
1	Oxacilina	Ox	$10 \leq$	11-12	≥ 13

Tabla 2. Instructivo BIO-RAD que nos da la medida de los halos de inhibición de Oxacilina para poder ser considerados resistentes o susceptibles.

6.5 Detección de β -lactamasas

La presencia de β -lactamasas se detectó mediante el uso de discos de papel impregnados con una cefalosporina cromogénica (nitrocefina; BectonDickinson, EE.UU). Este sustrato cambió de color amarillo a rojo después de que el enlace amida del anillo β -lactámico se hidrolizó por la presencia del gen *blaZ* productor de las β -lactamasas (enzimas que no permiten que los β -lactámicos se unan a las proteínas y se interrumpa así la síntesis de pared celular).

6.6 Detección del gen que confiere resistencia a metilina (*mecA*)

Para detectar el gen *mecA* por PCR se utilizaron las peras PuRetaqTMReady-To-GoTMPCR (GE Healthcare) (1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs), en un volumen final de 25 μ l por mezcla de reacción; 1 μ l de cada oligonucleótido (Integrated DNA Technologies; Tabla 3) a la concentración de 5 pmol (Geha *et al.*, 1994), 18 μ l de agua estéril libre de nucleasas y 3 μ l (100 ng) de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 10 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 66°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos). Posteriormente 5 ciclos

(desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineación a 64°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos) y 25 ciclos (desnaturalización a 94°C, 45 segundos, alineación a 50°C, 45 segundos y extensión a 72°C, 60 segundos). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5´- 3´	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
MecAF 5 MecAR 5	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	310	Gehaet <i>al.</i> , 1994.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *mecA* en las cepas de *S. aureus*

6.7 Detección de los genes *tetM*, *tetO*, *tetK*, *vanA*, *vanB*, *aac(69)Ie-aph(20)Ia* y *blaZ* en las cepas de *S. aureus*

La detección de los genes que codifican resistencia para tetraciclina, vancomicina, aminoglucósidos y β -lactámicos (Tabla 4) en las cepas de *Staphylococcus aureus* se llevó a cabo por el método de PCR convencional descrito por Rizzotti *et al.*, (2005). Para lo cual se utilizaron las peras PuRetaq™Ready-To-Go™PCR (GE Healthcare) (1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs), en un volumen final de 25 μ l por mezcla de reacción; 1 μ l de cada oligonucleótido (Integrated DNA Technologies; Tabla 4) a la concentración de 10 pmol, 18 μ l de agua estéril libre de nucleasas y 3 μ l (100 ng) de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos [desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineación a 55°C (*tetM*, *O*, *K* y *aac(69)Ie-aph(20)Ia*), 52 °C (*ermA*, *B* y *C*), 61 °C (*vanA* y *B*) y 58 °C (*blaZ*) por 45 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos]. Finalmente la extensión se prolongó por 7 minutos a 72°C.

6.8 Detección de los genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *mef*, *qacA*, *qacB* y *qacC* en las cepas de *S. aureus*

La detección de los genes que codifican resistencia a la eritromicina (*erm*) y los desinfectantes (*qac*) en las cepas de *Staphylococcus aureus* se llevó a cabo por el método de PCR multiplex descrito por Zmantar *et al.*, (2011). Para lo cual se utilizaron las perlas PuReTaq™Ready-To-Go™PCR (GE Healthcare) (1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs), en un volumen final de 25 µl por mezcla de reacción; 1 µl de cada oligonucleótido (Integrated DNA Technologies; (Tabla 4) a la concentración de 10 pmol, 18 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl (100 ng) de ADN. Las condiciones de amplificación para *ermA*, *ermB* y *ermC* fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 96°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos (desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 2 minutos). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C.

Las condiciones de amplificación para *qacA*, *qacB* y *qacC* fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1.5 minutos, alineación a 56°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1.5 minutos). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C.

Oligonucleótido	GEN	Secuencia del primer 5' a 3'	Tamaño del amplicón (pb)
Spa (X-region)	<i>spa</i>	CAAGCACCAAAAGAGGAA CACCAGGTTTAACGACAT	Polimorfismo
ermAF ermAR	<i>ermA</i>	TATCTTATCGTTGAGAAGGGATT CTACACTTGGCTTAGGATGAAA	139
ermBF ermBR	<i>ermB</i>	CTATCTGATTGTTGAAGAAGGATT GTTTACTCTTGGTTTAGGATGAAA	142
ermCF ermCR	<i>ermC</i>	CTTGTTGATCACGATAATTTCC ATCTTTTAGCAAACCCGTATTC	190
msrAF msrAR	<i>msrA</i>	TCCAATCATAGCACAAAATC AATCCCTCTATTTGGTGGT	163
mefF mefR	<i>mef</i>	AGTATCATTAACTACTAGTGC TTCTTCTGGTACAAAAGTGG	348
tetM-1 tetM-2	<i>tet(M)</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAAGTTCGTACACACAC	406
tetO-1 tetO-2	<i>tet(O)</i>	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC TCCCACTGCTCCATATCGTCA	515
tetK-1 tetK-2	<i>tet(K)</i>	TCGATAGGAACAGCAGTA CAGCAGATCCTACTCCTT	169
blaZ-1 blaZ-2	<i>blaZ</i>	ACTTCAACACCTGCTGCTTTC TGACCACTTTTATCAGCAACC	173
A1 A2	<i>vanA</i>	GGGAAAACGACAATTGC GTACAATGCGGCCGTTA	732
B1 B2	<i>vanB</i>	ATGGGAAGCCGATAGTC GATTTTCGTTCCCTCGACC	635
qacA, qacBF qacA, qacBR	<i>qacA, qacB</i>	TCCTTTTAATGCTGGCTTATACC AGCCKTACCTGCTCCAATA	220
qacCF qacCR	<i>qacC</i>	GGCTTTTCAAATTTATACCATCCT ATGCGATGTTCCGAAAATGT	249
Aming aph-1 Aming aph-2	<i>aac(69)/e-aph(20)/la</i>	GAGCAATAAGGGCATACCAAAAATC CCGTGCATTTGTCTTAAAAAACTGG	480

Tabla 4. Oligonucleótidos que fueron utilizados para la identificación de genes que codifican resistencia para antibióticos y desinfectantes.

6.9 Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de agarosa

Después de la amplificación del ADN, 10 microlitros de cada muestra fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliamperes por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación GEL LOGIC 100 (KODAK).

6.10 *spa* typing

El polimorfismo de la región X del gen *spa* que codifica para la proteína A en las cepas de *S. aureus* fue amplificado y secuenciado de acuerdo a lo descrito por Shopsisin *et al.*, (1999). Los tipos de *spa* correspondientes fueron asignados utilizando el sitio web (<http://seqtools.com>). Los tipos de *spa*Ridom fueron posteriormente asignados utilizando el sitio web *spa*-typing (<http://www.spaserver.ridom.de/>) desarrollado por RidomGmb

7. RESULTADOS

7.1 Pacientes estudiados

El estudio se llevó a cabo a partir de 21 pacientes del Hospital General Regional número 72 del IMSS, que presentaban infección asociada al sitio de inserción del catéter en hemodiálisis. En la Figura 1 se puede observar que el 61.9% (n=13) correspondió al sexo masculino y el 38.1% (n=8) al sexo femenino.

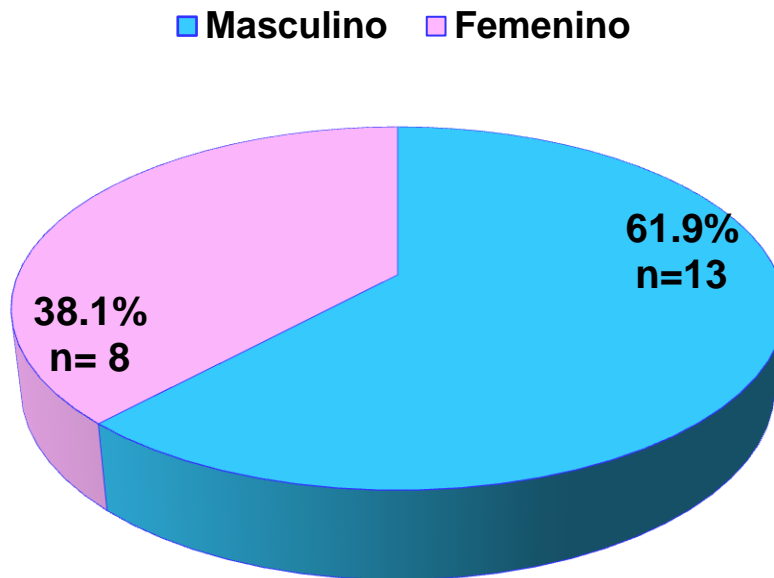


Figura 1. Distribución de los pacientes por sexo

Respecto a la distribución de los pacientes por edad (Figura 2), el grupo de edad con mayor frecuencia fue el de 21 a 30 años (33.3%, n=7); seguido del grupo de 41 a 50 años (n=5, 23.8%) y el grupo de 31 a 40 años (14.28n=3). Finalmente los grupos de edad con menor frecuencia fueron de 15 a 20 años y de 71 a 80 años (9.5%, n=2), en cada caso; seguido de los grupos de 51 a 60 años y de 61 a 70 años (4.7%, n=1), en cada caso.

Grupos de edades

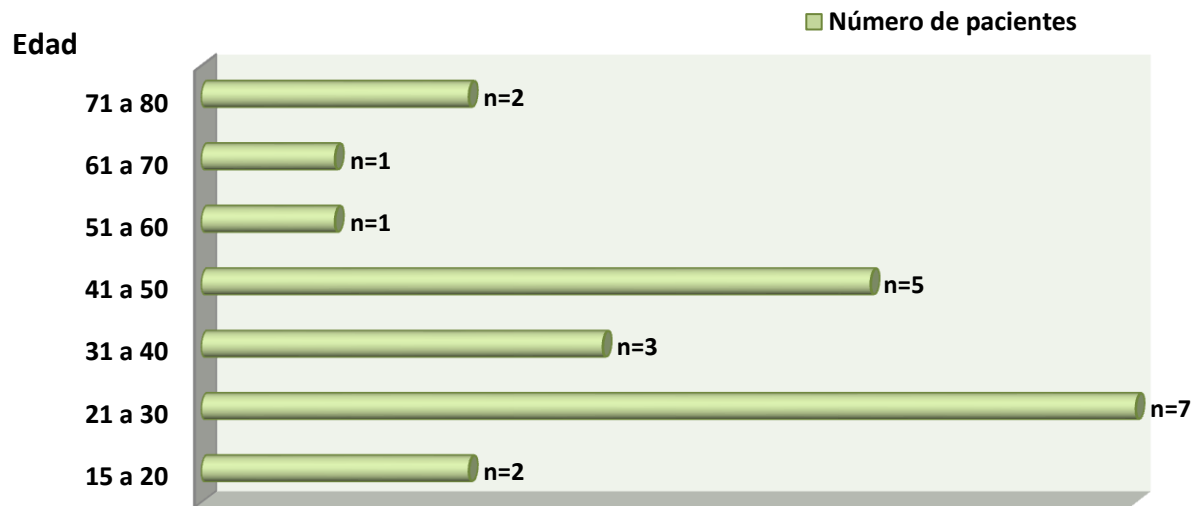
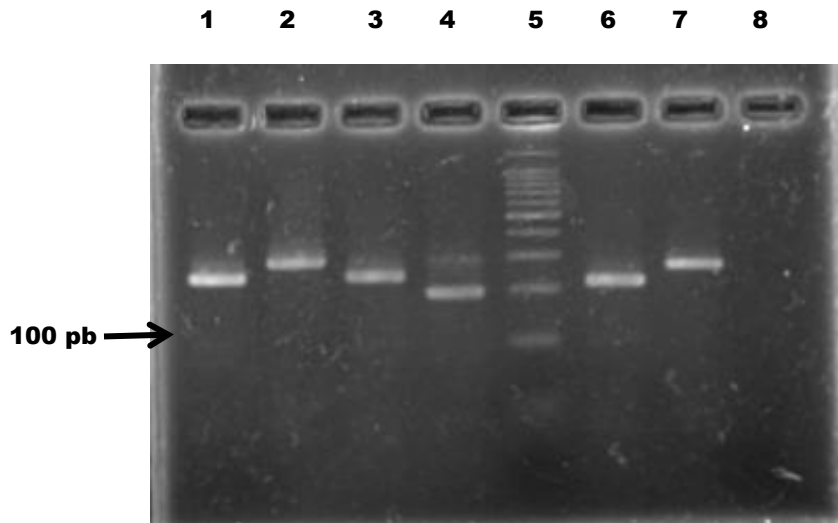


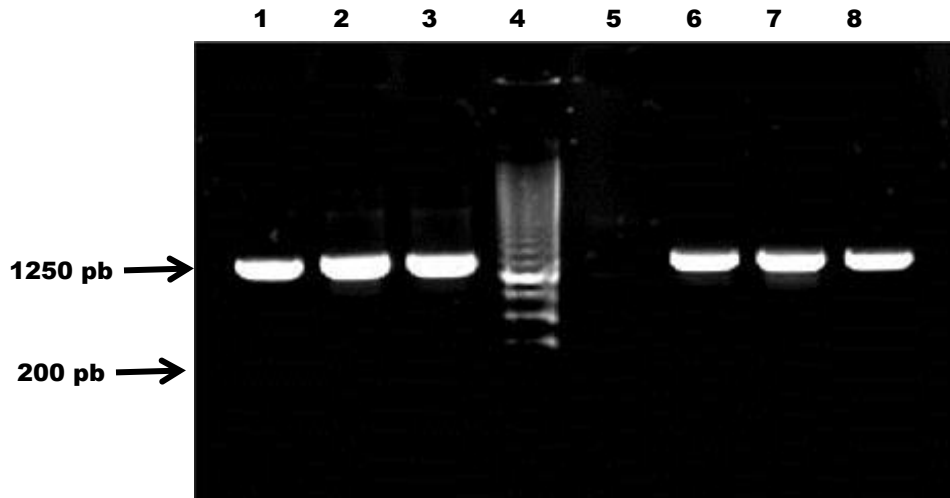
Figura 2. Distribución de pacientes por edad.

7.2 Identificación de *S. aureus*

Staphylococcus aureus fue identificado por las pruebas del manitol y coagulasa, y mediante PCR convencional, mediante la detección de los marcadores cromosómicos *spa* (Fotografía 1) y rRNA (Fotografía 2) en el 100% de las cepas (n=21).



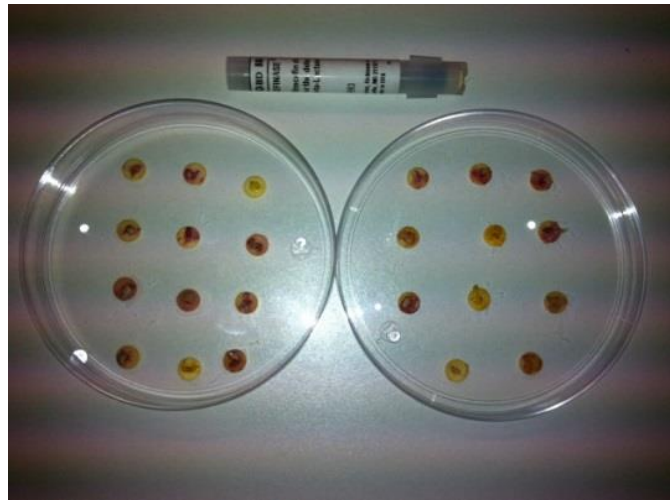
Fotografía 1. Detección del marcador cromosómico *spa* (X-región) en las cepas de *S. aureus* mediante PCR convencional. Carril 1 -4 y 6 (cepas de *S. aureus*) amplicones con tamaños entre 200 pb a 300pb debido al polimorfismo del gen; Carril 5 (MWM 100 pb-ladder); Carril 7 control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 8 control negativo (sin DNA molde).



Fotografía 2. Detección del gen *rRNA* de *S. aureus* (amplicón de 1250 pb) mediante PCR convencional. Carril 1, 2 y 3 (cepas de *S. aureus*); Carril 4 (MWM 200 pb-ladder); Carril 5 control negativo (sin DNA molde); Carril 6 control positivo (ATCC 33592); Carriles 7 y 8 (cepas de *S. aureus*).

7.3 Producción de β -lactamasas

La detección de β -lactamasas se llevó a cabo mediante la prueba de discos impregnados con Nitrocefín. El 85.7% (n=18) de las cepas fue productora de β -lactamasas (Fotografía 3 y Figura 3).



Fotografía 3. Detección de β -lactamasas mediante discos con nitrocefín. Coloración roja de los discos muestran producción de β -lactamasas.

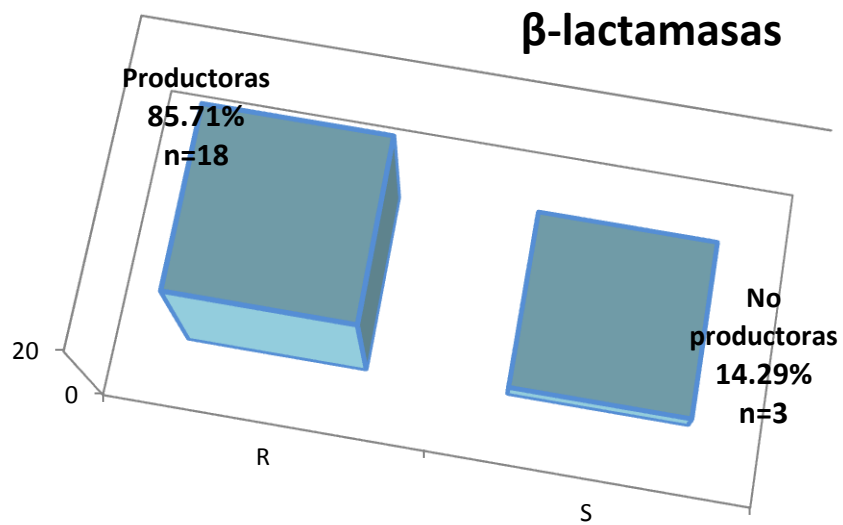
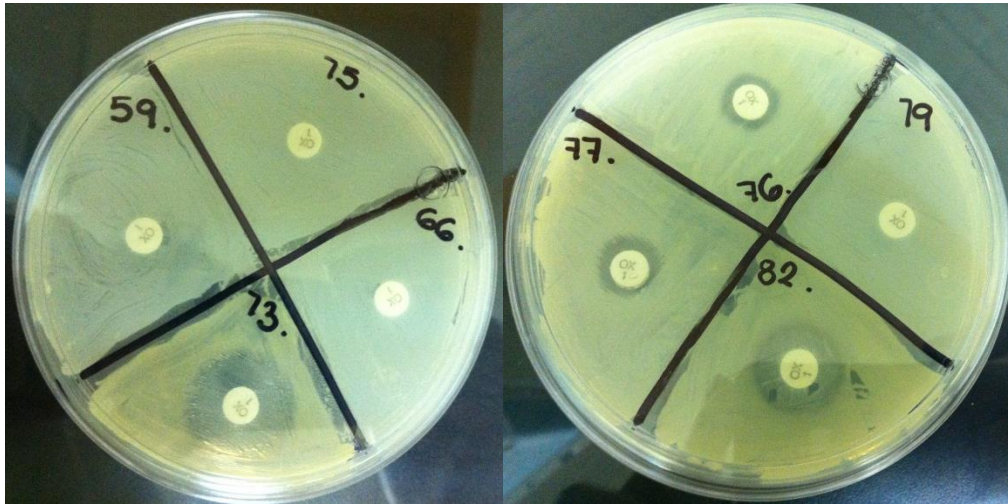


Figura 3. Porcentajes de cepas productoras de β -lactamasas.

7.4 Cepas MRSA

Las cepas MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) fueron determinadas mediante la prueba de sensibilidad en disco impregnados con Oxacilina (Fotografía 4). El 90.4% (n=19) de las cepas fueron MRSA y el 9.5% (n=2) MSSA (cepas 16 y 73) (Figura 4) formó halo de inhibición, esto se corroboró con la detección del gen *mecA* que codifica resistencia para meticilina el cual se encontró presente en el 100% (n=21) de las cepas (Fotografía 5).



Fotografía 4. Prueba de difusión en disco impregnados con oxacilina. Se aprecia que el halo de inhibición de la cepa 73 de *S. aureus* es mayor de ≤ 21 mm (MSSA), mientras que las cepas 59, 66, 75, 76, 77, 79 y 82 no formaron halo de inhibición, por lo que fueron consideradas cepas MRSA.

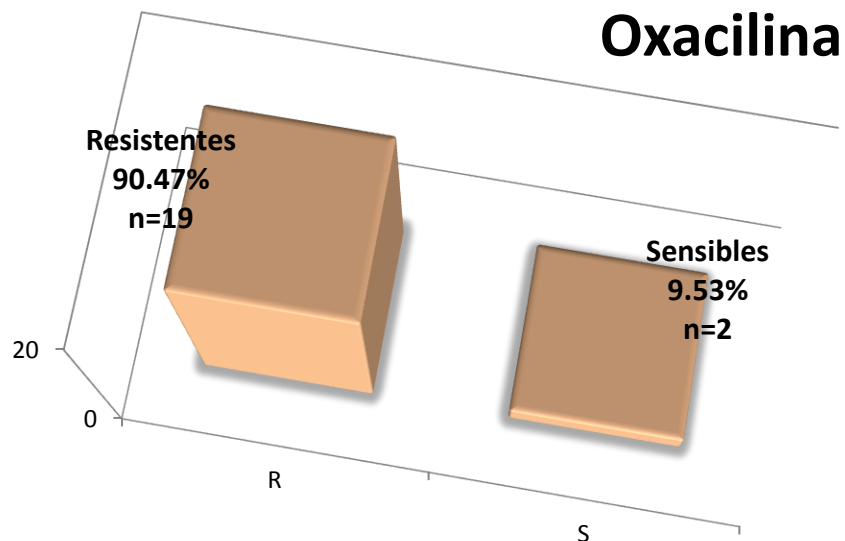
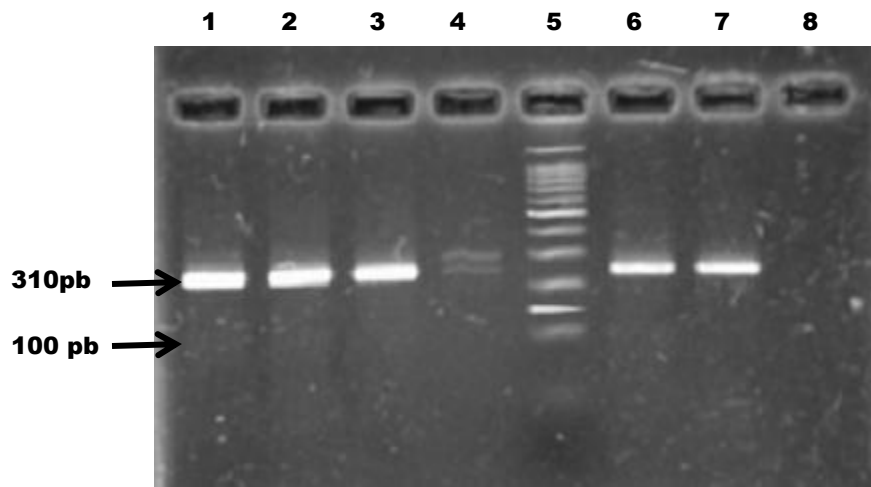


Figura 4. Porcentajes de cepas de *S. aureus* MRSA.



Fotografía 5. Detección del gen *mecA* mediante PCR convencional. Carril 1- 4 y 6 cepas *S. aureus* (amplicón de 310 pb); Carril 5 (MWM 100pb-ladder); Carril 7 control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 8 control negativo (sin DNA molde).

7.5 Fenotipos de resistencia a antibióticos en las cepas de *Staphylococcus aureus*

El 100% (n=21) de las cepas de *Staphylococcus aureus* fue resistente a Penicilina, Ampicilina, Eritromicina y Cefepime (Figura 5), el 95.2% (n=20) a Cefotaxima, el 90.4% (n=19) a Dicloxacilina, el 63.4% (n=13) a Levofloxacina, Cefalotina y Cefuroxima, en cada caso, el 28.5% (n=6) a Gentamicina, el 23.8% (n=5) a Trimetoprim-Sulfametoxazol y el 9.52% (n=2) a Tetraciclina.

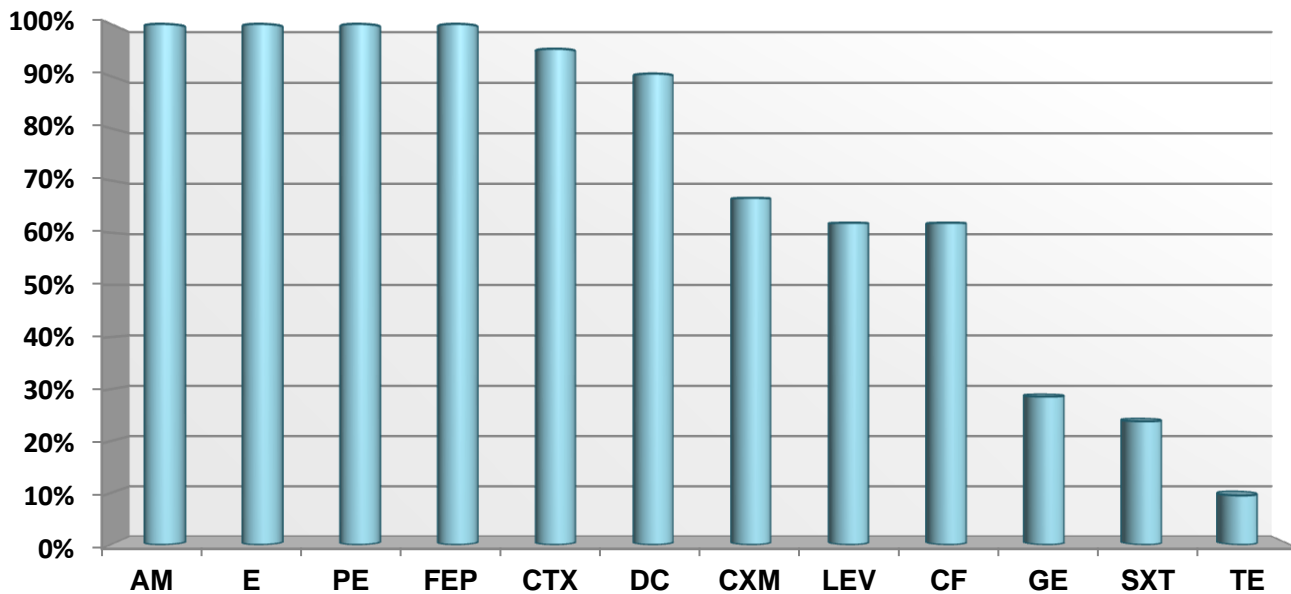
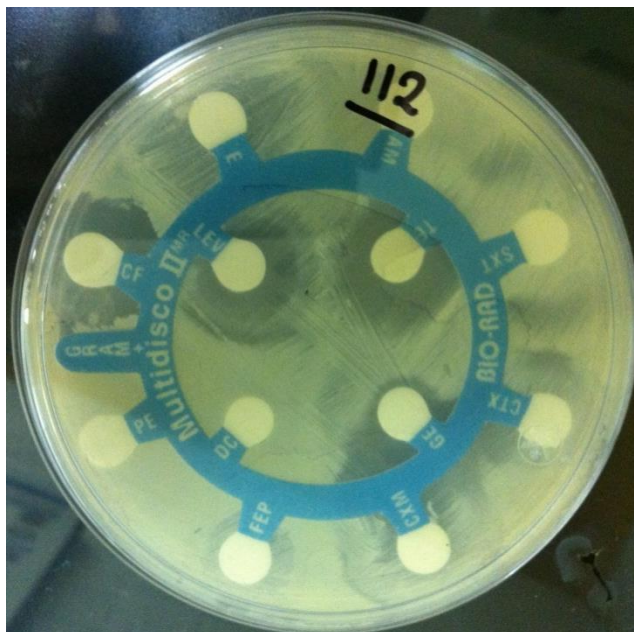
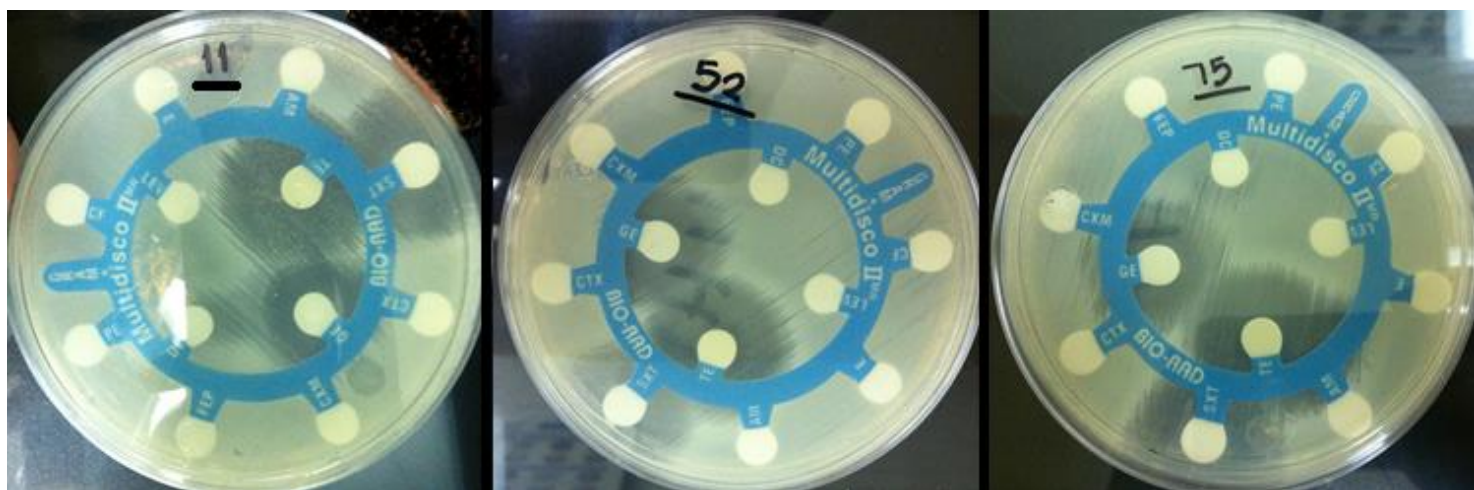


Figura 5. Porcentajes de resistencia de las 21 cepas de *S. aureus* a los 12 antimicrobianos probados. DC= dicloxacilina; E= eritromicina; GE= gentamicina; LEV= levofloxacina; PE= penicilina; TE= tetraciclina; SXT= trimetoprim-sulfametoxazol; CXM = cefuroxima; CTX = cefotaxima; FEP= cefepime; CF= cefalotina; AM= ampicilina.

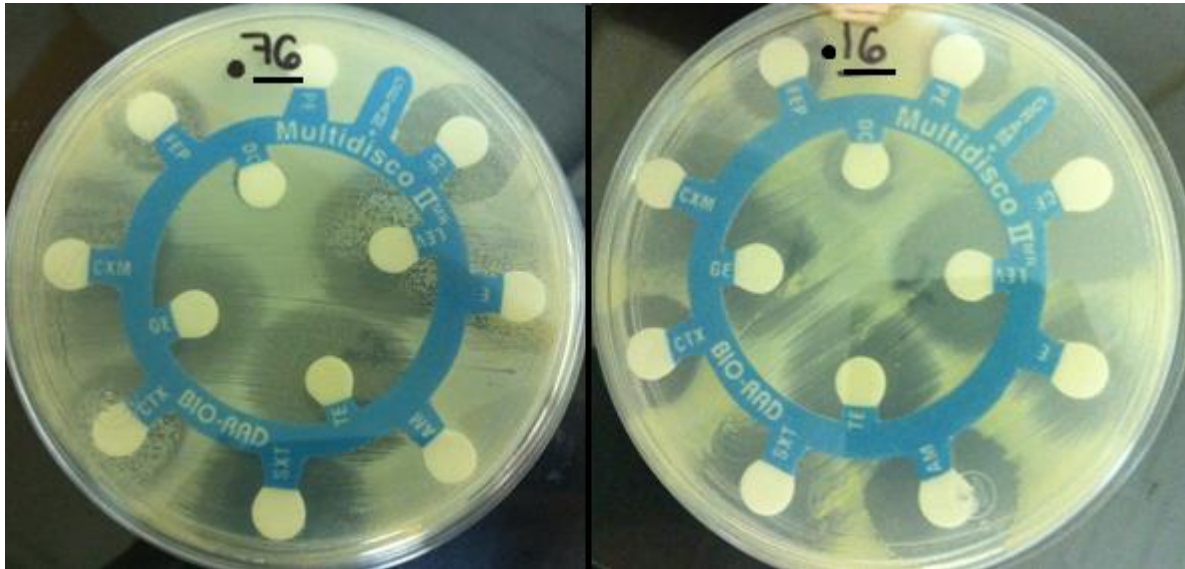
Respecto a las cepas estudiadas, la número 112 fue resistente a todos los antimicrobianos probados (Fotografía 6), el 42.8% (n=9) de las cepas fue resistente a 9 antibióticos (Fotografía 7), el 14.2% (n=3) fue resistente a 10 antibióticos y el 23.8% (n=5) fue sensible a varios antibióticos (Fotografía 8).



Fotografía 6. Antibiograma de la cepa 112, que presentó resistencia del 100%, los tres halos de inhibición que se formaron no alcanzaron la medida establecida para ser considerados susceptibles.



Fotografía 7. Antibiogramas de las cepas de *S. aureus* (11, 52 y 75) que presentaron halos de inhibición (sensibilidad) para los mismos tres antibióticos GE gentamicina, TE tetraciclina y SXT trimetoprim-sulfametoxazol.



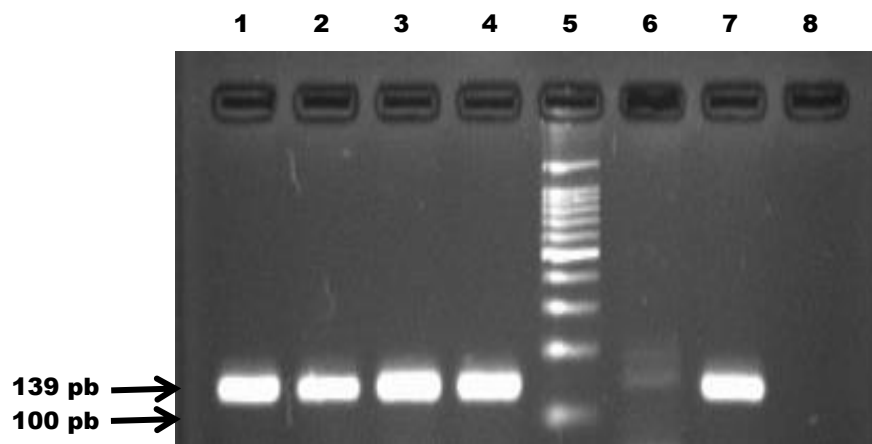
Fotografía 8. Antibiogramas de las cepas de *S. aureus* (16 y 76) que presentaron mayor sensibilidad a los diferentes antimicrobianos.

7.6 Genotipos de resistencia a antibióticos en las cepas de *Staphylococcus aureus*

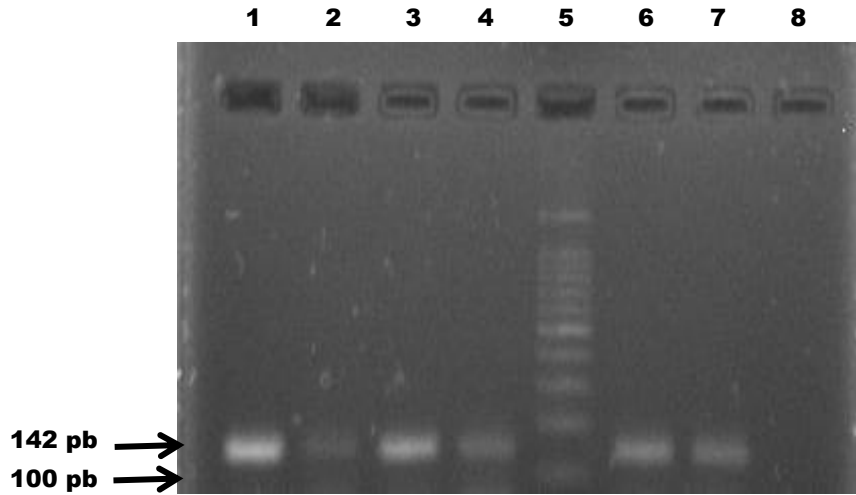
La detección de genotipos de resistencia a antibióticos y desinfectantes presentes en las 21 cepas de *Staphylococcus aureus* se llevó a cabo mediante PCR convencional. El 100% (n=21) de las cepas presentó los genes *ermA*, *ermB*, *tetK*, *tetM*, *blaZ* y *qacC* (Fotografías 9-14); el 71.4 % (n=15) los genes *qacA* y *qacB* en cada caso (Fotografía 15); el 28.5% (n=6) *tetO* (Fotografía 16); el 14.28% (n=3) *ermC* y [(*aac(69)*)/*le-aph(20)*]/*la*] en cada caso (Fotografías 17 y 18) y el 4.7% (n=1) *msrA* (Fotografía 19). Los genes *mef*, *vanA* y *vanB* no se encontraron presentes en ninguna de las cepas, el análisis del número de cepas que presentaron los diferentes genes se puede apreciar en la (Tabla 5).

Gen	N°	Porcentaje
<i>ermA</i>	21	100
<i>ermB</i>	21	100
<i>tetK</i>	21	100
<i>tetM</i>	21	100
<i>blaZ</i>	21	100
<i>qacC</i>	21	100
<i>qacA</i>	15	71.4
<i>qacB</i>	15	71.4
<i>tetO</i>	6	28.5
<i>ermC</i>	3	14.2
<i>aac(69)/le-aph(20)/la</i>	3	14.2
<i>mef</i>	0	0
<i>vanA</i>	0	0
<i>vanB</i>	0	0

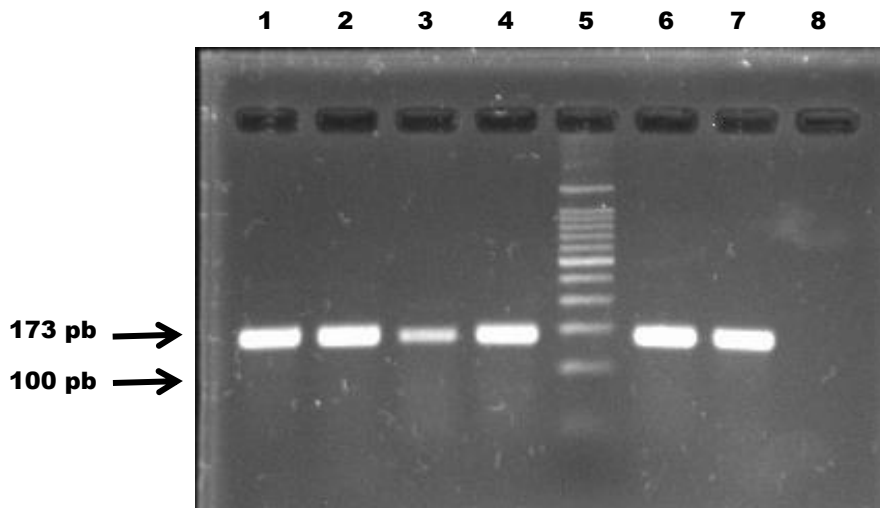
Tabla 5. Número y porcentaje de cepas de *S. aureus* que presentaron los diferentes genes de resistencia a antibióticos.



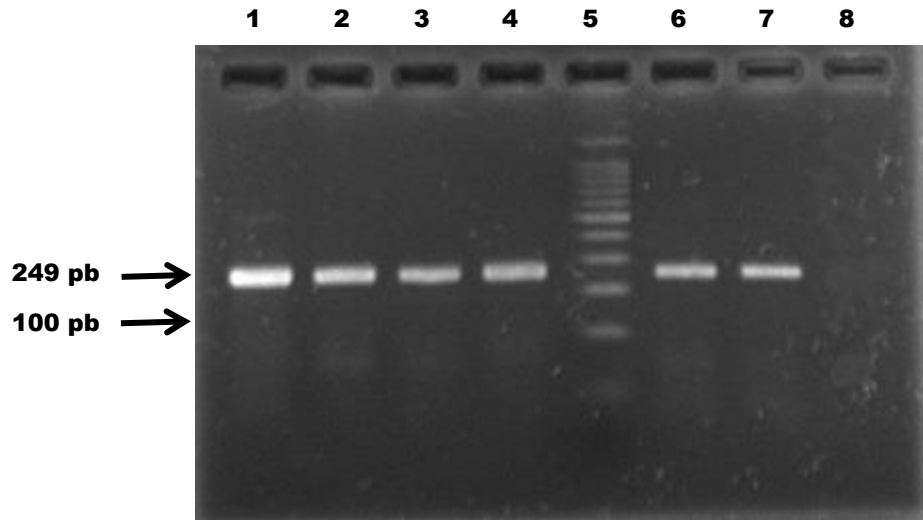
Fotografía 9. Detección del gen *ermA* mediante PCR convencional. Carriles 1 - 4 y 6 cepas de *S. aureus* (amplicones de 139 pb); Carril 5 (MWM 100pb-ladder); Carril 7 control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 8 control negativo (sin DNA molde).



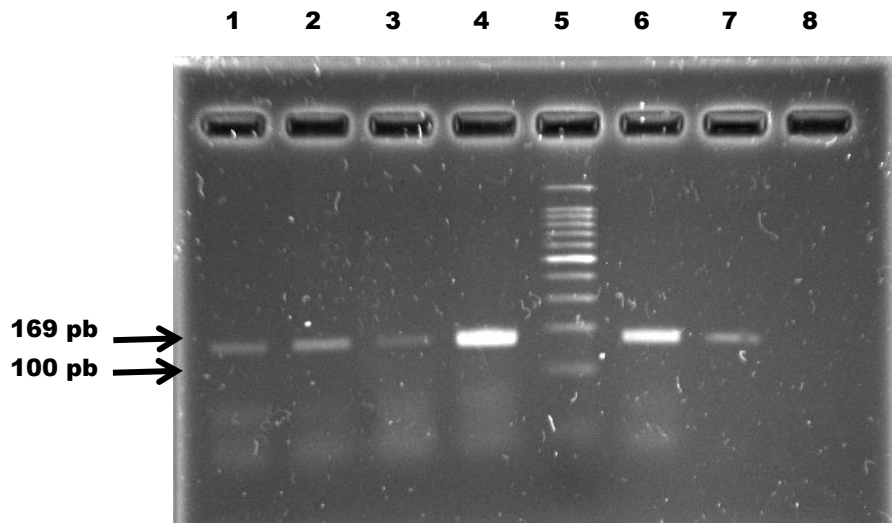
Fotografía 10. Detección del gen *ermB* mediante PCR convencional. Carriles 1-4 y 6 cepas de *S. aureus* (amplicones de 142 pb); Carril 5 (MWM 100pb-ladder); Carril 7 control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 8 control negativo (sin DNA molde).



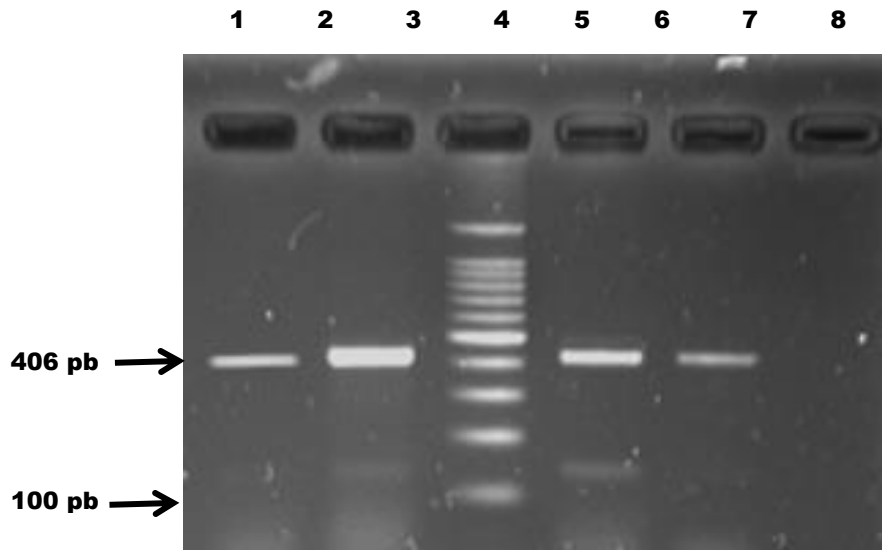
Fotografía 11. Detección del gen *blaZ* mediante PCR convencional. Carriles 1-4 y 6 cepas de *S. aureus* (amplicones de 173 pb); Carril 5 (MWM 100pb-ladder); Carril 7 control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 8 control negativo (sin DNA molde).



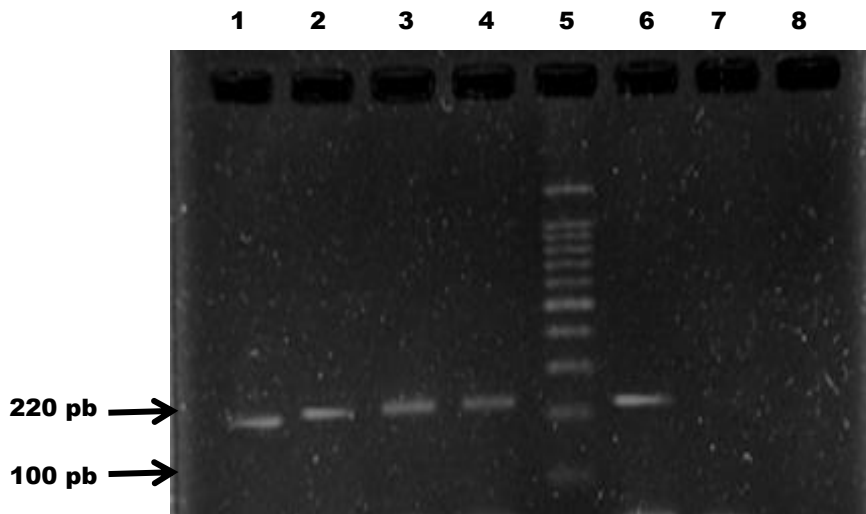
Fotografía 12. Detección del gen *qacC* mediante PCR convencional. Carriles 1- 4 y 6 cepas de *S. aureus* (amplicones de 249 pb); Carril 5 (MWM 100pb-ladder); Carril 7 control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 8 control negativo (sin DNA molde).



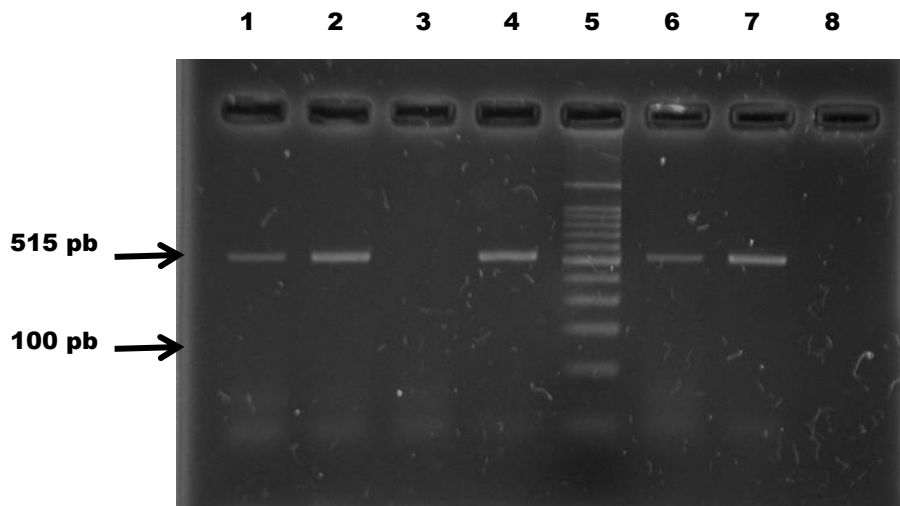
Fotografía 13. Detección del gen *tetK* mediante PCR convencional. Carriles 1- 4 y 6 cepas *S. aureus* (amplicones de 169 pb); Carril 5 (MWM 100pb-ladder); Carril 7 control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 8 control negativo (sin DNA molde).



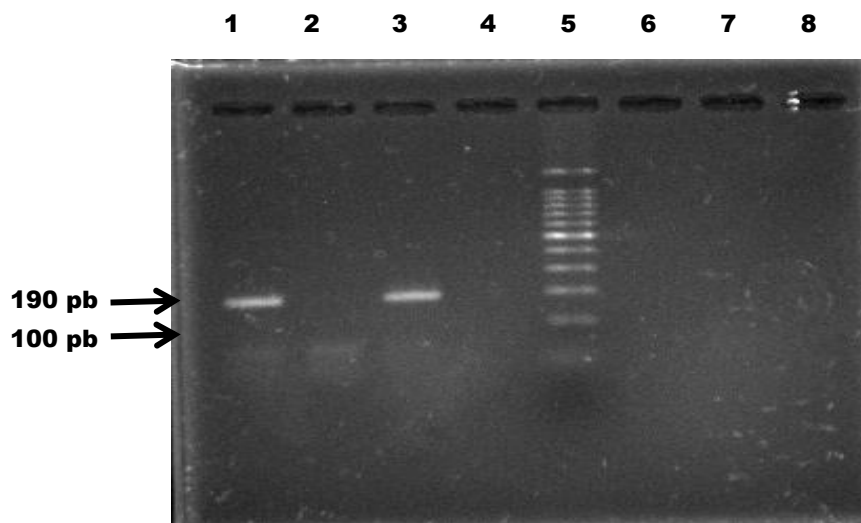
Fotografía 14. Detección del gen *tetM* mediante PCR convencional. Carriles 1 – 2 y 4 cepas de *S. aureus* (amplicones de 406 pb); Carril 3 (MWM 100pb-ladder); Carril 5 control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 8 control negativo (sin DNA molde).



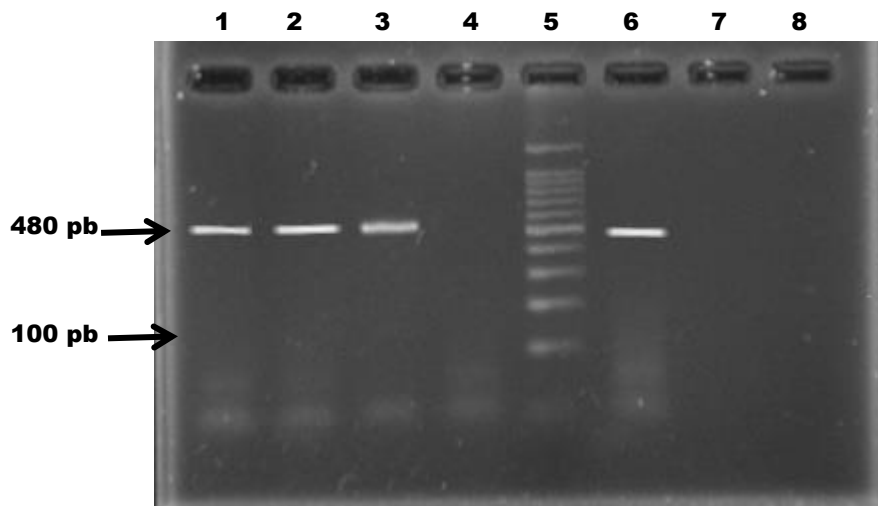
Fotografía 15. Detección del gen *qacAB* mediante PCR convencional. Carriles 1-4 cepas *S. aureus* (amplicones de 220 pb); Carril 5 (MWM 100pb-ladder); Carril 6 control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 7 muestra negativa; Carril 8 control negativo (sin DNA molde).



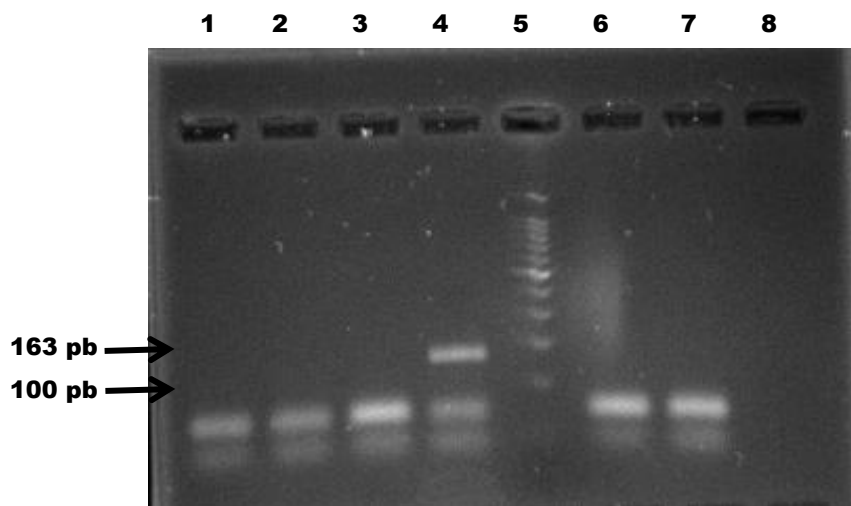
Fotografía 16. Detección del gen *terO* mediante PCR convencional. Carriles 1-2 y 4 y 6 cepas de *S. aureus* (amplicones de 515 pb); Carril 3 muestra negativa; Carril 5 (MWM 100pb-ladder); Carril 7 control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 8 control negativo (sin DNA molde).



Fotografía 17. Detección del gen *ermC* mediante PCR convencional. Carriles 1 y 3 cepas de *S. aureus* (amplicones de 190 pb); Carril 2, 4, 6 y 7 muestras negativas; Carril 5 (MWM 100pb-ladder); Carril 8 control negativo (sin DNA molde).



Fotografía 18. Detección del gen *aac(69)Ie-aph(20)Ia* mediante PCR convencional. Carriles 1-3 cepas de *S. aureus* (amplicones de 480 pb); Carriles 4 y 7 muestras negativas; Carril 5 (MWM 100pb-ladder); Carril 6 control positivo (ATCC 33592); Carril 8 control negativo (sin DNA molde).



Fotografía 19. Detección del gen *msrA* mediante PCR convencional. Carriles 1-3 y 6 cepas negativas; Carril 4 cepa de *S. aureus* positiva (amplicón de 163 pb); Carril 5 (MWM 100pb-ladder); Carril 7 control negativo (sin DNA molde).

En la tabla 6 se aprecian los fenotipos y genotipos de resistencia a antibióticos y desinfectantes. El 100% de las cepas presentó los fenotipos de resistencia para eritromicina, ampicilina, cefepime, y penicilina, en combinación con los genes *ermA*, *ermB*, *tetM*, *tetK* y *blaz*, y con el gen *qaC* que codifica para la resistencia a los desinfectantes. La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas presentó el tipo de *spa* t895 (n=15), seguido por t008 (n=4), y t002 (n=1) y t189 (n=1).

Cepa	FENOTIPOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS														PROD β- LACT AMAS AS	GENOTIPOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS											GENOTIPOS DE RESISTENCIA A DESINFECTANTES			Tipo de spa
	OXA (MRSA)	CF	LEV	E	AM	TE	SXT	CTX	GE	CXM	FEP	DC	PE	ermA		ermB	ermC	mrsA	mef	tetM	tetO	tetK	vanA	vanB	qac(69)Ie- aph(20)Ia	blaz	qacA	qacB	qacC	
C-11	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+		+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	t895	
C-12	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	t895	
C-16	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	t002
C-19	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	t895	
C-22	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	t895	
C-32	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	t895	
C-52	+	+	+	+	+	-		-	+		+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	t895	
C-58	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	t895	
C-59	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	t895	
C-66	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	t895	
C-73	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	t008	
C-75	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	t895	
C-76	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	t189	
C-77	+	-	-	+	+	-	-	-	-		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	t895	
C-79	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	t895	
C-82	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	t008	
C-93	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	t008	
C-103	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	t895	
C-109	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	t895	
C-111	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	t008	
C-112	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	t895	
cepas resisten te	19	13	13	21	21	2	5	20	6	13	21	19	21	18	21	21	3	1	0	21	6	21	0	0	3	21	15	15	21	

Tabla 6. Frecuencia de genotipos y fenotipos de resistencia a antibióticos y desinfectantes en las cepas de *S aureus* analizadas.

8. DISCUSION

8.1 Pacientes analizados

En este estudio se analizaron las cepas bacterianas de *S aureus* aisladas de infecciones relacionadas a los catéteres de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica (IRC) (Figuras 1 y 2). En el año 2002 la National Kidney Foundation de Estados Unidos en las guías K/DOQI definió a la (IRC) como la presencia de daño renal con una duración igual o mayor a tres meses, caracterizada por anomalías estructurales o funcionales con o sin descenso de la tasa de filtración glomerular (TFG) a menos de 60ml/min/1.73m² (K/DOQI, 2002). También podemos definirla como un proceso fisiopatológico multifactorial de carácter progresivo e irreversible, en donde se da una reducción lenta del número de nefronas con el consecuente síndrome clínico derivado de la incapacidad renal para llevar a cabo funciones depurativas, excretoras, reguladoras y endocrinometabólicas, frecuentemente lleva a un estado terminal, en el que el paciente requiere terapia de reemplazo renal (TRR), es decir diálisis o trasplante de riñón para poder vivir (Gómez *et al.*, 2006).

De los pacientes estudiados el 61.9% (n=13) fueron hombres y el 38.1%,(n=8) mujeres (Figura 1), siendo el grupo de 21 a 30 años el de mayor frecuencia (33.3%, n=7) (Figura 2). El origen de la IRC en el 100%,(n=21) de los pacientes fue la Diabetes, lo cual corrobora lo reportado por Mezzano (2005), quien ha descrito que las principales causas que llevan a la Insuficiencia Renal Crónica, son en primer lugar la Diabetes Mellitus y en segundo la hipertensión arterial, que en conjunto representan más del 60% de los pacientes en diálisis crónica.

La Diabetes Mellitus (DM) es un desorden metabólico de múltiples etiologías, caracterizado por hiperglucemia crónica (aumento de los niveles de glucosa en la sangre) con disturbios en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, lo cual resulta de defectos en la secreción o en la acción de la insulina (Poretsky *et al.*, 2002). Es una enfermedad crónica que se asocia con el daño a largo plazo, la disfunción y la falla orgánica, especialmente de ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos, por lo

que se requiere de cuidado médico continuo y automanejo por parte del paciente para prevenir complicaciones agudas y reducir las mismas a largo plazo (Pascua 2004).

La Diabetes es una enfermedad que genera mayor discapacidad, especialmente en los adultos mayores, ocupando gran parte de los recursos sanitarios de todos los países. Sus complicaciones crónicas, particularmente las cardiovasculares representan la mayor causa de mortalidad en estos pacientes. (Sabán *et al.*, 2012)

La American Diabetes Association divide a la diabetes en 2 categorías etiopatogénicas amplias: a) la DM tipo 1, donde existe destrucción de las células β que por lo general conducen a una deficiencia absoluta de la secreción de insulina y B) la DM tipo 2, mucho más frecuente, causada por una combinación de resistencia a la insulina y una respuesta de secreción compensatoria de insulina inadecuada (ADA, 2012).

La Federación Mexicana de Diabetes A.C. en base a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 reporta la importancia de padecer diabetes ya que se encuentra entre las primeras causas de mortalidad. En México durante 2011, 70 de cada 100 mil personas, murieron por diabetes mellitus (INEGI, 2011). Se estima que en México 6.4 millones de personas fueron diagnosticadas con diabetes, lo cual representa un gasto de 3,430 millones de dólares al año para su atención médica (ENSANUT, 2012).

8.2 Contaminación de los catéteres por *S. aureus*

El 100% (n=21) de los pacientes del servicio de hemodiálisis analizados presentó infección en el sitio de inserción del catéter por *S. aureus*, el cual se caracterizó por enrojecimiento, inflamación, dolor y supuración. Se ha descrito que *S. aureus* es el principal patógeno responsable de las infecciones asociadas a catéteres (Abad *et al.*, 2011). La contaminación puede ocurrir debido a que después de la inserción de un catéter, el segmento intravascular se recubre inmediatamente de proteínas del huésped (fibrina, fibrinógeno, fibronectina, laminina, etc.), que modifican la superficie del biomaterial, y actúan como adhesinas específicas para diferentes microorganismos. A su vez, estas proteínas favorecen también la adherencia de plaquetas, y promueven la trombogénesis y la formación de coágulos de fibrina. Los coágulos formados proporcionan una fuente de nutrientes para la proliferación bacteriana y la formación de biopelícula. La

masa generada puede disminuir el flujo a través del catéter, llegando incluso a obstruirlo. Además, esta disminución del flujo vascular implica una mayor manipulación del catéter, lo que incrementa el riesgo de infección; por lo que se establece una relación recíproca entre complicaciones mecánicas y colonización del catéter (Aguinaga *et al.*, 2011).

Los microorganismos, una vez adheridos, colonizan la superficie del catéter formando una biopelícula bacteriana, que les permite continuar dividiéndose y formar microcolonias. *S. aureus* es un microorganismo muy virulento capaz de ocasionar complicaciones como osteomielitis y endocarditis (Grothe *et al.*, 2010).

En la mayoría de las bacteremias de los catéteres no tunelizados, estos deben ser removidos. En el caso de los tunelizados o implantables, la decisión debe basarse en la severidad de la infección, la documentación de la infección de ese catéter, el aislamiento del microorganismo involucrado y la presencia de complicaciones como endocarditis infecciosa, trombosis séptica, infección del túnel o metástasis infecciosa a distancia. El tratamiento empírico debe modificarse con base al aislamiento microbiológico y su sensibilidad a los antibióticos (Fica *et al.*, 2003).

En una revisión retrospectiva de infecciones asociadas a los catéteres se encontró a *S. aureus* como la especie predominante, identificándose en el 100% de hemocultivos de los pacientes y en el 79.2% de los exudados, se encontró que el 60% fueron cepas MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). La alta prevalencia de especies meticilino-resistentes los llevó a incluir la Vancomicina en su protocolo de las infecciones de catéteres (Rodrigues *et al.*, 2009).

8.3 Identificación de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus fue identificado en el 100 (n=21) de los casos mediante las pruebas bioquímicas de manitol y coagulasa y por PCR convencional mediante la detección de los marcadores cromosómicos *spa* (Fotografía 1) y rRNA (Fotografía 2), los cuales se han descrito como marcadores específicos para *Staphylococcus aureus* (Hallin *et al.*, 2009). En un estudio realizado en cepas de *S. aureus*, se encontró el gen *spa* en el 100% de las cepas (Campbell *et al.*, 2008).

8.4 Detección del gen *mecA*

La resistencia a la meticilina y a la mayoría de los β -lactámicos se debe al gen *mecA*, que codifica para la proteína de 78 kDa: PBP2a (penicillin binding protein 2a). El gen está situado en un elemento genético móvil denominado SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome mec). En ausencia de la PBP2a, los antibióticos β -lactámicos se unen a la PBP nativa de la pared celular bacteriana, lo que resulta en la interrupción de la síntesis del peptidoglucano. En las cepas MRSA, la PBP2a está presente, pero poseen tan baja afinidad por los antibióticos β -lactámicos que no existe interrupción en la síntesis de peptidoglucano (Pérez *et al.*, 2012). Desde su aparición en 1961, las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina se diseminaron por todo el mundo, y aunque se mantuvieron como un problema asociado al ambiente hospitalario, en los años 90 aparecieron los primeros casos en pacientes sin antecedentes de hospitalización (Miranda N, 2011). En la última década han sido cada vez más frecuentes los informes de infecciones causadas por cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y el panorama de las infecciones por esta bacteria se ha tornado más complejo, debido a la emergencia y diseminación en la comunidad de cepas que se conocen con la sigla CA-MRSA (por Community-associated methicillin-resistant *S. aureus*), las cuales se han mostrado más virulentas y han ocasionado brotes graves en comunidades cerradas como grupos familiares, militares, reclusos, niños en guarderías y deportistas (Benavides *et al.*, 2010), por lo que el aumento de las cepas MRSA se ha convertido en un reto importante para los médicos en busca de establecer un tratamiento que permita erradicar las enfermedades infecciosas causadas por *S. aureus* (Ghaznavi *et al.*, 2012).

Deurenberg y colaboradores concluyeron que la aparición de las cepas MRSA se debe a la transferencia horizontal del gen *mecA* entre 2 especies de *Staphylococcus* diferentes (Deurenberg *et al.*, 2006). En nuestro estudio reportamos que el 100% (n=21) de las cepas presentó el gen *mecA* (Fotografía 5), sin embargo únicamente el 90.5% (n=19) de las cepas fueron MRSA y el 9.5% (n=2) fueron susceptibles. La diferencia significativa de las 2 cepas que resultaron sensibles posiblemente se deba a que el gen *mecA* presente en las cepas no se expresó durante el método del disco con oxacilina.

Debido a la resistencia a la meticilina por las cepas de *S. aureus*, se introdujo la vancomicina de manera global a principios de los años 90 como único antibiótico efectivo contra *S. aureus*. Sin embargo, en 1997 se encontraron cepas con resistencia intermedia

a la vancomicina (VISA) y en el 2002 se detectaron las primeras cepas resistentes a este antibiótico ("vancomycin resistant *S. aureus*", VRSA). La resistencia a la vancomicina se debe a la adquisición del gen *van*, el cual se transfiere a través de un plásmido. Para que la vancomicina ejerza su acción debe llegar a la membrana citoplásmica y unirse a las moléculas precursoras nacientes de la pared celular. Esta unión inhibe la incorporación de los precursores a la pared celular en formación. Al parecer, la resistencia a la vancomina se debe a cambios en la biosíntesis del peptidoglucano. Las cepas VISA producen cantidades elevadas de peptidoglucano, dando como resultado una pared celular gruesa y de forma irregular. Además, se presenta menos entrecruzamiento entre las hebras de peptidoglucano. Esta pared gruesa y desordenada puede atrapar a la vancomicina en la periferia de la célula, con el consiguiente bloqueo de la acción del antibiótico (Bustos *et al.*, 2006). En este panorama, *S. aureus* representa un riesgo muy grave, tanto hospitalario como comunitario. La mortalidad por una bacteriemia causada por *S. aureus* va del 20% al 40%, a pesar de la gran disponibilidad actual de antibióticos, y se incrementa proporcionalmente con su patrón de resistencia (Becerra *et al.*, 2009).

8.5 Detección del gen *blaZ*

La producción de β -lactamasas se debe a la presencia del gen *blaZ* (Fotografía 11) el cual se encontró presente en el 100% (n=21) de las cepas estudiadas, estas enzimas no permiten que los β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) se unan a las proteínas y se interrumpa la síntesis de pared celular. Nuestros resultados corroboran lo propuesto por Podkowik, quien reportó que el gen *blaZ* se encontró presente en el 96% de las cepas estudiadas (Podkowik *et al.*, 2012). La presencia del gen *blaZ* en las cepas de *S. aureus* ha generado gran preocupación en los médicos, debido a que los betalactámicos, constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico (Marín *et al.*, 2002).

8.6 Detección de genotipos y fenotipos de resistencia a los antibióticos

Los genes de resistencia bacteriana a los antibióticos representan una amenaza para la salud humana; dichos genes se encuentran en elementos genéticos móviles (plásmidos, transpososnes o integrones) que permiten su transferencia de una cepa a otra (Rizzotti *et al.*, 2005). En nuestras cepas estudiadas los genes *ermA* y *ermB* se encontraron presentes en el 100% (n=21) de las cepas (Fotografías 9 y 10). Estos genes codifican resistencia para eritromicina, macrólido frecuentemente utilizado en pacientes alérgicos a la penicilina, es un compuesto bacteriostático que actúa contra bacterias Grampositivas inhibiendo la síntesis de proteínas (Mendoza, 2008). Estos datos concuerdan con el método de Kirby- Bauer, en donde la resistencia a eritromicina fue del 100% (n=21) (Figura 5). Rizzotti y colaboradores en el 2005 encontraron el gen *ermB* en el 66.7% de las cepas de *S. aureus* estudiadas y Ghaznavi en el 2012 lo detectó en el 100% de las cepas estudiadas, lo que nos indica que con el tiempo se propago la resistencia bacteriana a este compuesto, por lo que hoy en día ya no es recomendable para combatir infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*. El gen *msrA* muestra otro mecanismo de resistencia inducible a la eritromicina mediante la codificación de una bomba de salida dependiente de ATP (Zmantar *et al.*, 2011), dicho gen se identificó únicamente en una de nuestras cepas (Fotografía 19).

La tetraciclina es un compuesto bacteriostático de amplio espectro que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas (Granados *et al.*, 1983). En este estudio se identificaron los genes *tetK* y *tetM* en el 100% de las cepas (Fotografías 13 y 14), sin embargo con el método de Kirby-Bauer para probar el fenotipo de resistencia, solo 2 cepas (9.5%) fueron resistentes, lo que probablemente se deba a que las cepas son portadoras del gen pero no se expresó durante el método de Kirby-Bauer, debido a que quizás las condiciones no eran adecuadas o porque hay genes que suelen expresarse únicamente in vivo, ya que en ocasiones se expresan o no dependiendo de la función de la célula en un tejido particular. También existe especificidad temporal, esto quiere decir que los diferentes genes en una célula se encienden o se apagan en diferentes momentos de la vida de un organismo (Solari 2007).

Los genes *vanA* y *vanB* que codifican resistencia para Vancomicina no se encontraron presentes en ninguna de las cepas. La Vancomicina es un antibiótico bactericida con un espectro de actividad exclusivamente para Grampositivos, que es eficaz para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a nafcilina o penicilina. Anteriormente se suministraba únicamente a pacientes graves debido a que se le atribuían efectos secundarios como la toxicidad renal, lo cual se debía probablemente a una impureza de la fórmula original. Actualmente no existen informes recientes de que la vancomicina sea causante de este padecimiento (Winter, 1994). Diversos estudios como el de Podkowik en el 2012 y Shing en el 2002 informaron que no encontraron el gen *van* presente en ninguna de sus cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas.

Para evitar la propagación de agentes patógenos tanto en la comunidad como en hospitales, han sido ampliamente utilizados los desinfectantes; para descontaminar superficies, para desinfección de manos y descolonización de pacientes de alto riesgo infectados por cepas MRSA. (Zhang *et al.*, 2011). La evidencia sugiere que el uso excesivo de estos compuestos de amonio cuaternario puede contribuir a la aparición y propagación de cepas resistentes, ya que en los hospitales las bacterias Grampositivas actúan como reservorios de gen *qac* (Peacock *et al.*, 2002). La frecuencia de los genes *qac* son bajas en las cepas bacterianas de la población en general, pero los porcentajes pueden aumentar debido a la transferencia de cepas de hospitales a comunidad, por lo que han surgido preocupaciones con respecto a la posible aparición de resistencia cruzada entre desinfectantes y antibióticos ampliamente utilizados. Estudios recientes reportan que la resistencia a los antibióticos es mayor entre las cepas resistentes a los desinfectantes (Singh *et al.*, 2002). En este estudio se encontró que el 100% (n=21) de las cepas fue portadora del gen *qacC* y el 71.4% (n=15) de los genes *qacA* y *qacB*, en cada caso (Fotografía 15).

A partir de las 21 cepas de *Staphylococcus aureus* analizadas, en este estudio se encontró que en el 38% (n=8) de las cepas fue portadora de 9 genes de resistencia a los antibióticos y desinfectantes, en el 23.8% (n=5) se encontraron 8 genes, en el 19.0% (n=4) 7 genes, en el 14.2% (n=3) se encontraron 6 genes y en el 4.7% (n=1) se encontraron 5 genes de resistencia (Tabla 6). En este trabajo también describimos que la mayoría de las cepas de *S. aureus* estudiadas presentó el tipo de *spa* t895 (n=15), seguido por t008 (n=4), y t002 (n=1) y t189 (n=1). Estos resultados reflejaron la elevada

carga genética de resistencia a los antibióticos y desinfectantes en las cepas de *S. aureus*, lo que complica el tratamiento médico para erradicar las infecciones relacionadas a los catéteres.

Es importante mencionar que en la actualidad no existen métodos específicos de prevención, por lo que deben extremarse las medidas de higiene, controlar a los portadores sanos, evitar la antibioticoterapia que destruya la microbiota local y proteger a las personas susceptibles, de igual manera, es recomendable probar más de una serie de antibióticos ya que se debe de considerar la variación de sensibilidad de la bacteria in vitro (Negróni *et al.*, 2009). Los antibióticos se deben administrar en concentraciones lo suficientemente altas para la curación y se recomienda continuar su aplicación durante algún tiempo después de que los síntomas han desaparecido. Este método proporciona la mejor oportunidad de una curación completa y minimiza la probabilidad de mutación a microorganismos resistentes (Divo *et al.*, 1990).

9. CONCLUSIONES

- Todas las cepas de *S. aureus* estudiadas fueron portadoras del gen *mecA* y presentaron los mismos fenotipos de resistencia para Penicilina, Ampicilina, Eritromicina y Cefepime.
- El total de las cepas de *S. aureus* presentó los genes *ermA*, *ermB*, *blaZ*, *tetK*, *tetM* y *qacC*.
- Los genes *mef*, *vanA* y *vanB* no se encontraron presentes en ninguna de las cepas de *S. aureus*.
- El tipo de *spa* más frecuente entre las cepas de *S. aureus* estudiadas fue t895.
- Los resultados mostraron la elevada frecuencia de genes que codifican la resistencia a los antibióticos y desinfectantes por las cepas de *S. aureus*.

10. LITERATURA CITADA

1. Abad CL, Safdar N. 2011. Catheter-related Bloodstream Infections. (IDSE) Infectious Disease Special Edition. Rev. Independently Developed By McMahon Publishing; pp. 84-98.
2. Aguinaga A, Del Pozo JL. 2011. Infección asociada a catéter en hemodiálisis: diagnóstico, tratamiento y prevención. Pomplona. NefroPlus 4:1-10.
3. Balaban N, Rassoly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. International Journal of Food Microbiology 61:1-10.
4. Becerra G, Placencia A, Luevanos A, Domínguez M, Hernández I. 2009. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos en bacterias. ENF InfMicrobial 29 2: 70-76.
5. Benavides PFB, Zapata TMA, Ramírez PA, León RA, Jimenez QJN. 2010. Colonización por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en las manos de individuos de la comunidad. Redalyc Iatreia Colombia 1: 5-9.
6. Bustos M, Aída HP, Marcia GC. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev. Biomed; 17: 287-305.
7. Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, Bae IG, Stryjewski ME, Federspiel JJ, Tonthat GT, Rude TH, Barriere SL, Corey R, Fowler VG. 2008. Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. Journal of clinical microbiology 46: 678-684.
8. Chang SC, Hsieh WC, Luh KT. 1995. Influence of beta-lactamase inhibitors on the activity of oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. DiagnMicrobiol Infect Dis 21: 81-84.
9. Cornejo BE. 2006. Determinación de la Resistencia a Antibióticos en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de las fosas nasales de portadores asintomáticos. Tesis de Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 66pp
10. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. 2006. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 13: 222-235.
11. Fica A, García P, Rodríguez TJ, Olivares CR, Contreras ML, Luppi NM, Segovia RE, Calvo AM, Barriga CF, Brenner FP, Bugedo TG, Calleja DR, Del Valle MG,

- Eliana GO, Jofré ML, Sutil PL. 2003. Consenso nacional sobre infecciones asociadas a cateteres vasculares centrales RevChillInfect (2003); 1: 39-75.
12. Freeman BA, Lovis BS, Preston DH, Donald DG, Deninis KJ, Terry ML, Gary PR, John RW, Mayer WJ. 1995. Microbiología de Burrows, 22^a ed. Nueva editorial Interamericana McGRAW-HILL SA de CV, México pp. 417-431.
 13. Freenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM. 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 15: 60–64.
 14. García M. 2001. Respuesta de 73 cepas de *Staphylococcus aureus* a 6 antibióticos β -lactámicos y a un inhibidor de β -lactamasas, sulbactam/ampicilina. Tesis de licenciatura, ENEP Iztacala UNAM. México 46pp.
 15. Geha JD, Uhl RJ, Gustaferrero AC, Persing HD. 1994. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant *Staphylococci* in the clinical laboratory. Journal of clinical microbiology. 7: 1768-1772.
 16. Ghaznavi ER, Neela V, Shamsudin MN, Ghasemzadeh HM, Tavakol M, Belkum AV, Etemadi MR, Andar-Ali AF. 2012. Diversity in the antimicrobial susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones Clin Microbiol Infect Dis 31: 3317–3321.
 17. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lernmark A, Nathan D, Palmer J, Rizza R, Saudek C, Shaw J, Steffes M, Stern M, Tuomilehto J, Zimmet P, Edelman D, Olsen MK, Dudley TK, Harris AC, Oddone EZ, Sato KK, Hayashi T, Harita N, Yoneda T, Nakamura Y, Endo G, Kambe H, Shimazaki T, Kadowaki T, Ohyama Y, Ohe K, Kubota K, Geiss LS, Pan L, Cadwell B, Gregg EW, Benjamin SM, Engelgau MM, Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM, Droumaguet C, Balkau B, Simon D, Caces E, Tichet J, Charles MA, Eschwege E, Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, Oats JJ, Persson B, Rogers MS, Sacks DA, Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, Dyer AR, Leiva A, Hod M, Kitzmiller JL, Lowe LP, McIntyre HD, Oats JJ, Omori Y, Schmidt MI, Landon MB, Spong CY, Thom E, Carpenter MW, Ramin SM, Casey B, Wapner RJ, Varner MW, Rouse DJ, Thorp JM, Jr, Sciscione A, Catalano P, Harper M, Saade G, Lain KY, Sorokin Y, Peaceman AM, Tolosa JE, Anderson GB, Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, McPhee AJ, Jeffries

- WS, Robinson JS. 2012. Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus (I). Intramed. American Diabetes Asociación.
18. Gordillo KH. 2008. Detección del factor de adhesión intracelular (ica) en cepas de *Staphylococcus spp.* aisladas de catéteres de pacientes de hemodiálisis de Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
 19. Granado JR, Bosch CJ. 1983. Compendio Esencial de Química Farmacéutica. Ed. Reverté S.A. Barcelona España pp. 646-650.
 20. Grothe C, Goncalves SBA, De Cássia BAR, Carneiro VLA, De Catro CSR, Barbosa DA. 2010. Incidence of bloodstream infection among patients on hemodialysis by central venous catheter. Sao Paulo Brasil, Rev. Latino-Am. Enfermagem 1: 112-126.
 21. Hallin M, Friedrich AW, Struelens MJ. 2009. Spa typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus*. Bruselas, Pub Med Methods Mol Biol. 551: 189-202.
 22. Ingraham JL, Ingraham CA, 1998. Introducción a la Microbiología, Editorial Reverte S.A. Barcelona pp.485-514.
 23. Jawetz ME, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. 1990. Microbiología Medica, 13° ed., Ed. El Manual Moderno, México D.F. pp.188-194, 142-173.
 24. Jensen MM, Wright DN. 1987. Introducción a la Microbiología Médica, Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. México pp. 132-143.
 25. K/DOQI. (2002). clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Kidney Disease Outcome Quality Initiative. Am J KidneyDis ,39 (S1), 1-266.
 26. Lennette EH, Balows A, Hauster WJ, Shadom HJ. 1987. Manual de Microbiología Clínica 4 ed. Ed. Medica Panamericana, Buenos Aires pp.189-201.
 27. Marín M, Gudial F. 2002. Antibióticos betaláctamicos. Barcelona España. Enferm Infec Microbial Clin. 1: 42-55.
 28. Marmur J. 1961. A procedure the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. 3: 208–218.
 29. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. 2000. Multiplex PCR for detection of Genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock, Syndrome Toxin 1 and Methicillin Resistance. Journal of Clinical Microbiology 38; 3: 1032-1035.

30. Mendoza PN. 2008. Farmacología Médica. Ed. Panamericana S.A. de C.V. UNAM México pp. 650-655.
31. Mezzano AS, Aros EC. 2005. Enfermedad renal crónica clasificación, mecanismos de progresión y estrategias de renoprotección. Nefrología. Universidad Austral de Chile. RevMéd Chile. 133: 338-348.
32. Miranda NMG. 2011. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 4: 262-270.
33. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. 2006. Microbiología Medica, 5ª edición Ed. GEA Consultoría Editorial S.L.L. Barcelona España pp.213-221.
34. Nashev D, Toshkova K, Salasia SIO, Hasson AA, Lammler C, Zschock M. 2004. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers FEMS Microbiology Letters 233: 45-52.
35. Negroni M, Aceto C, Alpuche CMA, Bernat MI, Bonvehí P, Carnovale S, Domenech MC, González MI, Eiguchi K, Leucowics JF, Monto MC, Marcantoni M, Romano LM, Molgatinas S, Negroi R, Piovano S, Ramella MR, Rosa AC, Sanjuán N, Somaglia L, Turcot L, Santos JAY. 2009. Microbiología Estomatológica: Fundamentos y guía práctica 2a edición, Ed. Medica Panamericana, Buenos Aires Argentina, pp. 353-358.
36. Pahissa A, Almirante B, Arribas JL, Fernández NH, García CM, Cercenado E, Gavaldá J, Cobo J, Cueto M, Río A, Hernández MJ, Lapresta C, Lisboa T, Mestres CA, Miro JM, Pascual A, Pigrau C, Pujol M, Rello J, Ulldemolins M. 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* SL. Barcelona España pp 21-40.
37. Paniagua GLC, Monrroy EP, Vaca SP. 2007. Manual de identificación de *Esterichia coli* y *Salmonella spp* en materia fecal. UNAM México.
38. Pascua M. 2006. Aumenta la Diabetes. Revista Española de Salud Pública. Madrid 80: 265-275.
39. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, Oneill G, Day NPJ. 20002. Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. Infections and Immunity 70: 4987-4996.
40. Perez AG, Rodríguez ÁG, Longoria RE, Castro MME. 2012. Evaluación de cuatro métodos para la detección de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente de muestras clínicas en un hospital regional. Salud Pública de México ISNN. 1: 1-6.

41. Podkowik M, Bystron J, Bania J. 2012. Prevalence of antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from ready-to-eat meat products. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 15: 233-237.
42. Poretzky L, Gerard B, Brass B, Brillon DJ, Alrefai H, Beyreuther M, Rochelle L, Chin RL, Bhambri R, Bloomgarden Z, Chiu KC, Farag AF, Ciaraldi TP, Fleckman AM, Devereux R, Frissora CL, Donovan DS, Geevarghese AT, Drexler A, Gerich JE, Goldberg IJ, Hsu WC, Jacobson AM, Gouller A, Jacobson IM, Grunberger G, Kruzynska Y, Haluzik M, Leung AC, Herold KC, Liu J, Mendoza MA, Mantzoros C, Melman A, Martínez DS, Meyer C, Marmur ES, Murphy JA, Mcfarlane S, Myers J, Pasternack FR, Rewers M, Robertson C, Rahhal F, Ranen L, Rayfield EJ, Reilly E, Rosentock JL, Reitman ML, Rubin M, Sargios TN, Strain GW, Stoffel M, Schneider AE, Svahn JK, Tolentino MC, Sharelson D, Varghese MC, Sowers JR, Weinger K, Welch GW, Zajac J, Zonszein J, Zweig SB. 2002. *Principles of Diabetes Mellitus*. ED. Kluwer Academic Publishers. Massachusetts USA. pp.764.
43. Rizzotti L, Simeoni D, Cocconcelli P, Gazzola S, Delgadillo F, Torriani S. 2005. Contribution of *Enterococci* to the Spread of Antibiotic Resistance in the Production Chain of Swine Meat Commodities *Journal of Food Protection*. 68: 955–965.
44. Rodrigues FMR, Castro R, Oliveira L, Prata C, Morgado T. 2009. Infección de catéterer de hemodiálisis: una revisión retrospectiva. Oporto (Portugal) *Nefrología*. 2:176-177.
45. Sabán RJ, Fabregate M, De la Torre N, Sánchez O, Bernal E. 2012. *Control Global del Riesgo Cardio metabólico*. Vol 1. Ediciones Díaz de Santos Madrid España pp. 303- 312.
46. Shing SM, Heir E, Leegaard T, Wiger K, Holck A. 2002. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β -lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 2797-2803
47. Shopsis B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN: 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 37: 3556–3563
48. Solari AJ. 2007. *Genética Humana Fundamentos y aplicaciones en Medicina* 3ªed Ed. Panamericana S.A. Buenos Aires Argentina pp. 127-141.

49. Sociedad Española de Geriátría y Gerontología (SEGG) Gómez AC, Arias EM, Jiménez CR. 2006 Tratado de Geriátría para residentes Madrid ed. International Marketing & Communication, S.A. (IM&C) pp. 637-646
50. Schwendener S, Perreten V. 2011. New transposon Tn6133 in methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* ST398 contains *vga (E)*, a novel streptogramin A, pleuromutilin, and lincosamide resistance gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55: 4900-4904.
51. Winter ME. 1994. *Farmacocinética Clínica Básica*. 2a ed Ed. Díaz de Santos S.A. Madrid España pp 393-407.
52. Zmantar T, Koudhi B, Miladi H, Bakhrouf A. 2011. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BioMedCentral Research Notes* 4:453.
53. Zhang M, O'Donoghue MM, Ito T, Hiramatsu K, Bosst MV. 2011. Prevalence of antiseptic-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci colonizing nurses and the general population in Hong Kong. *Journal of Hospital Infection* 78: 113-117.
54. http://ensanut.insp.mx/resultados_principales.php#.U5DILnJOUcA. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012
55. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2013/diabetes0.pdf>. Instituto Nacional de Estadística y Geografía Aguascalientes, 2013.