



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Detección molecular por PCR de los genes: identificación  
específica (*serp0107*) y resistencia a los antimicrobianos  
(*mecA*) en cepas clínicas de *Staphylococcus epidermidis***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**ALBA DE BELEN JIMÉNEZ SALINAS**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ROBERTO CABRERA CONTRERAS**

**2015**

**Ciudad Universitaria, D. F.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Jiménez  
Salinas  
Alba de Belen  
21563486  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
307134987

### 2. Datos del tutor

Dr.  
Roberto  
Cabrera  
Contreras

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Víctor Manuel  
Valdés  
López

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Javier Rolando  
Ambrosio  
Hernández

### 5. Datos del sinodal 3

Dra.  
Nayeli  
Rodríguez  
Fuentes

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.  
Enrique  
Meléndez  
Herrada

### 7. Datos del trabajo escrito

Detección molecular por PCR de los genes: identificación específica (*serp0107*) y resistencia a los antimicrobianos (*mecA*) en cepas clínicas de *Staphylococcus epidermidis*.

71 p  
2015

# Índice

	Página
<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Introducción</b>	
2.1 <i>Staphylococcus</i> .....	3
2.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	3
2.2.1 Importancia clínica.....	4
2.2.2 Pruebas bioquímicas para su identificación.....	5
2.3 Marcador molecular.....	6
2.3.1 Gen <i>mecA</i>	7
2.3.2 Gen <i>serp0107</i>	8
2.4 Antibióticos.....	8
2.4.1 Grupo $\beta$ -lactámicos.....	9
2.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	9
<b>3. Objetivos</b> .....	12
<b>4. Hipótesis</b> .....	12
<b>5. Método</b>	
5. 1 Revisión bibliográfica.....	14
5.1.1 Análisis bio-informático.....	14
5.2 Identificación bacteriana.....	14
5.2.1 Pruebas bioquímicas.....	15
5.2.1.1. Fermentación de manitol.....	15
5.2.1.2 Detección de la enzima catalasa.....	16
5.2.1.3 Producción de la enzima coagulasa.....	16
5.2.1.4 Producción de la enzima ureasa.....	17
5.2.1.5 Producción de la enzima fosfatasa.....	17
5.2.1.6 Resistencia a novobiocina.....	18

5.3 Detección molecular.....	19
5.3.1 Extracción de DNA.....	19
5.3.2 Condiciones de PCR.....	19
5.3.3 Electroforesis.....	21
5.4 Análisis de datos.....	23
<b>6. Resultados.....</b>	<b>24</b>
<b>7. Discusión.....</b>	<b>29</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>31</b>
<b>9. Referencias.....</b>	<b>32</b>
<b>10. Anexos</b>	
10.1 Diseño de oligonucleótidos o iniciadores de la PCR.....	36
10.2 Pruebas bioquímicas.....	48
10.3 Materiales y reactivos.....	51
10.4 Cepas bacterianas utilizadas.....	54

## Índice de figuras

	Página
1. Complejo <i>mec</i> .....	7
2. Anillo $\beta$ -lactámico.....	9
3. Amplificación exponencial del ADN en la PCR.....	10
4. Etapas de la PCR.....	11
5. Diagrama de flujo del método realizado.....	13
6. Condiciones para la amplificación de los genes <i>serp0107</i> y <i>mecA</i> .....	21
7. Electroforesis en gel de agarosa.....	22
8a. Amplificación del gen <i>serp0107</i> en <i>S. epidermidis</i> en gradiente desnaturalizante.....	24
8b. Amplificación del gen <i>serp0107</i> en <i>S. epidermidis</i> y en <i>S. aureus</i> .....	24
9. Pruebas bioquímicas.....	26
10. Productos de amplificación para los genes <i>serp0107</i> y <i>mecA</i> .....	27
11. PCR dúplex para amplificación de los genes <i>serp0107</i> y <i>mecA</i> .....	28
12. Análisis de horquillas y dímeros del iniciador de la PCR forward del gen <i>serp0107</i> .....	38
13. Análisis de horquillas y dímeros del iniciador de la PCR reverse del gen <i>serp0107</i> .....	38
14. Análisis de homo-dímeros entre los iniciadores forward y reverse.....	39
15. Análisis de hetero-dímeros entre los iniciadores forward y reverse.....	40
16. Ejemplos de análisis de horquillas y dímeros del iniciador de la PCR forward del gen <i>serp0107</i> (2do diseño).....	44
17. Ejemplos de análisis de horquillas y dímeros del iniciador de la PCR reverse del gen <i>serp0107</i> (2do diseño).....	44
18. Ejemplos de formación de homo-dímeros entre los iniciadores forward y reverse (2do diseño).....	45
19. Ejemplos de formación de hetero-dímeros entre los iniciadores forward y reverse (2do diseño).....	46

## Índice de tablas

	Página
1. Pruebas bioquímicas para identificación de <i>S. epidermidis</i> .....	6
2. Pruebas bioquímicas utilizadas para la diferenciación de las cepas de <i>S. epidermidis</i> estudiadas.....	15
3.1 Mezcla de reacción para amplificar el gen <i>serp0107</i> .....	20
3.2 Mezcla de reacción para amplificar el gen <i>mecA</i> .....	20

## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ASM</b>	Agar sal y manitol
<b>BHI</b>	Infusión de cerebro corazón (Brain heart infusion)
<b>GltC</b>	Glutamato sintasa
<b>IN</b>	Infecciones nosocomiales
<b>INPer</b>	Instituto Nacional de Perinatología
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)

## 1. Resumen

*Staphylococcus epidermidis* es un coco Gram positivo, coagulasa negativo. Comúnmente es una bacteria comensal que coloniza la piel y las membranas mucosas, debido a esto, es más frecuentemente encontrado como contaminante en los cultivos de muestras clínicas en el laboratorio. El principal factor de virulencia asociado a esta bacteria es su capacidad para formar biopelículas (biofilm) y con esto colonizar biomateriales.

Las cepas de *S. epidermidis* que son aisladas de infecciones nosocomiales (IN) representan un grave problema en hospitales a nivel mundial. Varios estados de la República Mexicana han publicado informes en los que demuestran que las cepas aisladas de pacientes con IN en diversos hospitales presentan resistencia a los antibióticos, como por ejemplo a la Meticilina. Actualmente, el problema es más complejo con el surgimiento de cepas de *S. epidermidis* que presentan poliresistencia a los antibióticos de uso común en la clínica y ha promovido el desarrollo de técnicas de laboratorio más precisas para la detección de esta bacteria, y promover el alivio del paciente.

Como parte de este trabajo se realizó una revisión bibliográfica de artículos científicos relacionados con la identificación molecular de *S. epidermidis*, seleccionándose como candidatos a 3 genes reportados como especie-específico: *serp0107*, *ureD* y *sodA*. Posteriormente se hizo un análisis bio-informático de dichos genes y se eligió el primero, debido a que el autor reporta que las 22 muestras de *S. epidermidis* con las que trabajo presentaron el gen mencionado, en contraste con los otros dos. *serp0107* es un gen que puede ser un marcador especie-específico en *S. epidermidis* en el trabajo rutinario de laboratorio. Los oligonucleótidos de este trabajo fueron rediseñados en el laboratorio a partir de los propuestos por el autor D. Liu (2006) y ajustados a un tamaño de amplificado de 341 pb, con la finalidad de realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dúplex (*serp0107-mecA*), como propósito fundamental.

En el laboratorio se estandarizó la PCR con los oligonucleótidos rediseñados, amplificando en gradiente desnaturalizante (gradiente de temperatura), y una vez seleccionada la temperatura de apareamiento óptima (56.2 °C), se validó con 100 cepas control, previamente caracterizadas fenotípicamente en el laboratorio mediante 6 pruebas



bioquímicas. Una vez validada y estandarizada la PCR se procedió a trabajar con 104 cepas clínicas de *S. epidermidis* obtenidas de pacientes hospitalizados en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer). Finalmente se estandarizó la PCR dúplex con los oligonucleótidos para identificación específica (*serp0107*) y los oligonucleótidos para identificar la resistencia a Meticilina (*mecA*).

Posteriormente con los resultados de la PCR y de las pruebas bioquímicas, realizamos un análisis de sensibilidad y especificidad, obteniendo 97% y 95% respectivamente, es decir muy útil para identificar a *S. epidermidis*. De las 104 cepas clínicas se obtuvo que el 95.1% de estas presentaron el gen *serp0107*, tanto en la PCR en formato dúplex como amplificando cada gen por separado.

Se concluye que los oligonucleótidos rediseñados para la identificación específica de *S. epidermidis* son útiles de acuerdo con los porcentajes de sensibilidad y especificidad obtenidos, por lo que pudieran ser de utilidad en la PCR dúplex para la identificación de esta bacteria en el control de IN en el diagnóstico hospitalario.

## 2. Introducción

### 2.1 *Staphylococcus*

En 1880 el cirujano escocés Sir Alexander Ogston demostró que cocos agrupados en forma de racimo eran la causa de ciertos abscesos piógenos en humanos. En 1882, llamó a estos cocos “*Staphylococcus*”, derivando el nombre de los términos griegos *staphile* (racimo de uvas) y *kokkus* (frutilla) [1].

Las especies que se encuentran dentro del género *Staphylococcus* presentan células esféricas, con un diámetro de 0.5-1.5  $\mu\text{m}$ , se pueden presentar aisladas, en pares, en tétradas o en grupos irregulares, especialmente cuando se cultivan en medio de cultivo líquido (caldo); son Gram-positivas, no móviles, no producen esporas, generalmente catalasa positivo y son anaerobios facultativos. Sus colonias son usualmente opacas y pueden ser de color blanco o crema, y a veces de color amarillo a naranja. Su temperatura óptima de crecimiento varía en un rango de 30 a 37°C [2].

Tradicionalmente el género *Staphylococcus* se ha incluido en la familia *Micrococaceae*, junto con los géneros *Micrococcus*, *Stomatococcus* y *Planococcus*, sin embargo, estudios recientes de homología genética han demostrado que los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* están poco relacionados por lo que, tentativamente, el género *Staphylococcus* se ha incluido junto con los géneros *Gemella*, *Macrococcus* y *Salinicoccus* en la familia *Staphylococaceae*, dentro del orden *Bacillales*, debido a que con estos comparte mayor similitud genética. Actualmente, el género *Staphylococcus* incluye 42 especies diferentes [3].

### 2.2 *Staphylococcus epidermidis*

*S. epidermidis* es un coco Gram-positivo coagulasa negativo y sus colonias presentan un diámetro menor a los 5 mm. Debido a que es una bacteria comensal que coloniza la piel y las membranas mucosas, es frecuentemente encontrada como contaminante en los cultivos. Aproximadamente del 1 al 6% de los hemocultivos son contaminados con estafilococos coagulasa negativos y usualmente *S. epidermidis*, es responsable en un 70 a 80% de los casos [4].

En contraste con *Staphylococcus aureus*, una especie más virulenta y con capacidad de sintetizar una serie de toxinas y otros factores de virulencia, el principal factor de virulencia asociado con *S. epidermidis* es su capacidad para formar biopelículas (biofilm) y colonizar biomateriales [4].

Las infecciones con *S. epidermidis* son a menudo crónicas con pocos síntomas característicos, por lo que se requiere de una identificación específica para diferenciar a *S. epidermidis* de otros estafilococos y así hacer un diagnóstico correcto de la infección. Las técnicas moleculares, como la PCR, pueden ser de gran utilidad.

Algunos *S. epidermidis* aislados de pacientes infectados, se han vuelto cada vez más resistentes a varios antibióticos de uso común en la terapéutica, incluyendo la Meticilina, lo que hace necesario el desarrollo de mejores técnicas de detección para esta bacteria y para su resistencia a antibióticos. Con este fin, se han realizado ensayos con la PCR para la detección rápida, sensible y precisa de genes de *S. epidermidis*. Además, el uso de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) ha permitido el seguimiento epidemiológico eficiente de *S. epidermidis* en clonas implicadas en infecciones humanas en diversas regiones geográficas [5].

El diagnóstico, la identificación y posterior análisis de *S. epidermidis* pueden proporcionar nuevos detalles sobre los mecanismos moleculares de sobrevivencia en su medio ambiente y su nicho de patogenicidad, así como contribuir al control más eficaz de brotes hospitalarios y establecer las estrategias de prevención contra las infecciones por *S. epidermidis* en hospitales [5].

Por ello, a partir de las bases de datos moleculares y genómicas podemos establecer un análisis bio-informático realizando alineamientos, comparación de secuencias de nucleótidos en diversos genes en bacterias y estudio sobre las secuencias de genomas como los ya descritos.

### **2.2.1 Importancia clínica**

Anteriormente *S. epidermidis* sólo era considerado un microorganismo comensal de la piel humana, actualmente es un importante patógeno oportunista y el responsable de infecciones

nosocomiales principalmente asociadas a implantes médicos [6]. Su patogenicidad se debe principalmente a la capacidad de formar biopelículas en dispositivos médicos permanentes, probablemente debido a que es un colonizador permanente de la piel humana y esto aumenta la probabilidad de contaminación del dispositivo durante la inserción quirúrgica. Aunque en raras ocasiones las infecciones por *S. epidermidis* se convierten en enfermedades que amenazan la vida, por su frecuencia y su dificultad de ser tratados, puede representar una carga relevante para el sistema de salud pública, al prolongar el tiempo de hospitalización.

A menudo, *S. epidermidis* se convierte en un agente infeccioso importante, tanto en los pacientes consumidores de drogas (por el uso inadecuado de agujas hipodérmicas), como en pacientes inmunodeprimidos (pacientes con SIDA, recién nacidos prematuros, etc.).

En comparación con *S. aureus*, *S. epidermidis* no produce toxinas y exoenzimas que dañen los tejidos. De hecho hay un número reducido de ellos y aún no se conoce claramente su papel como factores de virulencia. Generalmente su éxito como patógeno se debe a su capacidad para adherirse a superficies, permanecer y difundirse a otros órganos vía hematológica [6].

Cepas de *S. epidermidis* que son aisladas de IN representan un grave problema en todo el mundo. Varios estados de la República Mexicana han presentado informes en los que demuestran que muestras aisladas de pacientes con IN de diversos hospitales presentan resistencia a los antibióticos, como por ejemplo a la Meticilina. Así mismo, existen varios informes científicos que declaran que aproximadamente entre el 80 y el 90% de las cepas de *S. epidermidis* aisladas de pacientes con IN portan el gen *mecA*, es decir, son resistentes a Meticilina. La presencia de dicho gen parece ser más frecuente en las cepas productoras de biofilm [7].

### **2.2.2 Pruebas bioquímicas para su identificación**

Las pruebas bioquímicas son ensayos comunes de laboratorio clínico que ponen de manifiesto las características metabólicas de los microorganismos y son empleadas

principalmente para la identificación y clasificación de bacterias. En la Tabla 1 se muestran algunas pruebas bioquímicas que son utilizadas en la identificación de *S. epidermidis*.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para identificación de *S. epidermidis* [2].

Prueba bioquímica	Resultado
Fermentación de manitol	Negativo
Fermentación de sacarosa	Positivo
Fermentación de maltosa	Positivo
Producción de enzima fosfatasa	Positivo
Producción de enzima catalasa	Positivo
Producción de enzima ureasa	Positivo
Producción de enzima coagulasa	Negativo
Resistencia a novobiocina	Negativo
Citocromo-oxidasa C	Negativo

### 2.3 Marcador molecular

Un marcador molecular o marcador genético es un segmento de DNA con una ubicación física identificable (locus) en un cromosoma, el cuál puede ser un gen o alguna sección del DNA sin función conocida. Dichos marcadores son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y estudios de diversidad, además de que pueden ser utilizados para localizar y aislar genes de interés [8]. Estudios en microbiología clínica son algunos ejemplos de esta valiosa aplicación.

La mayoría de los marcadores moleculares, se clasifican en dos categorías de técnicas que se basan en:

- La hibridación: se emplean técnicas con sondas para la detección de los marcadores, y las más usuales son el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y número variable de repeticiones en tándem (VNTR).

- La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): en este caso se amplifica el ADN específico del marcador molecular seleccionado. Las técnicas basadas en la PCR difieren entre sí en la longitud y secuencia de los oligonucleótidos empleados, las condiciones de la PCR y en el método de separación y detección de los fragmentos [9].

### 2.3.1 Gen *mecA*

El gen *mecA* tiene un tamaño de 2,006 pb y su localización en el genoma de *S. epidermidis* ATCC 35984 (RP62A), una cepa de referencia, va del nucleótido 2576656 al 2578662. Este gen se encuentra en un elemento genético móvil largo llamado “Casette cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*)”, el cual está integrado en los extremos 3’ de origen de replicación (*orfX*) en el cromosoma de cepas de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* meticilino-resistentes (MRSA) [15]. Codifica para una proteína enlazadora de penicilina modificada, de baja afinidad a los antibióticos β-lactámicos (PBP 2a), que confiere a la bacteria resistencia a meticilina y en general a todos los antibióticos β-lactámicos.

El complejo *mec* contiene al gen *mecA* (gen estructural para la proteína enlazadora PBP2a); *mecI* (represor) y *mecRI* (inactivador de *mecI*), que actúan como elementos reguladores que controlan la transcripción de *mecA* (Fig. 1) [16].

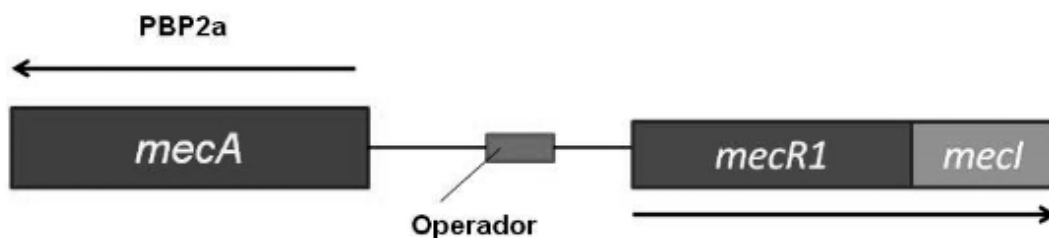


Fig. 1 Complejo *mec*, contiene el gen *mecA* (gen estructural para la PBP2a); *mecI* (represor) y *mecRI* (inactivador de *mecI*), que actúan como reguladores que controlan la transcripción del *mecA*.

### 2.3.2 Gen *serp0107*

El gen *serp0107* tiene un tamaño de 881 pb. Se encuentra localizado en el genoma de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (RP62A) del nucleótido 91276 al 92157. Es un gen regulador transcripcional de la familia GltC y se le ha propuesto como un marcador molecular para esta especie, por ser una secuencia única en el genoma de esta especie.

### 2.4 Antibióticos

En 1942, Selman Waksman propone el término antibiótico para definir a aquellas sustancias químicas producidas por microorganismos y que, a bajas concentraciones, inhiben el crecimiento o provocan la muerte de otros microorganismos, especialmente bacterias, mediante una interacción específica con alguno de sus componentes celulares [10].

En la actualidad este término también incluye a aquellas moléculas que no son de origen natural o que fueron modificadas químicamente, y se pueden clasificar de acuerdo a varios criterios, algunos de estos son:

- Clasificación de los antibióticos según su origen:
  - Naturales: son sustancias producidas por el metabolismo de organismos vivos, principalmente hongos y bacterias.
  - Sintéticos: moléculas que han sido sintetizadas químicamente en su totalidad.
  - Semisintéticos: a los compuestos sintetizados por microorganismos y posteriormente modificados parcialmente en el laboratorio, como es el caso de la Meticilina.
  
- Clasificación de los antibióticos según su estructura química [11]:
  - $\beta$ -lactámicos.
  - Tetraciclinas.
  - Quinolonas.
  - Aminoglucósidos.
  - Glucopéptidos.
  - Macrólidos.

### 2.4.1 Grupo $\beta$ -lactámicos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos componen un grupo numeroso de compuestos pertenecientes a diversas familias como las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, etc. La característica común entre ellos es la presencia del anillo  $\beta$ -lactámico (Fig. 2). Dicha característica les ayuda a inhibir la formación de la pared celular bacteriana [12]. Esta inhibición se produce en la última etapa de la síntesis del peptidoglucano y como consecuencia se forma una pared defectuosa incapaz de mantener el equilibrio osmótico, lo que ocasiona que pueda romperse [13, 14].

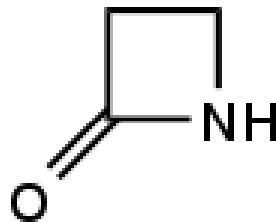


Fig. 2 Anillo  $\beta$ -lactámico, donde se observa el átomo de nitrógeno unido al carbono  $\beta$  característico de este grupo de antibióticos.

Resultado de este mecanismo de acción es que estos antibióticos actúan siempre en fase de reproducción celular, por lo tanto no son efectivos contra formas latentes ni contra gérmenes sin pared bacteriana [14].

### 2.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como la PCR por su acrónimo, es una técnica de biología molecular desarrollada por Kary Mullis en 1986. Ésta técnica permite la amplificación *in vitro* de una secuencia específica de ADN, obteniendo un gran número de copias (Fig. 3). Desde su implementación ha sido ampliamente utilizada por los investigadores que realizan estudios genéticos y moleculares, como en la microbiología médica.

La PCR se basa en el modelo biológico de la duplicación del ADN a nivel celular. Dicha técnica utiliza una polimerasa que es ser capaz de actuar a altas temperaturas, como la Taq polimerasa, proveniente de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, y la Vent polimerasa, de la bacteria *Thermococcus litoralis*.



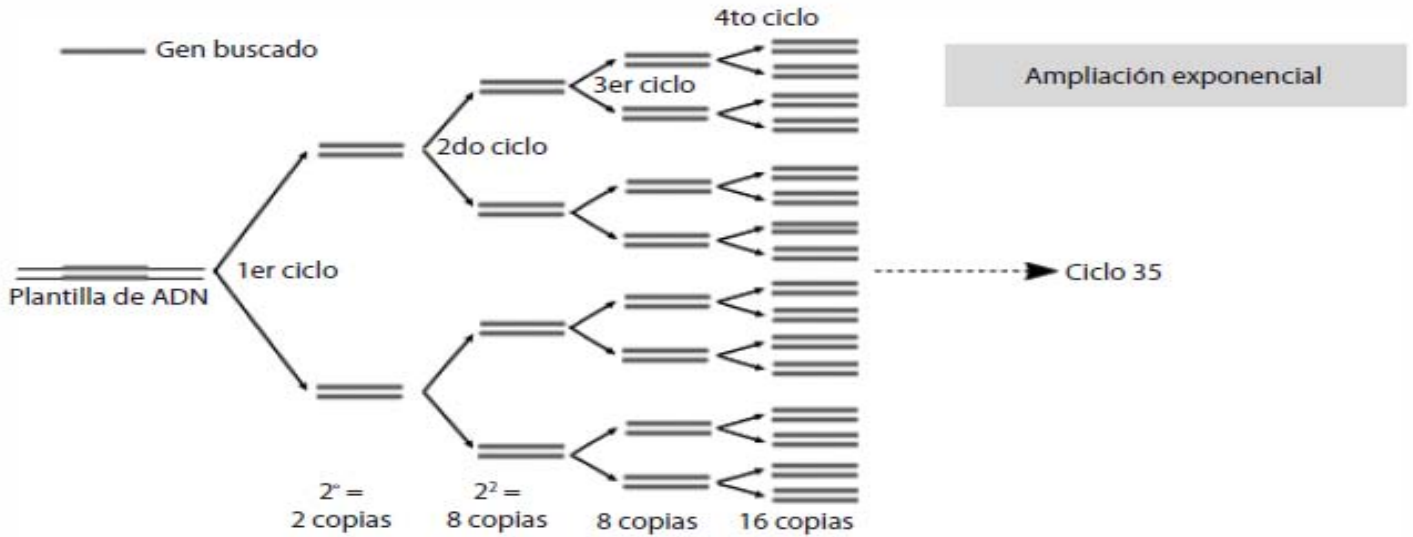


Fig. 3 La amplificación de los fragmentos en una reacción de la PCR es de manera exponencial [17].

Los elementos importantes para realizar la PCR son el ADN molde, los oligonucleótidos, los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTPs), el buffer con magnesio ( $MgCl_2$ ), la Taq polimerasa y el agua grado biología molecular. Todos estos componentes son agregados en un tubo de reacción, el cual es colocado en un termociclador [18, 19].

La reacción en el termociclador, generalmente, consta de 30 ciclos repetitivos conformados por tres etapas (Fig. 4):

- **Desnaturalización:** en este primer paso el ADN se incuba a temperaturas alrededor de  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  para romper los puentes de hidrógeno y separar la doble cadena, es decir prepara el ADN como molde de amplificación.
- **Apareamiento:** en este paso los oligonucleótidos se unen a las cadenas desnaturalizadas del ADN molde, a una temperatura que facilite el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias, esta temperatura generalmente oscila entre  $50$  y  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- **Extensión:** este paso se efectúa a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ , que es la temperatura a la cual la polimerasa extiende los oligonucleótidos, incorporando los diferentes nucleótidos libres de acuerdo a la secuencia de nucleótidos de la cadena molde.

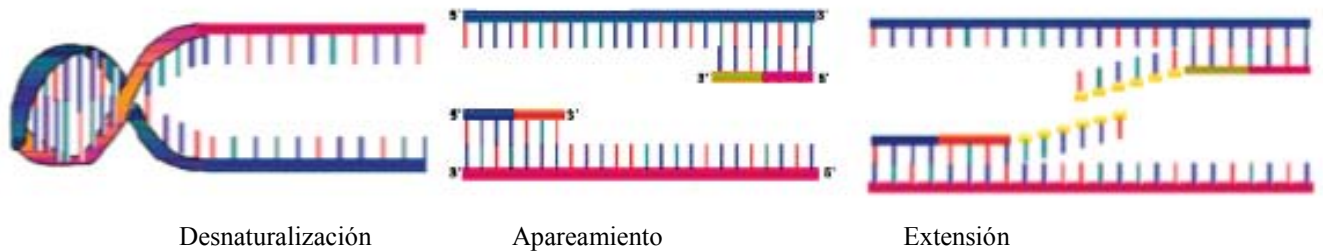


Fig. 4. Etapas de la PCR [18]

Es conveniente agregar una etapa de acondicionamiento a 94 °C, por al menos 4 minutos previa a la etapa de desnaturalización, esto con la finalidad de debilitar los enlaces de posibles estructuras secundarias.

También es aconsejable realizar como último paso una extensión adicional a 72 °C, el tiempo dependerá del tamaño del amplificado, por lo general se recomienda de 5 a 10 minutos después de concluidos los ciclos de amplificación; esto con la finalidad de asegurarse que todos los productos de amplificación estén completamente terminados y así garantizar que tengan la misma longitud [18].

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivos generales

- Rediseñar los oligonucleótidos (*serp0107*) publicados en 2006 para la identificación específica de *Staphylococcus epidermidis*, y emplearlos como una opción de diagnóstico de IN.
- Determinar la presencia del gen *mecA* en cepas clínicas de *S. epidermidis*.

#### 3.2 Objetivos particulares

- Evaluar los oligonucleótidos rediseñados mediante la PCR con cepas control previamente caracterizadas fenotípicamente en el laboratorio.
- Estandarizar una PCR dúplex para la identificación específica de *S. epidermidis* (*serp0107*) y la resistencia a Meticilina (*mecA*).

### 4. Hipótesis

- Si el amplificado obtenido a partir de los oligonucleótidos rediseñados (*serp0107*) se presenta en el genoma de especies de *S. epidermidis*, entonces el amplificado obtenido será específico y útil para diferenciar esta especie de otras.
- Si las cepas clínicas de *S. epidermidis* presentan el gen *mecA* entonces serán resistentes a Meticilina.

## 5. Método

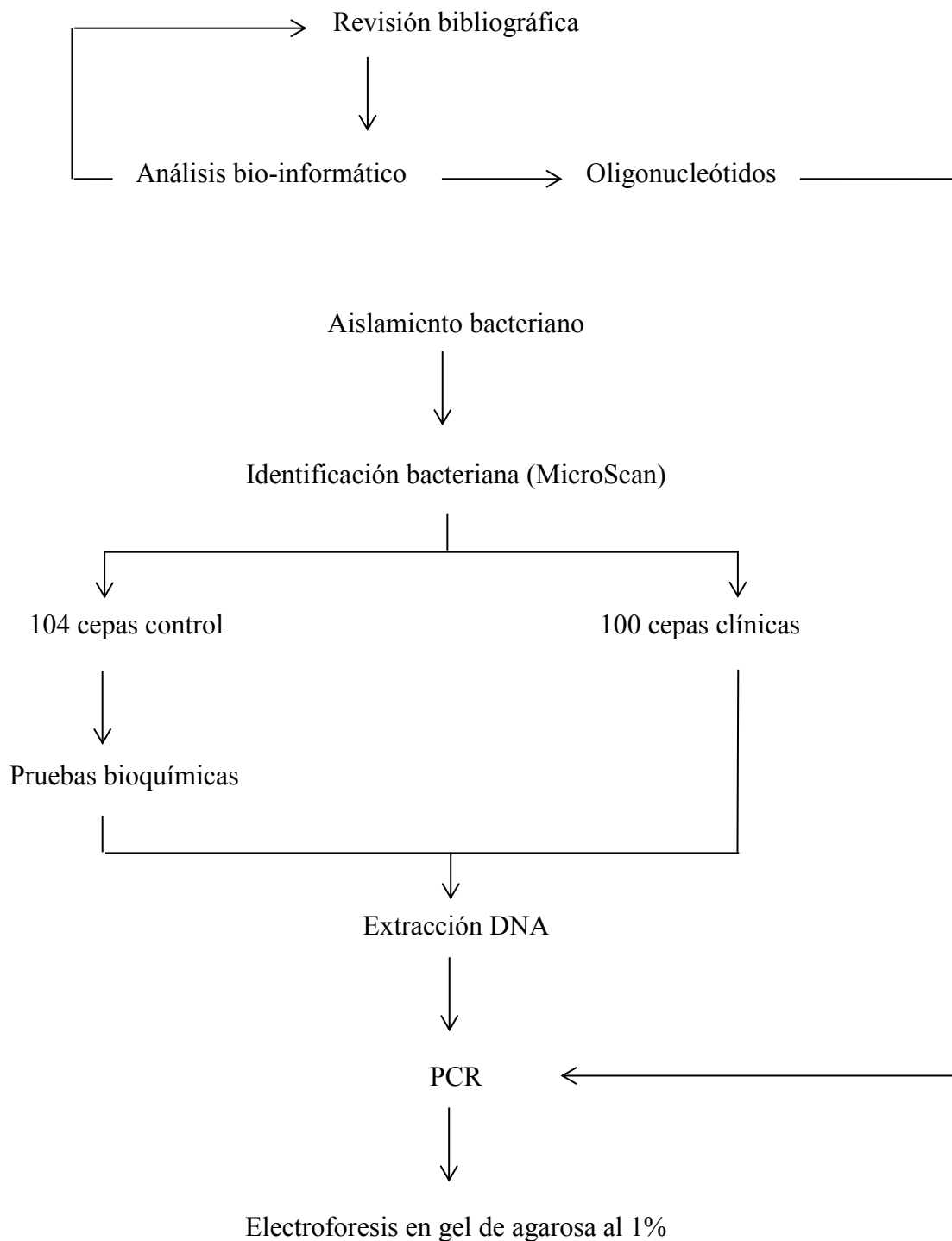


Fig. 5 Diagrama de flujo de las etapas realizadas en esta investigación.

## **5.1 Revisión bibliográfica**

Se realizó una revisión bibliográfica para localizar y recuperar información relacionada con un gen especie-específico en *Staphylococcus epidermidis* en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information). Con los documentos bibliográficos obtenidos, se realizó una discusión para seleccionar los documentos que consideramos más adecuados en la búsqueda de este gen específico.

### **5.1.1 Análisis bio-informático**

Se realizó un análisis bio-informático en el que se analizó la secuencia de oligonucleótidos ajustados utilizando el programa JustBio (<http://www.justbio.com/>), dicho análisis consistió en el alineamiento y comparación de los iniciadores con el producto de amplificación. Se analizó la posible formación de horquillas y dímeros que pudieran interferir con la formación del producto de amplificación entre los oligonucleótidos en la página OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>). Finalmente, utilizando el programa BLAST, por sus siglas en inglés Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se compara la secuencia ingresada contra una cantidad de secuencias de genomas bacterianos que se encuentren en la base de datos y se verificó que los oligonucleótidos solo se presentaran en *Staphylococcus epidermidis*, obteniendo así la especificidad al amplificado para el gen seleccionado (*serp0107*) [Anexo 1].

## **5.2 Identificación bacteriana**

Las muestras clínicas fueron proporcionadas por el INPer, el cual previamente determinó la especie y la concentración mínima inhibitoria (MIC) a diferentes antimicrobianos de uso clínico mediante un equipo automatizado MicroScan (MS) y envió las hojas con los resultados del antibiograma para cada muestra biológica. Posteriormente, las muestras se trasladan al Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, localizado en el 3er piso de la Torre de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM, donde son subcultivadas en gelosa BHI y en gelosa Sal y Manitol.

### 5.2.1 Pruebas bioquímicas

Para este trabajo se realizaron 6 pruebas bioquímicas (Tabla 2), con la finalidad de poder identificar y diferenciar *S. epidermidis* de otros *Staphylococcus* que también se encuentran con frecuencia en las muestras clínicas hospitalarias.

Tabla 2. Pruebas bioquímicas utilizadas para la diferenciación de las cepas de *S. epidermidis* estudiadas [2].

	Manitol	Novobiocina	Ureasa	Coagulasa	Fosfatasa Alcalina	Catalasa
<i>S. epidermidis</i>	-	Sensible	+	-	+	+
<i>S. aureus</i>	+	Sensible	d	+	+	+
<i>S. saprophyticus</i>	d	Resistente	+	-	-	+
<i>S. haemolyticus</i>	d	Sensible	-	-	-	+
<i>S. lugdunensis</i>	-	Sensible	-	-	-	+
<i>S. chleiferi</i>	-	Sensible	-	-	+	+
<i>S. hominis</i>	-	Sensible	+	-	-	+
<i>S. warneri</i>	d	Sensible	+	-	-	+
<i>S. cohnii</i>	d	Resistente	-	-	-	+
<i>S. xylosus</i>	d	Resistente	+	-	d	+
<i>S. capitis</i>	+	Sensible	-	-	-	+
<i>S. auricularis</i>	-	Sensible	-	-	-	+
<i>S. intermedius</i>	d	Sensible	+	-	+	+

d: 11 a 89% de cepas positivas.

#### 5.2.1.1 Fermentación del manitol

##### *Procedimiento:*

Se preparó el ASM de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se vació en placas de Petri estériles de 100 por 15mm con tres divisiones, se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente y posteriormente se colocaron en una estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas, esto como una prueba de esterilidad para verificar que no hubiera crecimiento microbiano.

Con el asa bacteriológica se depositó y distribuyó sobre la superficie del agar todas las muestras por analizar, una en cada división. Se colocó en una estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Finalmente se realizó la lectura de los resultados. Para un resultado positivo

se observó un cambio de color en el medio, pasando de un color rojo a un color amarillo; para un resultado negativo el medio mantuvo el color rojo inicial.

*Controles microbiológicos utilizados:*

Positivo: *Staphylococcus aureus* (Mu50) ATCC 700699

Negativo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

### **5.2.1.2 Detección de la producción de la enzima catalasa**

*Procedimiento:*

*Prueba en portaobjeto*

Con un asa bacteriológica se tomó una colonia de un cultivo en gelosa BHI de 24 horas de desarrollo y se colocó sobre un portaobjetos de vidrio limpio. Posteriormente se agregó una gota de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3.34% sobre la muestra colocada en el portaobjetos. Este procedimiento se aplicó en todas las muestras por analizar. Un resultado positivo se observó por la formación de burbujas debido a la liberación del oxígeno; en un resultado negativo no se observó producción de burbujas.

*Controles microbiológicos utilizados:*

Positivo: *Staphylococcus aureus* (Mu50) ATCC 700699

Negativo: Muestras clínicas *Enterococcus faecalis* (HGC207, HGC210)

### **5.2.1.3 Detección de la producción de la enzima coagulasa**

*Procedimiento:*

*Prueba en tubo*

Para la realización de esta prueba se utilizó plasma de conejo marca Remel.

Se colocó 0.5 mL de plasma de conejo en varios tubos de ensayo y posteriormente con un asa bacteriológica estéril se inocularon las muestras de estafilococos, agregando varias colonias de un cultivo en gelosa BHI de 24 horas. Se incubaron en baño de agua a 37 °C y se realizó una primera observación de formación de coágulo a las 4 horas; en caso de no observar esta formación se dejaron los tubos en baño agua por 24 horas. Las muestras coagulasa positiva formaron un coágulo en el fondo del tubo, mientras que en las muestras coagulasa negativa no se observó formación.

*Controles microbiológicos utilizados:*

Positivo: *Staphylococcus aureus* (Mu50) ATCC 700699

Negativo: *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) ATCC 35984

#### **5.2.1.4 Detección de la producción de la enzima ureasa**

*Procedimiento:*

Se preparó el caldo urea de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se vaciaron 3 mL en varios tubos de ensayo estériles. Se inocularon con un asa bacteriológica tomando varias colonias de un cultivo en BHI de 24 horas con las muestras para analizar y se agitó el tubo para suspender las bacterias. Se incubaron en una estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. En el resultado positivo se observó cambio en el color del indicador de pH, de amarillo a rojo debido a la presencia de amoníaco, poniendo de manifiesto la actividad de la ureasa. Para el resultado negativo no se observó cambio de color del indicador de pH en el caldo.

*Controles microbiológicos utilizados:*

Positivo: *Proteus mirabilis* ATCC 43071

Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922

#### **5.2.1.5 Detección de la producción de la enzima fosfatasa**

*Procedimiento:*

Previo al desarrollo de los ensayos, se prepararon las siguientes soluciones:

Sustrato de fenolftaleína al 0.5%

Sal tetrasódica de difosfato de fenolftaleína	0.5 g
Agua destilada	100 mL

Hidróxido de sodio (NaOH) al 40%

NaOH	40 g
Agua destilada	100 mL

Se preparó un caldo nutritivo de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se colocaron 3 mL en varios tubos de ensayo estériles. Antes de iniciar la prueba se agregaron 50µL de la solución al 0.5% de sal tetrasódica de difosfato de fenolftaleína en cada tubo de ensayo y se



mezclaron. Posteriormente, se inoculó con un asa bacteriológica, tomando varias colonias de un cultivo de las cepas por analizar en BHI de 24 horas. Se incubaron en una estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Después de la incubación se agregó una gota de NaOH para poder realizar la interpretación. Un resultado positivo presentó un cambio en la coloración del medio de cultivo de amarillo a rosa; los resultados negativos no presentaron cambio de color en el medio de cultivo.

*Controles microbiológicos utilizados:*

Positivo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Negativo: *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305

#### **5.2.1.6 Resistencia a novobiocina**

*Procedimiento:*

Se preparó agar Muller-Hinton (MH) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, el MH fundido y mantenido a 55 °C se vació en cajas Petri estériles de 100 por 15 mm con tres divisiones, se dejaron solidificar a temperatura ambiente y después se colocaron en una estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 horas.

Se distribuyeron 3 mL de solución salina al 0.85% en varios tubos de ensayo. Posteriormente, se preparó una suspensión bacteriana. La turbidez de la suspensión se ajustó a 0.5 unidades de McFarland, utilizando un densitómetro. Y se sembró con un hisopo de algodón estéril en las placas con agar MH, se colocó cada muestra por analizar en cada división de la caja. Finalmente se colocó en el centro de cada división un disco de novobiocina de 5µg. Se incubaron en una estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Al momento de anotar los resultados, se consideró resistente a novobiocina a aquellas cepas bacterianas que presentaron un halo  $\leq 16$  mm y sensible a novobiocina a las muestras que tuvieron un halo  $> 16$  mm.

*Controles microbiológicos utilizados:*

Positivo: *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305

Negativo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

## **5.3 Detección molecular**

### **5.3.1 Extracción de ADN**

El ADN es un polímero de nucleótidos, y cada nucleótido está formado por un azúcar de cinco carbonos (desoxirribosa), una base nitrogenada (adenina, timina, citosina o guanina) y una molécula de fosfato. La principal función de este polímero es almacenar la información genética [17].

El método de extracción del ADN utilizado en el laboratorio, consistió en colocar de 10 a 20 colonias bacterianas provenientes de un cultivo no mayor a 24 horas de crecimiento en un tubo Eppendorf con 250µl de solución buffer de lisis compuesta por Tris-HCl, EDTA 0.5M, lisozima (1mg/ml) y lisostafina (1mg/ml), y se incubó en un bloque metálico (Termo-block) a 37 °C durante 90 minutos. Posteriormente el tubo se colocó en un vaso con agua a 95 °C por 10 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y después se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos.

En el gabinete de bioseguridad (clase II A2) se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo Eppendorf de 1000µl. Se le agregaron 300µl de isopropanol (-20 °C), se agitó el tubo y se mantuvo a -20 °C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, el tubo con isopropanol se centrifugó a 10 000 rpm por 30 minutos, se retiró el isopropanol por decantación, y al sedimento se le adicionaron 100µl de alcohol etílico al 70%. Se mantuvo en baño de hielo a 4 °C durante 15 minutos y después el alcohol fue retirado mediante decantación. El ADN extraído se dejó secar durante 1 hora a temperatura ambiente dentro del gabinete de bioseguridad (clase II A2), posteriormente se agregaron 50 a 100µl de buffer TE 1X y se homogeneizó. Finalmente, se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Para evaluar la cantidad y calidad de DNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, de las muestras extraídas.

### **5.3.2 Condiciones de la PCR**

Se prepararon dos mezclas de reacción, la primera contenía los oligonucleótidos para amplificar el gen *serp0107* (Tabla 3.1) y la segunda contenía los oligonucleótidos previamente diseñados y validados por la Q.F.B Ada Nelly Galicia Camacho [20] en el

Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Facultad de Medicina para la amplificación del gen *mecA* (Tabla 3.2).

Tabla 3.1 Mezcla de reacción para amplificar el gen *serp0107*

<b>Gen <i>serp0107</i></b>	
Agua Grado Biología Molecular	3.25µl
Buffer de Mg <sup>2+</sup>	1µl
dNTP's	1.25µl
<i>serp0107 F</i>	1.2µl
<i>serp0107 R</i>	1.2µl
ADN	2µl
Taq. Polimerasa	0.1µl
<b>Volumen final</b>	<b>10µl</b>

Tabla 3.2 Mezcla de reacción para amplificar el gen *mecA*

<b>Gen <i>mecA</i></b>	
Agua Grado Biología Molecular	3.25µl
Buffer de Mg <sup>2+</sup>	1µl
dNTP's	1.25µl
<i>mecA F</i>	1.2µl
<i>mecA R</i>	1.2µl
ADN	2µl
Taq. Polimerasa	0.1µl
<b>Volumen final</b>	<b>10µl</b>

Se realizó el cálculo de las muestras de reacción dependiendo del número de muestras a evaluar y se prepararon dichas mezclas de reacción dentro del gabinete de bioseguridad (clase II A2), para evitar contaminación por partículas ambientales de los componentes. Utilizando puntas de micropipeta estériles, se colocaron los reactivos en un tubo Eppendor estéril de 600µl, se homogenizó y se distribuyeron 8µl de la mezcla de reacción (Tablas 3.1 y 3.2) en tubos para PCR de 200µl. Se tomó uno de los tubos como control negativo y a los demás se les agregó 2µl de ADN del control positivo y de las cepas a estudiar. Finalmente, los tubos se colocaron en un termociclador Bio Rad C-1000.

Las condiciones para la amplificación de los genes *serp0107* y *mecA* fueron realizados con las siguientes temperaturas y tiempos:

Fig. 6 Condiciones para la amplificación de los genes *serp0107* y *mecA*.

1	2	3	4	5	6	7
94°C	94°C			R E P E T I R	72°C	
4 min	30 s	56.2°C	72°C	2-4	10 min	4°C
		30 s	30 s	30 veces		

Al finalizar se realizó un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% para observar los productos de amplificación obtenidos.

### 5.3.3 Electroforesis

La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas a través de una matriz sólida que funciona como filtro o tamiz, generalmente formada por agarosa o por poliacrilamina. Esta separación de moléculas se lleva a cabo en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica, y se hace bajo un buffer que puede ser Tris acetato EDTA (TAE) o Tris borato EDTA (TBE) [19].

Para la visualización del ADN amplificado, generalmente se utiliza bromuro de etidio. Esta sustancia se intercala en las bases del ADN y brilla al aplicar luz UV, lo que facilita que podamos observar las bandas de ADN en el gel. El bromuro de etidio es un agente mutágeno y es altamente tóxico, por lo que es necesario que su manejo se efectúe siguiendo las precauciones recomendadas [17].

Cuando los productos de la PCR son separados a través del gel, es necesario cargar junto con éstos un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN de peso molecular conocido, para facilitar la identificación de los productos y saber si su tamaño corresponde con el esperado (Fig. 7) [19].

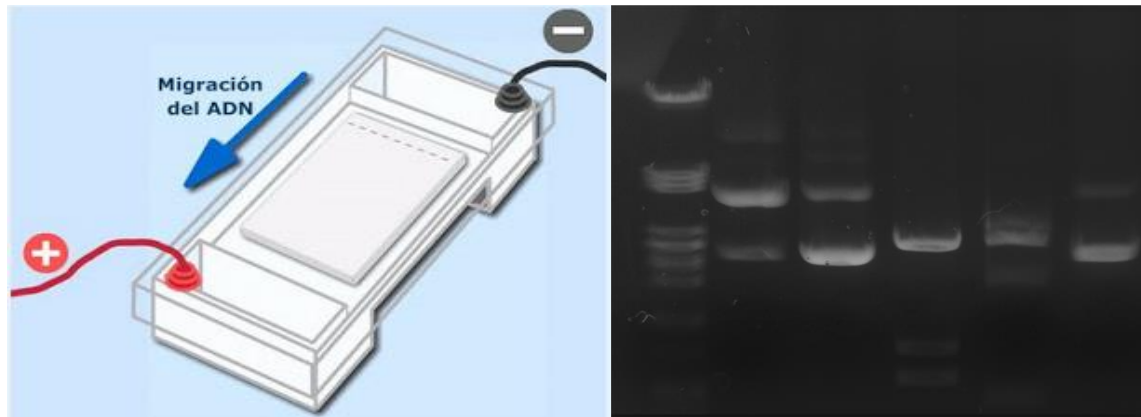


Fig. 7 Electroforesis en gel de agarosa. En el panel de la izquierda se muestra la cámara de electroforesis horizontal empleada para corrimientos de ácidos nucleicos y a la derecha un patrón de bandeado electroforético característico de ADN [21].

### *Procedimiento*

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

Se pesaron 0.45gr de agarosa ultrapura en una balanza analítica. Se procedió a la preparación en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se le agregaron 45 ml de buffer TAE 1X; el matraz se tapó con un vaso de precipitados para evitar la evaporación del buffer, se calentó suavemente la agarosa en un mechero Fisher hasta su disolución total. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y después con una micropipeta se adicionaron 2 $\mu$ l de bromuro de etidio y se mezcló suavemente.

Se armó la cámara de electroforesis, colocando correctamente el peine y se vació la agarosa preparada despacio para evitar la formación de burbujas. Cuando solidificó se retiró el peine y se agregó buffer TAE 1X a la cámara hasta la marca señalada en el extremo lateral de esta, cubriendo completamente el gel que se usará para el corrimiento de las muestras.

#### *- Carga de las muestras*

Se colocó un pedazo de parafilm en la mesa de laboratorio y se le agregó, para el caso de la solución del marcador molecular 5 $\mu$ l de agua grado biología molecular, 5 $\mu$ l de buffer de carga y 3 $\mu$ l de marcador molecular. Para las muestras de la PCR a analizar se agregó 4 $\mu$ l de agua grado biología molecular, 4 $\mu$ l de buffer de carga y 5 $\mu$ l del amplificado. Después con la ayuda de una micropipeta tomamos las gotas de esta preparación y las colocamos dentro

del pozo correspondiente en el gel, lentamente para evitar que se rompa el gel. Al terminar este paso se cerró la cámara y se conectó a la fuente de poder durante 40 minutos a 95 volts.

*- Revelado del gel*

Una vez transcurridos los 40 minutos se apagó la cámara de electroforesis, se abrió y con cuidado se sacó el gel, escurriendo el buffer TAE 1X sobrante. El gel se colocó en el transiluminador de UV para observar las bandas de interés. Para el gen *serp0107* el tamaño de amplificado esperado es de 341pb y para el gen *mecA* de 458pb.

Las imágenes de los geles fueron tomadas con una cámara Fuji Finepix S8600 16mp y la edición de las mismas se realizó con el software Microsoft Word 2010.

#### **5.4 Análisis de datos**

Con los datos obtenidos en las pruebas bioquímicas y en la PCR se realizaron cálculos de sensibilidad y especificidad, considerando a las primeras como estándar de referencia. Los cálculos se realizaron, utilizando las siguientes formulas:

$$\text{Sensibilidad (S)} = \frac{\text{Verdaderos positivos (VP)}}{\text{VP} + \text{Falsos negativos (FN)}}$$

$$\text{Especificidad (E)} = \frac{\text{Verdaderos negativos (VN)}}{\text{VN} + \text{Falsos positivos (FP)}}$$

## 6. Resultados

Para la estandarización de la PCR, inicialmente se amplificaron los oligonucleótidos rediseñados en gradiente desnaturalizante (gradiente de temperatura) con la cepa ATCC 35984 (RP62A) y la temperatura de apareamiento seleccionada fue de 56.2 °C (ver pág. 22), debido a que en dicha temperatura se mostraba una buena definición de la banda (Fig. 8a). Además se realizó una PCR con ADN por separado, tanto de *S. epidermidis* (RP62A) como de *S. aureus* (Mu50), obteniendo un amplificado de 341 pb únicamente en *S. epidermidis* (Fig. 8b). Esto último con la finalidad de verificar la especificidad del rediseño de los oligonucleótidos empleados.

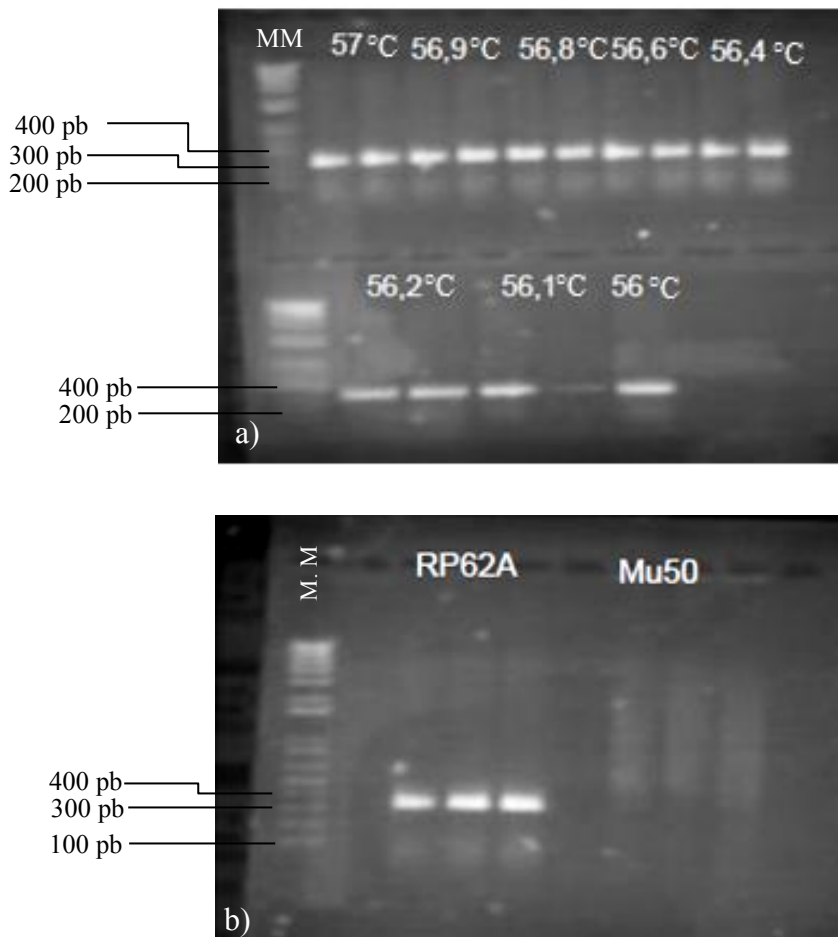


Fig. 8. a) Amplificación del gen *serp0107* en *S. epidermidis* (RP62A) en gradiente desnaturalizante (muestras por duplicado); b) Amplificación del gen *serp0107* en *S. epidermidis* (RP62A) y en *S. aureus* (Mu50) a una temperatura de apareamiento de 56.2 °C.

Posteriormente, los oligonucleótidos rediseñados en el laboratorio se validaron con 100 cepas de *Staphylococcus* seleccionadas como control y previamente caracterizadas fenotípicamente, mediante las pruebas bioquímicas de fermentación de manitol, producción de la enzima catalasa, coagulasa, ureasa, fosfatasa y la resistencia a novobiocina (Fig. 9). De dicha caracterización fenotípica se obtuvieron 36 cepas de *S. aureus*, 36 *S. epidermidis* y las 28 restantes como otros *Staphylococcus* coagulasa negativos. Con los resultados de la PCR y de estas pruebas, realizamos un análisis de sensibilidad (S) y especificidad (E), obteniendo 97% para la primera y 95% para la segunda:

#### Análisis de sensibilidad y especificidad

PCR	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Otros <i>Staphylococcus</i>	Total
<i>serp0107</i> (+)	35 (VP)	3 (FP)	38
<i>serp0107</i> (-)	1 (FN)	61 (VN)	62
Total	36	64	100

Fórmulas matemáticas para el cálculo de sensibilidad (S) y especificidad (E):

$$S = \frac{VP}{VP+FN} = \frac{35}{35+1} = 0.97 \quad E = \frac{VN}{VN+FP} = \frac{61}{61+3} = 0.95$$

En donde se interpretó como:

- Verdaderos positivos (VP): Número de cepas *S. epidermidis* que presentaron el gen *serp0107*.
- Falsos positivos (FP): Número de cepas diferentes a *S. epidermidis* que presentaron el gen *serp0107*.
- Falsos negativos (FN): Número de cepas *S. epidermidis* que no presentaron el gen *serp0107*.
- Verdaderos negativos (VN): Número de cepas diferentes a *S. epidermidis* que no presentaron el gen *serp0107*.



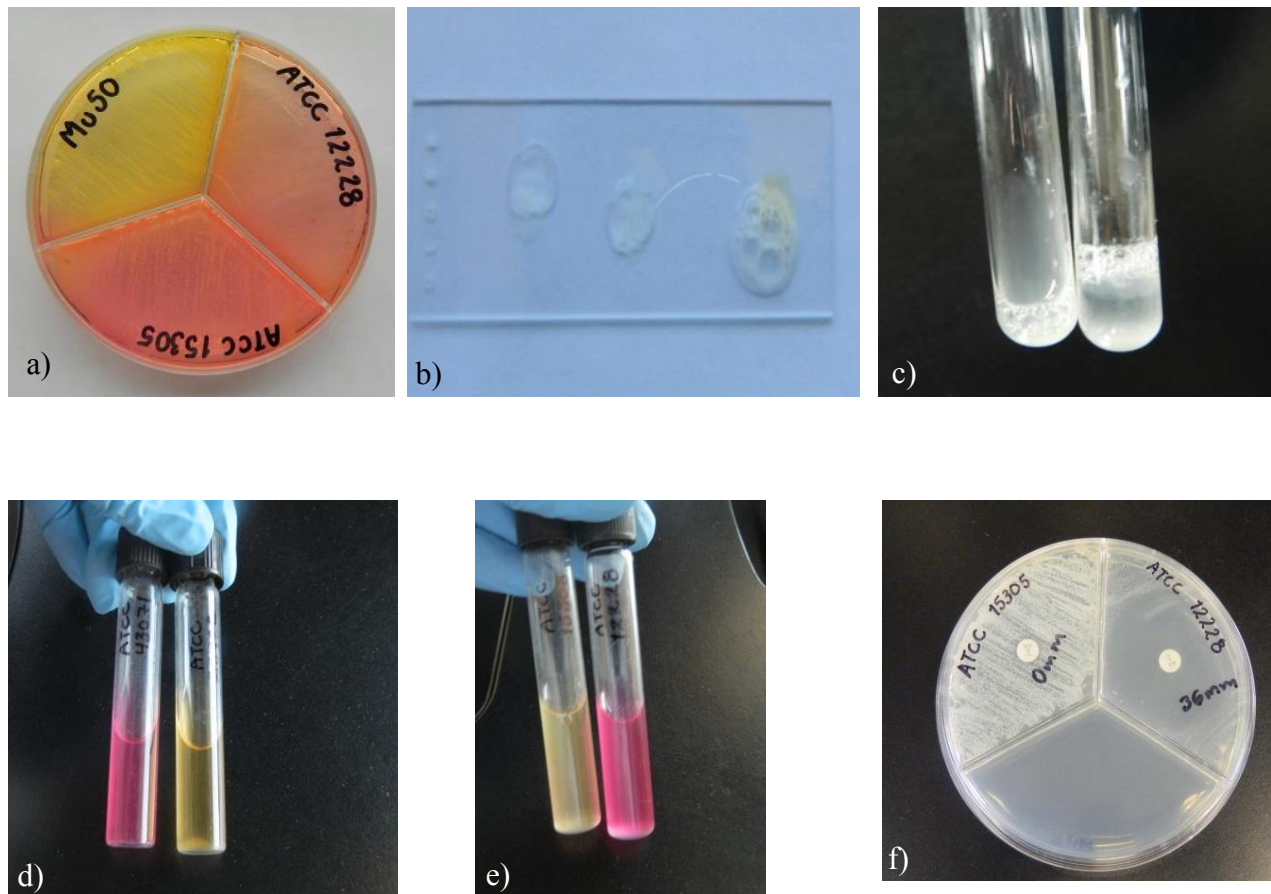


Fig. 9. Pruebas bioquímicas: a) fermentación de manitol, en el control positivo (Mu50) se observa cambio de color debido a la producción de ácido a causa de la fermentación del manitol por la bacteria, en contraste con el control negativo (ATCC 12228), b) detección de la producción de la enzima catalasa, se observa formación de burbujas en la tercera muestra (Mu50), a diferencia de las otras dos muestras *Enterococcus faecalis*, c) detección de la producción de la enzima coagulasa, en el tubo del lado derecho (Mu50) se observa la formación de un coágulo, a diferencia del tubo del lado izquierdo (RP62A), d) detección de la producción de la enzima ureasa, en el control positivo se observa cambio de color en el indicador de pH, de amarillo a rojo debido a la presencia de amoníaco, e) detección de la producción de la enzima fosfatasa, en el resultado positivo se presentó cambio en la coloración del medio de cultivo de amarillo a rosa y, f) resistencia a novobiocina, se observa crecimiento bacteriano en el control positivo (ATCC 15305), lo que nos indica resistencia al antibiótico, en contraste con el control negativo (ATCC 12228).

Una vez estandarizada y validada la PCR, se procedió a trabajar con 104 cepas clínicas de *S. epidermidis*, caracterizadas y obtenidas de pacientes con IN hospitalizados en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer).

En una estandarización inicial de la PCR dúplex con los oligonucleótidos rediseñados para identificación específica (*serp0107*) y los oligonucleótidos de resistencia a los antimicrobianos (*mecA*), no fue posible observar ambas bandas en el gel de agarosa, debido a que el tamaño de los amplificados de los genes era muy cercano entre sí y como consecuencia se sobreponían dichas bandas; por lo tanto a las 104 cepas clínicas de *S. epidermidis* se les realizó la PCR, tanto para el gen *serp0107* como para el gen *mecA* por separado (Fig. 10). De estas 104 cepas clínicas, obtuvimos que el 95.1% presentaron el gen *serp0107* y el 91.3% de ellas el gen *mecA*.

Para solucionar el problema de sobreposición de bandas antes mencionado, se aumentó el tamaño de amplificado del gen *serp0107* de 341pb a 644pb mediante un nuevo diseño con métodos bio-informáticos (Anexo 1). Una vez realizado dicho cambio, se amplificaron estos nuevos oligonucleótidos en gradiente desnaturalizante con la cepa ATCC 35984 (RP62A) y así fue posible observar ambas bandas (Fig. 11a). Posteriormente se realizó la PCR dúplex a las 104 cepas clínicas antes mencionadas, para confirmar los resultados obtenidos en la PCR por separado. En la Fig. 11b, se muestran algunas de ellas.

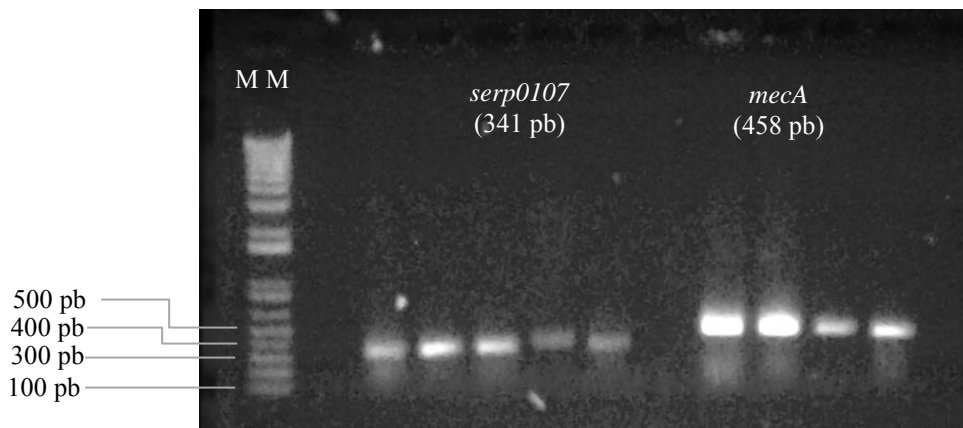


Fig. 10. Productos de amplificación para los genes *serp0107* y *mecA* en cepas clínicas de *S. epidermidis*.

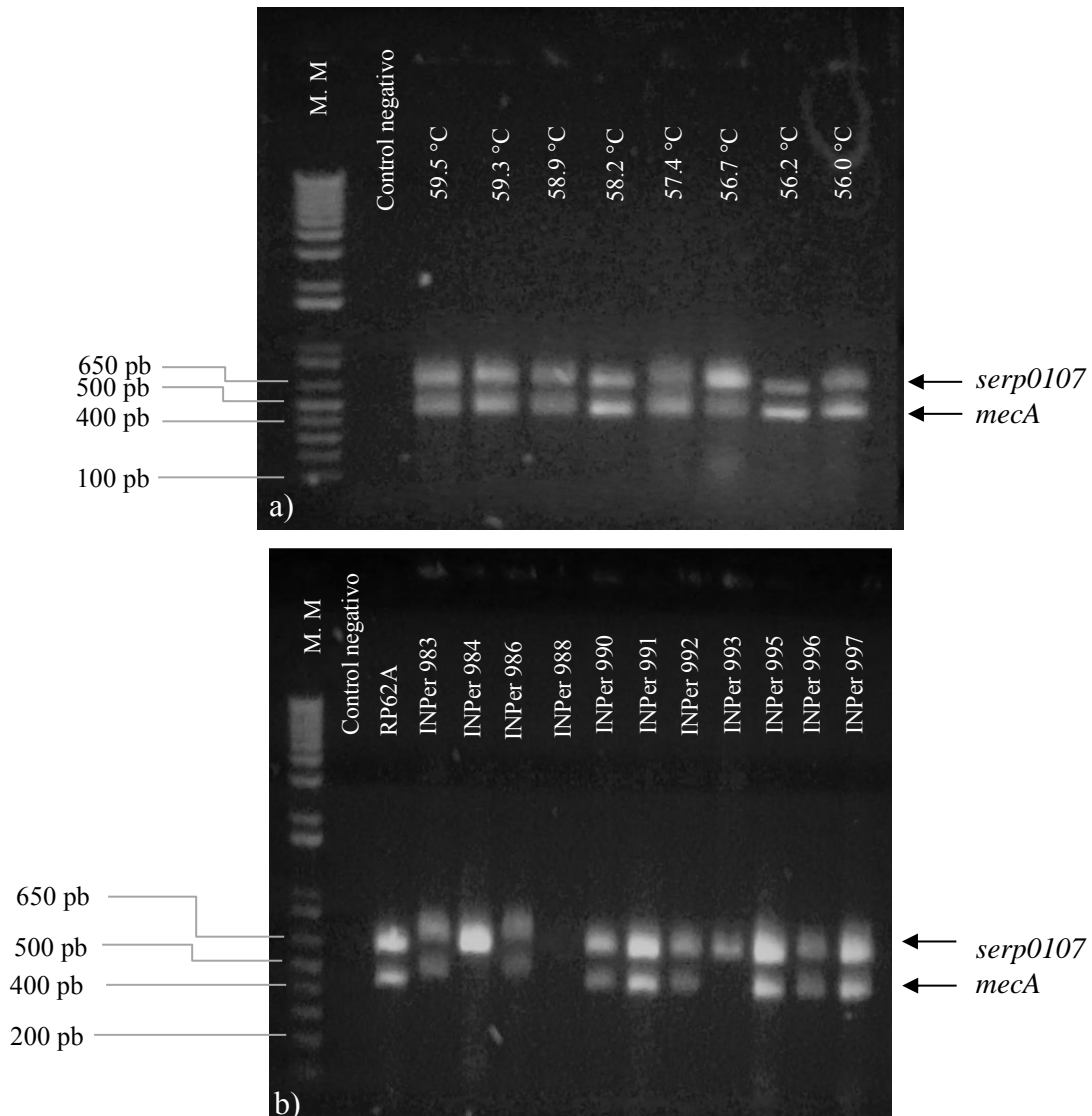


Fig. 11. PCR dúplex para amplificación de genes *serp0107* (644pb) y *mecA* (458pb): a) en gradiente desnaturalizante en *S. epidermidis* (RP62A), b) en cepas clínicas de *S. epidermidis*.

Con ésta PCR dúplex, obtuvimos que de las 104 cepas clínicas de *S. epidermidis* 95.1% presentaron el gen *serp0107* y 91.3% el gen *mecA*. Los mismos resultados fueron obtenidos amplificando cada gen por separado.

## 7. Discusión

Se emplearon las cepas de *S. epidermidis* aisladas de pacientes con IN, debido a que esta bacteria representa un grave problema de Salud Pública en los hospitales de todo el mundo, incluso en varios estados de la República Mexicana se reportan, tanto informes en los que se demuestra su resistencia a diversos antibióticos como informes científicos que reportan que aproximadamente entre el 80y el 90% de cepas de *S. epidermidis* portan el gen *mecA* [7]. A diferencia de *S. aureus*, las cepas de *S. epidermidis* no suelen causar infecciones que comprometan severamente a los pacientes, en general, su éxito como patógeno se atribuye a su capacidad de adherirse a superficies.

En medicina general, es común que llegue un paciente con síntomas de alguna infección bacteriana y debido a que hay bacterias que causan síntomas parecidos, es conveniente realizar pruebas de laboratorio para su identificación, además de que existe la posibilidad que sean resistentes a uno o varios antibióticos [22]. Por lo que la identificación de la bacteria a nivel de género y especie es muy importante, ya que en la clínica esto nos permite, de manera más precisa, determinar el tratamiento terapéutico que se deberá llevar a cabo, y enriquecer la información epidemiológica en este tema.

En los laboratorios de microbiología, se realizan de manera rutinaria técnicas fenotípicas que permiten identificar el agente responsable de la infección, sin embargo se observan algunas limitaciones para algunos microorganismos. Los métodos moleculares permiten prevenir estas limitaciones, ya que tienen la ventaja de ser específicos, sensibles y eficientes, así como de realizar la identificación en un corto período de tiempo [22]. Por lo cual la PCR puede ser una opción importante en el diagnóstico clínico.

En la revisión bibliográfica para la realización de esta tesis se encontraron 3 genes candidatos: *serp0107*, *ureD*, *soda*, reportados como especie-específicos a *S. epidermidis*, siendo la selección de uno de ellos nuestro objetivo principal. Se optó por el gen *serp0107* propuesto por el autor D. Liu, debido a que los 22 aislamientos de *S. epidermidis* con los que trabajo éste investigador, presentaron todos este gen y tanto los 23 *Staphylococcus* diferentes a *S. epidermidis* como los 67 aislamientos de bacterias comunes, no lo presentaron [5]; además de que en el análisis bio-informático que lleve a cabo correspondió

con el 100% de identidad para *S. epidermidis*. Mientras que en el gen *ureD*, al hacer el análisis bio-informático dio 100% de identidad para *S. epidermidis*, pero el reporte del autor menciona que los resultados de la PCR fueron un 93.4% idénticos a los obtenidos por métodos convencionales [23]. En el caso del gen *sodA*, al hacer el análisis bio-informático presentó el 100% de identidad para *S. epidermidis*, pero además presentó porcentajes por arriba del 80% de identidad con otras especies de *Staphylococcus*. Por lo tanto, al no tener buena especificidad, descartamos los genes *ureD* y *sodA*.

Una vez caracterizadas fenotípicamente estas 100 cepas, fueron utilizadas para la validación de la PCR con los oligonucleótidos rediseñados (*serp0107*), en donde sólo una cepa identificada como *S. epidermidis* dió *serp0107* negativo y 3 cepas identificadas como *S. aureus*, *S. hominis* y *S. warneri* dieron *serp0107* positivo, por lo que es deseable revisar nuevamente la caracterización fenotípica de estas cepas y repetir la PCR en un futuro. Con ambos resultados (fenotípicos y moleculares) se realizó un análisis de sensibilidad y especificidad, obteniendo 97% para la primera y 95% para la segunda.

La idea inicial era realizar una PCR dúplex (*serp0107-mecA*) en 104 cepas clínicas de *S. epidermidis* reportadas por el INPer, pero al iniciar los ensayos de estandarización no fue posible observar ambas bandas en el gel de electroforesis, debido a que los tamaños de amplificadores de los genes eran cercanos entre sí (341 y 458 pb respectivamente), por lo tanto a dichas cepas se les realizó la PCR para ambos genes por separado. Los resultados obtenidos para las 104 cepas antes señaladas son los siguientes: 95.1% de las cepas presentaron el gen *serp0107* y 91.3% de ellas presentaron el gen *mecA*.

Posteriormente, realicé un análisis bio-informático para alcanzar un incremento al tamaño del amplificado del gen *serp0107* a 644 pb. Con dicha modificación fue posible observar ambas bandas separadas en el gel de electroforesis presentes en el mismo carril, por lo tanto se realizó la PCR dúplex a las mismas 104 cepas clínicas, observando con esto los mismos resultados descritos con la PCR por separado y mostrados anteriormente.

Al realizar la amplificación del gen mediante la PCR, ya sea de manera individual o en dúplex, se demuestra que los resultados del análisis bio-informático son los correctos.

## 8. Conclusiones

- Los oligonucleótidos rediseñados son adecuados para la identificación de las cepas clínicas de *S. epidermidis*.
- Los resultados del análisis de sensibilidad y especificidad nos aportaron muy altos porcentajes confirmatorios (97% y 95% respectivamente), significando una alta confiabilidad en el ensayo.
- Se logró la estandarización de una PCR simple y una PCR dúplex para la identificación de los genes *serp0107* y *mecA*, en cepas clínicas de *S. epidermidis*.
- Se observa una alta prevalencia del gen *mecA* en las cepas clínicas de *S. epidermidis* del INPer, corroborando su alta resistencia a los antimicrobianos del grupo  $\beta$ -lactámicos en hospitales de México.
- Los métodos moleculares, como la PCR, ofrecen una rápida y mayor precisión en la identificación de estos genes.

## 9. Referencias

1. Seija, V. **Género *Staphylococcus***. En: **Temas de bacteriología y virología médica**. Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina. Universidad de la República. 2ª edición, 2006. pp. 257-258.
2. Kloos WE & Schleifer, KH. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986. pp. 544-551.
3. Pahissa, A. **Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus***. ICG Marge, SL. 2009. pp. 15-17.
4. Rupp EM. **Clinical Characteristics of Infections in Humans Due to *Staphylococcus epidermidis***. En: Fey, D. P. ***Staphylococcus epidermidis* Methods and Protocols**. Humana Press. 2014. pp. 1-3.
5. Liu D, Swiatlo E, Austin FW and Lawrence ML. **Use of a putative transcriptional regulator gene as target for specific identification of *Staphylococcus epidermidis***. Lett Appl Microbiol. 2006;43(3):325-30.
6. Vuong C, Otto M. ***Staphylococcus epidermidis* infections**. Microbes Infect. 2002;4(4):481-9.
7. Cabrera CR, Morelos RR, Galicia CAN and Meléndez HE. **Antibiotic Resistance and Biofilm Production in *Staphylococcus epidermidis* Strains, Isolated from a Tertiary Care Hospital in Mexico City**. ISRN Microbiology, vol. 2013, Article ID 918921, 5 pages, 2013. doi:10.1155/2013/918921.
8. Rentería AM. **Breve revisión de los marcadores moleculares**. En: Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X. **Ecología molecular**. Instituto Nacional de Ecología 2007. pp. 542-546.
9. Velasco MR. **Marcadores moleculares y la extracción de ADN**. Facultad de Ciencias Agropecuarias Vol 3 No.1 Marzo 2005. pp. 14-15.

10. García RJA, Gorris M, González J, Prieto J. **Historia de la antibioterapia.** [Acceso junio 2014]. Disponible en <http://es.scribd.com/doc/143799094/HISTORIA-DE-LA-ANTIBIOTERAPIA>.
11. Jover BA, García BMJ. **Manual del Auxiliar de Farmacia.** Editorial Mad, S. L. 2005. pp. 124-130.
12. Camps GP, Vázquez CS, Escolano MC. **Química Farmacéutica I.** Universidad de Barcelona. 2009. pp. 272-274.
13. Sierra JM, Vila J. **Mecanismos de acción y de resistencia a los antimicrobianos en bacterias Gram-positivas.** [Acceso julio 2014]. Disponible en [http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2419/02.JMSO\\_ARTICLE\\_I.pdf;jsessionid=14B36ECA4AE83B4DA93AD8BE199EECAF.tdx1?sequence=2](http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2419/02.JMSO_ARTICLE_I.pdf;jsessionid=14B36ECA4AE83B4DA93AD8BE199EECAF.tdx1?sequence=2)
14. Jover BA, García BMJ. **Generalidades sobre los grupos terapéuticos. Para Auxiliares de Farmacia.** Editorial MAS, S. L. 2006. pp. 18-19.
15. Hoon KN, Taek PK, San MJ, Kyung JW, Hyun KS, Man KJ, Keun HS, Cheung KH, Seok JY and Ho PY. **Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea.** Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(3):1001–1012.
16. Castellano GM, Perozo MA. **Mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Staphylococcus aureus*.** Kasmara [online]. 2010, vol.38, n.1 [citado 2014-11-26], pp. 18-35. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0075-52222010000100003&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000100003&lng=es&nrm=iso). ISSN 0075-5222.
17. Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X. **Ecología molecular.** Instituto Nacional de Ecología 2007. pp. 517-522.
18. Rodríguez SIP, Barrera SHA. **La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención.** CIENCIA UANL. 2004;VII(3):323-335.



19. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. **Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real.** Investigación en Discapacidad. 2013;2 (2):70-78.
20. Galicia CAN. **Detección fenotípica de formación de biofilms en cepas clínicas de *Staphylococcus epidermidis* obtenidas de pacientes hospitalizados con infecciones nosocomiales.** Tesis. Facultad de Química, UNAM. México. 2010
21. Farmacología Básica. **Electroforesis en gel.** [Acceso Julio 2014]. Disponible en <http://farmacologiabasica.blogspot.mx/2008/08/electroforesis-en-gel.html>
22. Fernández OA, García FC, Saéz NJA, Valdezate RS. **Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.** Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
23. Pechorsky A, Nitzan Y, Lazarovitch T. **Identification of pathogenic bacteria in blood cultures: Comparison between conventional and PCR methods.** J Microbiol Methods. 2009;78(3):325-30.
24. Oliva R, Ballesta F, Oriola J, Clària J. **Genética médica.** Publicaciones y ediciones de la Universidad de Barcelona. 3ª edición. 2004. pp. 66-67.
25. Rodríguez CE, Gamboa CM, Hernández CF, García HJD. **Bacteriología General. Principios y prácticas de laboratorio.** Editorial Universidad de Costa Rica. 2005. pp. 135.
26. McFaddin JF. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.** 3ª ed. Editorial Médica Panamericana. 1993. pp. 73-88, 98-109, 367-375, 397-408.
27. Asidah MN, Mohamed R & Teow CT. **Homology Modeling of Coagulase in *Staphylococcus aureus*.** Bioinformation. 2012;8(9):412–414.

28. Almeida RJ, Jorgensen JH. **Use of Muller-Hinton Agar to Determine Novobiocin Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci.** J Clin Microbiol. 1982; 16(6):1155–1156.
29. Kloos WE, Schleifer KH. **Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus species*.** J Clin Microbiol. 1975;1(1):82–88.

## 10. Anexos

### 10.1 Diseño de oligonucleótidos o iniciadores de la PCR

Los oligonucleótidos son secuencias cortas de ADN de cadena sencilla con tamaño que no suele exceder las 60 pb. Para la PCR se utilizan dos tipos de oligonucleótidos, uno que tenga la misma secuencia que se encuentra en una de las cadenas del ADN molde (forward, F), y el otro que tenga la secuencia complementaria (reverse, R), este último estará al final del fragmento que se desea a amplificar [24, 17].

La temperatura de apareamiento es un parámetro de gran importancia en cualquier ensayo de la PCR y determinante en los resultados obtenidos, usualmente es la guía para estandarizar la PCR en el laboratorio por el método de gradiente.

Para determinar la temperatura de apareamiento ( $T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$ ) óptima de los oligonucleótidos debemos calcular la temperatura melting o de fusión ( $T_m$ ) de las secuencias mediante la siguiente formula:

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

Dónde:

$T_m$  = Temperatura de fusión.

Adenina (A), Timina (T), Guanina (G), Citosina (C) = Número de cada nucleótido presente en las secuencias de los iniciadores.

En el rediseño de los oligonucleótidos utilizados en esta tesis, para la detección del gen *serp0107* (gen regulador transcripcional de la familia glutamato sintasa (GltC)), se utilizó como ADN molde el genoma de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (RP62A), esta secuencia se encuentran en internet y es utilizada para fines de investigación por la comunidad científica internacional.

Los oligonucleótidos originales, propuestos por el autor D. Liu, publicados en 2006, se ajustaron para esta tesis con programas bio-informáticos para obtener un tamaño de amplificado de 341 pb, con la finalidad de realizar experimentalmente una PCR dúplex *serp0107-mecA* (341 y 458 pb respectivamente). Posteriormente se analizó la secuencia de oligonucleótidos ajustados utilizando el programa JustBio (<http://www.justbio.com/>), dicho

análisis consistió en el alineamiento y comparación de los iniciadores con el producto de amplificación. Se analizó la posible formación de horquillas y dímeros que pudieran interferir con la formación del producto de amplificación entre los oligonucleótidos, esto en la página OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>). Finalmente, utilizando el programa BLAST, por sus siglas en inglés Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se compara la secuencia ingresada contra una cantidad de secuencias de genomas bacterianos que se encuentren en la base de datos y se verificó que los oligonucleótidos solo se presentaran en *Staphylococcus epidermidis*, obteniendo así la especificidad al amplificado para *serp0107*.

Detalles de este análisis bio-informático se muestran a continuación.

### **Secuencia de nucleótidos del gen *serp0107* en *S. epidermidis* RP62A**

Este gen se puede encontrar en el banco de datos del NCBI, número de acceso GeneID:3242677

```
ttaatatata gtcgatttat ttaataatgt gcaaattaaa ttccatgcta tattaatgtc
gtttttcttg ttatcttttc gcataactac acatagcatt cgttttaatt ctgtatgatt
taaagggatt ttagtccaat ttacgtgatac atatagtaaa gaattttgac tagaaataat
aaatccctta ttatgactca aaatatggtg agcgagtttc atatctgaaa tcatcgtac
ttgtgcctta gtcttttcaa tcaatttact ttttattgag cttgtcattg gttcgagaca
gtatagtgat tgatttgtaa attgagatag cgggggatgt acagtcatag ctagtggatg
tgatttgggc acatacatat aataattttc ttcaaataaa ggcatacgc gtaaattgtg
ttcccgttct aacacaggag taaattcagt gattgcaaga tccaattgat tggaaaggat
ttgatcfaat aatttatcat gttttgtaag ttgcggaatc atggtactgt tactttggtg
ttcaaatggt tgaattaggg gaagaatcat ttgagaggca tcactttctt catatccaat
ataaattgtc tgttggttat gtgatacgtg ttgttgaaat gagtgaatgg ttttatccat
taattctagt atttgagttg cctgtgagag taactgtcta cttcaacag ttaatatgat
atctctcca cttcttttaa ataatgtcac cccaattct ttttcgagtt gagtgatttg
acgactaatc gcagactgtg caatgtttag ttctaagcc gcatctgaaa tatgctctcg
acgtgcaacc tctacaaagt atctaagttg ttttatatcc at
```

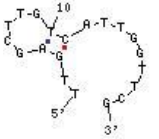
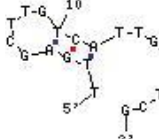
### Iniciadores de la PCR rediseñados a partir del autor D. Liu

Iniciadores de PCR	Secuencia	Tamaño	Tm = 2 (T+A) + 4 (C+G)
<i>serp0107</i> F	TTGAGCTTGTTCATTGGTTCG	20	58
<i>serp0107</i> R	CCAACAGACAATTTATATTGGA	22	58

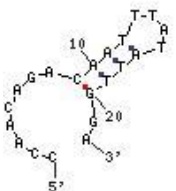
*serp0107* es un gen de *S. epidermidis* que contiene 881 pb, en el genoma se encuentra del nucleótido 91276 al 92157 y es un regulador transcripcional de la familia GltC. La región mostrada en negritas es el producto de amplificación de la PCR diseñado a partir del reporte de D. Liu, pretendiendo que esta secuencia del producto de amplificación permita caracterizar únicamente a *S. epidermidis*, principalmente de aislamientos clínicos.

### Análisis de horquillas y dímeros en la página de internet de OligoAnalyzer 3.1

**Figura 12.** Iniciador de la PCR (forward): *serp0107* F: TTGAGCTTGTTCATTGGTTCG

Estructura	Imagen	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )
1		0.03
2		0.24

**Figura 13.** Iniciador de la PCR (reverse): *serp0107* R: CCAACAGACAATTTATATTGGA

Estructura	Imagen	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )
1		-1.55

2		-1.12
---	--	-------

En las figuras 12 y 13 se muestra la formación de estructuras internas tipo horquillas en los iniciadores de la PCR deducidos con el programa OligoAnalyzer 3.1. Los resultados obtenidos del parámetro termodinámico Delta G ( $\Delta G$ ) permiten suponer una baja o nula interferencia durante el desempeño de la PCR.

**Figura 14.** Análisis de homo-dímeros de los iniciadores forward y reverse mediante el programa OligoAnalyzer 3.1

Iniciador F 5'- TTGAGCTTGTTCATTGGTTCG -3' <b>Maximum Delta G</b> -37.49 kcal/mole	Iniciador R 5'- CCAACAGACAATTTATATTGGA -3' <b>Maximum Delta G</b> -37.45 kcal/mole
<b>Análisis de homo-dímeros</b>	
<b>Delta G</b> -6.34 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 4 5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTCG      3' GCTTGGTTACTGTTTCGAGTT	<b>Delta G</b> -6.97 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 4 5' CCAACAGACAATTTATATTGGA      : : : : : : : : : : 3' AGGTTATATTTAACAGACAACC
<b>Delta G</b> -3.61 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTCG    3' GCTTGGTTACTGTTTCGAGTT	<b>Delta G</b> -5.37 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 4 5' CCAACAGACAATTTATATTGGA      : : : : : : : : : : 3' AGGTTATATTTAACAGACAACC
<b>Delta G</b> -3.53 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 3 5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTCG     : : : 3' GCTTGGTTACTGTTTCGAGTT	<b>Delta G</b> -5.36 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 4 5' CCAACAGACAATTTATATTGGA : : : :      : : : : 3' AGGTTATATTTAACAGACAACC
<b>Delta G</b> -1.95 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTCG    : : 3' GCTTGGTTACTGTTTCGAGTT	<b>Delta G</b> -3.91 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 4 5' CCAACAGACAATTTATATTGGA      3' AGGTTATATTTAACAGACAACC
<b>Delta G</b> -1.95 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTCG :    : : : 3' GCTTGGTTACTGTTTCGAGTT	<b>Delta G</b> -3.4 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 4 5' CCAACAGACAATTTATATTGGA      3' AGGTTATATTTAACAGACAACC

<b>Delta G</b> -1.57 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTCG    : : : : : 3' GCTTGGTTACTGTTTCGAGTT	<b>Delta G</b> -1.95 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' CCAACAGACAATTTATATTGGA    : : : : : 3' AGGTTATATTTAACAGACAACC
<b>Delta G</b> -1.47 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTCG    3' GCTTGGTTACTGTTTCGAGTT	<b>Delta G</b> -1.94 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' CCAACAGACAATTTATATTGGA    : : : : : 3' AGGTTATATTTAACAGACAACC
	<b>Delta G</b> -1.94 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' CCAACAGACAATTTATATTGGA    : : : : : 3' AGGTTATATTTAACAGACAACC
	<b>Delta G</b> -1.94 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' CCAACAGACAATTTATATTGGA : :    : : : : 3' AGGTTATATTTAACAGACAACC
	<b>Delta G</b> -1.47 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' CCAACAGACAATTTATATTGGA :    : : : : 3' AGGTTATATTTAACAGACAACC
	<b>Delta G</b> -1.47 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' CCAACAGACAATTTATATTGGA :    : : : : 3' AGGTTATATTTAACAGACAACC

En la figura 14 se observa que el análisis bio-informático permitió determinar los posibles arreglos internos (homo-dímeros) que se pueden presentar en la PCR. Los valores  $\Delta G$  obtenidos en el análisis permiten suponer una baja posibilidad de interferencia en el ensayo.

**Figura 15.** Análisis de hetero-dímeros entre los iniciadores forward y reverse mediante el programa OligoAnalyzer 3.1

<b>Análisis de hetero-dímeros</b>	
	<b>Iniciador F</b> 5'- TTGAGCTTGTTCATTGGTTCG -3' <b>Iniciador R</b> 5'- CCAACAGACAATTTATATTGGA -3' <b>Maximum Delta G</b> -37.49 kcal/mole
1	<b>Delta G</b> -6.97 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 4 5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTCG : : :     3' AGGTTATATTTAACAGACAACC

2	<p><b>Delta G</b> -6.82 kcal/mole  <b>Base Pairs</b> 5</p> <p>5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG  : :       : :  3' AGGTTATATTTAACAGACAACC</p>
3	<p><b>Delta G</b> -5.37kcal/mole  <b>Base Pairs</b> 4</p> <p>5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG  : :       :  3' AGGTTATATTTAACAGACAACC</p>
4	<p><b>Delta G</b> -3.9 kcal/mole  <b>Base Pairs</b> 3</p> <p>5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG       3' AGGTTATATTTAACAGACAACC</p>
5	<p><b>Delta G</b> -3.9 kcal/mole  <b>Base Pairs</b> 3</p> <p>5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG  :      3' AGGTTATATTTAACAGACAACC</p>
6	<p><b>Delta G</b> -3.9 kcal/mole  <b>Base Pairs</b> 3</p> <p>5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG      :  3' AGGTTATATTTAACAGACAACC</p>
7	<p><b>Delta G</b> -3.3 kcal/mole  <b>Base Pairs</b> 3</p> <p>5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG  :      3' AGGTTATATTTAACAGACAACC</p>
8	<p><b>Delta G</b> -3.29kcal/mole  <b>Base Pairs</b> 3</p> <p>5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG  : :     :  3' AGGTTATATTTAACAGACAACC</p>
9	<p><b>Delta G</b> -1.95 kcal/mole  <b>Base Pairs</b> 2</p> <p>5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG      3' AGGTTATATTTAACAGACAACC</p>
10	<p><b>Delta G</b> -1.95kcal/mole  <b>Base Pairs</b> 2</p> <p>5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG  : :    :  3' AGGTTATATTTAACAGACAACC</p>
11	<p><b>Delta G</b> -1.95 kcal/mole  <b>Base Pairs</b> 2</p> <p>5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG     :  3' AGGTTATATTTAACAGACAACC</p>
12	<p><b>Delta G</b> -1.94 kcal/mole  <b>Base Pairs</b> 2</p> <p>5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG  : :     3' AGGTTATATTTAACAGACAACC</p>
13	<p><b>Delta G</b> -1.6 kcal/mole  <b>Base Pairs</b> 2</p> <p>5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG  :    :  3' AGGTTATATTTAACAGACAACC</p>



14	<b>Delta G</b> -1.57kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG :      :         3'      AGGTTATATTTAACAGACAACC
15	<b>Delta G</b> -1.57 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG         : 3'                   AGGTTATATTTAACAGACAACC
16	<b>Delta G</b> -1.57 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG    3'                                   AGGTTATATTTAACAGACAACC
17	<b>Delta G</b> -1.47 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG :         3'                   AGGTTATATTTAACAGACAACC
18	<b>Delta G</b> -1.34kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' TTGAGCTTGTTCATTGGTTTCG : : : :    : 3'      AGGTTATATTTAACAGACAACC

En la figura 15 se muestra el resultado del análisis bio-informático entre los iniciadores de la PCR forward y reverse (análisis de hetero-dímeros) y las posibilidades de tener formación de estructuras secundarias durante la PCR. Los resultados de  $\Delta G$  permiten suponer una baja posibilidad de interferencia.

### Análisis en el programa BLAST del NCBI

Microorganismo	Identidad	% identidad
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A, genoma completo	341/341	100%
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 cromosoma, genoma completo	341/341	100%

Los resultados del análisis por el programa BLAST para los oligonucleótidos antes mencionados, nos muestran que la secuencia se encuentra únicamente en los genomas de *S. epidermidis*, por lo que tiene gran utilidad para los propósitos de esta tesis.

Como ya se mencionó, en la estandarización de la PCR dúplex con los oligonucleótidos rediseñados para identificación específica (*serp0107*) y los oligonucleótidos de resistencia a los antimicrobianos (*mecA*) no fue posible observar ambas bandas en el gel de electroforesis debido a que los tamaños de amplificadas de los genes eran cercanos entre sí (341 y 458 pb respectivamente) y se sobreponían, por lo tanto se optó por hacer otro diseño de oligonucleótidos con el programa Primer3, quedando de la siguiente manera:

```

ttaatatata gtcgatttat ttaataatgt gcaaattaaa ttccatgcta tattaatgtc
gtttttccttg ttatccttttc gcataactac acatagcatt cgttttaatt ctgtatgatt
taaagggatt ttagtccaat ttacgtgatac atatagtaaa gaattttgac tagaaataat
aaatccctta ttatgactca aaatatgttg agcgagtttc atatctgaaa tcattcgtac
ttgtgcctta gtcttttcaa tcaatttact ttttattgag cttgtcattg gttcgagaca
gtatagtgat tgatttgtaa attgagatag cgggggatgt acagtcatag ctagtggatg
tgatttgggc acatacatat aataattttc ttcaaataaa ggcatgacgc gtaaattgtg
ttcccgttct aacacaggag taaattcagt gattgcaaga tccaattgat tggaaaggat
ttgatcctaat aatttatcat gttttgtaag ttgcggaatc atggtactgt tactttgttg
ttcaaagtgt tgaattaggg gaagaatcat ttgagaggca tcactttcct catatccaat
ataaattgtc tgttggttat gtgatacgtg ttggtgaaat gagtgaatgg ttttatccat
taattctagt atttgagttg cctgtgagag taactgtcta ccttcaacag ttaatatgat
atttctccca cttcttttaa ataatgtcac ccccaattct ttttcgagtt gagtgatttg
acgactaatc gcagactgtg caatgtttag ttctaattgcc gcatctgaaa tatgctctcg
acgtgcaacc tctacaaagt atctaagttg ttttatatcc at

```

### Iniciadores de la PCR, segundo diseño

Iniciadores de PCR	Secuencia	Tamaño	Tm = 2 (T+A) + 4 (C+G)
<i>serp0107</i> F	AAATATGTTGAGCGAGTTTCA	21	56
<i>serp0107</i> R	ACGTCGAGAGCATATTCAG	20	58

Se muestra en letras negritas el área del gen seleccionada para el diseño de iniciadores y el tamaño del producto de amplificación por la PCR, manteniendo la especificidad a *S. epidermidis*. Con ello se tendrá una mejor visualización de las bandas de cada gen en el gel de agarosa.

**Ejemplos de análisis de horquillas y dímeros en la página de internet OligoAnalyzer**  
**3.1**

**Figura 16.** Iniciador de la PCR (forward): *serp0107* F: AAATATGTTGAGCGAGTTTCA

Estructura	Imagen	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )
1		0.81
2		0.84
3		1.04

**Figura 17.** Iniciador de la PCR (reverse): *serp0107* R: ACGTCGAGAGCATATTTTCAG

Estructura	Imagen	$\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> )
1		0.91

2		1.13
3		1.4

En las figuras 16 y 17 se muestran algunos ejemplos de la formación de estructuras internas tipo horquillas en los iniciadores de la PCR, diseñados por segunda ocasión, con el programa OligoAnalyzer 3.1.

**Figura 18.** Ejemplos de formación de homo-dímeros de los iniciadores forward y reverse en el segundo diseño.

<p><b>Iniciador F</b> 5'- AAATATGTTGAGCGAGTTTCA -3'</p> <p><b>Maximum Delta G</b> -36.85 kcal/mole</p>	<p><b>Iniciador R</b> 5'- ACGTCGAGAGCATATTTTCAG -3'</p> <p><b>Maximum Delta G</b> -37.45 kcal/mole</p>
<b>Análisis de homo-dímeros</b>	
<p><b>Delta G</b> -3.91 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 4</p> <pre> 5'          AAATATGTTGAGCGAGTTTCA            :      : 3'  ACTTTGAGCGAGTTGTATAAA </pre>	<p><b>Delta G</b> -6.76 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 4</p> <pre> 5'          ACGTCGAGAGCATATTTTCAG                 3'  GACTTTATACGAGAGCTGCA </pre>
<p><b>Delta G</b> -3.89 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 3</p> <pre> 5'  AAATATGTTGAGCGAGTTTCA        : : : : : 3'  ACTTTGAGCGAGTTGTATAAA </pre>	<p><b>Delta G</b> -6.3 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 4</p> <pre> 5'          ACGTCGAGAGCATATTTTCAG                 3'  GACTTTATACGAGAGCTGCA </pre>
<p><b>Delta G</b> -3.61 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2</p> <pre> 5'  AAATATGTTGAGCGAGTTTCA    ::      :: 3'  ACTTTGAGCGAGTTGTATAAA </pre>	<p><b>Delta G</b> -3.91 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 4</p> <pre> 5'  ACGTCGAGAGCATATTTTCAG         3'  GACTTTATACGAGAGCTGCA </pre>
<p><b>Delta G</b> -3.53 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 3</p> <pre> 5'  AAATATGTTGAGCGAGTTTCA         ::: 3'  ACTTTGAGCGAGTTGTATAAA </pre>	<p><b>Delta G</b> -3.61 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2</p> <pre> 5'          ACGTCGAGAGCATATTTTCAG               :: 3'  GACTTTATACGAGAGCTGCA </pre>

<b>Delta G</b> -3.14 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' AAATATGTTGAGCGAGTTTCA :                              : 3' ACTTTGAGCGAGTTGTATAAA	<b>Delta G</b> -3.14 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' ACGTCGAGAGCATATTTTCAG :                              : 3' GACTTTATACGAGAGCTGCA
---	--

**Figura 19.** Ejemplos de formación de hetero-dímeros entre los iniciadores forward y reverse.

<b>Análisis de hetero-dímeros</b>	
	<b>Iniciador F</b> 5'- AAATATGTTGAGCGAGTTTCA -3' <b>Iniciador R</b> 5'- ACGTCGAGAGCATATTTTCAG -3' <b>Maximum Delta G</b> -36.85 kcal/mole
1	<b>Delta G</b> -9.75 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 7 5' AAATATGTTGAGCGAGTTTCA         :        :: 3' GACTTTATACGAGAGCTGCA
2	<b>Delta G</b> -5.19 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 3 5' AAATATGTTGAGCGAGTTTCA : :                    : 3' GACTTTATACGAGAGCTGCA
3	<b>Delta G</b> -3.61 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' AAATATGTTGAGCGAGTTTCA : : :                :    3' GACTTTATACGAGAGCTGCA
4	<b>Delta G</b> -3.53 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 3 5' AAATATGTTGAGCGAGTTTCA     :        : : 3' GACTTTATACGAGAGCTGCA
5	<b>Delta G</b> -3.14 kcal/mole <b>Base Pairs</b> 2 5' AAATATGTTGAGCGAGTTTCA :                :               : 3' GACTTTATACGAGAGCTGCA

En las figuras 18 y 19 se muestra el resultado del análisis bio-informático con el programa OligoAnalyzer 3.1 de los iniciadores de la PCR forward y reverse (análisis de homodímeros y hetero-dímeros) y las posibilidades de tener formación de estructuras secundarias durante la PCR. Al igual que en los oligonucleótidos anteriores, los resultados de  $\Delta G$  permiten suponer una baja posibilidad de interferencia.

**Análisis del producto de amplificado en el segundo diseño mediante el programa BLAST**

Microorganismo	Identidad	% identidad
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A, genoma completo	644/644	100%
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 cromosoma, genoma completo	644/644	100%

Los resultados del análisis por el programa BLAST para estos segundos oligonucleótidos diseñados, nos muestran que la secuencia se encuentra únicamente en *S. epidermidis*, por lo que siguen siendo de gran utilidad en esta tesis, y fueron empleados en el trabajo experimental.

## 10.2 Pruebas bioquímicas

### 10.2.1. Fermentación de manitol

#### *Fundamento:*

El ASM formulado por Chapman, es un medio de cultivo selectivo y diferencial, debido a que tiene una alta concentración de cloruro de sodio (7.5%), lo que impide el crecimiento de la mayoría de las bacterias, excepto el grupo de los estafilococos. Además, el medio contiene manitol como único hidrato de carbono y rojo de fenol como indicador de pH, cuyo viraje está entre pH 8.4 - 6.8 (rojo y amarillo respectivamente). Cuando hay producción de ácido a causa de la fermentación del manitol por la bacteria, se observa un cambio de color en el medio de cultivo; el medio permanecerá sin cambio de color, cuando las colonias no fermentan el manitol [25].

### 10.2.2. Detección de la producción de la enzima catalasa

#### *Fundamento:*

La prueba de la catalasa se ha utilizado durante muchos años como ayuda para distinguir en el laboratorio entre los estafilococos y estreptococos y en la identificación de otras bacterias. MacLeod y Gordon en 1923 fueron los primeros investigadores que propusieron que la detección de esta enzima podría ser útil en la identificación de bacterias.

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias, descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La reacción química que se produce en esta prueba se expresa en la siguiente ecuación:



La liberación del oxígeno al medio durante la reacción produce la formación de burbujas, criterio que ha sido utilizado para considerar esta prueba como positiva. Este mecanismo es una forma que tienen las bacterias para protegerse del efecto tóxico que tiene el  $\text{H}_2\text{O}_2$  [26].

### **10.2.3. Detección de la producción de la enzima coagulasa**

#### *Fundamento:*

La coagulasa, también llamada estafilocagulasa, es una enzima producida por *Staphylococcus aureus*. Dicha enzima es relativamente estable al calor y resiste temperaturas de hasta 60°C durante 30 min. Esta proteína es secretada al medio extracelular por las cepas de *S. aureus* y se inactiva con facilidad por enzimas proteolíticas (proteasas). Aun cuando la estructura química de esta enzima no se conoce ampliamente, sí existen muchas hipótesis sobre su mecanismo de acción. Recientemente algunos investigadores han realizado modelos bioinformáticos de la posible estructura de la enzima, basados en información de enzimas homólogas. Esta enzima actúa sobre algunos constituyentes del suero para producir un coágulo. In vitro, la coagulasa aumenta la velocidad de coagulación del plasma, lo que produce la formación de un coágulo de fibrina que es muy visible [26, 27].

### **10.2.4. Detección de la producción de la enzima ureasa**

#### *Fundamento:*

Esta prueba se basa en la detección de la enzima ureasa, la cual hidroliza la urea para dar dos moléculas de amoníaco. Así, aquellas bacterias que poseen la enzima ureasa pueden utilizar el nitrógeno proveniente de la urea y, la hidrolizan, liberando amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos metabólicos alcalinizan el medio, haciendo virar el indicador de pH rojo de fenol, de amarillo al rojo. El pH óptimo para la actividad de la ureasa es de 7 [26].

### **10.2.5. Detección de la producción de la enzima fosfatasa**

#### *Fundamento:*

La producción de fosfatasa es determinada por la liberación de fenolftaleína a partir de sal sódica de difosfato de fenolftaleína, que es indicada mediante un cambio de color en el medio de cultivo.

Varios métodos son válidos para determinar la actividad de la fosfatasa en microorganismos, el método original utiliza fosfato de fenolftaleína como sustrato. Para



detectar la liberación de fenolftaleína se añade un álcali al medio de cultivo, y el desarrollo de un color rosa es indicativo de una prueba de fosfatasa positiva. La prueba es realizada en tubo, se agrega hidróxido de sodio para detectar la fenolftaleína [26].

#### **10.2.6. Resistencia a novobiocina**

*Fundamento:*

Originalmente los estafilococos coagulasa negativos (SCoN) eran considerados contaminantes no patógenos, en la actualidad son objeto de estudio debido a que miembros de este grupo han sido implicados como agentes causales de la endocarditis protésica, infecciones del tracto urinario, principalmente en mujeres jóvenes, e incluso como una causa de la uretritis no gonocócica en hombres. Un esquema simplificado útil para la identificación rutinaria de especies de *Staphylococcus* es la determinación de su susceptibilidad o resistencia al antibiótico novobiocina en una concentración de 1.6 µg por ml [28, 29]. Principalmente se utiliza para diferencias a las 2 especies principales del grupo de SCoN: *S. epidermidis* que es sensible y *S. saprophyticus* que es resistente.

## 10.3 Materiales y reactivos

### Medios de cultivo

- Agar infusión cerebro-corazón (BHI) OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England. Lote: 1103207.
- Agar sal y manitol (ASM) OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England. Lote: 527182.
- Agar Mueller Hinton (MH) BBL. Becton Dickinson an Company. Sparks, Maryland. USA. Lote: 3238759.
- Base agar urea (AU) Difco. Difco laboratorios. Detroit MI. USA. Lote: 131678XA.
- Caldo Nutritivo. Difco laboratorios. Detroit MI. USA. Lote: 119373JE.

### Reactivos

- 2-propanol. Tecsiquim, México. D.F. Lote: 9095-02.
- Agarosa (Ultrapure). INVITROGEN, Carlsbad, Cal. EUA. Lote: 385222.
- 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: 100310.
- Buffer TAE 10X. INVITROGEN, Carlsbad, Cal. EUA. Lote: 920810.
- Cloruro de sodio. J. T. Baker, Xalostoc, México. Lote: 3624-01.
- Discos para antibiograma: novobiocina 5µ. OXOILD LTD., Basingstoke, Hampshire, England. Lote: 812499.
- DNTP mix. INVITROGEN, Carlsbad, Cal. EUA. Lote: 1291060.
- EDTA. Sigma-Aldrich, Co. St. Louis MO, EUA. Lote: 044K0016.
- Hidróxido de sodio. J. T. Baker, Xalostoc, México. Lote: 3722-01.
- 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: 102M4007V.
- Marcador molecular (1 KB Plus DNA Ladder). Sigma-Aldrich, Co. St. Louis MO, EUA. Lote: 939786.

- Oligonucleótidos. INVITROGEN, Carlsbad, Cal. EUA.  
*serp0107-F* Lote: 226231B03.                      *serp0107-R* Lote: 226231B04.  
*serp0107-F* Lote: 261374E07.                      *serp0107-R* Lote: 261374E08.  
*mecA-F* Lote: 210278B07.                      *mecA-R* Lote: 210505B04.
- Peróxido de Hidrógeno al 3.34%. ZUUM, Universal Productora S.A. de C.V. Lote: 1008022.
- Plasma de conejo. REMEL. Ltd. Dartford, Kent DA2 6PT UK. Lote: 249416.
- Sal tetrasódica de difosfato de fenoltaleína. Sigma-Aldrich, Co. St. Louis MO, EUA. Lote: 128k5307V.
- Solución de bromuro de etidio. INVITROGEN, Carlsbad, Cal. EUA. Lote: 1241926.
- Taq Polimerasa. AltaEnzymes Co. Calgary. Alberta, Canada. Lote: 1007111.
- Tris-HCl. Research Organics Inc. Cleveland, Ohio, EUA. Lote: K17204.

### **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.
- Gabinete de Bioseguridad clase II, Tipo A2 Nuair. 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.
- Olla de presión de 20 L. 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 con 3 divisiones, desechables y estériles. SyM. Laboratorios. S.A de C.V. México.
- Guantes de nitrilo. Tronex Healthcare Industries. Parsippany, NJ USA. Lote: 211125HR-117860.
- 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, Herlsinki, Finland.
- Tubos para microcentrifuga (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 mm. Kimble Chase, St. Vineland, NJ. USA.
- Matrices Erlenmeyer de 250 mL, 500 mL y 1 L. 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.

## 10.4 Cepas bacterianas utilizadas

Cepas utilizadas como control (100)

Número UNAM	Microorganismo identificado	Nombre	Servicio	Sala	Paciente	Muestra	Fecha de aislamiento
INPer 446	<i>Staphylococcus hominis</i>	MAB	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	12/05/2009
INPer 448	<i>Staphylococcus hominis</i>	REB	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	18/05/2009
INPer 454	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	AGM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Adulta	Sangre	15/06/2009
INPer 458	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	JUH	Externo	Externo	Adulta	Secreción de herida	10/07/2009
INPer 468	<i>Staphylococcus hominis</i>	SAP	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Adulta	Sangre	19/08/2009
INPer 476	<i>Staphylococcus hominis</i>	HUS	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	03/10/2009
INPer 516	<i>Staphylococcus aureus</i>	ESH	Interno	Interno	Adulta	Aspirado intra-abdominal	23/04/2010
INPer 524	<i>Staphylococcus aureus</i>	CUC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	16/06/2010
INPer 528	<i>Staphylococcus aureus</i>	AGB	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Absceso	14/07/2010
INPer 529	<i>Staphylococcus aureus</i>	NEG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Umbilical	10/07/2010
INPer 530	<i>Staphylococcus aureus</i>	OCG	Interno	Interno	Adulta	Aspirado de tejidos blandos	24/08/2010
INPer 531	<i>Staphylococcus aureus</i>	ORM	Interno	Interno	Adulta	Aspirado de tejidos blandos	27/08/2010
INPer 534	<i>Staphylococcus aureus</i>	MAH	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Punta de catéter	08/10/2010
INPer548	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	VAR	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Punta de catéter	06/12/2010
INPer 550	<i>Staphylococcus aureus</i>	FEH	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	08/12/2010
INPer 554	<i>Staphylococcus aureus</i>	CAV	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Copro	06/12/2010

INPer 565	<i>Staphylococcus aureus</i>	HER	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	16/01/2011
INPer 568	<i>Staphylococcus hominis</i>	CAV	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	21/01/2011
INPer 580	<i>Staphylococcus aureus</i>	SER	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Articulación	03/03/2011
INPer 582	<i>Staphylococcus aureus</i>	SAM	Interno	Interno	Adulta	Uretral	07/03/2011
INPer 587	<i>Staphylococcus aureus</i>	SAG	Interno	Interno	Adulta	Herida quirúrgica	03/04/2011
INPer 594	<i>Staphylococcus aureus</i>	RUB	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Copro	08/04/2011
INPer 601	<i>Staphylococcus aureus</i>	RAF	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Umbilical	31/05/2010
INPer 610	<i>Staphylococcus aureus</i>	VAS	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Punta de catéter	20/06/2011
INPer 612	<i>Staphylococcus aureus</i>	BAC	Interno	Interno	Adulta	Punta de catéter	21/06/2011
INPer 613	<i>Staphylococcus aureus</i>	VAS	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	22/06/2010
INPer 614	<i>Staphylococcus aureus</i>	BAC	Interno	Interno	Adulta	Líquido ascitis	22/06/2011
INPer 637	<i>Staphylococcus aureus</i>	HUG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Orina	07/09/2011
INPer 638	<i>Staphylococcus aureus</i>	ORP	Externo	Externo	Adulta	Herida quirúrgica	24/09/2011
INPer 673	<i>Staphylococcus aureus</i>	HEH	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	23/12/2011
INPer 708	<i>Staphylococcus capitis</i>	ROM	Interno	Interno	Adulta	Sangre	26/03/2012
INPer 730	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	GOP	Externo	Externo	Adulta	Orina	12/04/2012
INPer 733	<i>Staphylococcus cohnii</i>	PUM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	03/05/2012
INPer 777	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CAM	Externo	Externo	Adulta	Orina	31/07/2012
INPer 779	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AVR	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	17/08/2012
INPer 780	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MED	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	19/08/2012

INPer 782	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ZAM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	27/08/2012
INPer 783	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TRV	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	30/08/2012
INPer 786	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	XOH	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	03/09/2012
INPer 787	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CUH	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	03/09/2012
INPer 788	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TOH	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	09/09/2012
INPer 789	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BAL	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	03/09/2012
INPer 790	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DEV	Interno	Interno	Adulta	Líquido ascitis	05/09/2012
INPer 792	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	RAG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	11/09/2012
INPer 793	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	GRP	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	11/09/2012
INPer 822	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ROB	Interno	Interno	Adulta	Herida quirúrgica	07/11/2012
INPer 823	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SAP	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Punta de catéter	10/11/2012
INPer 825	<i>Staphylococcus aureus</i>	CAC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Líquido ascitis	12/11/2012
INPer 826	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SOR	Interno	Interno	Adulta	Secreción de herida	12/11/2012
INPer 827	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MOR	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	15/11/2012
INPer 828	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MOR	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	15/11/2012
INPer 829	<i>Staphylococcus hominis</i>	GOS	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre periférica	18/11/2012
INPer 830	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PRC	Interno	Interno	Recién nacido	Catéter	21/11/2012
INPer 831	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CAM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	21/11/2012
INPer 832	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	LEM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	12/11/2012

INPer 834	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	SAC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	02/12/2012
INPer 835	<i>Staphylococcus hominis</i>	RUG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	04/12/2012
INPer 836	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	COV	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	20/12/2012
INPer 837	<i>Staphylococcus aureus</i>	RAC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Umbilical	21/12/2012
INPer 850	<i>Staphylococcus aureus</i>	SOR	Interno	Interno	Adulta	Orina	23/01/2013
INPer 853	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	FLG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	28/01/2013
INPer 854	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	COV	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	29/01/2013
INPer 855	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MAM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	30/01/2013
INPer 857	<i>Staphylococcus warneri</i>	CAP	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	31/01/2013
INPer 858	<i>Staphylococcus aureus</i>	ZAD	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	31/01/2013
INPer 859	<i>Staphylococcus aureus</i>	MOG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	02/02/2013
INPer 861	<i>Staphylococcus hominis</i>	PEJ	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	06/02/2013
INPer 862	<i>Staphylococcus aureus</i>	AVE	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Absceso	06/02/2013
INPer 863	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	GAV	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	07/02/2013
INPer 864	<i>Staphylococcus aureus</i>	ORV	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	11/02/2013
INPer 865	<i>Staphylococcus hominis</i>	ZAR	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	12/02/2013
INPer 866	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	TEB	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	14/02/2013
INPer 867	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	LOL	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	15/02/2013



INPer 868	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CAS	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	17/02/2013
INPer 869	<i>Staphylococcus hominis</i>	ESC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	18/02/2013
INPer 870	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ROS	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	18/02/2013
INPer 871	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PEJ	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	18/02/2013
INPer 872	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	COJ	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	20/02/2013
INPer 874	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	VAG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	27/02/2013
INPer 875	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	LOL	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	28/02/2013
INPer 876	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AVL	Interno	Interno	Recién nacido	Secreción de herida	28/02/2013
INPer 877	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ESC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Adulta	Sangre	03/03/2013
INPer 878	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ESC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	03/03/2013
INPer 880	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CAM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	27/03/2013
INPer 881	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AGG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	28/03/2013
INPer 883	<i>Staphylococcus aureus</i>	URM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre central	03/04/2013
INPer 884	<i>Staphylococcus aureus</i>	NAM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre periférica	03/04/2013
INPer 886	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NAM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	04/04/2013
INPer 887	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	OLB	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	04/04/2013
INPer 889	<i>Staphylococcus aureus</i>	URM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	05/04/2013
INPer 892	<i>Staphylococcus aureus</i>	CAM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre central	07/04/2013

INPer 902	<i>Staphylococcus aureus</i>	MEA	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Secreción de herida	21/04/2013
INPer 910	<i>Staphylococcus hominis</i>	GAS	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Líquido cefalorraquídeo	30/04/2013
INPer 911	<i>Staphylococcus hominis</i>	ROB	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Líquido cefalorraquídeo	30/04/2013
INPer 913	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	DEC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Secreción de herida	03/05/2013
INPer 916	<i>Staphylococcus aureus</i>	LAC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	13/05/2013
INPer 917	<i>Staphylococcus aureus</i>	LAC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Secreción de herida	13/05/2013
INPer 937	<i>Staphylococcus hominis</i>	LOG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	20/06/2013
INPer 943	<i>Staphylococcus hominis</i>	ABA	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	03/07/2013
INPer 962	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	GET	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre central	24/10/2013

#### Cepas clínicas (104)

Número UNAM	Microorganismo identificado	Nombre	Servicio	Sala	Paciente	Muestra	Fecha de aislamiento
INPer 794	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	JUA	Interno	Interno	Adulta	Líquido ascitis	10/09/2012
INPer 795	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	GAA	Interno	Interno	Recién nacido	Conjuntival	10/09/2012
INPer 796	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ALD	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	11/09/2012
INPer 797	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SOR	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	11/09/2013
INPer 798	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SAV	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Líquido cefalorraquídeo	13/09/2012
INPer 800	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PAB	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	30/08/2012
INPer 801	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SAG	Externo	Externo	Adulta	Orina	11/09/2012

INPer 802	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	HER	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre periférica	21/09/2012
INPer 803	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MOR	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre central	21/09/2012
INPer 804	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ESR	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	22/09/2012
INPer 805	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CAL	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	22/09/2012
INPer 806	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PEP	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Urocultivo	23/09/2012
INPer 807	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	JUA	Interno	Interno	Adulta	Líquido ascitis	25/09/2012
INPer808	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ALR	Interno	Interno	Adulta	Conjuntival	25/09/2012
INPer 809	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PEV	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre central	02/10/2012
INPer 810	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PEV	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre periférica	02/10/2012
INPer 811	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MOG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	03/10/2012
INPer 812	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PAA	Externo	Externo	Adulta	Conjuntival	10/11/2012
INPer 813	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SAM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	10/11/2012
INPer 814	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	GRN	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	12/11/2012
INPer 815	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	FLG	Interno	Interno	Adulta	Catéter	12/10/2012
INPer 816	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BEL	Interno	Interno	Adulta	Catéter	15/10/2012
INPer 817	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ESS	Interno	Interno	Adulta	Aspirado de tejidos blandos	15/10/2012
INPer 819	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BAR	Interno	Interno	Adulta	Sangre	04/10/2012
INPer 820	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CIB	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	01/11/2012
INPer 821	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SOR	Interno	Interno	Adulta	Sangre	06/11/2012
INPer 824	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AYA	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre periférica	10/11/2012

INPer 833	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SOR	Interno	Interno	Adulta	Catéter	12/09/2012
INPer 839	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	COP	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	26/12/2012
INPer 842	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ORC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	14/01/2013
INPer 843	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	GOS	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	14/01/2013
INPer 845	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	FLG	Interno	Interno	Adulta	Líquido ascitis	16/01/2013
INPer 846	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DIG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	17/01/2013
INPer 848	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	COV	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	20/01/2013
INPer 852	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	RAL	Interno	Interno	Adulta	Sangre	28/01/2013
INPer 856	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CAP	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	31/01/2013
INPer 873	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ULM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	27/02/2013
INPer 890	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AZM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	07/04/2013
INPer 891	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CAM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre periférica	07/04/2013
INPer 893	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DEC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	09/04/2013
INPer 894	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	GOB	Interno	Interno	Adulta	Secreción de herida	12/04/2013
INPer 895	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MEA	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Líquido cefalorraquídeo	15/04/2013
INPer 896	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	COH	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	15/04/2013
INPer 897	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ULM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	15/04/2013
INPer 898	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CAG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	17/04/2013
INPer 899	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PIG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	17/04/2013

INPer 900	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ROB	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	20/04/2013
INPer 903	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SAF	Interno	Interno	Adulta	Líquido de ascitis	21/04/2013
INPer 904	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CAG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	22/04/2013
INPer 906	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ESC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	23/04/2013
INPer 907	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MEA	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	24/04/2013
INPer 908	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ZUS	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre periférica	25/04/2013
INPer 909	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	GOG	Interno	Interno	Adulta	Líquido de ascitis	29/04/2013
INPer 912	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PIG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	02/05/2013
INPer 914	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	COV	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre periférica	05/05/2013
INPer 915	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SAM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre central	09/05/2013
INPer 919	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MAM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	23/05/2013
INPer 921	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AVF	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	22/05/2013
INPer 927	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ZAO	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	29/05/2013
INPer 929	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CAC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	01/06/2013
INPer 932	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	OLR	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	10/06/2013
INPer 933	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	HEA	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	10/06/2013
INPer 934	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	OCB	Interno	Interno	Adulta	Líquido peritoneal	11/06/2013
INPer 935	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	COT	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	13/06/2013

INPer 938	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DOG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	21/06/2013
INPer 939	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ESM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	23/06/2013
INPer 940	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	OLS	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	24/06/2013
INPer 941	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CAC	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	24/06/2013
INPer 942	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MAF	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	01/07/2013
INPer 944	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SIG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	10/07/2013
INPer 945	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MIF	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre periférica	12/07/2013
INPer 946	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	HEA	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	13/07/2013
INPer 948	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	RUM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	15/07/2013
INPer 951	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SAA	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	25/07/2013
INPer 954	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	RUM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	05/08/2013
INPer 959	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	LOG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre central	23/09/2013
INPer 960	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	LOG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre periférica	02/10/2013
INPer 963	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	GET	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre periférica	24/10/2013
INPer 964	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ARG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Líquido cefalorraquídeo	24/10/2013
INPer 965	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	GET	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre central	30/10/2013
INPer 969	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	VAS	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre central	05/11/2013

INPer 972	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	RON	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	17/11/2013
INPer 975	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ESR	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre periférica	22/11/2013
INPer 979	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BER	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Hemocultivo	05/12/2013
INPer 981	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MOM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	06/12/2013
INPer 982	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MOM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Hemocultivo	06/12/2013
INPer 983	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TOD	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	08/12/2013
INPer 986	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PIG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	10/12/2013
INPer 988	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ARD	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	12/12/2013
INPer 990	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ARD	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Hemocultivo	23/12/2013
INPer 991	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	RUZ	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	27/12/2013
INPer 992	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CUL	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Conjuntival	28/12/2013
INPer 995	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MOE	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	03/01/2014
INPer 996	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TRP	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	04/01/2014
INPer 997	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	RES	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	06/01/2014
INPer 998	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PEH	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	09/01/2014
INPer 1000	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MOR	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	13/01/2014
INPer 1001	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	REG	Interno	Interno	Adulta	Líquido de ascitis	16/01/2014
INPer 1003	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	REG	Interno	Interno	Adulta	Catéter	22/01/2014

INPer 1006	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MIG	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	27/01/2014
INPer 1007	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PEB	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Sangre	29/01/2014
INPer 1008	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DOJ	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	31/01/2014
INPer 1011	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MUM	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	01/02/2014
INPer 1012	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	HIB	Interno	Unidad de cuidados intensivos	Recién nacido	Catéter	02/02/2014