



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"

Hospital de Especialidades UMAE  
"Dr. Antonio Fraga Mouret"

**TESIS:**

DETECCIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE BIOFILM EN CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS*  
*AUREUS* RESISTENTES A METICILINA, AISLADOS DE HEMOCULTIVOS EN EL CENTRO  
MÉDICO NACIONAL LA RAZA

**PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALIDAD EN:**

PATOLOGÍA CLÍNICA

**PRESENTA:**

DRA. ANDREA FLORES PRECIADO

**ASESORES:**

D. EN C. ROSA GONZÁLEZ VÁZQUEZ

DRA. LAURA LÓPEZ PELCASTRE

**NÚMERO DE REGISTRO:**

R-2019-3501-092

CDMX, Febrero, 2020



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.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



Dictamen de Aprobado

Comité Local de Investigación en Salud 3501.  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA

Registro COFEPRIS 17 CI 09 002 047

Registro CONBIOÉTICA CONBIOÉTICA 09 CEI 033 2017121

FECHA Lunes, 12 de agosto de 2019

Dra. ROSA GONZALEZ VAZQUEZ

PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título "**Detección fenotípica y genotípica de biofilm en cepas de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina, aislados de hemocultivos en el Centro Médico Nacional la Raza**" que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **APROBADO**.

Número de Registro Institucional  
R-2019-3501-092

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Ética en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

ATENTAMENTE

Dr. José Arturo Gayosso Rivera  
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3501

[Imprimir](#)

IMSS

SECRETARÍA DE SALUD



DETECCIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE BIOFILM EN CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTES A METICILINA, AISLADOS DE HEMOCULTIVOS EN EL CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA

---

Dra. María Teresa Ramos Cervantes

Coordinación de Educación e Investigación en Salud

U.M.A.E. Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza" C.M.N. La raza

---

Dr. Oscar Zamudio Chávez

Profesor Titular de la Especialidad en Patología Clínica

Jefe de Laboratorio del Banco Central de Sangre

---

D. EN C. Rosa González Vázquez

Químico Clínico adscrito al Laboratorio Central, Hospital de Especialidades

U.M.A.E. Hospital General "Dr. Antonio Farga Mouret" C.M.N. La raza

---

Dra. Laura López Pelcastre

Jefe del Laboratorio Central, Hospital de Especialidades

U.M.A.E. Hospital General "Dr. Antonio Farga Mouret" C.M.N. La raza

---

Dra. Andrea Flores Preciado

Residente tercer año de la especialidad en Patología Clínica

U.M.A.E. Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza" C.M.N. La raza

## *Agradecimientos*

*A mis asesores de tesis por brindarme su conocimiento dedicación, paciencia y apoyo incondicional para la realización de este proyecto.*

*A mis coordinadores de la especialidad el Dr. Antonio Quintero Bazaldua y al Dr. Oscar Zamudio Chávez por ser parte importante de mi formación y su apoyo durante estos tres años.*

*A mis compañeros de residencia que se convirtieron en mi familia, que siempre estuvieron en los buenos y malos momentos.*

*A mi familia por creer en mí y siempre estar para apoyarme y motivarme a ser mejor.*

*A mi novio por acompañarme a vivir este sueño y aguantar esta etapa tan difícil.*

## **INDICE**

| <b>CONTENIDO</b>  | <b>PÁGINA</b> |
|---|---------------|
| RESUMEN   | <b>1</b>      |
| ANTECEDENTES CIENTÍFICOS                                  | <b>2</b>      |
| EPIDEMIOLOGIA   | <b>7</b>      |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y<br>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | <b>8</b>      |
| JUSTIFICACIÓN   | <b>9</b>      |
| OBJETIVOS E HIPÓTESIS                                     | <b>9</b>      |
| MATERIAL Y MÉTODOS  | <b>10</b>     |
| CONTROL DE CALIDAD  | <b>15</b>     |
| MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD Y<br>ELIMINACIÓN DE RESIDUOS      | <b>16</b>     |
| MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS                                   | <b>17</b>     |
| ASPECTOS ÉTICOS   | <b>22</b>     |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO                                      | <b>22</b>     |
| RESULTADOS  | <b>24</b>     |
| DISCUSIÓN   | <b>29</b>     |
| CONCLUSIONES  | <b>31</b>     |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS                                | <b>32</b>     |
| ANEXOS  | <b>40</b>     |

## RESUMEN

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo asociado frecuentemente a infecciones hospitalarias y comunitarias, causante de una gran variedad de enfermedades. La resistencia a meticilina se asocia con la adquisición de un casete cromosomal *SCCmec*, existen ocho tipos de *SCCmec* sobre la base de la estructura de su *ccrA-B* y complejos *mecA*. Existen otros factores de virulencia como el biofilm el cual es un exopolisacárido referido como adhesina intracelular de polisacárido (PIA), la cual esta codificado y regulado en el operón *ica ABCD* la cual se relaciona a resistencia asociado a infecciones recurrentes o falla terapéutica (resistencia a aminoglucósidos, glucopápetidos)

Resultados: Se analizaron 156 muestras 42% (66/156) de las cepas fueron MRSA, de las cuales el 100% (66/66) presentaron el gen *mecA*, por lo que, el 100% (66/66) mostraron resistencia de cefoxitina por el método de Kirby-Bauer. La producción de biofilm en las cepas MRSA fueron altas productoras en un 98.48% (65/66), y moderas en un 1.52% (1/66), y 0% en cepas nula y baja productora de biofilm. Los resultados que se obtuvieron para la expresión de genes fueron para *icaA* 45.45% (30/66), *icaD* 98.48% (65/66), *icaB* 34.84%(23/66) e *icaC* 50%(33/66)

Conclusiones: Es importante establecer los factores que definen la patogenicidad en nuestra comunidad ya que permitirá establecer una estrategia terapéutica oportuna y eficaz y protocolizar medidas preventivas

Palabras clave: *S. aureus*, MRSA, *ica ADBC*, Biofilm

## I. Antecedentes científicos

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo asociado frecuentemente a infecciones hospitalarias y comunitarias, causante de una gran variedad de enfermedades.<sup>1</sup> La resistencia a los antibióticos, se incrementa por la presión de selección de los antibióticos por abuso y uso inadecuado, lo que favorece la aparición de microorganismos multidrogoresistentes (MDR), con importantes repercusiones en los sistemas de salud, así como la aparición de brotes epidémicos, elevación en la morbimortalidad y costos. En pacientes diabéticos *S.aureus* resistente a meticilina (MRSA) se aísla frecuentemente (20%).<sup>1,2</sup>

Desde su aparición en Inglaterra en 1961, la incidencia de MRSA ha ido en constante aumento y es así como se ha constituido en uno de los patógenos prevalentes en infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS). Sin embargo, la epidemiología de MRSA fue modificándose con el tiempo y actualmente se observa un incremento de infecciones adquiridas en la comunidad en pacientes sin factor de riesgo conocido.<sup>3</sup> El “Centro para la Prevención y Control de Enfermedades” (CDC) reportó un aumento de 300% en la resistencia de MRSA en las UCI neonatales de 1995 a 2004.<sup>4</sup>

Velázquez y colaboradores investigaron la presencia de portadores de MRSA en 2 345 niños de guarderías del norte y sur de México. En 10% encontraron colonización de *S.aureus* y en 0.93% de MRSA. La resistencia a eritromicina, clindamicina, trimetoprim/sulfametoxazol, gentamicina y ciprofloxacina fue de 72, 32, 22.7, 18.1 y 4.5%, respectivamente.<sup>5</sup> Las 22 cepas de MRSA fueron

separadas en seis clonas mediante electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE); uno de los perfiles presentó similitud con la clona USA100, clona resistente de origen hospitalario en EU. Esto refleja la capacidad de diseminación, por la migración de poblaciones. Aparentemente en México hay una mayor frecuencia de la clona Nueva York/Japón.<sup>6</sup>

La resistencia a meticilina en *S. aureus* es asociada a un elemento genético móvil el casete cromosómico *SCCmec* que confiere resistencia a meticilina, dentro del cual se inserta el gen *mecA*. Éste codifica una proteína de unión a penicilina, PBP2a/ PBP20 con actividad transpeptidasa responsable de la resistencia intrínseca a todos los  $\beta$ -lactámicos. El “estándar de oro” para la confirmación de MRSA es la detección molecular de *mecA*, típicamente por PCR, o de PBP2a / PBP20, generalmente por anticuerpos con ensayos de aglutinación en portaobjetos comercialmente disponibles.<sup>7</sup>

El principal mecanismo de transmisión de MRSA dentro del hospital es a través de las manos de profesionales de la salud, que son portadores. En un estudio realizado en Brasil se encontró que, en el momento de la admisión, 46% de los pacientes fueron colonizados con MRSA. Los factores predisponentes para la colonización podrían ser: Edad, hospitalización previa, cirugía previa, aunque no fue confirmado. De los 54 pacientes negativos para MRSA al ingreso, 28 (52%) se colonizaron en la UCI. Dieciséis (22%) de los 74 pacientes colonizados durante el ingreso o la estancia en UCI presentaron infecciones respiratorias o de vías urinarias (IVU) por MRSA, y 9 (56%) fallecieron.<sup>8</sup>

En un estudio realizado por Mahavanakul en el Departamento de Medicina, “Hospital Sappasithiprasong, Ubon Ratchathani, Tailandia” se identificó un total de 106 pacientes con bacteriemia por *S. aureus*, de los cuales 98 fueron MRSA .49 adultos tuvieron sepsis grave, y 48 pacientes presentaron shock séptico.<sup>9</sup>

En la población pediátrica, los aislados fueron de 56 niñas (45,5%) y 67 niños (54,5%) con una mediana de edad de 60 meses (rango 1 día a 18 años). Los grupos etarios que presentaron los mayores porcentajes de infección por *S. aureus* fueron: de 1 a 4 años y de 5 a 14 años con 36,6 y 38,2%, respectivamente.

10

Las infecciones asociadas con *S. aureus* en los EE. UU, tiene una tasa bruta de mortalidad del 25% junto con hospitalizaciones que resultan en aproximadamente el doble de la estadía, las muertes y los costos médicos de las hospitalizaciones típicas. Las infecciones por dispositivo médico permanentes se ha observado que el principal causante es *S. aureus*, ya que forma biopelícula (biofilm). Los implantes ortopédicos, incluidas las articulaciones protésicas, alambres, alfileres, fijadores externos, placas, tornillos, clavos y fragmentos de implantes, son los más comúnmente colonizados. En la Periodontitis la formación de biopelículas de *S. aureus* en la cavidad oral puede actuar como un reservorio de infecciones orales, y la prevalencia de *S. aureus* en el bolsillo periodontal es 13.4% y 15.8% en la cavidad bucal. *S. aureus* tiene una gran afinidad por las superficies de titanio.<sup>11</sup>

## ***S. aureus*, factores de virulencia y patogenia**

*S.aureus*, es un coco Gram positivo en racimo, catalasa y coagulasa positivo, no móvil, anaerobio facultativo que forma parte de la biota normal (narinas anteriores, nasofaringe, región perineal y piel). Crece en agar sangre (GS 5%), las colonias a partir de este medio miden entre 1 a 3 mm, producen pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y  $\beta$ -hemólisis de 24-36 h.<sup>12,13</sup>

Los factores de virulencia contribuyen a su patogenicidad (tabla 1).

Tabla 1. Factores de virulencia de *S.aureus*

| <b>Factores de virulencia</b>            | <b>Efectos biológicos</b>   |
|--|---|
| Cápsula                                  | Inhibe la quimiotaxis y la fagocitosis; la proliferación de leucocitos mononucleares; facilita la adherencia a los cuerpos extraños.  |
| Peptidoglucano                           | Estimula la producción de pirógenos endógenos; quimioatrayente leucocitario; inhibe la fagocitosis.   |
| Proteína A                               | Inhibe la respuesta inmune mediada por la unión a la porción Fc de IgG y complemento; quimioatrayente leucocitario.   |
| Toxinas alfa, beta, gamma y delta        | Lisis celular   |
| Leucocidina                              | Destrucción de los fagocitos  |
| Invasinas:<br>coagulasa<br>hialuronidasa | Aumentan la invasión y supervivencia en los tejidos. <sup>14,15</sup>   |
| Enterotoxinas                            | Superantígenos (estimulan la proliferación de los linfocitos T y la liberación de citocinas); estimulan la liberación de mediadores inflamatorios en los mastocitos, aumentando el peristaltismo intestinal y la pérdida de líquidos, así como la aparición de náuseas y vómitos. |
| Biofilm                                  | Facilita la colonización, especialmente de los dispositivos quirúrgicos como las válvulas artificiales o los catéteres permanentes.   |

## **Resistencia a meticilina y biofilm**

La resistencia a meticilina se asocia con la adquisición de un casete cromosomal *SCCmec*, existen ocho tipos de *SCCmec* sobre la base de la estructura de su *ccrA-B* y complejos *mecA*. Los tipos *SCCmec* I, II, III y VIII pertenecen a clonas de

origen hospitalario; mientras que los tipos IV, V, VI, VII y son adquiridos en la comunidad (CA-MRSA).<sup>16, 17, 18,19</sup>

El biofilm es una comunidad bacteriana, que incluye bacterias plactónicas (libres, activas metabólicamente) y sésiles (inactivas metabólicamente), adheridas a un sustrato, interfase o unidas unas con otras, embebidas en exopolisacárido. referido como adhesina intracelular de polisacárido (PIA), codificado y regulado en el operón *ica ABCD*.<sup>20</sup> Otras proteínas relacionadas la formación de biofilm son BAP (proteínas asociadas a biofilm) que se encuentran ancladas en la pared celular.<sup>21</sup> La estructura de biofilm incluye el exopolisacárido, proteínas, DNA extracelular, este último se incorpora por lisis celular, debido a autolisinas. La biopelícula es considerada un mecanismo de resistencia asociado a infecciones recurrentes o falla terapéutica (resistencia a aminoglucósidos, glucopéptidos).

<sup>22,23</sup>

Las bajas dosis de antibiótico que se consiguen con el tratamiento sistémico pueden aliviar los síntomas causados por las bacterias planctónicas que se liberan desde la biopelícula<sup>24,25,26</sup>, pero las células sésiles de la comunidad no se ven afectadas y pueden seguir causando daño en los tejidos cuando el tratamiento se retire<sup>27,28,29</sup>.

## II. Epidemiología

*S. aureus* ocupa el segundo lugar después de los *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) como causa de bacteriemia adquirida en el hospital y es una causa letal y potencial en las infecciones en los Estados Unidos.<sup>30</sup>

En Europa en el 2014, se encontró variaciones en los aislamientos de *S. aureus* dependiendo el país los porcentajes van del 0.9% al 56.0%, con porcentajes bajos de MRSA en el norte de Europa y más altos en el sur y sureste.<sup>31</sup> En Asia, se realizó un estudio prospectivo el cual abarco de septiembre del 2004 a agosto del 2006 donde la prevalencia de MRSA en los hospitales fue muy elevada, con cifras que superan el 60 % de los aislados en países como: Corea del Sur, Vietnam o Taiwán.<sup>32</sup>

Las infecciones por MRSA en países de América como Chile, Argentina y México son variables, aunque se ha visto en altos porcentajes que oscilan entre un 50 y 80% en hospitales de tercer nivel.<sup>33</sup> La Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) en México reportó que la mortalidad con *S. aureus* varía entre 5 y 70%, existe un número limitado de estudios sobre la susceptibilidad antimicrobiana en MRSA. En el Hospital General de León, Guanajuato, en el año 1993 se encontró una resistencia a meticilina de 24.1 %, mientras que, en el Hospital Civil de Guadalajara, se obtuvieron resultados que indicaron un incremento en la resistencia a oxacilina en *S. aureus* de 7%, en 1989, a 20%, en 1998. Un estudio en un hospital de tercer nivel encontró una frecuencia de resistencia de *S. aureus* de 14.2%.<sup>34,35</sup>

Pradeep y colaboradores, describieron un estudio realizado en el 2016 en un hospital de la India, la asociación de *S. aureus* meticilino sensibles (MSSA) y una fuerte producción del biofilm del 27.5% y los genes *icaAD*.<sup>36</sup>

En el 2015 en Venezuela el 51,8% de cepas aisladas de *S. aureus* fueron sensibles y 48,2% resistentes, de las cuales el 22,6% fueron MRSA.<sup>37</sup> En Oaxaca en el año 2016 se realizó un estudio para estudiar la distribución de genes de adhesión y regulación de biofilm en *S. aureus* en el Hospital de Alta Especialidad, donde se aislaron 106 cepas, donde se encontró que el 28,3% fueron resistentes a meticilina y 71,7% sensibles. El 50% fueron formadores de biofilm. Entre las cepas MSSA, el 28% formaron biofilm.<sup>38</sup>

### **III. Planteamiento del problema**

Uno de los patógenos humanos más importantes a nivel mundial es *S. aureus*, al cual se le atribuye una gran cantidad de infecciones en la comunidad y asociadas a la atención de la salud (IAAS). Debido a sus factores de virulencia, coloniza, invade y puede diseminarse; la prevalencia del microorganismo en el medio hospitalario, y la resistencia a meticilina y otros antibióticos, hace imprescindible su caracterización y relación a diversas enfermedades. La frecuencia de este microorganismo en el hospital, no se había determinado, al igual que la prevalencia de MRSA, tampoco la producción de biofilm (fenotípica y genotípica) menos aún si existe una relación entre ambos (MRSA y biofilm). Gracias a que conocemos estos datos podemos implementar mejores estrategias de tratamiento y caracterizar los aislamientos clínicos.

#### **IV. Pregunta de investigación**

¿Cuál es el fenotipo y genotipo de biofilm en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, provenientes de hemocultivos de marzo 2014 a noviembre 2018 y en el periodo de junio a noviembre 2019?

#### **V. Justificación**

La formación de biofilm, favorece la prevalencia de los microorganismos en superficies bióticas y abióticas, además es un mecanismo de resistencia a diversos fármacos, se estableció la relación entre la formación de biofilm y la resistencia a meticilina en aislados de *S. aureus* provenientes de hemocultivos, para poder dirigir la terapia de antibióticos y otorgar un tratamiento correcto, reducir complicaciones por la estancia hospitalaria y mejorar el pronóstico del paciente con infecciones del torrente sanguíneo (bacteriemia o sepsis) por el uso de dispositivos médicos como el catéter.

#### **VI. Objetivos**

##### **Objetivo Principal**

Se detectó fenotípica y genotípicamente el biofilm en cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina aislados de hemocultivos.

## **Objetivos Específicos**

- Se confirmó la resistencia a meticilina, con el método de KIRBY BAWER (CLSI, 2019).
- Se determinó de forma cualitativa y cuantitativa de la formación de biofilm de MRSA.
- Se detectó los genes *icaADBC* en cepas MRSA biofilm(+).
- Se relacionó la resistencia a meticilina con la producción de biofilm.

## **VII. Hipótesis**

La detección fenotípica y genotípica de biofilm en cepas de *Stapylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de hemocultivo será mayor al 50%

## **VIII. Material y métodos**

### **Tipo de Estudio**

Por incluir un grupo de estudio: Descriptivo

Por la manipulación de la maniobra: Abierto

Por las mediciones realizadas: Transversal

Por recuperación de la información: Ambidireccional

### **Población**

### **Población De Estudio:**

150 cepas de *S. aureus* aislados de hemocultivos del 2014 al 2018.

Aislados clínicos de *S.aureus* del periodo de junio a diciembre 2019.

Cálculo de la Muestra para proporciones:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

donde:

- N = Total de la población = 150 cepas
- $Z_{\alpha}^2 = 1.96^2$  (si la seguridad es del 95%)
- p = proporción esperada (5% = 0.05)
- q = 1 - p (1-0.05 = 0.95)
- d = precisión (3%).

$$n = \frac{150 * 1.96^2 * 0.05 * 0.95}{0.03^2 * (150 - 1) + 1.96^2 * 0.05 * 0.95} = 50$$

## Criterios de selección de muestras

### Criterios de Inclusión:

- Cocos Gram positivos, catalasa, manitol y coagulasa positivos, del género y especie *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA).

### Criterios de exclusión:

- Cocos Gram positivos, catalasa positivos, manitol y coagulasa negativos, del grupo "*Staphylococcus coagulasa negativos (SCN)*".
- Cocos Gram positivos, catalasa, manitol y coagulasa positivos, del género y especie *S. aureus* sensibles meticilina (MSSA).

- Cocos Gram positivos, catalasa, manitol y coagulasa positivos, del género y especie *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) aislados de otra muestra diferente a hemocultivo.

#### **Criterios de eliminación:**

- Pérdida de la viabilidad bacteriana al momento de su conservación.
- Pérdida de la información (datos de la cepa, resultados de las pruebas).

#### **Ubicación Espacio-Temporal**

El estudio se realizó en el laboratorio clínico del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza, en cepas obtenidas de hemocultivos positivos, colectados durante el periodo comprendido del 2014 al 2018 y durante junio a diciembre 2019.

#### **Definición de las variables**

##### **Variable independiente:**

##### ***S. aureus* meticilino resistente**

- Definición conceptual: grupo de *S. aureus* el cual no responde al tratamiento antibiótico  $\beta$  - lactámico debido a la presencia de una proteína alterada de unión a la penicilina (PBP2a, por la sigla en inglés de “Penicillin binding protein 2<sup>a</sup>”), codificada por *mecA*.
- Definición operacional: Crecimiento de la cepa *S. aureus* en la parte de intersección entre el halo de inhibición generado por la difusión del antibiótico

del disco de CEFOXITINA 30 µg y con un crecimiento  $\leq 21$ mm de diámetro y con presencia de *mecA*.

- Tipo de variable: Cualitativa.
- Indicador: Resistente (<21mm ) o sensible ( $\geq 21$  mm).
- Escala de medición: nominal.

### **Operón *icaADBC***

- Definición conceptual: “Cluster” de genes que codifican y regulan la expresión de biofilm.
- Definición operacional: Detección de los genes *icaADBC*.
- Tipo de variable: Cualitativa.
- Indicador: Presente, ausente.
- Escala de medición: Nominal.

### **Variables dependientes**

#### ***S. aureus* productoras de biofilm detección fenotípica**

- Definición conceptual: comunidad microbiana embebida en una matriz de exopolisacárido que se adhiere a superficies inertes o vivas.
- Definición operacional: Detección de formación de biofilm mediante el método de cristal violeta (CV), cuantificación de biofilm por espectrofotómetro.
- Tipo de variable: Cualitativa
- Indicador: Nula, baja, moderada y alta.
- Escala de medición: Ordinal.

### ***S. aureus* productoras de biofilm con presencia de operón *icaADBC* (genotípica)**

- Definición conceptual: La producción del exopolisacárido está mediada por el operón *ica*, compuesto por el gen regulador *icaR* y los genes biosintéticos *icaADB*.
- Definición operacional: Presencia del operón *icaADBC*
- Tipo de variable: Cualitativa
- Indicador: Presente, ausente.
- Escala de medición: Nominal.

### **Descripción del estudio**

El estudio se realizó en el Hospital de Especialidades del CMNR por el IMSS, en la Ciudad de México D.F. por la tesista médico residente de patología clínica bajo la colaboración, supervisión y apoyo de los asesores D. en C. Rosa González Vázquez la cual es Química Clínica adscrito al Laboratorio Central del Hospital de Especialidades y la Dra. Laura López Pelcastre la cual es Jefa del Laboratorio Central del Hospital de Especialidades, también se cuenta con la asesoría de la QJS Edith Reyes Serrato, jefa de sección de Bacteriología y la Q.C. Patricia Escorza Meneses, de esta misma sección de laboratorio.

Después de la autorización del proyecto de investigación por el Comité Local de Investigación, CLIEIS, se procedió a la realización del proyecto de investigación.

El cepario de *S. aureus* se obtuvo de muestras positivas de hemocultivo durante el periodo de marzo 2014 a noviembre 2018, la identificación microbiológica y el

perfil de resistencia de la bacteria, se hizo de forma automatizada con el instrumento Vitek 2 (Biomerieux). Los aislados que se obtuvieron durante junio a diciembre 2019, se identificaron microbiológicamente y se obtuvo el perfil de resistencia también a través del equipo automatizado Vitek 2 (Biomerieux). La resistencia a meticilina se verificó en todas las cepas MRSA siguiendo las recomendaciones de la CLSI 2019, por lo que se utilizó la técnica de difusión en agar con el uso de sensidisco de cefoxitina (30µg) y la amplificación de *mecA* por PCR. La evaluación de la producción de biofilm se realizó fenotípica y genotípicamente. El fenotipo se determinó con el método de Cristal Violeta; mientras que el genotipo se obtuvo por PCR (operón *ica*).

## **CONTROL DE CALIDAD**

### **Validación de medios de cultivo por el Método Ecométrico Modificado**

Este método implica el desarrollo de unidades formadoras de colonias por superficie de área (UFC/mm<sup>3</sup>), sembrado en espiral. Evalúa la capacidad del medio a promover el crecimiento microbiano (UFC) y deberá inhibir organismos sensibles a los agentes selectivos del medio (ejemplo: MSA2, microorganismos sensibles a NaCl 7.5%). Se recomienda para el monitoreo de rutina de medios comerciales, deshidratados y listos para usar dentro de su fecha de caducidad y aquellos que se preparan en el laboratorio, para verificar funcionalidad.

### **Técnica de PCR**

Se evaluó la calidad de la técnica al agregar en la visualización del gel de agar un control de reactivos con agua inyectable, control positivo con cepa ATCC de *S.aureus* y control negativo *Rhodococcus* spp.

## **Medidas de bioseguridad y eliminación de desechos**

Nivel de bioseguridad 2, en el cuál las prácticas, equipos, diseño y construcción de instalaciones son aplicables a laboratorios educativos, de diagnóstico, clínicos u otros laboratorios donde se trabaja con un amplio espectro de agentes de riesgo moderado que se encuentran presentes en la comunidad y que están asociados con enfermedad humana de variedad variable. Se colocó señales de advertencia del peligro biológico en puertas, las puertas deben abrirse hacia adentro y cerrarse solas, la calefacción, ventilación e iluminación deben ser adecuadas, el acceso se limitará a personal autorizado.

En prácticas microbiológicas, estos agentes se pueden utilizar en forma segura en actividades realizadas en una mesa de trabajo. Se deben utilizar barreras primarias de protección facial, cabello recogido, batas de manga larga; y guantes de nitrilo, contar con barreras secundarias como el lavado de manos e instalaciones de descontaminación de desechos de cultivo microbiológico por autoclave. Se utilizó campana de flujo laminar para la manipulación de las cepas para los procesos de extracción de DNA y PCR. Al finalizar la manipulación, el lugar de trabajo se debe limpiar con alcohol 70%.

El pipeteo de líquidos se realizó con instrumentos automatizados y puntas de pipeta nuevas. Durante el centrifugado de líquidos, nunca se abrirá la tapa de la centrifuga mientras esté funcionando. Si durante la centrifugación se rompe un tubo o se derrama del contenido, desconectarla, mantenerla cerrada durante 10

minutos desde la detención completa, rociar la parte inferior de la centrifuga con cloro al 10% durante 30 min.

Ante la rotura de frascos con muestra, se recogerán los restos con pinzas, colocar en un recipiente adecuado y esterilizar en autoclave.

## **Métodos microbiológicos**

### **1. Recepción de hemocultivos positivos**

Se recibieron hemocultivo periférico positivo que cuente con datos de los pacientes y la muestra en laboratorio de bacteriología.

### **2.- Aislamiento de cocos Gram positivos**

- A partir del hemocultivo positivo se sembraron en caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), dejar incubar de 35 a 37°C de 24 a 48 h en ambiente aeróbico.
- A partir del BHI turbio tomar con un hisopo estéril, quitando el excedente en las paredes del tubo e improntar en GS 5% y en medio cromogénico CPS y sembrar con asa bacteriológica por estría cruzada, incubar de 24 a 48 h de 35 a 37°C en ambiente aeróbico.
- Revisar la pureza de la cepa
- Realizar tinción Gram, prueba de catalasa y coagulasa, el género *S. aureus* el cual es un coco Gram y coagulasa positiva.

### **3.- Identificación y susceptibilidad de *S. aureus* por el sistema automatizado**

#### **Vitek 2.**

- En cultivos puros de 24 h de cepas ya identificadas como cocos Gram, catalasa y coagulasa positivos realizar una suspensión en solución SS al 0.45% a una concentración de 0.5 McFarland para realizar pruebas de identificación y de susceptibilidad con equipo Vitek 2 ® Biomerieux utilizando tarjetas de identificación GP y de sensibilidad AST-GP67. Las cepas identificadas como *S. aureus* se conservarán.

### **4.- Conservación de aislados clínicos**

#### *Conservación a -20°C*

- A partir de cultivos puros de 24 h de *S. aureus* y resembrar en cuatro tubos Eppendorf , 2 con 1mL de caldo soya tripticaseína con glicerol al 5% y 2 con 1mL de caldo BHI con glicerol al 5% para conservación en congelación a – 20°, tomar una asa cargada de cultivo para cada tubo.

### **5.- Activación de cepas**

- A las cepas congeladas a -20°C tomar con hisopo estéril y resembrar en caldo BHI de 24 a 48 h de 35 a 37°C
- Revisar turbidez y resembrar en GS 5% de eritrocitos de carnero y agar cromogénico CPS incubar 24 a 48 h de 35 a 37°C en ambiente aerobio.

### **6.- Purificación de cepas**

- En caso de contaminarse la cepa durante el proceso de conservación, una vez activada la cepa, escoger colonias puras de *S. aureus* y resembrar en

GS 5% y agar cromogénico CPS y agar sal y Manitol (MSA2) incubar 24 de 35 h a 37°C.

## 7.- Clasificación de cepas resistentes a metilina

### 7.1 Prueba de susceptibilidad a cefoxitina

Para la determinación de resistencia a metilina se detectará mediante la prueba de susceptibilidad a cefoxitina mediante método de difusión en agar (\* ver anexo), siguiendo las recomendaciones de la CLSI, 2019 (tabla 2).

**Tabla 2. Puntos de corte. Interpretación de Guías CLSI 2019**

| <i>S. aureus</i>          |   |     |
|---------------------------|---|-----|
| Disco de cefoxitina 30 µg |   |     |
| mm de diámetro            |   |     |
| S                         | I | R   |
| ≥22                       | - | ≤21 |

#### **\*Método de difusión en agar:**

1. Tomar de 1 a 2 colonias, inocular en tubos con 3 mL de caldo MH hasta ajustar al 0.5 del Nefelómetro de McFarland.
2. Sembrar masivamente con hisopos estériles en placas de MH.
3. Dejar absorber el inóculo por 60 seg aproximadamente.
4. Colocar los sensidiscos de cefoxitina (30 µg).
5. Incubar las placas a 35°C +/- 2°C por 16 a 18 h en aerobiosis.

6. El diámetro de los halos de inhibición (mm) de cada aislamiento se comparará con los criterios establecidos (CLSI, 2018) determinar la resistencia (R) o susceptibilidad (S) a los antibióticos.

## 8.- Evaluar la producción de biofilm, detección genotípica

### 8.1 *icaADBC*

Los iniciadores para la amplificación del operón *ica* se muestran en la tabla 4 (Herrera-Cuevas; 2016).

**Tabla 4. Iniciadores diseñados del gen *icaADBC***

| Primer        | Secuencia                     | Tm   | Tamaño(bp) |
|---------------|-------------------------------|------|------------|
| <i>icaA-F</i> | 5'-CGTTGATCAAGATGCACC-3'      | 59.2 | 319pb      |
| <i>icaA-R</i> | 5'-CCGCTTGCCATGTGTTG-3'       | 60.9 |            |
| <i>icaB-F</i> | 5'-TGGATTAACCTTTGATGATATGG-3' | 54.3 | 409pb      |
| <i>icaB-R</i> | 5'-AGGAAAAAGCTGTACACACC-3'    | 55.3 |            |
| <i>icaC-F</i> | 5'-GGTCAATGGTATGGCTATTT-3'    | 54.1 | 148pb      |
| <i>icaC-R</i> | 5'-CGAACAACACAGCGTTTC-3'      | 56.2 |            |
| <i>icaD-F</i> | 5'-GGTCAAGCCCAGACAGAG-3'      | 56.7 | 150pb      |
| <i>icaD-R</i> | 5'-GAAATTCATGACGAAAGTATC-3'   | 54.3 |            |

El programa de amplificación para cada uno de los genes (*icaADBC*) se estandarizará; la temperatura de alineamiento que se empleará inicialmente será de 50°C. La visualización de los amplicones se realizará por electroforesis en geles de agarosa.

## 8.2. Detección fenotípica de biofilm.

Los ensayos cualitativo y cuantitativo, para la formación de biofilm, se realizarán a partir del método de cristal violeta (CV) en placa de poliestireno, utilizando la cepa de referencia de *S. aureus* ATCC 27543 como control positivo, caldo MH estéril como control negativo y los aislados MRSA de origen intrahospitalario. La cuantificación de biofilm se realizará en el espectrofotómetro a una absorbancia de 570 nm; el ensayo se realiza por triplicado y se obtiene la media (X) y desviación estándar (DS). La cantidad de CV absorbido es directamente proporcional a la formación de biofilm.

## 9.- Clasificación de *S.aureus*

| RESISTENCIA A METICILINA | PRODUCCION DE BIOFILM     |                      | CLASIFICACION                        |                                     |
|--------------------------|---------------------------|----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| MSSA                     | DETECCION FENOTIPICA      | DETECCION GENOTIPICA |                                      |                                     |
| MRSA                     | PRODUCCION DE BIOFILM (-) | <i>icaADBC(+)</i>    | MRSA BIOFILM(-)<br><i>icaADBC(+)</i> | No expresa el operón <i>ica</i>     |
|                          |                           | <i>icaADBC(-)</i>    | MRSA BIOFILM(-)<br><i>icaADBC(-)</i> |                                     |
|                          | PRODUCCION DE BIOFILM (+) | <i>icaADBC(+)</i>    | MRSA BIOFILM(+)<br><i>icaADBC(+)</i> | Expresa el operón <i>ica</i>        |
|                          |                           | <i>icaADBC(-)</i>    | MRSA BIOFILM(+)<br><i>icaADBC(-)</i> | Biofilm mediado por otras proteínas |

## **IX. Aspecto éticos**

Conforme a la ley general de salud en el capítulo de investigación en el artículo 17, el grado de riesgo para el paciente en el estudio es *Sin Riesgo*, por lo que no se requiere consentimiento informado por escrito, debido a que se trabajará cepas aisladas de hemocultivos positivos. Por lo cual no existen implicaciones éticas para este estudio, ya que no se requiere interacción directa con el paciente. Tampoco se contrapone a los lineamientos establecidos por la Ley General de Salud Mexicana en el capítulo de investigación, ni a la declaración de Helsinki.

### **Consentimiento informado**

No se requiere consentimiento informado por el tipo de estudio.

## **X. Análisis estadístico**

El análisis estadístico incluye:

- El cálculo de frecuencias simples con intervalos de confianza al 95%.
- Los datos estadísticos se analizarán con el programa SPSS versión 21.

## **XI. Recursos humanos y financieros**

### **Personal**

- La tesista, médico residente del 3º año de Patología Clínica del Hospital de General del Centro Médico Nacional La Raza, realizará todos los procedimientos bacteriológicos en el laboratorio.

### **Financieros**

#### **Recursos para la realización del proyecto:**

- **Soluciones y reactivos**
  - Solución Salina 0.45%
  - Solución Salina 0.9%

- Tinción de Gram
- Reactivo de Catalasa
- Reactivo de Coagulasa
- **150** tarjetas de Identificación Gram positivos y sensibilidad AST-GP67 del Instrumento Vitek 2, Biomerieux
- Sensidisco de Cefoxitina 30µl

- **Medios de cultivo**

- Agar Muller-Hinton
- Caldo Muller-Hinton
- Agar Gelosa Sangre
- Caldo BHI
- Caldo Soya Trypticase con Glicerol 0.5%

- **Procedimientos Biología Molecular**

#### **Extracción de DNA**

- TE (EDTA y Tris-HCL)
- Sarcocinato
- Acetato de Amonio
- Cloroformo-Isoamílico
- Isopropanol
- Etanol
- Agua Inyectable
- Tubos Eppendorf
- Pipetas automatizadas 10 µl, 100 µl, 1000 µl
- Puntas para pipetas automatizadas 10 µl, 100 µl, 1000 µl

#### **Determinación de genes *mecA***

- Primer: *mecA-F*, *mecA-R*

- Mezcla de amplificadores: Regulador PCR, Iniciador-F, Iniciador-R, MgCl<sub>2</sub>, DNTPs, H<sub>2</sub>O, Taq polimerasa.

#### **Determinación operón *icaABCD***

- Primer: *icaA-F*, *icaA-R*, *icaB-F*, *icaB-R*, *icaC-F*, *icaC-R*, *icaD-F*, *icaD-R*.
- Mezcla de amplificadores: Regulador PCR, Iniciador-F, Iniciador-R, MgCl<sub>2</sub>, DNTPs, H<sub>2</sub>O, Taq polimerasa.

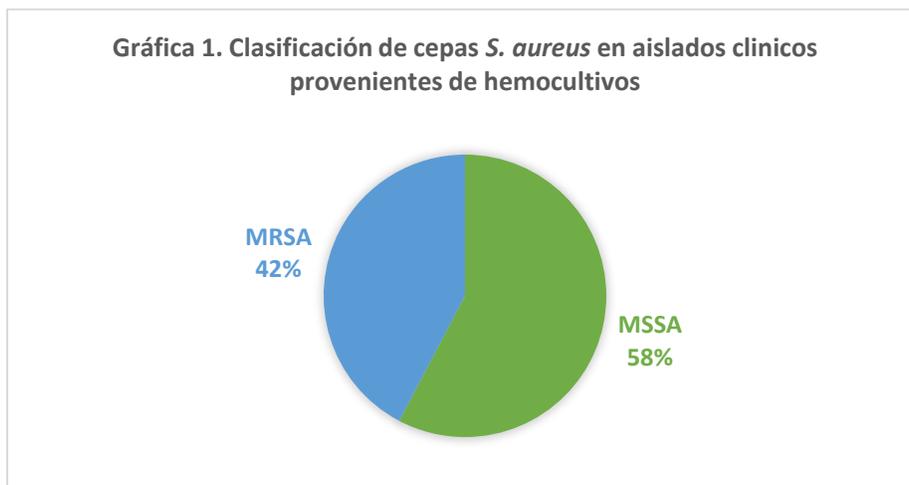
## **XII.- Resultados**

### 1. Identificación de cepas

Se analizaron 156 muestras correspondientes a microorganismos Gram positivos, catalasa y coagulasa positivos, identificados como *Staphylococcus aureus* provenientes de hemocultivos.

### 2. Determinación de resistencia metilina por medio de sistema automatizado Vitek 2.0®.

Mediante tarjetas de identificación GP y de sensibilidad AST-GP67, el sistema automatizado reportó que 42% (66/156) fueron MRSA (Gráfica 1).



3. Determinación de resistencia a meticilina (CLSI 2019) mediante la prueba de Kirby Bauer

Se realiza prueba de susceptibilidad a cefoxitina mediante el método de Kirby Bauer, siguiendo las indicaciones de las guías del CLSI 2019, se tomó de 1 a 2 colonias, e inoculó en tubos con 3 mL de caldo MH hasta ajustar al 0.5 del Nefelómetro de McFarland. Se sembró masivamente con hisopos estériles en placas de MH. Se dejó absorber el inóculo por 60 seg aproximadamente y se colocó los discos de cefoxitina (30 µg), se dejó incubar las placas a 35°C +/- 2°C por 16 a 18 h en aerobiosis. El diámetro de los halos de inhibición (mm) de cada aislamiento se comparará con los criterios establecidos (CLSI, 2019) para determinar la resistencia (R) <21 o susceptibilidad (S) >22 a los antibióticos. De lo cual se obtuvo una resistencia a este medicamento en el 100%, corroborando los datos obtenidos mediante el equipo automatizado Vitek 2.0®.

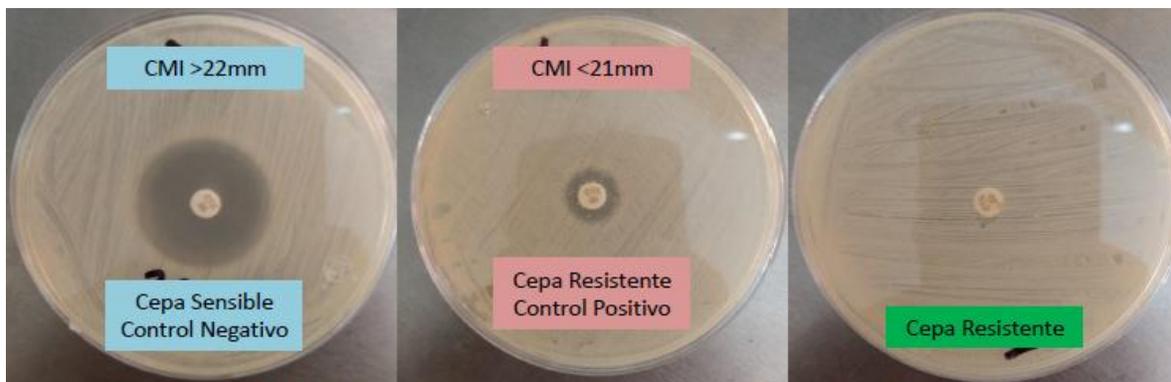


Figura 1. Método de difusión en agar con disco de cefoxitina (30µg)

#### 4. Formación de Biofilm detección fenotípica

Los ensayos para la formación de biofilm, se realizarán a partir del método de cristal violeta (CV). La cuantificación de biofilm se realizó en el espectrofotómetro a una absorbancia de 570 nm (figura 2); el ensayo se realizó por triplicado y se obtiene la media (X) y desviación estándar (DS). La cantidad de CV absorbido es directamente proporcional a la formación de biofilm.

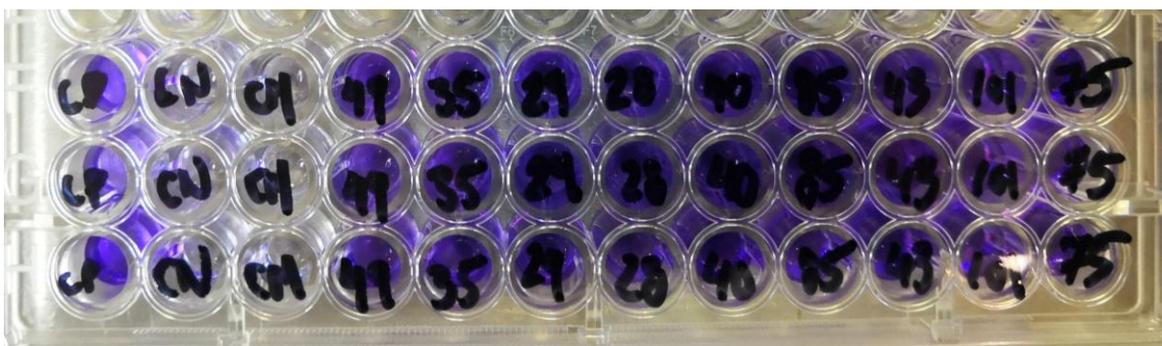


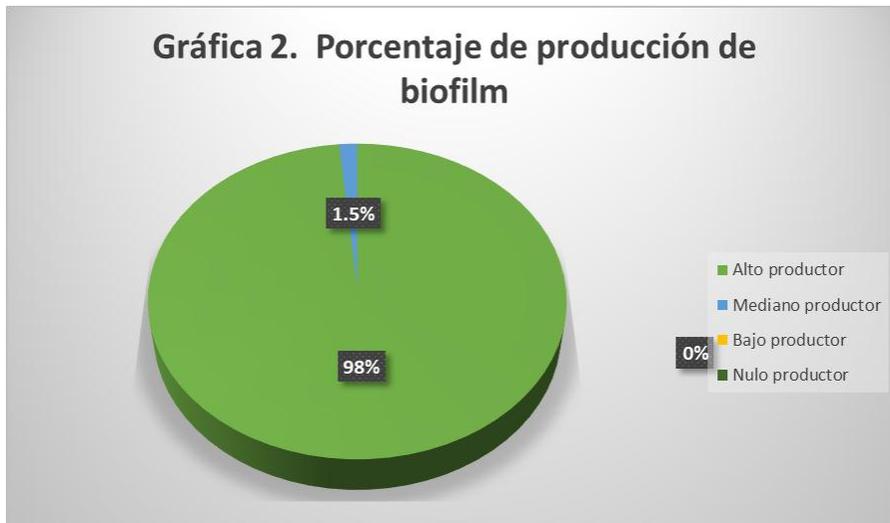
Figura 2. Prueba de biofilm cuantitativo, con controles; positivos, negativos y de medios.

Para facilitar el resultado de esta prueba y su más fácil agrupación se realizaron 4 categorías: no productoras, bajas productoras, moderadas productoras y altas productoras de biofilm. La clasificación se realizó a partir de las lecturas obtenidas y se compararon con la absorbancia del colorante CV (tabla 5).

Tabla 5. Clasificación producción de biofilm

| <b>Producción de biofilm</b> | <b>Absorbancia</b> |
|------------------------------|--------------------|
| <b>No productor</b>          | <0.001             |
| <b>Bajo productor</b>        | 0.001-0.500        |
| <b>Moderado productor</b>    | 0.501- 0.900       |
| <b>Alto productor</b>        | >0.901             |

Encontramos que la producción de biofilm en las cepas MRSA fueron altas productoras en un 98.48% (65/66), y moderas en un 1.52% (1/66), no se observó ninguna cepa nula ni baja productora de biofilm (grafica 2).



##### 5. Formación de Biofilm detección genotípica

Los genes *icaADBC* se amplificaron por PCR y se observaron mediante un gel de agarosa con un corrimiento de 80mv, la talla molecular correspondiente a cada uno de los amplicones detectados fueron: para *icaA* (319pb); *icaB* (409pb); *icaC* (148pb) e *icaD* (150pb), el control positivo fue la cepa de referencia ATCC 12228, *S. epidermidis icaADBC+*. Los resultados que se obtuvieron fueron para *icaA* 45.45% (30/66), *icaD* 98.48% (65/66) , *icaB* 34.84%(23/66) e *icaC* 50%(33/66) (gráfica 3; figura3 ); el porcentaje de detección de los genes que se encontró es variado, probablemente por la disposición del operón, además que en algunas cepas puede haber la formación de orquillas, e incluso mutaciones a lo largo del operón.

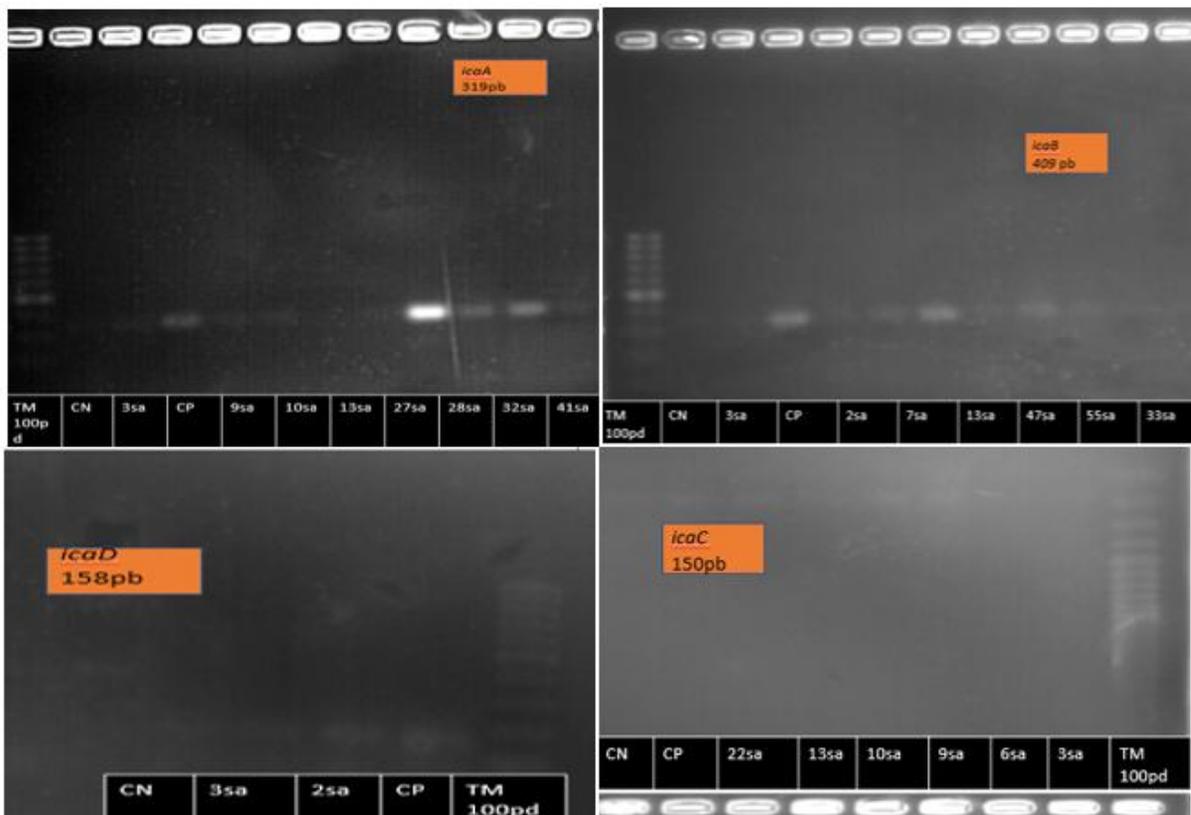
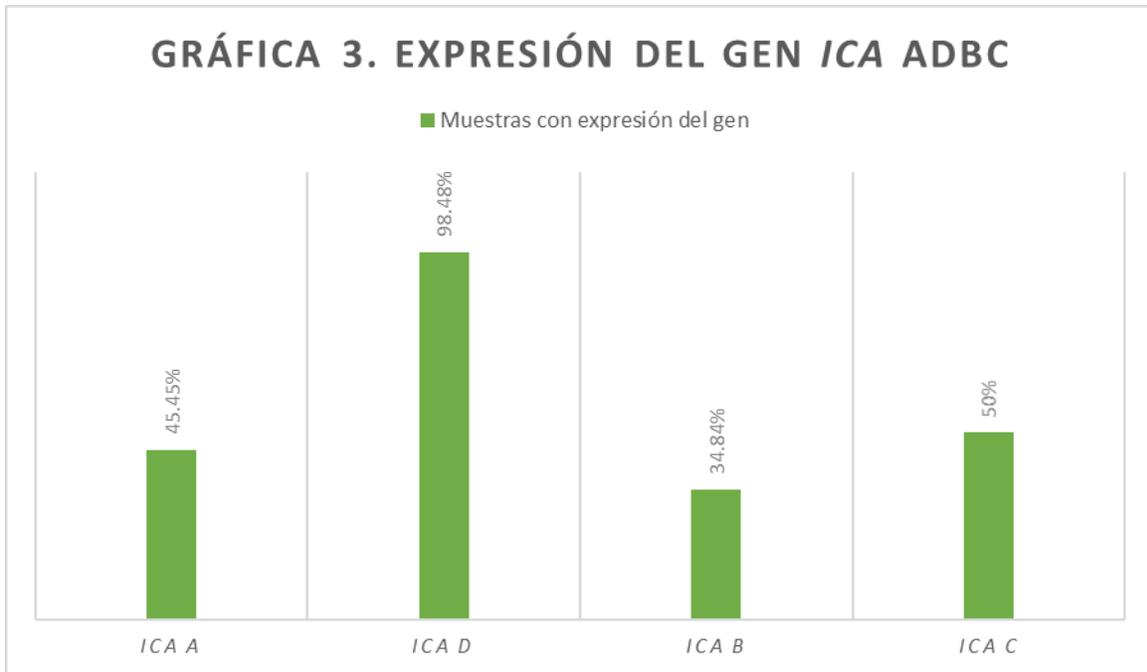


Figura 3. Electroferograma en gel de agarosa al 1,5% de los genes *icaADBC* por PCR en cepas MRSA

\*TM: talla molecular; CN: control negativo; CP: control positivo; #sa: número de cepa correspondiente.

### XIII.- Discusión

Debido a que *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina tiene la capacidad de producir un amplio rango de infecciones y síndromes clínicos, mundialmente se ha convertido en uno de patógeno intrahospitalario más significativo; además de contar con múltiples factores de virulencia que lo hace necesario implementar programas efectivos de vigilancia para la identificación y control de cepas epidémicas, en nuestra población encontramos que el 42% (66/156) fueron MRSA, como ya se había comentado anteriormente en países de América latina encontramos altos porcentajes que oscilan entre un 50 y 80% en hospitales de tercer nivel<sup>33</sup> y en México se reporta entre 5 y 70%<sup>38</sup>.

La CDC en Estados Unidos reportó que gracias a medidas que se han tomado durante los últimos años las infecciones del torrente sanguíneo debido a MRSA han disminuido, sin embargo, han aumentado ligeramente las infecciones debido a *S. aureus* susceptible a la meticilina.<sup>41</sup>

En un estudio que se llevó acabo en cepas aisladas de terapia intensiva, en el 2014 se encontró que la producción de biofilm con alta producción era de 36.1%, moderada producción en un 41.6% y poca producción en un 22.3%, reportando la presencia de *icaA* en un 58.3%, *icaB* 47.2%, *icaC* 63.8% e *icaD* 69.5%<sup>42</sup>; otro estudio que se realizó en Theran en el 2015 mostró que el 36.1% de los MRSA tenía una alta producción de biofilm y el resto se encontraba entre un moderado a leve producción junto con una expresión de *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* de 76%, 69%, 64%, y 74%, respectivamente<sup>43</sup>; así mismo otro estudio que se realizó en esta misma ciudad en el 2014 se encontró una producción alta de biofilm en un 55%, 40% fue moderada y solamente el 5% fue baja producción de biofilm, y se reportó

*icaA* 60.3%, *icaB* 34.2%, *icaC* 100% e *icaD* en un 100%.<sup>44</sup> En un estudio que se realizó en solamente cepas obtenidas de hemocultivos se observa que el 38.7% tiene una alta producción de biofilm, pero todas las cepas tienen la capacidad de producirlo, además de una expresión de *icaD* del 80.6% e *icaA*, *icaB* e *icaC* estaban en 51.6%, 45.1% y 77.4% respectivamente<sup>45</sup>. En un estudio realizado en Iran en el 2019 se encontró una producción alta de 87.5%, 4.2% and 4.2% moderada y baja producción de biofilm respectivamente junto con *icaA* e *icaD* en un 75.0% los demás genes no se detectaron<sup>46</sup>. Otro estudio realizado en el 2016 donde se buscaban otros genes de resistencia se encontró que *icaA* se expresaba en un 38.8% y la coexistencia de *icaA* e *icaD* junto con otros genes como *fib* y *eno* era del 20.3%.<sup>47</sup> En un estudio que pretendía también estudiar más genes de adhesión y regulación de biofilm en Oaxaca en el 2016 se encontró que los genes *icaA*, *icaD*, *eno*, *ebps*, *clfA*, *clfB* se expresaban en el 100% mientras que genes *fnbA*, *fnbB*, *fib*, y *bbp* tuvieron una distribución variable<sup>48</sup>. En México un estudio realizado en hospitales de la Ciudad de México en el 2019 se reporta que todas las cepas fueron productoras de biofilm, mayormente en una mediana producción 60%, y presentaron genotipo *icaADCB*<sup>49</sup>.

Los resultados obtenidos que las cepas MRSA presentan una alta capacidad de producción de biofilm a pesar de que existen ciertas discrepancias con datos publicados por otros grupos, estas puedan deberse a diferencias en la distribución geográfica de las cepas analizadas y los sitios de donde fueron aisladas las muestras.

#### XIV.- Conclusión

Se analizaron 156 muestras 42% (66/156) de las cepas fueron MRSA, de las cuales el 100% (66/66) presentaron el gen *mecA*, por lo que, el 100% (66/66) mostraron resistencia de cefoxitina por el método de Kirby-Bauer. La producción de biofilm en las cepas MRSA fueron altas productoras en un 98.48% (65/66), y moderas en un 1.52% (1/66), ninguna se registró como cepas nula y baja productora de biofilm. Los resultados que se obtuvieron para la expresión de genes fueron para *icaA* 45.45% (30/66), *icaD* 98.48% (65/66) , *icaB* 34.84%(23/66) e *icaC* 50%(33/66).

Es importante establecer los factores que definen la patogenicidad en nuestra comunidad ya que permitirá establecer una estrategia terapéutica oportuna y eficaz y protocolizar medidas preventivas. El estudio de MRSA seguirán siendo un área importante de investigación y desarrollo mediante la aplicación de técnicas de biología y que permitan establecer alternativas de diagnóstico, tratamiento y prevención en el ámbito hospitalario ya que continúa siendo un patógeno comúnmente asociado a enfermedades intra y extra hospitalarias.

## XV. Referencias

- 1.- Cervantes-García E, García-Gonzalez R, Salazar-Schettino P. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Medigraphic. 2014; 61 (1): 28-40
- 2.- Cervantes García E, González RG, María P, Schettino S. *Staphylococcus aureus* asociado a la comunidad (CA-MRSA). Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. 2015;62(2):100–11.
- 3.- Everhart JS, Mayerson JL, Glassman AH, Barlow JD, Bishop JY, Scharschmidt TJ. Prior staphylococcal bacteremia and risk of surgical site infection after total joint arthroplasty: a nested case-control study. Curr Orthop Pract. 2018;29(1):1–6.
- 4.- Guadalupe Miranda Novales M, Guadalupe Miranda M. Miranda 2011. Bol Med Hosp Infant Mex. 2011;68(4):242–9.
- 5.- Sousa MA De, Solo F. Surveillance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Pediatric Hospital in Mexico City during a 7-Year Period ( 1997 to 2003): Clonal Evolution and Impact of Infection Control. 2004;42(8):3877–80.
- 6.- Seas C, Guzma M, Meji C, Rodri E, Alvarez C, Bavestrello L, et al. International Journal of Infectious Diseases Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. 2010;14:560–6.
- 7.- Guillén R, Carpinelli L, Rodríguez F, Castro H, Quiñónez B, Campuzano A, et al. *Staphylococcus aureus*. 2016; 33 (6): 609-618
- 8.- Korn GP, Martino MD, Mimica IM, Mimica LJ, Chiavone P a, Musolino LR. High frequency of colonization and absence of identifiable risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in intensive care units in Brazil. Braz J Infect Dis. 2001;5(1):1–7.

- 9.- Mahavanakul W, Nickerson EK, Srisomang P, Teparrukkul P, Lorvinitnun P, Wongyingsinn M, et al. Feasibility of modified surviving sepsis campaign guidelines in a resource-restricted setting based on a cohort study of severe *S. aureus* sepsis. *PLoS One*. 2012;7(2):1-8.
- 10.- Sebastián Castillo J, Lucía Leal A, Arturo Álvarez C, Alberto Cortés J, Elena Henríquez D, Buitrago G, et al. Bacteriemia por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en la unidad de cuidados intensivos: revisión de los estudios de pronóstico. *Infectio [Internet]*. 2011;15(1):25–32.
- 11.- Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. Properties , regulation and roles in human disease *Staphylococcus aureus* biofilms. 2011;2(5):445–59.
- 12.- Walker JN, Crosby HA, Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Malone CL, Rosenthal CB, et al. The *Staphylococcus aureus* ArlRS Two-Component System Is a Novel Regulator of Agglutination and Pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2013;9(12):1–
- 13.- Harris LG, Foster SJ, Richards RG, Lambert P, Stickler D, Eley A. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. *Eur Cells Mater*. 2002;4:39–60
- 14.- Pinilla G, Bautista A, Cruz C, Chavarro B, Navarrete J, Muñoz L, et al. Determinación de factores de adhesión asociados a la formación de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. *NOVA*. 2017; 15 (27): 67-75
- 15.- Rivera A, Barragán A, Barragán J. Actualización en Bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. *MEDICINA U.P.B*. 33 (1): 48-55.

- 16.- Halebeedu Prakash P, Rajan V, Gopal S. Predominio de SCCmec tipos IV y V en las cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de biopelículas aisladas de infecciones de dispositivos médicos en hospitales terciarios de Mysuru, India. *Enferm Infecc Microbiol Clinic*. 2017;35(4):229–35.
- 17.- Dice B, Stoodley P, Buchinsky F, Metha N, Ehrlich GD, Hu FZ. Biofilm formation by ica-positive and ica-negative strains of *Staphylococcus epidermidis* in vitro. *Biofouling*. 2009;25(4):367–75.
- 18.- Ferreira FA, Souza RR, Bonelli RR, Américo MA, Fracalanza SEL, Figueiredo AMS. Comparison of in vitro and in vivo systems to study ica-independent *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Microbiol Methods*. 2012;88(3):393–8.
- 19.- Stefani S, Goglio A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *Int J Infect Dis*. 2010;14 (4):19–22.
- 20.- Cue D, Lei MG, Lee CY. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2(38):1–13.
- 21.- Alberto Castañón-Sánchez C. Artículo de revisión Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Medigraphic*. 2012;5 (3):79–84.
- 22.- Rodríguez Tamayo, Erika Andrea; Jiménez Quiceno, Judy Natalia Factores relacionados con la colonización por *Staphylococcus aureus*, *IATREIA*. 28(1): 66-7
- 23.- Lee JS, Bae YM, Moon SK, Lee SY. Survival of *Staphylococcus aureus* with different characteristics (antibiotic susceptibility, presence ica of gene, and colony morphology) in biofilms on stainless steel. *J Food Saf*. 2017;37(3):1–9.

- 24.- Paharik AE, Horswill AR. The Staphylococcal Bio film : Adhesins , Regulation , and Host Response. *Microbiol Spectrum* 2016. 4(2):1–27.
- 25.- Mirzaee M, Najar-peerayeh S, Behmanesh M, Forouzandeh M, Ghasemian A. Detection of Intracellular Adhesion (ica) Gene and Biofilm Formation *Staphylococcus aureus* Isolates from Clinical Blood Cultures. *J Med Bacteriol.* 2014;3(1):1–7.
- 26.- Staphylococcus B. crossm A Novel Repressor of the ica Locus Discovered in Clinically Isolated Super. *American society for microbiology.* 2017;8(1):1–17.
- 27.- Cue D, Lei MG, Luong TT, Kuechenmeister L, Dunman PM, O'Donnell S, et al. Rbf promotes biofilm formation by *Staphylococcus aureus* via repression of icaR, a negative regulator of icaADBC. *J Bacteriol.* 2009;191(20):6363–73.
- 28.- Shrestha L, Kayama S, Sasaki M, Kato F, Hisatsune J, Tsuruda K, et al. Inhibitory effects of antibiofilm compound 1 against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Microbiol Immunol.* 2016;60(3):148–59.
- 29.- Pan ES, Diep BA, Carleton HA, Charlebois ED, Sensabaugh GF, Haller BL, et al. Increasing Prevalence of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* Infection in California Jails. *Clin Infect Dis.* 2003;37:1384–8.
- 30.- Hashiguchi T, Zenmyo M, Yamamoto T, Ijiri K, Kawano Y. Orthopaedic device-related infections *IMMUNOLOGY & MEDICAL MICROBIOLOGY.* 2011;63:10–5.
- 31.- OMS, Estadísticas Sanitarias Mundiales. 2014; 2-12.
- 32.- Song J, Hsueh P, Chung DR, Ko KS, Kang C, Peck KR, et al. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study. 2011;(February):1061–9.

- 33.- Guzmán-Blanco M, Mejía C, Isturiz R, Alvarez C, Bavestrello L, Gotuzzo E, et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;34(4):304–8.
- 34.- Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Infecciones causadas por bacterias Grampositivas Multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp.). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(8):543–51.
- 35.- Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* metiliclorresistente. *Salud Pública Mex*. 2005;47(5):381–7.
- 36.- Halebeedu Prakash P, Rajan V, Gopal S. Predominio de SCCmec tipos IV y V en las cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de biopelículas aisladas de infecciones de dispositivos médicos en hospitales terciarios de Mysuru, India. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(4):229–35.
- 37.- Gil M, Nicita G. Formación de biopelículas en aislados de *Staphylococcus aureus* según la susceptibilidad antimicrobiana y la procedencia clínica. *VITAE*. 2015; 62: 1-8.
- 38.- Francisca S, Martínez C, Pastrana GT, Alberto C, Sánchez C. Distribución de genes de adhesión y regulación de biofilm en *Staphylococcus aureus*. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2016;50(4):713–20
39. Ochoa Pérez SA. Diversidad genética de cepas de *Helicobacter pylori* por RAPD-PCR y patrones de susceptibilidad a antimicrobianos, [tesis de maestría], Ciudad de México (IPN): Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2006.

40. Herrera Cuevas M. Genes *mecA* en cepas formadoras de biofilm in vitro MRSA y MRSCN asociadas a infección intrahospitalaria, [tesis de maestría], Ciudad de México (IPN): Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2016.
41. Kourtis, A. P., Hatfield, K., Baggs, J., Mu, Y., See, I., Epton, E. & Ray, S. M. Vital signs: epidemiology and recent trends in methicillin-resistant and in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections—United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2019; 68(9), 214.
42. Mirzaee, Mohsen, et al. "Biofilm formation and presence of *ica* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from intensive care unit." *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2014: 43-51.
43. Ghasemian, Abdolmajid, et al. "Comparison of biofilm formation between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus*." *Iranian biomedical journal* 2016: 175.
44. Mirzaee, Mohsen, Shahin Najari Peerayeh, and Abdol-Majid Ghasemian. "Detection of *icaABCD* genes and biofilm formation in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*." *Iranian Journal of Pathology* 2014: 257-262.
45. Mirzaee, Mohsen, et al. "Detection of intracellular adhesion (*ica*) gene and biofilm formation *Staphylococcus aureus* isolates from clinical blood cultures." *Journal of Medical Bacteriology* 2014: 1-7.
46. Omid, Mitra, et al. "Ability of biofilm production and molecular analysis of *spa* and *ica* genes among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *BMC Research Notes* 2020: 1-7.

47. Motallebi, Mitra, et al. "Spreading of genes encoding enterotoxins, haemolysins, adhesin and biofilm among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains with staphylococcal cassette chromosome mec type IIIA isolated from burn patients." *Microbial pathogenesis* 2016: 34-37.
48. Martínez, Sofía Francisca Cruz, Gabriela Tapia Pastrana, and Carlos Alberto Castañón Sánchez. "Distribución de genes de adhesión y regulación de biofilm en *Staphylococcus aureus*." *Acta bioquímica clínica latinoamericana* 2016: 713-720.
49. García, Ayerim, et al. "Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativa en México." *Biomédica* 2019: 513-523.

## **XIV. Anexos**

### **1. Conservación**

1. De cepas puras de 24 h se conservarán en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  por duplicado en tubos Eppendorf que contengan caldo con soya tripticaseína con glicerol al 5% (CST-G) y con caldo BHI con glicerol al 5% (BHI-G).
2. Se tomarán de una a dos asadas del cultivo puro para realizar una suspensión densa en los medios de cultivo previamente mencionados, los cuales se incubarán por 24 h. a una temperatura de  $35-37^{\circ}\text{C}$  en ambiente aeróbico. Se sacarán de la estufa los medios de cultivo y pasarán posteriormente a congelación a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2. Activación y purificación de cepas**

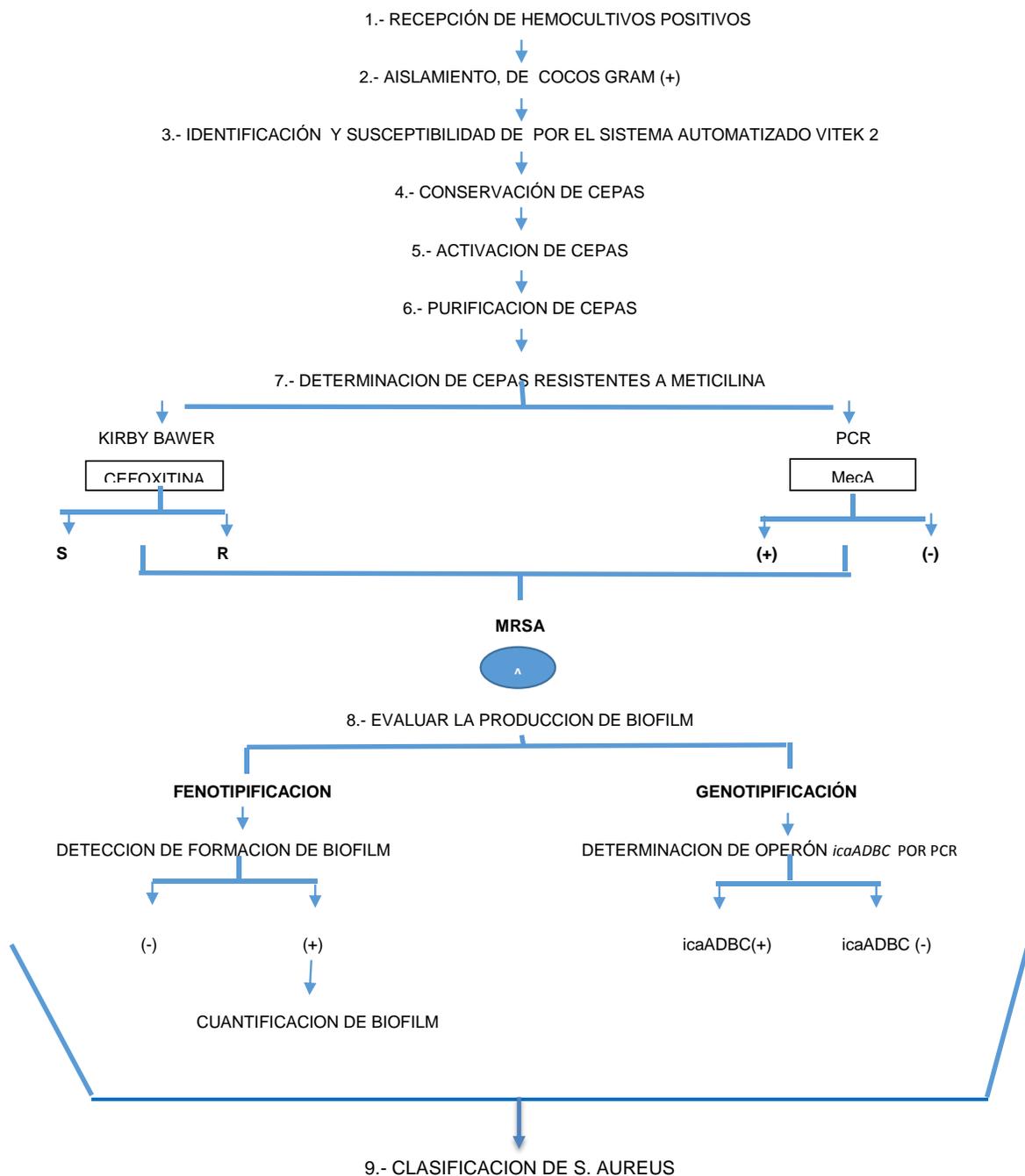
1. Tomar un tubo de las cepas congeladas y frente a mechero tomar con un hisopo estéril parte del medio de cultivo y colocarlo en un tubo con 5 ml de caldo BHI, estéril, atemperado. Realizar este procedimiento para cada una de las cepas a procesar.
2. Agitar los tubos de BHI con vortex de 30 a 60" y posteriormente incubar en estufa de  $35-37^{\circ}\text{C}$ , 24 hr en ambiente aeróbico.
3. Revisar la formación de turbidez (crecimiento bacteriano) en los tubos de BHI y frente a mechero los que presenten turbidez positiva sembrar en placas de gelosa sangre con 5% de eritrocito de ternero.
4. Sembrar por estría cruzada e incubar de  $35-37^{\circ}\text{C}$ , 24 hr en ambiente aerobio.
5. Posterior a la incubación, revisar la pureza del cultivo, y en caso de ser necesario realizar un nuevo aislamiento en otra placa de gelosa sangre, bajo las mismas condiciones mencionadas en el punto cuatro.

### **3. Preparación de agar Hinton Mueller (AHM)**

1. Pesar 38 g de polvo de AHM y diluir en 1 lt de agua estéril.
2. Mezclar perfectamente y calentar con agitación frecuente hasta ebullición.
3. Checar pH con un potenciómetro hasta ajustar a un pH de 7.2 a 7.4
4. Esterilizar a 121°C 15 minutos 121 Lb
5. Una vez estéril el medio, enfriar de 40 a 45°C para realizar el vaciado en placa frente a mechero
6. Colocar una placa petri, estéril sobre una balanza granataria que se encuentre en una superficie plana para poder pesar la cantidad de AHM, con la finalidad de estandarizar el peso del medio con un grosor final de entre 3 a 4 mm (22 g ajustado a placas de 88 mm de diámetro)
7. Una vez vaciado el agar en las placas, dejar gelificar a temperatura ambiente, etiquetar y almacenar el medio en refrigeración de 4 a 8°C hasta su uso.

## 4. Flujograma de trabajo

### FLUJOGRAMA DE TRABAJO



## 5. Hoja de recolección de datos

“Detección fenotípica y genotípica de biofilm en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, aislados de hemocultivos en el Centro

Médico Nacional la Raza del 2014 al 2018”

NUMERO DE MUESTRA: \_\_\_\_\_ FOLIO INTERNO: \_\_\_\_\_

FECHA DE PROCESO: \_\_\_\_\_

| RESISTENCIA A METICILINA | PRODUCCION DE BIOFILM     |                      |
|--------------------------|---------------------------|----------------------|
| MRSA sensidisco          | DETECCION FENOTIPICA      | DETECCION GENOTIPICA |
|                          | PRODUCCION DE BIOFILM (-) | <i>icaADBC(+)</i>    |
|                          |                           | <i>icaADBC(-)</i>    |
| MRSA <i>mecA</i>         | PRODUCCION DE BIOFILM (+) | <i>icaADBC(+)</i>    |
|                          |                           | <i>icaADBC(-)</i>    |