



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus aureus* DE CATÉTERES DE  
PACIENTES DE DIÁLISIS PERITONEAL PORTADORES DE GENES DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y DESINFECTANTES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

PRESENTA:

ROSA MARIA RODRIGUEZ BEDOLLA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2016





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.

# *Dedicatoria . . . .*

Este trabajo está dedicado principalmente a mi mamá **Rosa María Bedolla Ortiz**, con mucho amor y cariño le dedico todo mi esfuerzo, ahora y a lo largo de toda mi vida, sin su amor y apoyo incondicional no habría podido llegar hasta este momento tan especial. Admiro la manera incansable en que siempre te esfuerzas para que a mi hermano y a mí nunca nos falte nada.

A mis abuelitos **Rosita** e **Isaías** que tanto amo y son el pilar de mi vida, que han estado junto a mí y me han apoyado en cada paso que he dado, gracias por todo su amor, atención y cuidados que tienen para mí, que siempre me han abrigado y guiado en cada momento de mi vida.

A mi hermano **Gabriel**, a mis tíos: **Marcos**, **Consuelo**, **Isaías** y **Paty**; a mis primos: **Marcos**, **Paola**, **Karla** y **Daniel**, que me llenan de alegría con su compañía, sus palabras, consejos, experiencias, risas e infinito amor.

A mis queridas **amigas Irma**, **Sandy**, **Fernanda**, **Sandrita** sin ustedes nada habría sido igual, gracias por escucharme, darme ánimos, por sus consejos, su hermosa amistad, palabras, abrazos, risas, viajes, prácticas, en fin, tantas cosas increíbles que pasamos.

No tengo palabras para agradecerle a cada una de ustedes su compañía en los momentos buenos y malos que hemos pasado, gracias porque nunca dejaron de creer en mí, por estar conmigo y apoyarme en todo este trayecto, ustedes son mi fuerza para salir adelante, son parte de este logro y de todos los que siguen.

# *Agradecimientos...*

Agradezco profundamente a mi directora de tesis **Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras** por aceptarme en su laboratorio, por depositar su confianza en mí, por su paciencia y tolerancia, por transmitirme sus conocimientos y sobre todo haberme dado la oportunidad de culminar esta etapa. Su experiencia y sabiduría me han ayudado en mi formación profesional.

Al **Dr. Eric Monroy** por brindarme su tiempo y atención en mi trabajo, tanto del laboratorio como de mi tesis, por guiarme en cada paso y apoyarme con sus conocimientos para finalizar este trabajo.

A las Biólogas **Paty** y **Susa** que me apoyaron en el trabajo de laboratorio, gracias por permitirme aprender de su experiencia y sus conocimientos, por su ayuda y por su gran amistad.

A mis sinodales **Dr. Sergio Vaca Pacheco** y **M. en C. Alina Uribe García** por sus valiosos consejos, observaciones y correcciones que realizaron.

A todos ustedes muchas gracias, son mi mayor ejemplo a seguir.

## INDICE

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	2
2.1 Características generales de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	2
2.2 Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	3
2.3 Enfermedades causadas por <i>S. aureus</i> . ....	4
2.4 Infecciones bacterianas asociadas a los catéteres de diálisis peritoneal.....	5
2.4 Resistencia a antibióticos y desinfectantes por <i>S. aureus</i> . ....	6
<b>3. Antecedentes</b> .....	8
<b>4. Justificación</b> . ....	10
<b>5. Objetivos</b> .....	11
5.1 Objetivo general. ....	11
5.2 Objetivos particulares.....	11
<b>6. Materiales y métodos</b> .....	12
6.1 Origen de las cepas e Identificación de <i>S. aureus</i> por pruebas bioquímicas. .....	12
6.2 Determinación de la susceptibilidad y/o resistencia a los antibióticos en las cepas de <i>S. aureus</i> . ....	12
6.3 Extracción de ADN.....	14
6.4 Identificación de <i>S. aureus</i> por PCR. ....	14
6.5 Identificación de los genes de resistencia a antibióticos y desinfectantes en <i>S. aureus</i> por PCR convencional. ....	15
6.6 Detección de los genes de resistencia a la tetraciclina ( <i>tetM</i> , <i>tetO</i> y <i>tet K</i> ) en las cepas de <i>S. aureus</i> .....	16
6.7 Detección de los genes de resistencia a aminoglucósidos [( <i>aac(6')</i> - <i>le-</i> <i>aph(2'')</i> - <i>la</i> )] y betalactamasas ( <i>blaZ</i> ) en las cepas de <i>S. aureus</i> .....	16
6.8 Detección de los genes de resistencia a la Vancomicina ( <i>vanA</i> y <i>vanB</i> ) en las cepas de <i>S. aureus</i> .....	17
6.9 Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de agarosa. ....	18
<b>7. Resultados</b> .....	19
7.1 Pacientes estudiados. ....	19
7.2 Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	20
7.3 Fenotipos de resistencia a antibióticos en las cepas de <i>S. aureus</i> . ....	23

7.4 Genotipos de resistencia a antibióticos y desinfectantes en las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	24
7.5 Diferentes combinaciones de genes que codifican resistencia a antibióticos y desinfectantes en cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de catéteres de pacientes con diálisis peritoneal.	30
<b>8. Discusión</b>	31
8.1 Pacientes analizados.	31
8.2 Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> .	31
8.3 Fenotipos de resistencia a antibióticos en las cepas de <i>S. aureus</i>	32
8.4 Detección de los genes que codifican para resistencia a antibióticos y desinfectantes en las cepas de <i>S. aureus</i> .	33
8.5 Combinaciones de los genes en las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de catéteres de diálisis peritoneal.	36
<b>9. Conclusiones</b>	37
<b>10. Literatura citada</b>	38

## 1. Resumen.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) frecuentemente se asocian a infecciones en los sitios de inserción de los pacientes con diálisis peritoneal. El tratamiento de estas infecciones se ha complicado debido a que las cepas de *S. aureus* frecuentemente acarrean diversos genes de resistencia a antibióticos y desinfectantes. El objetivo del presente estudio fue identificar los genes que codifican para resistencia a antibióticos y desinfectantes en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de infecciones asociadas a los catéteres de pacientes de diálisis peritoneal. Se analizaron 34 cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres de pacientes con diálisis peritoneal. Las cepas fueron identificadas por las pruebas bioquímicas de manitol, de la coagulasa y por PCR convencional mediante la amplificación de los marcadores cromosómicos *spa* (x-región), *23rRNA*, *nuc* y *coa*. Los fenotipos de resistencia a antibióticos fueron determinados por el método de Kirby-Bauer. El 100% (n=34) de las cepas de *S. aureus* fue resistente a Penicilina, Dicloxacilina y Eritromicina, en cada caso, 97% (n=33) a Ampicilina, 94%(n=31) a Pefloxacina, 91% (n=30) a Trimetoprim-Sulfametoxazol, 85% (n=29) a Gentamicina, 82% (n=28) a Cefotaxima, 71% (n=24) a Tetraciclina y 50% (n=33) a Cefalotina. El 100% (n=34) de las cepas fue portadora del gen *blaZ*, 73.5% (n=25) de *aac(69)/e-aph(20)/a* (Tabla 4), 32.3% (n=11) de *ermA*, 26.5% (n=9) de *mrsA* y 20.6% (n=7) de *ermB*. El 73.5% (n=25) de las cepas acarreó *tetM*, 59% (n=20) *tetK* y 6% (n=2) *tetO*. Con respecto a los desinfectantes, el 32.3% de las cepas (n=11) presentó *qacA/B* y 29.41% (n=10) *qacC*. Los genes *ermC*, *mef*, *vanA* y *vanB* no se encontraron presentes en ninguna de las cepas. Los resultados demostraron que las cepas de *S. aureus* asociadas a las infecciones de los catéteres de los pacientes de diálisis peritoneal presentaron diferentes asociaciones de los fenotipos y genotipos de resistencia a los antibióticos y desinfectantes, por lo que se sugiere mejorar los protocolos de higiene durante el proceso de diálisis peritoneal.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, diálisis peritoneal, genes, resistencia, antibióticos.

## 2. Introducción.

### 2.1 Características generales de *Staphylococcus aureus*.

Las bacterias del genero *Staphylococcus* son cocos Gram positivos de 0.5 a 1.5 µm de diámetro, se agrupan como células únicas, en pares, tétradas y formando racimos de uvas. Son bacterias inmóviles, no forman esporas y poseen cápsula. La mayoría de las especies producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativa (Cervantes *et al.*, 2014).

Dentro del género *Staphylococcus* se encuentran incluidas 42 especies diferentes, siendo *Staphylococcus aureus* la especie con mayor importancia clínica. *S. aureus* fermenta el manitol, produce la enzima coagulasa que le permite a la bacteria coagular el plasma sanguíneo. Crece con facilidad sobre casi todos los medios de cultivo bacterianos. En el medio de S-110 forman colonias redondas, lisas y brillantes. Con coloración amarilla o dorada por la presencia de carotenoides. (Pahissa, 2009).

Los *Staphylococcus* forman parte de la flora bacteriana normal en el humano, particularmente *S. aureus* está presente en la piel, tracto respiratorio y tracto gastrointestinal. Se estima que del 20% al 50% de la población es portador nasal permanente, ya que, las fosas nasales anteriores suelen ser el nicho ecológico preferente de esta bacteria (Nashev *et al.*, 2004)

*Staphylococcus aureus* es una bacteria de gran importancia, porque se considera un patógeno asociado a diversas infecciones en hospitales y en la comunidad en general a nivel mundial.



## 2.2 Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*.

*S. aureus* posee un gran número de factores de virulencia que le confieren la capacidad de colonizar y ocasionar enfermedades en el humano (Hermann & Smeltzer, 2016). Entre los factores de virulencia se encuentran cinco toxinas citolíticas que dañan la membrana celular de las células que infectan como: hemolisinas (alfa, beta, delta y gama) que actúan causando poros sobre plaquetas, monocitos y glóbulos rojos, son responsables destrucción tisular, formación de abscesos y Leucocidina de Pantón-Valentine que lisa específicamente neutrófilos polimorfonucleares y monocitos creando poros en su membrana nuclear; también se relaciona a infecciones como neumonía necrotizante e infecciones graves de la piel (Omuse *et al.*, 2013). Además de enterotoxinas (A, B, C, D y F) que se asocian a intoxicaciones alimentarias, dos toxinas exfoliativas (A y B), responsables de graves enfermedades como el síndrome de la piel escaldada que se caracteriza por dermatitis exfoliativa y la toxina 1 (TSS-1) que provoca el síndrome del choque tóxico (Koosha *et al.*, 2013).

<b>Componentes estructurales</b>	<b>Efecto biológico</b>
Cápsula	Es una adhesina; además, impide la quimiotaxis y la fagocitosis, inhibe la proliferación de células mononucleares
Proteína A	Altera función ciliar, estimula respuesta inflamatoria, media en el daño tisular con producción de radicales tóxicos de oxígeno.
Adhesinas	Proteínas de superficie que favorecen el anclaje a las células que infectan.
<b>Enzimas</b>	<b>Efecto biológico</b>
Coagulasa	Convierte el fibrinógeno en fibrina.
Catalasa	Cataliza la descomposición de peróxido de hidrogeno.
Hialuronidasa	Hidroliza los ácidos hialurónicos en el tejido conectivo, facilitando la diseminación de los estafilococos en los tejidos.
Fibrinolisisina	Disuelve los coágulos de fibrina.
Lipasa	Hidroliza los lípidos.
Nucleasa	Hidroliza el ADN.
<b>Toxinas</b>	<b>Efecto biológico</b>
Hemolisinas alfa, beta, delta y gama.	Mecanismo poro-perforador sobre las membranas de leucocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos.

Leucocidina Panton-Valentine	Destruye los leucocitos y produce necrosis de los tejidos.
Toxina exfoliativa	Proteasas, que rompen los puentes intercelulares en el estrato granuloso de la epidermis.
Enterotoxinas (A-F).	Súper antígenos (estimula la proliferación de células T y la liberación de citosinas); estimula la liberación de mediadores químicos en los mastocitos, aumentando el peristaltismo.
Toxina del síndrome del choque tóxico TSST-1.	Súper antígenos (estimulan la proliferación de células T y la liberación de citosinas); produce la destrucción de las células endoteliales.

Tabla 1. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

### 2.3 Enfermedades causadas por *S. aureus*.

*Staphylococcus aureus* es un importante patógeno humano, produce infecciones comunitarias y hospitalarias (Pahissa, 2009).

El primer paso para colonizar un tejido e iniciar una infección es la adherencia bacteriana a las proteínas de la matriz del huésped (fibronectina, fibrinógeno, elastina y colágeno) por medio de una familia de adhesinas llamadas MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz). La unión a la fibronectina está mediada por dos proteínas estrechamente relacionadas FnBPA y FnBPB, codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB*, respectivamente, las cuales regulan la adhesión de *S. aureus* a las células epiteliales humanas. (Nashev *et al.*, 2004).

Una vez que las bacterias, llegan al tejido subcutáneo o submucoso se diseminan rápidamente, formando abscesos leves y/o profundos (abscesos metastásicos) causando Infecciones de piel y tejidos blandos, forúnculos, faringitis, otitis e infecciones graves como bronquitis, neumonía, artritis séptica, osteomielitis, endocarditis, e infecciones asociadas a los catéteres de pacientes de hemodiálisis o de diálisis peritoneal (Zendejas *et al.*, 2014).

## **2.4 Infecciones bacterianas asociadas a los catéteres de diálisis peritoneal**

The National Kidney Foundation de Estados Unidos definió a la Insuficiencia Renal Crónica (IRC) como la presencia de daño renal con una duración igual o mayor a tres meses, caracterizada por anomalías estructurales o funcionales con o sin descenso de la tasa de filtración glomerular (TFG) a menos de 60ml/min/1.73m<sup>2</sup>. La IRC es un proceso fisiopatológico multifactorial de carácter progresivo e irreversible que frecuentemente lleva a un estado terminal, en el que el paciente requiere terapia de reemplazo renal, es decir diálisis o trasplante para poder vivir (K/DOQI, 2002).

La IRC es la resultante de diversas enfermedades crónico-degenerativas, entre las que destacan la diabetes mellitus y la hipertensión arterial, este fenómeno ocurre de manera similar en todo el mundo y lamentablemente conduce hacia un desenlace fatal si no es tratada. Las cifras de morbilidad y mortalidad son alarmantes; en México, esta es una de las principales causas de atención en hospitalización y en los servicios de urgencias (Méndez *et al.*, 2010).

La diálisis peritoneal (DP) es el método de reemplazo renal más empleado; en México hay 34,000 pacientes en diálisis y el 80% con la modalidad peritoneal (Méndez *et al.*, 2007). La DP es un procedimiento donde se utiliza el peritoneo como membrana dialítica, ésta es una membrana biológica semipermeable a líquidos y solutos. Basándose en este hecho fisiológico la DP consigue eliminar sustancias tóxicas y agua del organismo. Por medio de un catéter de Tenckhoff que se inserta en la cavidad peritoneal, se infunde una solución de diálisis que es mantenida en el peritoneo por un tiempo predeterminado, durante el cual, mediante mecanismos de transporte de difusión y osmosis, se produce el intercambio de sustancias. Siguiendo el gradiente osmótico, se produce la difusión y osmosis de tóxicos y electrolitos desde la sangre al líquido infundido. Posteriormente éstos serán eliminados al exterior a través del mismo catéter (Guía de DP, 2010).

La inserción del catéter de Tenckhoff es un procedimiento quirúrgico e invasivo al organismo que, en malas condiciones de higiene por el personal médico,

manipulación inadecuada del paciente y la implantación a largo plazo, se puede colonizar de bacterias y convertirse en una fuente de infección generalizada (bacteremia), por la facilidad de acceder de forma continua al torrente sanguíneo (Smuszkiewicz *et al.*, 2009).

*S. aureus* es una bacteria capaz de formar una biopelícula en superficies de dispositivos médicos, lo que conduce a que las infecciones sean más agudas. Las interacciones bacterianas con las superficies de los catéteres de DP ocurre por el polisacárido de adhesión intercelular (PIA), codificado por el operón *ica* (*icaADBC*) de *S. aureus*. La biopelícula protege al microorganismo contra el sistema inmune del huésped y contra la acción de los antibióticos (Nourbakhsh *et al.*, 2016). Recientemente Paniagua *et al.*, (2012) encontraron que la frecuencia del gen *ica* en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres de pacientes de hemodiálisis fue del 96.3%. La formación de biopelícula ocasiona que del 20% al 30% de las infecciones relacionadas con el catéter no se curen, lo que lleva a infecciones crónicas.

#### **2.4 Resistencia a antibióticos y desinfectantes por *S. aureus*.**

En las últimas décadas el uso prolongado de los antibióticos ha ocasionado la selección de cepas de *S. aureus* resistentes a los antimicrobianos. La resistencia bacteriana a los antibióticos frecuentemente se encuentra codificada por genes localizados en elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones e integrones, lo que hace posible su transferencia (Sørum *et al.*, 2002).

Desde la década de 1980 las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) y a otros antibióticos se han extendido rápidamente, convirtiéndose en un grave problema de salud a nivel mundial, ya que reducen la disponibilidad de antibióticos para el tratamiento de diversas infecciones en hospitales y en la población en general (Koosha *et al.*, 2013). La resistencia a la meticilina se debe a la adquisición de un elemento genético móvil llamado *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (*SCCmec*) que incluye el gen *mecA*, elemento central de resistencia a la meticilina (Ibrahim *et al.*, 2009).

Las cepas de *S. aureus* frecuentemente acarrean múltiples genes de resistencia a antibióticos, como el gen *blaZ*, que codifica para la producción de  $\beta$ -lactamasas y confiere resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Los genes *ermA*, *ermB*, y *ermC* que codifican para la producción de metiltransferasas, las cuales son responsables de la resistencia a antibióticos macrólidos al igual que el gen que *msrA* induce resistencia a la eritromicina, al codificar para bombas de eflujo dependientes de ATP (Ross *et al.*, 1995). El gen *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* confiere resistencia a antibióticos aminoglucósidos. Los genes *tet(M)*, *tet(O)* y *tet(K)* confieren resistencia a la tetraciclina; y los genes *vanA* y *vanB* codifican para resistencia a vancomicina (Rizzotti *et al.*, 2005).

Con el fin de evitar la propagación de patógenos y contrarrestar las infecciones en los hospitales con frecuencia se utilizan los desinfectantes, que son compuestos cuaternarios de amonio como el cloruro de benzalconio, que se utiliza como antiséptico de la piel y heridas, su mecanismo de acción radica en la inactivación de las enzimas productoras de energía, desnaturalización de las proteínas celulares esenciales y la ruptura de la membrana celular; sin embargo, se ha demostrado que el uso generalizado de estos compuestos impone una presión selectiva y contribuye a la aparición de bacterias resistentes a dichos compuestos (Zhang *et al.*, 2011). Los genes que codifican para resistencia a desinfectantes son *qacA*, *qacB* y *qacC*, los cuales se encuentran en los plásmidos pST6, pSK4y pSK41. El verdadero problema radica en que algunos de estos plásmidos también contienen genes de resistencia a antibióticos como: gentamicina, penicilina, kanamicina y tobramicina. De manera que el empleo de compuestos a base de cuaternario de amonio para desinfectar puede conducir a una resistencia cruzada a antibióticos y desinfectantes de cepas MRSA (Zmantar *et al.*, 2011).

### 3. Antecedentes.

Smuszkiewicz *et al.*, (2009) realizaron un estudio donde se aislaron bacterias de 115 puntas de catéteres infectados de pacientes de hemodiálisis; el 24% de los pacientes presentaron bacteriemia (infección en el torrente sanguíneo). Entre los patógenos se encontraron: *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*.

Zmantar *et al.*, (2011) detectaron por PCR multiplex los genes de resistencia a eritromicina (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* y *mef*) y a desinfectantes (*qacA*, *qacB*, y *qacC*) en 46 cepas obtenidas de pacientes con infección articular, 22 cepas recuperadas de fluido de diálisis y 49 cepas aisladas de agujas de un servicio de diálisis. Estos autores encontraron que la frecuencia de los genes de resistencia a eritromicina en *S. aureus* fue: *ermA* 7.7%, *ermB* 13.7%, *ermC* 6% y *msrA* 10.2%. Además 88 cepas (74%) fueron resistentes a cloruro de benzalconio (compuesto cuaternario de amonio).

Zhang *et al.*, (2011) realizaron un estudio para establecer las frecuencias de genes de resistencia a desinfectantes (*qac A/B*) en cepas nasales de *S. aureus* en enfermeras de hospitales y personas sanas. En la población sana encontraron que el 11.3% de las cepas de *S. aureus* presentó el gen *qac A/B*, mientras en las cepas de *S. aureus* recuperadas de las fosas nasales del personal de enfermería presentó el gen *qac A/B* en un 42%, representando un riesgo de salud para los pacientes hospitalizados que son atendidos por estas enfermeras.

Paniagua *et al.*, (2014) realizaron un estudio donde aislaron y tipificaron 21 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de catéteres de pacientes con hemodiálisis. El 100% (n=21) de las cepas presentó los genes *ermA*, *ermB* que confieren resistencia a la eritromicina, los genes *tetM*, *tetK* que codifican para resistencia a la tetraciclina, el gen *blaZ* que confiere resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y el gen *qacC*. que codifica para resistencia a desinfectantes. Los genes *qacA* y *qacB* fueron identificados en un 76% (n=16), en cada caso. Por último el gen

*aac(6')Ie-aph(2'')Ia* que confiere resistencia a los antibióticos aminoglucosidos fue detectado en el 14.3% (n=3) de las cepas de *S. aureus*.

#### **4. Justificación.**

Debido a que en los últimos años en México se ha incrementado la frecuencia de las infecciones relacionadas a los catéteres por cepas de *S. aureus* resistentes a los antibióticos, es importante caracterizar molecularmente los genes que codifican para resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, eritromicina, aminoglucósidos, tetraciclina, vancomicina y desinfectantes en cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones asociadas a los catéteres de pacientes de diálisis peritoneal.



## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general.

Identificar los genes que codifican resistencia a antibióticos y desinfectantes en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de catéteres de pacientes de diálisis peritoneal.

### 5.2 Objetivos particulares.

- Establecer la frecuencia de *Staphylococcus aureus* en los catéteres de los pacientes de diálisis peritoneal.
- Determinar la resistencia a antibióticos en las cepas de *S. aureus* por el método de Kirby-Bauer.
- Detectar por PCR los genotipos que codifican resistencia a Eritromicina (*ermA*, *ermB* y *ermC*), Tetraciclina (*tetM*, *tetO* y *tetK*), Vancomicina (*vanA* y *vanB*), Aminoglucósidos [(*aac(6')*-*le-aph(2'')*-*la*)],  $\beta$ -lactamasas (*blaZ*) y desinfectantes (*qacA*, *qacB* y *qacC*) en cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Determinar los diferentes patrones de asociación de los marcadores de resistencia a antibióticos y desinfectantes en las cepas de *S. aureus*.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1 Origen de las cepas e Identificación de *S. aureus* por pruebas bioquímicas.**

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron a partir del cepario del Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, un total de 34 cepas de *S. aureus* aisladas previamente de infecciones asociadas a los catéteres de pacientes con diálisis peritoneal. Las cepas fueron identificadas por morfología colonial en el medio de cultivo selectivo de S110 y por las pruebas bioquímicas bacteriológicas de manitol y de la coagulasa.

### **6.2 Determinación de la susceptibilidad y/o resistencia a los antibióticos en las cepas de *S. aureus*.**

Una vez identificadas las bacterias se utilizó la técnica de Kirby-Bauer para probar la susceptibilidad y/o resistencia de cada cepa encontrada, para lo cual se tomaron 5 colonias de cada cepa con un asa estéril, se inocularon en 5 ml de caldo BHI y se incubaron a 37°C durante 3 horas, hasta que apareció una turbidez ligera. La turbidez se ajustó con solución salina estéril hasta obtener una densidad comparable con un estándar de sulfato de bario. El estándar se preparó mezclando 5 ml de BaCl<sub>2</sub> 0.048 M (1.175% peso/ volumen de BaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O) con 99.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1% v/v (0.36N), que fue la mitad de la densidad del estándar No. 1 de MacFarland (estándar 0.5 de MacFarland).

Posteriormente se inoculó sobre el agar de Mueller Hinton por medio de hisopos estériles, los cuales se humedecieron con la suspensión (crecimiento bacteriano) y se estriaron sobre la totalidad de la superficie del agar. Por último, se tomó un sensidisco con los 12 antimicrobianos a determinar, por medio de una pinza estéril y se colocó sobre el agar de Mueller Hinton. El antibiótico se difundió formando un gradiente de concentración que inhibió o permitió el crecimiento de la bacteria en un tiempo de 24 horas a 37°C.

De esta manera las cepas se clasificaron como susceptibles (S), resistentes (R) o intermedias (I) dependiendo del diámetro del halo de inhibición, el cual se midió con un vernier (Tabla 2).

Antibiótico	Abrev.	Familia	Acción	Diámetro del halo de INH. (mm)		
				R	I	S
Ampicilina	AM	Aminopenicilina	1	<28		>29
Cefalotina	CF	Cefalosporina de 1ª Gen.	1	<14	15-17	>18
Cefotaxima	CTX	Cefalosporina de 3ª Gen.	1	<14	15-22	>23
Ceftazidima	CAZ	Cefalosporina de 3ª Gen.	1	<14	15-17	>18
Cefuroxima	CXM	Cefalosporina de 2ª Gen.	1	<14	15-17	>18
Dicloxacilina	DC	Penicilina semisintetica	1	<10	11-12	>13
Eritromicina	E	Macrolido	2	<13	14-17	>18
Gentamicina	GE	Aminoglucosido	2	<12	13-14	>15
Pefloxacina	PEF	Quinolona	3	<14	15-22	>23
Penicilina	PE	Penicilina	1	<28		>29
Tetraciclina	TE	Tetraciclina	2	<14	15-18	>19
Trimetoprim-sulfametoxazol	SXT	Combinación de diaminopirimidina y sulfonamida	3	<10	11-15	>16

Tabla 2.- Antibióticos que se utilizaron contra las cepas encontradas

R= resistente, I= intermedia, S= sensible .1. Inhibición de la formación de la pared celular  
 2. Interferencia en la síntesis de proteínas 3. Inhibición del metabolismo de los ácidos nucleicos.

### 6.3 Extracción de ADN.

Las cepas fueron sembradas en agar S-110 por el método de estría cruzada y se incubaron a 37° C por 24 horas para obtener crecimiento bacteriano. Con un asa de siembra estéril se tomó una muestra considerable y se depositó en un tubo con rosca de 16x150 con 2 mL de agua desionizada estéril. El inóculo fue agitado por medio de un vortex por 30 segundos y se colocó a baño maría durante 20 minutos. Al término, la muestra se colocó en hielo por 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante que contenía el ADN se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se guardó a -20°C hasta su utilización (Paniagua *et. al.*, 2015).

### 6.4 Identificación de *S. aureus* por PCR.

*S. aureus* fue identificada por PCR convencional mediante la detección de los marcadores cromosómicos *spa*, *23rRNA*, *nuc* y *coa* (Tabla 3, Nashev *et al.*, 2004). Los oligonucleótidos que se utilizaron se observan en la Tabla 3. Para la amplificación por PCR de cada gen por separado se utilizó la Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™), para un volumen final de 20 µl por mezcla de reacción se agregó: 10 µl de la Kapa Taq, 1µl de cada oligonucleótido (10 pmol; Sigma-Genosys), 5 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl (100 ng) de ADN molde. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones. Para *spa*: desnaturalización inicial 95°C por 5 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 60°C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto). La extensión final fue de 72°C por 7 minutos.

Para *rRNA*: desnaturalización inicial 95°C por 5 minutos, 37 ciclos (desnaturalización a 94°C por 40 segundos, alineación a 64°C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 75 segundos). La extensión final fue de 72°C por 7 minutos.

Para *nuc*: desnaturalización inicial 95°C por 5 minutos, 37 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos). La extensión final fue de 72°C por 7 minutos.

Para *coa*: desnaturalización inicial 95°C por 5 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 58°C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto). La extensión final fue de 72°C por 7 minutos. Como control positivo se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 33592 (*mecA*+).

Oligonucleotido	Gen	Secuencia del primer 5'-3'	Tamaño del amplicon
23 rRNA F 23 rRNA R	<b>23 rRNA</b>	ACGGAGTTACAAAGGACGAC AGCTCAGCCTTAACGAGTAC	1250
Spa (región X) F Spa (región X) R	<b>spa</b>	CAAGCACCAAAAGAGGAA CACCAGGTTTAACGACAT	Polimorfismo
Nuc-1 Nuc-2	<b>nuc</b>	GCGATTGATGGTGATACGGTT ACGCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	279
Coag-1 Coag-2	<b>coa</b>	ATAGAGATGCTGGTACAGG GCTTCCGATTGTTTCGATGC	Polimorfismo

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para identificar *S. aureus*.

### 6.5 Identificación de los genes de resistencia a antibióticos y desinfectantes en *S. aureus* por PCR convencional.

La detección de los genes que codifican para resistencia a la eritromicina (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* y *mef*) y desinfectantes (*qacA*, *qacB* y *qacC*) en las cepas de *S. aureus* se realizó por el método PCR convencional (Tabla 4; Zmantar *et al.*, 2011). Para la amplificación por PCR de cada gen por separado se utilizó la Kapa Taq Ready Mix <sup>TM</sup> (Kapa Biosystems<sup>TM</sup>), para un volumen final de 20 µl por mezcla de reacción se agregó: 10 µl de la Kapa Taq, 1µl de cada oligonucleótido (10 pmol; Sigma-Genosys), 5 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl (100 ng) de ADN molde. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones. Para los genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* y *mef* fueron: desnaturalización inicial 96°C por 3 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 2 minutos). La extensión final fue de 72°C por 10 minutos.

Las condiciones de amplificación para *qacA*, *qacB*, y *qacC* fueron: desnaturalización inicial 94°C por 5 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1.5 minutos, alineación a 56°C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1.5 minutos). La extensión final fue de 72°C por 10 minutos.

#### **6.6 Detección de los genes de resistencia a la tetraciclina (*tetM*, *tetO* y *tet K*) en las cepas de *S. aureus*.**

Para la amplificación por PCR de cada gen por separado se utilizó la Kapa Taq Ready Mix <sup>TM</sup> (Kapa Biosystems<sup>TM</sup>), para un volumen final de 20 µl por mezcla de reacción se agregó: 10 µl de la Kapa Taq, 1µl de cada oligonucleótido (10 pmol; Sigma-Genosys), 5 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl (100 ng) de ADN molde. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones: las condiciones de amplificación para *tetM* fueron (Tabla 4, Rizzotti *et al.* 2005): desnaturalización inicial 94°C por 4 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos). La extensión final fue de 72°C por 7 minutos.

Las condiciones de amplificación para *tet O* fueron: desnaturalización inicial 94°C por 4 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 57°C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos). La extensión final a 72°C fue por 7 minutos.

Las condiciones de amplificación para *tet K* fueron: desnaturalización inicial 94°C por 4 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos). La extensión final fue de 72°C por 7 minutos.

#### **6.7 Detección de los genes de resistencia a aminoglucósidos [(*aac(6')*-*le-aph(2'')*)-*la*]] y betalactamasas (*blaZ*) en las cepas de *S. aureus*.**

Para la amplificación por PCR de cada gen por separado se utilizó la Kapa Taq Ready Mix <sup>TM</sup> (Kapa Biosystems<sup>TM</sup>), para un volumen final de 20 µl por mezcla de reacción se agregó: 10 µl de la Kapa Taq, 1µl de cada oligonucleótido (10 pmol;

Sigma-Genosys), 5 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl (100 ng) de ADN molde. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones: las condiciones de amplificación para *aph* fueron (Tabla 4, Rizzotti *et al.* 2005): desnaturalización inicial 94°C por 4 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos). La extensión fue de 72°C por 7 minutos.

Las condiciones de amplificación para *blaZ* fueron: desnaturalización inicial 94°C por 4 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 58°C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos). La extensión final fue de 72°C por 7 minutos.

### 6.8 Detección de los genes de resistencia a la Vancomicina (*vanA* y *vanB*) en las cepas de *S. aureus*.

Para la amplificación por PCR de cada gen por separado se utilizó la Kapa Taq Ready Mix <sup>TM</sup> (Kapa Biosystems<sup>TM</sup>), para un volumen final de 20 µl por mezcla de reacción se agregó: 10 µl de la Kapa Taq, 1µl de cada oligonucleótido (10 pmol; Sigma-Genosys), 5 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl (100 ng) de ADN molde. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones: las condiciones de amplificación para *vanA* y *vanB* fueron (Tabla 4, Rizzotti *et al.* 2005): desnaturalización inicial 94°C por 4 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineación a 61°C por 45 segundos y extensión a 72 °C por 45 segundos). La extensión final fue de 72°C por 7 minutos.

Oligonucleotido	Gen	Secuencia del primer 5'-3'	Tamaño del amplicon
erm AF erm AR	<i>ermA</i>	TATCTTATCGTTGAGAAGGGATT CTACACTTGGCTTAGGATGAAA	139
erm BF erm BR	<i>ermB</i>	CTATCTGATTGTTGAAGAAGGATT GTTTACTCTTGGTTTAGGATGAAA	142

erm CF erm CR	<b>ermC</b>	CTTGTTGATCACGATAATTC ATCTTTTAGCAAACCCGTATT	190
mrs AF mrs AR	<b>mrsA</b>	TCCAATCATAGCACAAAATC AAT CCCTCTATTTGGTGGT	163
mef F mef R	<b>mef</b>	AGTATCATTAACTACTAGTGC TTCTTCTGGTACAAAAGTGG	348
tetM-1 tetM-2	<b>tet(M)</b>	GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAGTTCGTCACACAC	406
tetO-1 tetO-2	<b>tet(O)</b>	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC TCCCACTGCTCCATATCGTCA	515
tetK-1 tetK-2	<b>tet(K)</b>	TCGATAGGAACAGCAGTA CAGCAGATCCTACTCCTT	169
blaZ-1 blaZ-2	<b>blaZ</b>	ACTTCAACACCTGCTGCTTTC TGACCACTTTTATCAGCAACC	173
A1 A2	<b>vanA</b>	GGGAAAACGACAATTGC GTACAATGCGGCCGTTA	732
B1 B2	<b>vanB</b>	ATGGGAAGCCGATAGTC GATTTTCGTTCCCTCGACC	635
qacA, qacBF qacA, qacBR	<b>qacA, qacB</b>	TCCTTTTAATGCTGGCTTATACC AGCCKTACCTGCTCCAACCTA	220
qacCF qacCR	<b>qacC</b>	GGCTTTTCAAATTTATACCATCCT ATGCGATGTTCCGAAAATGT	249
Aming aph-1 Aming aph-2	<b>aac(69)Ie- aph(20)Ia</b>	GAGCAATAAGGGCATAACCAAAAATC CCGTGCATTTGTCTTAAAAAACTGG	480

Tabla 4. Oligonucleotidos utilizados para identificar los genes que codifican resistencia a antibióticos y desinfectantes.

### 6.9 Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de agarosa.

Posterior a la amplificación del ADN por PCR, 10 µL de cada muestra fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliamperes por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con Midori Green (0.3 µL) y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación GEL LOGIC 100 (KODAK).



## 7. Resultados

### 7.1 Pacientes estudiados.

Se analizaron treinta y cuatro cepas de *S. aureus* del cepario del Laboratorio Clínico de la CUSI, FESI, que fueron obtenidas previamente de pacientes con infección en el sitio de inserción del catéter de diálisis peritoneal. En la figura 1 se observa que el 65% (n= 22) de los pacientes correspondió al sexo masculino y el 35% (n=12) al sexo femenino.

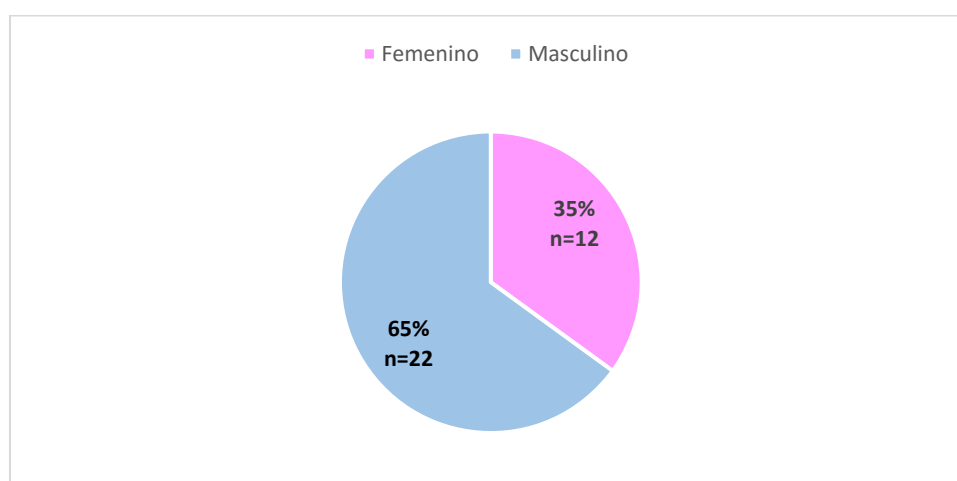


Figura 1. Distribución de los pacientes por sexo.

La edad de los pacientes se observa en la Figura 2. El grupo de edad con mayor frecuencia fue de 41 a 50 años (32.3%, n=11); seguido del grupo de 15 a 20 (23.5%, n=8) y por el grupo de 21 a 30 (20.5%, n=7). Los grupos de edad con menor frecuencia fueron 31 a 50 (14.7% n=5) y 51 a 60 (8.8%, n=3).

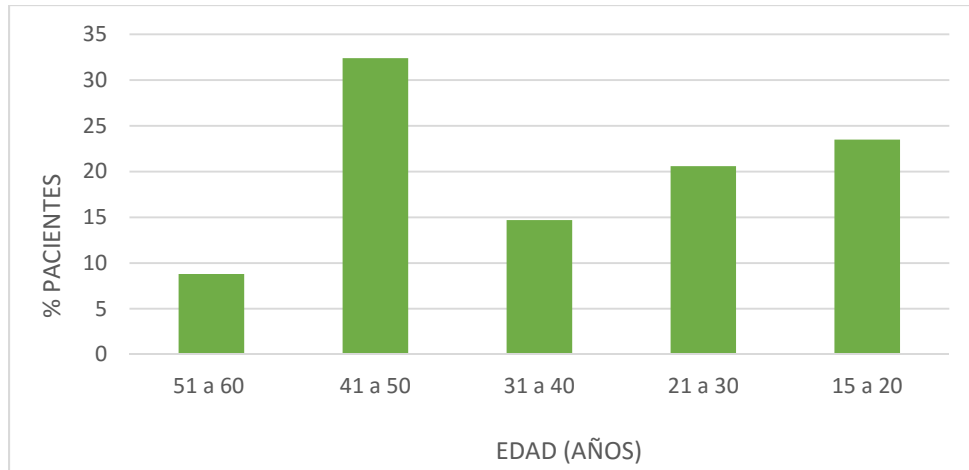
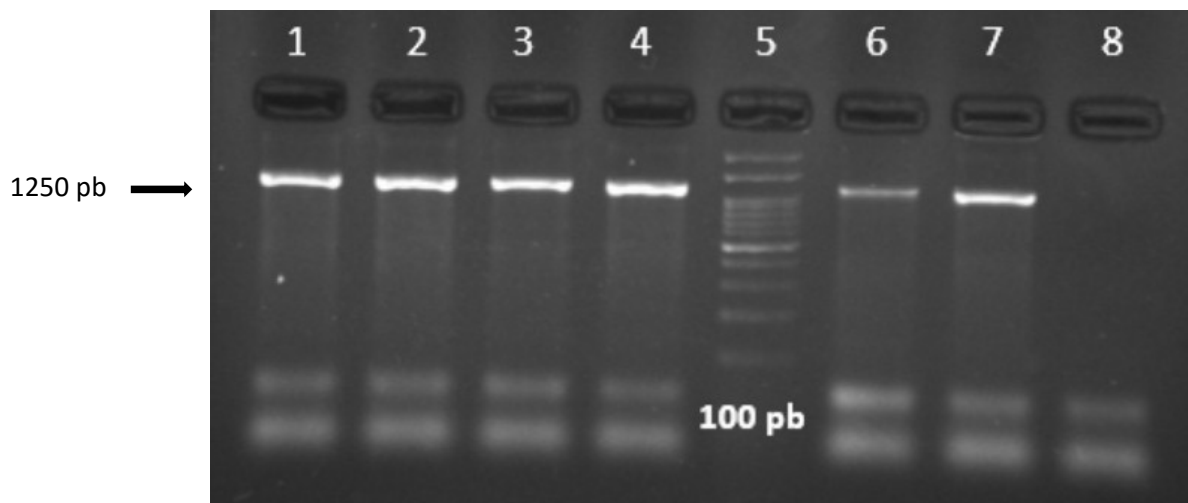


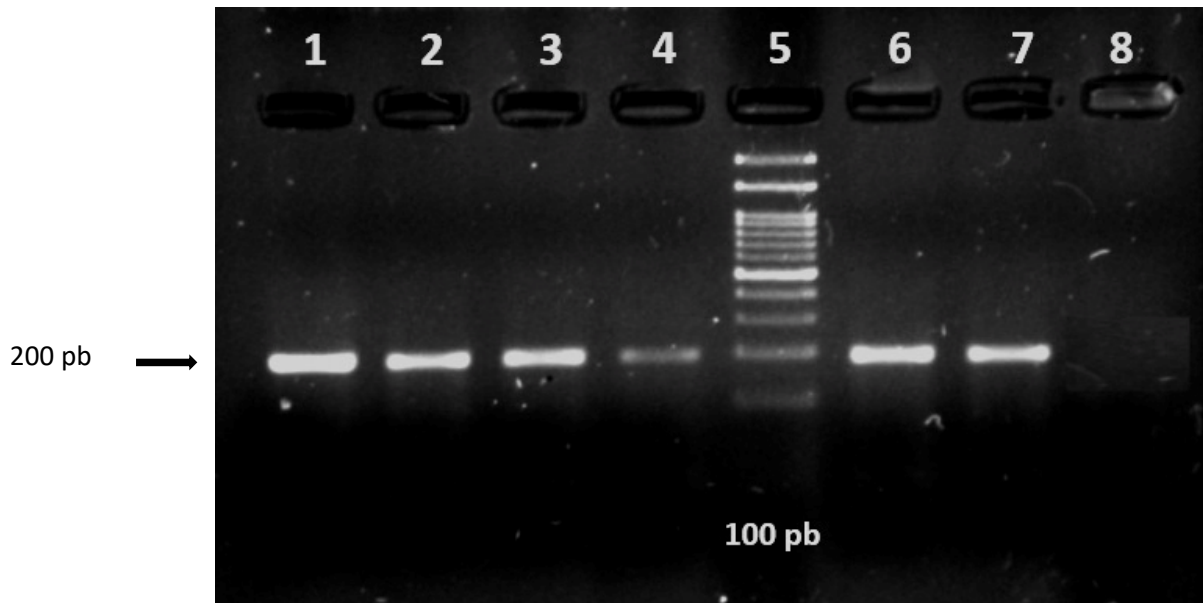
Figura 2. Distribución de los pacientes por edad.

## 7.2 Identificación de *Staphylococcus aureus*.

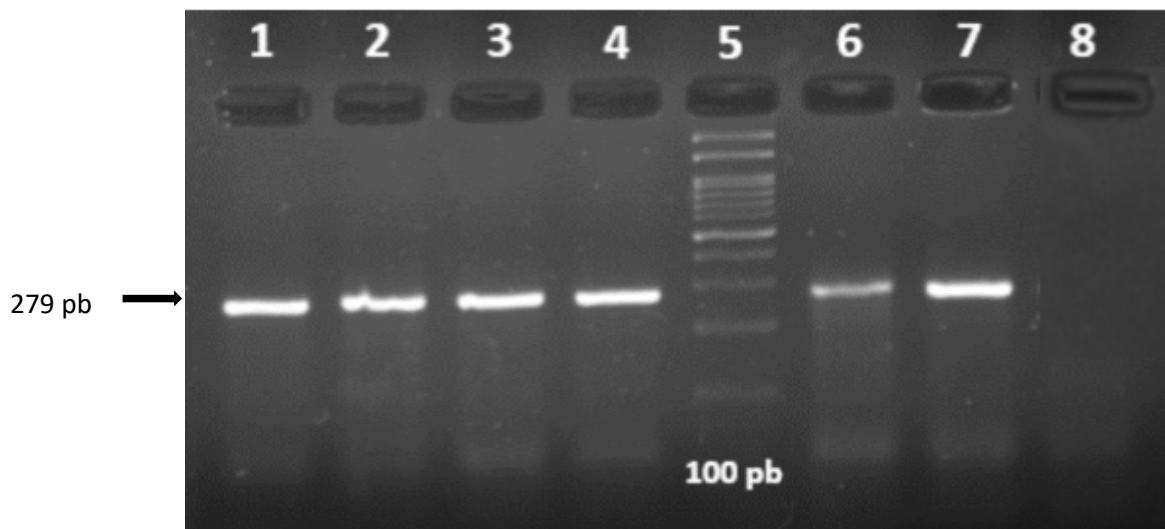
*Staphylococcus aureus* fue identificado mediante la detención de los marcadores cromosómicos *rRNA*, *spa* region X, *nuc* y *coa* (Fotografías 1-4).



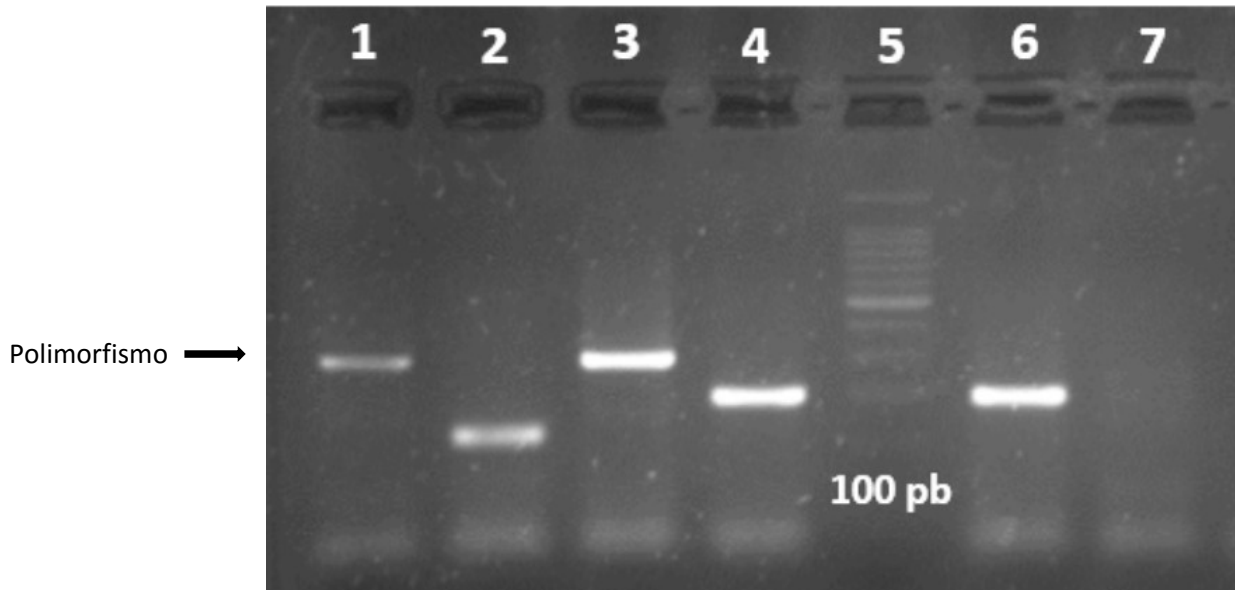
Fotografía 1. Detección de gen *rRNA* mediante PCR convencional. Carriles 1-4 y 6, *rRNA* en cepas de *S. aureus* (amplicones de 1250 pb); carril 5, MWM (100 pb); carril 7, control positivo, *S. aureus* ATCC 33592; carril 8, control negativo (sin DNA).



Fotografía 2. Detección del gen *spa r*(egión X) en *S. aureus* mediante PCR convencional. Carriles 1-4 y 6 *spa* en cepas de *S. aureus* (amplicones de 200 pb); carril 5 MWM (100 pb); carril 7, control positivo, *S. aureus* ATCC 33592; carril 8, control negativo (sin DNA).



Fotografía 3. Detección de *nuc* en *S. aureus* mediante PCR convencional. Carriles 1-4 y 6 *nuc* en cepas de *S. aureus* (amplicones de 279 pb); carril 5 MWM (100 pb); carril, 7 control positivo, *S. aureus* ATCC 33592; carril 8, control negativo (sin DNA).



Fotografía 4. Detección de *coa* en *S. aureus* mediante PCR convencional. Carriles 1-4, *coa* en cepas de *S. aureus* (amplicones de 100 a 300 pb por el polimorfismo del gen); carril 5, MWM (100 pb); carril 6, control positivo, *S. aureus* ATCC 33592, control negativo (sin DNA).

### 7.3 Fenotipos de resistencia a antibióticos en las cepas de *S. aureus*.

El 100% de las cepas fue resistente a Penicilina (n=34), 97% (n=33) a Dicloxacilina, Eritromicina y Ampicilina, en cada caso, 94% (n=31) a Pefloxacina, 91% (n=30) a Sulfametoxazol-Trimetoprim, 85% (n=29) a Gentamicina, 82% (n=28) a Cefotaxima, 71% (n=24) a Tetraciclina y 50% (n=33) a Cefalotina (Figura 3).

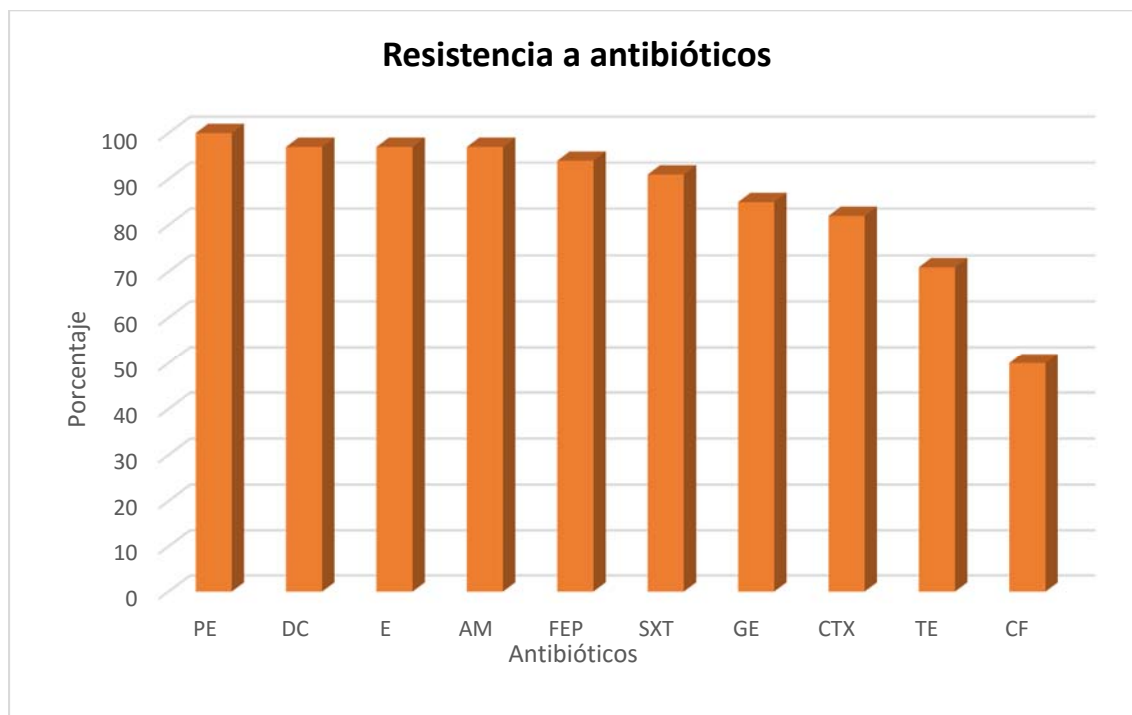


Figura 3. Porcentaje de resistencia a los antibióticos en cepas de *S. aureus*.

PE= penicilina; DC= dicloxacilina; E= eritromicina; AM= ampicilina; PEF= Pefloxacina; SXT= trimetoprim-sulfametoxazol; GE= gentamicina; CTX= cefotaxima; TE= tetraciclina; CF= cefalotina.

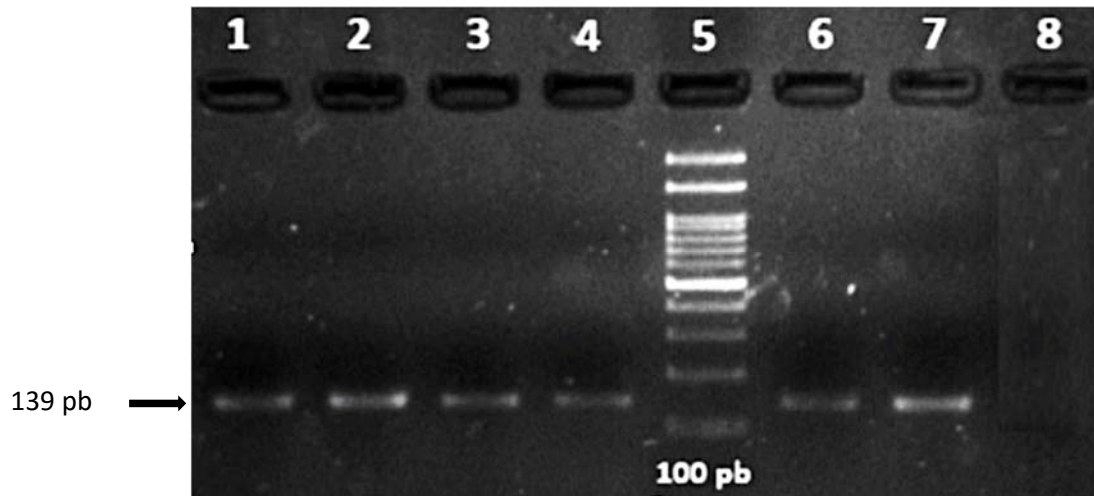
#### 7.4 Genotipos de resistencia a antibióticos y desinfectantes en las cepas de *Staphylococcus aureus*.

La detección de los genotipos de resistencia a antibióticos y desinfectantes presentes en las 34 cepas de *Staphylococcus aureus* se llevó a cabo mediante PCR convencional. El 32.3% (n=11) de las cepas presentó el gen *ermA*, el 20.6% (n=7) *ermB*, 3% (n=1) *ermC* y 26.5% (n=9) *mrsA* (Tabla 5, Fotografías 5-7). Respecto a los genes de resistencia a la tetraciclina, el 73.5% (n=25) fue portadora de *tetM* (Tabla 5, Fotografía 8), 6% (n=2) de *tetO* y 59% (n=20) de *tetK* (Fotografía 9). El gen *blaZ* (betalactamasas) fue identificado en el 100% de las cepas (n=34) (Fotografía 10), *aac(6')/le-aph(2'')/la* (aminoglucósidos) en el 73.5% (n=25) (Fotografía 11), *qacA/B* (desinfectantes) en el 32.3%(n=11) y *qacC* en el 29.4% (n=10) (Fotografías 12 y 13). Los genes *mef*, *vanA* y *vanB* no se encontraron presentes en ninguna de las cepas (Tabla 5).

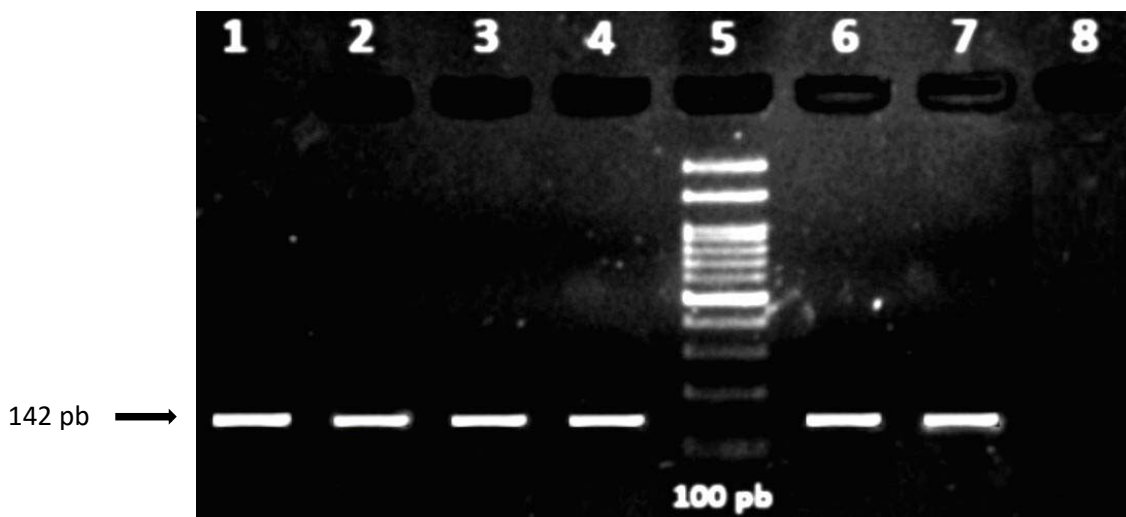
Antibiótico	Gen	No.	Porcentaje %
Eritromicina	<i>ermA</i>	11	32.3
	<i>ermB</i>	7	20.6%
	<i>ermC</i>	0	0
	<i>mef</i>	0	0
	<i>mrsA</i>	9	26.5
Tetraciclina	<i>tetM</i>	25	73.5
	<i>tetO</i>	2	6
	<i>tetK</i>	20	59
Aminoglucosidos	<i>aac(6')/le-aph(2'')/la</i>	25	73.5
Betalactamicos	<i>blaZ</i>	34	100
Vancomicina	<i>vanA</i>	0	0
	<i>vanB</i>	0	0

<b>Desinfectantes</b>	<i>qacA/B</i>	11	32.3
	<i>qacC</i>	10	29.4

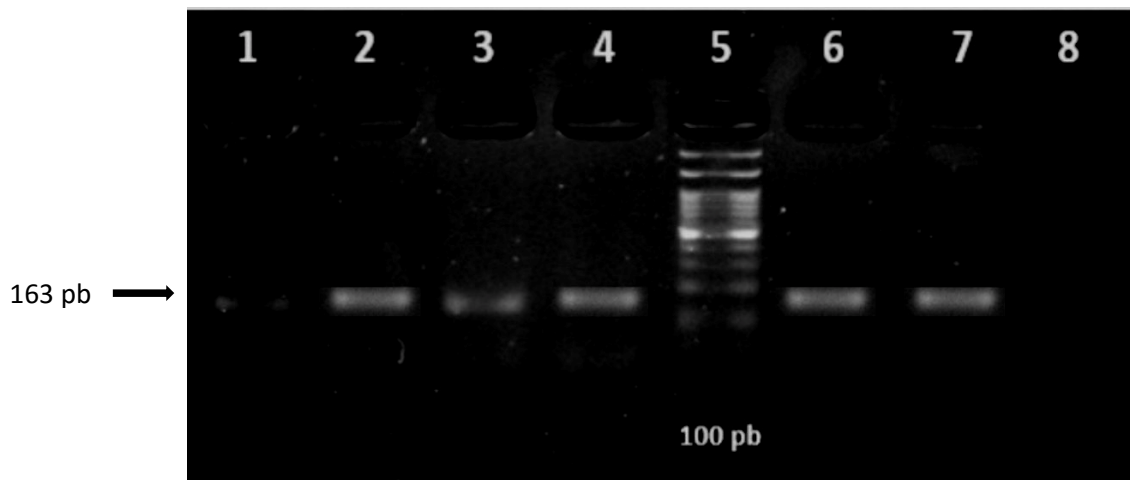
Tabla 5. Porcentaje de cepas de *S. aureus* que presentaron los diferentes genes de resistencia a antibióticos y desinfectantes.



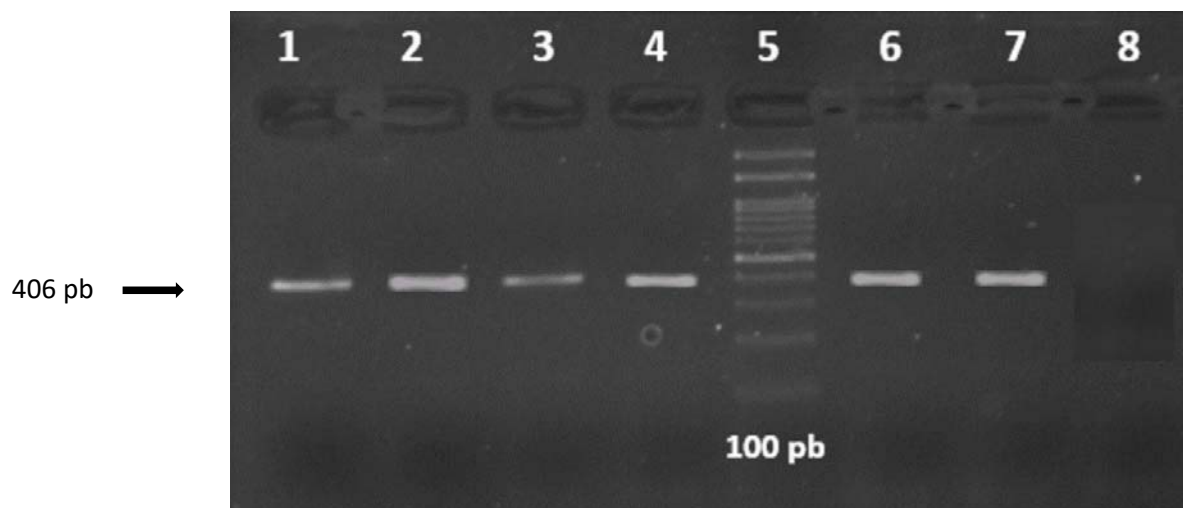
Fotografía 5. Detección de gen *ermA* en *S. aureus* mediante PCR convencional. Carriles 1-4 *ermA* en cepas de *S. aureus* (amplicones 139 pb); carril 5, MWM (100 pb); carril 6, control positivo, *S. aureus* ATCC 33592, control negativo (sin DNA).



Fotografía 6. Detección de gen *ermB* en *S. aureus* mediante PCR convencional. Carriles 1-4 *ermB* en cepas de *S. aureus* (amplicones de 142 pb); carril 5, MWM (100 pb); carril 6, control positivo, *S. aureus* ATCC 33592, control negativo (sin DNA).

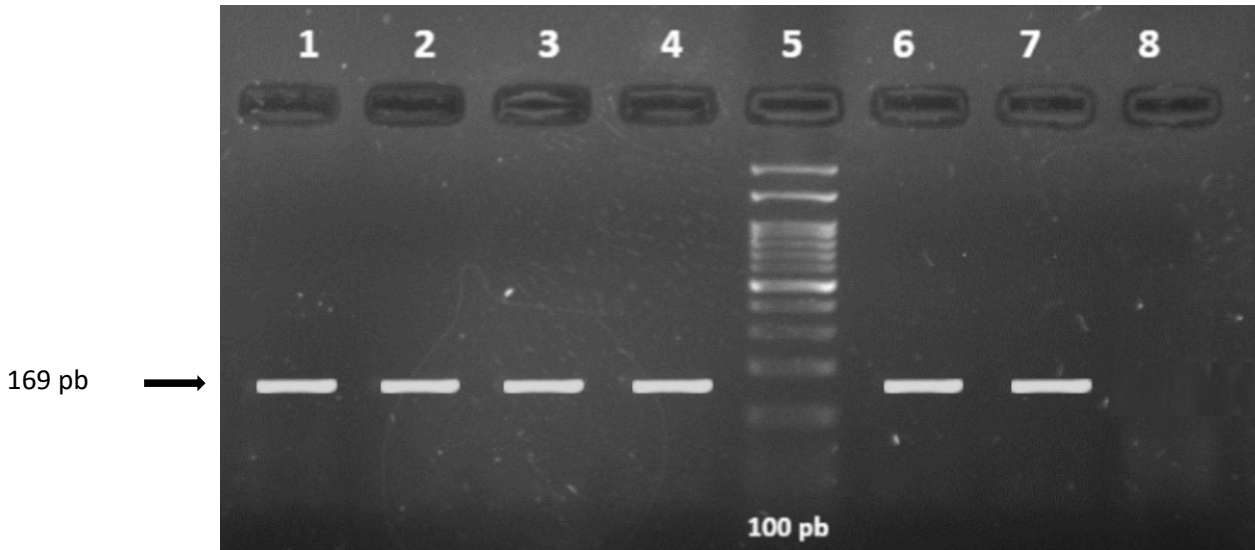


Fotografía 7. Detección de gen *mrsa* en *S. aureus* mediante PCR convencional. Carriles 2-4 y 6 *mrsa* en cepas de *S. aureus* (amplicones 163 pb); carril 5, MWM (100 pb); carril 7, control positivo, *S. aureus* ATCC 33592, control negativo (sin DNA).

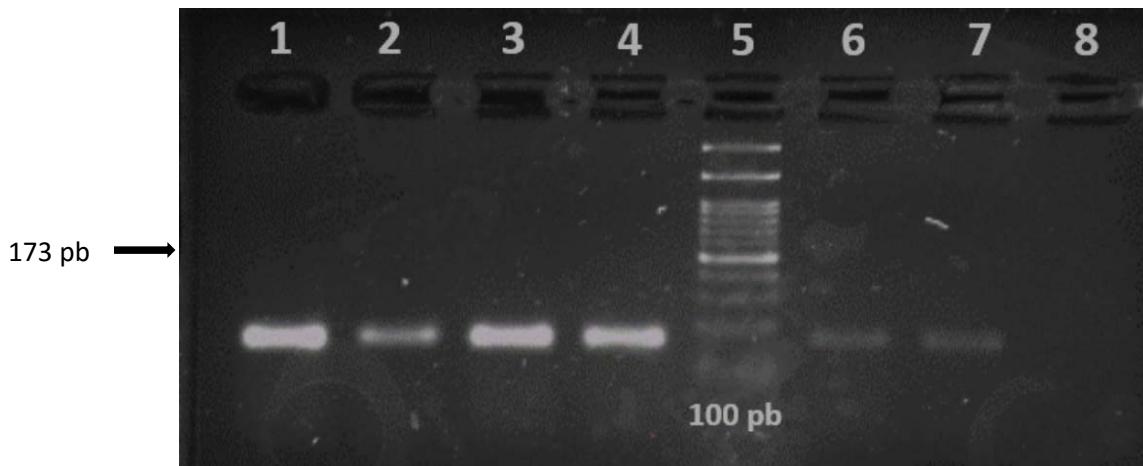


Fotografía 8. Detección de gen *tetM* en *S. aureus* mediante PCR convencional. Carriles 1-4 *tetM* en cepas de *S. aureus* (amplicones 406 pb); carril 5, MWM (100 pb); carril 6, control positivo, *S. aureus* ATCC 33592, control negativo (sin DNA).

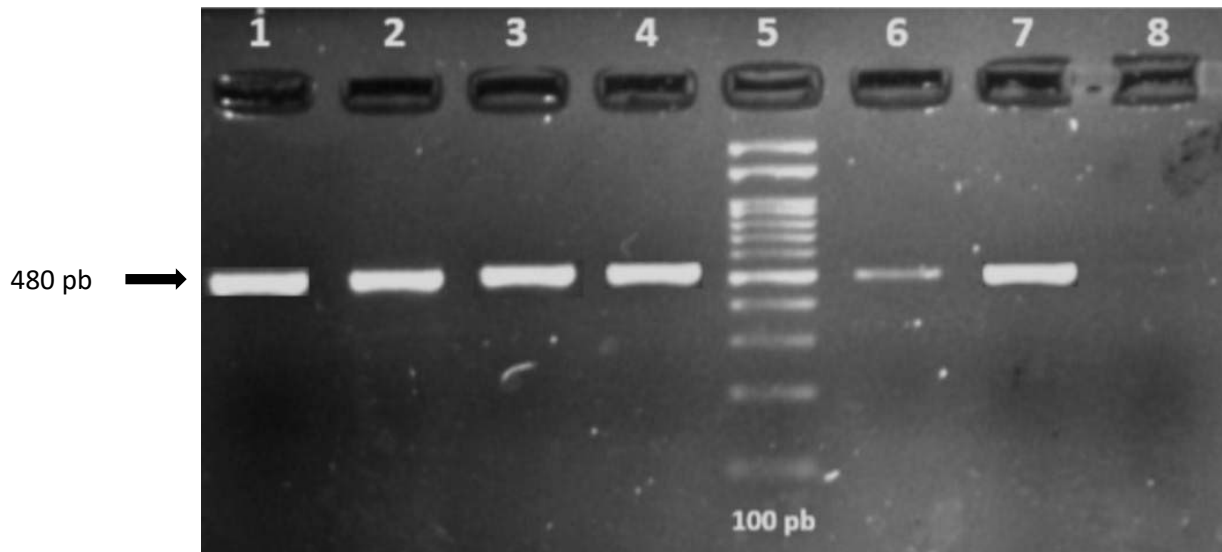




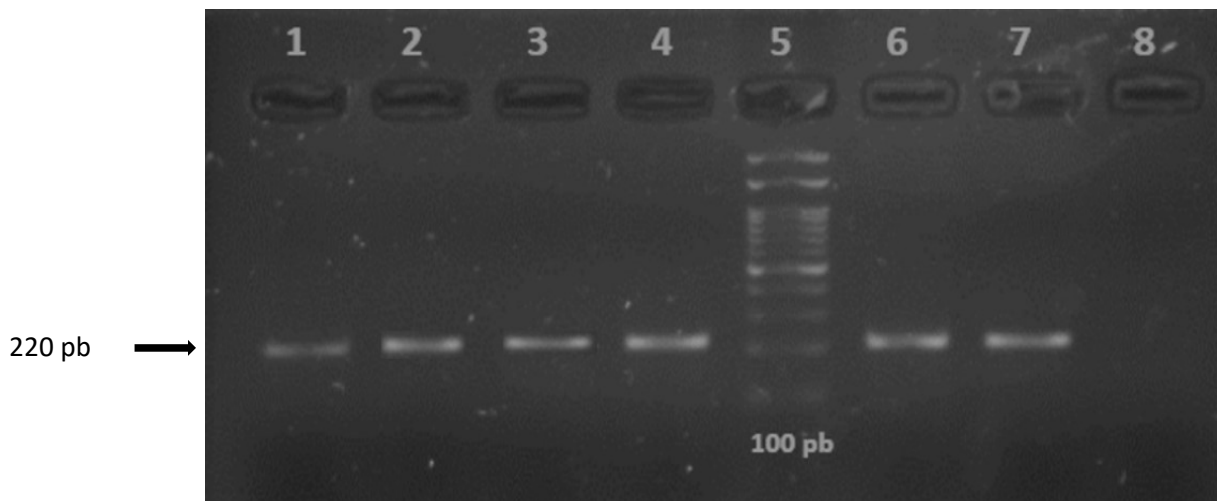
Fotografía 9. Detección de gen *tetK* en *S. aureus* mediante PCR convencional. Carriles 1-4 y 7 *tetK* en cepas de *S. aureus* (amplicones 169 pb); carril 5, MWM (100 pb); carril 6, control positivo, *S. aureus* ATCC 33592, carril 8 control negativo (sin DNA).



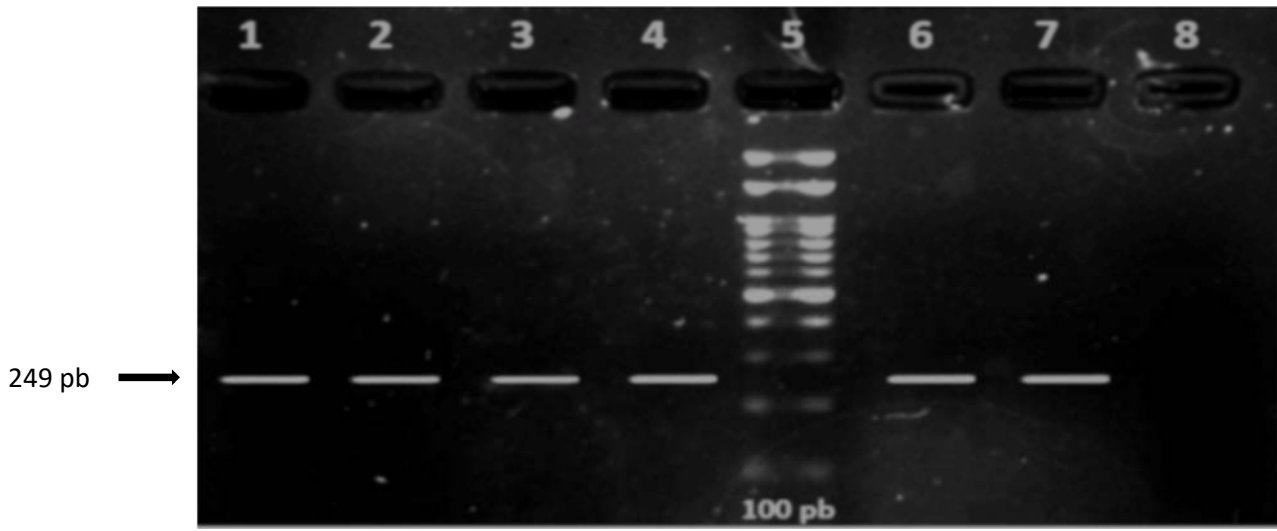
Fotografía 10. Detección de gen *blaZ* en *S. aureus* mediante PCR convencional. Carriles 1-4 y 7 *blaZ* en cepas de *S. aureus* (amplicones 173 pb); carril 5, MWM (100 pb); carril 6, control positivo, *S. aureus* ATCC 33592, carril 8 control negativo (sin DNA).



Fotografía 11. Detección de gen *aac(6)/leaph(2'')*/*la* en *S. aureus* mediante PCR convencional. Carriles 1-4 y 7 *aac(6)/leaph(2'')*/*la* en cepas de *S. aureus* (amplicones de 480 pb); carril 5, MWM (100 pb); carril 6, control positivo, *S. aureus* ATCC 33592, carril 8 control negativo (sin DNA).



Fotografía 12. Detección del gen *qacA/B* en *S. aureus* mediante PCR convencional. Carriles 1, 3-4 y 7 *qacA/B* en cepas de *S. aureus* (amplicones 220 pb); carril 5, MWM (100 pb); carril 6, control positivo, *S. aureus* ATCC 33592, carril 8 control negativo (sin DNA).



Fotografía 13. Detección de gen *qacC* en *S. aureus* mediante PCR convencional. Carriles 1-4 y 7 *qacC* en cepas de *S. aureus* (amplicones 249 pb); carril 5, MWM (100 pb); carril 6, control positivo, *S. aureus* ATCC 33592, carril 8 control negativo (sin DNA).

### 7.5 Diferentes combinaciones de genes que codifican resistencia a antibióticos y desinfectantes en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres de pacientes con diálisis peritoneal.

Se identificaron 9 patrones distintos de asociación de los genes de resistencia a antibióticos y desinfectantes, dentro de los actuales los patrones no. 1 y 2 conformados por los genes *tetM*, *aac(6')le-aph(2'')la*, *blaZ* y *tetM*, *tetK*, *blaZ* respectivamente fueron los más frecuentes en las cepas de *S. aureus* con un 17.6% (n=11), seguidos los patrones 3, 4 y 5 conformados por los genes *tetK*, *aac(6')le-aph(2'')la*, *blaZ*, *qacA/B*, *tetK*, *aac(6')le-aph(2'')la*, *blaZ* y *aac(69)le-aph(20)la*, *blaZ* con un 11.8% (n=4) . Los patrones 6, 7 y 8 fueron encontrados en un 8.8% (n=3) con los genes *tetK*, *aac(6')le-aph(2'')la*, *blaZ*, *qacA/B*, *qacC*, *tetO*, *tetK*, *aac(6')le-aph(2'')la*, *blaZ* y *tetM*. *blaZ* y una solo cepa presentó los genes *ermB*, *blaZ* (Tabla 6).

No. de patrón	Combinación de genes que codifican resistencia a antibióticos y desinfectantes en cepas de <i>S. aureus</i>	Catéter n=34	
		No.	%
1	<i>tetM</i> , <i>aac(6')le-aph(2'')la</i> , <i>blaZ</i>	6	17.6
2	<i>tetM</i> , <i>tetK</i> , <i>blaZ</i>	6	17.6
3	<i>tetK</i> , <i>aac(6')le-aph(2'')la</i> , <i>blaZ</i> , <i>qacA/B</i>	4	11.8
4	<i>tetK</i> , <i>aac(6')le-aph(2'')la</i> , <i>blaZ</i>	4	11.8
5	<i>aac(6')le-aph(2'')la</i> , <i>blaZ</i>	4	11.8
6	<i>tetK</i> , <i>aac(6')le-aph(2'')la</i> , <i>blaZ</i> , <i>qacA/B</i> , <i>qacC</i>	3	8.8
7	<i>tetO</i> , <i>tetK</i> , <i>aac(6')le-aph(2'')la</i> , <i>blaZ</i>	3	8.8
8	<i>tetM</i> , <i>blaZ</i>	3	8.8
9	<i>ermB</i> , <i>blaZ</i>	1	3

Tabla 6. Combinaciones de genes que codifican resistencia a antibióticos y desinfectantes en cepas de *S. aureus*.

## **8. Discusión**

### **8.1 Pacientes analizados.**

En este estudio se analizaron 34 cepas de *S. aureus* provenientes de pacientes de diálisis peritoneal (DP) con infección en el sitio de inserción del catéter, de los cuales el 65% (n=22) fueron hombres y el 35% (n=12) mujeres (Figura 1), principalmente con edades comprendidas en el rango de 41 a 50 años (Figura 2). Estos datos son similares a los descritos en un estudio realizado en 21 estados de la República Mexicana en pacientes con DP, en el que se describió que los hombres presentaron una mayor frecuencia (53%) en relación con las mujeres (47%). Se ha descrito que la Diabetes Mellitus, la Hipertensión arterial y las Glomerulopatías crónicas son las causas más frecuentes que originan insuficiencia renal crónica (Méndez *et al.*, 2010).

### **8.2 Identificación de *Staphylococcus aureus*.**

*Staphylococcus aureus* fue identificado en el 100% (n=34) de los catéteres de los pacientes analizados mediante las pruebas bioquímicas de manitol, coagulasa y por PCR convencional mediante los marcadores cromosómicos *rRNA* (Fotografía 1), *spa* (Fotografía 2), *nuc* (Fotografía 3) y *coa* (Fotografía 4), específicos para *Staphylococcus aureus* (Ruiz *et al.*, 2005).

Se ha reportado que pacientes sometidos a diálisis peritoneal frecuentemente presentan altas tasas de infecciones por cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), debido a la elevada cantidad de uremia y glucosa en sangre que provoca trastornos que deprimen el sistema inmune haciéndolo deficiente contra infecciones. Estas infecciones, a su vez, aumentan la permanencia hospitalaria, costos en tratamientos, así como la morbilidad y mortalidad en los pacientes (Devraj *et al.*, 2016).

Una de las principales causas de infección por *S. aureus* asociadas a los catéteres de DP es debido a que estos pacientes frecuentemente son portadores nasales permanentes de *S. aureus*, por lo que existe una autoinfección durante el proceso

de la diálisis peritoneal. Devraj *et al.*, (2016) reportó que las infecciones en pacientes de hemodiálisis están vinculadas a contaminación por los mismos pacientes, debido a que son portadores nasales de *S. aureus*. En el estudio realizado por Toshkova *et al.* (2001), describieron que los pacientes que desarrollaron infecciones en la piel también eran portadores nasales de *S. aureus*.

En condiciones normales la presencia de *S. aureus* en las fosas nasales no produce enfermedad, pero sí la provoca cuando se introduce al torrente sanguíneo y coloniza otros sitios. Por esta razón el catéter de DP se ha convertido en la causa más frecuente de bacteremias por cepas de cepas de *S. aureus* en pacientes dependientes de este tratamiento, aumentando el riesgo de desarrollar peritonitis infecciosa, hasta infecciones del torrente sanguíneo y posteriormente causar endocarditis (Chua *et al.*, 2008). Otros de los factores de infección en el sitio de inserción del catéter son la falta de asepsia por el personal de la salud, o la manipulación inadecuada del paciente (García *et al.*, 2008).

La peritonitis infecciosa es uno de los principales padecimientos asociadas al catéter de DP, donde del 15% al 57% de los casos terminan en el cambio del catéter y entre el 2% al 6% de los pacientes fallece (Sampaio *et al.*, 2016).

### **8.3 Fenotipos de resistencia a antibióticos en las cepas de *S. aureus***

El 100% (n=34) de las cepas de *S. aureus* fue resistente a Penicilina (n=34) y el 97% (n=33) a la Ampicilina (Figura 3). Estos porcentajes son similares a los descritos por Akpaka *et al.*, (2016), quienes describieron que el 100% (n=309) de las cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes tipos de infecciones fueron resistentes a Penicilina y Ampicilina. Estos datos corroboran que la penicilina y ampicilina, son los antibióticos menos eficientes para el tratamiento y el control de más del 80% de las infecciones por cepas de *S. aureus* (Akpaka *et al.*, 2016).

En este estudio se describió que el 97% (n=33) de las cepas fue resistente a la eritromicina (Figura 3). Este porcentaje coincide con lo descrito por Paniagua *et al.*, (2014) en cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres de pacientes de Hemodiálisis, quienes encontraron que la resistencia a la eritromicina fue del 100%

(n=21), y discrepa lo reportado por Zmantar *et al.*, (2008), quienes encontraron que la resistencia a la Eritromicina por cepas de *S. aureus* fue del 37.7%

En este estudio el antibiótico que presentó menor porcentaje de resistencia contra las cepas de *S. aureus* fue el antibiótico  $\beta$ -lactámico Cefalotina con un 50% (n=17) (Figura 3). La cefalotina pertenece al grupo de las cefalosporinas de primera generación, es muy parecido a la penicilina, sólo que este tiene una mayor ventaja es su efecto al ser menos susceptible a la hidrólisis por  $\beta$ -lactamasas; al igual que las penicilinas actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Actualmente este antibiótico puede ser una opción para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram positivas sensibles a éste fármaco (Rivas *et al.*, 2002).

#### **8.4 Detección de los genes que codifican para resistencia a antibióticos y desinfectantes en las cepas de *S. aureus*.**

Durante los últimos años se han desarrollado gran variedad de antibióticos naturales, sintéticos y semisintéticos que se utilizan como agentes terapéuticos para tratar diversas infecciones. Por desgracia, la introducción y la utilización de nuevos antibióticos ha demostrado que las bacterias poseen la capacidad para desarrollar una rápida resistencia a estos antibióticos, por medio de genes que se encuentran en plásmidos, integrones y transposones, que a través de la transferencia genética pueden propagar esa resistencia a otras bacterias (Molina *et al.*, 2010).

El gen *blaZ* que codifica para  $\beta$ -lactamasas fue identificado en el 100% de las cepas analizadas (Tabla 5, fotografía 10). Este porcentaje corrobora al descrito recientemente en un estudio realizado en cepas de *S. aureus* de pacientes de hemodiálisis (Paniagua *et al.*, 2014), en donde el gen *blaZ* fue identificado en el 100% (n=21) de cepas, mientras que en otro estudio realizado en cepas MRSA la frecuencia de *blaZ* fue del 88.7% (n=274) (Akpaka *et al.*, 2016).

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas que inactivan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas), destruyendo la estructura química del antibiótico al hidrolizar el núcleo beta-lactámico (Cabrera *et al.*, 2007).

Dentro de las cepas de *S. aureus* analizadas el 56% (n=19) fue portadora al menos uno de los genes *erm* y *mrsA* que confieren resistencia a la eritromicina. El gen *ermA* se encontró en un 32.3% (n=11), el gen *ermB* en un 20.6% (n=7) y el gen *mrsA* en un 26.5 % (n=9) (Tabla 5). Estos resultados son mayores a los encontrados por Zmantar *et al.*, (2008) en cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones articulares, quienes detectaron el gen *ermA* en el 7.7% (n = 4), el gen *ermB* en un 13.7% (n=6) y el gen *mrsA* en un 10% (n=5). Los genes *ermA* y *ermB* codifican para una metilasa del RNAr 23S que altera la unión a la diana del antibiótico, en el caso de la eritromicina es la unión a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano inhibiendo la síntesis de proteínas, lo que confiere a las bacterias resistencia a la eritromicina. Estos genes se encuentran en el transposon Tn554 y Tn551 respectivamente; mientras que el gen *mrsA* codifica una bomba de eflujo dependiente de ATP (Zmantar *et al.*,2008).

Los antibióticos aminoglucósidos inhiben la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad ribosomal 30s conduciendo finalmente a la muerte de la bacteria. Son utilizados para bacterias Gramnegativos y Grampositivas. Son efectivos frente a *S. aureus* sensible a meticilina, pero no frente a la mayoría de las cepas MRSA (Palomino y Pachón, 2003). La resistencia a los antibióticos aminoglucósidos esta mediada por el gen *aac(6')/e-aph(2'')/a*. La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido que únicamente se administra por vía intramuscular e intravenosa debido a que no se absorbe por vía oral. En este estudio el gen *aac(6')/e-aph(2'')/a* fue identificado en el 73.5% (n=25) de las cepas de *S. aureus* analizadas (Tabla5) y el fenotipo de resistencia por el método de Kirby-Bauer fue del 85% (Figura 3, Fotografía 11). Sin embargo, en un estudio reciente (Akpaka *et al.*, 2016), se encontró que el 100% (n=309) de las cepas MRSA presentó el gen *aac(6')/e-aph(2'')/a*, mientras que Paniagua *et al.*, (2014) describieron que la frecuencia de *aac(6')/e-aph(2'')/a* fue del 14.3% (n=9).



Las tetraciclinas ejercen su efecto al unirse a la subunidad 30S ribosomal inhibiendo la síntesis de las proteínas bacteriana (Pérez *et al.*, 2003). En este estudio se encontró el gen *tetM* en el 73.5% (n=25) de las cepas de *S. aureus*, *tetK* en el 59% (n=20) y *tetO* en el 6% (n=2) (Tabla 5, fotografías 8 y 9). En el año 2003 se reportó que únicamente el 5% de cepas de *S. aureus* fue resistente a la tetraciclina (Pérez e Iglesias, 2003). Posteriormente Rizzotti *et al.*, (2005) reportaron que el 66.7% de las cepas de *S. aureus* acarrearon el gen *tetM* y el 80.5% *tetK*. En el 2016 Akpaka *et al.*, describieron que los porcentajes de detección para los genes *tetM* y *tetK* en cepas MRSA fueron del 79% y del 80%, respectivamente. Se ha descrito (Lim *et al.*, 2013) que en un periodo de 6 años la resistencia a la tetraciclina aumentó en un 46%, hecho que se atribuyó al incremento en el uso de dicho antibiótico en los hospitales.

La Vancomicina es un antibiótico glucopéptido que actúa inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana. Se utiliza como antibiótico de reserva únicamente en el ámbito intrahospitalario para infecciones muy graves frente a cepas de MRSA y a otros antibióticos (Revilla, 2009). En este estudio ninguno de las cepas analizadas fue portadora de los genes *vanA* y *vanB* responsables de la resistencia a la Vancomicina (Tabla 5). Sin embargo, en Estados Unidos desde el 2002 ya fueron reportadas 12 cepas de *S. aureus* resistentes a Vancomicina provenientes de diversas de infecciones dentro de hospitales. Se sugiere que estos genes fueron obtenidos por las bacterias a partir de plásmidos provenientes de enterococos (Koss *et al.*, 2012).

En la práctica clínica se llevan a cabo diferentes medidas higiénicas para prevenir la propagación bacteriana utilizando desinfectantes cuaternarios de amonio, sin embargo, se han detectado cepas MRSA portadoras de los genes *qacA*, *qacB* y *qacC*, que codifican para la resistencia a estos compuestos (Zhang *et al.*, 2011). En este estudio se encontró que el gen *qacA/B* fue identificado en el 32.3% (n=11) de las cepas de *S. aureus*, mientras que el gen *qacC* fue detectado en el 29.4% (n=10) (Tabla 5 y Fotografías 12 y 13) Zmantar *et al.*, 2008 encontraron en cepas de *S. aureus* los genes *qacA* (24%), *qacB* (15%) y *qacC* (35%), junto con el gen

*erm* responsable de la resistencia a la Eritromicina. Esta incidencia de resistencia en cepas de *S. aureus* es resultado de la presión selectiva impuesta por agentes a base de cuaternario de amonio utilizados en hospitales. Además de la ubicación de los genes *qacA/B* en el plásmido de multiresistencia pSk1 que frecuentemente acarrea diversos genes de resistencia a antibióticos.

### **8.5 Combinaciones de los genes en las cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres de diálisis peritoneal.**

Se obtuvieron 9 patrones distintos de combinaciones de los genes que codifican para resistencia a antibióticos y desinfectantes (Tabla 6), dentro de los cuales los patrones no. 1 conformado por los genes de resistencia a tetraciclina, aminoglucósidos y de betalactamasas (*tetM, aac(6')Ie-aph(2'')Ia, blaZ*) y no. 2 por genes de resistencia a la tetraciclina y betalactamasas (*tetM, tetK, blaZ*) fueron los más frecuentes entre las cepas de *S. aureus* (17.6%; n=11). Se ha descrito que las cepas de *Staphylococcus aureus* frecuentemente son portadoras de plásmidos que acarrea genes de resistencia a antibióticos y desinfectantes, de tal manera que la selección a un antibiótico en particular o a algún compuesto de amonio, conduciría de manera indirecta a la selección de resistencia a antibióticos y/o a desinfectantes (Zhang *et al.*, 2011). Los patrones de resistencia a antibióticos y desinfectantes han sido estudiados recientemente en cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres de pacientes de hemodiálisis (Paniagua *et al.*, 2014), demostrando que en la actualidad el tratamiento de las infecciones por cepas de *S. aureus*, principalmente en los hospitales, es un serio problema de salud pública.

## **9. Conclusiones.**

1. *Staphylococcus aureus* fue el principal patógeno responsable de las infecciones asociadas a los catéteres de los pacientes de diálisis peritoneal.
2. La penicilina y la ampicilina fueron los antibióticos menos efectivos para el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus*.
3. En este estudio se demostró que las cepas de *S. aureus* asociadas a las infecciones de los catéteres de diálisis peritoneal fueron portadoras de genes de resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos, eritromicina, tetraciclina y desinfectantes.
4. Los resultados evidenciaron la presencia de diferentes patrones de genes de resistencia a los antibióticos y desinfectantes, por lo que se sugiere mejorar los protocolos de higiene durante el proceso de diálisis peritoneal.

## 10. Literatura citada.

1. Akpaka EP, Roberts R & Monecke S. 2016. Molecular characterization of antimicrobial resistance genes against *Staphylococcus aureus* isolates from Trinidad and Tobago. Unit of Pathology, University of the West Indies. J Infect Public Health.16:1-8.
2. Cabrera CE, Gómez RF, Zúñiga EA. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colomb Med. 38:149-158.
3. Chua T, Moore LC, Perri BM, Donabedian MS, Masch W, Vager D, Davis LS, Lulek K, Zimnicki B & Zervos JM. 2008. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Isolates in Urban Detroit. University School of Medicine, Boston USA. J Clin Microbiol. 46: 2345–2352.
4. Cervantes GE, González GR & Schettino SPM. 2014. Características generales de *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. 61: 29-31.
5. Devraj A, Pinnamaneni TS, Biswal M, Ramachandran R & Jha V. 2016. Extranasal *Staphylococcus aureus* colonization predisposes to bloodstream infections in patients on hemodialysis with non-cuffed internal jugular vein catheters. Department of Internal Medicine, New Delhi, India. Hemodial Int. 10: 1-6.
6. Eady EA, Ross JL, Tipper JL, Walters CE, Cove JH & Noble WC. 1993. Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci. J Antimicrob Chemother. 3: 211-217.
7. García PJD, Fariñasa MC & Gutiérrez CM. 2008. Infecciones asociadas a los catéteres utilizados para la hemodiálisis y la diálisis peritoneal. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 26: 518- 526.

8. Gómez J, García VE & Hernández TA. 2015. Los betalactámicos en la práctica clínica. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. Rev Esp Quimioter. 28: 1-9.
9. Ibrahem S, Salmenlinna S, Virolainen A, Kerttula AM, Lyytikäinen O, Jagerroos H, Broas M & Varkila VJ. 2009. Carriage of Methicillin-Resistant Staphylococci and Their SCCmec Types in a Long Term Care Facility. Department of Bacterial and Inflammatory Diseases. J Clin Microbiol. 47: 32-37.
10. K/DOQI. 2002. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Kidney Disease Outcome Quality Initiative. Am J Kidney Dis. 39 (S1), 1-266.
11. Kos NV, Desjardins AC, Griggs A, Cerqueira G, Tonder VA, Holden, TM, Godfrey P, Palmer LK, Mongodin FE, Wortman, JE, Feldgarden M, Lawley T, Gill RS, Haas BJ, Birren B & Gilmore SM. 2012. Comparative genomics of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their positions within the clade most commonly associated with methicillin-resistant *S. aureus* Hospital-Acquired Infection in the United States. Departments of Ophthalmology and of Microbiology and Immunobiology USA. mBio 3:1-9.
12. Koosha ZR, Hosseini MH, Aghdam ME, Tajandareh GS & Fooladi AA. 2014. Prevalence of exfoliative toxin A and B genes in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. Biology Department, Islamic Azad University of Jahrom Branch, Iran. J Infect Public Health. 7:178-180.
13. Leyva J.R, Álvarez AC & López MMG. 2004. Función renal en diabéticos tipo 2, determinada por fórmula de Cockcroft-Gault y depuración de creatinina. Unidad de Investigación en Epidemiología, Hospital General Regional 1, Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia, Michoacán. Rev Med IMSS. 42: 5-10.
14. Martínez AMO & García PJA. 2002. Eritromicina, descubrimiento, características y aplicaciones. Farmacología. OFFARM 21; 78-82.

15. Mayer S, Boosa M, Beyera A & Schmitza JF. 2001. Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. Institute for Medical Microbiology and Virology. J Antimicrob Chemother. 47: 896–897.
16. Méndez DA, Chavira SP, Martínez TC, Orozco MP & Godoy MA. 2007. La colocación percutánea de catéter de Tenckhoff, una técnica ideal para el inicio de diálisis peritoneal. Rev Fac Med UNAM 50: 204-207.
17. Méndez DA, Méndez BF, Tapia YT, Muñoz MA & Aguilar SM. 2010. Epidemiología de la insuficiencia renal en México. Hospital General Regional No 25, Instituto Mexicano del Seguro Social, Distrito Federal: México. Dial Traspl 31; 7-11.
18. Molina LJ, Manjarrez ZME & Tay ZJ. 2010. Microbiología, Bacteriología y Virología. Méndez Editores, México, DF; 95-114.
19. Murray RP, Rosenthal SK & Pfaller AM. 2014. Microbiología médica. Elsevier 7a edición, España; 123-138.
20. Nashev D, Toshkova K, Isrina S, Abdulwahed A, Lammler HC & Zschok M. 2004. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. National Center of Infectious and Parasitic Diseases. FEMS, Microbiol Lett. 233: 45-52.
21. Nourbakhsh F & Namvar EA. 2016. Detection of genes involved in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. GMS Hyg Infect Control. 11: 1-5.
22. Omuse G, Shivachi P, Kariuki S & Revathi G. 2013. Prevalence of Panton Valentine Leukocidin in Carriage and Infective Strains of *Staphylococcus aureus* at a Referral Hospital in Kenya. Department of Pathology, Aga Khan University Hospital, Nairobi, Kenya. Open J Med Microbiol. 3: 5-8.
23. Pahissa A. 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Marge Medica Books. 1era Edición Barcelona España, 15-33.
24. Palomino J & Pachon J. 2003. Aminoglucósidos. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla. España. Enferm Infecc Microbiol Clin. 21:105-114.

25. Paniagua CGL, Monroy PE & Vaca PS. 2007. Manual de identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, 43-75.
26. Paniagua CGL, Monroy PE, Vaca PF, Rodríguez MJR, Negrete AE & Vaca PS. 2014. Implementation of a novel in vitro model of infection of reconstituted human epithelium for expression of virulence genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheter-related infections in Mexico. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 13: 1-9.
27. Paniagua CGL, Sáinz ET, Monroy PE, Rodríguez MJR, Arenas AD, Negrete AE & Vaca PS. 2012. Virulence Markers in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Hemodialysis Catheters of Mexican Patients. *Advances on Microbiol* 2: 476-485.
28. Pérez TE & Iglesias L. 2003. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. Servicio de Microbiología. Hospital Donostia. San Sebastián. España. *Enferm Infecc Microbiol*. 21: 520-28.
29. Revilla C. N. 2009. Tesis doctoral: Análisis farmacocinético-farmacodinámico de Vancomicina en pacientes de UCI Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Salamanca, 19-28.
30. Rizzotti L, Simeoni D, Coconcelli P, Gazzola S, Dellaglio F & Torriani S. 2005. Contribution of enterococci to the spread of antibiotic resistance in the production chain of swine meat commodities. *J Food Prot*. 68:955-965.
- Rivas KB, Rivas MA, Dávila EL & Rodríguez M. 2002. Cefalosporinas, de la primera a la cuarta generación. *RFM*: 25 1-10.
31. Ross JI, Eady EA, Cove JH & Baumberg S. 1995. Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the *staphylococcal* erythromycin exporter *msrA* may interact. *Gene* 153: 93-98.
32. Ruiz PM, Torres SMJ, Arroyo PLA, Prados BT & Aznar MJ. 2005. Detección de la resistencia a meticilina e identificación de *Staphylococcus spp.* en hemocultivos positivos amplificando los genes *mecA* y *nucA* con el sistema

LightCycler. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 23:1-5.

33. Sampaio J, Machado D, Gomes AM, Machado I, Santos C, Lima N, Carvalho MJ, Cabrita A, Rodrigues A & Martins M. 2016. Deciphering the Contribution of Biofilm to the Pathogenesis of Peritoneal Dialysis Infections: Characterization and Microbial Behaviour on Dialysis Fluids. University of Minho, Campus de Gualtar, Braga, Portugal. *PLoS One*. 11: 1-15.
34. Sorum H & L'Abée Lund TM. 2002. Antibiotic resistance in food-related bacteria--a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *Int. J Food Microbiol*. 78: 43-56.
35. Smuszkiewicz P, Trojanowska I, & Tomczak H. 2009. Venous catheter microbiological monitoring. Necessity or a habit. *Med Sci Monit*. 15: 5-8.
36. Toshkova K, Annemüller C, Akineden O & Lämmle C. 2001. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections. A National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Bulgaria. *FEMS Microbiol Lett*. 7: 17-24.
37. Wu SH, Kuo SC, Chen LY, Chiang CM, Lin TY Wang DF & Fung P C. 2013. Comparison between patients under hemodialysis with community-onset bacteremia caused by community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Section of Infectious Diseases, Department of Medicine, Taiwán. *J Microbiol Immunol Infect*. 46: 96-103.
38. Zendejas MGS, Avalos FH & Soto PMY. 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, México. *Rev Biomed*. 25:129-143.
39. Zhang M, O'Donoghue MM, Ito T, Hiramatsu k & Boost MV. 2011. Prevalence of antiseptic-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci colonising nurses and the general population in Hong Kong. *J Hosp Infect*. 78: 113-117.



40. Zmantar T, Koudhi B, Miladi H & Bakhrouf A. 2011. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. BMC Res Notes. 4: 2-9.
41. <http://www.bibliotecaminsal.cl/wp/wpcontent/uploads/2016/04/Di%C3%A1lisis-Peritoneal.pdf>. Ministerio de Salud Pública. 2010. Guía Diálisis: Peritoneal.