



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Distribución de los diferentes tipos de *SCCmecA* y de los genes de resistencia a desinfectantes en cepas periodontales de *Staphylococcus aureus*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA :

JACQUELINNE GUILLEN RIOS

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. ERIC MONROY PÉREZ**



LOS REYES IZTACALA, EDO. MEX. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

- * Dedico este trabajo a mis padres, muchas gracias por todo el amor y apoyo que me han brindado a lo largo de todos estos años. Son lo más hermoso que tengo en este mundo y me siento muy privilegiada de ser su hija.

 - * A mis hermanos a quienes amo mucho, gracias por su compañía, consejos, apoyo y amor que me brindan todo el tiempo

 - * A mi hermano Alfredo, por todo lo que tenemos en común, por los sueños compartidos, por las pláticas y risas, por escucharme y apoyarme, por ser mi compañero de juegos y mi amigo, por enseñarme a ser más fuerte y sobre todo por cuidarme y preocuparte por mí.

 - * A mis amigos que han estado en las diferentes etapas de mi vida, en especial a Héctor, Monse y Karina. Gracias por contribuir a que mi estancia en la facultad fuera la etapa más hermosa de mi vida. Con cada uno de ustedes compartí y viví cosas únicas e inigualables que jamás podré olvidar, gracias por permitirme ser parte de su vida como ustedes son parte de la mía.

 - * Y a toda mi familia por el cariño y apoyo que siempre me han demostrado
-

Agradecimientos.

- * A la Universidad Nacional Autónoma de México particularmente a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por permitirme crecer como profesional y como persona.

 - * A mi Director de tesis el Dr. Eric Monroy Pérez por sus comprensión, apoyo y tiempo que me brindo para llevar a cabo este proyecto.

 - * A la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras por permitirme realizar mi proyecto de investigación en el laboratorio de análisis clínicos, por todos los conocimientos que me brindo, por su tolerancia y apoyo

 - * A mis asesores de tesis: DR. Sergio Vaca Pacheco, M.C. Alina Uribe García y a la Biól. Susana Esther González Almazán, quienes me brindaron su apoyo, orientación y conocimiento, muchas gracias por sus valiosas sugerencias, observaciones y correcciones para la culminación de este trabajo.
-

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Características de <i>Staphylococcus aureus</i>	2
2.3. Infecciones asociadas a la periodontitis	4
2.4. Resistencia bacteriana a los antibióticos y desinfectantes.	5
3. ANTECEDENTES.....	7
5. OBJETIVOS	9
5.1. Objetivo general.	9
5.2. Objetivos particulares.	9
6. METODOLOGÍA.....	10
6.1. Obtención de las muestras	10
6.2. Extracción del DNA bacteriano.....	10
6.3. Identificación de <i>S. aureus</i> por pruebas bioquímicas y PCR.....	10
6.4. Preparación de la muestra reactiva para PCR.	11
6.5. Identificación de los tipos de SCC <i>mecA</i> y de genes que codifican resistencia a desinfectantes en las cepas de <i>S. aureus</i>	12
6.6. Análisis de los amplicones por electroforesis.	14
7. RESULTADOS.....	15
7.1. Pacientes estudiados.	15
7.2. Identificación de <i>S. aureus</i>	16

7.4. Detección de genes que codifican resistencia a desinfectantes en cepas de <i>S. aureus</i> .	21
8. DISCUSIÓN.	23
8.1. Pacientes estudiados.	23
8.2. Identificación de <i>S. aureus</i> .	23
8.3. Identificación de tipos de SCC <i>mec</i> en cepas de <i>S. aureus</i> .	24
8.4. Detección de los genes que codifican resistencia a desinfectantes en cepas de <i>S. aureus</i> .	25
9. CONCLUSIONES.	26
10. BIBLIOGRAFÍA.	27

1. Resumen.

La elevada frecuencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) y a los desinfectantes es considerada un serio problema de salud que complica el tratamiento de las infecciones. La frecuencia de cepas MRSA asociada a la periodontitis ha sido muy poco estudiada. El objetivo de este trabajo fue identificar los diferentes tipos de SCC*mecA* y los genes de resistencia a desinfectantes (*qacA*, *qacB* y *qacC*) en un grupo de cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con periodontitis. Se analizaron 268 pacientes con enfermedad periodontal durante su asistencia a la clínica de endoperiodontología de la FES Iztacala, y de la clínica de Tláhuac de la ciudad de México. Las cepas de *S. aureus* fueron identificadas por pruebas bioquímicas como manitol, coagulasa y por PCR mediante la amplificación de los genes *rRNA*, *nuc*, región x de *spa* y *coa*. Los diferentes tipos de SCC*mecA* y los genes que codifican para resistencia a los desinfectantes se identificaron por PCR. *S. aureus* fue identificado en el 18.6% (n= 50) de los pacientes estudiados. SCC*mecA* tipo I estuvo presente en el 46% (n=23) de las cepas, el tipo II en el 6% (n=3) y el tipo V en el 4% (n=2). Los genes que confieren resistencia a desinfectantes *qacA* y *qacB* estuvieron presentes en el 52% (n=26) y el gen *qacC* en el 68% (n=34) de las cepas. Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que las cepas MRSA se encuentran asociadas a enfermedades periodontales, lo que sumado a la presencia de genes de resistencia a los desinfectantes podría ser un factor de riesgo importante para ocasionar infecciones periodontales crónicas.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, desinfectantes, enfermedad periodontal

2. Introducción

2.1. Características de *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, que se encuentran agrupados en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos irregulares parecidos a uvas. Estas bacterias se desarrollan rápidamente en muchos tipos de medios, fermentan carbohidratos, algunos son miembros de la microbiota normal de la piel y las mucosas del ser humano, otros producen supuración y formación de abscesos. El género *Staphylococcus* actualmente se encuentra conformado por 40 especies, dentro de las cuales *S. epidermis*, *S. saprophyticus* y *S. aureus* tienen importancia médica, debido a que se encuentran asociadas a enfermedades humanas (Murray, 2003).

S. aureus mide de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, son bacterias no móviles, no forman esporas, poseen cápsula, son anaerobias facultativas, sus colonias pueden medir de 1 a 3 mm, se observan lisas, elevadas, brillantes, presentan consistencia cremosa y pigmentación que va del amarillo a dorado debido a la producción de carotenoides, pueden producir coagulasa y fermenta manitol. Crecen en medios de cultivo con grandes cantidades de NaCl (7.5%)(Cervantes *et al.*, 2014).

2.2. Factores de virulencia

S. aureus es responsable del incremento de infecciones, tanto nosocomiales como adquiridas en la comunidad. La patogenicidad causada por *S. aureus* se debe al amplio número de factores de virulencia que posee, que incrementan la agudeza de las infecciones.

Entre los factores de virulencia más importantes que posee *S. aureus* se encuentra la pared celular, conformada por el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano que es el componente básico de la pared celular, tanto de bacterias Gram positivas como de las Gram negativas. La parte hidrofóbica del ácido lipoteicoico juega un papel en la adherencia, mientras que la parte covalente del peptidoglicano se une a las proteínas con función de adhesinas; el peptidoglicano está compuesto por cadenas de ácido N-acetilmurámico, ácido N-acetilglucosamina y de subunidades de disacáridos. En *S. aureus*, la pared celular representa la mitad del peso seco, dicha pared le confiere

resistencia osmótica, actividad endotóxica, estimula la agregación de los leucocitos, desencadena la producción de interleucina-1 (IL-1) por monocitos, estimula la quimiotaxis e induce la producción de anticuerpos opsonizantes. La pared celular representa gran importancia debido a que es el blanco de antibióticos como los β -lactámicos y glicopéptidos como la vancomicina (Cervantes *et al.*, 2014).

S. aureus posee diversas proteínas de superficie que pertenecen a la familia de adhesinas MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) codificadas por los genes *fnbA*, *fnbB*, *spa*, *clfB*, *cna*, *bbp*, *ebps*, *map/eap*, *sdrC*, *sdrD* y *sdrE*. Las MSCRAMMs median la adherencia a los tejidos del hospedero e inician la colonización, que termina cuando se establece una infección (Paniagua *et al.*, 2014).

Otro factor de virulencia importante en *S. aureus* es la producción de cápsula, conformada por polisacáridos, por lo que también se le llama slime o cápsula mucoide, esta facilita la adherencia de las bacterias a diversas células, además de tener capacidad antifagocitaria. Los polisacáridos capsulares de *S. aureus* incrementan el desarrollo de la biopelícula, que se encuentra constituida por un polímero de N-acetilglucosamina (PNAG) (Götz, 2002), también llamado Polisacárido Intercelular de Adhesión (PIA). El operón *icaADBC* es el responsable de codificar la biopelícula; sin embargo, existe un mecanismo alternativo para la formación de la biopelícula, en este mecanismo *S. aureus* expresa una variedad de adhesinas, entre estas se encuentra un grupo de proteínas denominadas *bap* (proteínas asociadas a biopelícula), que están ancladas a la pared celular de *S. aureus* y favorecen la unión de la bacteria a la biopelícula. Diversas investigaciones indican que la biopelícula protege a la bacteria contra la acción de los antimicrobianos y contra la respuesta inmune del hospedero, por lo que su presencia es considerada un factor importante para las infecciones recurrentes (Castañón, 2012).

La producción de enzimas y toxinas por *S. aureus* durante los procesos infecciosos permite la penetración e invasión de los tejidos. Entre las enzimas más importantes se encuentran proteasas, hialuronidasas, lipasas, fosfolipasas y coagulasa, mientras que entre las toxinas se encuentran: hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SE), las toxinas

exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina. Las bacterias portadoras de estos factores de virulencia son capaces de ocasionar infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis, enfermedades respiratorias como neumonía, intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos, además de artritis séptica, síndrome de la piel escaldada, meningitis y también se encuentran asociadas a periodontitis (Tay, 2012).

La hemolisina α es secretada por *S. aureus* y se integra en la membrana de las células blanco, formando heptámeros cilíndricos que son capaces de lisar las células eucariontes. Los poros que produce permiten la entrada y salida de iones y moléculas pequeñas que eventualmente producen la muerte de las células nucleadas y la lisis osmótica de los eritrocitos. La formación de poros también produce eventos secundarios que promueven el desarrollo de secuelas patológicas. Además, al romper la integridad celular aumenta la permeabilidad vascular.

La hemolisina α es neurotóxica y puede ser letal para ciertos animales. La hemolisina β tiene actividad de fosfolipasa c, la cual es específica para la esfingomielina y lisofosfatidilcolina. La diferencia en la susceptibilidad de los eritrocitos a la hemolisina β se debe al diferente contenido de esfingomielina en ellos. Su función durante la enfermedad no está determinada claramente.

La hemolisina γ afecta a neutrófilos, macrófagos y a una gran variedad de eritrocitos de mamíferos. No se sabe si induce la liberación de mediadores de la inflamación.

La hemolisina δ es capaz de causar daño en la membrana de un gran número de células de mamíferos. El 97% de las cepas de *S. aureus* produce hemolisina δ . Esta toxina es capaz de hidrolizar eritrocitos y otras células, así como estructuras subcelulares rodeadas por membrana como esferoplastos y protoplastos. Se ha propuesto que la hemolisina δ actúa como un surfactante disgregando la membrana celular (Saïd-Salim *et al.*, 2005).

2.3. Infecciones asociadas a la periodontitis

La periodontitis es una enfermedad crónica que se caracteriza por una respuesta inmune inflamatoria persistente ocasionada por la presencia de una placa bacteriana

que genera con el tiempo la destrucción del tejido óseo alveolar alrededor de los dientes, por lo que subsecuentemente ocurre el aflojamiento y la pérdida de las piezas dentales (Lorencinia *et al.*, 2009). Es ocasionada por diversos microorganismos que colonizan el área supra y subgingival. Ciertos grupos de especies bacterianas comúnmente conviven en sitios subgingivales y son reproduciblemente asociados con la periodontitis. Estos patógenos incluyen bacterias anaerobias como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus* y *Treponemas*.

S. aureus se transmite a los pacientes a través de la cavidad nasal y la cavidad oral, donde se encuentra altamente distribuido. Min *et al.* (2007) ha planteado la posibilidad de infección cruzada con múltiples cepas de *S. aureus* en el campo dental, mediado por contacto de efusiones, piel, y saliva entre el personal de atención dental y los pacientes, o por contacto con *S. aureus* flotando en forma de aerosoles y por contaminación de los instrumentos médicos y las sillas de la unidad.

La periodontitis es un importante problema de salud pública a nivel mundial, que ha tenido un incremento en la última década. El padecimiento de enfermedades periodontales está asociado con un aumento de riesgo en enfermedades cardiovasculares, de igual manera, se relaciona con la influencia del curso de infecciones respiratorias.

2.4. Resistencia bacteriana a los antibióticos y desinfectantes.

El incremento de cepas multirresistentes de *S. aureus* a los antibióticos es considerado un serio problema de salud, que disminuye las alternativas del tratamiento médico (Collery *et al.*, 2008). Las infecciones ocasionadas por cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) incrementa el riesgo de infecciones crónicas (Ray, 2017; Cho & Chung 2017).

Las cepas MRSA son portadoras del gen *mecA* y *mecC* que codifican para la forma modificada de penicillin-binding protein 2a (PBP2a). Estas son proteínas que confieren resistencia a la mayoría de antibióticos β -lactámicos, presentan baja actividad de unión a la penicilina (meticilina, dicloxacilina, nafcilina, oxacilina, etc. y a las cefalosporinas (Deurenberg *et al.*, 2007). Los genes *mec* se encuentran insertos en un elemento genético móvil llamado Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*), este

facilita la transferencia horizontal de genes en estafilococos.(Zong, 2011; Monecke *et al.*, 2015)

Se han descrito cinco clases de complejos *mec* (A, B, C₁, C₂ y D), y cinco alotipos de complejos genéticos *mec* y de los alotipos *ccr* dan lugar a varios tipos de SCC*mec*, que son clasificados de acuerdo con variaciones en la región "J" (región de inserción), y se diferencian también, según los determinantes genéticos adquiridos como resultado de la integración de plásmidos y transposones. Hasta el momento se han descrito 13 tipos SCC*mec* que van desde I al XIII. (Zhang *et al.*, 2008; Kaya *et al.*, 2018)

Además del uso de antibióticos para erradicar las infecciones por *S. aureus*, se han empleado en los hospitales desinfectantes para prevenir la propagación de las bacterias. Los desinfectantes son agentes químicos que destruyen o inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos en fase vegetativa o no esporulada. Su eficacia depende de factores como tipo de desinfectante, pH del medio, presencia de materia orgánica y naturaleza de los microorganismos. Los desinfectantes más utilizados son: hipocloritos, desinfectantes yodados, tenso activos anfóteros, compuestos fenólicos y compuestos de amonio cuaternario, estos son utilizados principalmente en la descontaminación de superficies, así como en la desinfección de manos del personal. (Sánchez *et al.*, 2005)

El uso excesivo de estos compuestos ha contribuido a la aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a los desinfectantes, la resistencia puede ser una propiedad natural (intrínseca) o debida a mutación o adquisición de plásmidos (DNA extracromosómico) o transposones (cassettes de DNA transmisibles). La resistencia intrínseca ha sido demostrada en especies del genero *Staphylococcus* (Cabrera *et al.*, 2007; Cash, 2002). En *S. aureus* se han descrito los genes responsables de la resistencia a estos compuestos: *qacA*, *qacB* y *qacC* (Zmantar *et al.*, 2011).

En las cepas de *S. aureus* resistentes a la metilina (MRSA) los genes *qacA*, *qacB* y *qacC* frecuentemente se encuentran en plásmidos, lo que ha contribuido a la propagación de estos genes de resistencia a desinfectantes a lo largo del tiempo entre las bacterias.

3. Antecedentes

Katayama y colaboradores en 2003 realizaron un estudio sobre la organización cromosómica del gen *mecA* en cepas de *S. aureus*.

Hamdan-Partida y colaboradores en 2010 estudiaron la presencia de *S. aureus* en la garganta y en las fosas nasales de 1 243 personas. El porcentaje de portadores sanos fue del 59.8%, además se demostró que la colonización por *S. aureus* fue mayor en la garganta con un 38% en comparación con el 22% registrado en las fosas nasales. También reportaron que el 91.1% de las cepas fue resistente a la penicilina. Estos autores concluyeron, que *S. aureus* puede permanecer en personas durante años sin causar alguna enfermedad.

Zhang y colaboradores en 2011 analizaron un grupo de cepas nasales de *S. aureus* aisladas de los pacientes y del personal de la salud, para establecer la frecuencia de los genes de resistencia a los desinfectantes. Estos autores encontraron los genes *qacA* y *qacB* en el 11.3% de las cepas de *S. aureus* de los pacientes, mientras que la frecuencia de estos genes en las cepas aisladas de las enfermeras fue del 42%, por lo que en las enfermeras representan un gran riesgo de salud para los pacientes hospitalizados.

Zmantar y colaboradores en 2011 detectaron por PCR multiplex los genes de resistencia a eritromicina y a desinfectantes en 117 cepas de *S. aureus* (46 cepas aisladas de pacientes con infección articular, 22 de fluido de diálisis y 49 de agujas de un servicio de diálisis). Los genes que confieren resistencia a los desinfectantes de cloruro de benzalconio fueron identificados en 88 cepas.

Kim & Lee en 2015 demostraron que *S. aureus* desempeña un papel importante en el aumento de las enfermedades dentales al formar una biopelícula. Ésta comienza cuando las bacterias se adhieren a la superficie de los dientes.

Koukos y colaboradores en 2015 evaluaron por medio de PCR la prevalencia de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) en pacientes sanos y con enfermedad periodontal, *S. aureus* fue detectado en el 18% de los pacientes.

4. Justificación

Debido a que la caracterización molecular de cepas MRSA relacionadas con enfermedades periodontales ha sido poco estudiada, el presente trabajo contribuirá a establecer la distribución de los diferentes tipos de SCC*mecA* y los genes que codifican resistencia a desinfectantes en cepas periodontales de *S. aureus*.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general.

- Identificar los diferentes tipos de SCC*mecA* y su asociación con genes que codifican resistencia a desinfectantes en un grupo de cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con periodontitis.

5.2. Objetivos particulares.

- Determinar mediante PCR los genes *qacA*, *qacB* y *qacC* que codifican resistencia a desinfectantes en las cepas de *S. aureus*.
- Identificar por PCR multiplex los diferentes tipos de SCC*mecA* en las cepas.

6. Metodología

6.1. Obtención de las muestras

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de Salud Integral (CUSI), de la FES Iztacala. En este estudio se analizaron 50 cepas de *S. aureus* previamente aisladas de pacientes con enfermedad periodontal que acudieron durante marzo a noviembre de 2016 a las clínicas de endoperiodontología de las FES Iztacala, UNAM y de la clínica de endoperiodontología (Tiáhuac) de la ciudad de México. Fueron excluidos de este estudio pacientes embarazadas, o en lactancia, con enfermedades infecciosas (hepatitis y VIH) y los que recibieron tratamiento periodontal o con antibióticos en los últimos seis meses.

6.2. Extracción del DNA bacteriano.

Las cepas de *S. aureus* aisladas de los pacientes con periodontitis fueron incubadas en el medio líquido de cultivo BHI (infusión-cerebro-corazón, Bioxon México), y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente fueron sembradas por el método de estría cruzada en el medio de cultivo S-110 (Bioxon México) a 37°C durante 24 horas. A partir del crecimiento y por medio de asas estériles, se tomaron varias colonias y se depositaron en un tubo con tapón de rosca de 16 x 150 que contenía 2 mL de agua desionizada estéril. La muestra se agitó en un vortex por 20 segundos y se colocó a baño maría durante 20 minutos. Al terminó las muestras se depositaron en contenedores con hielo por 10 minutos. Al finalizar las muestras se centrifugaron en tubos eppendorff a 12 000 rpm por 10 minutos. Finalmente se separó el sobrenadante y se guardó a -20° C para su posterior utilización.

6.3. Identificación de *S. aureus* por pruebas bioquímicas y PCR.

Las cepas fueron identificadas por las pruebas bioquímicas bacteriológicas de manitol y coagulasa y por PCR mediante amplificación de los genes rRNA (Straub *et al.*, 1999) *nuc* (Brakstad *et al.*, 1992) región *x* de *spa* (Frenay *et al.*, 1996) y *coa* (Hookey *et al.*, 1998). La tabla 1 muestra los oligonucleótidos utilizados y el tamaño de los amplicones.

6.4. Preparación de la muestra reactiva para PCR.

El volumen final de las mezclas de reacción para PCR fue de 25 µL: 3 µL de ADN molde, 8 µL de agua libre de nucleasas estéril, 1 µL de cada oligonucleótido (10 pmol, Tabla 1), 12 µL AMPLIQON IIII (PCR ENZYMES & REAGENTS) que contenían 1.5 mmol de MgCl₂, 0.2 U de Ampliqon Taq DNA polimerasa y 0.4 mmol de dNTPs.

Tabla 1. Oligonucleótidos que se emplearon en la identificación *S. aureus*.

Oligonucleótidos	Gen	Secuencia (5'→3')	Tamaño del amplicon (pb)
Spa (región x) F Spa (región x)R	<i>spa</i>	CAAGCACCAAAAAGAGGAA CACCAGGTTTAACGACAT	Polimorfismo
coa R coa F	<i>coa</i>	ATAGAGATGCTGGTACAGG GCTTCCGATTGTTTCGATGC	
23 rRNA F 23 rRNA R	<i>23 rRNA</i>	ACGGAGTTACAAAGGACGAC AGCTCAGCCTTAACGAGTAC	1250
Nuc-1 Nuc-2	<i>nuc</i>	GCGATTGATGGTGATACGGTT ACGCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	279

Las condiciones para la amplificación de cada gen fueron:

spa región X: desnaturalización inicial 95°C por 3 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto). Finalmente una extensión a 72°C por 3 minutos y un enfriamiento a 4 °C por 2 minutos.

23S *rRNA*: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, 37 ciclos (desnaturalización 94°C por 40 segundos, alineación a 64°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1.15 minutos). Una extensión final de 72°C por 3 minutos y un enfriamiento a 4°C por 2 minutos.

coa: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, 37 ciclos (desnaturalización 94°C por 1 minuto, alineación a 58°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto). Una extensión final de 72°C por 3 minutos y un enfriamiento a 4°C por 2 minutos.

nuc: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, 37 ciclos (desnaturalización 94°C por 1 minuto, alineación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos). Una extensión final de 72°C por 3 minutos y un enfriamiento a 4°C por 2 minutos.

6.5. Identificación de los tipos de *SCCmecA* y de los genes que codifican resistencia a desinfectantes en las cepas de *S. aureus*.

La identificación de los tipos de *SCCmec* se realizó por el método de PCR multiplex descrito por Milheiriço y colaboradores en 2007. Para lo cual se utilizó el equipo comercial AMPLIQON IIII (PCR ENZYMES & REAGENTS) (1.5 mmol de MgCl₂, 0.2 U de AmpliqonTaq DNA polimerasa y 0.4 mmol de dNTPs). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 35 µL: 3 µL de ADN molde, 1 µL de cada oligonucleótido (10 pmol, Tabla 2) y 12 µL de AMPLIQON IIII. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 74°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto). La extensión final fue de 72°C por 4 minutos. La tabla 2 muestra los oligonucleótidos utilizados y el tamaño de los amplicones.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la detección de los diferentes tipos de SCCmecA en las cepas de *S. aureus*.

Oligonucleótido	Secuencia(5'→3')	Región SCCmecA amplificada	Tamaño (pb)
CIF2 F2 CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	<i>I, J1 region</i>	495
ccrC F2 ccrC R2	GTA ^{ACT} CGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	<i>V, ccr complex</i>	449
RIF5 F10 RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG ATGGAGATGAATTACAAGGG	<i>III, J3 region</i>	414
SCC mec VJ1 F SCC mec VJ1 R	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC AGAGACTACTGACTTAAGTGG	<i>V, J1 region</i>	377
dcs F2 dcs R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	<i>I, II, IV, y VI, J3 region</i>	342
ccrB2 F2 ccrB2 R2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG CCGATATAGAAWGGGTTAGC	<i>II y IV, ccr complex</i>	311
kdp F1 kdp R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	<i>II, J1 region</i>	284
SCC mec III J1F SCC mec III J1 R	CATTTGTGAAACACAGTACG GTTATTGAGACTCCTAAAGC	<i>III, J1 region</i>	243
mecl P2 mecl P3	ATCAAGACTTGCATTCAGGC GCGGTTTCAATTC ^{ACT} TGTC	<i>II y III, mec complex</i>	209
mecA P4 mecA P7	TCCAGATTACA ^{ACT} TCACCAGG C ^{CACT} TCATATCTTGTAACG	control interno positivo	162

La identificación de los genes de resistencia a los desinfectantes *qacA*, *qacB* y *qacC* en las cepas de *S. aureus* se realizó por PCR de punto final conforme lo descrito por Sekiguchi *et al.*, (2004). Para lo cual se utilizó el equipo comercial AMPLIQON IIII (PCR ENZYMES & REAGENTS) (1.5 mmol de MgCl₂, 0.2 U de AmpliqonTaq DNA polimerasa y 0.4 mmol de dNTPs). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 µL: 3 µL de ADN molde, 8 µL de agua libre de nucleasas estéril, 1 µL de cada oligonucleótido (10 pmol, Tabla 3) y 12 µL de AMPLIQON IIII. Las condiciones de amplificación para *qacA*, *qacB* y *qacC* fueron: desnaturalización inicial a 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. La tabla 3 muestra los oligonucleótidos utilizados y el tamaño de los amplicones.

Tabla. 3 Oligonucleótidos utilizados para la detección de los genes que codifican resistencia a desinfectantes.

Oligonucleótido	Gen	Secuencia(5'→3')	Tamaño (pb)
qacA, qacB F	<i>qacA</i> ,	TCCTTTTAATGCTGGCTTATACC	220
qacA, qacB R	<i>qacB</i>	AGCC TACCTCCTGCTCCAACTA	
qacC F	<i>qacC</i>	GGCTTTTCAAATTTATACCATCCT	249
qacC R		ATGCGATGTTCCGAAAATGT	

6.6. Análisis de los amplicones por electroforesis.

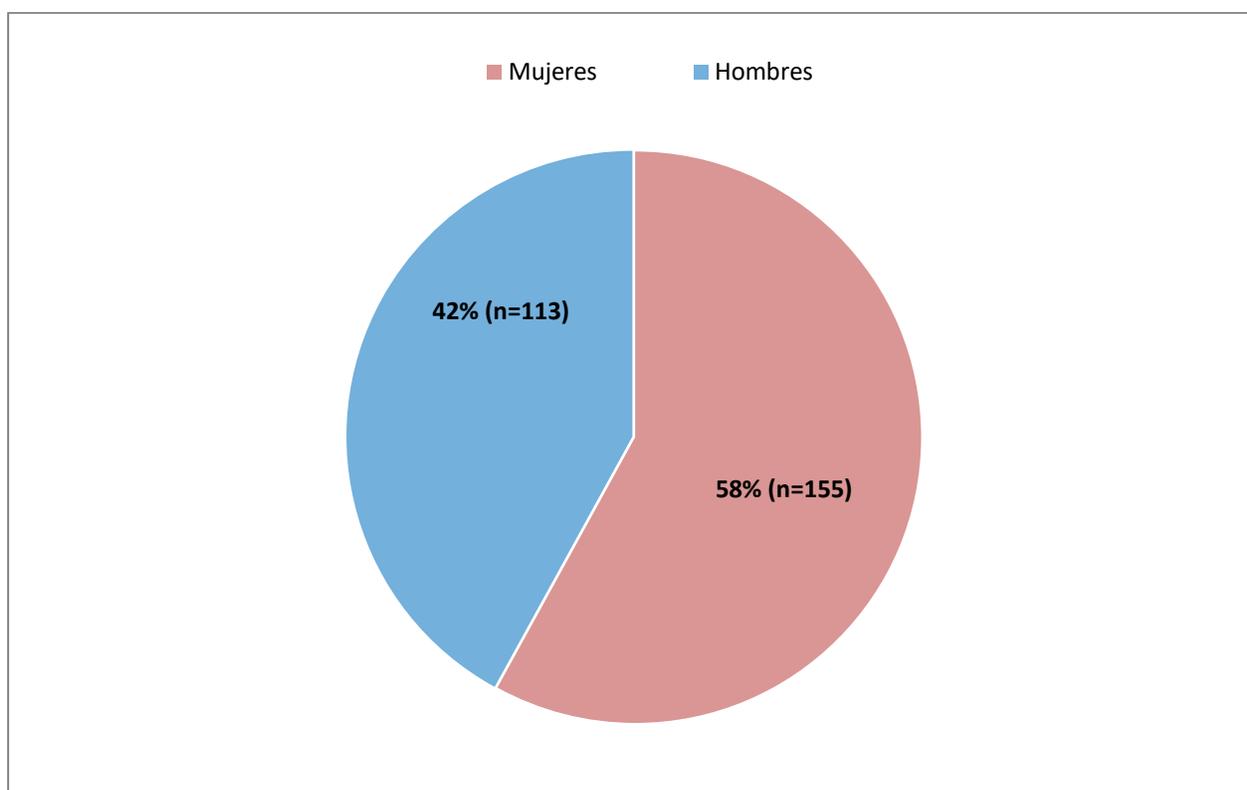
Para visualizar los amplicones de PCR, se tomaron 8 µL de cada muestra y se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con 0.3 µL de Midori Green (BIORAD). Las condiciones de corrimiento fueron: 120 volts, 94 miliampers por un tiempo de 40 minutos. Los tamaños de los amplicones fueron comparados con un marcador de 100 pb. Los geles se observaron bajo luz UV y se fotografiaron con el sistema de foto documentación GEL LOGIC 100 (KODAK).

7. Resultados.

7.1. Pacientes estudiados.

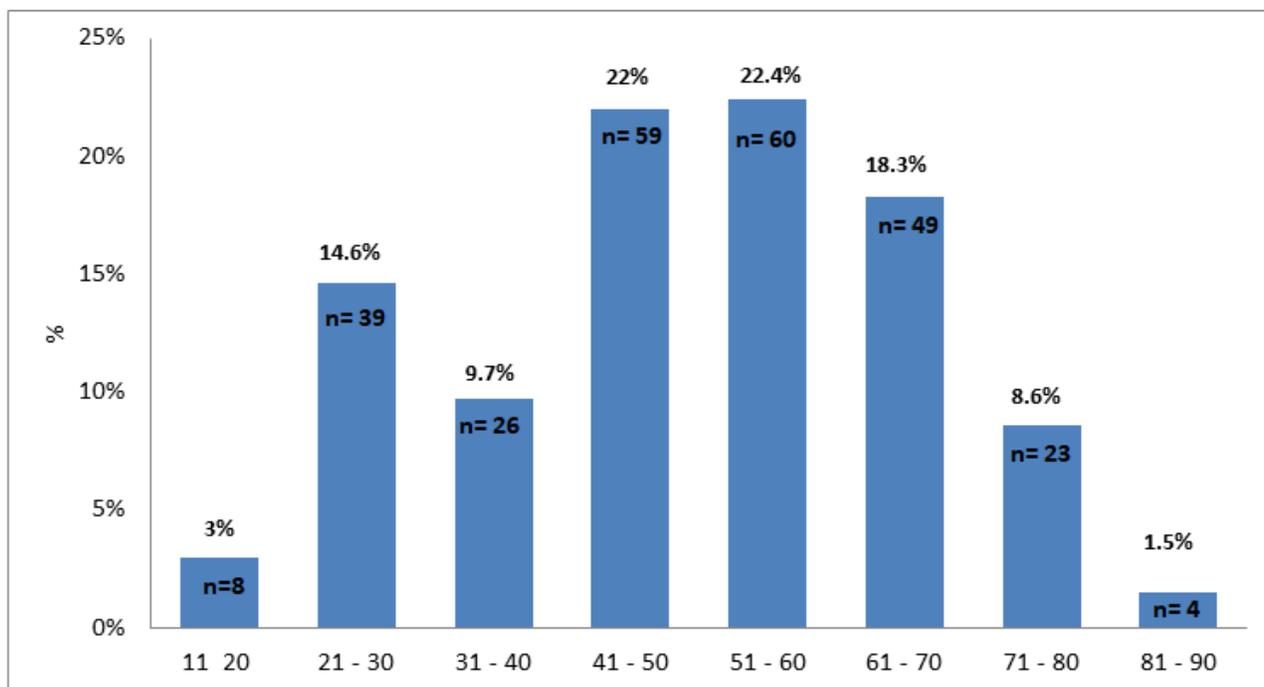
Se analizó un total de 268 pacientes con enfermedad periodontal. Estos pacientes presentaron gingivitis (n=15), periodontitis moderada (n=162) y periodontitis crónica (n=91). De los cuales el 58% (n= 155) correspondió al sexo femenino y el 42% (n= 113) al sexo masculino (Figura 1).

Figura 1. Distribución de los pacientes por sexo.



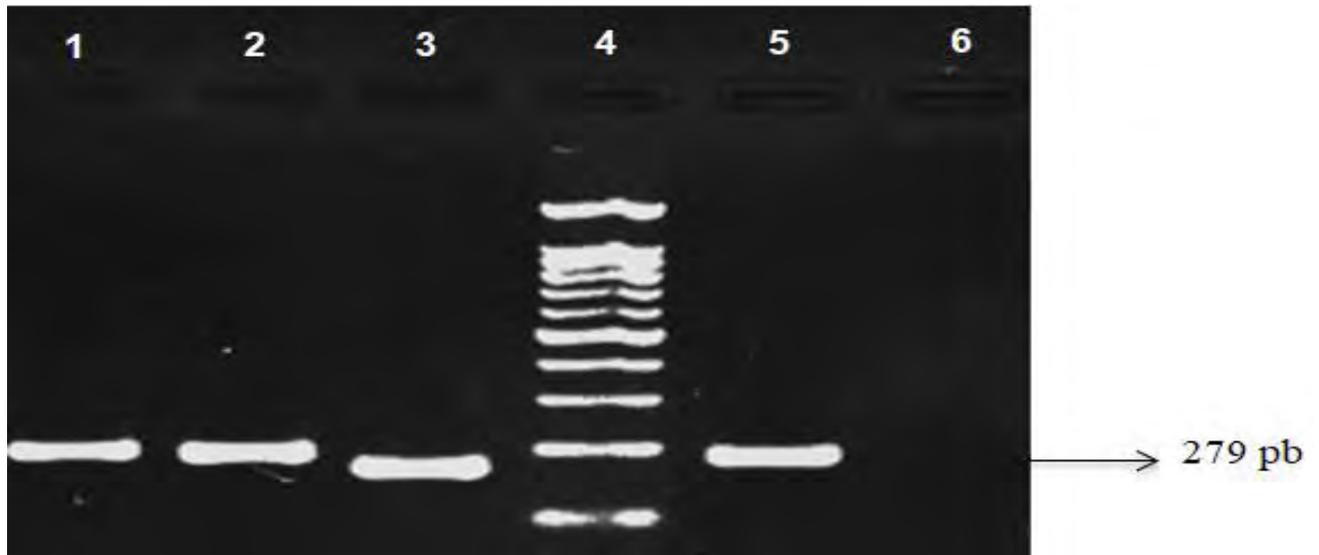
La distribución de pacientes por edad se puede observar en la figura 2. El grupo que presentó mayor frecuencia fue el de 51 a 60 años (22.4%, n=60), seguido por los grupos de 41 a 50 (22%, n=59), 61 a 70 (18.3%, n=49), 21 a 30 (14.6%, n=39) y 31 a 40 (9.7%, n=26). Finalmente los grupos con menor frecuencia fueron: 71 a 80 (8.6%, n=23), 11 a 20 (3%, n= 8) y 81 a 90 (1.5%, n=4) (figura 2).

Figura 2. Distribución de los pacientes por edad.

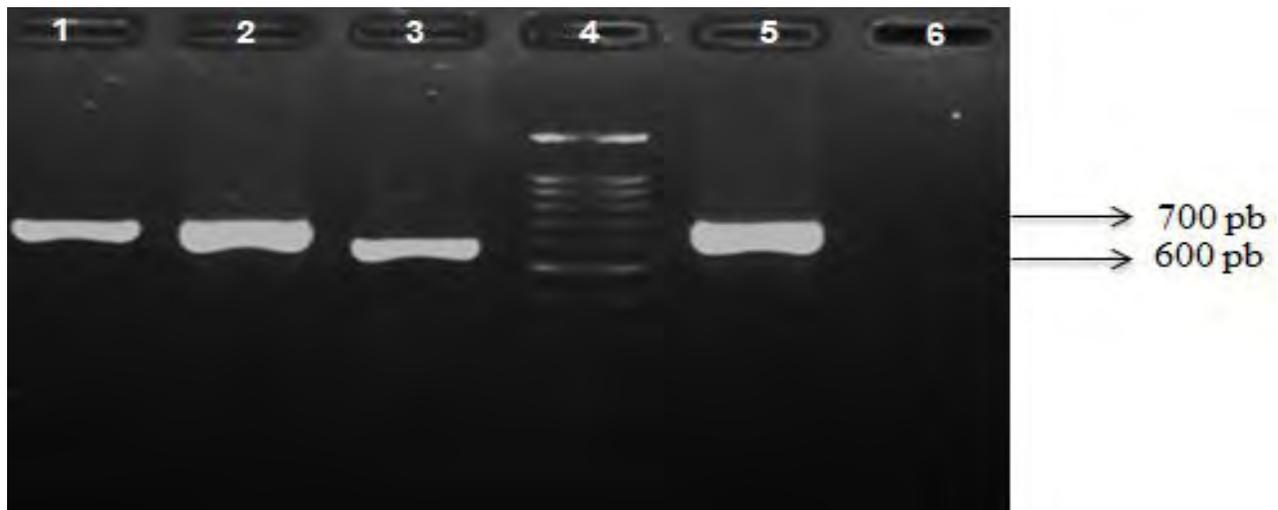


7.2. Identificación de *S. aureus*.

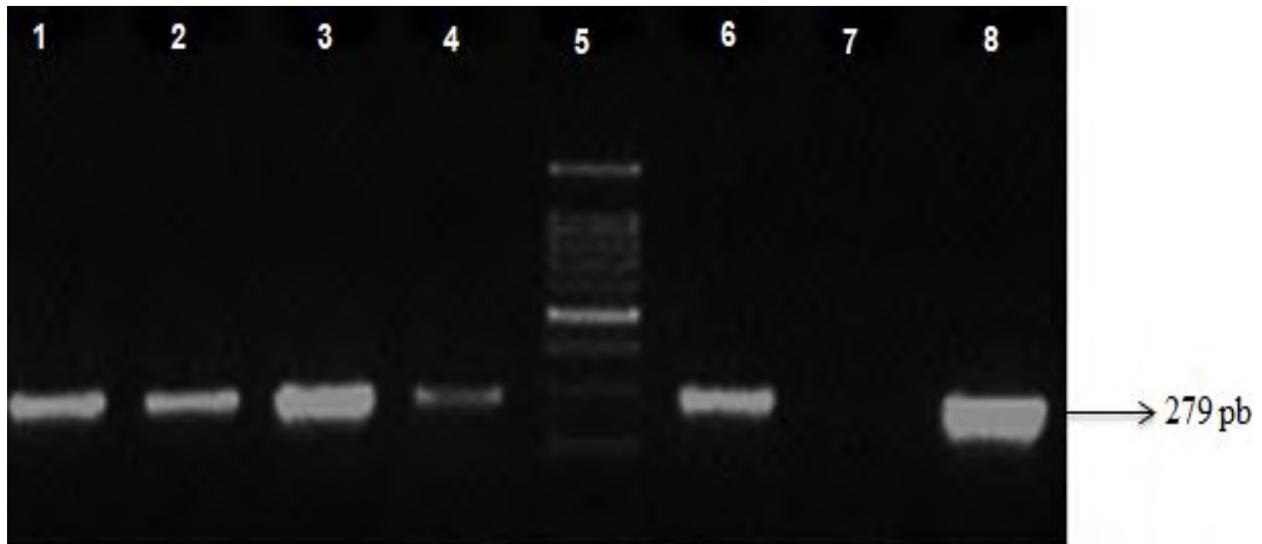
A partir de los 268 pacientes con enfermedad periodontal, *S. aureus* fue identificado en el 18.6% (n= 50), de ellos por PCR convencional mediante amplificación de los marcadores *spa* (región X) (Fotografía 1), *coa* (Fotografía 2), *nuc* (Fotografía 3) y 23S *rRNA* (Fotografía 4).



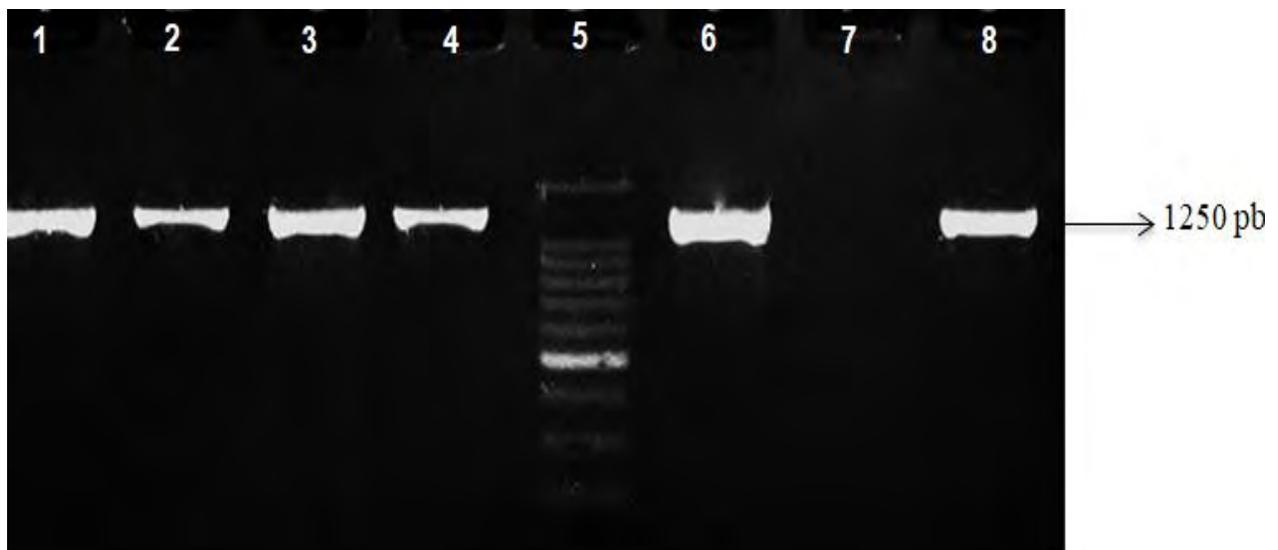
Fotografía 1. Detección del gen *spa* en cepas de *S. aureus* por PCR convencional. Carriles 1-3, *spa* (200 y 180 pb). Carril 5, control positivo (*S. aureus* ATCCC 33592 *mecA*+), carril 4, MWM (100 pb), carril 6, control negativo (sin ADN molde).



Fotografía 2. Detección del gen *coa* en cepas de *S. aureus* por PCR convencional. Carriles 1-3, *coa* (600 y 550 pb), carril 5, control positivo (*S. aureus* ATCCC 33592 *mecA*+), carril 4 MWM (100 pb), carril 6, control negativo (sin ADN molde).



Fotografía 3. Detección del gen *nuc* en cepas de *S. aureus* por PCR convencional. Carriles 1-4 y 6, *nuc* (279 pb), carril 5 MWM (100 pb), carril 7, control negativo (sin ADN molde), carril 8, control positivo (*S. aureus* ATCCC 33592 *mecA*+).



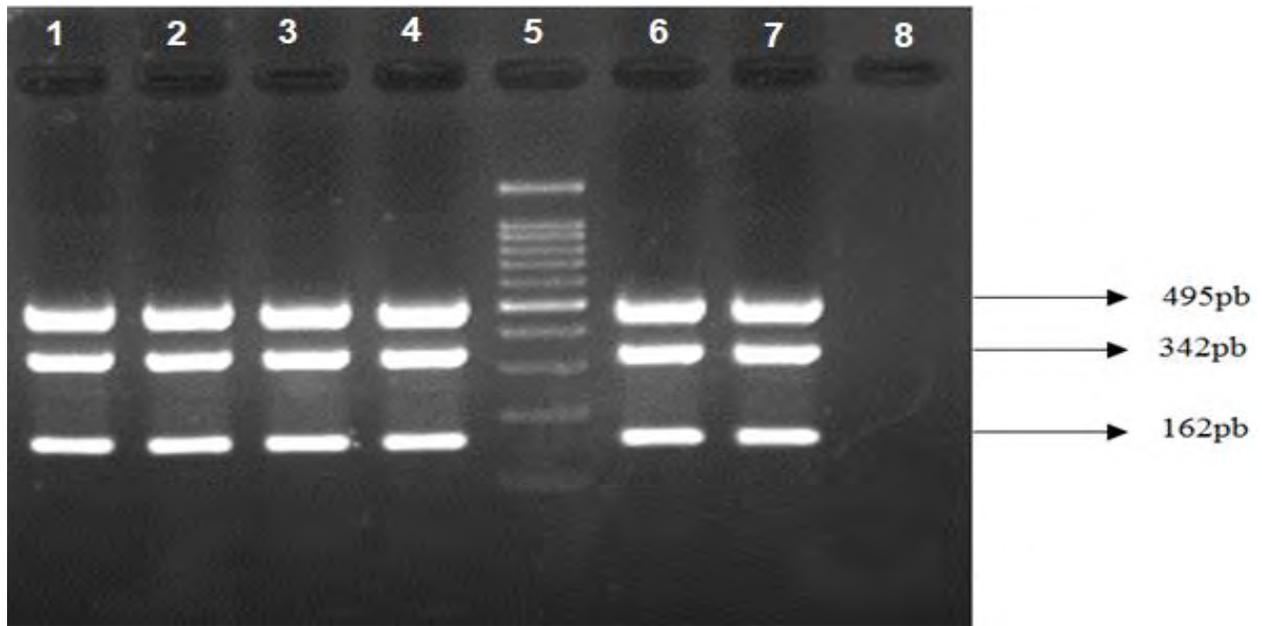
Fotografía 4. Detección del gen 23S *rRNA* en cepas de *S. aureus* por PCR convencional. Carriles 1-4 y 6, 23S *rRNA* (1250 pb), carril 5 MWM (100 pb), carril 7, control negativo (sin ADN molde), carril 8, control positivo (*S. aureus* ATCCC 33592 *mecA*+).

7.3. Detección de tipos de *SCCmec* en cepas de *S. aureus*.

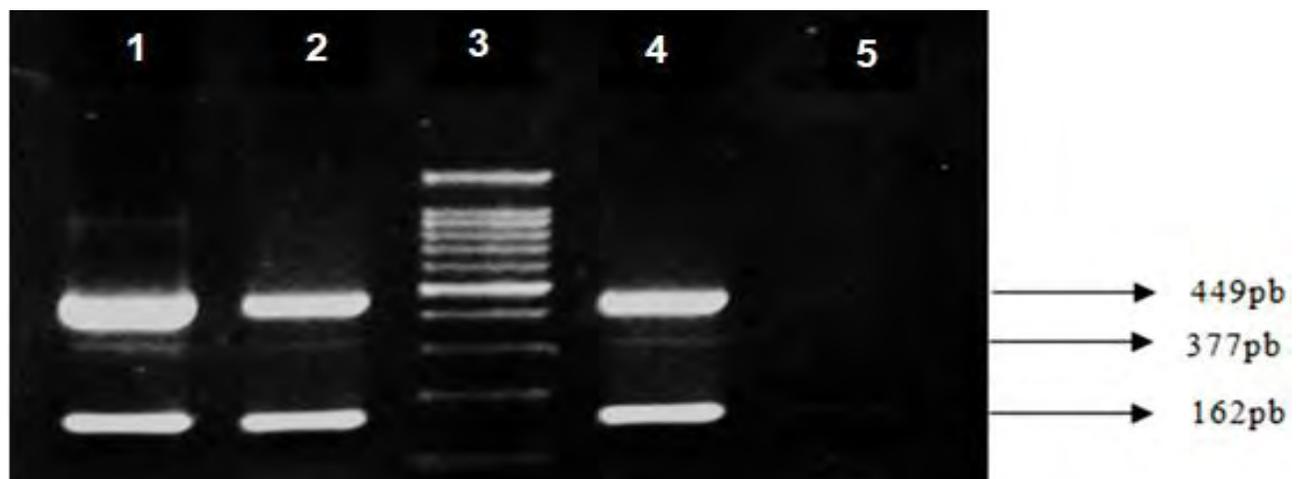
En cuanto a la identificación de los diferentes tipos de *SCCmec*, el tipo I se encontró presente en el 46% (n=23) de las cepas (Tabla 4, fotografía 3), el tipo II y el tipo IV, en el 6% (n=3), en cada caso, y el tipo V en el 4% (n=2) de las cepas. El *SCCmec* tipo III no se encontró en ninguna de las cepas.

Tabla. 4 Detección de tipos de *SCCmec* y genes que codifican para resistencia en desinfectantes en cepas de *S. aureus*.

Tipo de <i>SCCmec</i> /gen	N=50	%
<i>SCCmec</i> I	23	46
<i>SCCmec</i> II	3	6
<i>SCCmec</i> V	2	4
<i>qacA/qac B</i>	26	52
<i>qacC</i>	34	68



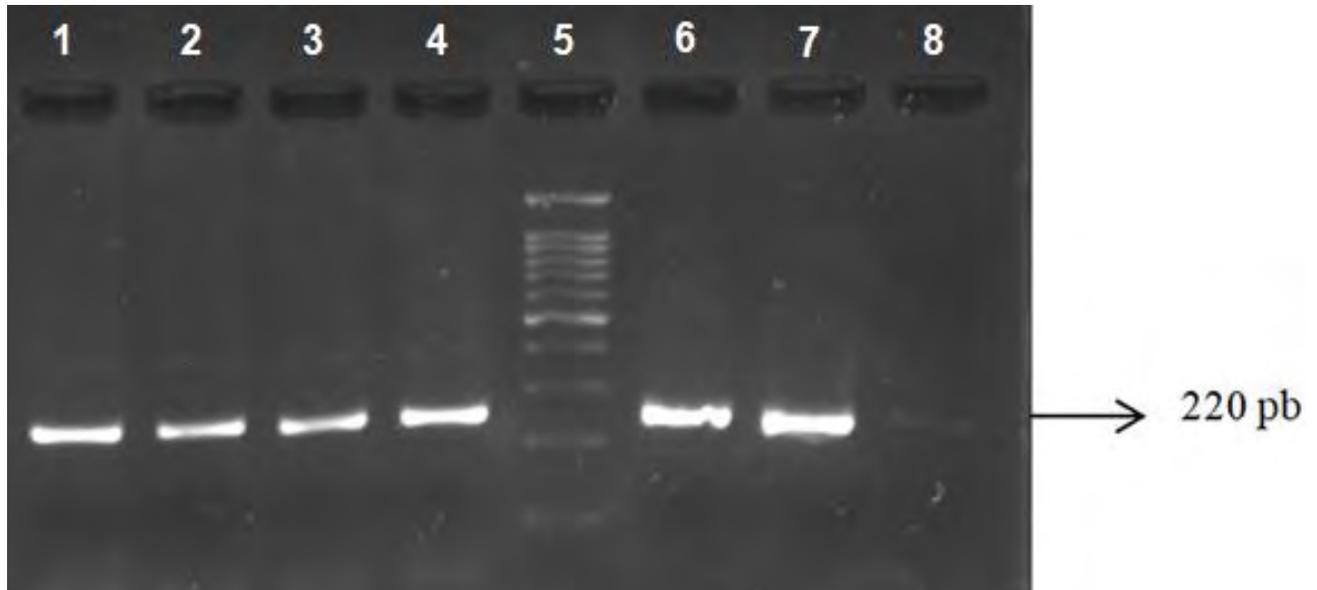
Fotografía 5. Identificación de SCCmec tipo I en cepas de de *S. aureus* por PCR multiplex. Carriles 1-4 y 6, SCCmec tipo I (162, 342 y 495 pb), carril 5, MWM (100 pb) carril 7, control positivo (*S. aureus* del cepario del Lab. Clínico), carril 8, control negativo (sin DNA molde).



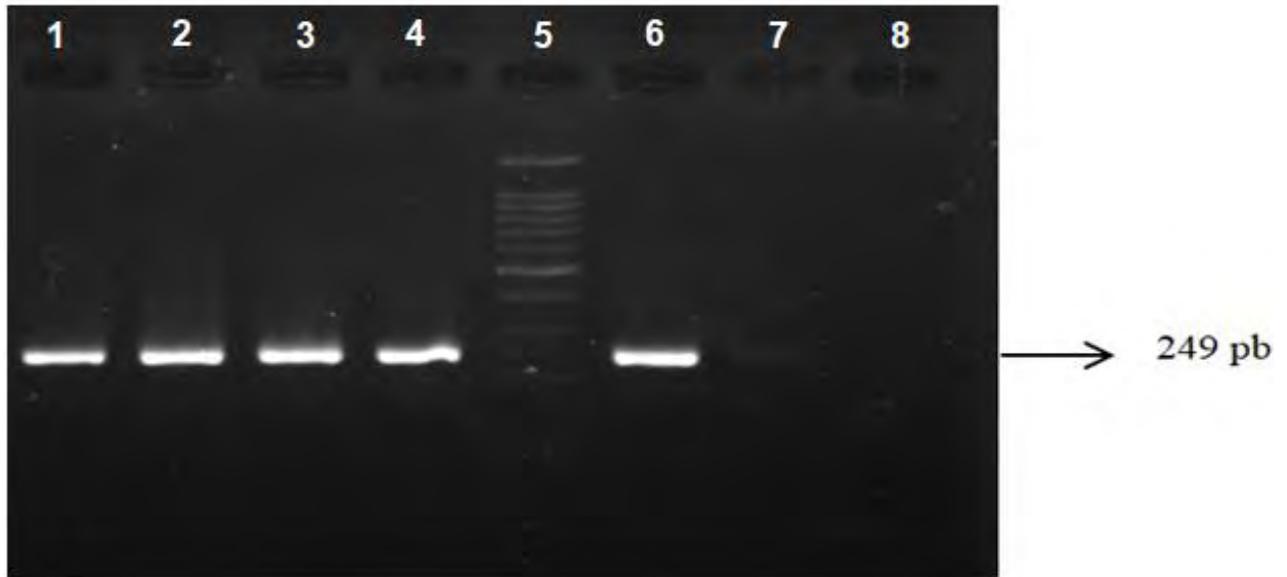
Fotografía 6. Identificación de SCCmec tipo V en cepas de de *S. aureus* por PCR multiplex. Carriles 1 y 2, SCCmec tipo V (162, 377, y 449 pb), carril 3 MWM (100 pb), carril 4, control positivo (*S. aureus* del cepario del Lab. Clínico), carril 5, control negativo, (sin DNA molde).

7.4. Detección de genes que codifican resistencia a desinfectantes en cepas de *S. aureus*.

El 52% (n=26) de las cepas de *S. aureus* fue portadora de los genes que confieren resistencia a desinfectantes *qacA* y *qacB* (fotografía 6), mientras que el gen *qacC* se identificó en el 68% (n=34) de las cepas (fotografía 7).



Fotografía 7. Detección de los genes *qacA* y *qacB* en cepas de en cepas de *S. aureus* por PCR convencional. Carriles 1-4 y 6, *qacA* y *qacB* (220 pb), carril 5 MWM (100 pb), carril 7, control positivo (*S. aureus* del cepario del Lab. Clínico), carril 8, control negativo (sin DNA molde).



Fotografía 8. Detección del gen *qacC* en cepas de en cepas de *S. aureus* por PCR convencional. Carriles 1-4 y 6, *qacC* (249 pb), carril 5 MWM (100 pb), carril 7 control positivo (*S. aureus* del cepario del Lab. Clínico), carril 8, control negativo (sin DNA molde).

8. Discusión.

8.1. Pacientes estudiados.

En este trabajo se analizaron 268 pacientes con enfermedad periodontal, de los cuales el 58% (n= 155) correspondió al sexo femenino y el 42% (n= 113) al sexo masculino (Figura 1). La periodontitis es más frecuente en los países en desarrollo, sin embargo en una encuesta realizada en Estados Unidos se reportó que aproximadamente el 22% de los adultos estadounidenses tenían enfermedad leve y el 13% tenían enfermedad moderada o grave, siendo más prevalente en los hombres que en las mujeres, y en los negros y mexicano-americanos que en la gente blanca (Albandar *et al.*, 1999). Se ha descrito que existen factores de riesgo como tabaquismo, enfermedades sistémicas, antiepilépticos, medicamentos durante la terapia de cáncer, mala colocación de puentes dentales, falta de dientes, embarazo, uso de anticonceptivos, pacientes con VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) o diabetes mellitus que incrementan la enfermedad periodontal (Amar *et al.*, 2013).

En este estudio la edad de los pacientes estudiados se encontró en el intervalo de 11 hasta 90 años, el rango de edad más frecuente fue el de 51 a 60 años (22.4%, n=60), seguido por el grupo de 41 a 50 (22%, n=59) (Figura 2). Estos resultados coinciden con un estudio realizado en México (Minaya *et al.*, 2007), donde se describió que la enfermedad periodontal parece ser un problema mayor de salud pública global que afecta a la mayoría de la población adulta después de los 35 años, debido a que se observa un patrón de progreso continuo de la enfermedad periodontal con el avance de la edad y que la enfermedad se inicia como gingivitis, y si no se trata a tiempo conduce a la periodontitis destructiva progresiva.

8.2. Identificación de *S. aureus*.

A partir de los 268 pacientes con enfermedad periodontal, *S. aureus* fue identificado en el 18.6% (n= 50) por medio de PCR convencional mediante la amplificación de los marcadores cromosómicos *spa* región X, *coa*, *nuc* y 23S *rRNA* (Fotografías 1 a 4). La amplificación por PCR de estos marcadores ha sido utilizada por diversos autores para la identificación de aislados de *S. aureus* de diferentes procesos infecciosos (Nashev *et al.*, 2004; Hassan *et al.*, 2017; Hamdan *et al.*, 2015). La frecuencia de *S. aureus* encontrada en este trabajo coincide con la descrita por Koukos *et al.*, (2015), quienes

aislaron cepas *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) en un 18% de pacientes con enfermedad periodontal, sin embargo contrasta con el 36.6% encontrado en pacientes con periodontitis (Kim & Lee 2015).

8.3. Identificación de tipos de SCCmec en cepas de *S. aureus*.

La identificación de los tipos de SCCmec se realizó mediante PCR multiplex de acuerdo a lo descrito por Oliveira *et al*, (2002). Las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) presentan una proteína de unión a la penicilina (PBP 2a), codificada por el gen *mecA*, que se encuentra inserto en un elemento genético móvil llamado Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCCmec) (Liu *et al.*, 2016). Actualmente se han descrito 13 tipos de SCCmec (Saber *et al.*, 2017). En el presente estudio el gen *mecA* estuvo presente en el 100% de las cepas, dentro de los cuales el SCCmec tipo I fue detectado con mayor frecuencia en el 46% de las cepas analizadas, seguido por el SCCmec tipo II con él 6% y finalmente el SCCmec tipo V con el 4% (Figuras). Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Saber *et al.*, (2017), en donde el SCCmec tipo I fue detectado con mayor frecuencia en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes de países como Brasil, Finlandia, Nigeria y Estados Unidos. Así mismo Acuña (2008) reportó que SCCmec tipo I fue el más frecuente en el 66.6% de las cepas., mientras que Budimir *et al.*, (2006) describió que el 89% de las cepas presentó el SCCmec tipo I y el 11% el SCCmec III.

Los SCCmec tipo I y V identificados en las cepas de *S. aureus* codifican únicamente para resistencia a antibióticos β -lactámicos, mientras que las cepas portadoras del tipo II portan genes adicionales de resistencia a fármacos transferidos por plásmidos y transposones, por lo que las cepas de *S. aureus* presentan multirresistencia a kanamicina, tobramicina, bleomicina y tetraciclinas (Deurenberg *et al.*, 2007)

La frecuencia del SCCmec tipo V fue menos frecuente en las cepas de *S. aureus* (Tabla 4) debido probablemente a que este tipo posee el gen denominado *ccrC*, que se ha hallado con baja frecuencia en cepas de *S. aureus* en Australia (Ito *et al.*, 2004).

8.4. Detección de los genes que codifican resistencia a desinfectantes en cepas de *S. aureus*.

La detección de los genes que codifican resistencia a desinfectantes se realizó mediante PCR convencional. En el presente estudio 52% de las cepas de *S. aureus* presentó los genes *qacA* y *qacB* (Tabla 4), mientras que el gen *qacC* se identificó en el 68% de las cepas. Estos resultados son superiores a lo reportado por Zmantar *et al.*, (2011), quienes describieron que el gen *qacA* se encontró en el 24% de las cepas de *S. aureus*, *qacB* en el 15% y *qacC* en el 35% y también con lo descrito por Zhang *et al.*, (2011), quienes reportaron que los genes *qacA* y *qacB* se encontraron presentes en el 11.3% de las cepas de *S. aureus* aisladas de fosas nasales. La elevada presencia de los genes que codifican resistencia a desinfectantes en las cepas de *S. aureus* puede ser el resultado del uso excesivo de estos compuestos, a la transferencia horizontal y a la ubicación de este gen, *qacA* en el plásmido pSK1, *qacB* en el plásmido pSK23 y *qacC* en el plásmido pSK89 (Wassenaar *et al.*, 2015).

Este es el primer estudio realizado en México para determinar la presencia de cepas de *S. aureus* resistentes a la metilina (MRSA) en pacientes con enfermedad periodontal. La elevada frecuencia de las cepas de *S. aureus* portadoras del *SCCmec* tipo I, que codifica para resistencia a los antibióticos betalactámicos, refleja la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de las infecciones periodontales, sobre todo considerando que la mayoría también es portadora de los genes de resistencia a los desinfectantes.

9. Conclusiones.

1. En este estudio se demostró que *S. aureus* es un patógeno que se encuentra asociado a enfermedades periodontales.
2. Todas las cepas de *S. aureus* identificadas fueron portadoras del gen *mecA*.
3. El SCC*mec* tipo I que codifica para resistencia a betalactámicos fue el más frecuente entre las cepas MRSA.
4. La presencia de los genes que codifican resistencia a los desinfectantes fue ampliamente distribuida entre las cepas MRSA.
5. La asociación de los diferentes tipos de SCC*mec* con genes de resistencia a los desinfectantes representa un riesgo importante de salud que podría agudizar la periodontitis de los pacientes estudiados.

10. Bibliografía.

1. Amar S., Leeman S. 2013. Periodontal innate immune mechanisms relevant to obesity. *Mol Oral Microbiol.* 5;331-341
2. Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. 1999. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988–1994. *J Periodontol.* 70:13-29
3. Baig S., Johannesen T.B., Overballe P. S., Larsen J., Larsen AR., Stegger M. 2018. Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.*61:74-76
4. Brakstad O.G., Aasbakk K., Maeland J.A. 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the *nuc* Gene. *J Clin Microbiol.* 30:7;1654-1660.
5. Budimir A., Deurenberg R., Plecko V., Vink C., Kalenic S., Stobberingh E. 2006. Molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from Croatia. *J Antimicrob Chemother.* 57:2;331- 334
6. Cabrera C.E., Gomez F., Zuñiga A. 2007. La resistencia de las bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Med.* 38:2; 149-158.
7. Carvajal P. 2016. Enfermedades periodontales como un problema de salud pública: el desafío del nivel primario de atención en salud. *Rev Clín Periodon, implan y rehab oral.* 9:2;177-183.
8. Cash H. 2002. Bacterial resistance to antimicrobial antibiotics and quaternary ammonium biocides. *Microb Drug Resist.* 8:4
9. Castañón S.C. 2012. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Evd Med e Inves en Salud.* 5:3;79-84.
10. Cervantes G.E., García G.R., Salazar S.P. 2014. Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Rev Lat de Pat Clín Med Lab.* 61:1; 28-40.
10. Cho S.Y., Chung D.R. 2017. Infection Prevention Strategy in Hospitals in the Era of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Asia-Pacific Region: A Review. *Clin Infect Dis.*15:64;82-90.

11. Collery M.M., Smyth D.S., Twohig J.M., Shore A.C., Coleman D.C., Smyth C.J. 2008. Molecular typing of nasal carriage isolates of *Staphylococcus aureus* from an Irish university student population based on toxin gene PCR, Agr locus types and multiple locus, variable number tandem repeat analysis. *J of Clin Microbiol.* 57:3;348–58.
12. Deurenberg R. H., Vink C., Kalenic S., Friedrich A.W., Bruggeman C.A., Stobberingh E.E. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol & Infec.* 13: 222-235.
13. Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 13:1;16-34.
14. Frénay H.M., Bunschoten A.E., Schouls L.M., Van Leeuwen W.J., Vandenbroucke-Grauls C.M., Verhoef J., Mooi F.R. 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol & Infec Diseases.* 15:1;60-64.
15. Geha D.J., Uhl J.R., Gustafarro C.A., Persing D.H. 1994. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 32:27;1768-1772.
16. Götz F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol.* 43:6;1367-1378.
17. Hamdan P. A., Sainz E.T., Bustos M. J. 2010. Characterization and Persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior Nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. *J Clin Microbiol.* 48:5;1701–1705.
18. Hassan M., Mohammad R.A., Seyed F.M., Mohammad Y.A. 2017. Molecular analysis of the coagulase gene in clinical and nasal carrier isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by restriction fragment length polymorphism. *J global antimicrobial resistance.* 8:41-47.
19. Hookey V.J., Richards J.F., Cookson B.D. 1998. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of coagulase gene. *J Clin Microbiol.* 36:4;1083–1089
20. Ito T., Ma XX., Tekeuchi F., Okuna K., Yuzawa H., Hiramatsu K. 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *J Antimicrob Chemoter.* 48: 2637-2651.

21. Katayama Y., Takeuchi F., Ito T., Ma XX., Ui-Mizutani Y., Kobayashi I. 2003. Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 185:2711-22
22. Kaya H., Hasman H., Larsen J., Stegger M., Johannesen B.T., Allesøe R.L., Lemvig L.C., Aarestrup M.F., Lund O., Larsen R.A. 2018. SCCmecFinder, a Web-Based Tool for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in *Staphylococcus aureus* Using Whole-Genome Sequence Data. *American Society for Microbiology.* 3:1;1-9.
23. Kim G.Y., Lee C. H. 2015. Antimicrobial susceptibility and pathogenic genes of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity of patients with periodontitis. *J Periodontal Implant Sci.* 45:4;223-228.
24. Kolenbrander P.E. 2000. Oral Microbial Communities: Biofilms, Interactions, and Genetic Systems. *Microbiology.* 54:1;413–37.
25. Koukos G., Sakellari D., Arsenakis M., Tsalikis L., Slini T., Konstantinidis A. 2015. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the oral cavity. *Arch Oral Biol.* 60:9;1410-1415
26. Liu J., Chen D., Peters M.B., Li L., Li B., Xu Z., Shirliff E M. 2016. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog.* 101:28;56-67.
27. Lorencinia M., Silvaa J.A., Almeida C.A., Bruni C.A., Carvalhob H.F., Stach M.D. 2009. A new paradigm in the periodontal disease progression: Gingival connective tissue remodeling with simultaneous collagen degradation and fibers thickening. *Tissue Cell.* 41:1;43-50.
28. Milheiriço C., Oliveira D.C., Lencastre H. 2007. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemoter.* 51:9;3374-3377.
29. Minaya S.M., Medina C.E., Maupomé G., Vallejos S.A., Casanova R.J., Márquez C.M. 2007. Prevalence of, and risk indicators for chronic periodontitis in man of Campeche, Mexico, with periodontal readings ascertained with an electronic probe. *Rev Salud Pública.* 9:3;388-398.

30. Min J.H., Park S.N., Hwang H.K., Min J.B., Kim H.S., Kook J.K. 2007. Detection of methicillin or vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* from dental hospital. *J Korean Acad Conserv Dent.* 32:102-110.
31. Mobili R.D., Falcón D., Rodríguez M. 2017. *Staphylococcus* spp. En bolsas periodontales de un grupo de paciente del centro odontológico del Municipio San Diego, estado Carabobo. *Kasmera.* 45:1;16-23.
32. Monecke S., Coombs G.W., Pearson J., Hotzel H., Slickers P., Ehrichta R. 2015. A Clonal Complex 12 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain, West Australian MRSA-59, Harbors a Novel Pseudo-SCCmec Element. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:11;7142-7144.
33. Murray P.R., Kobayashi G.K., Pfaller M. 2003. Microbiología Médica. 4ª Edición, 173-212.
34. Nashev D., Toshkova K., Salasia S.I., Hassan A.A., Lämmler C., Zschöck M. 2004. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol Lett.* 233:1;45-52.
35. Oliveira D.C., Lencastre H. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:7;2155-2161.
36. Ooka T., Terajima J., Kusumoto M., Iguchi A., Kurokawa K., Ogura Y., Asadulghani M., Nakayama k., Murase k., Ohnishi M., Iyoda S., Watanabe H., Hayashi T. 2009. Development of a Multiplex PCR-Based Rapid Typing Method for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Strains. *J Clin Microbiol.* 47:9;2888–2894.
37. Paniagua C.G., Monroy P.E., Gutiérrez L.R., Sainz E.T., Bustos M.J., Vaca S. 2014. Genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and catheter of ambulatory hemodialysis patients in Mexico. *Folia Microbiol* 59:4;295–302
38. Ray S.M. 2017. Preventing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Disease in Urban US Hospitals-Now for the Hard Part: More Evidence Pointing to the Community as the Source of MRSA Acquisition. *J Infect Dis.* 11:215;1631-1363

39. Saïd-Salim B., Mathema B., Braughton K., Davis S., Sinsimer D., Eisner W., Likhoshvay Y., DeLeo F.R., Kreiswirth B.N. 2005. Differential distribution and expression of Panton-Valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* 43:7;3373-3379.
40. Sekiguchi J., Hama T., Fujino T., Araake M., Irie A., Saruta K. 2004. Detection of the antiseptic and disinfectant-resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in a Tokyo hospital. *Jpn J Infect Dis.* 57:6;228-291.
41. Saber H., Jasni A.S., Jamaluddin T., Ibrahim R. 2017. A Review of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Types in Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) Species. *M J Medical Sciences.* 24:5;7-18.
42. Sánchez SL, Saenz AE. 2005. Antisépticos y desinfectantes. *Dermatología Peruana*, 15:2;82-103.
43. Straub J.A., Hertel C., Hammes W.P. 1999. A 23S rRNA targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *Journal of Food Protection* 62:10;1150-1156.
44. Tay Z.J. 2012. *Microbiología y parasitología médicas*. Cuarta edición. Méndez editores.
45. Zhang K., McClure J., Elsayed S., Conly J. 2008. Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type, Tentatively Designated Type VIII, Harboring Class A *mec* Type 4 *ccr* Gene Complexes in a Canadian Epidemic Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:2;531-540.
46. Zhang M, O'Donoghue M.M., Hiramatsu K., Boost M.V. 2011. Prevalence of antiseptic-resistance genes in staphylococcus and coagulase-negative staphylococci colonising nurses and the general population in Hong Kong. *J Hosp Infect.* 78:2;113-117.
47. Zmantar T., Kouidhi B., Miladi H., Bakhrouf A. 2011. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Research Notes.* 4:453;1-9

48. Zong Z., Peng C., Lü X. 2011. Diversity of *SCCmec* Elements in Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. *PLoS ONE*. 6:5;1-6.
49. Wassenaar T.M., Ussery D., Nielsen L.N., Ingmer H. 2015. Review and phylogenetic analysis of *qac* genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species. *Eur J Microbiol Immunol*. 5:1;44-61.