



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada


"Estudio Molecular de la Resistencia contra Vancomicina de Cepas de *Staphylococcus epidermidis* aisladas de Ojo Humano"

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustenta la Pasante

C. Gonzalo Arteaga Hernández

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo., 14 de Abril del 2009
"Amor, Orden y Progreso"

PRESIDENTE	M. EN N.H. AMANDA PEÑA IRECTA
SECRETARIO	QFB. ZURISSADAI BETANZOS PALMEROS
PRIMER VOCAL	DR. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES
SEGUNDO VOCAL	DR. JUAN VICENTE GÓMEZ GÓMEZ
TERCER VOCAL	DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
PRIMER SUPLENTE	M. EN N.H. ZULI CALDERÓN RAMOS
SEGUNDO SUPLENTE	DR. JAVIER VILLANUEVA SÁNCHEZ



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Nutrición Molecular del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Gabriel Betanzos Cabrera. y como codirector el Dr. Juan Carlos Cancino Díaz del Departamento de Microbiología de la ENCB del IPN. Proyecto Parcialmente Financiado por el CONACYT (46537), PAI 2006 Y AMMFEN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

Estudio Molecular de la Resistencia contra Vancomicina de Cepas
de *Staphylococcus epidermidis* Aisladas de Ojo Humano

T E S I S

Que para obtener el título de
Licenciado en Nutrición

P R E S E N T A

Gonzalo Arteaga Hernández.

Bajo la Dirección de:

Dr. Gabriel Betanzos Cabrera

Codirector

Dr. Juan Carlos Cancino Díaz

Pachuca, Hgo., Mayo de 2009.



Agradecimientos

Agradezco infinitamente a Dios por iluminar mi camino, darme vida y la oportunidad de concluir mi educación superior.

A mis padres Gonzalo y Flor, por su apoyo, su cariño y su amor que me han brindado en el transcurso de mi vida, por toda la ayuda recibida ya que han hecho más ligero mi camino, por las palabras de aliento en los momentos difíciles, por la vida misma, infinitamente..... Gracias.

A mis hermanos Otilio, Erika y Crucita, por ser un ejemplo para mí, por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de la vida, por las palabras de aliento y motivación que me ayudaron a salir adelante, por su ayuda y confianza.

En especial al Dr. Gabriel Betanzos Cabrera. Por ser un gran amigo, por la confianza depositada en mí, su amabilidad, su asesoramiento, sus consejos científicos y su ayuda incondicional.

A mis revisores la Mtra. Amanda Peña, QFB, Jurissadai Betanzos, Dr. Marco Antonio Becerril, Dr. Juan Vicente Gómez, Mtra. Zuli Calderón, Dr. Javier Villanueva.

A mis compañeros de laboratorio, por los momentos agradables compartidos y a todas las personas que me brindaron su apoyo, amistad y confianza incondicional y que contribuyeron de una u otra manera para la realización de este proyecto.

Gracias a todos.

Gonzalo

	Página
INDICE	I
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	III
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1 MARCO TEORICO	1
1.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
1.2 Infecciones Intrahospitalarias (IIH)	2
1.2.2 Agentes etiológicos de las IIH	4
1.2.3 Factores principales que influyen en la presencia de IIH	4
1.2.4 Tratamiento y resistencia de agentes causales de IIH	5
1.2.5 Selección adecuada del antibiótico para el tratamiento de las IIH	5
1.3 Vancomicina	7
1.3.1 Estructura de la vancomicina	8
1.3.2 Farmacocinética de la vancomicina	8
1.3.3 Farmacodinamia de la vancomicina	10
1.4 Mecanismos de resistencia a la vancomicina	11
1.4.1 Gen <i>Van</i>	11
1.4.2 Bombas de flujo de antibióticos	12
1.4.3 Plásmidos	13
1.4.4 Biopelícula	13
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	17
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	19
5. HIPÓTESIS	19

6. METODOLOGÍA	20
6.1 Material biológico	21
6.2 Propagación y conservación de cepas de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	21
6.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para vancomicina	21
6.3.1 Determinación de la CMI en placa	22
6.3.2 Determinación de la CMI en tubo	22
6.4 Extracción de ADN genómico de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	22
6.5 Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>Van</i>	23
6.6 Determinación de biopelícula	24
6.6.1 Método de microplaca	24
6.6.2 Método de rojo congo en caja de Petri	25
7. RESULTADOS	26
7.1 Determinación de la CMI de vancomicina en cepas de <i>S. epidermidis</i>	26
7.2 Amplificación por PCR múltiple de un fragmento del gen <i>Van</i>	27
7.3 Determinación de la formación de biopelícula por el método de microplaca y método de rojo congo	28
7.3.1 Método de microplaca	28
7.3.2 Método de rojo congo	29
8. DISCUSIÓN	31
9. RECOMENDACIONES	34
10. CONCLUSIONES	35
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

	Página
Figura 1 Incidencia de infecciones	4
Figura 2 Estructura de la vancomicina	8
Figura 3 Inhibición de la síntesis de la pared en bacterias sensibles a la vancomicina	10
Figura 4 Formación de la biopelícula	14
Figura 5 Diseño experimental del trabajo realizado	20
Figura 6 CMI's de vancomicina de las 60 cepas obtenidas de infecciones oculares	26
Figura 7 Amplificación de ADN por PCR múltiple	27
Figura 8 Formación de biopelícula en microplaca	29
Figura 9 Formación de biopelícula por el método de rojo congo	30

TABLAS

Tabla 1 Características de farmacocinéticas de la vancomicina	9
Tabla 2 Oligonucleótidos iniciadores empleados en el trabajo	23
Tabla 3 Formación de biopelícula de cepas de <i>S. epidermidis</i> inducidas con 8% de NaCl	29

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusión Cerebro y Corazón, del inglés Brain Heart Infusion
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DO	Densidad Óptica
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-cetico
FDA	Administración de Drogas y Alimentos , del inglés Food and Drug Administration
IIH	Infecciones Intra Hospitalarias
INNSZ	Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán
mL	Mililitros
NaCl	Cloruro de Sodio
NCCLS	Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico de Estados Unidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	Pares de bases
PBS	Regulador Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIA	Adhesina Intercelular Polisacarida

Rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulasa Negativa
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
TBE	Tris Borato-EDTA
TSA	Agar Soya Trypticaseína

RESUMEN

El tratamiento de las infecciones microbianas tiene gran interés mundial, especialmente por el incremento de la resistencia a antibióticos. Una razón de esta resistencia, es el mal uso de los antibióticos en el tratamiento. La vancomicina, es un antibiótico empleado para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus* spp, como la neumonía. Reportes muestran la aparición de cepas resistentes de *Staphylococcus epidermidis* a meticilina y vancomicina especialmente en infecciones intrahospitalarias. Por tal motivo, el presente trabajo se enfocó a encontrar cepas resistentes a vancomicina y establecer la existencia de mecanismos de resistencia, en una colección de cepas de *S. epidermidis* obtenidas del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”, las cuales fueron aisladas a partir de tres infecciones oculares: conjuntivitis, úlcera corneal y endoftalmitis. Primeramente se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de vancomicina para cada cepa tanto en placa como en tubo de acuerdo con las especificaciones establecidas por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico. Se encontraron que 4 de las 60 cepas tuvieron resistencia intermedia (una CMI de 16µg/mL de vancomicina). Por otra parte, no se detectó por PCR múltiple la presencia de algún gen *Van* que confiere resistencia. Finalmente se determinó la formación de biopelícula. Los resultados indican que 3 cepas con resistencia intermedia fueron formadoras de biopelícula. Adicionalmente se logró incrementar la CMI en 2 de estas cepas a 32 µg/mL (altamente resistentes) al cultivarlas en 8% de NaCl el cual es inductor de biopelícula. No obstante, cepas clasificadas como sensibles dieron positivo a la biopelícula, lo que sugiere que la biopelícula es un mecanismo inespecífico de resistencia al menos en las cepas de estudio. En resumen, se encontraron tres cepas resistentes a vancomicina, en dos se encontró asociación con la formación de biopelícula, por lo que no descarta la presencia de otros mecanismos de resistencia.

Palabras clave: *S.epidermidis*, vancomicina, resistencia, CMI, gen *Van*, biopelícula.

ABSTRACT

The treatment of microbial infections is a topic of great worldwide interest, especially for increasing of resistance to antibiotics. One of the reasons of this resistance is by the inappropriate use of antibiotics in the treatment. The vancomycin is an antibiotic used for the treatment of infections caused by *Staphylococcus* spp, such as pneumonia. Reports show appearance of resistant *Staphylococcus epidermidis* strains to methicilin and vancomycin especially in nosocomial infections. For that reason, the present work was focused to find resistant strains to vancomycin and to establish the existence of resistance mechanisms in a strains collection of *S. epidermidis* obtained from Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”, which were isolated from three ocular infections: conjunctivitis, corneal ulcers and endophthalmitis. Firstly, Minimum inhibitory concentration (MIC) of vancomycin was determinate for each strain by plaque and tube according to specifications established by the Clinical and Laboratory Standars Institute. We found that 4 of 60 strains had intermediate resistance (MIC of 16µg/mL of vancomycin). On the other hand, none *gene Van* was detected by multiple PCR. Finally, the capacity of biofilm forming was determinate. The results indicate that 3 strains with intermediate resistance were biofilm forming. Additionally, in two of these strains the MIC was increased to 32 µg/mL (becoming resistant), when they were grew at NaCl 8% (inductor of biofilm). Nerveless, strains classified as sensitive gave positive to biofilm forming; this suggests that biofilm is a unspecific resistance mechanism at least on the strains of study. In conclusion, 3 resistant strains to vancomycin were found, and association in 2 strains with biofilm forming was found, so it is not discarded the existence of other resistance mechanisms.

Keywords: *S. epidermidis*, vancomycin, resistance, CMIs, *gene Van*, biofilm.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis es una bacteria Gram (+), coagulasa negativa (a diferencia de *Staphylococcus aureus*) [O'gara y Humphreys, 2001; Srinivasan, *et al.*, 1997]; aunque normalmente es parte de la flora normal de la piel y otras mucosas, suele causar infecciones en pacientes inmunocomprometidos o pacientes cateterizados en hospitales, siendo entonces una bacteria oportunista y uno de los principales agentes etiológicos de IIH [Hernández, *et al.*, 2005; Moreno y Ruiz, 2007].

Pertenece al phylum: *firmicutes*, clase: *Basilli*, orden: Bacillales, Familia: Staphylococcaceae, del género: *Staphylococcus* y a la especie: *epidermidis*. El *S. epidermidis* es responsable del 70 al 80 % de las infecciones por SCN. *S. epidermidis* es la causa más frecuente de infecciones en cuerpos extraños implantados (catéteres intravasculares, catéteres de nutrición parenteral total y periférica, catéter de la diálisis peritoneal ambulatoria continuada, derivaciones ventrículo-peritoneales, endoprótesis, prótesis valvulares cardiacas y prótesis articulares, marcapasos, etc.) [Okajima, *et al.*, 2006; Palavecino, 2002]. Las cepas que provocan infecciones asociadas a cuerpos extraños, suelen proceder de la flora endógena del paciente. Sin embargo, también se producen infecciones nosocomiales exógenas [Schneider y Zeitz, 2004]. En cuanto a la patogenicidad, se sabe que las cepas de *S. epidermidis* poseen la capacidad de adherirse a polímeros y de generar biopelículas que surgen de la multiplicación y formación de una capa mucosa (glucocálix) del patógeno. Este proceso se ve reforzado en presencia de proteínas como fibrinógeno. Las biopelículas son focos infecciosos a partir de los cuales las bacterias entran en el torrente circulatorio y pueden causar sepsis [Juárez, *et al.*, 2006]. Esta característica llega a ser importante en pacientes inmunocomprometidos, porque *S. epidermidis* es hasta el momento el causal de infecciones y el productor más conocido de la formación de biopelícula [Gaudioso, *et al.*, 2006].

1.2. INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS

Las infecciones intrahospitalarias (IIH) o nosocomiales (del griego: *Nosos*: Enfermedad y *Komeion*: Tener cuidado) se pueden definir como una condición localizada o generalizada resultante de la reacción adversa a la presencia de un agente infeccioso o su toxina que no estaba presente o en un período de incubación en el momento del ingreso del paciente al hospital. Las IIH tienen repercusión a nivel social y económico por los altos costos que representa su tratamiento, las cuales han existido desde la aparición de los hospitales hasta la fecha y cobran atención desde la segunda mitad del siglo XIX [Banerjee. *et al.*, 1980; Ponce. *et al.*, 1999].

En Estados Unidos de Norteamérica, los estudios de investigación epidemiológica realizados en 1999 arrojaron una incidencia de IIH del 18%, y recientemente se habla de 5-7%. En México para el 2001 la incidencia oscilaba entre 3.8 y 26.1 casos por cada 100 egresos, lo cual significa que es 1 a 7 veces mayor a la registrada en otros países [Díaz. *et al.*, 1999; Rodríguez. *et al.*, 2003].

Bajo la denominación de las IIH se agrupa un denominador común, el cual es haber sido adquiridas en un hospital o en una institución de salud. No se deben contabilizar como IIH aquellas infecciones que se estaban incubando en el momento del ingreso y sí, en cambio, las que se manifiestan al alta del paciente en un periodo de 24 a 72 h o si el contagio se produjo durante el período de hospitalización [Surveill, 1984].

La importancia de las IIH es vislumbrado por médicos y cirujanos incluso antes que se lograra aislar la primera bacteria [Wenzel, 1989] a principios del siglo XX, se llegó a pensar que podrían ser totalmente erradicadas. Sin embargo, esto no fue así, cuantitativamente las IIH fueron en aumento y experimentaron cambios etiológicos sustanciales, de forma gradual pero ininterrumpida hasta la actualidad [Haley, *et al.*, 1980; NCCLS, 1998].

Aunque desde hace siglos ha existido un gran interés por el tema de las IIH no ha sido sino hasta hace pocas décadas que el campo de las IIH ha obtenido aceptación

general. La prevención y control de las IIH se basa en estrategias ligadas principalmente a las buenas prácticas de atención. Sin embargo, diversas características de la prestación de atención de salud, entre las que destacan los métodos invasivos de exploración, los procedimientos quirúrgicos, la cirugía en personas mayores, o el manejo de niños prematuros plantean hoy en día nuevos retos, uno de los cuales es disminuir la incidencia de IIH [Garner, *et al.*, 1988; NCCLS, 1998].

Los estudios han señalado las conductas observadas por el personal para la realización de los procedimientos diagnósticos y terapéuticos como un elemento central para la solución del problema. En la medicina moderna, el descubrimiento y la utilización amplia de antibióticos han traído como consecuencia un relajamiento en el cumplimiento de las medidas asépticas, por la errónea sensación de seguridad que proviene de contar con dichos elementos para el tratamiento [Martínez, *et al.*, 2001]. La prevención y el control de las infecciones representan en la práctica clínica una tarea amplia y compleja la cual resulta indispensable contar con la información epidemiológica y microbiológica, la existencia de una eficiente administración hospitalaria y el involucramiento del personal de salud en las acciones de prevención y control [NCCLS, 1998].

Diversos estudios han mostrado que establecer sistemas de control de infecciones basados en evidencias científicas ha resultado en un considerable ahorro de recursos para los servicios de salud y para sus pacientes y en la reducción de la morbilidad y de la mortalidad por estas infecciones, particularmente en áreas de alto riesgo como: las unidades quirúrgicas y las unidades de cuidados intensivos, donde los pacientes que generalmente están severamente comprometidos, son sometidos a intervenciones muy agresivas haciéndolas susceptibles al riesgo de adquirir infecciones [Miller, *et al.*, 2005; NCCLS, 1998].

1.2.2 AGENTES ETIOLÓGICOS DE LAS INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS

Algunos de los agentes etiológicos más frecuentes de IIH son: la *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida spp*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* estafilococos coagulasa negativos (SCN) como es el caso de *S. epidermidis* [Martineau, et al., 1996]. Todos ellos pueden provocar diferentes cuadros como: infecciones urinarias, neumonía nosocomial, sepsis, infecciones de heridas quirúrgicas profundas y otros diversos padecimientos intrahospitalarios [Díaz, et al., 1999; Rodríguez, et al., 2003].

1.2.3 FACTORES PRINCIPALES QUE INFLUYEN EN LA PRESENCIA DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS

Dentro de los factores principales asociados a IIH según el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (**Figura. 1**) destaca, en primer lugar la inmunosupresión, puesto que el paciente con algún tipo de supresión inmunológica tienen mayor riesgo de enfermarse. La relación temporal entre nutrición e infección se conoce desde hace mucho tiempo y se cuenta con muchas referencias históricas por ejemplo a cerca de la coincidencia de la peste y la hambruna. Dentro de las vías que provocan IIH están: la ventilación mecánica asistida, tratamiento de inmunosupresión, patologías crónicas, sondas urinarias permanentes, implantes como: válvulas cardiacas, catéter intravascular, el área de estancia del paciente siendo la unidad de terapia intensiva una de las más frecuentes, falta de cuidado de higiene del personal médico y de atención al paciente [Ponce, et al., 1999]

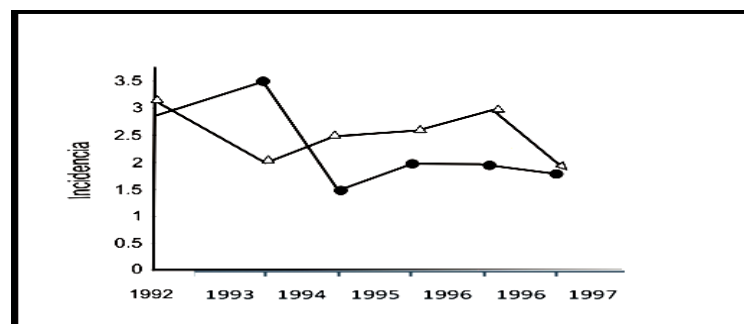


Figura 1.- Incidencia de infecciones. En pacientes inmunocomprometidos
 —△— Inmunocompetente —●— Inmunocomprometido

1.2.4 TRATAMIENTO Y RESISTENCIA DE AGENTES CAUSALES DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS

Desde hace sesenta años aproximadamente se inicio la introducción de antibióticos en la práctica clínica, han jugado un papel esencial en la disminución de la morbilidad y la mortalidad causada por las IIH como la tuberculosis, la lepra, la sífilis y numerosas infecciones diarreicas. Paradójicamente, en este mismo período las infecciones causadas por microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos se han incrementado gradualmente en todo el mundo [Rodríguez, et al., 2003]. Hoy en día son frecuentes las infecciones por microorganismos resistentes a diversos antibióticos y este fenómeno se observa no solamente en bacterias, sino también en otros grupos de microorganismos (hongos, virus y parásitos). Algunos ejemplos son el *Streptococcus pneumoniae* resistente a los β -lactámicos [Juarez, et al., 2006]., *S. epidermidis* y *Enterococcus* resistente a meticilina y recientemente a la vancomicina [Calderón, et al., 2002; Dourado, et al., 2007; Juárez, et al., 2006; Larson, et al., 1991].

1.2.5 SELECCIÓN ADECUADA DEL ANTIBIÓTICO PARA EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS

La selección del antibiótico correcto exige conocer la bacteria responsable de la enfermedad del paciente; para lo cual el diagnóstico bacteriológico requiere del aislamiento de la bacteria y el estudio de su sensibilidad o resistencia frente a los antibióticos [Jacoby y Archer, 1991]. La resistencia bacteriana a antibióticos puede obviarse cuando exista evidencia de que la infección es causada de un microorganismo específico y que la experiencia indique que es susceptible a un determinado antibiótico [Levine, 1988].

El aumento del uso de antibióticos desde la década de 1940 se ha acompañado del alza creciente en la resistencia, cuya principal causa es la destrucción o expulsión del antibiótico por la bacteria responsable de la infección. La terapia con antibióticos está destinada al tratamiento de pacientes con los síntomas y signos clínicos de

infección [Jacoby y Archer, 1991]. Su uso adecuado requiere de la recolección de información sobre el paciente y su contexto tal como edad, sexo, antecedentes de hipersensibilidad a los antibióticos, estado inmunológico, alergias entre otras.

No todas las infecciones justifican el tratamiento antibiótico, ejemplos de ellas son la bacteriuria asintomática (excepto en embarazadas o en pacientes inmunocomprometidos), abscesos superficiales que pueden ser drenados, diarrea sin sangre y fiebre secundaria a la introducción por tiempo breve de un catéter venoso profundo. El uso del antibiótico debe seleccionarse de manera eficaz y segura cuando el agente etiológico ya ha sido identificado, debido a que el aislamiento resulta benéfico, pues facilita la elección del tratamiento más adecuado y evita la resistencia [Mathur, *et al.*, 2005].

Este procedimiento debe realizarse mediante diversas consideraciones por ejemplo, el diagnóstico de una infección basado en datos clínicos y epidemiológicos. Si ambos justifican el tratamiento antibiótico, la selección del antimicrobiano para el tratamiento dependerá tanto de la información que posea, el estado general del huésped, el sitio de la infección y los datos epidemiológicos, las características del antimicrobiano que se use y del agente causal [Evans y Holmes, 1987].

Se debe considerar los antibióticos con mejor perfil de actividad, una mejor farmacocinética, una farmacodinamia constante, eficaz y segura, sus características como son: absorción, distribución en tejidos, cavidades y líquidos orgánicos; metabolismo, excreción, espectro de acción, dosis y forma de administración, vía y período de administración, interacción con otros antibióticos (antagonismo, sinergia) efectos adversos y contraindicaciones, potencial de inducción de resistencia, perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos, epidemiología de infecciones prevalentes en el hospital, disponibilidad, costo [Haley, *et al.*, 1980].

1.3 VANCOMICINA

El grupo de antibióticos de naturaleza polipeptídica (glucopéptidos) está representado en la terapéutica exclusivamente por dos compuestos: la teicoplanina y la vancomicina [Linden., 2008].

En 1955 científicos de la compañía Ely Lilly descubrieron que el actinomiceto *Amycolatopsis orientalis*, es capaz de producir una sustancia antimicrobiana denominada vancomicina, derivado de la palabra “vaquish” (vencedor). La aprobación para su uso terapéutico por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) se obtuvo en 1958 [Larson, *et al.*, 1991; Nayak, *et al.*, 2007].

La vancomicina está indicada para el tratamiento de las infecciones graves causadas por bacterias Gram positivas y negativas agentes etiológicos de diversas enfermedades como: endocarditis, septicemias, infecciones óseas y de articulaciones, infecciones de vías respiratorias bajas, infecciones de piel, tejidos blandos y en pacientes alérgicos a penicilinas [William y Petri, 2002]. Es particularmente útil en las causadas por estafilococos resistentes a meticilinas y en sujetos alérgicos a penicilinas y cefalosporinas [Juarez, *et al.*, 2006; Geraci, *et al.*, 1956].

1.3.1 ESTRUCTURA DE LA VANCOMICINA

La vancomicina es un glucopéptido tricíclico complejo, con una masa molecular de 1500 Daltones. **(Figura. 2)**, su fórmula semidesarrollada es $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$, su estado de agregación es líquido e incoloro, o en forma de cristales [William y Petri, 2002].

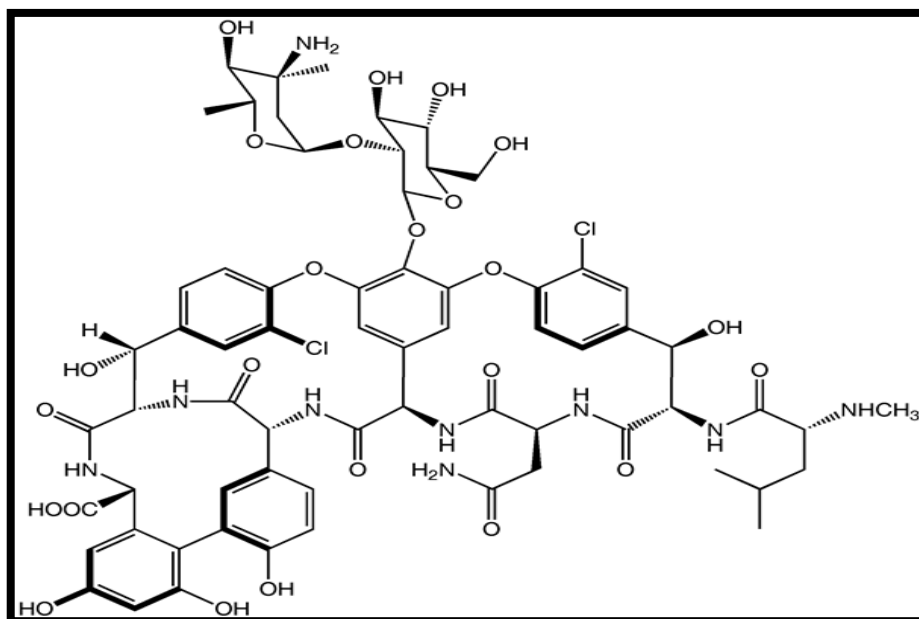


Figura 2. Estructura de la vancomicina. Inhibe la síntesis de peptidoglucano, siendo de gran importancia en el tratamiento de IHH, debidas a bacterias Gram positivas resistentes

1.3.2 FARMACOCINÉTICA DE LA VANCOMICINA

La vancomicina se administra por vía intravenosa para el tratamiento de infecciones sistémicas ya que administrada por vía intramuscular induce necrosis tisulares **(Tabla 1)** [Beltran; 2004]. La dosis deseada de vancomicina se debe administrar por vía intravenosa en un lapso no menor a 60 minutos para evitar lesiones adversas por la venoclisis. Su farmacocinética se ajusta a un modelo de fases, con una fase de distribución de 8 minutos, una fase intermedia de 30 a 90 min y una fase de eliminación de 5 a 11 h en adultos con función renal normal, ya que la eliminación se efectúa fundamentalmente por filtración glomerular [Levine; 1988]. Este fármaco en la terapéutica parenteral debe administrarse por vía intravenosa y

nunca por vía intramuscular, el fármaco tiene una vida media de casi 6 horas y tiene una biodisponibilidad es del 90%, si disminuye la función renal del paciente pueden acumularse cifras tóxicas capaces de causar ototoxicidad, también la disminución de la función hepática disminuye la velocidad de eliminación de excreción [Lodwin, *et al.*, 1998]. La dosis empírica de vancomicina en adultos es de 30/mg/Kg/día en fracciones que se aplican cada 6 a 12 h el margen terapéutico de la vancomicina es controversial pero recomendado en una concentración de 5 a 15 µg/mL, para evitar ototoxicidad conviene que la concentración máxima sea menor de 60 µg/mL [Rodríguez-Martínez, *et al.*, 2007]. La vancomicina puede administrarse vía oral a personas con colitis pseudomembranosa. La solución oral es clorhidrato de vancomicina en forma de cápsulas. Algunas de las reacciones adversas por el consumo de esta solución está la hipersensibilidad, máculas cutáneas, anafilaxia, la flebitis, pudiéndose observar en ocasiones escalofríos erupciones y fiebre. El suministro intravenoso de la vancomicina mediante el goteo rápido, puede ocasionar diversas reacciones eritematosas o urticarianas, hiperemia facial, taquicardia e hipotensión [Sande y Mandell, 1982]. Aunque las reacciones adversas más notables son la ototoxicidad y nefrotoxicidad, aunque la dosis depende de cifras excesivas del fármaco en plasma de 60 a 100 µg/mL. Volviéndose rara la nefrotoxicidad por la medición de la función renal y de los niveles plasmáticos [William y Petri; 2002].

Tabla 1. Características farmacocinéticas de la vancomicina.

Dosis IV (mg/Kg)	C_{máx} (µg/mL)	VD (l/Kg)	FP (%)
7.5 (x4)	25	0.5 - 1.25	50
Excreción (% NM)	Depuración (mL/min)	t_{1/2} (h)	t_{1/2} IR (h)
Renal	80	6-8	44 – 400

Fuente: Velasco, 2003.

1.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA VANCOMICINA

La resistencia de bacterias Gram positivas patógenas a la vancomicina fue documentada en 1986 en Europa y en 1988 en Estados Unidos, treinta años después de su introducción terapéutica [Uttley. *et al.*, 1988].

Para mantener la especie, los microorganismos han desarrollado capacidad de sobrevivir a la acción de diversos antibióticos como las cefalosporinas, penicilinas y a los glucopeptidos como la meticilina y actualmente la vancomicina [Normark. y Normark. 2002]. El antibiótico puede crear cepas resistentes originadas por mutación genética espontánea o por plásmidos, los mecanismos de la resistencia varían de acuerdo al antibiótico de que se trate, desde inhibición enzimática, bloqueo del lugar donde actúa o de la enzima blanco, alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, hasta la eliminación de etapas en la producción de componentes bacterianos, o bien la formación de biopelículas, además de mecanismos de flujo y la presencia de genes. [Appleton, A. 2001; Van, *et al.*, 2000].

1.4.1 GEN *Van*

El gen *Van* es un complejo que involucra por lo menos cinco genes, el producto final, es la síntesis de una peptidoglicana que contiene un pentapéptido con en D ala-Dlactato (Dlac) o ala-Dserina (Dser). Esto hace que la vancomicina no se una a su sitio blanco por lo que la célula bacteriana se protege de la acción del antibiótico [Courvalin, *et al.*, 2006]. El tipo de resistencia de la vancomicina se asocia a tres fenotipos bien definidos: *VanA*, *VanB* y *VanC*. El fenotipo *VanA* confiere alta resistencia a vancomicina y teicoplanina. La resistencia es inducible y puede localizarse en plásmidos y ser transferible a otros Gram positivos como estreptococos del grupo viridans y *S. aureus*, implicando ello un riesgo de diseminación de este tipo de resistencia. El fenotipo *VanB* afecta únicamente la actividad antibacteriana de vancomicina y respeta la de teicoplanina. Su resistencia es mediada por cromosomas y en algunas cepas puede ser transmitida por conjugación. El fenotipo *VanC*, descrito fundamentalmente en *Enterococcus*

gallinarum y en otras especies, presenta unos niveles bajos de resistencia a vancomicina pero mantiene la sensibilidad a teicoplanina. El gen *VanC* es cromosómico, constitutivo y no transmisible, tiene baja importancia clínica, Se han descrito otros fenotipos de resistencia (*VanD*, *VanE*, *VanG*) caracterizados por conferir bajos niveles de resistencia a vancomicina y sensibilidad a la teicoplanina [Depardieu, *et al.*, 2004].

1.4.2 BOMBAS DE FLUJO DE ANTIBIÓTICOS

La resistencia a antibióticos se consideraba exclusivamente a la combinación de varios genes de resistencia, cada uno codificando para la resistencia a un único antibiótico en específico [Levy, 1992]. Recientemente se demostró que estos fenotipos se presentan también por la actividad de bombas de flujo de antibióticos. Algunas de estas bombas, demuestran una amplia especificidad y cubren prácticamente todos los antibióticos, agentes quimioterapéuticos, detergentes, colorantes y otros inhibidores [Van. *et al.*, 2000]. Estas bombas de flujo trabajan con excepcional eficacia en bacterias Gram negativas por su acción sinérgica con la barrera de la membrana externa [Calderón, *et al.*, 2002; Mahamoud. *et al.*, 2007].

Las bombas de flujo en Gram negativas y en Gram positivas excretan el antibiótico a través de la membrana citoplasmática y están compuestas por proteínas transportadoras localizadas en la membrana citoplasmática. Estas bombas son bastante poco eficientes ya que tienen que competir con la entrada rápida y espontánea de inhibidores al citoplasma, por lo que se necesita una velocidad de recambio alta para producir niveles significativos de resistencia [Kaatz, 2002; Levy, 1992].

1.4.3 PLÁSMIDOS

Los plásmidos son material genético generalmente circular extracromosomal de ADN que aparecen en el citoplasma de algunos organismos procarióticos y en organismos eucarióticos como las levaduras, son de diversos tamaños aunque menor en el cromosoma principal. Estos tienen una conformación variable que puede ser lineal, circular o con estructura enrollada, cada bacteria puede tener uno o varias copias. Los plásmidos son autónomos, es decir que tienen capacidad de autorreplicarse, mejorando los rasgos de supervivencia de las bacterias, sin ser imprescindibles para la misma. Pueden ser transferidos entre bacterias del mismo, o diferentes géneros. Los plásmidos se clasifican siguiendo distintos criterios. Uno de estos criterios es el tipo de genes que portan. Así se define el grupo de plásmidos con genes de degradación de sustancias, el grupo de plásmidos con genes de fertilidad, el que porta genes de virulencia o el grupo que porta genes de resistencia. Un plásmido también puede ser incorporado por un virus y transferido a otra bacteria [Zhang. *et al.*, 2006].

1.4.4 BIOPELÍCULA

La biopelícula es denominada una población bacteriana promovida por un polisacárido extracelular que genera la adhesión célula-célula y es un factor de virulencia de *S. epidermidis* [Moreno y Ruíz, 2007; Oin, *et al.*, 2007]. La formación de la biopelícula se realiza en dos fases (**Figura 4**): primero, la bacteria se adhiere a la superficie de un implante y en un segundo paso a la unión célula-célula; y su acumulación en multicapas depende de la habilidad de las células para formar la adhesina polisacarida intracelular (PIA) N-acetil-glucosamina, codificada por el operón *ica*, el cual desempeña un papel fundamental en la capacidad de adhesión de *S. epidermidis* [Arciola, *et al.*, 2001; Corsterton, *et al.*, 1995; Moreno y Ruiz, 2007]. Se puede observar que en la biopelícula hay microcolonias rodeadas de canales llenos de agua, y su función es semejante a la de un sistema circulatorio primitivo, permitiendo el acceso de nutrientes, la eliminación de desechos y la comunicación

con otras microcolonias [Christensen, *et al.*, 1985; Jacoby y Archer, 1980; Spengler y Greenough, 1978; Stickler, 1999].

La adherencia del *S. epidermidis* al biomaterial se asume ser un paso crucial en el desarrollo de las infecciones del cuerpo cuando se es tratado con diversos materiales [Polonio, *et al.*, 2001], siendo hasta el momento el microorganismo más conocido como formador de biopelícula [Gaudioso, *et al.*, 2006; Gander, *et al.*, 2005]. La producción de biopelícula tiene implicaciones importantes para el desarrollo y la puesta en práctica de estrategias terapéuticas, algunos reportes mencionan interferencia entre la bacteria y el antimicrobiano, y la respuesta inmunitaria del paciente [Costerton, *et al.*, 1995; Mathur, *et al.*, 2005].

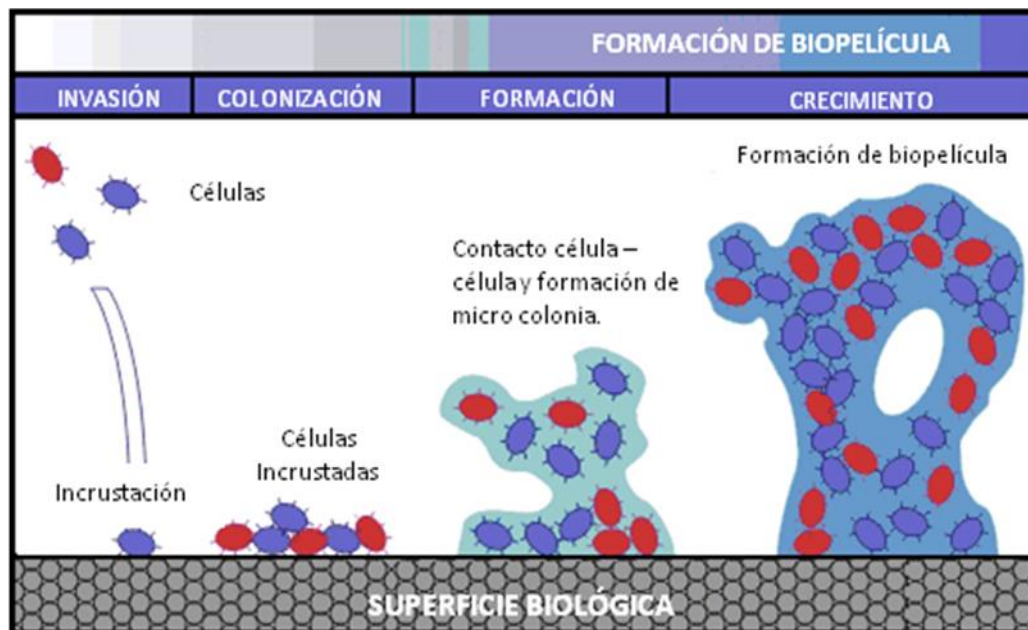


Figura 4. Formación de la biopelícula. La bacteria se va agrupando hasta formar biopelícula este mecanismo se realiza en dos fases. La adhesión a la superficie y la formación de multicapas.

Durante su evolución, las bacterias han modificado constantemente su metabolismo y características físicas, adaptándose prácticamente a todos los ambientes del planeta [Haley, *et al.*, 1980; Surveill, *et al.*, 1984].

La biopelícula representa sociedades microbianas con sus propias defensas y sistemas de comunicación [Crede, *et al.*, 1988; Von, *et al.*, 2002].

Por ejemplo, las bacterias son capaces de sobrevivir en candentes géiseres de origen volcánico o en suspensiones hiperosmolares extremas de algunos lagos, o a grandes profundidades marinas, donde se adaptan perfectamente. Además, se encuentran prácticamente en cualquier parte: en suelos, agua, y en los seres vivos, en simbiosis permanente [Haley, *et al.*, 1980; Spengler y Greenough, 1978; Zhiquiang, *et al.*, 2007].

Existen varios factores involucrados en esta adherencia inicial, como la hidrofobicidad de la superficie, proteínas de adhesión y polisacáridos capsulares; la segunda, de multiplicación celular y producción del polisacárido de adherencia intercelular, que implica la adhesión entre bacterias, da como resultado la formación de una microcolonia y la compleja arquitectura de la biopelícula [Gaynes y Horan, 1996; Haley, *et al.*, 1985; Rodríguez-Martínez, *et al.*, 2007; Surveill, 1984].

La matriz glucoprotéica no sólo permite el intercambio de metabolitos entre microcolonias y el exterior, sino que además les confiere una barrera protectora contra ambientes adversos, como falta de nutrientes, medio hiperosmolar, anaerobiosis, presencia de anticuerpos, macrófagos y antibióticos. Sin embargo, las bacterias sacrifican su capacidad de crecimiento y desplazamiento dentro de la biopelícula [Crede y Hierholzer, 1988]. Varias son las bacterias que se han determinado como formadoras de biopelícula, tanto Gram positivas y negativas, así como también patógenas y no patógenas, algunos ejemplos son *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Enterococcus* *ssp.*, *Streptococcus mutans* [William y Petri, 2002].

Actualmente existe un gran interés para la medicina en la observación que las bacterias patógenas se adhieren a dispositivos plásticos (prótesis ortopédicas, válvulas cardíacas artificiales, marcapasos, lentes de contacto, injertos plásticos y dispositivos intravenosos temporales o permanentes). Una vez adheridas, comienzan a formar la biopelícula, que impide la acción no sólo de fagocitos y anticuerpos que tratan de eliminarlos, sino además de antibióticos indicados como tratamiento. Se ha encontrado que al obtener cultivos de estas bacterias, son sensibles *in vitro* a los tratamientos convencionales; sin embargo, las grandes moléculas de antibióticos no logran atravesar la estrecha red de glicoproteínas de la biopelícula para llegar a su sitio de acción [Díaz, *et al.*, 1999; Edmond y Wenzel, 1995]. Se reduce la eficacia de los antibióticos cuando la *S. epidermidis* existe dentro de una biopelícula adherida en las superficies de aparatos médicos colocados en un órgano [Polonio, *et al.*, 2001].

2.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Durante las últimas décadas, el uso excesivo e inapropiado de antibióticos ha propiciado la aparición y diseminación de bacterias resistentes, favoreciendo la adquisición de la resistencia como respuesta adaptativa de los microorganismos. La resistencia es, un proceso evolutivo inevitable y predecible. Uno de los principales mecanismos por el que las bacterias obtienen genes de resistencia a antibióticos es, por la adquisición de ADN exógeno [Levy, 1997]. La transmisión de los factores de resistencia a los microorganismos patógenos complica el tratamiento de las IIH. En ambientes hospitalarios es habitual la presencia de microorganismos resistentes a diversos antibióticos. De esta forma, han ido surgiendo cepas resistentes y multiresistentes de estafilococos, neumococos y enterococos responsables de graves infecciones, difíciles de tratar dado su nivel de resistencia.

Aunque *S. epidermidis* es generalmente una bacteria no patógena, es una bacteria oportunista y está dentro de los principales agentes causales especialmente en IIH [Banerjee, *et al.*, 1980]. En las últimas dos décadas se ha incrementado la resistencia de sus cepas contra diversos antibióticos, entre ellos la vancomicina [Depardieu, *et al.*, 2004], provocando mayor tiempo de estancia hospitalaria y muerte de estos pacientes [O'gara y Humphreys, 2001].

3.- JUSTIFICACIÓN

Los antibióticos son agentes terapéuticos importantes en el tratamiento de infecciones. Sin embargo, en las últimas décadas, los microorganismos muestran cada vez resistencia a los mismos. Lo que hace necesario tomar medidas preventivas eficientes para su erradicación, iniciando desde la concientización en el uso racional de los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

El presente trabajo estuvo enfocado a detectar cepas resistentes a vancomicina a partir de infecciones oculares, el encontrar cepas resistentes deja un precedente más sobre la aparición de cepas resistentes y deja en claro que se deben tomar medidas preventivas en el tratamiento y control de las enfermedades infecciosas. Con ello se podrá reducir significativamente el costo, y disminuir el tiempo de estancia en los hospitales; y con ello disminuir los casos de morbilidad y mortalidad de las enfermedades [Banerjee, *et al.*, 1980; O'gara y Humphreys, 2001]. Por otra parte, el trabajo también tiene como finalidad, saber el mecanismo de resistencia, lo que permitiría el diseño de nuevos antibióticos dirigidos a un mecanismo de resistencia en específico.

4.- OBJETIVOS

Objetivo General:

Encontrar cepas resistentes a vancomicina con capacidad de formar biopelícula, así como determinar algunos mecanismos de resistencia a vancomicina de cepas de *S. epidermidis* aisladas de infecciones en ojo humano.

Objetivos Específicos:

- a) Determinar las CMI de vancomicina tanto en placa como en tubos de 60 cepas de *S. epidermidis* de acuerdo a las especificaciones de la NCCLS.
- b) Detectar por PCR múltiple la presencia de algún tipo de gen *Van* en las 60 cepas de *S. epidermidis* en estudio.
- c) Determinar la formación de biopelícula de cepas de *S. epidermidis* resistentes a vancomicina mediante la técnica de rojo congo en caja de petri y el método de microplaca.

5.- HIPÓTESIS

Encontrar cepas de *S. epidermidis* resistentes a vancomicina aisladas de infecciones oculares y determinar si la resistencia está asociada al gen *Van* y/o a la formación de biopelícula.

6.- METODOLOGÍA

El presente diseño es de tipo experimental encaminado a encontrar cepas resistentes a vancomicina y conocer los mecanismos de resistencia.

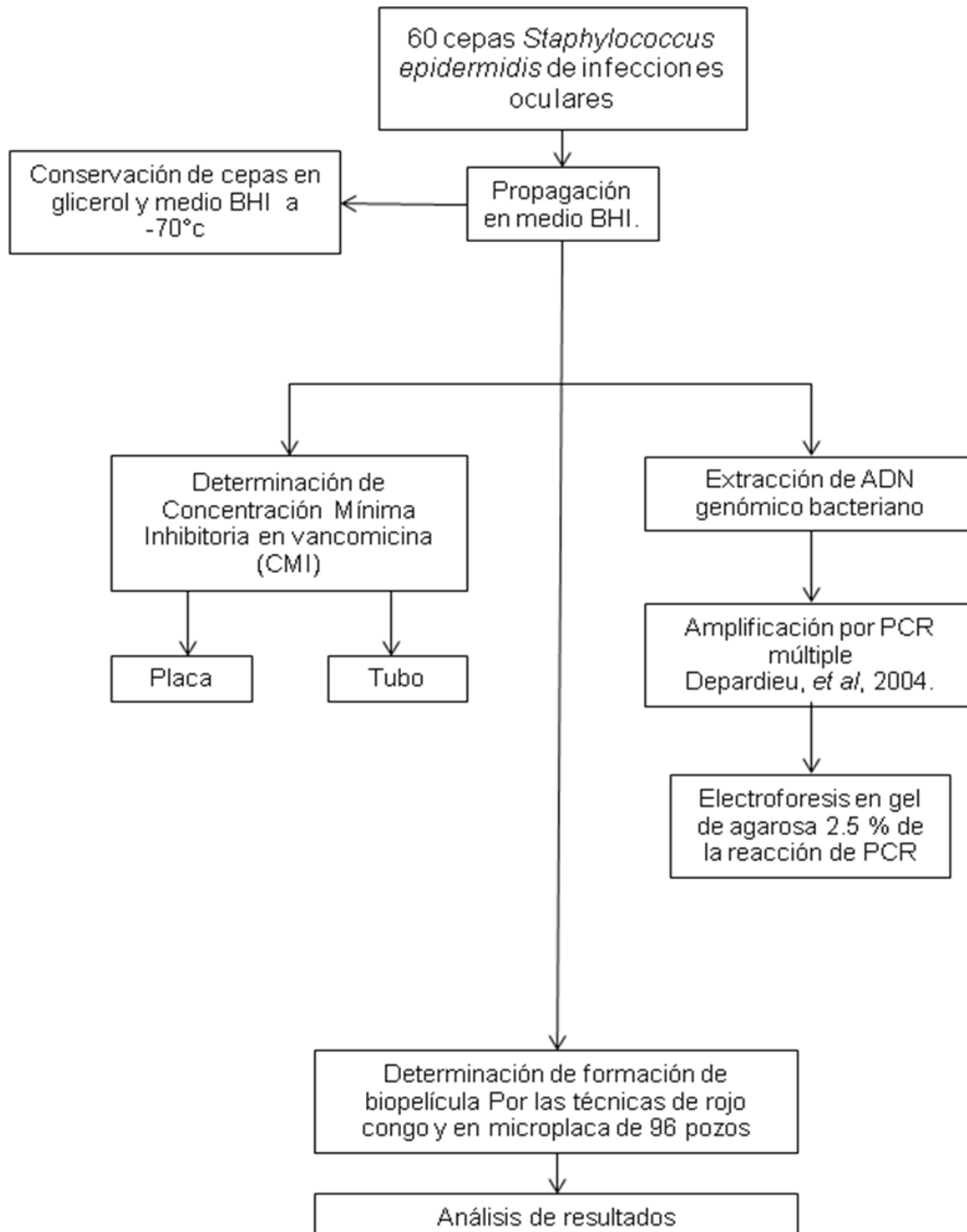


Figura 5. Diseño experimental del trabajo realizado.

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El trabajo experimental se realizó con 60 cepas de *S. epidermidis* aisladas y bioquímicamente caracterizadas de infecciones oculares obtenidas del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”, en la ciudad de México a través de un trabajo en colaboración con el Dr. Juan Carlos Cancino Díaz del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. El trabajo fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Instituto Politécnico Nacional.

De las 60 muestras clínicas 28 fueron de conjuntivitis, 19 de endoftalmitis y 13 de úlcera corneal.

6.2 PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPAS DE *Staphylococcus epidermidis*

Las cepas fueron sembradas en 5 mL de medio Infusión cerebro y corazón (BHI) estéril y se incubaron a 37°C por 12-48 h. Posteriormente, en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL. se mezclaron 500 µL de cada cepa del crecimiento bacteriano con 500 µL de glicerol estéril, se homogeneizaron en vortex e inmediatamente se congelaron a -70 °C hasta su uso.

6.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA PARA VANCOMICINA

Para determinar tanto la dilución en agar y dilución en caldo se realizaron, en base a las especificaciones del Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico usando agar con caldo BHI respectivamente. Las concentraciones de vancomicina en las placas o en los tubos fueron de 2, 4, 8, 16 y 32 µg/mL [NCCLS, 1998], donde CMI de vancomicina ≤ 4 µg/mL es sensible, CMI entre 8 y 16 µg/mL es intermedia y aquellas con CMI ≥ 32 µg/mL son resistentes [Srinivasan, *et al.*, 2002].

La clasificación de las cepas se realizó de acuerdo con el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico de los Estados Unidos (NCCLS de sus siglas en inglés National Committee for Clinical Laboratory Standards).

6.3.1 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD MÍNIMA INHIBITORIA EN PLACA

La determinación de las CMI de vancomicina se realizó en placa, para ello cultivos de *S. epidermidis* fueron crecidos en medio líquido BHI hasta alcanzar la fase logarítmica (± 0.5 DO). Se sembraron con un replicador en cajas de Petri con medio BHI conteniendo diferentes concentraciones de vancomicina (2, 4, 8, 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$) las cajas se incubaron a 37°C haciendo lecturas visuales de crecimiento a 24 y 48 h, usando como referencia cepas ATCC, esta técnica se realizó por duplicado y triplicado hasta tener datos reproducibles.

6.3.2 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD MÍNIMA INHIBITORIA EN TUBO

Para el ensayo en tubo, se preparó una serie de tubos con 5 mL de medio líquido BHI con las mismas concentraciones probadas en placa; para este caso alícuotas de 10 μL de cultivo en fase log se sembraron en cada tubo y posteriormente se agitaron a 100 rpm a 37°C y se tomaron lecturas a 24 y 48 h estas técnicas se realizaron por duplicado y triplicado hasta tener datos reproducibles mediante lecturas visuales observando turbiedad en los tubos, comparando con un control de cada cepa.

6.4 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *Staphylococcus epidermidis*

Cepas de *S. epidermidis* fueron crecidas en medio líquido BHI hasta alcanzar la fase logarítmica (± 0.5 DO). Se centrifugaron a 10,000 rpm. por 1 min en un tubo Eppendorf, posteriormente se agregaron 467 μL de EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-cético) y se agitaron en vortex. A continuación se agregaron 30 μL de SDS y 5 μL de proteínasa K y se incubaron a 37 °C en termomixer Eppendorf . Terminado el tiempo se agregaron 500 μL de fenol-cloroformo y se centrifugó por 10 s. La fase superior se colocó en un tubo limpio, este paso se realiza dos veces de la misma forma.

Posteriormente a la fase agregaron 50 µL de acetato de sodio 0.3 M y 100 µL de isopropanol, se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 min.

Se decantó el sobrenadante y al fondo se observó un pellet al cual se re suspendió en 500 µL de etanol al 70% y se centrifugó por 10 minutos a 12 000 revoluciones (este procedimiento se realizó en dos ocasiones), una vez concluida esta etapa se retiró el etanol y se colocó el tubo Eppendorf en un horno a 40 °C para evaporar el etanol y una vez seco se adicionaron 35 µL de agua libre de nucleasas. Para observar la integridad del ADN 1 µl de muestra se sometió a electroforesis de agarosa al 0.7% a 90 V. y revelado con bromuro de etidio. El gel de agarosa se preparó de acuerdo a la concentración necesaria y en TBE 1x (Tris Boratos-EDTA).

6.5 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE UN FRAGMENTO DEL GEN VAN

La amplificación por PCR múltiple se realizó según lo describió Depardieu, 2004, a fin de amplificar uno de los seis tipos de gen *Van* que confieren resistencia: gen *VanA*, *VanB*, *VanC*, *VanD*, *VanE* y *VanG*. La tabla 2 muestra los oligonucleótidos iniciadores empleados y los tamaños de los productos de PCR esperados. Así mismo, otro par de iniciadores dentro de la misma reacción se incluyeron para la amplificación de una región específica de *S. epidermidis*.

Tabla 2. Oligonucleótidos iniciadores empleados en el trabajo.

Iniciador	Secuencias (5' - 3')	Gen	Tamaño de producto	Numero de acceso	Referencia
EA1(+) EA2(-)	GGGAAAACGACAAATTGC GTACAATGCGGCCGTTA	<i>VanA</i>	732	M97297	Dutka-Malen, <i>et al.</i> , 1995
EB3(+) EB4(-)	ACGGAAATGGGAAGCCGA TGCACCCGATTTCGTTTC	<i>VanB</i>	647	U00456/AF550667	Depardieu, <i>et al.</i> , 2004
EC5(+) EC8(-)	ATGGATGGTAYTKGTAT* TAGCGGGAGTGMCMYMTAA*	<i>VanC1/2</i>	815/827	AF162694/L29638	Depardieu, <i>et al.</i> , 2004
ED1(+) ED2(-)	TGTGGGATCGGAGCTGCAG TGCAGCCCAAGTATCCGCTAA	<i>VanD</i>	500	AF130997/AY082011	Depardieu, <i>et al.</i> , 2004
EE 1(+) EE 2(-)	TGTGGTATCGGAGCTGCAG ATAGTTTAGCTGGTAAC	<i>VanE</i>	430	AF430807	Depardieu, <i>et al.</i> , 2004
EG1(+) EG2(-)	CGGCATCCGCTGTTTTTGA GAACGATAGACCAATGCCTT	<i>VanG</i>	941	AY271782	Depardieu, <i>et al.</i> , 2004
Se705-1(+) Se705-2(-)	ATCAAAAAGTTGGCGAACCTTTTCA CAAAAGAGCGTGGAGAAAAGTATCA	<i>S. epidermidis</i> ^b	125	NA ^c	Martineau, <i>et al.</i> , 1996

* K = G o T; M = A o C; Y = C o T.

^b Fragmento cromosomal de *S. epidermidis*.

^c No aplica

La reacción se realizó como sigue: 1.0 µL del ADN extraído de las cepas, 5 µL de regulador de la enzima (10X), 6.29 µL de una mezcla de oligonucleótidos, 1.5 µL de MgCl₂, 50 mM 0.5 µL dNTPs 20 mM, 0.4 µL de Taq polimerasa y 35.31 µL de agua. La mezcla de reacción se incubó a 94 ° C por 3 min posteriormente a 30 ciclos a 94 ° C por 1 min., 54 °C por 1min., 72 ° C por 1 min. La extensión final 72 ° C por 7 min, en un termociclador (Techne 512 Genius). Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa al 2.5 % y revelado con bromuro de etidio, la captura de imágenes se hizo a través de un fotodocumentador UVP.

6.6 DETERMINACIÓN DE BIOPELÍCULA

6.6.1 MÉTODO DE MICROPLACA

El ensayo de la formación de biopelícula se realizó con modificaciones según [Christensen, *et al.*, 1985]. Las cepas de *S. epidermidis* se cultivaron en 5mL de medio líquido BHI por 24 h a 37°C, cuando se requirió, se agregó NaCl a una concentración final de 5% para inducir la formación de biopelícula. Posteriormente, se realizó una dilución de 1:200 con medio Agar Soya Trypticase (TSA, por sus siglas en inglés) fresco y se colocaron 200 µL en un pozo de una microplaca de 96 pozos (el ensayo se realizó por cuadruplicado para cada cepa), la placa se incubó a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con regulador fosfato salina (PBS) 1X al final de los lavados se agregó 200 µL de safranina al 0.1% y se dejó reposar por 5 min. Se retiró la safranina por decantación y se lavó dos veces con PBS 1X, posteriormente se midió absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA, empleando como blanco medio de cultivo sin crecimiento, valores ≥ 0.12 DO fueron considerados positivos para la formación de biopelícula.

6.6.2 MÉTODO DE ROJO CONGO EN CAJA DE PETRI

La técnica del rojo congo consistió en la preparación de placas de base de TSA, adicionando rojo congo a una concentración final de 0.8 mg/mL [Freeman, *et al.*, 1989].

Las cepas de *S. epidermidis* previamente fueron cultivadas en 5 mL de medio líquido BHI por espacio de 24 horas a 37 °C. Posteriormente a partir de este cultivo se sembraron por estría abierta en las placas de rojo Congo y se incubaron por 24 horas a 37 °C. Las cajas con crecimiento bacteriano se colocaron en refrigeración a 4 °C. por 24 hrs., al término de este periodo de refrigeración se identificó la producción de biopelícula (positivas) por la presencia de colonias de color negro y la no producción de biopelícula (negativas) por la presencia de colonias color rojas.

7.- RESULTADOS

7.1.- DETERMINACIÓN DE LA CMI DE VANCOMICINA EN CEPAS DE *S. epidermidis*

Los resultados de la CMI en las 60 cepas de *S. epidermidis* se muestran en la **Figura 6**. Para el caso de conjuntivitis (n=28), 23 cepas tuvieron una CMI de vancomicina de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (sensibles); 2 con una CMI de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (resistencia intermedia) y 3 con una MIC de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$; para el caso de endoftalmitis (n=19), 17 tuvieron una CMI de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (sensibles); 1 de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (sensibles) y 1 de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (resistencia intermedia) y finalmente las de úlcera corneal (n= 13) todas fueron sensibles (CMI de 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

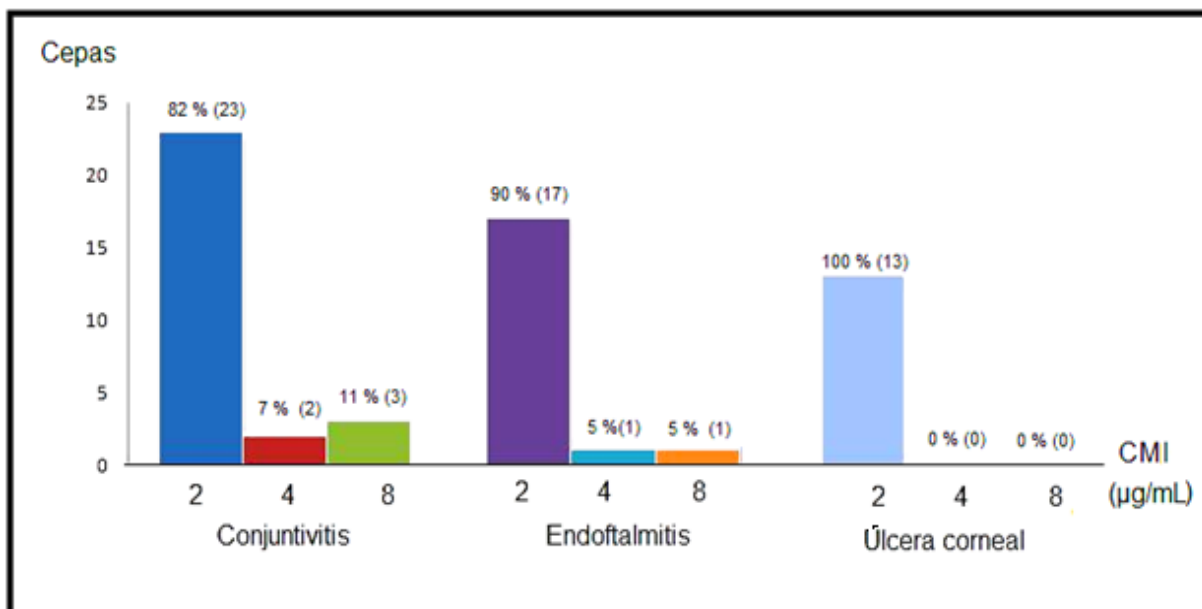


Figura 6. CMIs de vancomicina de las 60 cepas obtenidas de infecciones oculares. Las muestras de Conjuntivitis mostró la mayor cantidad de cepas resistentes, mientras, que de úlcera corneal todas fueron sensibles. CMI ≤ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es sensible, CMI entre 8 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es intermedia, CMI ≥ 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ son resistentes. [Srinivasan, *et al.*, 2002]

7.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR MÚLTIPLE DE UN FRAGMENTO DEL GEN VAN

Al hacer el escrutinio molecular de todas las cepas por PCR múltiple, no se logró detectar la presencia de ningún gen *Van*, sólo se logró obtener un producto de amplificación de 125 pb en todas las cepas, que corresponde al tamaño esperado para identificar la especie, (**ver tabla 1**). La figura de abajo (**Figura 7**) sólo se muestra el resultado para 4 cepas y una cepa ATCC utilizada como control negativo.

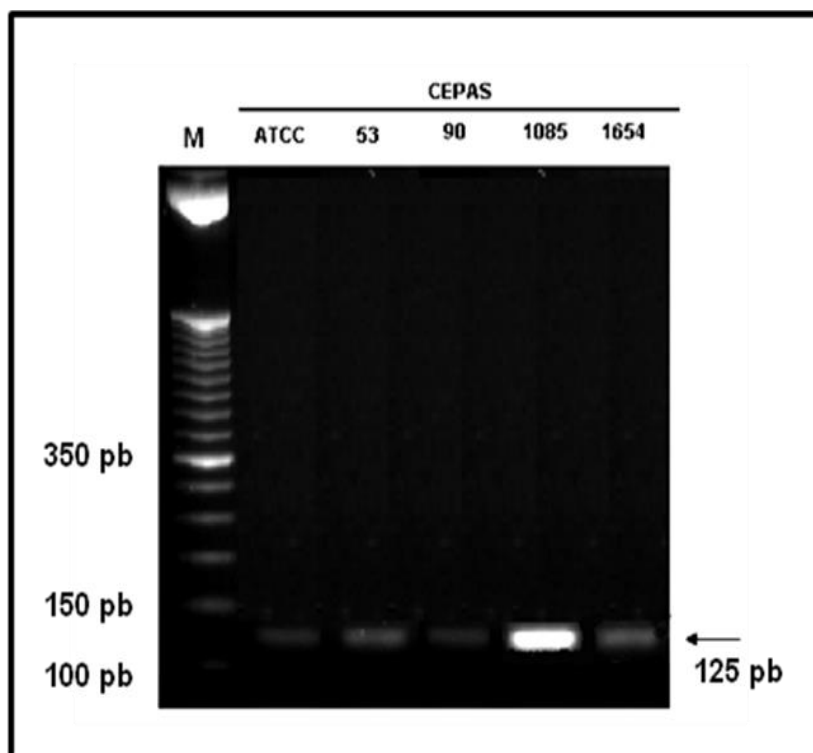


Figura 7. Amplificación de DNA por PCR múltiple. En las cepas probadas (53, 90, 1085, 1654) se aprecia una banda de 125 pb al igual que una cepa *S. epidermidis* utilizada como control ATCC. El carril M, se encuentra un marcador de peso molecular de 50 pb en escalera (Invitrogen, The Netherlands.)

7.3 DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA POR EL MÉTODO DE MICROPLACA Y MÉTODO DE ROJO CONGO

7.3.1 MÉTODO DE MICROPLACA

Las cepas con resistencias intermedia fueron analizadas por su relevancia clínica para determinar la formación de la biopelícula, se encontró que las cepas 1986, 1654 y 1668 fueron productoras (**Tabla 3**), se consideraron formadoras de biopelícula aquellas que estuvieron por arriba del valor de corte de (0.12 unidades de absorbancia) lo que puede explicar en parte la resistencia intermedia encontrada en estas cepas al antibiótico. Interesantemente, el crecimiento de las cepas 1986 y 1654 en NaCl 8% (inductor de formación de biopelícula incrementó la CMI a 32 µg/mL por lo que según al NCCLS pasaron de resistencia intermedia a altamente resistentes. Por el contrario, la cepa 1843 fue negativa a esta prueba, lo que sugiere que otros mecanismos de resistencia deben estar presentes. En la **Figura 8** se muestra un ejemplo de la formación positiva de biopelícula en la microplaca teñida con safranina de una cepa de *S. epidermidis*, de una cepa no formadora (negativa), además del blanco usado como control.

Tabla 3. Formación de biopelícula de cepas de *S. epidermidis* inducidas con 8% de NaCl

CEPA	983		53		1668		1843		1654		1986	
	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
	8µg	16µg	8µg	16µg	8µg	16µg	8µg	16µg	8µg	8µg	8µg	8µg
BLANCO	0.003	0.289	0.115	0.229	0.243	0.219	0.301	0.653	0.552	0.647	0.944	0.82
	0.044	0.359	0.121	0.359	0.175	0.207	0.382	0.824	0.555	0.64	0.794	1.058
	-0.01	0.412	0.284	0.398	0.232	0.306	0.326	0.884	0.531	0.707	0.812	1.075
	-0.037	0.381	0.345	0.396	0.316	0.306	0.544	0.991	0.533	0.706	0.918	1.228
PROMEDIO	0.36	0.216	0.345	0.241	0.259	0.388	0.838	0.542	0.675	0.867	1.045	
PROMEDIO	0.038	0.122	0.199	0.261	0.326	0.447	0.509	0.608	0.639	1.08	0.556	0.945
	0.034	0.197	0.146	0.395	0.456	0.458	0.475	0.715	0.681	0.749	0.995	1.152
	0.075	0.11	0.207	0.266	0.337	0.476	0.629	0.66	0.77	0.725	0.963	1.45
	0.162	0.098	0.188	0.291	0.361	0.518	0.588	0.639	0.707	0.942	1.236	1.103
PROMEDIO	0.077	0.131	0.74	0.303	0.37	0.474	0.55	0.655	0.699	0.874	0.937	1.162
	8µg	16µg	8µg	16µg	8µg	16µg	8µg	16µg	8µg	8µg	8µg	8µg
	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
CEPA	983		53		1668		1843		1654		1986	

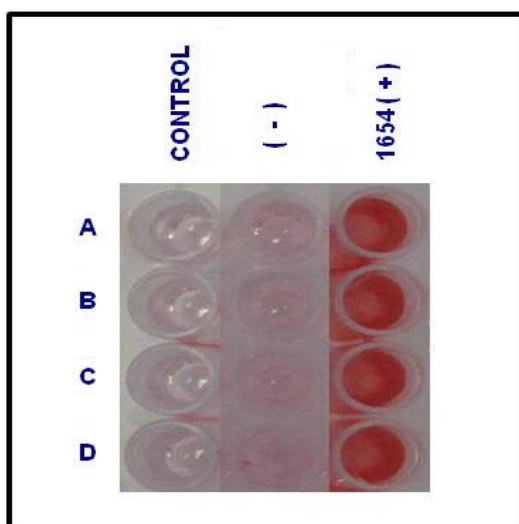


Figura 8. Formación de biopelícula en microplaca. En la imagen donde se muestra la mayor intensidad se encuentra la formación de biopelícula positivo, mientras una no formadora es la columna de en medio.

7.3.2 MÉTODO DE ROJO CONGO

Para corroborar la formación de biopelícula con otra técnica, se realizó la técnica de rojo congo para las cepas con resistencia intermedia, en la **Figura 9** se muestra un ejemplo de observar una bacteria formadora de biopelícula comparada con una cepa no formadora.

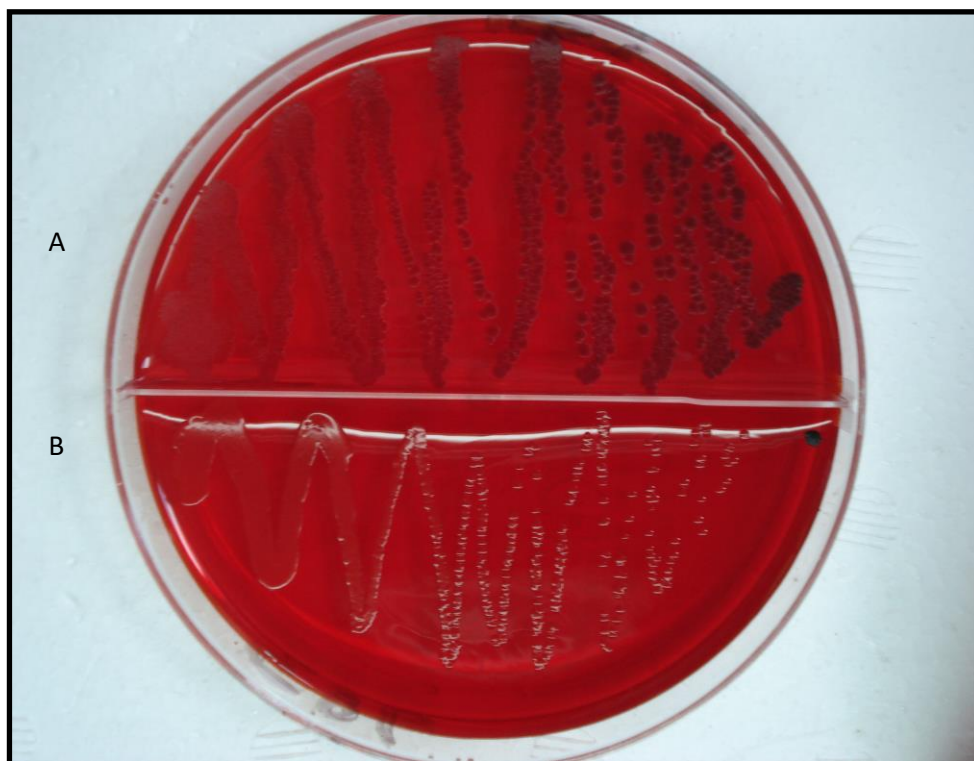


Figura 9. Formación de biopelícula por el método de rojo congo.

(A) De lado superior se observa producción de biopelícula y de lado inferior

(B) una cepa forma productora de biopelícula negativa.

8. DISCUSIÓN

La etapa del uso de los antibióticos comienza en 1941 con la producción de la penicilina a gran escala y su utilización con buenos resultados en ensayos clínicos [Sande y Mandell, 1982]. La aparición en los años 80s de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina y el aumento en el número de infecciones por bacterias Gram positivas han favorecido el uso de la vancomicina, es cual a su vez, es un antibiótico indicado para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram positivas y negativas y en pacientes alérgicos a penicilinas [William y Petri, 2002]. No obstante, en los últimos años también se han aislado de manera importante cepas resistentes de estafilococos contra este antibiótico [Calderón. *et al.*, 2002; Courvalin, 2006; Dourado. *et al.*, 2007; Dutka-Malen. *et al.*, 1995].

Por lo que el presente trabajo, se enfocó a encontrar cepas de *S. epidermidis* resistentes a vancomicina, aisladas de tres infecciones oculares: conjuntivitis, úlcera corneal y endoftalmitis. Al determinar las CMI's tanto en placa como en tubo, encontramos que 4 de las 60 cepas en estudio (6.66 %) tuvieron resistencia intermedia, este porcentaje es similar a lo reportado por Juarez, *et al.*, 2004 y Mamani, *et al.*, 2006. Estas mismas cepas mostraron resistencia a diversas quinolonas como gatifloxacina, moxifloxacina y balofloxacina empleadas para el tratamiento de infecciones oculares [Betanzos-Cabrera, *et al.*, 2008], estos datos confirman la aparición cada vez más común de cepas resistentes a antibióticos a partir de casos clínicos. Para explicar la resistencia intermedia en las cepas, se trató de amplificar por PCR múltiple los genes de resistencia a vancomicina reportados en la literatura (*VanA*, *VanB*, *VanC*, *VanD*, *VanE* y *VanG*) [Depardieu, *et al.*, 2004]. Como se sabe, este gen es un complejo genético que su expresión produce enzimas que modifican el sitio blanco de reconocimiento de la vancomicina en la peptidoglicana [Courvalin, *et al.*, 2006]. El procedimiento se realizó según Depardieu *et al.*, 2004 utilizando los iniciadores ya reportados (**Tabla 2**). Al hacer el escrutinio de todos los ADNs genómicos de todas las cepas, no se logró demostrar la presencia en ninguna de las cepas de algunos de los tipos de genes mencionados. Únicamente

se logró amplificar un fragmento de 125 pb el cual corresponde al tamaño esperado para identificar especie, demostrando así, que todas las cepas de trabajo fueron *S. epidermidis* (**Figura 7**). En la práctica, estos iniciadores dirigidos para *S. epidermidis*, pueden emplearse para realizar diagnóstico molecular a partir de muestras biológicas, que puede ser un ensayo confirmatorio en la identificación de especie, una vez que la identificación bioquímica se haya realizado. Al no detectar ningún tipo de gen *Van* se pone de manifiesto que las cepas con resistencia intermedia no se debió por la presencia del gen.

Por otra parte, se sabe que la gran mayoría de las bacterias en ambientes naturales están organizados formando biopelículas [Costerton, *et al.*, 1995; Freeman, *et al.*, 1989; Gaudio, *et al.*, 2006]. La biopelícula aparentemente no sólo es una organización sino también es un mecanismo de resistencia común en microorganismos [Okajima, *et al.*, 2006]. Nuestros resultados obtenidos, mostraron que 3 de las 4 cepas con resistencia intermedia (1986, 1654 y 1843) fueron productoras de biopelícula, lo que puede explicar parcialmente la resistencia al antibiótico. No obstante la cepa 983 que también tuvo resistencia intermedia fue negativa a esta prueba. Por lo que no se descarta la posibilidad que otros mecanismos puedan contribuir a la resistencia en esta cepa o incluso en las otras [Van, *et al.*, 2000]; en este sentido existen otros mecanismos que pueden contribuir a la resistencia como por ejemplo la presencia de genes de resistencia codificada por plásmidos o mecanismo de flujo capaz de expulsar al antimicrobiano de la célula bacteriana [Mahamoud, *et al.*, 2007] tal y como se ha descrito en *Streptococcus pneumoniae* [Brenwald, *et al.*, 1998; Pestova, *et al.*, 2000; Piddock, *et al.*, 1998] *S. aureus* [Pestova, *et al.*, 2000] y *Pseudomonas aeruginosa* [Mahamoud, *et al.* 2007], el cual es un mecanismo de flujo activo que contribuye sustancialmente al fenotipo de resistencia contra fluoroquinolonas [Brenwald, *et al.*, 1998; Piddock, *et al.*, 1998]. Otra forma de conferir resistencia es a través de elementos genéticos móviles conocidos como transposones [Normak y Normak, 2002]. Muchos de ellos transposones complejos que cuentan con sitios para la inserción conjunta de genes de resistencia a antibióticos [Hall *et al.*, 1999; Nandi *et al.*, 2004].

Por otra parte, la cepa 1668 que fue sensible a vancomicina, también fue formadora de biopelícula, esto sugiere que la formación de biopelícula puede ser un proceso biológico común entre bacterias de la misma especie pero no siempre garantiza la resistencia a la acción de cualquier antibiótico, ya que se considera al género *epidermidis* como un productor de biopelícula [Juarez *et al.*, 2004; Gaudioso, *et al.*, 2006]. Por lo tanto no hay una perfecta relación entre la resistencia y la formación de biopelícula. También esto sugiere que la biopelícula es un mecanismo de protección inespecífico que bajo ciertas condiciones puede servir de protección y que además puede tener otras funciones en la comunidad bacteriana, especialmente hay que considerar que los ensayos se realizaron *in vitro* y que eventualmente esto puede cambiar una vez que la bacteria esté colonizando un tejido humano.

Finalmente, en un ensayo para incrementar la CMI por inducción con 8% NaCl tal y como lo describe Jacoby y Archer. 1991, se encontró que las cepas 1986 y 1654 incrementaron su CMI de 16 a 32 µg/mL, por lo que de acuerdo al NCCLS pasaron de ser de resistencia intermedia a altamente resistentes. Este resultado tiene un significado clínico importante, en el sentido a que en ciertas condiciones de estrés, las cepas podrían ser más difíciles de erradicar, ya que tienen una capacidad potencial mayor de resistir al tratamiento con vancomicina. Por ejemplo, un paciente infectado por esta cepa que no sea tratado adecuadamente con vancomicina la bacteria pueda adquirir mayor resistencia de tal forma que el tratamiento puede ser ineficaz para erradicar al microorganismo. No obstante, la cepa 1843 no incrementó su nivel de resistencia en presencia del NaCl 8%. Este resultado también coincide con la evidencia que la tipificación molecular de especies *S. epidermidis* han mostrado considerable diversidad entre la población de *S. epidermidis* [Bogado, *et al.*, 2002; de Mattos, *et al.*, 2003; Galdbart, *et al.* 1999] por lo que es de esperarse que la respuesta a condiciones ambientales sea diferente.

9. RECOMENDACIONES

Por tanto, serán esenciales todas las estrategias dirigidas a prevenir la aparición de resistencias y a reducir, en lo posible, su diseminación. Los programas de seguimiento resultan, esenciales para indicar el estado de las resistencias en determinados grupos o especies microbianas y en diferentes localizaciones. Será conveniente también el aislamiento de los enfermos colonizados por microorganismos resistentes, para evitar su diseminación así como el ensayo de nuevas formas de tratamiento (identificación más rápida y fiable de los agentes infecciosos, menor duración de los tratamientos, desarrollo de agentes terapéuticos contra nuevas dianas moleculares, desarrollo de vacunas, inhibición específica de la infección [Levy y Marshall, 2004].

10. CONCLUSIONES

Se detectaron 6.6% de las cepas estudiadas con resistencia intermedia (16 µg/mL) a vancomicina según los lineamientos de la NCCLS.

En ninguna de las cepas de estudio, se logró asociar con la presencia del gen *Van*.

La resistencia intermedia encontrada en las cepas 1654, 1986 y 1668 se asoció con la capacidad de formar biopelícula.

Se encontraron cepas sensibles con la capacidad de formar biopelícula, por lo que posiblemente la biopelícula no puede ser siempre un mecanismo de protección al antibiótico.

En la cepa 983 clasificada con resistencia intermedia no fue productora de biopelícula por lo que deben existir otros mecanismos de resistencia al menos en esta cepa que explique la resistencia encontrada.

El NaCl 8% incrementó la CMI de resistencia intermedia de 16 µg/mL a 32 µg/mL en 2 cepas de *S. epidermidis* por lo que probablemente estas cepas puedan ser más difíciles de erradicar en casos clínicos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arciola, C., Baldassarri, L. y Montanaro, L. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol.* **39**(6):2151-2156.
2. Appleton, A. 2001. Bacterial Resistance. A worldwide problem. *Clin Lab Intern* **25**(4):22-23.
3. Banerjee, S., Emori, T. y Culver D. 1980. Secular trends in nosocomial primary blood stream infections in the United States. *Am J Med.* **91**(3):86-89.
4. Beltran, C. 2004. Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: Utilidad práctica. *Rev Chil Infect.* **21**(1):39-44.
5. Betanzos-Cabrera, G., Juárez-Verdayes, M., González-González, G., Cancino-Díaz, M. y Cancino-Díaz, J. 2008. Gatifloxacin, Moxifloxacin, and Balofloxacin Resistance due to Mutations in the *gyrA* and *parC* Genes of *Staphylococcus epidermidis* Strains Isolated from Patients with Endophthalmitis, Corneal Ulcers and Conjunctivitis. En prensa.
6. Beyer, R., Pestova, E., Millichap, J., Noskin, G. y Peterson, L. 2000. A convenient assay to estimate the possible involvement of efflux of fluoroquinolones by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: evidence for diminished moxifloxacin, sparfloxacin and trovafloxacin efflux. *Antimicrob Agents Ch.* **44**:798-801.
7. Brenwald, N., Gill, M. y Wise, R. 1998. Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Ch.* **42**: 2032-2035.
8. Bogado, I., Limansky, A., Sutich, E., Marchiaro, P., Marzi, M., Putero, J. y Viale, A. 2002. Molecular characterization of methicillin-resistant coagulase-

- negative staphylococci from a neonatal intensive care unit. *Infect Cont Hosp Ep.* **23**: 447–451.
9. Calderón, J., Espinoza, M. y Ávila, B. 2002. Epidemiology of drug resistance: The case of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococcus infections. *Salud pública.* **44**(2):108-112.
10. Christensen, G., Simpson, W., Younger, J., Baddour, L., Barret F., Melton, D. y Beachy, E. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* **22**(6):996-1006.
11. Crede, W. y Hierholzer W Jr. 1988. Linking hospital epidemiology and quality assurance: seasoned concepts in a new role. *Infect Control.* 9(1):42-44.
12. Diaz, R., Solorzano, S. y Padilla, G. 1999. Infecciones nosocomiales. Experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel. *Salud pública Mèx.* **41**(1):12-17.
13. Depardieu, F., Perichon, B. y Courvalin, P. 2004. Detection of the van Alphabet and identification of Enterococci and Staphylococci at species level by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* **42**(12):5857-5860.
14. De Mattos, E., Teixeira, L., Alves, V., Rezenda, C., da Silva M., da Silva-Carvalho, M., Ferreira-Carvalho, B. y Figueiredo, A. 2003. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and comparison of different molecular techniques for discriminating isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **45**: 13–22.
15. Dourado, A., Alves, P., Barbosa, L., Viana, C., Francisco, W., Lottenberg, C., Valle, M. y Hofling, A. 2007. Laboratory detection methods for methicillin

- resistance in coagulase negative *Staphylococcus* isolated from ophthalmic infections. *Arq Bras Oftalmol.* **70**(4):667-675.
16. Dutka-Malen, S., Ever, S. y Courvali, P. 1995. Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**(1):24-27.
17. Edmond, MB, Wenzel, RP. 1995. Infection control. En: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4ed. Mandell, GL., Bennett, JE., Dolin, R. New York: Churchill. pp: 2572-2575.
18. Evans, R. y Holmes, C. 1987. Effect oh Vancomycin Hifrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrob Agents Ch.* **31**(6):889-894.
19. Freeman, D., Falkiner, F. y Keane, C. 1989. New method for detection slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Phatol.* **42**(8):872-874.
20. Gander, S. Kinnaird, A. y Finch, R. 2005. Telavancin: in vitro activity against staphylococci in a biofilm model. *J Antimicrob Chemoth.* **56**(2):337-343.
21. Gaudioso, M., Angela, M., Romero, C. y Cecilia, M. 2006. Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of Coagulase-Negative *Staphylococcus* Strains. *Biol Pharm Bull.* **29**(8):1592-1596.
22. Gaynes, R. y Horan, T. 1996. Surveillance of Nosocomial Infections. En *Mayhall CG.* edit. Hospital epidemiology and infection control. Baltimore: Williams & Wilkins. pp: 1017-1031.
23. Galdbart, J., Morvan, A., Desplaces, N., El Solh, N. 1999. Phenotypic and genomic variation among *Staphylococcus epidermidis* strains infecting joint prostheses. *J Clin Microbiol.* **37**: 1306–1312.

24. Geraci, J., Heilman, F., Nichols, D., Wellman, W. y Rooss, G. 1956. Some laboratory and clinical experiences with a new antibiotic, vancomycin. *Proc. Mayo Clin.* **31**(21):564-582.
25. Garner, J., Jarvis, W., Emori, T., Horan, T. y Hughes, J. 1988. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control.* **36**(5):309-332.
26. Haley, R., Culver, D. y White, J. 1985. The Efficacy of Infection Surveillance and Control Programs in Preventing Nosocomial Infections in U.S Hospitals. *Am J Epidemiology.* **121**(2):182-205.
27. Haley, R., Schaberg, D., Von Allmen S. y McGowan, J. Jr. 1980. Estimating the extra charges and prolongation of hospitalization due to nosocomial infection: a comparison of methods. *J Infect Dis.* **141**(2):248-257.
28. Hall, R., Collis, C., Kim, M., Partridge, S., Recchia, G, y Stokes H. 1999. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann. NY. Acad. Sci.* **870**:68-80.
29. Hernández, R., Quintero, G., Mesa, L., Molano, R. y Hurtado, R. 2005. Prevalencia de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* en pacientes con conjuntivitis. *Rev. Facultad de ciencias. P.U.J.B.* **10**(2):47-54.
30. Jacoby, G. y Archer, G. 1991. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N Engl J Med.* **324**(9):601-612.
31. Juárez, V., Reyes, L., Cancino, D., Muñoz, S., Rodríguez, M., Zavala, D. y Henández, R. 2006. Isolation, vancomycin resistance and biofilm production of *Staphylococcus epidermidis* from patients with conjunctivitis, corneal ulcers, and endophthalmitis. *Rev Latinoamericana de Microbiología.* **48**(3-4):238-246.

32. Kaatz, G. 2002. Inhibition of bacterial efflux pumps: a new strategy to combat increasing antimicrobial agent resistance. *Expert Opin Emerg Drugs*. **7**(2):223-233.
33. Larson, E., Horan, T., Cooper, B., Kotilainen, H., Landry, S. y Terry, B. 1991. Study of the Definitions of Nosocomial Infections (SDNI). *Am J Infect Control*. **19**(6):259-267.
34. Levine, J. 1988. Actualización sobre Antibióticos, vancomicina. *Clin med nord Am*. 1201-1211.
35. Levy, S. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Ch*. **36**(4):695-703.
36. Levy S. 1997. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. En: Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. *Ciba Foundation Symposium*. **207**:1-14.
37. Levy, S. y Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med*. **10**(12):122-129.
38. Lodwin, E., Odenholt, I. y Cars, O. 1998. In vitro studies of Pharmacodynamic Properties of Vancomycin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Ch*. **42**(10):2739-2744.
39. Linden, P. 2008. Vancomycin resistance: are there better glycopeptides coming?. *Expert Rev Anti Infect Ther*. **6**(6):917-928.
40. Mamani, E., Luján, D. y Pajuelo, G. 2006. Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. *An Fac Med Lima*. **67**(2):120-124.

41. Mahamoud, A., Chevalier, J., Albert-Franco, s., Kern, W. y Pages, J. 2007. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J Antimicrob Chemoth.* **59**(6):1223-1229
42. Martínez, R. H., Anaya, G. V. y Gorbea, R. M. 2001. Infecciones nosocomiales en un servicio de pediatría de un hospital de tercer nivel, *Rev. Mex Ped.* **68**(2):56-65.
43. Martineau, F., Picard, F., Roy, P., Ouellette, M., y Bergeron, M. 1996. Species specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**(12):2888-2893.
44. Mathur, T., Shingal, S., Khan, S., Upadhyay, D., Fatma, T. y Rattan, A. 2005. Adverse effect of Staphylococci Slime on in vitro activity of glycopeptides. *Jpn J Infect Dis.* **58**(6):353-357.
45. Miller, J., Scott, I., Flynn, H., Jr, Smiddy, W., Newton, J. y Miller D. 2005. Acute-onset endophthalmitis after cataract surgery (2000-2004): incidence, clinical settings, and visual acuity outcomes after treatment. *Am J Ophthalmol.* **139**(6):983-977.
46. Moreno, G. y Ruíz, E. 2007. *Staphylococcus epidermidis* formador de biofilm en blefaroconjuntivitis. *Rev. Med Hosp Gen Mex.* **70**(1):24-29.
47. Nacional Comité for clinical Laboratory Standards Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing. Eight information supplement M100-S8 Wayne (PA): National Committee for Clinical Laboratory. 1998
48. Nayak, N., Nag, T., Satpathy, G. y Ray, S. 2007. Ultrastructural analysis of slime positive & slime negative *Staphylococcus epidermidis* isolates in infectious keratitis. *Indian J Med Res.* **125**(6):767-771.
49. Normark, B. y Normark, S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* **252**(2):91-106.

50. O'gara, J., Humphreys, H., 2001. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J. Med. Microbiol.* **50**(7):582-587.
51. Oin, Z., Yang, X., Yang, L., Jiang, J., Ou, Y., Molin, S. y Qu, D. 2007. Formation and properties of in vitro biofilms of ica-negatives *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *J Med Microbiol.* **56**(1):86-93.
52. Okajima, Y., Kobayakawa, S., Tsuji, A. y Tochikubo, T. 2006. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* on intraocular lens material. *IOVS.* **47**(7):2791-2795.
53. Palavecino, E. 2002. Métodos recomendados para el estudio de susceptibilidad en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulasa negativa y *Staphylococcus saprophyticus*: Nuevos puntos de corte e interpretación de resultados. *Rev Chil Infect.* **19**(2):119-124.
54. Pestova, E., Millichap, J., Noskin, G. y Peterson, L. 2000. Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemoth.* **45**: 583–590.
55. Piddock, L., Johnson, M., Ricci, V. y Hill, S. 1998. Activities of new fluoroquinolone-resistant pathogens of the lower respiratory tract. *Antimicrob Agents Ch.* **42**: 2956-2960.
56. Polonio, R., Mermel, L., Paquette, G. y Sperry, J. 2001. Eradication of biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) by a combination of sodium salicylate and vancomycin. *Antimicrob Agents Ch.* **45**(11):3262-3266.
57. Ponce, S., Rangel, F., Elias, L., Romero, O. y Huertas, J. 1999, Infecciones nosocomiales: tendencias seculares de un programa de control en México, *Salud pública Mèx.* **41**(1):5-11.

58. Rodríguez-Martínez, J., Ballesta, S., Garcia, I., Cornejo, M., y Pascual, A. 2007. Actividad y permeabilidad de linezolid y vancomicina en biocapas de *Staphylococcus epidermidis*. *Enferm infec micr cl.* **25**(7):425-428.
59. Rodríguez, W. M., Lopez, C. C., Arredondo, G. J., Gutierrez, C. P. y Sanchez, A. F., 2003, Morbilidad y mortalidad por sepsis neonatal en un hospital de tercer nivel de atención, *Salud Publica Mex.* **45**(2):90-95.
60. Sande, M., Mandell, G. 1982. Farmacodinámica: mecanismos de acción. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (Eds). Goodman Gilman A. y Goodman LS. Mc Graw Hill. Mexico, D.F. pp: 1062-1165.
61. Schneider, T. y Zeitz, M. 2004. Bakterielle Infektionen. En: *Die Infektiologie*. (Ed) Adam, D, y cols. Springer, Alemania. p.p. 913-1117.
62. Spengler, R. y Greenough, W. B. 1978. Hospital costs and mortality attributed to nosocomial bacteremias. *JAMA.* **240**(22):2455-2458.
63. Srinivasan, M. 1997. Epidemiology and aetiological diagnosis of corneal ulceration in Maduri, south India. *British Journal of Ophthalmology.* **81**(11):965-971.
64. Srinivasan, A., Dick, J. y Perl, T. 2002. Vancomycin Resistance in *Staphylococci*. *Clin Microbiol Rev.* **15**(3):430-438.
65. Stickler, D. 1999. Biofilms. *Curr Opin Ophthalmol.* **2**(3):270-275.
66. Surveill, S. 1984. Nosocomial Infection Surveillance, *MMWR CDC.* **35**(1):17.
67. Uttley, A., Collins, C., Naidoo, J. y George, R. 1988. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet.* **1**:57-58.
68. Van, F., Balz, E. y Tulkens, P. 2000. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol.* **60**(4):457-470.

69. Von, E., Peters, G. y Heilmann C. 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis.* **2**(11):285-301.
70. Wenzel, R. 1989. Expanding roles of hospital epidemiology: quality assurance. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **10**(6):255-256.
71. William, A. Petri. 2002. Antimicrobianos. *Las bases de farmacológicas de la terapéutica.* (ed) J.G. Hardman. L. E. Limbird. Mc Graw Hill. México. pp: 1279-1282.
72. Zhang, B., Luan, R., Liu, H., Zhang, Y., Li F., Tu, G. y Liao, J. 2006. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of coagulase-negative Staphylococci in Chengdu. *Journal of hygiene research.* **35**(6):775-780.
73. Zhiquiang, O., Xiaome, Y., Lei, Y., Jiang, J., Ou, Y., Molin, S. y Qu, D. 2007. Formation and properties of in vitro biofilms of *ica*-negative *Saphylococcus epidermidis* clinical isolates. *J Med Microbiol.* **56**(1):83-93.