



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN ECOLOGÍA APLICADA**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

**Aplicación de larvas de mosca *Lucilia sericata*,
como control biológico de *Staphylococcus aureus* en
úlceras de pie diabético**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
ECOLOGÍA APLICADA PRESENTA**

Wendy Jacquelin Cifuentes Garcia

Matrícula: 2162800331

COMITÉ TUTORAL

Dra. María del Carmen Vera Rosales Directora

Dra. María Teresa Núñez Cardona Co-Directora

Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez Asesor

El Jurado asignado por la Comisión Académica de la Maestría en Ecología Aplicada de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, aprobó la Idónea Comunicación de Resultados titulada:

Aplicación de larvas de mosca *Lucilia sericata*, como control biológico de *Staphylococcus aureus* en úlceras de pie diabético

Que presentó:

WENDY JACQUELIN CIFUENTES GARCIA

El día 24 de julio de 2018 en la Ciudad de México para obtener el Grado de

MAESTRA EN ECOLOGÍA APLICADA

JURADO DE EXAMEN

FIRMA

Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez (UAM – Xochimilco)

Presidente

Dra. Aida Hamdan Partida (UAM – Xochimilco)

Secretaria

Mtra. Raquel Huerta Huerta (UAM – Xochimilco)

Vocal

Dedicatoria

A mi padre por encauzar mi futuro. Sé que estas orgulloso de la persona en que me convertido.

A Nicolas por ser mi principal motivación.

Agradecimientos

A la Maestría en Ecología Aplicada de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Xochimilco por permitirme realizar el proyecto de investigación.

A mi comité tutorial por su apoyo y dedicación para desarrollar el proyecto de investigación. Dra. Carmen Vera le agradezco por su iniciativa y confianza. Dra. Tere Núñez, gracias por su disciplina y amabilidad. Dr. Jaime Bustos, gracias por su orientación y valioso tiempo dedicado.

A los pacientes por hacer posible el desarrollo del trabajo.

A mi amigo y compañero Erick Quezada por su apoyo y solidaridad en todo momento. Gracias a mis compañeros de laboratorio: Arturo Martínez, Luis Toledo y Guadalupe Cruz por hacer ameno el trabajo en el laboratorio.

A todo el equipo de trabajo del laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, en especial a la Dra. Aida Hamdan, Erika Gómez, Samuel García y Normita.

Al Mtro. Alfonso Esquivel y la Mtra. Ruth Soto por sus atenciones.

A Jesús Manuel por su amor, apoyo y comprensión.

A mi mamá Tanchys y mi hermana Ana Gabriel por ser parte de todos mis logros.

A Karina, que eres más que una prima para mí. Gracias por tu cariño y apoyo incondicional.

A la familia Rodríguez Cifuentes por todas sus atenciones, apoyo y cariño.

A Auri Garcia por su apoyo en la distancia.

A toda mi familia y amigos, gracias.

Índice

1. Prefacio	6
2. Diseñar un proceso sistemático para la reproducción masiva de larvas estériles de <i>Lucilia sericata</i> , en condiciones de laboratorio y su aplicación en pacientes vulnerables a amputación	8
3. Determinar la presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en úlceras de pie diabético antes y después del tratamiento con larvas de <i>Lucilia sericata</i>	53
4. Aislar e identificar molecularmente a cultivos bacterianos con características morfológicas y fisiológicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	100
5. Conclusiones generales	146
6. Transferencia de Tecnología	147
7. Producto de trabajo	165

Prefacio

Las úlceras infectadas de pie diabético son consideradas como una de las complicaciones comunes de hospitalización por diabetes mellitus que cobra más importancia al sector salud, ya que de no atenderse a tiempo conlleva a la amputación, lo que origina, entre otras, la incapacidad en el paciente y problemas intrafamiliares. El desarrollo de la infección en pie diabético se asocia a la presencia de bacterias Gram positivas, especialmente, *Staphylococcus aureus*, que ha creado resistencia a fármacos originando una mayor morbi-mortalidad en pacientes con dicho padecimiento; haciendo evidente en el paciente un grado de invalidez e impactando, inevitablemente, los sistemas de salud, de allí la necesidad de implementar alternativas terapéuticas redituables de tratamiento para las úlceras de pie diabético, que beneficien al paciente, sus familiares y a todo el contexto de recursos de salud en México.

Una alternativa para tratamiento de pie diabético es el uso de larvas de mosca como las de *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) que intervienen en la desbridación del tejido necrótico, desinfección de la úlcera (inducen la muerte de bacterias) y favorecen el desarrollo de tejido granular. Por lo anterior el objetivo general de esta investigación fue controlar la proliferación de *Staphylococcus aureus* en úlceras de pie diabético, utilizando larvas de *Lucilia sericata*.

Se aplicó terapia larval a cuatro pacientes mediante la firma de su consentimiento informado y se valoró la efectividad del mismo, posterior a las 48 o 72 horas de aplicación; después de este tiempo se observó la desaparición del tejido necrótico en todos los casos y por consiguiente la formación de tejido de granulación, así como también la disminución del mal olor y secreción purulenta.

Por otro lado, se colectaron muestras en úlceras antes y después de aplicar el tratamiento larval para el análisis bacteriológico; se obtuvieron 32 cultivos bacterianos a los cuales se les realizaron pruebas bioquímicas para su caracterización fisiológica y a partir de técnicas moleculares (secuenciación del gen 16S) se identificaron a las especies involucradas. Tan solo un cultivo de los aislados, resultó ser *Staphylococcus aureus* obtenido de la muestra de antes de aplicar el tratamiento con larvas, las demás especies bacterianas identificadas en

la úlceras de pie diabético fueron: *Staphylococcus* sp., *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* y *Enterococcus faecalis*. La terapia larval fue eficaz ante el desbridamiento de tejido necrótico y ante la formación de tejido de granulación. En cuanto al control del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, probablemente solo fue controlado en un paciente ya que *S. aureus* no estuvo presente en las úlceras de los pacientes estudiados.

Capítulo 1

Diseñar un proceso sistemático para la reproducción masiva de larvas estériles de *Lucilia sericata*, en condiciones de laboratorio y su aplicación en pacientes vulnerables a amputación.

Resumen

Las úlceras en pie diabético es una de las complicación de la diabetes mellitus que impacta negativamente la calidad de vida de los pacientes, así como también al sector salud en México debido al elevado costo para su atención y tratamiento. La presencia de tejido necrótico e infección complican el manejo y pronóstico de curación de la herida. La aplicación de larvas (terapia larval) en pie diabético se presenta como una alternativa de tratamiento que evita la cirugía, ya que actúa ante el desbridamiento de la lesión y controla el proceso infeccioso con la subsecuente aparición de tejido de granulación que contribuye a su óptima evolución. El objetivo de este estudio fue diseñar un proceso sistemático para reproducir larvas estériles de *Lucilia sericata*, en condiciones de laboratorio y su aplicación en pacientes con úlceras infectadas en pie diabético. Se reporta reproducción masiva de moscas de *Lucilia sericata* en condiciones de laboratorio, temperatura de entre 32-35°C, fotoperiodo de 12 horas luz y humedad al 50%. Su alimentación estuvo basada en formula láctea infantil, agua e hígado en tubos de PVC para su ovoposición. Las larvas estériles para aplicación en heridas se obtuvieron tras la desinfección con hipoclorito de sodio al 0,5%, formalina al 10% y solución salina; se comprobó su desinfección con cultivos negativos en agar sangre. Se intervino a cuatro pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y firmaron un consentimiento informado. Se aplicó entre 5-10 larvas por cm² de herida, esta fue cubierta por un apósito que sirvió para evitar la fuga de las larvas. Cada 24 horas se revisó la evolución de la herida y se hizo cambios de gasas y demás material de curación; la duración del tratamiento fluctuó entre 48 y 72 horas. Tras la primera aplicación de larvas, se observó la desbridación completa del tejido necrótico en todos los pacientes; el mal olor y la secreción purulenta también desapareció, a excepción de un caso que solo disminuyo; en todos los pacientes se observó la aparición de tejido de granulación. El tratamiento con larvas de *Lucilia sericata* fue eficaz para disminuir el tejido necrótico y útil para regenerar a los tejidos.

Abstract

Diabetic foot ulcers in one of the complications of diabetes mellitus that negatively impacts the quality of life in patients, as well as the health sector in Mexico due to the high cost for its care and treatment. The presence of necrotic tissue and infection complicate the management and prognosis of wound healing. The application of larvae (larval therapy) in diabetic foot is presented as an alternative treatment which avoids surgery, since it acts upon the debridement of the lesion and controls the infectious process with the subsequent appearance of granulation tissue that contributes to its optimal evolution. The objective of this study was to design a systematic process to reproduce sterile larvae of *Lucila Sericata* under laboratory conditions and its application in patients with infected ulcers in diabetic foot. Massive reproduction of *Lucila Sericata* flies is reported in laboratory conditions, temperature between 32-35 C, photoperiod of 12 light hours and 50% humidity. Their diet was based on infant milk formula, water and liver in PVC tubes for oviposition. Sterile larvae for wound applications were obtained after disinfection with 0.5% sodium hypochlorite, 10% formalin and saline solution; their disinfection was tested with negative cultures on blood Agar. Four patients were interviewed who met the inclusion criteria and signed an informed consent. It was applied between 5-10 larvae per cm² of wound, this was covered by a dressing which was useful to prevent larvae from leaking. The evolution of the wound was reviewed every 24 hours and gauze changes and other healing materials were made; the duration of the treatment fluctuated between 48 and 72 hours. After the first application of larvae, complete debridement of the necrotic tissue was observed in all patients; the bad smell and the purulent discharge also disappeared, except for a case that only decreased; the appearance of granulation tissue was observed in all patients. The treatment with larvae of *Lucila Sericata* was effective to diminish the necrotic tissue and useful to regenerate the tissues.

Introducción

Actualmente la diabetes mellitus es la primera causa de muerte en México y representa una afectación a más de 6.4 millones de personas adultas en el país (Escobedo et al., 2011; Barquera, 2016). Esta enfermedad crónica degenerativa de origen multifactorial representa un gran reto para el sistema nacional de salud, debido a sus altos costos para atención y tratamiento (Barquera, 2016).

El diagnóstico de la diabetes se determina por niveles sostenidos de glucosa en sangre mayores a 110 mg/dL, también conocido como hiperglicemia (American Diabetes Association, 2014); lo que, favorece la aparición de complicaciones que pueden devenir en la muerte prematura del individuo. Infarto al corazón, nefropatía, retinopatía, arteriopatía, neuropatía y pie diabético, son algunas de las comorbilidades asociadas a la diabetes (Hernández et al., 2013).

El pie diabético es una de las complicaciones que cobra más importancia al sector salud, ya que de no atenderse a tiempo conduce a la amputación de las extremidades inferiores, lo que origina, entre otras, la incapacidad en el paciente y problemas intrafamiliares. El cuadro clínico de este padecimiento comprende la existencia de arteriopatía, neuropatía e infección, que contribuyen a retrasar la óptima evolución de la herida (Castillo et al., 2014).

El tratamiento convencional empleado en las úlceras de pie diabético es el desbridamiento quirúrgico y la administración de antibióticos (Beltrán et al., 2001), sin embargo, de acuerdo con las cifras actuales de amputaciones publicado por el sistema nacional de salud, más de 75 mil en 2013 (Gutiérrez, 2014), demuestran que estos procedimientos son ineficaces para atender esta afección; por lo que es necesario implementar medidas alternativas de tratamiento.

Una alternativa antigua pero poco estudiada en México, es el uso terapéutico de larvas de mosca como las de *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) que interviene en la desbridación del tejido necrótico, desinfección de la úlcera (inducen la muerte de bacterias) y el desarrollo de tejido granular (Contreras et al., 2016).

Mediante la aplicación de larvas de *Lucilia sericata* para el tratamiento de úlceras en pie diabético, es posible contribuir a procedimientos convencionales,

disminuyendo costos y evitando amputaciones de miembros inferiores afectados. Con esto también se evitarán daños psicológicos personales e intrafamiliares y costos económicos sociales. Cabe señalar que esta terapia no tiene efectos secundarios, es inocua para la salud y debe ajustarse a los aspectos éticos, teniendo en mente, en todo momento, el cuidado y la integridad de los pacientes, la sociedad y el ambiente.

Una de las limitaciones de este procedimiento es la poca evidencia científica, sin embargo, el uso de larvas para sanar heridas necróticas, es una técnica que ya ha sido utilizada en otras naciones, por lo que es necesario formalizar esta práctica en el sector salud y científico en México, mediante evidencias funcionales.

Revisión bibliográfica

La diabetes mellitus se considera la epidemia del siglo XXI (Hernández et al., 2013), lo cual la convierte en un reto importante para el sector nacional de salud en México (Barquera, 2016). Esta es una enfermedad crónica degenerativa, representada por niveles sostenidos de glucosa en sangre por encima de 110 mg/dl (hiperglucemia), generalmente puede originarse a partir de la insuficiente producción de insulina por el páncreas o también por la incapacidad del cuerpo para introducir glucosa a la célula aún en presencia de insulina (American Diabetes Association, 2014), cabe señalar que esta es una hormona que transporta glucosa a la célula.

En su etapa inicial, la enfermedad no presenta sintomatología, por lo que su detección es tardía. Entre los síntomas característicos de la diabetes están el aumento en la excreción de orina (poliuria), del apetito (polifagia), de la sed (polidipsia), la pérdida de peso, entre otros (Almaguer et al., 2012; American Diabetes Association, 2014). El sostener la hiperglucemia, propicia el desarrollo de complicaciones propias de la diabetes, como: infarto del corazón, retinopatía, nefropatía, neuropatía, enfermedad vascular periférica, pie diabético y, en situaciones graves, muerte prematura (Hernández et al., 2013).

Los datos epidemiológicos muestran que la diabetes crece continuamente a pesar de las iniciativas de las autoridades sanitarias de países de todo el mundo y de organizaciones, como: la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y la Federación Internacional de Diabetes (FID) (Mora, 2014).

En América Latina, México es el país en donde la diabetes aumenta (Moreno, 2001), y actualmente este padecimiento es la primer causa de muerte (Secretaría de Salud, 2016).

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012, señala que en México, 6.4 millones de personas son diabéticas, un 9.2% de los adultos del total de la población. La proporción se presenta en la región norte y centro del país; generalmente son personas de entre 50 y más de 70 años de edad las afectadas y de estas la mayoría son mujeres.

El impacto económico al sector salud se evidencia al comparar los costos estimados para la atención de la diabetes mellitus y sus complicaciones, y el monto asignado al Seguro Popular, que fue de 3872 millones de dólares y 3790 millones de dólares, respectivamente (ENSANUT, 2012).

El pie diabético es considerado como una de las complicaciones más importante de la diabetes mellitus, tan solo en el 2013 fueron registradas 75 mil amputaciones en todo el sistema nacional de salud (Gutiérrez, 2014), impactando económicamente al sector salud de México (Rivero, 2006) debido a largos periodos de hospitalización, altos costos para su prevención y tratamiento, que puede ser de hasta 300 mil pesos ya que no solo requiere cirugía, sino además implica participación multidisciplinaria de los profesionales en salud (Brena, 2013) y finalmente los costos sociales, originados por la incapacidad laboral de los pacientes, entre otras situaciones que afectan la calidad de vida de estos y sus familiares (Barraza et al., 2015).

La fisiopatología del pie diabético comprende la existencia de neuropatía, esta complicación puede afectar los nervios de todo el cuerpo, presentando síntomas como dolor, hormigueo o adormecimiento en manos, brazos, piernas y pies (Beltrán et al., 2001).

Otro factor de importancia en la aparición de úlceras en pie diabético es la arteriopatía o también conocida como enfermedad vascular periférica (EVP) la cual origina complicaciones micro o macrovasculares, causadas por depósitos de grasas que estrechan o bloquean los vasos sanguíneos (pequeño o mediano calibre) que son los encargados de irrigar las piernas y pies (ADA, 2014).

La arterioesclerosis puede permanecer asintomática o bien producir daño tisular y necrosis; hasta llegar a la pérdida del miembro. Por otro lado en el diagnóstico del pie diabético, la arteriopatía se presenta con claudicación intermitente, pie frío, dolor en reposo (por bloqueo arterial e isquemia de los nervios y neuritis), pulsos ausentes, retardo en el vaciamiento venoso al elevar la extremidad, atrofia de grasa subcutánea, piel adelgazada y seca, pérdida de vellos del pie y pierna, uñas quebradizas y gangrena-necrosis en botón, probable oclusión progresiva o aguda por trombosis (Raz et al. 2004).

Un factor agravante en las úlceras de pie diabético es la infección, responsable del retraso en el proceso de cicatrización de heridas que conlleva al incremento de los costos en servicios y atención sanitarias (Beltrán et al., 2001).

Se define a la infección como la invasión y proliferación desmesurada de microorganismos que generan daño a la persona afectada aun como la respuesta de las defensas del organismo y generalmente está relacionada con un proceso inflamatorio (Hernández, 2014). Los signos de la infección son presencia de tejido necrótico y supuración, agregándose también al menos dos de los signos inflamatorios como: eritema, induración, dolor, sensibilidad y calor (Martínez et al., 2012). Entre los factores de riesgo para desarrollar infección en los pacientes diabéticos está el mal control metabólico, deficiente funcionamiento de los sistemas nervioso (pérdida de la barrera cutánea), vascular (produce hipoxia celular) e inmune (defectos en la función leucocitaria, quimiotaxis y capacidad fagocítica) y daño del tejido (Vargas. 2014). Se estima que un 50% de las úlceras en pie diabético desarrollarán infección, y una de cada cinco derivará en amputación del miembro (Lavery et al., 2003). Dato importante es que a mayor edad se incrementa el riesgo de amputación y en personas de más de 65 años el riesgo es de siete veces mayor que en los de 45 años (Tapia et al., 2015).

Según su etiopatogenia las úlceras del pie diabético pueden clasificarse en: neuropáticas y neuro-isquémicas. Las primeras generalmente se manifiestan en un punto de presión o deformidad del pie (primer y quinto metatarsiano, y calcáneo en su extremo posterior), son de forma redondeadas y presentan callosidad periulcerosa, su perfusión sanguínea es buena y los pulsos tibiales están presentes. En las neuro-isquémicas hay necrosis seca y su localización es latero-digital, no hay pulsos tibiales y existe neuropatía asociada.

Las pruebas diagnósticas que usan para identificar un pie en riesgo son: la sintomatología del paciente, exploración física, test del monofilamento de Semmes-Weinstein, palpación de pulsos arteriales pedial y tibial posterior y el índice de tobillo-brazo. Determinar la localización y el grado de afección de las úlceras en el pie diabético contribuye a tener éxito en el Mucoutratamiento y con ello evitar la amputación del miembro afectado (Hernández, 2014).

Las heridas del pie diabético presentan cuatro fases de curación, la primera es la hemostasis, en la cual en un individuo sano se presenta de manera inmediata y está dada por las plaquetas que se encargan de la coagulación y cierre de los vasos rotos; la segunda etapa es la inflamación que puede tener un periodo de duración entre uno y cuatro días, en esta etapa intervienen los neutrófilos y los macrófagos, a través de la fagocitosis; la tercera etapa es la granulación y contracción del tejido, tiene una duración aproximada de entre 4-21 días, es tarea específica de los macrófagos, linfocitos, angiocitos, neurocitos, fibroblastos y keratinocitos, que restablecen la continuidad y función del tejido; finalmente se presenta la remodelación, que se inicia a partir del 21 día y puede durar hasta 2 años, los encargados de esta parte final son los fibrocitos (Ríos et al., 2013).

En una persona sana, las heridas suelen sanar en un periodo de tres semanas con una secuencia ordenada, cuando esto sucede, la herida es considerada aguda; contrariamente una herida que no sigue los patrones normales de cicatrización se considera herida crónica, como lo son las úlceras infectadas en pie diabético (Beltrán et al., 2001).

La importancia del proceso de cicatrización en heridas crónicas, es vital en la secuencia de curación, y en esta se presentan dos fases, la cicatrización y epitelización. Partiendo de lo que es la cicatrización, se define como el desarrollo del nuevo tejido conectivo y vascular, que a su vez consta de cuatro fases: la inflamatoria, destructiva, proliferativa y de maduración.

En la fase inflamatoria ocurre la homeostasia, favoreciéndose la coagulación, son fundamentales las plaquetas ya que estimulan factores de crecimiento. En la fase destructiva se produce una respuesta vascular, aumentando la vasodilatación y la permeabilidad que generan una matriz extracelular. Ya en la etapa proliferativa, se forma nuevo tejido de granulación a partir de la síntesis de colágeno, y por último, en la fase de maduración se reorganiza el colágeno, dando como resultado el cierre de la herida. Este tipo de heridas, comúnmente se estaciona en la etapa inflamatoria (Ríos et al., 2013; Beltrán et al., 2001), la cual no es regulada y produce un exceso de neutrófilos, monocitos y macrófagos así como grandes concentraciones de sustancias pro-inflamatorias, como las citosinas, proteasas y

especies reactivas de oxígeno (ROS siglas en ingles), dando como resultado la inactivación de factores de crecimiento y destrucción tisular. La presencia de tejido necrótico y bacterias en la herida induce también a que persista la inflamación (Nigam et al., 2006).

El manejo de la úlcera dependerá de la etiología, las características morfológicas y la forma en que estas se presenten. El tratamiento debe ser integral y enfocarse a prevenir o retrasar el desarrollo de la enfermedad y con esto, evitar el devenir en la amputación de la extremidad afectada (Beltrán et al., 2001).

El tratamiento convencional orientado al proceso infeccioso de las ulceraciones, comprende el uso de antibióticos y el desbridamiento quirúrgico profundo del tejido muerto. Cuando la infección es superficial basta con la limpieza local y desbridación mecánica; pero si la infección es severa, y presenta abscesos profundos, gangrena o fascitis necrotizante será necesario desbridar quirúrgicamente (Beltrán et al., 2001).

Tras lo mencionado anteriormente, surge la necesidad de emplear nuevas medidas para el tratamiento del pie diabético, ya que las cifras de amputaciones actuales son alarmantes (más de 75 mil realizadas en el 2013) y nos reflejan que el manejo no está siendo efectivo para controlar esta afección.

Existe evidencia científica acerca de los beneficios de la terapia larval en ulceraciones de pie diabético, donde resaltan la capacidad de estos organismos para contrarrestar la proliferación de bacterias (Frausto y Trejo, 2009) y es, por mucho, una opción redituablemente económica ante la estimación del costo del tratamiento convencional, que puede ser de hasta \$300,000.00 pesos (Castillo, 2013).

La terapia larval ha sido aplicada para tratar lesiones de piel y tejidos blandos. La especie mayormente utilizada es *Lucilia sericata* y el procedimiento consiste en aplicar larvas estériles de la mosca en heridas infectadas o con carga de tejido necrótico (Telléz et al., 2012). Uno de los beneficios de este tratamiento natural es que su reproducción puede llevarse a cabo en cualquier medio acondicionado, a un bajo costo y a corto plazo. Los efectos adversos para su aplicación es que a menudo incluye malestar leve en la herida y migración de larvas de la lesión

(Sherman et al., 2001). Este tratamiento presenta una tasa de éxito que oscila alrededor de 68% en lesiones que no responden a tratamientos convencionales (Ríos et al., 2013) y supone una alternativa viable a los procedimientos quirúrgicos en las úlceras infectadas.

La utilización de larvas para el tratamiento de heridas hace referencia en el libro del Antiguo Testamento de la biblia. Así mismo se documentaron experiencias de su aplicación en culturas Australianas y Mayas, quienes utilizaban telas que empapaban de sangre y las exponían al sol con la finalidad de que las moscas depositaran sus huevos y posteriormente las aplicaban en las heridas (Ríos et al., 2013).

La reaparición de la terapia larval refiere al año 1799 tras los sucesos de la guerra napoleónica, en la cual, el Barón D. J. Larrey observó que soldados con infestaciones de larvas en sus heridas tenían un mejor pronóstico de recuperación que aquellos que no (Gutierrez y Trejo, 2009). La primera experiencia documentada se le atribuye a William Baer, en 1928 (Figueroa y Uherek, 2006), quien después de la primera guerra mundial utilizó los beneficios de esta técnica con gran éxito. La terapia larval fue empleada en más de 300 hospitales estadounidenses durante 1930 y 1940 como proceso terapéutico de las heridas (Ríos et al., 2013); sin embargo, a finales de 1940, la técnica pierde su auge por la aparición de antibióticos, un ejemplo, la penicilina y avances en las técnicas quirúrgicas de desbridamiento y asepsia de heridas.

La terapia larval es retomada en 1980 por el médico Ronald Sherman en Estados Unidos y los doctores S. Thomas y J. Church en el Reino Unido, quienes con ayuda de biólogos la utilizaron con gran éxito para el tratamiento de heridas de diferente origen, úlceras por presión y diabéticas, quemaduras y heridas necrosadas (Marcondes, 2006; Arrivillaga et al., 2008; Rey et al., 2010; Calderón et al., 2014; Rodríguez y González, 2016); además de heridas infectadas por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Streptococcus* spp (Arrivillaga et al., 2008).

Un acontecimiento importante en el 2004 fue la aprobación del uso de terapia larval para el tratamiento de heridas por la FDA (Administración de Medicamentos

y Alimentos de Estados Unidos) (Ríos et al., 2013). Actualmente es usada en países como Estados Unidos, Canada, Reino Unido, Inglaterra, Israel, Australia, Alemania, Holanda, Suiza, Bélgica, Ucrania, Tailandia, Colombia, Chile, Perú, Argentina, Venezuela y México (Figueroa y Uherek, 2006; Marcondes, 2006; Echeverry et al., 2009; Ballester et al., 2016).

Se considera a la terapia larval como una miasis inducida artificialmente y controlada, de aquí la importancia de utilizar especies necrófagas (Ballester et al., 2016).

Moscas de la familia *Calliphoridae*, *Muscidae*, *Oestridae* y *Sarcophagidae* han sido utilizadas en el desbridamiento de heridas, siendo *Lucilia sericata* la comúnmente empleada en la clínica (Wolff et al., 2010; Piña et al., 2016; Ballester et al., 2016). Recientemente se ha propuesto el uso de *Lucilia eximia* en diversas lesiones dérmicas, obteniendo mayor eficacia en comparación con *Lucilia sericata*, sin embargo, supone una nueva alternativa en larvaterapia (Retana et al., 2014; Calderón et al., 2014).

Entre las especies perjudiciales para la salud de los humanos y animales domésticos se encuentran las especies *Musca domestica*, *Cochliomyia hominivorax* y *Dermatobia hominis* (Marcondes, 2006; Piña et al., 2016).

Lucilia sericata, también conocida como *Phaenicia sericata*, es un díptero de la familia *Calliphoridae* y comúnmente conocida como mosca verde (por su coloración verde metálico en tórax y abdomen) o panteonera (Echeverry et al., 2009; Pinilla et al., 2010). Esta especie es de gran importancia ecológica pues participa en la descomposición de cadáveres y en la medicina forense aporta información del intervalo post-mortem (Echeverry et al., 2009; Acuña et al., 2011; Galindo, 2013).

Se encuentra con mayor frecuencia en verano (Desposorio et al., 2015), su ciclo de vida puede ser de tres semanas a dos meses, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad en el ambiente (Fraustro y Trejo, 2009), en condiciones de laboratorio este cambia de 29 a 34 días aproximadamente (Galindo, 2013). Su desarrollo se presenta en cuatro estadios (figura 1): huevo, larva (que consta de tres instares), pupa e imago (Gentil y Smirnova, 2009).

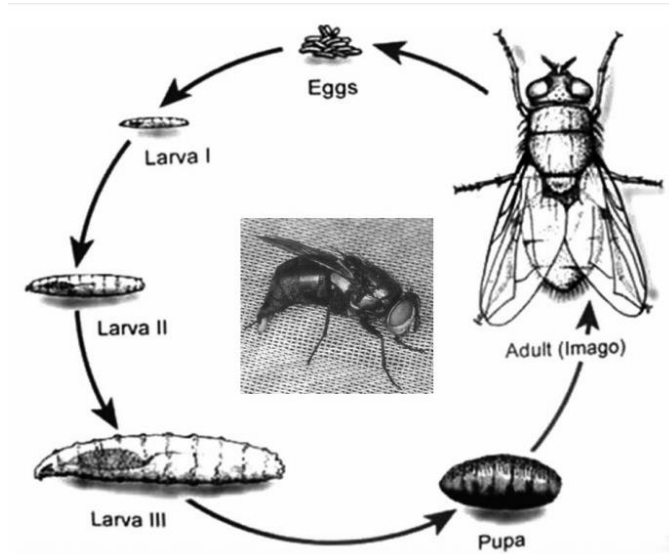


Figura 1. Ciclo biológico de *Lucilia sericata* (Gentil y Smirnova, 2009).

Los huevos de la especie son de color crema y miden aproximadamente 2mm de longitud, posterior a las 18 o 24 horas que emergen se inicia el primer instar larval (Ballester et al., 2016) y continúan su desarrollo hasta larva III en un lapso no mayor a seis días; posteriormente la larva se convierte en pupa desde donde emerge como imago, todo lo anterior varía según las condiciones medioambientales (Sánchez et al., 2004).

Este díptero es de tamaño mediano y su principal característica es la coloración verde metálico en su tórax y abdomen (Figuroa et al., 2007; Ríos et al., 2013).

En su hábitat natural la hembra adulta deposita, aproximadamente entre mil y tres mil huevos a lo largo de unas cuatro semanas, de los cuales muy pocos embriones prosperan hasta la adultez, siendo la mayor fecundidad de la hembra entre la segunda y cuarta semanas de vida (Figuroa et al., 2007). Es interesante observar que la deposición de huevos, se lleva a cabo hasta que otras hembras alcancen el mismo punto de ciclo reproductivo, debido a que al aumentar la cantidad de larvas, aumenta la posibilidad de supervivencia. La principal función de las larvas es alimentarse mientras que la de la mosca adulta es la propagación (Ríos et al., 2013).

Para la utilización de estos organismos en procesos terapéuticos, se necesita desarrollar un método sistematizado de reproducción en laboratorio (Piña et al., 2016); las larvas pueden utilizarse después de las primeras ocho horas de eclosión o pueden refrigerarse a temperaturas de entre 8 y 10 °C (Desposorio et al., 2015). Los estudios realizados acerca de la crianza y reproducción de mosca *Lucilia sericata* recalcan la importancia de conocer previamente el ciclo biológico de la especie, su alimentación y necesidades de temperatura y humedad. El proceso da inicio con la captura del insecto, seguido de su caracterización taxonómica; una vez identificada la especie se continúa con la crianza en condiciones de laboratorio. Para la producción de larvas de *Lucilia sericata* en condiciones de laboratorio, estas son alimentadas con leche en polvo y azúcar granulada. Un vaso de agua invertido con papel absorbente provee de agua y trozos de hígado son colocados en tubos de PVC para que ovopositen sus huevos; posteriormente estos son desinfectados mediante el uso de sustancias como: hipoclorito de sodio al 5%, formalina al 10% y suero fisiológico estéril. La esterilidad de los huevos se comprueba tras su siembra en agar sangre, el cual debe estar libre de contaminantes después de 24 horas de incubación a 37°C, Figueroa et al., 2007.

El proceso terapéutico consiste en aplicar larvas de mosca *Lucilia sericata* o de alguna otra especie previamente esterilizadas sobre heridas crónicas, con la finalidad de restaurar el tejido desvitalizado (Sánchez et al., 2004; Pérez y Añel, 2009; Blasco et al., 2014; Ballester et al., 2016); generalmente el número de larvas debe ser entre 5 a 10 por centímetro cuadrado de la herida y su duración debe fluctuar entre 48 o 72 horas o dependiendo del crecimiento de las larvas (Romero, 2011; Ríos et al., 2013).

El efecto de la larvaterapia es primeramente la remoción de tejido necrótico en la herida, seguido de la muerte bacteriana y finalmente la regeneración de tejido de granulación (Figueroa y Uherek, 2006; Acuña et al., 2011; Romero, 2011; Calderón et al., 2014).

El desbridamiento o remoción de tejido no viable se realiza por acción mecánica de las larvas, es decir, se alimentan del tejido necrótico (muerto) que se encuentra

en la superficie de las úlceras; una vez consumido ese material, estas secretan enzimas proteolíticas, que incluye: carboxipeptidasas A y B, leucina aminopeptidasa, colagenasas, quimiotripsina, metaloproteasas y serin proteasas, las cuales propician la degradación de la matriz extracelular favoreciendo la oxigenación de la herida (Calderón et al., 2014).

Se dice que las secreciones larvales tienen gran efecto bactericida y bacteriostático en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y bacterias anaerobias, con efecto menor ante las Gram negativas, como: *Pseudomonas aureginosa* o *Proteus* spp. (Frausto y Trejo, 2009; Calderón et al., 2014). La producción de sustancias antibióticas como: ácido fenilacético y fenilacetaldehído por *Proteus mirabilis* (comensal dentro del intestino de las larvas), contribuyen también a la desinfección (Jiménez et al., 2013; Ballester et al., 2016).

Otra sustancia con propiedades antimicrobianas es la lucifensina, que además de estar presente en las secreciones de larvas, se puede encontrar en las glándulas salivales, grasa corporal y la hemolinfa de estas. Se ha propuesto que la acción desinfectante de las larvas se da por procesos como: la ingestión de bacterias presentes en la herida, la irrigación de sustancias sobre la afección y por lo consiguiente, estas actúan con propiedades bactericidas. Aparentemente las secreciones antimicrobianas larvales son producidas por el sistema inmune de la misma, y lo utilizan como mecanismo de defensa en ambientes contaminados (Ríos et al., 2013). Dato importante es que el amoniaco generado tras el mecanismo de las larvas modifica el pH del medio, evitando la proliferación bacteriana; entre otros compuestos alcalinizantes como alantoína, urea y bicarbonato de amonio (Gentil y Smirnova, 2009; Calderón et al., 2014).

Tras la remoción de tejido muerto y desinfección, la herida pasa a una fase proliferativa en la que se inicia la regeneración de tejido sano, esto se debe a que promueve la motilidad de los fibroblastos, acelera la remodelación de la matriz extracelular y coordina las respuestas celulares con actividad promotora de crecimiento (Ríos et al., 2013; Calderón et al., 2014).

Los beneficios de la terapia larval en las heridas son un rápido desbridamiento del material necrótico, la desaparición del mal olor posterior a las primeras 24 horas después de la primera aplicación (Figuroa y Uherek, 2006), el acelerado crecimiento de tejido de granulación y la remoción con facilidad de agentes patógenos infecciosos; además de ser una práctica ambulatoria, sin embargo, a pesar de sus bondades el proceso terapéutico es rechazado por algunos pacientes debido a prejuicios estéticos.

Las contraindicaciones de uso de la terapia larval son dolor y fiebre (Jiménez et al., 2013). Por tal motivo es necesario informar claramente a los pacientes acerca de la técnica, tanto de sus beneficios como de las contraindicaciones de su aplicación.

Objetivo

Diseñar un proceso sistemático para la reproducción masiva de larvas estériles de *Lucilia sericata*, en condiciones de laboratorio y su aplicación en pacientes vulnerables a amputación

Material y métodos

Se diseñó un proceso sistematizado para criar y reproducir larvas de *Lucilia sericata* estériles. Inició con el proceso de captura y especiación de las moscas de *L. sericata*, estas fueron capturadas en el ambiente del canal de Cuemanco (ubicado entre Calzada del Hueso y Periférico), con el uso de trampas especializadas. Una vez capturadas se transportaron al laboratorio G-008 de la UAM-X en donde fueron colocadas dentro de una jaula.

Caracterización y ciclo biológico de Lucilia sericata

La caracterización de *Lucilia sericata* se realizó en ocho moscas adultas, para lo cual fueron utilizadas claves de Zapata y Rodríguez (2014) y Figueroa et al. (2007). Para ello se utilizó un microscopio óptico, cera y alfileres entomológicos. La determinación del tiempo de duración de los estadios, del ciclo de desarrollo y las medidas morfométricas del huevo, larva, pupa e imago de *Lucilia sericata*, fue tras la utilización de tres ejemplares por cada instar; para este fin se efectuó el monitoreo diario entre las 10:00 y 11:00 horas del día.

Crianza de moscas Lucilia sericata

Para la crianza de moscas de *L. sericata* se utilizó la técnica propuesta por Figueroa et al. (2007), que considera condiciones óptimas de temperatura (25-30 °C), luz (fotoperiodo 12 horas) y humedad. La preparación de jaulas, consistió en un rectángulo de policarbonato el cual contó con un pequeño orificio cubierto con malla para evitar la fuga, y dimensiones de 90.5 cm x 42.5 cm x 27 cm. Esta fue equipada con un termómetro de mercurio y una lámpara externa de 100 watts. Para alimentar a las moscas se utilizó azúcar y formula láctea infantil (10-20g en total), que se colocó en un recipiente plano.

El abastecimiento de agua se logró con un mini-tanque con liberación lenta de líquido sobre un papel filtro. Para la ovoposición se colocaron trozos de hígado dentro de un tubo de PVC oscuro (10 cm de largo por dos cm de radio). El reemplazo de alimento, agua e hígado fue cada día, de igual manera la limpieza de la jaula. Para la limpieza de esta, fue necesaria una franela de algodón impregnada con hipoclorito de sodio al 10%. Los huevos depositados en el

contenedor de ovoposición fueron removidos y utilizados para la reproducción de moscas o bien para iniciar el tratamiento larval.

Reproducción de moscas *Lucilia sericata*

Para la reproducción de moscas, los huevos fueron incubados en un contenedor de vidrio con capacidad de tres kg conteniendo aserrín estéril, un pedazo de esponja humedecida e hígado fresco. En un lapso no mayor a siete días los huevos, después de este tiempo pasan al estadio de pupa y posteriormente a imago.

Esterilización de huevos de mosca *Lucilia sericata*

Para obtener larvas estériles utilizadas en la terapia larval, los huevos se sometieron a tres sustancias: hipoclorito de sodio al 0.5%, formalina al 10% y suero fisiológico. Cada sustancia se aplicó durante tres minutos de manera aislada bajo condiciones asépticas. Una vez que los huevos fueron esterilizados se secaron con gasas estériles y posteriormente fueron sembrados en agar gelosa sangre al 5% mediante técnicas y consideraciones microbiológicas. Después de transcurrir 24 horas los huevos pasaron a estadio larval uno y estuvieron listos para ser utilizados en procesos terapéuticos.

Previo a la aplicación de larvas estériles en las úlceras infectadas se obtuvo la firma del consentimiento informado de cada paciente (anexo 2A), así como la recolección de información para la historia clínica (anexo 2B), la cual, comprendió una descripción de la enfermedad del paciente, valoración del estado nutricional, de las alteraciones neurológicas y vasculares, y de infección. Esto se hizo con la finalidad de determinar el grado de afección en el pie y su riesgo de amputación.

Aplicación de larvas estériles de mosca *Lucilia sericata*

Para la aplicación de la terapia larval se verificó que la caja de agar sangre que contenía las larvas estériles en estadio uno estuviera completamente sellada. Posteriormente se colocó un apósito-jaula de acuerdo con la técnica de Figueroa et al. (2007), la cual es más frecuentemente utilizada por su simplicidad, disponibilidad y bajo costo en las guías de práctica clínica.

El número de larvas utilizadas fue de acuerdo con el tamaño y profundidad de la herida en cada paciente, esto es, de cinco a 10 larvas estériles por cm². Seguido,

el apósito se selló con dobles gasas estériles y se vendó ligeramente para evitar que las larvas murieran por falta de oxígeno o se fugaran de la herida.

La evolución de la úlcera y el crecimiento de las larvas se revisaron cada 24 horas (formato de registro anexo 2C).

El tratamiento se retiró cuando las larvas alcanzaron el estadio tres o cuando el paciente refiriera dolor exhaustivo.

Para completar el tratamiento, la úlcera se limpió mediante arrastre mecánico y se vendó para evitar contaminación.

Las larvas utilizadas fueron incineradas junto con el material de curación que se empleó.

Resultados

Se capturaron entre 19 y 20 moscas en el canal de Cuemanco. Posteriormente y de acuerdo con las claves dicotómicas para la identificación de *Lucilia sericata*, se obtuvieron los principales criterios para la determinación de la mosca adulta, figuras de la 1 a la 7:



Figura 1. Tórax y abdomen brillantes color verde metálico.



Figura 2. Protorax con setas acrosticales presuturales y metatórax con la presencia de tres setas acrosticales.

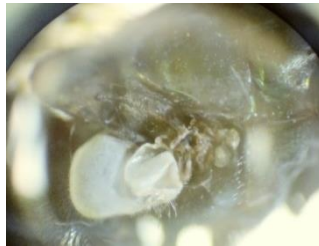


Figura 3. Mesopleura con ampolla ovoide y caliptras claras.



Figura 4. Alas color humo.

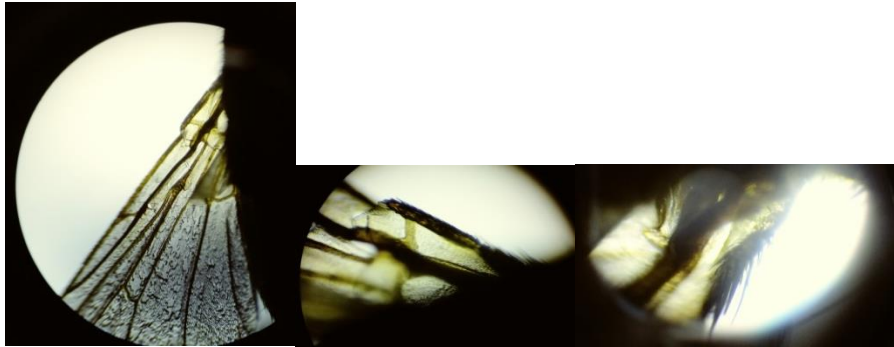


Figura 5. Vena radial R dorsalmente desnuda.

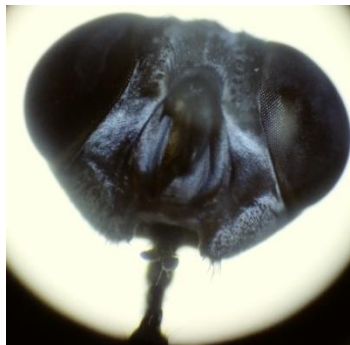


Figura 6. Área parafacial desnuda y palpos maxilares (naranja o amarillo).

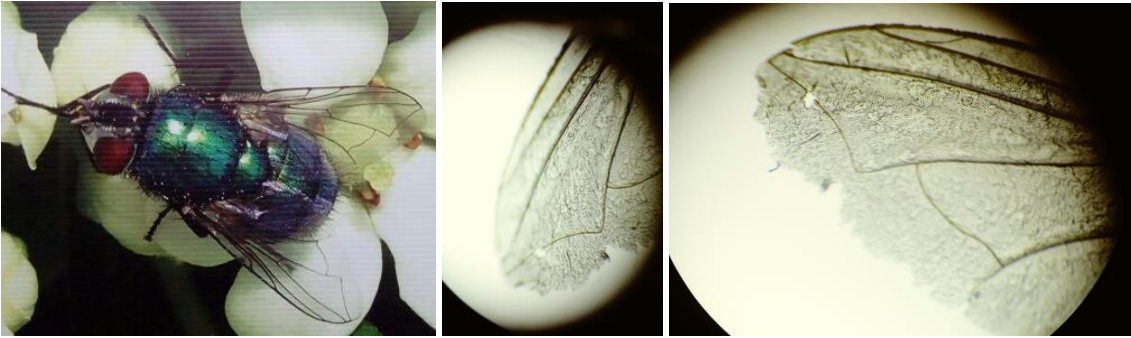


Figura 7. Ala con curvatura angulosa de la vena M.

En cuanto al desarrollo del ciclo biológico, se definieron los cuatro estadíos de *Lucilia sericata* (figura 1). El tiempo total de desarrollo fue de 312 horas; el periodo de incubación fue de 24 horas, el del estadio larval fue de 144 horas (larva 1 y larva 2 de 24 horas cada estadio, larva 3 de 96) y la pupa tardó 144 horas hasta convertirse en imago. El crecimiento en longitud de cada instar fue de, huevo 1.2 mm, las larvas en instars 1 de 2 mm con 9 segmentos, las larvas 2 de 6 mm con 12 segmentos y las larvas 3 de 9 mm con 12 segmentos; la pupa obtuvo un promedio de 7mm.

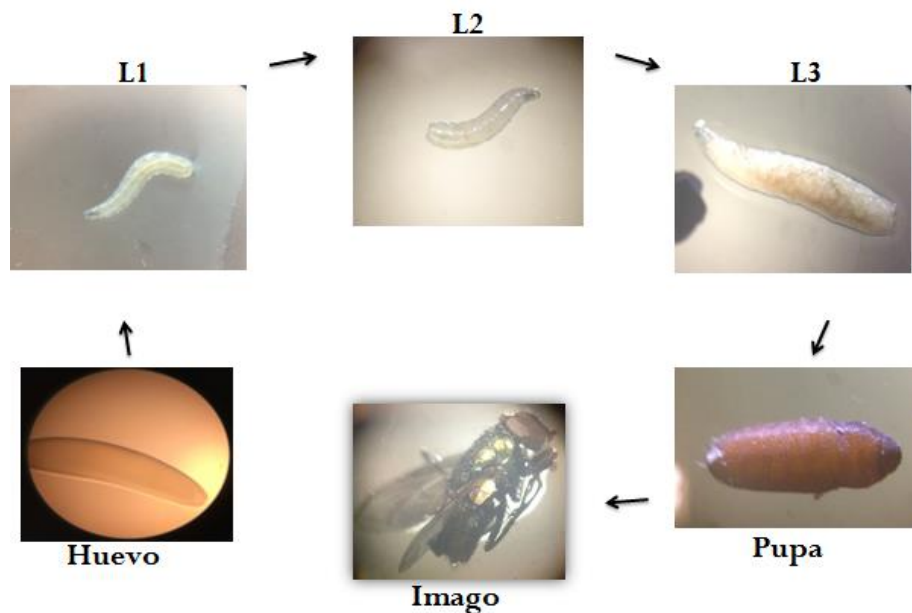


Figura 8. Ciclo biológico de *Lucilia sericata* (fuente personal).

La descripción de los datos obtenidos en la historia clínica de cada paciente se muestra a continuación (tabla 1):

- Paciente 1: género femenino de 50 años de edad, diagnosticada con diabetes tipo dos de 10 años de evolución, presenta úlcera en pie con longitud de cinco cm de largo y dos cm de ancho, aproximadamente hace un año de aparición. Su herida se clasifica como úlcera profunda grado dos de acuerdo a la clasificación de Meggit-Wagner y la paciente refiere no haber tenido hospitalización previa a su participación en el protocolo de investigación. Tras la valoración neuropática y vascular de la paciente, ambos sistemas no se ven alterados, no lleva un control metabólico y maneja un valor de glucosa en sangre mayor a 230 mg/dL.
- Paciente 2: género masculino de 70 años de edad, diagnosticado con diabetes tipo dos de cinco años de evolución, presenta úlcera en pie con longitud total de la circunferencia del tobillo de aproximadamente 18 cm de largo, tiempo de aparición de hace 9 años. Su herida se clasifica como úlcera profunda grado dos de acuerdo a la clasificación de Meggit-Wagner y el paciente refiere no haber tenido hospitalización previa a su participación en el protocolo de investigación. Tras la valoración neuropática, el paciente presenta alteración de sensibilidad profunda y un ligero grado de isquemia. No lleva un control metabólico, realiza ejercicio y maneja un valor de glucosa en sangre mayor a 170 mg/dL.
- Paciente 3: género masculino de 51 años de edad, diagnosticado con diabetes tipo dos de cinco años de evolución, presenta úlcera en pie con longitud total de la circunferencia del tobillo de aproximadamente 15 cm de largo, tiempo de aparición de 11 años. Su herida se clasifica como úlcera profunda grado dos de acuerdo a la clasificación de Meggit-Wagner y el paciente refiere no haber tenido hospitalización previa a su participación en el protocolo de investigación. No se ve alterado neuropáticamente y presenta un ligero grado de isquemia. No lleva un control metabólico y sus valores de glucosa en sangre en ayuno son mayor a 150 mg/dL.

- Paciente 4: género masculino de 60 años de edad, diagnosticado con diabetes tipo dos de 16 años de evolución, presenta úlcera en pie con longitud total de 12 cm de largo y 20 cm de ancho. Presenta ligera alteración neuropática y vascular, no lleva un control metabólico y sus valores de glucosa en sangre son mayor a 170 mg/dL.

Tabla 1. Datos recabados en la historia clínica de cada paciente.

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
Edad (años)	50	70	51	60
Género	Femenino	Masculino	Masculino	Masculino
Tipo de diabetes y tiempo de evolución	T2-10 años	T2- 5 años	T2-5 años	T2-16 años
Tiempo de aparición de úlcera	1 año	9 años	11 años	1 año
Clasificación de úlcera (Meggit-Wagner)	II	II	II	II
Tamaño de úlcera	5cm de largo y 2 cm de ancho	Circunferencia del tobillo, aprox. 18 cm de largo y 45 cm de ancho	Circunferencia del tobillo, aprox. 15 cm de largo y 29 cm de ancho	Circunferencia del pie aprox. 17 cm de largo y 20 cm de ancho
Hospitalización previa	No	No	No	No
Sensibilidad superficial	+	+	+	+
Sensibilidad profunda	+	-	+	-
Isquemia	-	+	+	+
Control metabólico	No	No	No	No
Realización de ejercicio	No	Si	No	No
Nivel de glucosa en sangre (ayuno)	>230mg/Dl	>170mg/dL	>150mg/dL	>170mg/dL

Las larvas se retiraron después de 48 a 72 horas. En este tiempo las heridas quedaron desbridadas, sin o con disminución del mal olor y secreción purulenta. En todos los casos se observó la aparición de tejido de granulación (figura 9).

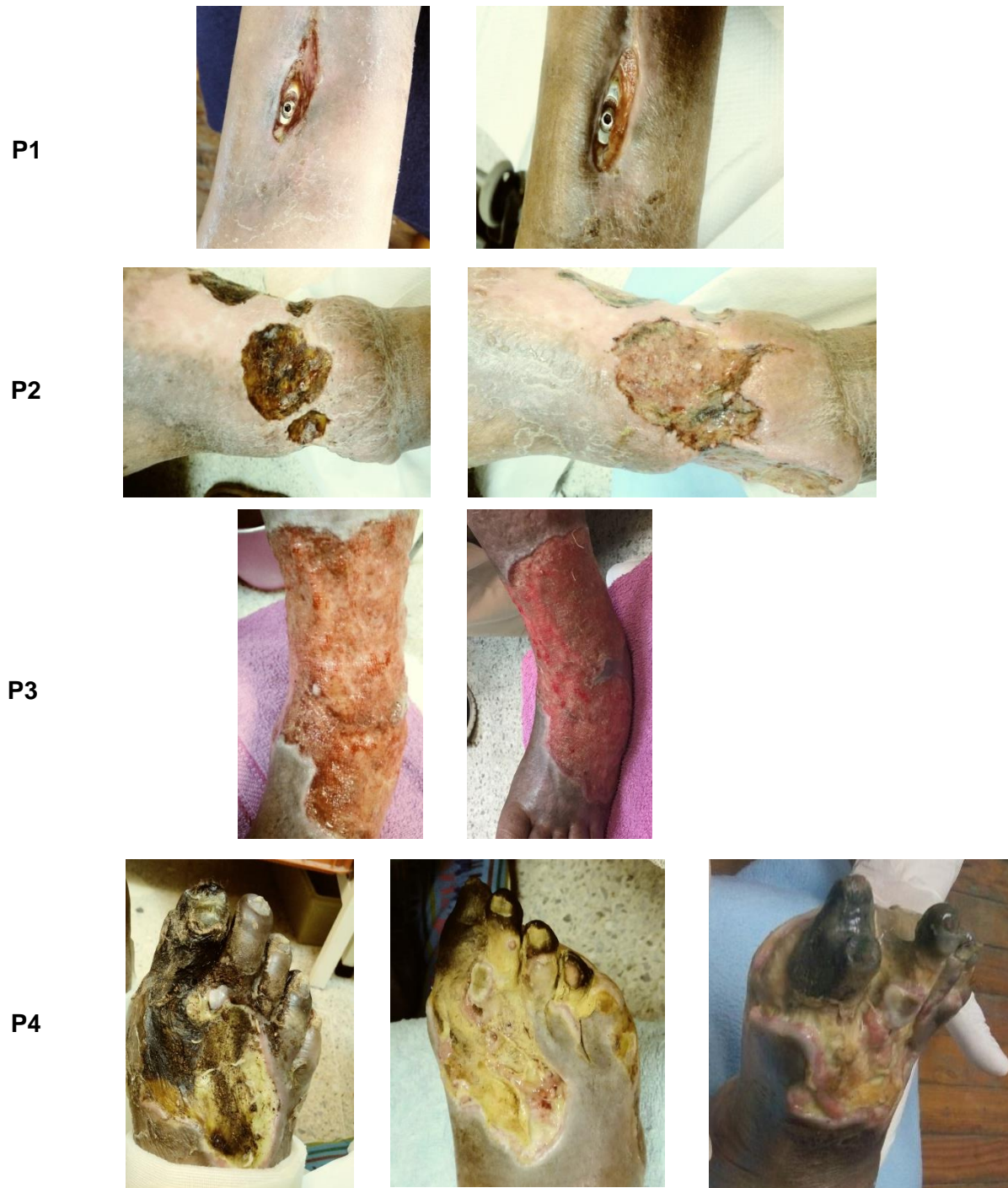


Figura 9. Evolución de las heridas tras aplicar terapia larval.

P1: paciente 1; P2: paciente 2; P3: paciente 3; P4: paciente 4.

Los resultados de la aplicación de larvas en los pacientes fueron los siguientes (tabla 2):

- Paciente 1: la herida presentó una reducción de 1.5 cm de largo y 0.7 cm de ancho, el tejido necrótico desapareció completamente, de igual manera el mal olor, la secreción purulenta y la inflamación. Se observó de manera subsecuente la formación de tejido de granulación. La paciente refirió sensación de cosquilleo durante el tratamiento larval.
- Paciente 2: el tejido necrótico de la lesión se eliminó, la secreción paso de purulenta a sanguinolenta, el mal olor disminuyó y la inflamación desapareció. Se observó de manera subsecuente la formación de tejido de granulación. La sensación del tratamiento por parte del paciente es cosquilleo y dolor leve.
- Paciente 3: desapareció la secreción, el mal olor y la inflamación. Se observó el crecimiento de tejido de granulación en la úlcera y la sensación del tratamiento fue de dolor fuerte.
- Paciente 4: gran parte del tejido necrótico fue removido. La secreción, el mal olor y la inflamación disminuyó ligeramente. El paciente refirió dolor fuerte y se observó en los bordes de la herida la presencia de tejido de granulación.

En todos los casos que presentaron dolor durante el procedimiento se suministró analgésico.

Tabla 2. Características de las heridas de cada paciente antes y después de aplicar terapia larval.

		Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
Tamaño de úlcera	Antes	5cm de largo	Circunferencia del tobillo, aprox. 18 cm de largo	Circunferencia del tobillo, aprox. 15 cm de largo	Circunferencia del pie, aprox. 12 cm de largo
		2cm de ancho			
	Después	3.5cm de largo	Sin reducción	Sin reducción	Sin reducción
		1.3cm de ancho			
Tejido necrótico	Antes	75%	100%	50%	100%
	Después	0%	0%	0%	50%
No. de larvas aplicadas		100	250	200	300
Duración de tratamiento		72	48	72	72
Secreción	Antes	Purulenta	Purulenta	Sanguinolenta	Purulenta
	Después	No	Sanguinolenta	No	Sanguinolenta
Mal olor	Antes	Presente	Presente	Ausente	Presente
	Después	Ausente	Disminuyó	Ausente	Disminuyó
Inflamación	Antes	Si	Si	Si	Si
	Después	No	No	No	Disminuyó
Formación de tejido granular		Si	Si	Si	Si
Sensación		Cosquilleo	Cosquilleo	Cosquilleo	Dolor fuerte
			Dolor	Dolor fuerte	

Discusión

Lucilia sericata presenta una coloración verde metálico en tórax y abdomen lo que concuerda con las características previamente descritas por Figueroa et al. (2007), este rasgo hace fácilmente reconocible a la especie.

Tiene tres setas acrosticales postsuturales en el protórax y setas acrosticales presuturales en el metatórax; presenta mesopleura con ampolla ovoide y caliptras claras, sus alas son ahumadas, tienen una curvatura angulosa en la vena M y la vena radial R se observa dorsalmente desnuda. Sus palpos maxilares son de color amarillo a naranja y su área parafacial se encuentra desnuda, tal como lo describe Zapata y Rodríguez (2014).

El tiempo total en que *Lucilia sericata* desarrolló su ciclo biológico fue de 312 horas en condiciones de laboratorio (fotoperiodo de 12 horas luz, humedad y temperatura de 32°C), resultados que se asemejan a los obtenidos por Figueroa et al (2007), quienes estudiaron el desarrollo de los estadios de la misma especie y obtuvieron una duración de 279 horas a una temperatura de 25°C; de acuerdo con lo mencionado por Zapata y Rodríguez (2014), la especie completa su desarrollo entre 96-312 horas a una temperatura que oscile de 35 a 38°C.

La duración en horas de los estadios de huevo, larva 1 y larva 2 fue de 24 para cada uno, de igual manera lo fue con los resultados de Pinilla et al. (2010) controlados a una temperatura de 24 a 27°C. El estadio de larva 3 duró 96 horas, lo cual no difiere con 87 horas obtenidas en un estudio realizado por Zapata y Rodríguez (2014) a entre 17 y 19°C; en ese mismo estudio señalaron la duración de 357 horas para el estadio de pupa, que contrasta con nuestro resultado de 144 horas; sin embargo se asemeja con los resultados de Figueroa et al., (2007) que fue de 126 y el de Pinilla et al., (2010) de 192 horas.

Se obtuvo una longitud media de 1.2 mm para el instars de huevo, de 2 mm para el de larva 1, 6 mm para larva 2, 9 mm para larva 3 y para pupa e imago fue de 7 mm cada uno, a diferencia de los datos obtenidos por Zapata y Rodríguez (2014), que fueron: 1.35, 2.38, 6.5, 9.8, 7.63 y 7.8, respectivamente. Resultó de suma importancia la medición de longitud de cada estadio de *Lucilia sericata*, ya que

nos permite estimar el tamaño en que las larvas deben retirarse del proceso terapéutico; es decir, cuando estas se encuentran en el estadio de larva 3.

Todos los datos obtenidos acerca del desarrollo del ciclo biológico de *Lucilia sericata* y sus mediciones, difieren entre los estudios, ya que existen variaciones en la temperatura, condiciones ambientales y la alimentación de los individuos.

El tratamiento con larvas resultó exitoso, principalmente por el desbridamiento de tejido necrótico en todos los casos y la subsecuente aparición de tejido de granulación; además de la disminución de la secreción y mal olor; estos resultados concuerdan con otros autores, por ejemplo, Sherman en 2001 valoró 145 úlceras de las cuales un 50% lograron desbridar completamente e iniciar de manera continua la formación de tejido granular. Un caso similar en 2005 de Tanyuksel, aplicó tratamiento larval a 11 pacientes, diez de ellos presentaron limpia su herida con aparición de tejido de granulación y desaparición del mal olor. En 2006 Figueroa y Uherek, estudiaron cinco lesiones ulcerosas, todas quedaron libres de tejido necrótico, desapareció el mal olor, el exudado y se observó la presencia de tejido de granulación. González et al., 2010, describió dos casos de heridas de diferentes etiologías que fueron tratadas con terapia larval y obtuvo la desbridación total del tejido desvitalizado y la disminución del exudado, con un incremento en el dolor de los pacientes. Martínez et al., 2016, mostró una mejoría en un paciente tres a cuatro días después de la utilización de larvas, se apreció que la herida quedó libre de tejido esfacelado y disminuyó el exudado. Perucho et al., 2016, reporta el estudio de un caso y a las dos semanas posterior a aplicar las larvas observa la disminución del exudado, del tejido esfacelado y del olor, con aparición de tejido de granulación. Otro estudio reciente en México por Contreras et al., 2016, reafirma los datos mencionados anteriormente; en su estudio la carga de tejido necrótico y las secreciones se redujeron en los ocho pacientes y aumento posteriormente la formación del tejido de granulación.

Los resultados obtenidos tras la aplicación de larvas contribuye a la recolección de evidencia clínica a cerca de su uso, lo cual facilitará su aceptación y por lo consiguiente su implementación como alternativa para tratar úlceras diabéticas necrosadas.

Conclusiones

El tratamiento con larvas de *Lucilia sericata* fue eficaz para el desbridamiento de tejido necrótico y útil en la formación de tejido de granulación en todas las úlceras diabéticas; además de contribuir ante la desaparición de secreción purulenta y mal olor.

Literatura citada

- Acuña Y, Cortés D, Vargas M, Segura N, Bello F. 2011. Caracterización citogenética de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: calliphoridae), Cepa Bogotá, Colombia. *Revista Ciencias de la Salud* 9(2): 111-124.
- ADA (American Diabetes Association). 2014. Resumen de las recomendaciones de la American Diabetes Association para la práctica clínica en el manejo de la diabetes mellitus. Consultado el 14 de abril de 2018. Disponible: <http://www.diabetes.org/es/>
- Almaguer A, Miguel P, Reynaldo C, Mariño A, Oliveros R. 2012. Actualización sobre diabetes mellitus. *Correo Científico Médico* 16(2): 7-8.
- Arrivillaga J, Rodríguez J, Oviedo M. 2008. Evaluación preliminar en un modelo animal de la terapia con larvas de *Lucilia sericata* para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Biomédica* 28(2): 305-310.
- Ballester L, Martínez E, Serra N, Palomar F. 2016. Utilización de la terapia larval en heridas desvitalizadas: revisión bibliográfica. *Enfermería Dermatológica* 10(29): 27-33.
- Barquera S. 2016. Diabetes Mellitus: un reto de salud pública para México. Asumiendo el control de la Diabetes en México. Disponible: http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/11/FMidete_Asumiendo-Control-Diabetes-2016.pdf.
- Barraza M, Guajardo V, Picó J, García R, Hernández C, Mora F, Athie J, Crable E, Urtíz A. 2015. Carga económica de la diabetes mellitus en México, 2013. México, D.F. Funsalud. Disponible: <http://funsalud.org.mx/portal/wp-content/uploads/2015/08/Carga-Economica-Diabetes-en-Mexico-2013.pdf>.
- Beltrán C, Fernandez A, Giglio S, Biagini L, Morales R, Perez J, Aburto A. 2001. Tratamiento de la infección en el pie diabético. *Revista Chilena de Infectología* 18(3): 212-224.
- Blasco G, Martín A, Gutiérrez J, Arias S. 2014. Miasis por *Calliphora* sobre pioderma gangrenoso. *Revista Española de Quimioterapia* 27(3): 220-221.
- Brena J. 2013. Tratamiento del pie diabético cuesta hasta \$300,000 pesos. Alianza por la Salud Alimentaria. Disponible: <http://alianzasalud.org.mx/2013/04/tratamiento-del-pie-diabetico-cuesta-hasta-300000-pesos>.
- Calderón O, Belfort K, Troyo A, Gamboa M. 2014. Terapia larval con *Lucilia eximia* (diptera: calliphoridae) de costa rica en un modelo experimental. *Revista Chilena de Entomología* 39: 57-65.
- Castillo R, Fernández J, Castillo F. 2014. Guía de práctica clínica en el pie diabético. *Archivos de Medicina* 10(2:1): 1-17.
- Contreras J, Fuentes A, Arroyo S, Moncada D, Sosa M, Maravilla E, Domínguez J. 2016. Estudio comparativo de la larvaterapia (LT) para desbridar y controlar la carga bacteriana en úlceras venosas comparadas con desbridamiento quirúrgico y aplicación de un antimicrobiano tópico. *Gaceta Médica de México* 152: 78-87.

- Desposorio S, Nomberto S, Paz S, Quispe M, Rodríguez B, Ureta G, Roldán J. 2015. Efecto de la temperatura sobre la supervivencia de larvas II de *Lucilia sericata* en condiciones de laboratorio. REBIOLEST 3(2): 43-48.
- Echeverry L, Zapata Á, Segura A, Bello F. 2009. Study of primary cell cultures derived from *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Revista Ciencias de la Salud 7(3): 17-28.
- ENSANUT. 2012. Evidencia para la política pública en salud. Diabetes mellitus: la urgencia de reforzar la respuesta en políticas públicas para su prevención y control. Disponible: <https://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/DiabetesMellitus.pdf>.
- Figueroa L, Flores J, Rodríguez S. 2007. Método de cultivo de larvas de moscas *Lucilia sericata* para terapia larval. Parasitología Latinoamericana 62: 79-82 2007
- Figueroa L, Uherek F. 2006. Experiencia de terapia larval en pacientes con úlceras crónicas. Parasitología Latinoamericana 61:160–164.
- Frausto C, Trejo R. 2009. Larvoterapia: una antigua forma de curar heridas. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud.6:4-12.
- Galindo F. 2013. Visión en *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera:Calliphoridae): experimentos comportamentales y electrofisiológicos. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias 1.
- Gentil G, Smirnova P. 2009. Maggottherapy. A systematic review on evidence-based Medicine. Revista Internacional de Ciencias Podológicas 3(1): 48-51.
- González L, Fortes M, Pedro B. 2010. Descripción de dos casos de herida, con diferente etiología, tratadas mediante terapia larval desbridante. Enfermería Clínica 20(1):47-53.
- Gutiérrez A. 2014. Amputación de extremidades. ¿Van a la alza? Revista Mexicana de Angiología 42(3):112-114.
- Hernández J. 2014. Las bacterias GRAM negativas y su influencia en la cicatrización de úlceras de pie diabético. Universidad Complutense de Madrid. Madrid [Tesis doctoral]. Consultado el 08 de junio del 2018. Disponible: <http://eprints.ucm.es/25023/1/T35297.pdf>
- Jiménez H, Douriet M, Salgado A. 2013. Larvaterapia. Revista del Centro Dermatológico Pascua 22(3).
- Lavery L, Armstrong D, Wunderlich R, Tredwell J, Boulton A. 2003. Diabetic foot syndrome: evaluating the prevalence and incidence of foot pathology in Mexican Americans and non-Hispanic whites from a diabetes disease management cohort. Diabetes Care 26(5):1435-1438.
- Marcondes C. 2006. Terapia larval de las lesiones de la piel causadas por la diabetes y otras enfermedades. Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 48(6): 320.
- Martínez F, Guerrero G, Ochoa P, Anaya R, Muñoz J, Jiménez R, Márquez G, Jubiz Y, Clerici G, Sánchez L, Gutiérrez P, Martínez F. 2012. Cirujano General 34(3):199-205.

- Martínez M, Franco M, Ordoño C, García M. 2016. Terapia larval. Caso clínico en atención domiciliaria. *Revista Rol de Enfermería* 39(4):26-29.
- Mumcuoglu K, Miller J, Mumcuoglu M, Friger M, Tarshi M. 2001. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 38:161-166.
- Nigam Y, Bexfield A, Thomas S, Ratcliffe N. 2006. Maggot Therapy: The Science and Implication for CAM Part I-History and Bacterial Resistance. *Evid Based Complement Alternat Med* 3(2): 223-227.
- Parnes A, Lagan M. 2007. Larval therapy in wound management: a review. *International Journal of Clinical Practice* 61(3):488-493.
- Patarroyo, M. 2015. Terapia larval en la curación de heridas. *Infectio* 19(1).
- Pérez A, Añel M. 2009. Evidencias sobre Terapia Larval en el cuidado de heridas. *Evidentia: Revista de Enfermería Basada en la Evidencia* 6(26): 8.
- Perucho N, Nartínez L, Monleon E, Llatas F. 2016. Terapia larval aplicada a un caso clínico de úlcera necrosada en pierna. *Enfermería Dermatológica* 10(29): 44-46.
- Pinilla, B. Acuña, Y. Cortes, D. Diaz, A. Segura, A. Bello, F. 2010. Características del ciclo biológico de *Lucilia sericata* (MEIGEN, 1826) (Diptera:Calliphoridae) sobre dietas diferentes. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 13 (2): 153-154.
- Piña A, Salvador C, Lindao R, González L, Vintimilla N, Selles M. 2016. Miasis cutánea masiva que simula invasión cerebral. Presentación de caso y revisión de la literatura. *MÉDICAS UIS* 29(2): 145-153.
- Repáraz L, Sánchez P. 2004. El pie del diabético. *Anuales de Medicina Interna* 21(9): 417-419.
- Retana L, Belfort K, Calderón O, Troyo A, Gamboa M. 2014. Desarrollo y evaluación de un método de obtención de larvas estériles de *Lucilia eximia* para su uso en terapia larval. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 33(1): 44-51.
- Rey A, Castañeda A, González Z, Acero P, Segura C, Bello G. 2010. Evaluación de la terapia larval aplicada a cuatro casos clínicos de animales en Bogotá. *Revista Colombiana de Entomología* 36(2): 254.
- Rey M, Castañeda A, González J, Acero V, Segura A, Zapata C, Gaona M, Ríos D, Bello F. 2008. Evaluación de la terapia larval en el proceso de curación de heridas infectadas con *Pseudomonas aeruginosa* en conejos. *Revista Ciencias de la Salud* 6(2): 9-24.
- Ríos Y, Mercadillo P, Yuil R, Ríos C. 2013. Terapia con larvas de mosca para heridas crónicas: alternativa en una época de creciente resistencia a los antimicrobianos. *Dermatología Cosmética Médica y Quirúrgica* 11(2).
- Rivero F. 2006. Programa de prevención del pie diabético. Iniciativa local para un problema global. *Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vasculat* 7(1):1-3.

- Rodríguez P, González M. 2016. Eficacia de la terapia larval en el tratamiento de heridas crónicas. *Nure Investigación* 13(85): 1-7.
- Romero O. 2011. Aportes al manejo avanzado del pie diabético. *FORUM* 13(1): 16-26.
- Sánchez M, Chuairé L, Narváez R, Segura N. 2004. Biocirugía: utilización de larvas de insectos necrófagos en la curación de heridas. La terapia larval. *Revista Ciencias de la Salud* 2(2): 156-164.
- Scretaría de Salud. 2016. Obesidad aumenta riesgo de diabetes, que es la primera causa de muerte en México. Disponible: <https://www.gob.mx/salud/prensa/obesidad-aumenta-riesgo-de-diabetes-que-es-la-primera-causa-de-muerte-en-mexico>.
- Sherman R, Sherman J, Gilead L, Lipo M, Mumcuoglu K. Maggot debridement therapy in out-patients. 2001. *Archives of Physical Medicine Rehabilitation* 82:1226-1229.
- Tanyuksel M, Araz E, Dundar K, Uzun G, Gumus T, Alten B, Saylam F, Taylan-Oskan A, Mumcuoglu K. 2005. Maggot Debridement Therapy in the Treatment of Chronic Wounds in a Military Hospital Setup in Turkey. *Dermatology* 210: 115-118.
- Tapia J, Ruíz H, Ochoa F, Hernández B. 2015. Proporción de incidencia de amputaciones en pacientes con lesiones de pie diabético. Revisión de tres años en el Hospital Regional Dr. Valentín Gómez Farías en Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Angiología* 43(1): 9-13.
- Wolff M, Rivera C, Herrera S, Wolff J, Escobar M. 2010. *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae), a new alternative for maggot therapy. Case series report *Iatreia* 23(2): 107-116.
- Zapata, K. Rodríguez, R. 2014. Tesis de licenciatura: Primer registro y ciclo de desarrollo de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) en campo. Universidad Nacional de Trujillo. Distrito de Trujillo, Perú.

Anexos

Anexo 1A. Consentimiento informado.

**Consentimiento informado para participar en el proyecto de investigación:
Aplicación de larvas de mosca *Lucilia sericata*, como control biológico de
Staphylococcus aureus en úlceras de pie diabético que se realiza en la
Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco**

Fecha: _____ No. de expediente: _____

Señor (a): _____

Número telefónico: _____ No. celular: _____

Dirección: _____

Clave de INE: _____ Edad: _____

Informo que en pleno uso de mis facultades mentales he sido debidamente informado sobre los beneficios de la terapia larval con mosca *Lucilia sericata* para el tratamiento de úlceras infectadas en pie diabético, por lo cual autorizo que se me realicen:

- a) Preguntas sobre mis datos personales, enfermedad que padezco y mis hábitos de alimentación
- b) Una exploración física y visual detallada de mis pies
- c) La colecta de muestras, en su caso, para análisis microbiológico de úlceras infectadas en pie diabético
- d) Aplicación de tratamiento con larvas de mosca *Lucilia sericata* en úlceras infectadas de pie diabético

Declaro que:

- a) Comprendo en su totalidad el propósito del estudio
- b) Me han aclarado las dudas sobre mi participación como paciente para el tratamiento experimental
- c) Estoy satisfecho (a) con la información que me fue proporcionada
- d) Que mi participación en esta fase experimental es **VOLUNTARIA** y que no recibiré compensación económica por el tratamiento que me aplicarán
- e) Me comprometo a seguir las indicaciones de alimentación y cuidados de la herida antes, durante (48 a 72 horas) y después de la terapia larval (posterior a 72 horas)

Eximo de toda responsabilidad sobre mi salud a quienes aplican el tratamiento con larvas.

Nombre y firma del paciente

Dra. María del Carmen Vera Rosales
Responsable del proyecto

Anexo 1B. Historia clínica.



HISTORIA CLÍNICA
MAESTRÍA EN ECOLOGÍA APLICADA
PROYECTO “APLICACIÓN DE LARVAS DE MOSCA *Lucilia sericata* COMO CONTROL BIOLÓGICO DE *Staphylococcus aureus* EN ÚLCERAS DE PIE DIABÉTICO”
USO DE INVESTIGACIÓN E INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

I. Datos personales

Fecha: _____ No. de expediente: _____

Nombre: _____

Edad: _____ Masculino Femenino

Ocupación: _____

Dirección: _____

No. telefónico: _____

No. celular _____

II. Antecedentes patológicos heredo-familiares

	Primarios		Secundarios			
	Padre	Madre	Abuelos		Abuelas	
			Paterno	Materno	Paterna	Materna
Sobrepeso						
Obesidad						
Diabetes T1						
Diabetes T2						
Hipertensión arterial						
Enfermedad cardíaca						
Cáncer						
Alteraciones neurológicas						

III. Antecedentes patológicos

-Se le ha diagnosticado alguno de los siguientes padecimientos:

	Tiempo de evolución	
	Años	Meses
Sobrepeso		
Obesidad		
Diabetes T1		
Diabetes T2		
Hipertensión arterial		
Enfermedad cardiaca		
Cáncer		
Alteraciones neurológicas		
Otro:		

Tratamiento para control de su padecimiento:

Tratamiento antibiótico (si está empleando y especificar el tiempo):

IV. Antecedentes no patológicos

- ¿Consume alcohol?_____ Frecuencia_____
- ¿Fuma?_____ Frecuencia_____
- ¿Practica algún deporte?_____ Frecuencia_____

V. Valoración de presencia de infección en úlcera de pie diabético

Indicadores clínicos		
	Si	No
Tejido necrótico		
Secreciones		
Eritema		

Inflamación		
-------------	--	--

VI. Determinar grado de afección del pie diabético

Clasificación de Meggit-Wagner		
Grado	Lesión	Características
0	Ninguna, pie en riesgo	Callos gruesos, cabezas de metatarsianos prominentes, dedos en garra y deformidades óseas
I	Úlceras superficiales	Dstrucción del espesor total de la piel
II	Úlceras profundas	Penetra la piel grasa y ligamentos sin afectar hueso, se encuentra infectada
III	Úlceras profundas más abscesos (osteomielitis)	Extensa y profunda, con secreción y mal olor
IV	Gangrena limitada	Necrosis de una parte del pie (dedos, talón o planta)
V	Gangrena extensa	Afectación en todo el pie y efectos sistémicos

Grado: _____

Tiempo aproximado de aparición de úlcera: _____

¿Conoce acerca de los cuidados en pie? _____

VII. Valoración de sensibilidad del pie diabético

Indicadores clínicos	Indicadores clínicos	
	Si	No
Hormigueos		
Adormecimiento		
Dolor		
Calor en piernas		

Exploración física	Exploración física	
	Si	No
Deformidades óseas		
Atrofia muscular		
Hiperqueratosis		
Cambios tróficos en las uñas		
Rigidez		

Sensibilidad del pie utilizando Monofilamento de Semmes-Weinstein				
Puntos plantares de cada pie	Pie izquierdo		Pie derecho	
	-	+	-	+
Primer dedo (falange distal)				
Primer metatarsiano				
Tercer metatarsiano				
Quinto metatarsiano				

VIII. Valoración de la irrigación sanguínea en el pie diabético

Indicadores clínicos		
	Si	No
Calambres		
Necrosis		
Telangiectasis		
Piel pálida		
Piel delgada		
Piel seca		
Piel cuarteada		
Edema		
Pérdida de vellos en pies		
Pérdida de vellos en piernas		
Isquemia		

Palpación de pulsos distales del paciente						
	Pie izquierdo			Pie derecho		
	Ausente	Disminuido	Normal	Ausente	Disminuido	Normal
Pulso distal pedial						
Pulso tibial posterior						

Índice Tobillo-Brazo (utilizando un Doppler o un esfigmomanómetro)	
Presión arterial del tobillo	mm/Hg
Presión arterial del brazo	mm/Hg

Valor: _____

Clasificación de Índice Tobillo-Brazo	
Estado	Valor
Calcificación arterial (alto riesgo vascular)	>1.4
Normal	1.4-0.9
Enfermedad arterial obstructiva leve	0.9-0.7
Enfermedad arterial obstructiva moderada	0.7-0.5
Enfermedad arterial obstructiva grave	<0.5

Clasificación: _____

IX. Pronóstico de la herida (úlceras en pie diabético)

Clasificación de San Elián			Puntuación
Factores anatómicos topográficos	Localización o zona de la herida inicial	1.- Falángica o digital con o sin extensión al resto del pie 2.-Metatarsal con o sin extensión al resto del pie 3.- Tarsal en talón y medio pie, con o sin extensión a todo el pie	
	Aspecto topográfico	1.- Dorsal o plantar 2.- Lateral 3.- Más de dos aspectos	
	No. De zonas afectadas	1.- Una 2.- Dos 3.-Todo el pie (heridas múltiples)	
Factores agravantes	Isquemia (índice tobillo-brazo)	0.- No isquemia: 0.91-1.21 1.- Leve: 0.7-0.9 2.- Moderada: 0.51-0.69 3.- Grave o crítica: <0.5	
	Infección	0.- No infección 1.- Leve: Eritema <2cm, induración, calor, dolor y secreción purulenta. 2.- Moderada: Eritema >2cm. Afectación de músculo, tendón, hueso o articulación. 3.- Grave: Respuesta inflamatoria sistémica.	
	Edema	0.- No edema 1.- Perilesional 2.- Solo el pie y/o la extremidad afectada 3.- Bilateral secundario a enfermedad sistémica	
	Neuropatía	0.- No neuropatía 1.- Disminución de la sensibilidad protectora y vibratoria. 2.- Ausencia de la sensibilidad protectora o vibratoria. 3.- Neuro-osteoartropatía diabética (artropatía de Charcot)	
Factores de afección tisular de la herida	Profundidad	1.- Superficial (sólo piel) 2.- Úlcera profunda (toda la dermis) 3.- Todas las capas (Incluye hueso y articulación)	
	Área en cm ²	1.- Pequeña <10 cm ² 2.- Mediana de 10-40 cm ² 3.- Grande > de 40 cm ²	
	Fases de cicatrización	1.- Epitelización 2.- Granulación 3.- Inflamación	

Grado	Gravedad	Puntaje inicial	Pronóstico
I	Leve	<10	Probable curación exitosa de la herida
II	Moderada	11-20	Riesgo de pérdida del pie; la respuesta dependerá de la terapia utilizada y de la respuesta biológica del paciente

III	Severa	21-30	Condición con riesgo de pérdida de la extremidad y la vida, independientemente de la terapéutica empleada y la respuesta del paciente
-----	--------	-------	---

Grado: _____

X. Valoración nutricional del paciente con pie diabético

Indicadores antropométricos		
Peso actual (kg)	IMC	Circunferencia de Cintura (cm)
Peso habitual (kg)	Circunferencia muñeca (cm)	Circunferencia de Cadera (cm)
Talla (cm)	Complexión	ICC

Indicadores bioquímicos			
Fecha de análisis clínicos :			
Glucosa	mg/dL	Colesterol	Triglicéridos
Tensión arterial	mg/Hg	Colesterol HDL	Leucocitos
Hemoglobina glucosilada		Colesterol LDL	Cetonas

Antecedentes dietéticos			
¿Cuántas comidas realiza al día?			
¿Acostumbra comer a las misma hora?	Si	No	A veces
¿Se salta comidas?	Si	No	A veces
¿Come entre comidas?	Si	No	A veces
¿A qué hora le da más apetito o antojos?			
¿Qué cantidad de líquidos consume en el día?			
¿Come fuera de casa?	Si	No	A veces
¿Consumo alimentos procesados?	Si	No	A veces
¿Toma siesta después de comer?	Si	No	A veces

Frecuencia de consumo de alimentos									
En la última semana, ¿Cuántas veces comiste los siguientes alimentos									
<i>Cereales</i>	Nunca	1 vez	2 o 3 veces	4-6 veces	<i>Lácteos</i>	Nunca	1 vez	2 o 3 veces	4-6 veces
1.- Arroz	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	21.- Leche	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2.- Bolillo o pan blanco de caja	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	22.- Quesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.- Cereales industrializados	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	23.- Yogurt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.- Sopa de pasta	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Leguminosas</i>				
5.- Tortillas de maíz	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	24.- Frijoles o lentejas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.-Tortilla de harina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	25.- Habas y garbanzos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.- Pan de dulce, pastelitos, galletas o Hot cakes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Alimentos de origen animal</i>				
8.- Atole o avena	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	26.- Carne de res	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.- tamales tlacoyos, sopes, quesadillas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	27.- Pollo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10.-Hamburguesas, hot dog, pizza	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	28.- Carne de puerco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Azucares</i>					29.- Huevo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11.- refresco o jugos industrializados	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	30.- Chorizo o longaniza, chicharrón de cerdo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12.-gelatina o flan	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	31.-Jamon y salchicha u otros embutidos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13.-dulces paletas de caramelo y Helados	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	32.- Pescados y mariscos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14.-azucar y chocolate en polvo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Verduras</i>				
15.-mermelada, cajeta y miel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	33.- verduras crudas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Grasas</i>					34.- verduras al vapor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
16.-aceite vegetal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	35.- ensalada de verduras	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
17.-aguacate	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Frutas</i>				
18.-crema y mayonesa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	36.- frutas secas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19.-mantequilla o margarina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	37.- jugos de fruta	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
20.-cacahuete, nueces, pistaches, Pepitas u otras	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	38.- fruta fresca, cocteles	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Recordatorio de 24 horas				
Desayuno	1ra. Colación	Comida	2da. Colación	Cena
Horario	Horario	Horario	Horario	Horario
Lugar	Lugar	Lugar	Lugar	Lugar
Alimento	Alimento	Alimento	Alimento	Alimento

Alergias alimentarias:

Preferencias en la alimentación:

Anexo 1C. Registro de valoración clínica tras la aplicación del tratamiento larval.

Registro del tratamiento con larvas de mosca *Lucilia sericata* en úlceras infectadas de pie diabético y colecta de muestra microbiológica

Nombre del paciente: _____

Hombre Mujer No. de expediente: _____

No. telefonico: _____ No. celular: _____

Dirección: _____

Colecta de muestra microbiológica antes de aplicar el tratamiento con larvas			
F1	Hora	Fecha	Clave de muestra

Aplicación de tratamiento con larvas de mosca <i>Lucilia sericata</i> (48-72 horas)										
F1	Fecha	Tejido necrótico *	Secreción **	Mal olor ***	Tamaño aprox. de la úlcera (cm2)	Tamaño aprox. de la úlcera (cm)	Hora de inicio del tx	No. de larvas aplicadas	No. de revisiones	
										24
									48	
									72	

Retirar el tratamiento con larvas de mosca <i>Lucilia sericata</i>								
F2	Fecha	Hora	No. final de larvas	Tejido de granulación ****	Secreción **	Mal olor ***	Tejido necrótico *	Tamaño aprox. de la úlcera (cm2)

Colecta de muestra microbiológica posterior a aplicación del tratamiento con larvas			
F2	Hora	Fecha	Clave de muestra

*	75% o más	50%	25% o menos	Tejido esfacelado (TE)
**	Purulenta (amarillo o verdoso)	Serosa (clara)	Serosanguinolenta (rosa)	
***	Fuerte	Poco fuerte	Nada	
****	75% o más	50%	25%	Nada

*, ****. Porcentaje proporcional al tamaño de la úlcera

Capítulo 2

Determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* en úlceras de pie diabético antes y después del tratamiento con larvas de *Lucilia sericata*.

Resumen

Uno de los factores agravantes en las úlceras de pie diabético es el proceso infeccioso, que complica la óptima evolución y cierre de la herida, lo que trae como consecuencia la amputación de la extremidad inferior o al riesgo de perder la vida. Entre los microorganismos relacionados con ulceraciones en pie diabético se mencionan a los cocos Gram positivos, como *Staphylococcus aureus* que es considerado el más frecuente. El presente estudio tuvo por objetivo determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* en úlceras de pie diabético antes y después de aplicar un tratamiento con larvas de *Lucilia sericata* estériles, y evaluar su acción, como control biológico, de *S. aureus*. Se realizó la toma de muestra de exudados en cuatro pacientes (antes y después del tratamiento con larvas de *Lucilia sericata*) mediante hisopos estériles. Las muestras fueron inoculadas en tubo de ensaye conteniendo caldo soya tripticaseína y fueron incubadas durante 24 horas a 37°C; pasado este tiempo, se hicieron resiembras en agar sal y manitol; los cultivos fueron incubados durante el mismo tiempo y temperatura antes indicados. Una vez que se observó la presencia de colonias se hicieron aislamientos de colonias amarillas (características de *S. aureus*) y se aplicó la técnica de siembra y resiembra para obtener cultivos puros lo cual fue verificado por tinción de Gram. Estos fueron caracterizados mediante pruebas bioquímicas convencionales. En tres de los pacientes se observó el crecimiento de colonias amarillas en agar sal manitol previo a aplicar el tratamiento larval y posterior al procedimiento el crecimiento de colonias fue de color blanco. Se obtuvieron 32 aislados puros provenientes de cuatro pacientes diabéticos con úlcera en pie, de los cuales dos fueron cocobacilos Gram positivos y el resto estafilococos Gram positivos. Un 6% de los cultivos resultó positivo a la prueba de coagulasa lo cual pone en evidencia la probable presencia de *S. aureus*. La actividad hemolítica estuvo representada en un 50% de los aislados y más de un 78% resultó anaerobio facultativo en fructuosa. Más del 90% de los cultivos aislados presentaron características morfológicas del género *Staphylococcus*, y de estos un 6% son probables *Staphylococcus aureus*.

Abstract

One of the aggravating factors in diabetic foot ulcers is the infectious process, which complicates the optimal evolution and closure of the wound, as a worse consequence leads to the amputation of the lower extremity or the risk of losing one's life. Among the microorganisms related to this are mentioned the Gram-positive cocci, such as *Staphylococcus aureus* which is considered the most frequent. The objective of the present study was to determine the presence of *Staphylococcus aureus* in diabetic foot ulcers before and after treatment with sterile *Lucilia sericata* larvae, and to evaluate its action, as a biological control, of *S. aureus*. Sampling of exudates was performed in four patients (before and after treatment with *Lucilia sericata* larvae) using sterile swabs. Samples were inoculated in test tube containing trypticasein soy broth and incubated for 24 hours at 37 ° C; after this time, reseeded were made on salt, agar and mannitol; the cultures were incubated during the same time and temperature indicated above. Once the presence of colonies was observed, isolations of yellow colonies (characteristics of *S. aureus*) were made and the seeding and reseeded technique was applied to obtain pure cultures, which was verified by Gram stain. These were characterized by conventional biochemical tests. In three of the patients the growth of yellow colonies on mannitol, salt, agar was observed before applying the larval treatment and after the procedure the growth of colonies was white. We obtained 32 pure isolates from four diabetic patients with foot ulcer, of which two were Gram positive coccobacilli and the rest Gram positive staphylococci. 6% of the cultures tested positive for the coagulase test, which makes evident the probable presence of *S. aureus*. The hemolytic activity was represented in 50% of the isolates and more than 78% was facultative anaerobic in fructose. More than 90% of the isolated cultures presented morphological characteristics of the *Staphylococcus* genus and of these 6% are likely *Staphylococcus aureus*.

Introducción

La infección en pie diabético es el padecimiento más frecuente de infecciones en la piel y tejidos blandos, que afectan el manejo y pronóstico de curación. Se trata de una complicación que pueden inducir la amputación de las extremidades afectadas o inclusive la muerte por sepsis (Beltrán et al., 2001; Hernández, 2014). En pacientes con pie diabético la neuropatía, la enfermedad vascular periférica (hipoxia celular), la deficiencia del sistema inmune (defectos de la función leucocitaria, quimiotaxis y capacidad fagocítica) y la pérdida de la barrera cutánea, se combinan para favorecer la aparición y progresión del proceso infeccioso (Hernández, 2014).

En la infección del pie diabético se presentan con mayor frecuencia los cocos Gram positivos, de ellos *Staphylococcus aureus* es el más frecuente, seguido de *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp., además de bacilos Gram negativos y Enterobacterias (Beltrán et al. 2001; Martínez, 2004; Barberán, 2009; Bocanegra et al., 2013); pueden encontrarse también bacterias multirresistentes que incluye a *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), estafilococos coagulasa negativa (SCN) y enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Barberán, 2009; Echeverría et al., 2017).

Staphylococcus aureus es un patógeno de gran importancia médica por su alta morbi-mortalidad a nivel comunitario e intrahospitalario por ser un patógeno potencial y causante de múltiples enfermedades (Camarena y Sánchez, 2001; Bustos et al., 2006; Camussone y Calvino, 2013; Zendejas-Manzo et al. 2014; Cervantes-García et al. 2014). Sin embargo, no es el único del género *Staphylococcus* que juega un papel importante en la etiología de infecciones; los estafilococos coagulasa negativa (SCN) están involucrados también en patología infecciosa, de ellos *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus* son los más significativos (Herrera et al., 2001; Cuevas et al., 2008; Fariña et al., 2013).

La patogenicidad de los estafilococos se debe, entre otros factores a su capacidad para adherirse y formar biopelículas, lo cual los protege de la acción de los antimicrobianos y los mecanismos de defensa de los hospederos. Además, *S. aureus* producen enzimas extracelulares que contribuyen a degradar los tejidos

invadidos y permite que persista la infección (Fariña et al., 2013; Pinheiro et al., 2016).

El conocimiento de la patogenia de este tipo de infecciones fomenta el desarrollo de medidas preventivas y terapéuticas eficaces, que contribuyen a la cura de las lesiones y a evitar amputaciones. Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación fue determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* en úlceras de pie diabético antes y después del tratamiento con larvas de *Lucilia sericata*.

Revisión bibliográfica

Las infecciones en la piel y tejidos blandos son las infecciones más frecuentes en los humanos y generalmente comprenden una respuesta inflamatoria o sistémica, de cuadro clínico variable (Arteaga y Arteaga, 2006). Pueden ser primarias al manifestarse en piel sana o con lesiones pequeñas, o secundarias cuando suceden en una piel alterada o con heridas (Sosa y Sosa, 2013). Los tejidos blandos son los tejidos, órganos y espacios ubicados entre la piel y los huesos. Están formados por tres capas: epidermis, dermis y tejido celular subcutáneo (Saavedra et al., 2011).

La microbiota de la piel está conformada por microorganismos que la colonizan establemente en la superficie, ya sean bacterias, hongos o parásitos; esta relación entre la piel y los microorganismos es beneficiosa para ambos, sin embargo, puede llegar a ser perjudicial tras romper el equilibrio entre huésped y la microbiota (Suárez, 2013).

La microbiota se divide en flora residente y flora transitoria. La primera es representada por organismos capaces de reproducirse y subsistir en la superficie cutánea. La segunda la conforman organismos que son depositados en la barrera cutánea desde el medio ambiente, pero no pueden adherirse a ella. Los microorganismos residentes son bacterias que incluye a: *Coryneiformes* (Ej. *Corynebacterium*), estafilococos coagulasa negativa (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. wameri*, *S. xilosus* y *S. simulans*), micrococcos, *Acinetobacter* (*A. baumannii*), *Pseudomonas* y Enterobacterias (*E. coli*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*). Los organismos transitorios que se asocian al proceso infeccioso están representados principalmente por bacterias Gram positivas como, *Streptococcus* del grupo A y *Staphylococcus aureus* (Santamaría y Alvarado, 2002).

En la infección del pie diabético se presentan con mayor frecuencia microorganismos del género *Staphylococcus* spp. (Hernández et al., 2014), seguido de los *Streptococcus* spp. (Segovia et al., 2017); se encuentran también *Enterococcus* spp., y bacilos Gram negativos como: *Pseudomonas* spp y Enterobacterias, entre otros microorganismos anaerobios (Beltrán et al. 2001; Martínez, 2004; Barberán, 2009; Bocanegra et al., 2013).

Las características microbiológicas de las úlceras en pie diabético varían en los diferentes tipos de infección y generalmente los microorganismos presentes proceden de la microbiota de la piel (Echevarría e Iglesias, 2003). El patógeno más importante en las ulceraciones diabéticas por su patología infecciosa es *Staphylococcus aureus*, ya sea como agente único o como parte de una infección mixta (Beltrán et al. 2001; Martínez, 2004; Barberán, 2009; Martínez et al., 2009; Echeverría et al., 2017). Además de *S. aureus*, en el pie diabético pueden encontrarse microorganismos multiresistentes debido a que los pacientes han recibido terapias que incluye a antibióticos, han sido intervenidos quirúrgicamente o han estado hospitalizados recientemente, tal es el caso de *Staphylococcus aureus* que es resistente a la meticilina (MRSA), estafilococos coagulasa negativa (SCN), enterococos, enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), bacilos Gram negativos o en ocasiones por hongos (Barberán, 2009; Echeverría et al., 2017).

Los *Staphylococcus*, son causantes de infecciones tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario, principalmente de las frecuentes en la piel y tejidos blandos y las relacionadas con la utilización de dispositivos médicos (catéteres y prótesis) (Cuevas et al., 2008). Estas constituyen uno de los problemas de mayor preocupación en salud pública en todo el mundo (Laspina et al., 2008), ya que poseen gran capacidad de formar biopelículas (*slime*) que los protegen de los antimicrobianos y de los mecanismos de defensas del hospedero (Barberán, 2009; López et al., 2016); además sintetizan enzimas que contribuyen a degradar los tejidos y ampliar su patogenicidad (Fariña et al., 2013).

Actualmente, han sido descritas alrededor de 32 especies de *Staphylococcus*, de las cuales 16 forman parte de la microbiota de la piel y mucosas del humano, volviéndose patógenos en pacientes inmunodeprimidos (Cervantes-García et al. 2014).

Los estafilococos son bacterias Gram positivas anaerobias facultativas que aparecen agrupadas en cadenas cortas, tétradas o en formas irregulares de racimos de uvas (Camarena y Sánchez, 2001), la mayoría de estos producen catalasa, y los diferencia de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, que son

negativos a esta prueba (Cervantes-García et al. 2014). Los *Staphylococcus* se clasifican en dos grupos, el primero que incluye a los coagulasa positiva como lo es *Staphylococcus aureus*, y el segundo grupo denominado coagulasa negativo (SCN) del cual las especies más importantes son *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. capitis* y *S. warneri* (Herrera et al., 2001).

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo, no móvil ni formador de esporas, agrupado en racimos similares a los de uvas, produce catalasa, coagulasa, hemólisis (la mayoría de las cepas) y es anaerobio facultativo. Sus colonias miden entre 1 a 3 mm y presenta pigmento amarillo (Bustos et al., 2006).

S. aureus es un patógeno de gran importancia médica por su alta morbi-mortalidad a nivel comunitario e intrahospitalario (Camarena y Sánchez, 2001; Bustos et al., 2006; Camussone y Calvino, 2013; Zendejas-Manzo et al. 2014; Cervantes-García et al. 2014) y es causante de múltiples enfermedades en humanos, entre ellas: infecciones de la piel y tejidos blandos (produce lesiones superficiales y abscesos), del sistema nervioso central, de las vías respiratorias, del tracto urinario e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis, que pueden comprometer la vida; además, ocasiona intoxicación alimentaria y el síndrome del shock tóxico (Bustos et al., 2006; Pérez et al., 2014).

En cuanto a los factores de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (figura 1 y tabla 1), los cuales aunados a su capacidad adaptativa (presencia de adhesinas) que propician la infección en el hospedero, se encuentra a la cápsula mucoide polisacárida y los componentes antígenos de la pared celular, la producción de enzimas (Ej. catalasa, coagulasa, hialuronidasa, estafiloquinasas, lipasas, beta-lactamasas y proteasas) y la secreción de toxinas (hemolisinas, leucotoxinas, enterotoxinas), que promueven la cronicidad de la infección, ya que permiten la adaptación del microorganismo (Camarena y Sánchez, 2001; Zendejas-Manzo et al. 2014; Cervantes-García et al. 2014).

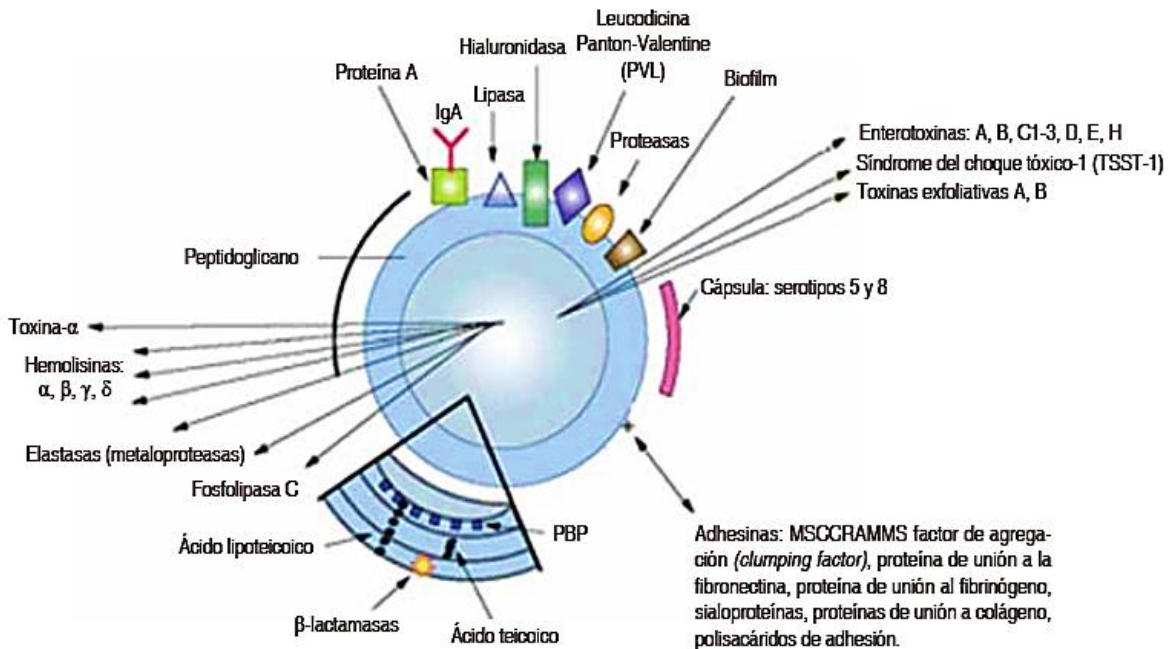


Figura 1. Factores de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (Cervantes-García et al., 2014).

La pared celular de la bacteria comprende dos componentes, el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano. Este último es un componente básico, ya que le confiere rigidez y resistencia osmótica a la bacteria, entre otras propiedades como: actividad endotóxica, producción de interleucina-1 por monocitos, estimula quimiotaxis y agregación de los leucocitos, activa al complemento además de producir anticuerpos opsonizantes.

Los ácidos lipoteicoicos están involucrados en el proceso inflamatorio y en la liberación de citosinas por los macrófagos y demás células que comprenden el sistema inmune (Cervantes-García et al. 2014).

La cápsula mucoide es una capa de polisacáridos que le proporciona adherencia a las mucosas del hospedero y le provee efecto antifagocítico a *Staphylococcus aureus* (Cueto y Pascual, 2009). Otros ácidos que juegan un papel importante en la cápsula mucoide son los teicoicos que contribuyen en la unión de la bacteria con la mucosa de los hospederos a partir de uniones específicas a la fibronectina. La proteína A presente también en la pared celular funciona como factor de

patogenicidad ya que activa al complemento e interfiere en las funciones de las inmunoglobulinas, por lo que previene la eliminación del microorganismo, inhibiendo la opsonización y la fagocitosis, además de que es fundamental para la identificación de *Staphylococcus aureus* (Seija, 2008).

Entre la producción de enzimas propias de las bacterias está la coagulasa con la capacidad de convertir sin intervención de factores plasmáticos al fibrinógeno en fibrina, produciendo la coagulación del plasma, lo cual origina sepsis y abscesos; con ello se evita la fagocitosis de las bacterias. La catalasa y la hialuronidasa son otras enzimas que se manifiestan en el proceso infeccioso, la primera, a partir de la degradación de peróxido de hidrógeno, brinda protección a las bacterias contra la fagocitosis, mientras que la segunda se encarga de degradar al ácido hialurónico de la matriz del tejido conectivo, lo cual promueve la diseminación de la infección.

Entre otras enzimas que produce *S. aureus* están: ADNasas, lipasas, estafiloquinasas, proteasas, penicilinasas y fosfatasas que contribuyen en la generalización de la infección y producción de lesiones (Camarena y Sánchez, 2001).

Staphylococcus aureus produce además toxinas involucradas también en el proceso infeccioso que incluye: las hemolisinas y las leucocidinas, ambas de acción general, y especializadas como las exfoliatinas o toxinas epidermolíticas, la toxina del shock tóxico y enterotoxinas.

Existen hemolisinas como la alfa, beta, gamma y delta, que tienen capacidad hemolítica y citolítica, y actúan hacia una variedad de células en el hospedero (leucocitos, neutrófilos, monocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y células endoteliales). La hemolisina alfa o alfa toxina, interviene en la presencia de edema y daño al tejido como consecuencia del cambio en la permeabilidad de las membranas (cambios en el balance iónico) de células endoteliales, esta toxina se considera neurotóxica y dermonecrótica y es la responsable principal de la hemólisis que se forma alrededor de las colonias de *S. aureus*.

Las leucocidinas causan la degranulación del citoplasma, hinchamiento celular y lisis en el huésped, tras la alteración de la permeabilidad celular. Las toxinas

exfoliatinas o epidermolíticas, tiene capacidad proteolítica (desencadena la exfoliación) y desarrollan el síndrome de la piel escaldada. Existen dos serotipos de estas toxinas, el A y el B, ambos actúan destruyendo los desmosomas del estrato granuloso de la epidermis, sin producir citólisis o inflamación (Camarena y Sánchez, 2001; Zendejas-Manzo et al. 2014).

Los superantígenos son proteínas que inactivan el sistema inmune, comprenden a la toxina del choque tóxico y las enterotoxinas estafilocócicas (15 enterotoxinas diferentes). Se encargan de inducir la liberación de citosinas por macrófagos y linfocitos T y son responsables de intoxicaciones alimentarias, al ser resistentes a las enzimas digestivas del hospedero, respectivamente (Cervantes-García et al. 2014).

Tabla 1. Factores de patogenicidad en *Staphylococcus aureus* (Zendejas-Manzo et al., 2014; Cervantes-García et al., 2014).

Factor de virulencia	Acción	Manifestaciones clínicas
Cápsula mucoide	Evita la quimiotaxis y fagocitosis Es una adhesina	Infecciones de piel y tejidos blandos Abscesos
Peptidoglicano	Estabilidad osmótica Actividad endotóxica Produce anticuerpos opsonizantes	
Ácido lipoteicoico	Participa en el proceso inflamatorio Libera citocinas por células del sistema inmune	
Ácido teicoico	Contribuye en la unión de la bacteria con la mucosa del huésped (uniones específicas a la fibronectina)	
Proteína A	Interfiere en las funciones de las inmunoglobulinas; Estimula respuesta inflamatoria Inhiben la opsonización y la fagocitosis	
Enzimas		
Coagulasa	Convierte el fibrinógeno en fibrina Coagula el plasma Evita la fagocitosis	Destrucción de tejidos Infecciones metastásicas Osteomielitis (Invasión y penetración de tejido en el hospedero)
Catalasa	Degrada peróxido de hidrógeno Evita la fagocitosis	
Hialuronidasa	Degrada el ácido hialurónico del tejido conectivo Disemina la infección	
DNASas Lipasas Estafiloquinasas Proteasas Colagenasas Fosfatasas Penicilinasas	Diseminan la infección en el tejido Producen lesiones Hidroliza la penicilina	
Toxinas		
Hemolíticas	Capacidad hemolítica y citolítica Neurotóxica Dermonecrotica	Edema Necrosis
Leucocidinas	Lisis celular	Infección de piel
Toxinas exfoliatinas o epidermolíticas	Capacidad proteolítica Lisis celular	Síndrome de piel escaldada
Toxina del choque tóxico	Inactivan el sistema inmune Liberación de citocinas Extravasación de las células endoteliales	Síndrome del shock tóxico Hipotensión
Enterotoxinas estafilocócicas	Inactivan el sistema inmune Presenta resistencia a enzimas digestivas	Intoxicaciones alimentarias

La infección se disemina al atravesar la barrera cutáneo-mucosa, las bacterias alcanzan rápidamente al tejido celular subcutáneo y forma abscesos, lo cual da manifiesto a la respuesta inflamatoria del hospedero y a la presencia de supuración (Castañón, 2012). Este tipo de infecciones en piel y tejidos blandos pueden hacerse más invasivas causando neumonía, osteomielitis, artritis, sepsis o inclusive la muerte (Seija, 2008).

Entre los componentes específicos de la bacteria que originan la adherencia a los tejidos del huésped, para su posterior colonización y resistencia a antibióticos, se cuenta con proteínas de la superficie conocidas como componentes microbianos de superficie que se adhieren a moléculas tisulares (MSCRAMM). Estas proteínas expresan gran patogenicidad, ya que incentivan la diseminación de *S. aureus*, a partir de su capacidad para unirse a otras proteínas como el fibrinógeno, la fibronectina y el colágeno. Una vez colonizada la superficie del tejido, *S. aureus* produce una biocapa bacteriana (biopelícula o *biofilm*) compuesta por polisacárido de adhesión intracelular (PIA), que la protege de la actividad del sistema inmune del hospedero y de los antimicrobianos (Cueto y Pascual, 2009; Castañón, 2012). Otros factores de virulencia son el depósito de complejos inmunes y su posterior liberación de necrosis tumoral, entre otras sustancias que desencadenan coagulación intravascular diseminada (Díaz, 2006).

Conjuntamente todos los factores anteriormente mencionados hacen a *Staphylococcus aureus* un patógeno sumamente peligroso para el hospedero.

En diversos estudios coinciden que los estafilococos coagulasa negativos (SCN), considerados por muchos años como contaminantes tras aislarse en diversos cuadros clínicos, juegan un papel importante en la etiología de infecciones (Herrera et al., 2001; Cuevas et al., 2008; Fariña et al., 2013) y se les ha asociado con bacteremias relacionadas a la utilización de dispositivos médicos (catéteres, válvulas, entre otras prótesis), abscesos superficiales, infecciones en la piel y tejidos blandos, oftalmológicas y urinarias (Pedrari, 2007).

Las especies de *Staphylococcus* mayormente involucradas en patologías infecciosas son: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus*; en menor

proporción están: *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. cohnii*, entre otros. La virulencia de los SCN refiere principalmente a la capacidad de algunas cepas de presentar adhesinas y formar biopelículas en determinado cuadro clínico (Pinheiro et al., 2016), lo cual les ayuda a adherirse y protegerse de la acción de los antimicrobianos, así como de los mecanismos de defensa del hospedero. Además, sintetizan enzimas extracelulares que incluye a lipasas, DNAasas, termonucleasas, hemolisinas, que contribuyen a degradar los tejidos y a que persista el proceso infeccioso (Fariña et al., 2013).

Estudios recientes han demostrado que entre 70 y 80% de los SCN son resistentes a la meticilina y actualmente surge entre ellos la resistencia a vancomicina o con concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de este; característica muy parecida a la que se presenta con *Staphylococcus aureus* (Montúfar et al., 2016).

De entre los SCN, *Staphylococcus epidermidis* predomina y es altamente resistente a múltiples antibióticos (Pedrari, 2007; Rodríguez et al., 2012; Fariña et al., 2013; Nakatsuji et al., 2018). Esta especie ha desarrollado resistencia similar a *S. aureus* hacia la meticilina, e incluso ha presentado tasas más altas de resistencia que este último (Breña et al., 2009). Además, suele ser resistente a macrólidos, lincosaminas, aminoglicósidos y fluoroquinolonas (García et al., 2003). Se conoce poco a cerca de su patogenicidad, sin embargo, su capacidad de producir biopelículas (desarrollo masivo de células bacterianas encerradas dentro de una matriz extracelular amorfa, está compuesta de DNA, proteínas y polisacáridos extracelulares) a partir del ácido teicoico que se encuentra en la pared celular de todos los estafilococos, le atribuye gran patogenicidad (Nguyen et al., 2017).

Staphylococcus haemolyticus es el segundo SCN aislado con mayor frecuencia en infecciones hospitalarias (Barros et al., 2012), asociadas principalmente con pacientes inmunodeprimidos y con aquellos que utilizan dispositivos médicos. Este microorganismo no es muy patógeno pero su éxito en el hospedero destaca por su alta resistencia a los antibióticos (Takeuchi et al., 2005), entre ellos las

penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, tetraciclinas, quinilonas, aminoglucósidos, glucopéptidos y fosfomicinas (Czekaj et al., 2015); Además, fue el primero de los SCN en mostrar resistencia a la vancomicina (Fariña et al., 2013).

Otro SCN de importancia médica es *Staphylococcus saprophyticus*, causante frecuente de infecciones en el tracto urinario principalmente en mujeres (Hirsell, 2004), puede también causar este tipo de infecciones en niños, niñas y hombres de cualquier edad. Se ha relacionado con endocarditis y bacteremias (Orden et al., 2008), sin embargo, presenta mayor adherencia a células uroepiteliales. Generalmente es susceptible a la mayoría de los antibióticos empleados en infecciones urinarias, a excepción del ácido nalidíxico (Raz et al., 2005), y no es hemolítico (Fariña et al., 2005). Dentro de los factores de patogenicidad presentes en *S. saprophyticus* están las adhesinas que se unen a la fibronectina, entre otras proteínas como la (hemaglutinina), asociadas a la superficie.

En la tabla 2 se muestran los factores de patogenicidad de estafilococos coagulasa negativo (SCN).

Tabla 2. Factores de patogenicidad de estafilococos coagulasa negativo (SCN), significativos en patología infecciosa (Takeuchi et al., 2005; Seija, 2008).

Estafilococos coagulasa negativa (SCN)	Factor de virulencia	Acción
<i>S. epidermidis</i> <i>S. saprophyticus</i>	Adhesinas PS/A*	Adhesión bacteriana a la superficie de cuerpos extraños
	Otras proteínas asociadas a la superficie	
	Formación de biopelículas	Protección ante los antimicrobianos y defensas del huésped
		Diseminación bacteriana
<i>S. haemolyticus</i> <i>S. epidermidis</i>	Multirresistencia a los antibióticos **	Falta de actividad antimicrobiana

*(APS) adhesina polisacárida capsular

***Staphylococcus haemolyticus* con alta resistencia

En todos los estafilococos la resistencia a los antimicrobianos fue reportada desde 1960 (Laspina et al., 2008; Miranda, 2011), principalmente ante los betalactámicos (metecilina, oxacilina, cefalosporinas de primera y hasta cuarta generación y carbapenems), su resistencia está influida por la sobreproducción de proteína de unión a penicilina (PBP) que a su vez esta codificada por el gen *mecA* (González et al., 2005; Castro et al., 2006), lo que impide que el antibiótico pueda adherirse y bloquear la acción de la enzima transpeptidasa (Bermejo et al. 2012). Existe también un mecanismo de resistencia que se presenta ante otros grupos de antibióticos como las quinolonas (ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino, ácido nalidíxico y moxifloxacino) y las lincosamidas como lincomicina y clindamicina (Echevarría e Iglesias, 2003).

La resistencia se da por distintos mecanismos que favorecen su subsistencia, entre ellos: la inactivación enzimática de las bacterias (en la cual estas producen una enzima que se encarga de alterar o destruir la estructura química de un antibiótico determinado, la alteración de las barreras de permeabilidad (que impide al antibiótico poder traspasar la membrana o genera su expulsión) y la modificación o cambio del sitio blanco (los sitios blanco son proteínas o algún otro componente de la estructura bacteriana a las cuales se une el antibiótico para posteriormente ejercer su acción antimicrobiana, la bacteria altera el sitio blanco y con esto impide la función antibiótica) (Echevarría e Iglesias, 2003).

Actualmente la multirresistencia presente en los estafilococos ha incrementado la morbi-mortalidad y los costos en la atención de infecciones originados por el mismo (Cervantes-García et al. 2014; Silva J, 2006; Echevarria e Iglesias, 2003); Por lo que es de importancia clínica el determinar precozmente la presencia de los microorganismos implicados (Hernández, 2014).

Los métodos tradicionales de identificación bacteriana se basan en la caracterización fenotípica, a partir de las características observables físicas y tintoriales (morfología de las colonias y tinción de Gram) de las bacterias, así como sus propiedades bioquímicas y metabólicas (Harvé, 2015)

Con la caracterización fenotípica es posible determinar a nivel de género y especie la identidad del o los microorganismos implicados en el proceso infeccioso, sin embargo, no proporcionan una identificación certera. El método consiste en comparar las características fenotípicas de las bacterias a estudiar con aquellas que ya se conocen (Cercenado y Cantón, 2010; Harvé, 2015).

Para la identificación fenotípica de las bacterias se realizan pruebas bioquímicas determinantes (aquellas reacciones que evidenciarán la capacidad de producir enzimas o catabolizar sustratos), entre las que se encuentran: la prueba de catalasa, oxidasa, ureasa, coagulasa, DNAsa, hidrolisis de gelatina, lipasa, decarboxilasas, utilización de citratos, indol, óxido-fermentación, reducción de nitratos y nitritos, rojo de metilo, fermentación de azúcares, entre otras pruebas determinantes de resistencia a ciertas sustancias (Bou et al., 2011).

Para la identificación de los estafilococos, generalmente utilizan las siguientes pruebas: catalasa (permite diferenciar a los estafilococos de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*), coagulasa (para diferenciar a *Staphylococcus aureus* de otras especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos), desoxirribonucleasa (DNAsa, presente en *S. aureus*), nucleasa termoestable, ureasa y susceptibilidad a la Novobiocina (que diferencia a *S. saprophyticus* de los SCN) (Hernández et al., 2005; Seija, 2008; Zendeja et al., 2014). Además de la fermentación de manitol y glucosa, y la producción de fosfatasa alcalina (Cervantes-García et al. 2014). En cuanto a su capacidad para crecer en presencia o ausencia de aire, el género es aerobio-anaerobio facultativo (Seija, 2008).

Los medios de cultivo selectivos para aislar a *Staphylococcus*, se utiliza, principalmente, agar sal y manitol o medio de Chapman, agar estafilococos No. 110 y agar ADNasa (Zendejas-Manzo et al. 2014). Se dice también, que en medios de cultivos no selectivos como agar sangre, agar chocolate y agar infusión cerebro-corazón, los estafilococos presenta un buen crecimiento (Cervantes-García et al. 2014).

En la tabla 3 se muestran las características microbiológicas principales de los *Staphylococcus* patógenos.

Tabla 3. Características microbiológicas para la identificación de los *Staphylococcus* patógenos (García et al., 2003; Hernández et al., 2005; Castro et al., 2006; Seija, 2008; Fariña et al., 2013; Zendeja et al., 2014; Cervantes et al. 2014).

Criterio	Especie			
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Coagulasa	+	-	-	-
DNAasa	+	-	+	-
Nucleasa termoestable	+	-	-	-
Ureasa	V	+	-	+
Susceptibilidad a la Novobiocina	R	R	R	R
Fermentación de manitol	+	-	V	+
Fermentación de glucosa	+	+	+	-
Anaerobio facultativo	+	+	+	-

V: variable; R: resistente

Con base en la tabla anterior, *Staphylococcus aureus* es la especie más virulenta en comparación con los estafilococos coagulasa negativos que muestran comportamientos metabólicos mayormente negativos a las pruebas descritas.

Objetivo

Determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* en úlceras de pie diabético antes y después del tratamiento con larvas de *Lucilia sericata*.

Material y métodos

Durante el mes de febrero a septiembre de 2017, se incluyeron pacientes diabéticos con úlcera infectada en pie que cumplieron los criterios de inclusión, esto es ambos géneros de entre 50 y 70 años de edad, sin administración de tratamiento antibiótico y sin haber estado hospitalizado tres semanas previo a su participación en el proyecto: Aplicación de larvas de mosca *Lucilia sericata*, como control biológico de *Staphylococcus aureus* en úlceras de pie diabético. Se inició la aplicación del tratamiento a partir de la firma del consentimiento informado por cada paciente de acuerdo con Contreras et al. (2016).

Colecta y procesamiento de muestra bacteriológica antes y después de aplicar tratamiento con larvas estériles

Antes de coleccionar la muestra para su posterior análisis fue indispensable limpiar con suero fisiológico estéril la zona de la úlcera y secar con gasas estériles ligeramente presionadas. Una vez realizada esta acción, se procedió a coleccionar la muestra de exudado en el interior de úlceras en pie diabético, la toma se realizó antes y después de aplicar el tratamiento con larvas de mosca *Lucilia sericata*, previamente esterilizadas (descrito en el capítulo 2 de este documento). El lapso de tiempo para obtener la muestra bacteriológica, posterior al tratamiento fue de entre 48 a 72 horas, esto de acuerdo al crecimiento de las larvas en la herida.

La muestra de exudado se tomó mediante un frotis con hisopo estéril de algodón en lo más profundo de la úlcera y se inoculó en tubos de ensaye conteniendo caldo soya tripticasa, seguido se incubó el cultivo a 37°C por 24 horas. Pasado este tiempo, se sembró en agar sal y manitol y se dejó nuevamente en incubadora durante 24 horas a 37°C. Este mismo procedimiento se realizó en ambas colectas de muestras, antes y después de aplicar tratamiento con larvas.

Observaciones macroscópicas de las colonias bacterianas

Se observaron las características de las colonias crecidas en el medio de cultivo selectivo (para el género *Staphylococcus*) agar sal y manitol y se hicieron registros del tamaño, forma, consistencia y color de las colonias seguido del aislamiento de estas, considerando la formación de pigmento amarillo (distintivo de *S. aureus*).

Análisis microscópico

Mediante la técnica de siembra y resiembra se obtuvieron cultivos bacterianos puros, caracterizados mediante tinción de Gram (anexo 3A) y observación al microscopio óptico; se observó la morfología de la bacteria, su afinidad tintorial y su manera de agrupación. Los cultivos puros fueron conservados en viales conteniendo agar soya.

Nomenclatura de los cultivos bacterianos

Para diferenciar a los cultivos se utilizó una clave asignada a cada paciente de acuerdo al orden de atención: primer paciente (1), segundo (2), tercero (3) y cuarto (4), seguido de una A para indicar la toma de muestra antes del tratamiento y una D si fue tomada posterior a este; se añadió una letra del alfabeto (minúscula) para diferenciar a las colonias aisladas en un cultivo original, y un número (en su caso) para indicar que es un aislado de la colonia aislada del cultivo original. Por ejemplo: 1Ae1, es la muestra del paciente 1 tomada antes del tratamiento, de la colonia e y su aislamiento 1; 1Da1 es el cultivo perteneciente al paciente 1 después de aplicar el tratamiento, de la colonia a y su aislado 1.

Caracterización metabólica de los cultivos bacterianos mediante pruebas bioquímicas

Se procedió a realizar pruebas bioquímicas a los cultivos puros para caracterizarlos metabólicamente. Las pruebas bioquímicas y de producción de enzimas empleadas fueron las siguientes: utilización de sustratos (glucosa, fructuosa, lactosa, maltosa, sacarosa, manitol, sorbitol y dextrosa) como única fuente de carbono y energía; óxido-fermentación en glucosa y fructuosa para conocer su metabolismo respiratorio, reducción de nitratos y nitritos, así como pruebas de producción de coagulasa, DNAasa, ureasa, lipasa, gelatinasa y actividad hemolítica, todo con base en los procedimientos realizados en el laboratorio de Ecología Microbiana por la Dra. María Teresa Núñez-Cardona y el Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez (anexo 3B).

Respuesta a los antibióticos por los cultivos puros bacterianos

Se procedió a realizar la prueba de susceptibilidad a antibióticos para Gram positivos, a todos los cultivos puros. La prueba consistió en inocular con 1.0 mL de

cultivo (previo crecimiento durante una hora en caldo soya tripticasa) una caja Petri conteniendo agar Müller-Hinton, continuamente se colocó un disco de sensibilidad bacteriana (marca ACCUTRACK) comprendiendo los 14 antibióticos específicos para bacterias Gram positivas. Tras incubarlos a 28°C durante 16 a 18 horas, se procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición en cada antibiótico.

Los antibióticos incluidos en COMBI DISC MULTIDISCOS de ACCUTRACK fueron los siguientes: penicilina-G PG (10IU), amoxicilina AX (10 µg), cefalotina/amoxicilina-ac. clavulánico AC/AMC (30 µg), cotrimoxazol CT/SXT (25 µg), cefalexina CP/CFM (30 µg), cefazolina CF/CFZ (30 µg), cefuroxima CR/XM (30 µg), eritromicina ER/EM (15 µg), cloranfenicol CK/C (30 µg), ciprofloxacina CL/CI (15 µg), Ofloxacina OF (30 µg), piperaciclina PC/PI (30 µg), azitromicina AZ (15 µg) y tetraciclina TE (30 µg).

La lectura de los diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento alrededor de los discos se interpretó de acuerdo con el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2000, 2015, 2016 y 2017 (anexo 3C).

Resultados

Colecta y procesamiento de muestras bacteriológicas

Se colectaron dos muestras bacteriológicas (correspondientes al antes y después del tratamiento larval) por cada paciente. Se obtuvieron un total de 32 cultivos puros bacterianos provenientes de cuatro pacientes con úlceras en pie diabético; 13 cultivos pertenecientes al paciente uno (P1), tres al paciente dos (P2), tres al paciente tres (P3) y 13 al paciente cuatro (P4).

Características morfológicas, coloniales y celulares de los cultivos bacterianos

En la tabla 1 pueden apreciarse las características macroscópicas y microscópicas de los cultivos bacterianos obtenidos. En las características macroscópicas se describen el color de las colonias crecidas en agar sal manitol y su tamaño; en las microscópicas se muestra su respuesta a la tinción de Gram, el tipo celular y su formación.

El crecimiento de colonias en medio de cultivo agar sal manitol antes del tratamiento larval fue de color amarillo y posterior a este fue de color blanco, en los pacientes P1, P3 y P4; tras las observaciones al microscopio y aplicada la tinción de Gram se determinó la presencia de estafilococos Gram + en todos los casos.

El P2 presentó crecimiento de colonias blancas en agar sal y manitol previo a la aplicación del tratamiento y amarillas posterior a este; en cuanto a sus características microscópicas se observó un estafilococo Gram + (cultivo2Aa1) y dos cocobacilos Gram + (2Da y 2Da1).

Tabla 1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los cultivos bacterianos aislados de úlceras en pie diabético.

Muestra		Características macroscópicas		Características microscópicas
		Crecimiento de colonias en agar sal manitol (color)	Tamaño de colonia	tipo, formación y respuesta a tinción de Gram
Antes	1Aa	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	1Ab	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	1Ac	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	1Ad	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	1Ad1	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	1Ad2	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	1Ae	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	1Ae1	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	1Ae2	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	1Af	amarillo	grande	estafilococo Gram +
Después	1Af1	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	1Da	blanco	grande	estafilococo Gram +
Antes	1Da1	blanco	grande	estafilococo Gram +
Después	2Aa1	blanco	grande	estafilococo Gram +
	2Da	amarillo	grande	cocobacilo Gram +
Antes	2Da1	amarillo	grande	cocobacilo Gram +
Después	3Aa	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	3Aa1	amarillo	grande	estafilococo Gram +
Antes	3Da	blanco	grande	estafilococo Gram +
	4Aa	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	4Aa1	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	4Aa2	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	4Aa3	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	4Ab	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	4Ac	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	4Ad	amarillo	grande	estafilococo Gram +
Después	4Ad1	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	4Ad2	amarillo	grande	estafilococo Gram +
	4Da	blanco	grande	estafilococo Gram +
	4Da1	blanco	grande	estafilococo Gram +
Después	4Db	blanco	grande	estafilococo Gram +
	4Dc	blanco	grande	estafilococo Gram +

Caracterización metabólica de los cultivos bacterianos mediante pruebas bioquímicas

En la figura 1 se presentan los resultados del número de cultivos aislados de úlceras en pie diabético, capaces de utilizar a diferentes sustratos orgánicos como única fuente de carbono, su metabolismo respiratorio y su capacidad para reducir nitratos.

La utilización de glucosa y de dextrosa fue catabolizada por más del 93% de los cultivos bacterianos, mientras que los sustratos: sorbitol con 15% y manitol con 12% fueron utilizados con menor frecuencia. Un 78% de los cultivos fueron anaerobios facultativos en fructuosa y un 59% en glucosa; 68% de los cultivos presentó capacidad para reducir nitratos.

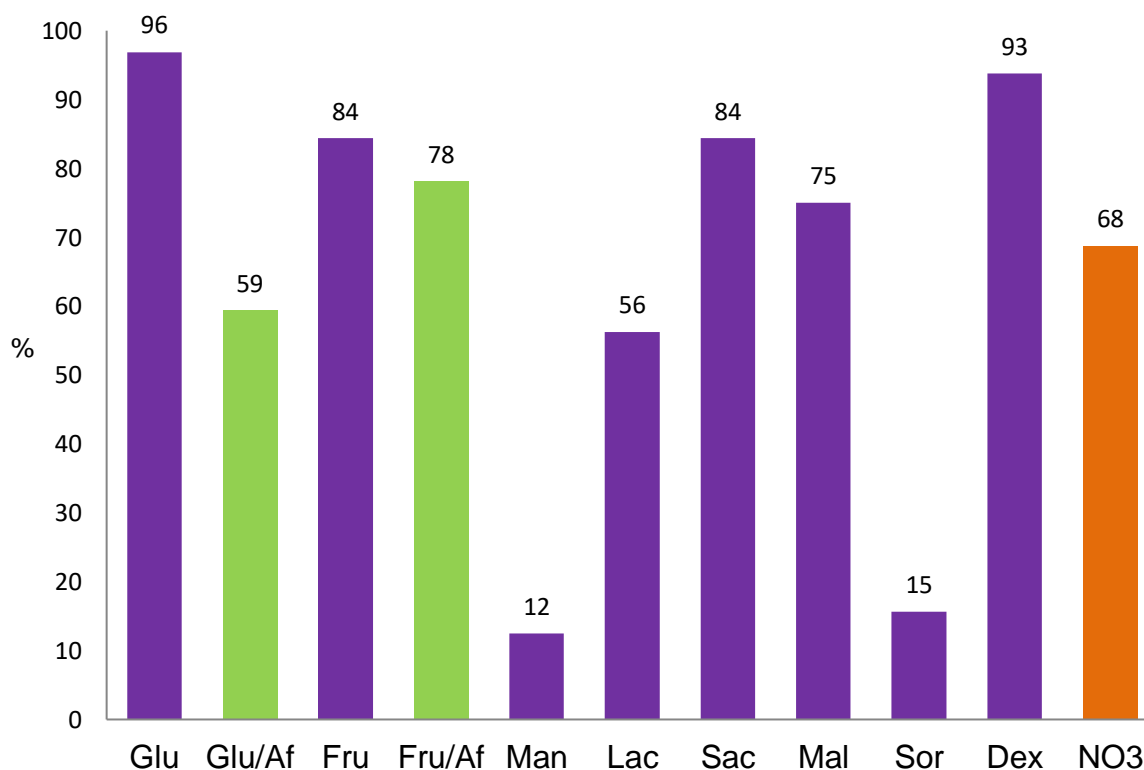


Figura 1. Utilización de sustratos, metabolismo respiratorio y reducción de nitratos por los cultivos puros bacterianos aislados de úlceras en pie diabético.

Glu: glucosa; Glu/Af: anaerobio facultativo en glucosa; Fru: fructuosa; Fru/Af: anaerobio facultativo en fructuosa; Man: manitol; Lac: lactosa; Sac: sacarosa; Mal: maltosa; Sor: sorbitol; Dex: dextrosa; NO₃: reducción de nitratos.

La producción de enzimas extracelulares y la actividad hemolítica se presentan en la figura 2.

La producción de lipasa y DNAsa fue de un 9% del total de los cultivos bacterianos; el menor porcentaje (3%) resultó en la producción de gelatinasa. Un 50% de los cultivos presentó actividad hemolítica.

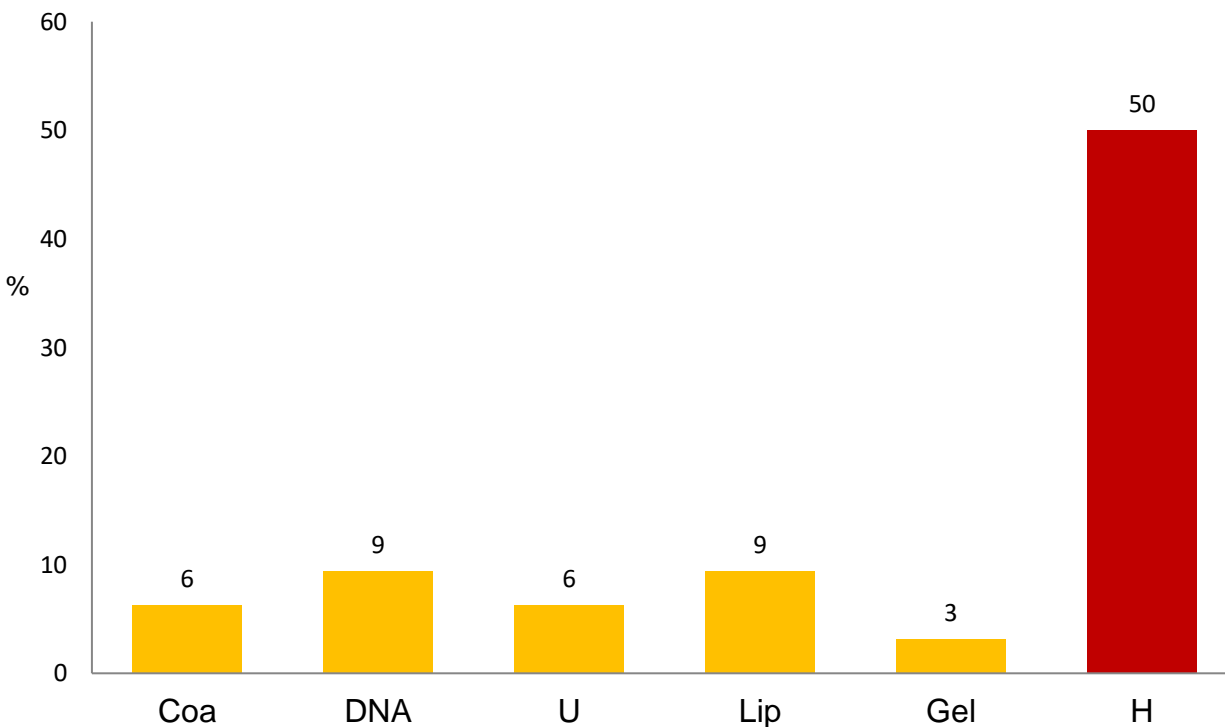


Figura 2. Producción de enzimas extracelulares y actividad hemolítica por los cultivos puros bacterianos aislados de úlceras en pie diabético.

Coa: coagulasa; DNA: DNAsa; U: ureasa; Lip: lipasa; Gel: gelatinasa; H: hemólisis.

En las tablas de la 2 a la 5 se presentan los resultados de la actividad de los cultivos aislados en los diferentes pacientes ante los sustratos ensayados, su capacidad de producir enzimas extracelulares, su metabolismo respiratorio y su capacidad de reducir a los nitratos.

En la tabla 2, se presentan los cultivos del P1, en general no presentaron factores de virulencia, solo 1 cultivo fue hemolítico (1Da1) y otro produjo ureasa (1Ae). El éxito de estos cultivos probablemente se debe a su capacidad de utilizar diferentes compuestos orgánicos.

Tabla 2. Características fisiológica de los cultivos bacterianos aislados del paciente uno.

Paciente	Cultivo	Pruebas bioquímicas															
		Coa	H	DNA	U	Lip	Gel	Glu/Af	Fru/Af	Man	Lac	Sac	Mal	Sor	Dex	NO ₃	
1	Antes	1Aa	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+	+	+	-	+	+
		1Ab	-	-	-	-	-	-	+/-	+/+	-	+	+	+	-	+	+
		1Ac	-	-	-	-	-	-	+/-	+/+	-	+	+	+	-	+	+
		1Ad	-	-	-	-	-	-	+/-	+/+	-	+	+	+	-	+	+
		1Ad1	-	-	-	-	-	-	+/-	+/+	-	+	+	+	-	+	+
		1Ad2	-	-	-	-	-	-	+/-	+/+	-	+	+	+	-	+	+
		1Ae	-	-	-	+	-	-	+/-	+/+	+	+	+	+	-	+	+
		1Ae1	-	-	-	-	-	-	+/-	+/+	-	+	+	+	-	+	+
		1Ae2	-	-	-	-	-	-	+/+	+/+	-	+	+	+	+	+	-
		1Af	-	-	-	-	-	-	+/+	+/+	-	+	+	+	-	+	-
		1Af1	-	-	-	-	-	-	+/-	+/+	-	+	+	+	-	+	-
	Después	1Da	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-	-	+	+	+	-	+	-
		1Da1	-	+	-	-	-	-	+/-	+/+	-	-	+	+	-	+	+

Coa: coagulasa; H: hemólisis; DNA: DNAasa; U: ureasa; Lip: lipasa; Gel: gelatinasa; Glu: glucosa; Glu/Af: anaerobio facultativo en glucosa; Fru: fructuosa; Fru/Af: anaerobio facultativo en fructuosa; Man: manitol; Lac: lactosa; Sac: sacarosa; Mal: maltosa; Sor: sorbitol; Dex: dextrosa; NO₃: reducción de nitratos.



 +
 -

Todos los cultivos del P2 (tabla 3) son hemolíticos, además de utilizar todos los sustratos orgánicos ensayados, con excepción de manitol. El cultivo 2Da también produce DNAasa y el 2Aa1 lipasa, lo cual les confiere mayor patogenicidad.

Tabla 3. Caracterización fisiológica de los cultivos bacterianos aislados del paciente dos.

Paciente	Cultivo		Pruebas bioquímicas														
			Coa	H	DNA	U	Lip	Gel	Glu/Af	Fru/Af	Man	Lac	Sac	Mal	Sor	Dex	NO ₃
2	Antes	2Aa1	-	+	-	-	+	-	+/+	+/+	-	+	+	+	+	+	-
	Después	2Da	-	+	+	-	-	-	+/-	+/-	-	+	+	+	+	+	-
		2Da1	-	+	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+	+	+	+	+

Coa: coagulasa; H: hemólisis; DNA: DNAasa; U: ureasa; Lip: lipasa; Gel: gelatinasa; Glu: glucosa; Glu/Af: anaerobio facultativo en glucosa; Fru: fructuosa; Fru/Af: anaerobio facultativo en fructuosa; Man: manitol; Lac: lactosa; Sac: sacarosa; Mal: maltosa; Sor: sorbitol; Dex: dextrosa; NO₃: reducción de nitratos.

 +
 -

Como puede observarse en la tabla 4, los cultivos pertenecientes al P3 mostraron gran patogenicidad; por su capacidad de utilizar todos los sustratos con excepción de lactosa y sorbitol y ser anaerobios facultativos en glucosa y fructuosa. Los cultivos 3Aa y 3Aa1 obtenidos de la muestra antes de aplicar tratamiento con larvas fueron coagulasa positivos, además, en el caso del 3Aa fue lipasa positivo. El cultivo 3Aa1 fue DNAasa y ureasa positivo. La actividad hemolítica resultó en los cultivos 3Aa y3Da.

Tabla 4. Caracterización fisiológica de los cultivos bacterianos aislados del paciente tres.

Paciente	Cultivo		Pruebas bioquímicas														
			Coa	H	DNA	U	Lip	Gel	Glu/Af	Fru/Af	Man	Lac	Sac	Mal	Sor	Dex	NO ₃
3	Antes	3Aa	+	+	-	-	+	-	+/+	+/+	+	+	+	+	+	+	-
		3Aa1	+	-	+	+	-	-	+/+	+/+	+	-	+	+	-	+	-
	Después	3Da	-	+	+	-	+	-	+/+	+/+	+	-	+	+	-	+	-

Coa: coagulasa; H: hemólisis; DNA: DNAasa; U: ureasa; Lip: lipasa; Gel: gelatinasa; Glu: glucosa; Glu/Af: anaerobio facultativo en glucosa; Fru: fructuosa; Fru/Af: anaerobio facultativo en fructuosa; Man: manitol; Lac: lactosa; Sac: sacarosa; Mal: maltosa; Sor: sorbitol; Dex: dextrosa; NO₃: reducción de nitratos.



 +
 -

Uno de los factores de patogenicidad presente en la mayoría de los cultivos del P4 fue la hemólisis, el metabolismo respiratorio anaerobio facultativo en glucosa y fructuosa, y la capacidad de reducir nitratos en los aislado de la muestra antes y después de aplicar el tratamiento larval. La utilización de sustratos como la glucosa, fructuosa, sacarosa y dextrosa, fue mayor en los cultivos obtenidos de antes del tratamiento.

Tabla 5. Caracterización fisiológica de los cultivos bacterianos aislados del paciente cuatro.

Paciente	Cultivo	Pruebas bioquímicas															
		Coa	H	DNA	U	Lip	Gel	Glu/Af	Fru/Af	Man	Lac	Sac	Mal	Sor	Dex	NO ₃	
4	Antes	4Aa	-	+	-	-	-	-	+/+	+/+	-	-	+	+	-	+	+
		4Aa1	-	+	-	-	-	-	+/+	+/+	-	-	+	-	-	+	+
		4Aa2	-	-	-	-	-	-	+/+	+/+	-	+	+	-	-	+	+
		4Aa3	-	-	-	-	-	-	+/+	+/+	-	+	+	+	-	+	+
		4Ab	-	+	-	-	-	-	+/+	+/+	-	-	+	+	-	+	+
		4Ac	-	+	-	-	-	+	+/+	+/+	-	-	+	-	-	+	+
		4Ad	-	+	-	-	-	-	+/+	-/-	-	-	-	-	-	-	+
		4Ad1	-	-	-	-	-	-	+/+	+/+	-	-	+	+	-	+	+
	4Ad2	-	+	-	-	-	-	+/+	+/+	-	-	+	+	-	+	+	
	Después	4Da	-	+	-	-	-	-	+/+	+/-	-	-	-	-	-	-	+
		4Da1	-	+	-	-	-	-	+/+	-/-	-	-	-	-	-	+	+
		4Db	-	+	-	-	-	-	+/+	-/-	-	-	-	-	-	+	+
		4Dc	-	+	-	-	-	-	+/+	-/-	-	-	-	-	-	+	+

Coa: coagulasa; H: hemólisis; DNA: DNAasa; U: ureasa; Lip: lipasa; Gel: gelatinasa; Glu: glucosa; Glu/Af: anaerobio facultativo en glucosa; Fru: fructuosa; Fru/Af: anaerobio facultativo en fructuosa; Man: manitol; Lac: lactosa; Sac: sacarosa; Mal: maltosa; Sor: sorbitol; Dex: dextrosa; NO₃: reducción de nitratos.

 +
 -

Respuesta a los antibióticos por los cultivos puros bacterianos

De manera general en la figura 3 se muestra la respuesta de todos los cultivos bacterianos aislados de úlceras en pie diabético a los antibióticos ensayados. La sensibilidad antimicrobiana estuvo presente en un 84% de los cultivos frente a amoxicilina/ác. clavulánico y cloranfenicol, en 75% a cefazolin, en 69% ante azitromicina, en 66% a cotrimoxazol y tetraciclina, 59% a amoxicilina, 56% a eritromicina y piperaciclina, 53% a ciprofloxacina y un 50% cefuroxima. La resistencia tuvo un valor alto de 88% de los aislados ante penicilina, seguido de 44% hacia cefalexina y ofloxacina, y 41% a amoxicilina, ciprofloxacina y piperaciclina.

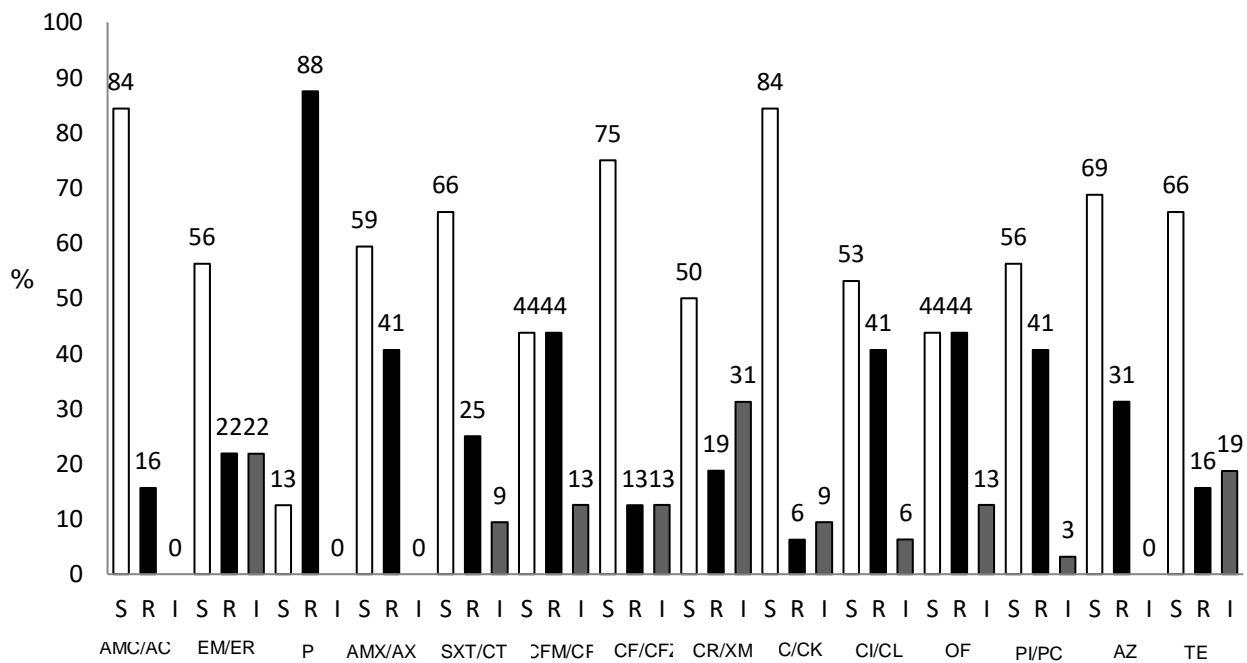


Figura 3. Respuesta de los cultivos bacterianos a los antibióticos ensayados.

S: sensible (blanco); R: resistente (negro); I: intermedio (gris).

AMC/AC: amoxicilina/Ác. clavulánico; EM/ER: eritromicina; P: penicilina; AMX/AX: amoxicilina; SXT/CT: cotrimoxazol; CFM/CF: cefalexina; CF/CFZ: cefazolin; CR/XM: cefuroxima; C/CK: cloranfenicol; CI/CL: ciprofloxacina; OF: ofloxacina; PI/PC: piperaciclina; AZ: azitromicina; TE: tetraciclina.

En la tabla 6 se presenta la respuesta de los aislados bacterianos de cada paciente a los antibióticos ensayados. Los cultivos del P1 solo resultaron resistentes a la penicilina, con excepción de unos cultivos que lo fueron a cefalexina (1Ad), a ofloxacina (1Aa) y a piperaciclina (1Ae1). En el P2 la mayor resistencia se observó ante eritromicina y azitromicina (cultivos 2Da y 2Da1), un solo cultivo presentó además resistencia ante penicilina y tetraciclina (2Da). Los cultivos 3Aa y 3Aa1 del P3 presentaron resistencia a múltiples antibióticos como: amoxicilina/ác. clavulánico, eritromicina, penicilina, amoxicilina, cefalexina, cefazolin, cefuroxima, ciprofloxacina, ofloxacina y azitromicina, el cultivo 3Aa lo fue también a piperaciclina. En la P4 un mayor número de cultivos presentó multirresistencia, entre ellos a penicilina, amoxicilina, cotrimoxazol, cefalexina, ciprofloxacina, ofloxacina, piperaciclina, azitromicina y tetraciclina, en menor número lo fue ante amoxicilina/ác. clavulánico, eritromicina, cefazolin, cefuroxima y cloranfenicol.

Tabla 6. Respuesta de los cultivos puros bacterianos de cada paciente a los antibióticos ensayados.

Paciente	Cultivo	AMC/AC	EM/ER	P	AMX/AX	SXT/CT	CFM/CP	CF/CFZ	CR/XM	C/CK	CI/CL	OF	PI/PC	AZ	TE	
1	Antes	1Aa			R							R				
		1Ab			R			I						I		I
		1Ac			R											I
		1Ad			R			R								I
		1Ad1			R					I	I					
		1Ad2			R											I
		1Ae			R											I
		1Ae1		I	R									R		
		1Ae2			R			I								
		1Af			R					I						
		1Af1			R											I
	Después	1Da			R						I		I			
		1Da1			S								I			
2	Antes	2Aa1														
		2Da		R	R											
	Después	2Da1		R	S										I	
3	Antes	3Aa	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	
		3Aa1	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	
	Después	3Da														
4	Antes	4Aa		I	R			I		I		R				
		4Aa1		I	R			I				I				
		4Aa2	R		R		I									
		4Aa3			R		I									
		4Ab			R				I							
		4Ac			R											
		4Ad			R					I						
		4Ad1			R							I				
		4Ad2		I	R		I				I	I	S			
	Después	4Da			R											
		4Da1			R											
		4Db			R											
		4Dc		I	R				I	I						

S: sensible (blanco); R: resistente (negro); I: intermedio (gris).
 AMC/AC: amoxicilina/Ác. clavulánico; EM/ER: eritromicina; P: penicilina; AMX/AX: amoxicilina; SXT/CT: cotrimoxazol; CFM/CP: cefalexina; CF/CFZ: cefazolin; CR/XM: cefuroxima; C/CK: cloranfenicol; CI/CL: ciprofloxacina; OF: ofloxacina; PI/PC: piperaciclina; AZ: azitromicina; TE: tetraciclina.

Discusión

De acuerdo con los resultados obtenidos tras la caracterización macroscópica y microscópica, 30 de los 32 aislados (94%) de las úlceras infectadas en pie diabético presentan características morfológicas del género *Staphylococcus*, tal como lo describen Camarena y Sánchez (2001) y Bustos et al., (2006) indicando que la forma y arreglo celular corresponde a cocos Gram positivos agrupados principalmente en racimos, sus colonias pueden ser de color rosa, blancas y en algunos casos amarillas (específicas de *S. aureus*) en medios de cultivos selectivos como el agar sal manitol. El tamaño de las colonias varía entre 1 a 3 mm.

En este estudio el crecimiento bacteriano se realizó en medio de cultivo agar sal manitol y se observó en los pacientes P1, P3 y P4, la coloración amarilla de las colonias en la muestra obtenida previo a aplicar el tratamiento con larvas de *Lucilia sericata* en las ulceraciones, lo anterior podría sugerir la presencia probable de *Staphylococcus aureus* en las lesiones, sin embargo, esto se corroboró posteriormente (de forma presuntiva) con la realización de pruebas bioquímicas convencionales (de mayor importancia para esta especie, la producción de coagulasa). En las muestras de los mismos pacientes (P1, P3 y P4) posterior a la aplicación del tratamiento se observó el crecimiento de colonias blancas, lo cual deduce la participación de los estafilococos coagulasa negativa, dentro de ellos, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus* que están relacionados con patologías infecciosas (Pedrari, 2007).

En el P2 se presentó el crecimiento de colonias blancas previo al tratamiento larval y amarillo posterior a este, es de importancia mencionar que en este caso solo se identificó (mediante la tinción de Gram) un aislado con característica morfológicas del género *Staphylococcus*, los demás resultaron cocobacilos Gram positivos. La literatura reporta la participación de bacilos en las úlceras de pie diabético, pero son principalmente los Gram negativos como *Pseudomonas* spp y Enterobacterias (Beltrán et al. 2001; Martínez, 2004; Barberán, 2009; Bocanegra et al., 2013).

Se identificó mediante pruebas bioquímicas a los estafilococos Gram positivos aislados de los pacientes diabéticos con úlcera infectada en pie, específicamente por la prueba de coagulasa que diferencia a *Staphylococcus aureus* de las otras especies de estafilococos que son negativos a esta prueba (Herrera et al., 2001). Tan solo un 6% de todos los cultivos resultó ser coagulasa positiva y probablemente *S. aureus*.

En la literatura reportan que en las úlceras de pie diabético *Staphylococcus aureus* es uno de los microorganismos más importantes por su patología infecciosa (Beltrán et al. 2001; Macías et al., 2011; Cruz et al., 2013; Hernández et al., 2014; Espinoza et al, 2014; Sajona et al., 2018). Y en un estudio realizado por Martínez et al. (2009) *S. aureus* fue aislado con mayor frecuencia, seguido de *Pseudomonas aureginosa* y *Enterococcus* spp. en pie diabético. Por otro lado, García et al. (2014) hicieron un estudio comprendido entre el año 2005 y 2010, en el que *S. aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* estuvieron asociados a infección en más de la mitad de pacientes diabéticos con úlcera en pie. Echeverría et al. (2017) señalaron que además de *S. aureus* en las úlceras crónicas de pie diabético se encontraron bacterias resistentes a los antibióticos como *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), estafilococos coagulasa negativa (SCN), *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, publicaciones recientes, como la de Flores et al. (2016), aislaron menos Gram positivos que Gram negativos, de entre los primeros están el aislamiento de *S. aureus*, *S. saprophyticus* y *S. lugdunensis*.

En cuanto a los aislados bacterianos que fueron negativos a la prueba de coagulasa se consideraron como estafilococos coagulasa negativos, que incluye a *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus* (Predari, 2007; Fariña et al., 2013).

En un estudio realizado por Ruiz et al. (2007), *S. epidermidis* (perteneciente a los SCN) prevaleció entre aislados en pie diabético, seguido de *S. aureus* y *E. coli*; estos mismos señalaron que en las heridas tratadas con antibióticos detectaron la presencia de *S. aureus*, *P. aureginosa*, *E. faecalis*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* y *S. cohnii*.

Bravo et al. (2009) reportaron a *Staphylococcus haemolyticus* como la segunda especie más frecuente en úlceras infectadas de pie diabético en pacientes de dos hospitales de Chilpancingo Guerrero.

Las características metabólicas varían en las diferentes especies de *Staphylococcus*, generalmente la presencia de adhesinas en la superficie de la bacteria, les permite fijarse a las células ayudadas por la producción de enzimas extracelulares como la lipasa, gelatinasa y DNAasa, que se producen diferencialmente, y que dañan los tejidos; además son capaces de formar biopelículas que los protege de la acción de los antimicrobianos y mecanismos defensivos del hospedero. Así la patogenicidad de este grupo de microorganismos contribuye a la degradación de tejidos y a la persistencia de infecciones (Pinheiro et al., 2016).

En la tabla 3 de este capítulo se muestra la reacción a las pruebas bioquímicas comúnmente empleadas que distinguen a las especies de entre el grupo de los *Staphylococcus*. La prueba de la coagulasa es determinante en la diferenciación, ya que solo *S. aureus* es positivo a esta, el resto se agrupa como *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN). La producción de DNAsa es positiva en *S. aureus* y *S. haemolyticus*. Lo anterior, supone la identidad presuntiva de *S. aureus* en el cultivo 3Aa1 (obtenido de la muestra antes del tratamiento en el P3).

La nucleasa termoestable es positiva para *S. aureus*; la reacción positiva a ureasa es característica de *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, y es variable para *S. aureus*. La respuesta a la Novobiocina es resistente en todos los estafilococos involucrados en patología infecciosa (Hernández et al., 2005; Seija, 2008; Zendeja et al., 2014). La utilización de azúcares como única fuente de carbono y energía es común entre las especies, a excepción de *S. saprophyticus* que suele comportarse poco representativo para estas pruebas y ante el metabolismo anaerobio facultativo (Fariña et al., 2005).

La resistencia a los antibióticos por parte de los estafilococos es reconocida ante la meticilina y recientemente a la vancomicina (Montúfar et al., 2016). La resistencia a meticilina puede interpretarse como resistencia a todos los betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes). Entre otros

antimicrobianos asociados a la multirresistencia se encuentran las tetraciclinas, macrólidos, quinolonas y aminoglucósidos (Miranda, 2011).

En este estudio se encontró la mayor resistencia ante la penicilina con un 88% del total de los aislados. La resistencia a penicilina refiere desde el año 1940 en *S. aureus* y se comporta de igual manera para los SCN, por lo cual esta resistencia es común en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Nodarse, 2001; Rincón et al., 2014). Martínez et al. (2009), obtuvieron una resistencia del 100% total de sus cultivos Gram positivos a Penicilina, de igual manera Espinoza et al. (2014), reportó una resistencia de 98.8% por las bacterias Gram positivas (*S. aureus*, SCN y *Enterococcus*) presentes en pie diabético.

Los antibióticos cefalexina y ofloxacina presentaron un 44% de resistencia y sensibilidad. Generalmente el empleo de cefalosporinas en este caso de cefalexina es de gran eficacia clínica frente a bacterias Gram positivas ensayadas en infección del pie diabético; ofloxacina por su parte tiene menos experiencia ante el pie diabético, sin embargo, ha mostrado efectividad en infecciones de piel y tejidos blandos (Beltrán et al., 2001).

El mayor porcentaje de sensibilidad microbiana fue muy parecido al de resistencia, resultó un 84% sensible a amoxicilina/ác. clavulánico y a cloranfenicol, estos datos resultan muy parecidos a los obtenidos por Espinoza et al. (2014), más de 53% de sus aislados bacterianos fueron sensibles a los mismos antibióticos; sin embargo, un estudio reciente de Flores et al. (2016) presentaron resistencia total ante amoxicilina/ác. clavulánico y a cloranfenicol en bacterias Gram positivas aisladas de úlceras en pie diabético.

En cuanto a los resultados obtenidos por cada paciente, en el paciente uno (tabla 6) la resistencia solo fue ante la penicilina, en el P2 se observó resistencia a eritromicina y azitromicina, y en los cultivos obtenidos de los pacientes P3 y P4 se presentó multirresistencia a los antibióticos ensayados, lo cual les confiere mayor virulencia. Cabe mencionar que 2 de los cultivos del P3 presentaron características morfológicas y fisiológicas de *Staphylococcus aureus*.

Generalmente los aislados bacterianos resultaron mayormente sensibles ante el empleo de antibióticos para Gram positivos. Los resultados aquí obtenidos son semejantes a los publicados por Flores et al. (2016), los microorganismos Gram positivos presentaron alta sensibilidad a los antibióticos empleados; sin embargo, en los resultados por cada paciente la resistencia a los antimicrobianos es más evidente; Cantón y Ruíz (2013) señalan que las bacterias Gram positivas representan un gran problema en salud por su perfil de multiresistencia a antibióticos, cabe especificar que todos los cultivos obtenidos son Gram positivos y se derivan de infección en pie diabético.

El proceso infeccioso en el pie diabético es la principal causa de hospitalización por diabetes mellitus y generalmente se desarrolla por úlceras crónicas con repetidos ciclos de tratamiento antibiótico y hospitalización, lo cual origina la participación de microorganismos multiresistentes, entre ellos los estafilococos coagulasa negativa (SCN) que aumentan la morbi-mortalidad en dicho padecimiento, además de los costos económicos y sociales. La identificación de los microorganismos responsables a nivel de especie contribuye a la selección del tratamiento antibiótico más adecuado en este u otro padecimiento (Martínez et al., 2009).

Conclusiones

30 de los 32 cultivos aislados de las úlceras infectadas en pie diabético presentaron características morfológicas del género *Staphylococcus*; de este total, un 2 resultaron positivos a la prueba de coagulasa lo cual es distintivo de *Staphylococcus aureus*.

Por lo anterior, los resultados obtenidos no coinciden con lo mayormente reportado en la literatura: *Staphylococcus aureus* no estuvo presente en la mayoría de los aislados bacterianos de pie diabético tras realizar la caracterización fisiológica.

Literatura citada

- Arteaga R, Arteaga M. 2006. Infecciones de piel y tejidos blandos. Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría 45(3): 171-177.
- Barberán J. 2009. Infecciones en el pie diabético: importancia de las resistencias bacterianas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 27(6): 315-316.
- Barros E, Ceotto H, Bastos M, dos Santos K, de Marval M. 2012. *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. Journal of Clinical Microbiology 50(1): 166-168.
- Beltrán C, Fernandez A, Giglio S, Biagini L, Morales, R. Perez, J. Aburto, A. 2001. Tratamiento de la infección en el pie diabético. Revista Chilena de Infectología 18(3): 212-224.
- Bermejo V, Spadaccini L, Elbert G, Duarte A, Erbin M, Cahn P. 2012. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en infecciones de piel y partes blandas en pacientes ambulatorios. Medicina 74(4): 283-286.
- Bocanegra V, Cruz W, Bladinieres E, Alcalá R, Rivera G, Reyes M. 2013. Infecciones en pie diabético: conceptos y consensos generales. Ciencia UAT 8(1): 11-17.
- Bou G, Fernández A, García C, Saénz J, Valdezate S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 29(8): 601-608.
- Bravo L, Cortez D, Montesinos F, Muñoz M, Barrios A. 2009. Frecuencia de infecciones bacterianas en pacientes con pie diabético en dos hospitales de Chilpancingo, Guerrero. Bioquímica 34(SA): 98.
- Breña D, Font L, Busto R, Castellanos M, Reyes V. 2009. Neumonía complicada por *staphylococcus epidermidis* en un paciente con osteomielitis del fémur. Reporte de caso. Revista Médica Electrónica 31(1). Consultado el 30 de junio de 2018. Disponible: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242009000100015.
- Bustos J, Hamdan, A. Gutiérrez, M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Revista Biomédica 17(4): 287-305.
- Cantón R, Ruíz P. 2013. Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp.). Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 31(8): 543-551.
- Camarena J, Sánchez, R. 2001. Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>
- Camussone C, Calvino L. 2013. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. Revista Argentina de Microbiología 45(2): 119-130.
- Castañón C. 2012. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. Evidencia Médica e Investigación en Salud 5(3): 79-84.

- Castro N, Loaiza M, Calderón A, Sánchez A, Silva J. 2006. Estudio molecular de *Staphylococcus haemolyticus* resistente a meticilina en un hospital de México. *Revista de Investigación Clínica* 58(6): 580-585.
- Cernado E, Cantón, R. 2010. Procedimientos en Microbiología Clínica: Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 37: 3-19.
- Cervantes García E, García González R, Salazar Schettino P. 2014. Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio* 61(1): 28-40.
- Cruz W, Bladinieres E, Alcalá R, Rivera G, Reyes M, Bocanegra V. 2013. Infecciones en pie diabético: conceptos y consensos generales. *Ciencia UAT* 8(1): 11-17.
- Cueto M, Pascual Á. 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*: Microbiología y patogenia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. En: Pahissa A, Soler H, Soto A, Matos L, Serrano E, Roing MA editores. *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. Barcelona (España): Marge Books Ed.; 2009: 15-29.
- Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ, Vindel A, Trincado P, Boquete T. Marín M. 2008. *Staphylococcus* spp. en situación actual y evolución de la resistencia a antimicrobianos (1986-2006). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 26(5): 269-277.
- Czekaj T, Ciszewski M, Szewczyk E. 2015. *Staphylococcus haemolyticus* an emerging threat in the twilight of the antibiotics age. *Microbiology* 161(11): 2061-2068.
- Díaz, R. 2006. Principales organismos causantes de infecciones nosocomiales. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48(2):106-108.
- Echevarría J, Iglesias D. 2003. Estafilococo meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Revista Médica Herediana* 14(4):195-203.
- Echeverría V, Sotomayor E, Norambuena M, Vidal P, Campos A. 2017. Pie diabético. *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile* 27: 207-219.
- Espinoza A, Hernández G, Cantú R, Díaz Arely, Ávila S, García E, Rivera Gildardo; Bocanegra V. 2014. Prevalencia y perfil de resistencia a antibióticos de microorganismos aislados de infecciones en pie diabético. *Ciencia UAT* 9(1): 84-89.
- Fariña N, Carpinelli L, Samudio M, Guillén R, Laspina F, Sanabria R, Abente S, Rodas L, González P y M. de Kaspar H. 2013. *Staphylococcus coagulasa*-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Revista chilena de infectología* 30(5): 480-488.
- Fariña N, Sanabria R, Figueredo L, Ramos L, Samudio M. 2005. *Staphylococcus saprophyticus* como patógeno urinario. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud* 3(1): 31-33.
- Flores R, Cárcamo S, Pavón D, Avilés A, Díaz C, Giacaman L, Álvarez G, Aceituno A. 2016. Bacteriological Profile in Patients with Diabetic Foot, Attending the National Institute of Diabetes. Tegucigalpa, Honduras, January 2013-December 2015. *Archivos de Medicina* 12(3): 1-7.

- García A, Pardo J, Seas C. 2003. Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: reporte de un caso. *Revista Médica Herediana* 14(4):221-223.
- García M. 2014. Infecciones en Úlceras de Pie Diabético: Epidemiología, factores predictivos de multirresistencia y pronósticos asociados con amputación. Estudio prospectivo 2008-2012. Universidad de Murcia. España [Tesis doctoral]. Consultado el 08 de junio del 2018. Disponible: <https://www.tdx.cat/handle/10803/277177>.
- González L, Ramos A, González M, Nadal L, Chacon L, Morffi J, Garcés A, Vallin C. 2005. Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus* spp meticilina resistente en el Hospital Pediátrico "William Soler". *Revista CENIC, Ciencias Biológicas* 36: 20-27.
- Harvé B. 2015. New technologies in microbiology: automatization and some applications in microbial identification and susceptibility tests. *Revista Médica Clínica Las Condes* 26(6): 753-763.
- Hernández J. 2014. Las bacterias Gram negativas y su influencia en la cicatrización de úlceras de pie diabético. Universidad Complutense de Madrid. Madrid [Tesis doctoral]. Consultado el 08 de junio del 2018. Disponible: <http://eprints.ucm.es/25023/1/T35297.pdf>
- Hernández O, Ulloa Y, Rio D, Galdós M. 2005. *Staphylococcus aureus* y su identificación en los laboratorios microbiológicos. Revisión bibliográfica. *Archivo Médico de Camagöy* 9(1). Consultado el 24 de junio de 2018. Disponible: <http://www.redalyc.org/pdf/2111/211117623016.pdf>.
- Herrera M, Herrera M, Vargas A, Moya T, Yock I. 2001. Sensibilidad antimicrobiana de 4015 cepas de *Staphylococcus* sp. 1995-2000. *Revista Médica del Hospital Nacional de Dr. Carlos Sáenz Herrera* 36(1-2): 15-29.
- Hirsel W. 2004. Implicancias del *Staphylococcus saprophyticus* en la patología infecciosa urinaria de la mujer. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* 38(2): 217-220.
- Laspina F, Samudio M, Sosa S, Centurión M, Apud E, Espinola C, Martínez M, Rodríguez H. 2008. Resistance profile of *Staphylococcus* spp isolated from hemocultures in the Hospital Central of the Instituto de Previsión Social. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud* 6(2): 18-24.
- López L, del Rio G, Escalona R, Brossard G, Figueredo I, Dured Y. 2016. Biofilm detection in negative coagulasa *Staphylococcus* and clinical epidemiological variables. *Revista Archivo Médico de Camaguey* 20(4): 351-358.
- Macías A, Álvarez J, Cabeza F, Cuevas A, Ramírez A, Sifuentes J. 2001. Microbiología del pie diabético: ¿es útil el cultivo tomado con hisopo? *Gaceta Médica de México* 147: 117-124.
- Martínez, D. 2004. Tratamiento de la infección en el pie diabético. *Cirugía Española* 76(1):9-15.
- Martínez, G. Ramírez, A. Campillo, S. Morales, C. Pagán, O. Aguayo, A. 2009. Infecciones del pie diabético. Prevalencia de los distintos microorganismos y sensibilidad a los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27 (6): 317-321.

- Miranda M. 2011. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. Boletín Médico del Hospital Infantil de México 68(4): 262-270.
- Montúfar F, Madrid C, Villa J, Díaz L, Vélez J, Vega J, Bedoya A, Zuleta J, Montúfar M. 2016. Bacteremia por *Staphylococcus* coagulasa negativo con concentración inhibitoria mínima para vancomicina ≥ 2 . Infectio 20(1): 3-8.
- Nakatsuji T, Chen T, Butcher A, Trzoss L, Jip S, Shirakawa K, Zhou W, Oh J, Otto M, Fenical W, Gallo R. 2018. A commensal strain of *Staphylococcus epidermidis* protects against skin neoplasia. Science Advances 4(2): 1-9.
- Nguyen T, Park M, Otto M. 2017. Host response to *Staphylococcus epidermidis* colonization and infections. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 7(90): 1-7.
- Nodarse R. 2001. Estafilococos multirresistentes: uso del disco de oxacillín como marcador de resistencia a antibióticos. Revista Cubana de Medicina Militar 30(1): 7-10.
- Orden B, Martínez R, Millán R. 2008. ¿Qué estamos aprendiendo de *Staphylococcus saprophyticus*? Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 26(8): 495-499.
- Pedrari S. 2007. Estafilococos coagulasa negativos: el enemigo silente. Revista Argentina de Microbiología 39:1-3.
- Pérez S, Díaz A, González C, García Y. 2014. Crecimiento bacteriano en la úlcera del pie diabético previo al uso de Heberprot-P. Revista Cubana de Medicina Militar 43(2): 169-175.
- Pinheiro L, Brito C, Pereira V, Oliveira A, Bartolomeu A, Camargo C, Ribeiro C. 2016 Susceptibility Profile of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* Isolated from Blood Cultures to Vancomycin and Novel Antimicrobial Drugs over a Period of 12 Years. Microbial Drug Resistance 22(4). Consultado el 30 de junio de 2018. Disponible: <https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/mdr.2015.0064>.
- Raz R, Colodner R, Kunin C. 2005. Who are you *Staphylococcus saprophyticus*? Clinical Infectious Diseases 40(6): 896-898.
- Rincón S, Panesso D, Díaz L, Carvajal L, Reyes J, Munita J, Arias C. 2014. Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. Biomedica 34(01): 191-208.
- Rodríguez J, Paño J, Álvarez L, Asensio A, Calbo E, Cercenado E, Cisneros J, Cobo J, Garnacho J, Grau S, Horcajada J, Hornero A, Murillas J, Oliver A, Padilla B, Pasquau J, Pujol M, Sierra R. 2012. Programs for optimizing the use of antibiotics (PROA) in Spanish hospitals: GEIH-SEIMC, SEFH and SEMPSPH consensus document. Farmacia Hospitalaria 36(1): 1-33.
- Ruiz H, Miranda A, González J, Ochoa F. 2007. Microorganismos bacteriológicos más frecuentes y resistencia en las infecciones de pie del diabético en el Hospital Regional "Dr. Valentín Gómez Farías" del ISSSTE, Zapopan, Jalisco. Revista Mexicana de Angiología 35(4): 177-184.
- Saavedra J, Santos M, González F, Hernández P, Navarro M. Infecciones bacterianas de la piel y tejidos blandos. Consultado el 23 de junio 2018. Disponible en: <http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/piel.pdf>
- Sajona E, Osorio E, Lina C, Pérez I. 2018. Caracterización de la microbiota presente en infecciones de úlcera de pie diabético en pacientes de la IPS

- Universitaria de Antioquía durante el segundo semestre del 2017 en Barranquilla, Atlántico. *Revista Edu-física* 10(21): 1-8.
- Santamaría V, Alvarado A. 2002. Flora cutánea como protección y barrera de la piel normal. *Revista del Centro Dermatológico de Pascua* 11(1): 18-21.
- Segovia N, Mereles E, Gottardi G, Marques W, Viana C, Pereira A, Porto G, Soares H, Lopes I, Gonzalez N, Ramos P. 2017. Bacterial infections in patients with Diabetic Foot. Regional Hospital of Ciudad del Este, Paraguay. Year 2015. *Revista Salud Pública del Paraguay* 7(2): 9-13.
- Seija, V. 2008. Etiopatogenia microbiológica: Genero *Staphylococcus*. Cap. 3. 259-266. En: Temas de bacteriología y virología médica. FEFMUR. Universidad de la República (Facultad de Medicina): 3da Ed.; 2008: 15-29.
- Silva, J. 2006. Resistencia a antibióticos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48(2):105-106.
- Sosa L, Sosa C. Infecciones bacterianas primarias de piel y tejidos blandos. *CCAP* 12(3):46-57.
- Suarez J. 2013. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutrición Hospitalaria* 28(1): 38-41.
- Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Tuzawa F, Ito T, Morimoto Y, Kuroda M, Cui L, Takahashi M, Ankai A, Baba S, Fukui S, Lee J, Hiramatsu K. 2005. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *Journal of Bacteriology* 187(21): 7292-7308.
- Zendejas Manzo, G. Avalos Flores, H. Soto Padilla, M. 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generealidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica* 25: 129-143.

Anexos

Anexo 2A. Técnica para tinción de Gram.

Esta tinción nos permite separar a las bacterias en dos grupos, las Gram positivas y las Gram Negativas. Las primeras se tiñen de color violeta y las segundas de color rosa. Los reactivos que se necesitan para su realización son:

- Agua estéril
- Cristal violeta (violeta de genciana)
- Lugol
- Safranina
- Mezcla de alcohol y acetona 1:1
- Agua de uso para enjuagar

El procedimiento consiste primeramente en esterilizar un asa bacteriológica en el mechero, seguido con el asa tomar una gota de agua estéril y colocarla en un porta objetos. Esterilizar de nuevo el asa y tomar una pequeña muestra de bacteria aislada, para posteriormente agregarla en el porta objetos y homogenizarla con el agua estéril. Secar a temperatura ambiente y poner unos segundos la muestra en la llama del mechero, esto para fijar la muestra.

Para realizar la tinción hay que agregar cristal violeta para cubrir todo el extendido bacteriano y dejar actuar por un minuto, repetir el procedimiento pero con otra sustancia, lugol. Enjuagar con agua de uso, agregar una o dos gotas de la mezcla de alcohol-acetona y enjuagar nuevamente con agua. Agregar suficiente safranina y dejar actuar por un minuto. Volver a enjuagar y dejar secar a temperatura ambiente. Finalmente observar características morfológicas, de agrupación y color de la tinción de la bacteria en el microscopio, usando aceite de inmersión.

Anexo 2B. Pruebas bioquímicas ensayadas (preparación, inoculación y lectura).

PRUEBAS BIOQUÍMICAS				
	Función	Preparación	Inoculación	Lectura
Líquidos				
Lactosa sorbitol manitol maltosa sacarosa dextrosa	Conocer la capacidad metabólica de microorganismos bacterianos para degradar compuestos orgánicos	Preparar base rojo de fenol 1000mL Agua destilada 15.0g Base rojo de fenol Adicionar sustrato 5.0g Azúcares 1. Mezclar hasta homogenizar solución 2. Vaciar 3mL en tubos con rosca 3. Esterilizar 20min a 121°C	Inocular e incubar por 24 horas	Prueba positiva Viraje a color amarillo (ácido) Prueba negativa Sin cambio de color Intensifica color (alcalino)
Reducción de nitratos y nitritos	Reducir nitratos a nitritos	1000mL Agua destilada 8.0g Caldo nutritivo 1.0g Nitrito de potasio 1. Calentar para disolución total	Inocular e incubar por 24 horas	1. Agregar 3 gotas de reactivos A y B de Viraje color rojo Red de nitratos + Red de nitritos -
	Identificación de enterobacterias	2. Vaciar 3mL en tubos con rosca y campana de Durham		2. Si no cambia de color agregar un poco de polvo de zinc Sin cambio de color Red de nitratos y nitritos + Viraje color rojo Red nitratos -
	Identificación de bacilos Gram positivos	3. Esterilizar 20min a 121°C		
Sólidos				
Urea	la especie de Proteus y se utiliza para diferenciar este género de otras enterobacterias Capacidad de desdoblar la urea en dos moléculas de amoníaco	1000mL Agua destilada 15.0g Agar bacteriológico 1. Preparar medio y esterilizar en autoclave por 20 min a 121°C 2. Agregar Urea estéril en campana de flujo laminar 24.038g Urea 3. Mezclar 4. Vaciar en tubos estériles 5. Enfriar medio y solidificar en posición inclinada	Estriar sobre la superficie del medio e incubar por 24 horas	Prueba positiva Viraje a color rosa Prueba negativa Sin cambio de color
Semisólidos				
Óxido/fermentación	Indica el tipo de metabolismo energético de un microorganismo: respiratorio o fermentador	1000mL Agua destilada 15.0g Base rojo de fenol 3.0g Agar bacteriológico Adicionar sustrato 5.0g glucosa/fructuosa 1. Calentar para disolución total 2. Vaciar 3mL en tubos con tapón de algodón 3. Esterilizar 20min a 121°C 4. Enfriar medio y solidificar en posición vertical *Esterilizar cera previo a inoculación de tubos	Inoculación recta en el centro del tubo y por duplicado para cada cultivo Tubo en condiciones anaerobias: poner un tapón de cera Incubar por 24 horas	Prueba positiva Tras cambio de coloración del medio Tubo sin tapón Color amarillo: ácido Color rosa: alcalino Tubo con tapón de cera (parafina) Color amarillo: ácido, anaerobio facultativo Color rosa: alcalino, aerobio estricto Observar producción de gas
Enzimas				
ADNasa	Hidrolizan el ADN en mono y polinucleótidos	1000mL Agua destilada 42.0g Agar prueba de ADNasa 1. Esterilizar 20min a 121°C 2. Enfriar medio y vaciar en cajas Petri	Inocular e incubar por 24-48 horas	Adicionar ácido clorhídrico (HCL) 1.0 N Prueba positiva Halo transparente alrededor del área de crecimiento
Gelatinasa	Hidrolizan la gelatina en péptidos y aminoácidos	1000mL Agua destilada 8.0g Caldo nutritivo 15.0g Agar bacteriológico 4.0g Gelatina bacteriológica 1. Esterilizar 20min a 121°C 2. Enfriar medio y vaciar en cajas Petri	Inocular e incubar por 24-48 horas	Adicionar cloruro de mercurio (HgCl2) Prueba positiva Halo transparente alrededor del área de crecimiento
Lipasa	Degradan las macromoléculas de grasa y las convierten en ácidos grasos y glicerol	1000mL Agua destilada 23.0g Agar nutritivo 10mL Tween 80 1. Esterilizar 20min a 121°C 2. Enfriar medio y vaciar en cajas Petri	Inocular e incubar por 24-48 horas	Prueba positiva Halo cristalino alrededor del área de crecimiento
Hemólisis	Detectar la presencia de hemolisinas	Solución A 950mL Agua destilada 38.0g Mueller Hinton 1. Esterilizar 20min a 121°C 2. Enfriar medio Solución B 50mL sangre humana 4. Mezclar ambas soluciones 5. Vaciar en cajas Petri	Inocular e incubar por 24-48 horas	Prueba positiva Halo negro-verde alrededor del área de crecimiento Alfa Halo transparente alrededor del área de crecimiento Beta
Coagulasa	Conocer la capacidad de los microorganismos para coagular el plasma	Sangre humana o de carnero 1. Centrifugar para obtener el plasma 2. Distribuir 200 µl en tubos de ensayo	Inocular con 100 µl de cultivo 200 µl de plasma por 4 horas	Prueba positiva Formación de coagulo

Anexo 2C. Interpretación de halos de inhibición en test de difusión en agar Müller Hinton para *Staphylococcus* (CLSI 2000, 2015, 2016 y 2017).

Antimicrobiano	Carga del sensidisco µg	R*	I*	S*
Amoxicilina/Ác. Clavulánico AMC/AC	30	<1 4	15-17	>1 8
Eritromicina EM/ER	15	<1 3	14-22	>2 3
Penicilina P	10 UI	<2 8	-	>2 9
Amoxicilina AMX/AX	10	<1 3	14-16	>1 7
Cotrimoxazol SXT/CT	25	<1 0	11-1 5	>1 6
Cefalexina CFM/CP	30	<1 4	15-17	>1 8
Cefazolin CF/CFZ	30	<1 4	15-17	>1 8
Cefuroxima CR/XM	30	<1 4	15-22	>2 3
Cloranfenicol C/CK	30	<1 2	13-17	>1 8
Ciprofloxacina CI/CL	15	<1 3	14-17	>1 8
Ofloxacina OF	30	<1 4	15-17	>1 8
Piperaciclina PI/PC	30	<1 7	18-20	>2 1
Azitromicina AZ	15	<1 3	14-17	>1 8
Tetraciclina TE	30	<1 4	15-18	>1 9

*resistencia
**intermedio
***sensibilidad

Capítulo 3

Identificar molecularmente a cultivos bacterianos con características morfológicas y fisiológicas de *Staphylococcus aureus* aislados en úlceras de pacientes con pie diabético.

Resumen

Las técnicas moleculares de identificación bacteriana a partir del análisis de la secuencia del gen 16S rRNA, representan una alternativa a los métodos convencionales y es útil en la identificación de microorganismos patógenos, un ejemplo es, *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria se reporta en la patogénesis de la infección en el pie diabético, seguido de *Streptococcus* β -hemolíticos del grupo A y B, estafilococos coagulasa negativa (SCN), *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp, entre otros microorganismos resistentes. El objetivo de este estudio fue aislar e identificar molecularmente a cultivos bacterianos obtenidos de úlceras infectadas en pie diabético con características morfológicas y fisiológicas de *Staphylococcus aureus*. Tras contar con cultivos puros obtenidos de cuatro pacientes diabéticos con úlcera infectada en pie y con su respectiva caracterización fenotípica, se procedió a identificar molecularmente a las bacterias implicadas. Se inició con la extracción de DNA bacteriano de todos los cultivos puros (21 cultivos) siguiendo protocolos generales establecidos, comprobada la extracción mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se realizó la amplificación a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16S rRNA con ayuda de primers universales para los extremos del gen. El producto de PCR obtenido se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Posteriormente se purificaron las muestras y fueron enviadas a Macrogen-Corea para la secuenciación del amplicón. Una vez obtenida la secuencia, ésta, se sometió al análisis BLAST del NCBI para compararse con secuencias incluidas en la base de datos pública y se determinó a los microorganismos implicados. Se identificó a *Staphylococcus aureus* en tan solo un cultivo; tres de los cultivos no amplificaron para el gen 16S rRNA. En el resto (17 cultivos) se determinó la participación de los estafilococos coagulasa negativa de importancia clínica, como: *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus epidermidis*, además de un *Enterococcus faecalis*.

Abstract

The molecular techniques of bacterial identification from the sequence analysis of the 16S rRNA gene represent an alternative to conventional methods and is useful in the identification of pathogenic microorganisms, an example is *Staphylococcus aureus*. This bacterium is reported in the pathogenesis of the infection in the diabetic foot, followed by β -hemolytic *Streptococcus* of group A and B, coagulase negative staphylococci (SCN), *Enterococcus* spp, *Corynebacterium* spp, among other resistant microorganisms. The objective of this study was to isolate and molecularly identify bacterial cultures obtained from infected ulcers in diabetic foot with morphological and physiological characteristics of *Staphylococcus aureus*. After having pure cultures obtained from four diabetic patients with infected foot ulcers and with their respective phenotypic characterization, the bacteria involved were molecularly identified. It started with the extraction of bacterial DNA from all the pure cultures (21 cultures) following established general protocols, the extraction was verified by electrophoresis in 1% agarose gel, amplification was carried out from the polymerase chain reaction (PCR) of the 16S rRNA gene with the help of universal primers for the ends of the gene. The obtained PCR product was checked by electrophoresis in 1.5% agarose gel. Subsequently, the samples were purified and sent to MacroGen-Corea for amplicon sequencing. Once the sequence was obtained, it was submitted to the BLAST analysis of the NCBI to be compared with sequences included in the public database and the microorganisms involved were determined. *Staphylococcus aureus* was identified in only one culture; three of the cultures did not amplify for the 16S rRNA gene. In the rest (17 cultures), the participation of coagulase-negative staphylococci of clinical importance was determined, such as *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus epidermidis*, as well as *Enterococcus faecalis*.

Introducción

El diagnóstico microbiológico para determinar al agente causal de un proceso infeccioso a partir de procedimientos y técnicas convencionales (caracterización fenotípica), es comunmente empleado en laboratorios clínicos. Sin embargo, estos procedimientos presentan algunas limitaciones como lo son: los tiempos de respuesta y la certeza total de identificación. Una alternativa empleada ante estas limitaciones es la identificación bacteriana mediante técnicas moleculares ya que, presenta una alta especificidad, sensibilidad y rapidez, lo cual es de gran importancia para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas (Cercenado y Cantón, 2010).

El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA es la técnica mayormente utilizada en biología molecular para la identificación de bacterias de importancia clínica y ambiental, pero su uso se ve restringido por su costo y grado de especialización, además que está delimitado a centros y laboratorios específicos (Cercenado y Cantón, 2010; Valenzuela et al., 2015).

Staphylococcus aureus es un patógeno de gran importancia clínica debido a su alta morbi-mortalidad a nivel comunitario e intrahospitalario, originada principalmente por sus factores de virulencia y resistencia a antibióticos (Zendejas et al., 2014; Perez et al., 2014). Es causante de múltiples enfermedades, entre ellas, las infecciones de piel y tejidos blandos (Bustos et al., 2006). Este microorganismo coloniza la piel y mucosas en los humanos, lo que le favorece para acceder a una lesión e iniciar un proceso infeccioso. Aunado a esta bacteria se encuentran los estafilococos coagulasa negativo (SCN), involucrados también en la patología infecciosa, de entre ellos: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus*, son los más frecuentes (Fariña et al., 2013).

En las úlceras de pie diabético los microorganismos presentes proceden generalmente de la microbiota de la piel, tales como: *Staphylococcus aureus*, seguido de *Streptococcus* β -hemolíticos del grupo A y B, estafilococos coagulasa negativo (SCN), *Enterococcus* spp, *Corynebacterium* spp, entre otros microorganismos resistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA) (Barberán, 2009; Martínez et al., 2009; Bocanegra et al., 2013).

Actualmente los SCN son frecuentemente reportados como agentes patógenos, sin embargo algunos estudios aún no determinan el rol de estos microorganismos en la patogénesis de una determinada enfermedad (Predari, 2007). Al igual que *Staphylococcus aureus*, los datos acerca de su resistencia a antibióticos (como metilina y vancomicina) y la formación de biopelículas, los colocan como un problema de salud pública mundial (Hernández, 2009).

Por lo tanto es de gran importancia la identificación de los microorganismos implicados en este problema, así como determinar el papel que juegan en el proceso infeccioso y con base en esto, elegir el tratamiento de antibióticos adecuado.

Revisión bibliográfica

La identificación de un microorganismo responsable de un proceso infeccioso se realiza a partir de técnicas fenotípicas comúnmente utilizadas en laboratorios de microbiología. Sin embargo, estos procedimientos presentan algunas limitaciones como lo son: los tiempos de respuesta y la certeza total de identificación. Los métodos moleculares constituyen una solución a estas limitaciones pues representan procedimientos complementarios o incluso de referencia para los métodos fenotípicos, pero su asequibilidad y grado de especialización hacen que se encuentre limitado a centros y laboratorios específicos (Cercenado y Cantón, 2010).

En la actualidad las técnicas moleculares han tenido mayor relevancia en la identificación de bacterias de importancia clínica, ya que presentan una alta especificidad (para detectar a un solo microorganismo de interés de entre muchos), sensibilidad (a partir de poca cantidad del patógeno en la muestra puede detectarlo) y rapidez (puede identificar a un microorganismo en al menos dos días), lo cual resulta primordial para el diagnóstico y tratamiento de una enfermedad. Además, ha permitido la identificación de nuevos microorganismos que por técnicas convencionales no era posible (Ayála et al., 2004).

En cuanto a la taxonomía bacteriana la herramienta más utilizada en biología molecular es el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA (Valenzuela et al., 2015), el cual está presente en todas las bacterias actuales provenientes de muestras clínicas y ambientales; ofrece una identificación filogenética rápida y comparable con secuencias disponibles en bases de datos de uso público (Cercenado y Cantón, 2010; Valenzuela et al., 2015). Sin embargo, en taxonomía es necesaria una identificación conjunta, que utilice las características fenotípicas junto con las genotípicas y de esta manera determinar definitivamente el género y especie (Rodicio y Mendoza, 2018).

El 16S rRNA comprende una secuencia de aproximadamente 1500 nucleótidos (pb) y una estructura secundaria conservada (por lo cual se le denomina cronómetro molecular), tiene nueve zonas hipervariables (V1-V9) que aportan la mayor información para los estudios de taxonomía y filogenia, entre otras zonas conservadas que determinan el diseño de iniciadores o cebadores (pequeñas

secuencias de nucleótidos complementarios a una de las dos hebras de DNA) que permiten su amplificación (Cercenado y Cantón, 2010; Patel, 2001; Rodicio y Mendoza, 2018; Valenzuela et al., 2015).

El método de identificación bacteriana a partir de la secuencia del gen 16S rRNA inicia con la amplificación del mismo (con ayuda de cebadores complementarios para los extremos 5' y 3' del gen), seguido de la secuenciación y el análisis de la secuencia (Patel, 2001). Un paso fundamental es la extracción de DNA desde un cultivo bacteriano puro mediante protocolos generales establecidos o a partir de muestras clínicas, minimizando así el trabajo en laboratorio (Rodicio y Mendoza, 2018).

La amplificación del DNA, se realiza a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual amplifica millones de veces una secuencia de DNA a partir de una copia del gen deseado (Bustos, 2011).

La PCR es empleada entre otras cosas para la detección de microorganismos patógenos, utiliza un termociclador que permite reacciones a temperaturas alternadas (denominados ciclos de reacción). La reacción en cadena de la polimerasa comunmente se realiza en tres pasos, desnaturalización, alineamiento y extensión, que se repiten varias veces (generalmente 35 ciclos) creando millones de copias del fragmento de DNA deseado (Louie et al., 2000; Rodríguez et al., 2009).

La desnaturalización del DNA (separación de las dos hebras) se inicia con una temperatura de entre 90-94°C durante 30 segundos. El alineamiento consiste en unir el cebador a su secuencia complementaria del DNA a una temperatura de entre 40 a 60°C durante 30 segundos. La extensión de DNA se realiza a 72°C durante tiempo variable (dependiente del tamaño del producto deseado), en este paso interviene la Taq polimerasa y nucleotidos para sintetizar nuevo DNA que será complementario al segmento objetivo (Louie et al., 2000; Pérez et al., 2001). Posterior a la amplificación por PCR, el amplicón se visualiza mediante técnicas de electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, con lo cual se estimará el tamaño del producto amplificado (Pérez et al., 2001). En el caso de la

detección del gen 16S rRNA debe comprender alrededor de 1500 pb (Rodicio y Mendoza, 2018).

La secuenciación se lleva a cabo para analizar los productos obtenidos por PCR, el método consiste en una reacción cíclica (similar a la PCR) que utiliza un único cebador complementario (directo ó reverso) a cada hebra del segmento de DNA por cada reacción (Rodicio y Mendoza, 2018).

Cabe señalar que este proceso es automatizado y se realiza en centros especializados.

Finalmente se realiza el análisis de la secuencia, esto tras la comparación del fragmento de DNA obtenido en una base de datos pública, con la finalidad de identificar la cepa de interés. Entre las bases de datos mayormente consultadas tenemos a: GenBank del NCBI, EMBL, RDP y RIDOM (Cercenado y Cantón, 2010). Es recomendable el empleo de más de una secuencia para corroborar resultados y tomar en cuenta porcentajes de similitud desde $\leq 0.5\%$ a 2% para determinar una especie con la secuencia del gen 16S rRNA. Además, algunas bases de datos ofrecen esquematizar el parentesco genético entre las bacterias obtenidas (Rodicio y Mendoza, 2018).

En general las técnicas moleculares, en este caso, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son las más aceptadas en la actualidad para la identificación de microorganismos patógenos, un ejemplo es *Staphylococcus aureus* (Bustos, 2011; Hamdan et al., 2015).

Staphylococcus aureus es un patógeno de gran importancia médica por su alta morbi-mortalidad a nivel comunitario e intrahospitalario (Zendejas et al., 2014); es causante de múltiples enfermedades en humanos originadas por sus factores de virulencia y resistencia a antibióticos (Perez et al., 2014), entre ellas: infecciones de la piel y tejidos blandos, del sistema nervioso central, de las vías respiratorias, del tracto urinario e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis, que pueden comprometer la vida. Además, ocasiona intoxicación alimentaria y el síndrome del shock tóxico (Bustos et al., 2006).

S. aureus coloniza la piel y mucosas en humanos (Álvarez y Ponce, 2012; Chambers, 2001), lo cual representa una oportunidad para acceder a una lesión e

iniciar un proceso infeccioso. Este patógeno presenta múltiples factores de virulencia: adhesinas (que permiten la adhesión a estructuras del huésped facilitando la colonización y proliferación de la bacteria), secreción de toxinas (hemolisinas, leucotoxinas, enterotoxinas) y enzimas (como: hialuronidasa, estafiloquinasas, lipasas, beta-lactamasas, proteasas, entre otras), que promueven la cronicidad de la infección, ya que permiten la adaptación del microorganismo (Camarena y Sánchez, 2001; Bustos et al., 2006; Camussone y Calvino, 2013; Zendejas-Manzo et al. 2014; Cervantes-García et al. 2014).

Los estafilococos coagulasa negativo (SCN) se han asociado también a infecciones, relacionadas a la utilización de dispositivos médicos (catéteres, válvulas, entre otras prótesis), abscesos superficiales, infecciones en la piel y tejidos blandos, así como, infecciones urinarias (Fariña et al., 2013). De entre los SCN involucrados en patología infecciosa se encuentran: *S. epidermidis* (especie predominante), *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus*, que conjuntamente representan un 80% de los casos. Y otros *Staphylococcus* como: *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. cohnii* (Predari, 2007).

El papel que juegan los SCN en un proceso infeccioso ha sido complicado de definir ya que son colonizadores de la piel, por lo que, en algunos casos la participación de estos microorganismos puede deberse a contaminación al momento de tomar la muestra (Olaechea et al., 2011). Sin embargo, el papel de los SCN como patógenos es reportado frecuentemente (Beltrán et al., 2001; Fernández et al., 2012).

La patogenia de los SCN es diferente entre las especies y está relacionada con su capacidad de formar biopelículas (*biofilms*) que los protege de los antimicrobianos y de los mecanismos de defensas del hospedero (inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos y la fagocitosis) (Otto, 2009; López et al., 2016); sintetizan también, enzimas (lipasas, DNAasas, term nucleasas, hemolisinas, entre otras exoenzimas) que contribuyen a degradar los tejidos, lo cual, origina que persista la infección (Fariña et al., 2013).

En un estudio realizado por Montúfar et al. (2016), alrededor de un 70 y 80% de los aislamientos obtenidos de SCN resultaron ser resistentes a la meticilina. Existen datos acerca del surgimiento de SCN resistentes a vancomicina, similar a lo descrito para *S. aureus*, lo que demuestra la pérdida de actividad antimicrobiana por este grupo de antibióticos, representando un problema de salud pública mundial (Castro et al., 2006).

En todos los estafilococos (especies de SCN y *S. aureus*) la resistencia a meticilina está mediada por la sobreproducción de una proteína de unión a penicilina (PBP) diferente a la normal que es codificada por el gen *mecA*, el cual, es considerado marcador molecular de resistencia a meticilina (Castro et al., 2006).

De entre los SCN, *Staphylococcus haemolyticus* ha surgido como un microorganismo de importancia clínica, es resistente a la meticilina y a la vancomicina, por lo que se dificulta su tratamiento (Fariña et al., 2013). De igual manera *S. saprophyticus*, es importante como agente causal de infecciones principalmente en vías urinarias en mujeres (Hirsal, 2004).

En las úlceras de pie diabético los microorganismos presentes proceden generalmente de la microbiota de la piel, tales son los estafilococos coagulasa negativa (SCN), *Enterococcus* spp, *Corynebacterium* spp., entre otros microorganismos que pueden ser patógenos si se aíslan frecuentemente de heridas de difícil cicatrización (Bocanegra et al., 2013).

En las infecciones agudas del pie diabético predomina: *Staphylococcus aureus*, seguido de *Streptococcus* β -hemolíticos del grupo A y B; mientras que en las infecciones graves a los cocos Gram positivos se unen bacilos Gramnegativos, como las enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*, también microorganismos anaerobios como: *Peptoestreptococcus* y *Bacteroides subspecies* (Ruiz et al., 2007; Barberán, 2009; Martínez et al., 2009; Bocanegra et al., 2013).

Los pacientes con ulceraciones que han recibido antibiótico, han sido intervenidos quirúrgicamente o han estado hospitalizados recientemente suelen estar colonizados o infectados por bacterias multiresistentes: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), estafilococos coagulasa negativa (SCN),

enterococos, enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), bacilos Gram negativos o en ocasiones por hongos (Barberán, 2009). La colonización o infección puede deberse al deficiente funcionamiento del sistema inmune del paciente que permite que organismos de baja virulencia se vuelvan sumamente patógenos (Bocanegra et al., 2013).

Como se mencionó anteriormente algunos microorganismo presentes en las úlceras de pie diabético producen biopelículas (*biofilms*), que disminuyen la acción del sistema inmune al igual que la de los antibióticos y representa un problema significativo ante el tratamiento y la cicatrización de la herida, por lo que es de gran importancia su atención (Hernández, 2009).

La genómica a partir del empleo de la PCR ha permitido entender el mecanismo de transferencia de información y los genes implicados en la patogénesis de las bacterias presentes en el pie diabético (Barberán, 2009). En este caso, la caracterización bioquímica confirmada por estudios de secuenciación del gen 16S rRNA o por el gen *rpoB* (que es una región que codifican a la fracción conservada de la subunidad β de la RNA polimerasa) (Agapito et al., 2002) permitirá la identificación de los microorganismos implicados, determinará el rol que desempeñan en un proceso infeccioso y contribuirá para la elección del tratamiento antibiótico adecuado (Predari, 2007).

Objetivo

Identificar molecularmente a cultivos bacterianos con características morfológicas y fisiológicas de *Staphylococcus aureus* aislados en úlceras de pacientes con pie diabético.

Material y métodos

Selección de cultivos bacterianos para realizar la secuenciación del gen 16S rARN
Por cada paciente se eligió a los cultivos bacterianos con la característica principal de ser hemolíticos, y con base en los grupos obtenidos (un cultivo por cada grupo) en los dendrogramas de asociación de especies con el programa SYSTAT 10.2, (anexo 4A).

Extracción y purificación de DNA de bacterias Gram positivas

Se extrajo el DNA de las bacterias, todas Gram positivas, mediante el uso del kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification de la marca Promega y siguiendo las indicaciones del fabricante (anexo 4B).

Se adicionó 1 mL de cultivo (de 24 horas) a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL de capacidad y se centrifugó a 13 000 rpm durante 2 minutos. Se decantó el sobrenadante. Se adicionó al paquete celular 480 µL de solución de EDTA (50mM) y se mezcló hasta disolver. Se adicionó 120 µL de solución de lisozima (10mg/ml) y 5 µL de lisostafina (1µg/ml), se mezcló e incubó a 37°C durante 60 minutos. Se centrifugó por 2 minutos a 13 000 rpm y se eliminó el sobrenadante.

Continuamente se adicionó 600 µL de solución de lisis nuclear y se mezcló la muestra para disolver todas las células. Se incubó por 5 minutos a 80°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se adicionó 3 µL de solución RNAsa (4mg/ml), se mezcló y se incubó por 30 minutos a 37°C. La muestra se enfrió a temperatura ambiente. Se adicionó 200 µL de solución de precipitación de proteínas, se mezcló e incubó la muestra por 5 minutos en hielo. Se centrifugó a 13 000 rpm durante 3 minutos.

El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga conteniendo 600 µL de isopropanol, se mezcló invirtiendo el tubo 20 veces y se observó la aparición de una masa visible de DNA. Se centrifugó a 13 000 rpm durante 3 minutos y se decantó el sobrenadante. Se adicionó 600 µL de etanol al 70%, se mezcló y centrifugó por 2 minutos a 13 000 rpm. Se decantó el sobrenadante. Bajo condiciones estériles se dejó secar de entre 10 o 15 minutos el DNA. Posteriormente se adicionó 100 µL de solución de rehidratación de DNA y se conservó en congelación.

Electroforesis en gel de agarosa

Se comprobó la presencia de DNA bacteriano por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La preparación del gel constó en adicionar 30 mL de solución buffer TBE al 0.5X y 0.3 g de agarosa en un matraz Erlenmeyer, se calentó la solución en microondas hasta observarse la ebullición. Posteriormente, se vertió la solución en un soporte para preparar gel y se colocó un peine de 16 pozos; se solidificó en 20 minutos aproximadamente, se retiró el peine y se colocó en una cámara de electroforesis.

Se colocó en cada pozo la mezcla de 4 μ L de muestra y 1 μ L de buffer, se llenó la cámara de solución TBE al 0.5X para cubrir el gel y se corrió a 80 V durante 40 minutos; pasando este tiempo, el gel se tiñó en solución de bromuro de etidio durante 15 minutos.

Finalmente el proceso de extracción de DNA se comprobó tras visualizar presencia de DNA en un transluminador de luz ultravioleta marca Bio-Rad.

Para visualizar el producto de PCR se preparó un gel de agarosa al 1.5%. En este caso, se mezcló 30 mL de solución buffer TBE al 0.5X y 0.45 g de agarosa en un matraz Erlenmeyer.

Cepa control

Se utilizó la cepa IZC5c1c (identificada como *Micrococcus luteus* y obtenida de muestras del aire en el valle de Toluca) como control positivo en PCR para el gen 16S rRNA.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Contando con la extracción de DNA, se preparó una mezcla de reacción (tabla 1) para PCR. El volumen de los reactivos se calculó de acuerdo al número de muestras a procesar. Los reactivos (volumen total) fueron incorporados en un tubo de microcentrífuga en orden ascendente, sin adicionar el 1 μ L de DNA. La mezcla se centrifugó para homogeneizar y se vació 19 μ L de esta en cada tubo para PCR y se le adicionó el 1 μ L de DNA. Los primer o cebadores que se emplearon para la amplificación del 16S fueron el 8 forward y 1492 reverse (dos de los iniciadores más utilizados para la secuenciación del gen 16S rRNA bacteriano) (Gee et al., 2003; Frank et al., 2008).

Tabla 1. Reactivos para realizar mezcla de reacción para PCR.

Reactivos	Concentraciones	Volumen (μL)
PCR Master mix, 2x	10pmol/ μL	10
Primer Forward (8)	0.2 μM / pmol	0.5
Primer Reverse (1492)	0.2 μM / pmol	0.5
DNA	0.25 μg	1
H ₂ O		8
Total		20

Los tubos de PCR conteniendo la mezcla de los reactivos y el DNA se colocaron en un termociclador marca TECHNE TC-300 bajo las siguientes condiciones de tiempo y temperatura, con un total de 35 ciclos:

Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos
Desnaturalización	94°C	30 segundos
Alineamiento	52°C	30 segundos
Extensión	72°C	40 segundos
Extensión final	72°C	7 minutos

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% para visualizar el producto obtenido de PCR. Se depositó en cada carril 1 μL de 5X Green Go Taq flexi buffer y 4 μL de producto de PCR. Se corrió durante 40 minutos a 80 V. El gel se tiñó en solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) durante 15 minutos y se reveló en un transluminador de luz ultravioleta marca Bio-Rad.

Ya comprobada la amplificación del gen 16S rRNA se purificaron los productos con el kit comercial ExoSAP, a partir del siguiente procedimiento: A 5 μL de producto de PCR se le adicionó 1 μL de exonucleasa I y 1 μL de fosfatasa alcalina, se incubó a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, se sometió a baño María (80°C) durante 15 minutos. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se conservaron en refrigeración.

Los productos de PCR ya purificados se enviaron a secuenciar a MacroGen-Corea. Las secuencias obtenidas (anexo 4C) de la amplificación del gen 16S

rRNA se compararon con secuencias dentro de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y mediante el análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se identificó a cada uno de los cultivos bacterianos. Finalmente, los datos obtenidos en el análisis de las secuencias se complementaron con las características fisiológicas previamente realizadas a los cultivos bacterianos y con la susceptibilidad a antibióticos por los mismos.

Resultados

Extracción de DNA

Se extrajo el DNA total de 21 cultivos bacterianos, tal como se observa en la figura 1. En el caso de los cultivos Ad1, 1Af, 1Da1, 4Aa, 4Aa1 y 4Aa2, fue necesario repetir la extracción de DNA y se comprobó nuevamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% (Gel C).

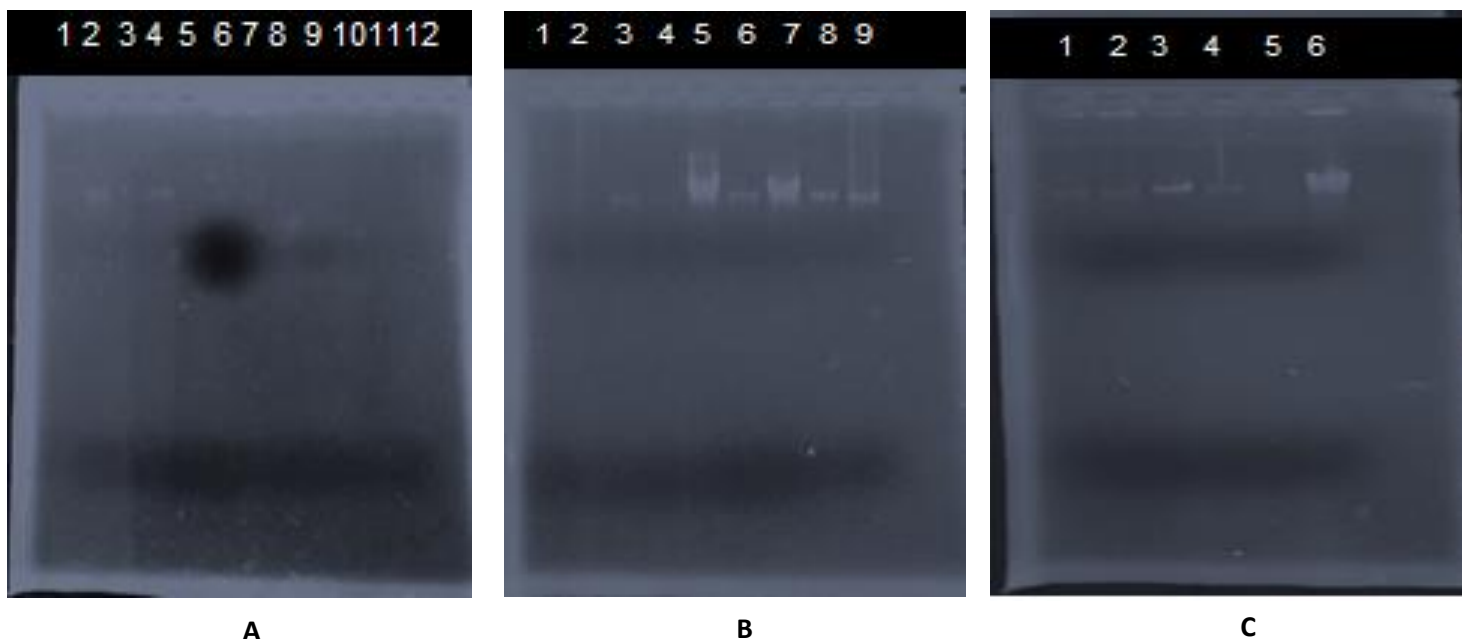


Figura 1. Extracción de DNA total de los cultivos bacterianos, electroforesis en gel de agarosa al 1.0%.

Gel A: carril 1: cepa 1Ad1; carril 2: cepa 1Ae; carril 3: cepa 1Af; carril 4: cepa 1Da; carril 5: cepa 1Da1; carril 6: cepa 2Da; carril 7: cepa 2Da1; carril 8: cepa 3Aa1; carril 9: cepa 3Da; carril 10: cepa 4Aa; carril 11: cepa 4Aa1; carril 12: cepa 4Aa2.

Gel B: carril 1: cepa 2Aa1; carril 2: cepa 3Aa; carril 3: cepa 4Ac; carril 4: cepa 4Ab; carril 5: cepa 4Ad2; carril 6: cepa 4Da; carril 7: cepa 4Db; carril 8: cepa 4Dc; carril 9: cepa 4Da1.

Gel C: carril 1: cepa 1Ad1; carril 2: cepa 1Af; carril 3: cepa 1Da1; carril 4: cepa 4Aa; carril 5: cepa 4Aa1; carril 6: cepa 4Aa2.

En la figura 2 se muestra la amplificación del gen *16S* de alrededor de 1500 pb de todos los cultivos bacterianos. En el gel A, se observa que las cepas 1Ad1, 1Ae, 1Af, 1Da, 1Da1, 2Aa1, 3Aa y 3Aa1, además del control positivo dieron resultado positivo; de igual manera fue el resultado de las cepas 3Da, 4Aa1, 4Ac, 4Ab, 4Ad2, 4Da, 4Db, 4Dc, 4Da1 y el control positivo, del gel B . En cuanto al gel C y D, la cepa 4Aa y la 4Aa2 respectivamente, dieron resultado positivo a la amplificación del gen *16S* tras repetir la PCR.

De los 21 cultivos bacterianos procesados al inicio, solo 18 amplificaron para el gen *16S* ARNr. Los cultivos 2Aa1, 2Da y 2Da1 (pertenecientes al paciente dos), no amplificaron tras realizar nuevamente el proceso de extracción y amplificación.

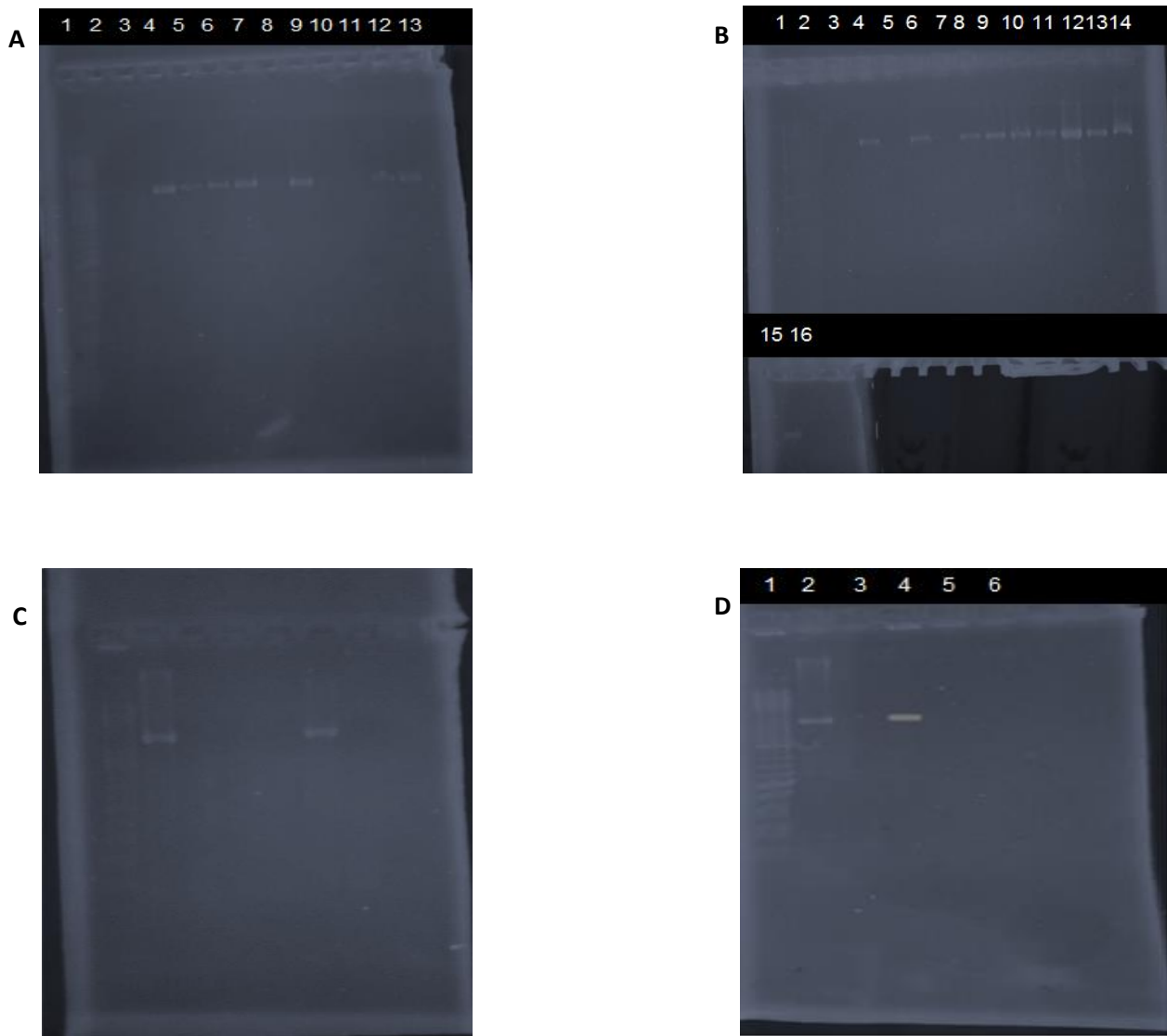


Figura 2. Amplificación por PCR del gen *16S rRNA* de los cultivos bacterianos, electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Gel A: carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: control +; carril 3: control -; carril 4: cepa 1Ad1; carril 5: cepa 1Ae; carril 6: cepa 1Af; carril 7: cepa 1Da; carril 8: cepa 1Da1; carril 9: cepa 2Aa1; carril 10: cepa 2Da; carril 11: cepa 2Da1; carril 12: cepa 3Aa; carril 13: cepa 3Aa1.

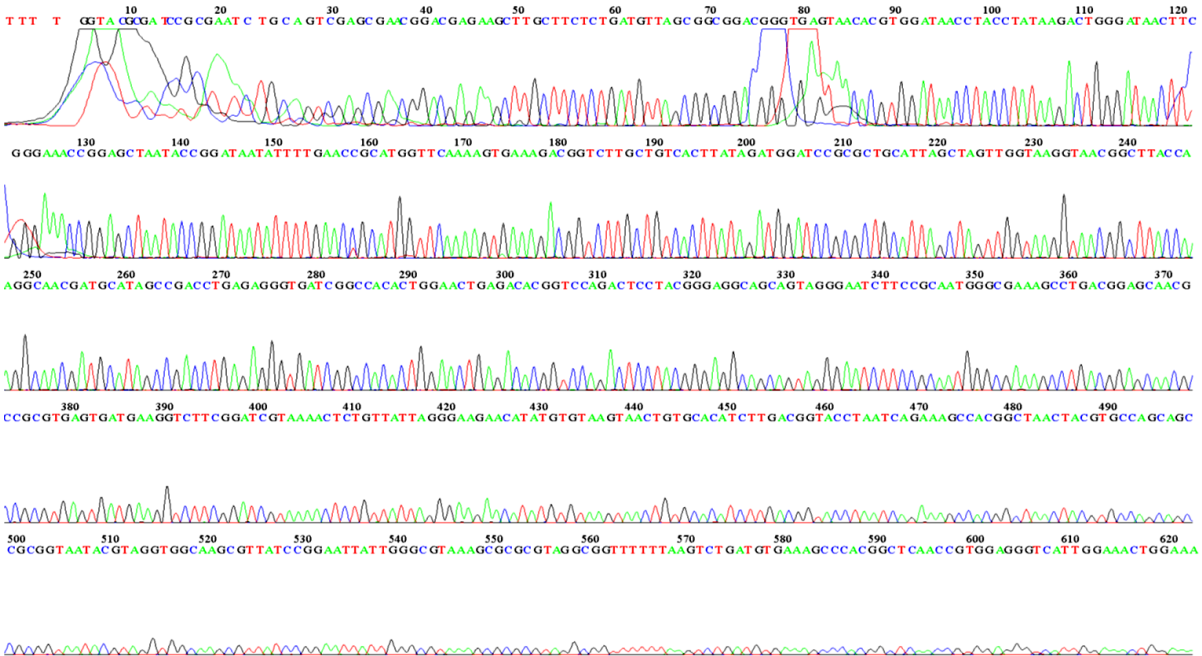
Gel B: carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: cepa 2Da; carril 3: cepa 2Da1; carril 4: cepa 3Da; carril 5: cepa 4Aa; carril 6: cepa 4Aa1; carril 7: cepa 4Aa2; carril 8: cepa 4Ac; carril 9: cepa 4Ab; carril 10: cepa 4Ad2; carril 11: cepa 4Da; carril 12: cepa 4Da1; carril 13: cepa 4Db; carril 14: cepa 4Dc; carril 15: control +; carril 16: control -.

Gel C: carriles 1: marcador de peso molecular; carril 2: control +; carril 3: control -; carril 4: cepa 2Da; carril 5: cepa 2Da1; carril 6: cepa 4Aa; carril 7: cepa 4Aa2.

Gel D: carriles 1: marcador de peso molecular; carril 2: control +; carril 3: control -; carril 4: cepa 4Aa2; carril 5: cepa 2Da; carril 6: cepa 2Da1.

Secuenciación del amplicón del gen 16S rRNA

Los amplicones se enviaron a Macrogen-Corea y se analizaron los resultados enviados. En la figura 3 se puede ver un electroferograma y la secuencia obtenida del cultivo 3Aa1.



```
TTTTGGTACGCGATCCGGAATCTGCAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCT
TGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTA
CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAGCTAATACCGGATAATA
TTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACCTATA
GATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGG
CAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GCGAAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGTCTTCGGAT
CGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCACA
TCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
```

Figura 3. Electroferograma y secuencia obtenida del cultivo 3Aa1.

Análisis de la secuencia

El resultado de la secuenciación de los productos de PCR del gen 16S rRNA bacteriano fue comparado tras un análisis BLAST en la base de datos del NCBI tal como se ejemplifica en la figura 4.

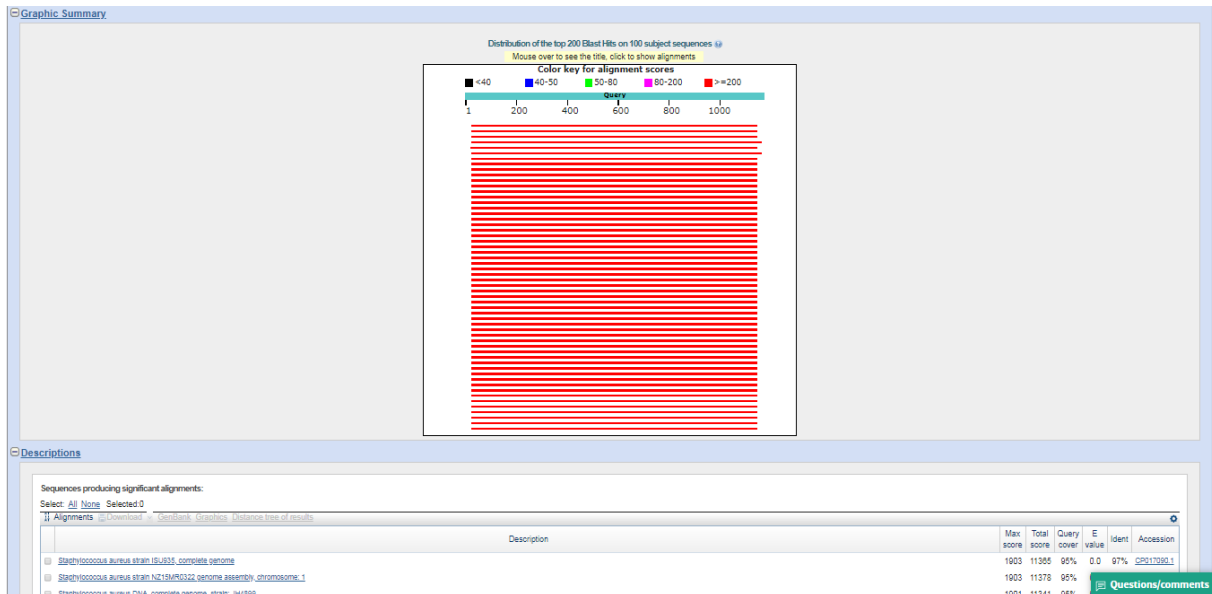


Figura 4. Ejemplo del análisis BLAST de la secuencia obtenida del cultivo 3Aa1.

En la tabla 1 se muestra la identificación final de los cultivos bacterianos ordenados por paciente y especificando el tiempo de toma de muestra (antes y después del tratamiento). En el paciente uno (P1) se identificó la misma especie bacteriana (*Staphylococcus saprophyticus*) en las muestras tomadas antes y después de aplicar el tratamiento con larvas de mosca *Lucilia sericata*. En el caso del paciente dos (P2), las muestras no amplificaron para el gen 16S rRNA. En el paciente tres (P3), los aislados obtenidos antes del tratamiento revelaron la presencia de las especies *Enterococcus faecalis* y de *Staphylococcus aureus*; en la muestra tomada después del tratamiento se determinó *Staphylococcus* sp. En el paciente cuatro (P4) se observa la identificación de dos especies de *Staphylococcus* presentes en las muestras de antes de aplicar terapia larval: *S. haemolyticus* y *S. epidermidis*, y en las muestras obtenidas después, se encontró *Staphylococcus haemolyticus*.

Tabla 1. Identificación de cultivos bacterianos mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.

Paciente	Muestra	Especie	No. acceso	
1	Antes	1Ad1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	KT441087.1
		1Ae	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	KU922275.1
		1Af	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	KC456631.1
	Después	1Da	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	MH396763.1
		1Da1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	MH491957.1
2	Antes	2Aa1	No amplificaron	
	Después	2Da		
		2Da1		
3	Antes	3Aa	<i>Enterococcus faecalis</i>	KM257699.1
		3Aa1	<i>Staphylococcus aureus</i>	CP017090.1
	Después	3Da	<i>Staphylococcus</i> sp.	MH447013.1
4	Antes	4Aa	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	MH542264.1
		4Aa1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	KY623168.1
		4Aa2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MH447004.1
		4Ab	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	KF607057.1
		4Ac	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	KT238985.1
		4Ad2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KX946155.1
	Después	4Da	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	KX822156.1
		4Da1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	JF784022.1
		4Db	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	KX946163.1
		4Dc	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	KX946157.1

Una vez identificados los cultivos puros bacterianos se procedió a complementar estos resultados con sus características morfológicas y fisiológicas realizadas previamente.

En la tabla 2 se muestran las características macroscópicas, microscópicas y fisiológicas de los cultivos puros bacterianos identificados, así como su identificación final a partir de la secuencia del gen 16S rRNA.

Los cultivos del P1 presentaron un crecimiento de colonias amarillas en medio de cultivo agar sal manitol en la muestra obtenida antes de aplicar el tratamiento larval y crecimiento de colonias blancas posterior a este (tabla 2), tras su análisis microscópico se observaron cocos Gram positivos agrupados en racimos (estafilococos Gram positivos); la mayoría de los cultivos reaccionaron a la utilización sustratos, con excepción de manitol y sorbitol, fueron anaerobios facultativos en fructuosa y presentaron capacidad de reducir nitratos; tan solo un cultivo obtenido de la muestra antes del tratamiento (1Ae) produjo ureasa y un cultivo de la muestra después del tratamiento (1Da1) fue hemolítico. En todos los aislados se identificó a la misma especie: *Staphylococcus saprophyticus*.

En el P2 las colonias del cultivo 2Aa1 perteneciente a la muestra antes del tratamiento fueron de color blanco y posterior al tratamiento de color amarillo en agar sal manitol (tabla 2). Al realizar la tinción de Gram y observar al microscopio, en el cultivo de la muestra antes del tratamiento se observó un coco Gram positivo agrupado en racimos (estafilococo Gram positivo) y en los cultivos de la muestra después del tratamiento resultaron cocobacilos Gram positivos; la identificación final de los cultivos bacterianos no pudo concretarse debido a que las muestras no amplificaron para el gen 16S. Sin embargo, sus características fisiológicas muestran actividad hemolítica en todos los cultivos, además de producir lipasa (cultivo 2Aa1) y DNAasa (cultivo 2Da). La utilización de sustratos como única fuente de carbono y energía, a excepción de manitol, fue por todos los cultivos bacterianos.

El crecimiento de las colonias del P3 antes del tratamiento fue de color amarillo y después de este fue color blanco (tabla 2), se observó tras realizar la tinción de Gram a cocos Gram positivos agrupados en racimos (estafilococos Gram

positivos) en ambas muestras; los cultivos obtenidos de la muestra previo al tratamiento resultaron positivos a la prueba de coagulasa y uno de ellos (cultivo 3Aa) fue hemolítico y lipasa positivo, y otro (3Aa1) resulto DNAasa y ureasa positivo; el cultivo de la muestra después del tratamiento fue hemolítico, DNAasa y lipasa positivos. Todos los aislados del P3 fueron anaerobios facultativos en glucosa y fructuosa, presentaron capacidad de utilizar sustratos como manitol, sacarosa, maltosa y dextrosa. Se identificó a *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* en la muestra de antes y a *Staphylococcus* sp. en la muestra después del tratamiento.

En los cultivos del P4 el crecimiento de colonias en agar sal manitol fue de color amarillo antes del tratamiento larval y color blanco posterior a este (tabla 2), en todos se observó microscópicamente a cocos Gram positivos agrupados en racimos (estafilococos Gram positivos). Todos los cultivos fueron hemolíticos (a excepción del cultivo 4Aa2), anaerobios facultativos en glucosa y presentaron capacidad para reducir nitratos; los cultivos obtenidos de la muestra antes del tratamiento fueron también anaerobio facultativos en fructuosa y presentaron capacidad para utilizar sacarosa y dextrosa. En la muestra obtenida antes de aplicar el tratamiento se identificó a *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus epidermidis*, en la muestra después solo a *Staphylococcus haemolyticus*.

Tabla 2. Características macroscópicas, microscópicas y fisiológicas de los cultivos bacterianos identificados mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.

Paciente	Muestra	Características macroscópicas Color de colonias	Características microscópicas	Pruebas bioquímicas														Especie			
				Coa	H	DNA	U	Lip	Gel	Glu/A	Fru/A	Man	Lac	Sac	Mal	Sor	Dex		NO3		
1	Antes	1Ad1	amarillo	estafilococo Gram +	-	-	-	-	-	-	+/-	+/+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
		1Ae	amarillo	estafilococo Gram +	-	-	-	+	-	-	+/-	+/+	+	+	+	+	-	+	+	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
		1Af	amarillo	estafilococo Gram +	-	-	-	-	-	-	+/-	+/+	-	+	+	+	-	+	-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
	Después	1Da	blanco	estafilococo Gram +	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-	-	+	+	+	-	+	+	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
		1Da1	blanco	estafilococo Gram +	-	+	-	-	-	-	+/-	+/+	-	+	+	+	-	+	+	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
2	Antes	2Aa1	blanco	estafilococo Gram +	-	+	-	-	+	-	+/-	+/+	-	+	+	+	+	+	-	No amplificaron	
	Después	2Da	amarillo	cocobacilo Gram +	-	+	+	-	-	-	+/-	+/-	-	+	+	+	+	+	+		
		2Da1	amarillo	cocobacilo Gram +	-	+	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+	+	+	+	+	+		
3	Antes	3Aa	amarillo	estafilococo Gram +	+	+	-	-	+	-	+/-	+/+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Después	3Aa1	amarillo	estafilococo Gram +	+	-	+	+	-	-	+/-	+/+	+	-	+	+	-	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	
		3Da	blanco	estafilococo Gram +	-	+	+	-	+	-	+/-	+/+	+	-	+	+	-	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	
4	Antes	4Aa	amarillo	estafilococo Gram +	-	+	-	-	-	-	+/-	+/+	-	-	+	+	-	+	+	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
		4Aa1	amarillo	estafilococo Gram +	-	+	-	-	-	-	+/-	+/+	-	-	+	-	-	+	+	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
		4Aa2	amarillo	estafilococo Gram +	-	-	-	-	-	-	+/-	+/+	-	+	+	-	-	+	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
		4Ab	amarillo	estafilococo Gram +	-	+	-	-	-	-	+/-	+/+	-	-	+	+	-	+	+	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
		4Ac	amarillo	estafilococo Gram +	-	+	-	-	-	+	+/-	+/+	-	-	+	-	-	+	+	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
	Después	4Ad2	amarillo	estafilococo Gram +	-	+	-	-	-	-	+/-	+/+	-	-	+	+	-	+	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
		4Da	blanco	estafilococo Gram +	-	+	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
		4Da1	blanco	estafilococo Gram +	-	+	-	-	-	-	+/-	-/-	-	-	-	-	-	+	+	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
		4Db	blanco	estafilococo Gram +	-	+	-	-	-	-	+/-	-/-	-	-	-	-	-	+	+	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
		4Dc	blanco	estafilococo Gram +	-	+	-	-	-	-	+/-	-/-	-	-	-	-	-	+	+	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	

Discusión

La identificación de bacterias mediante el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA es la técnica molecular mayormente utilizada en muestras clínicas y ambientales (Valenzuela et al., 2015). Sin embargo, tras no resultar la amplificación de este gen (16S rRNA) puede optarse por el gen *rpoB*, que también se considera útil para la identificación bacteriana y filogenia de muestras de origen humano (bacterias con repercusión clínica), animal y ambiental (Cercenado y Cantón, 2010).

En cuanto a los 18 cultivos identificados a partir del análisis de la secuencia del gen 16S rRNA, tan solo un cultivo (3Aa1) perteneciente al paciente tres (P3) resultó ser *Staphylococcus aureus* (de acuerdo con las características morfológicas y bioquímicas); lo cual no concuerda con lo mayormente reportado en la literatura. Beltrán et al. (2001) reportó tras un análisis bibliográfico de estudios realizados entre 1990 y 1998, que *S. aureus* es el microorganismo que predomina en úlceras de pie diabético. De igual manera lo describe Martínez Gómez (2004), *S. aureus* es el patógeno más importante en la infección del pie diabético. En un estudio realizado entre el año 2005 y 2010 por García (2014), *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* estuvieron asociados a infección en más de la mitad de pacientes diabéticos con úlcera en pie. Aunque Barberán (2009), refiere que *S. aureus* es el microorganismo más prevalente y causal de infección en el pie diabético.

Bocanegra et al. (2013), mencionan que en la infección inicial del pie diabético prevalecen *S. aureus* y *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), además de, *Streptococcus* β -hemolíticos, incluyendo los del grupo A, B, C y G.

Recientemente Echeverría et al. (2017), señalan que en úlceras de larga duración pueden encontrarse además de *S. aureus*, microorganismos resistentes, entre ellos MRSA, *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN), *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* y en algunos casos *Corynebacterium* y *Candida*.

En el presente estudio *Staphylococcus saprophyticus* (perteneciente a los estafilococos coagulasa negativo) fue detectado tanto en las muestras de antes y

después del tratamiento larval en el P1 (tabla 1). Tal como lo reporta Fariña et al. (2005), este microorganismo es agente causal de infecciones urinarias en mujeres en edad sexual activa (comprendida entre 15 a 50 años). En este caso, el P1 (único caso) refiere al género femenino y la herida pudo haberse contaminado durante el baño o por mala higiene de manos, ya que, *S. saprophyticus* no se adhiere comúnmente a otros tejidos (piel y mucosas).

En el P3 se aislaron e identificaron dos cultivos bacterianos obtenidos de la muestra antes del tratamiento; el cultivo 3Aa, se identificó como *Enterococcus faecalis* y el 3Aa1, como *Staphylococcus aureus* (tabla 1). En la muestra después del tratamiento se encontró a *Staphylococcus* sp. (cultivo 3Da).

Los *Enterococcus* tienen poco potencial patógeno pero pueden volverse patógenos oportunistas en un paciente inmunodeprimido. En las úlceras de pie diabético puede presentarse como parte de una infección mixta (Bocanegra et al., 2013). *Enterococcus faecalis* es el más abundante en el tracto gastrointestinal de los humanos, lo cual explica su aislamiento en muestras clínicas (Pérez et al., 2010); su principal diseminación es a través de las manos (Rodríguez et al., 2013). En muestras de antes del tratamiento del P4 fueron identificados *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus epidermidis* (cultivos 4Aa2 y 4Ad2) (tabla 1). Los cultivos pertenecientes a la muestra después se identificaron como *Staphylococcus haemolyticus* (4Da, 4Da1, 4Db y 4Dc).

Staphylococcus epidermidis, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus* (todos SCN) están asociados a patología infecciosa (Predari, 2007). En un estudio realizado por Ruiz et al. (2007), *S. epidermidis* tuvo una prevalencia del 12% de los aislamientos seguido de *S. aureus* y *E. coli* en infección del pie diabético; también encontraron, que las heridas tratadas con antibióticos presentaron reinfecciones y se manifestaron bacterias como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus cohnii*.

Bravo et al. (2009), reportaron a *Staphylococcus haemolyticus* como la segunda bacteria más frecuente en úlceras infectadas de pie diabético. Este patógeno ha

surgido en la clínica como un microorganismo multirresistente al igual que *S. epidermidis*, lo cual dificulta su tratamiento (Castro et al., 2006).

Lo anteriormente descrito realza a los estafilococos coagulasa negativo (SCN) como patógenos emergentes que pueden causar infecciones graves y difíciles de tratar. Diversos estudios proponen identificar a nivel de especie a los microorganismos responsables en un proceso infeccioso y a partir de esto, determinar un tratamiento adecuado que contribuya a contrarrestar la infección.

Los métodos moleculares, a partir de la secuenciación del 16S rRNA, ofrecen una identificación a nivel de especie (de los microorganismos de interés) de manera rápida y precisa.

Conclusiones

Un solo cultivo fue identificado como *Staphylococcus aureus* no hemolítico.

En el paciente tres se identificó a *Enterococcus faecalis* y a *Staphylococcus* sp.

La presencia de estafilococos coagulasa negativo (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus saprophyticus*) se determinó en tres pacientes, lo cual reafirma la participación causal de estos microorganismos en el desarrollo de un proceso infeccioso.

En los pacientes hay diferencias entre las especies aisladas.

Literatura citada

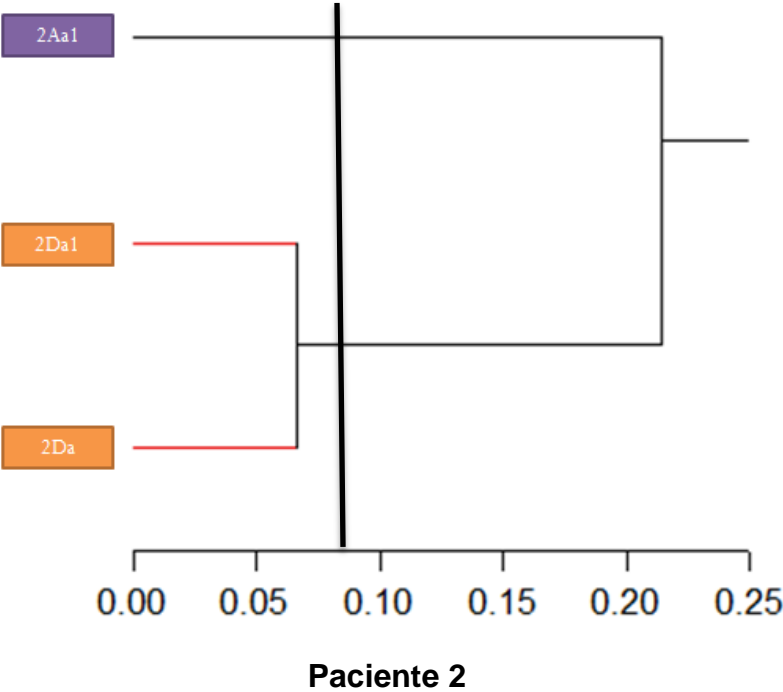
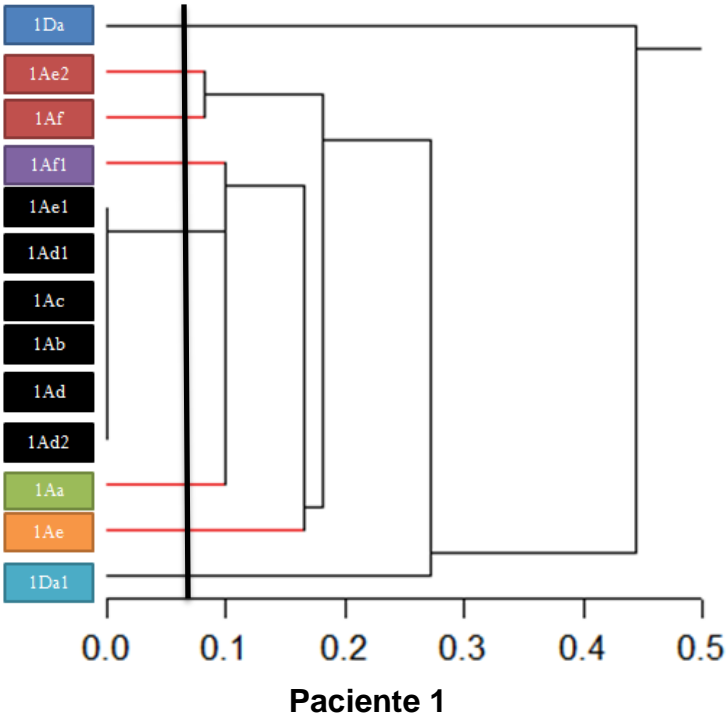
- Agapito J, Neyra V, Castro J, Accinelli R, Rodríguez I, Espinoza J. 2002. Caracterización de las mutaciones en el gen *rpoβ* asociadas a la rifampicina en pacientes con tuberculosis pulmonar. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 19 (3):117-123.
- Álvarez I, Ponce J. 2012. *Staphylococcus aureus*, evolución de un viejo patógeno. *Revista Cubana de Pediatría* 84(2): 383-391.
- Ayala L, Rodríguez R, Aguilar C, Lara F, Quero A. 2004. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Schuster, Hoff, Mandel y Lazar) Vidaver y Mandel, usando la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(2): 239-245.
- Barberán J. 2009. Infecciones en el pie diabético: importancia de las resistencias bacterianas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27(6): 315-316.
- Beltrán C, Fernandez A, Giglio S, Biagini L, Morales, R. Perez, J. Aburto, A. 2001. Tratamiento de la infección en el pie diabético. *Revista Chilena de Infectología* 18(3): 212-224.
- Bocanegra V, Cruz W, Bladinieres E, Alcalá R, Rivera G, Reyes M. 2013. Infecciones en pie diabético: conceptos y consensos generales. *CienciaUAT* 8(1): 11-17.
- Bravo L, Cortez D, Montesinos F, Muñoz M, Barrios A. 2009. Frecuencia de infecciones bacterianas en pacientes con pie diabético en dos hospitales de Chilpancingo, Guerrero. *Bioquímica* 34(SA): 98.
- Bustos J, Hamdan A, Gutiérrez M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomédica* 17: 287-305.
- Bustos J. 2011. Identificación y tipificación molecular de *Staphylococcus aureus* en alimentos. Impacto de la biología molecular y las nuevas tecnologías en el conocimiento de la función celular y sus aplicaciones. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. 1ra edición.
- Camarena J, Sánchez, R. 2001. Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Consultado el 24 de mayo de 2018. Disponible: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>.
- Camussone C, Calvino L. 2013. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista Argentina de Microbiología* 45(2): 119-130.
- Castro N, Loaiza M, Calderón A, Sánchez A, Silva J. 2006. Estudio molecular de *Staphylococcus haemolyticus* resistente a meticilina en un hospital de México. *Revista de Investigación Clínica* 58(6): 580-585.
- Cernado E, Cantón, R. 2010. Procedimientos en Microbiología Clínica: Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 37: 3-19.
- Cervantes García E, García González R, Salazar Schettino P. 2014. Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio* 61(1): 28-40.

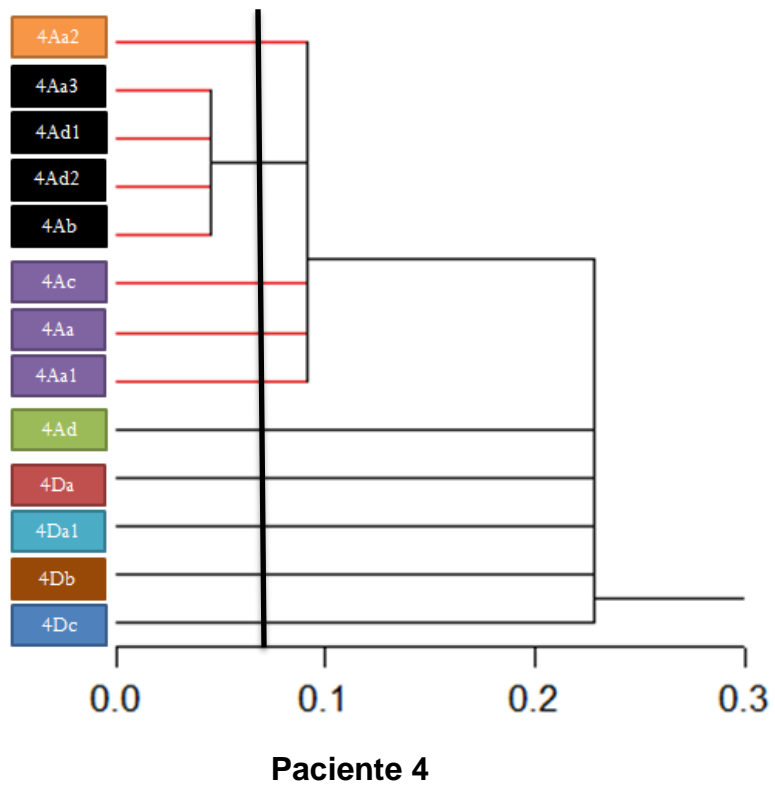
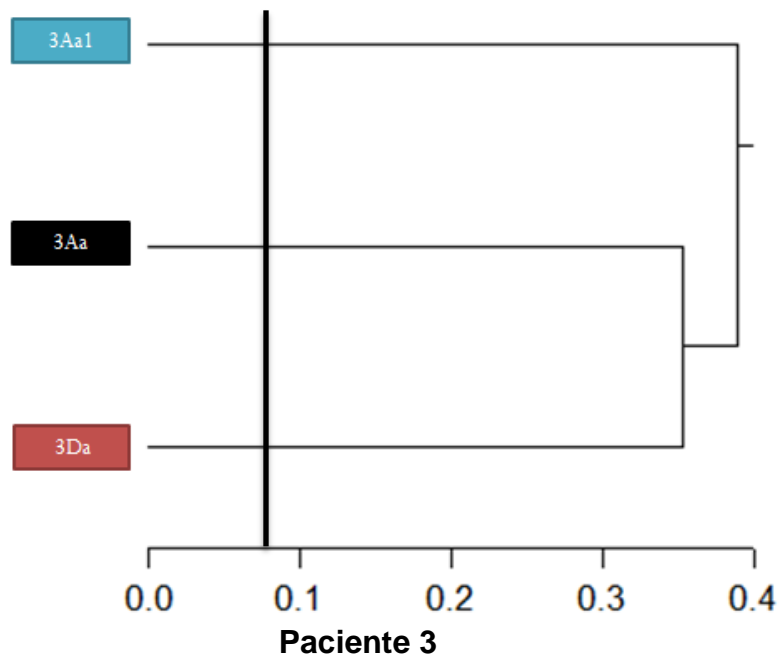
- Chambers H. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerging Infectious Diseases 7(2): 178-182.
- Díaz M, Rodríguez C, Zhurbenko III R. 2010. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología 48(2): 147-151.
- Echeverría V, Sotomayor E, Norambuena M, Vidal P, Campos A. 2016. Pie diabético. Revista Hospital Clínico Universidad de Chile 27: 207-219.
- Fariña N, Carpinelli L, Samudio M, Guillén R, Laspina F, Sanabria R, Abente S, Rodas L, González P y M. de Kaspar H. 2013. *Staphylococcus* coagulasa-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. Revista Chilena de Infectología 30(5): 480-488.
- Fariña N, Sanabria R, Figueredo L, Ramos L, Samudio M. 2005. *Staphylococcus saprophyticus* como patógeno urinario. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud 3(1): 31-33.
- Fernández A, García E, Hernández A, Canteras M, Ruiz J, Gómez J. 2012. Bacteriemia por *Staphylococcus* coagulasa negativos: Factores pronósticos e influencia del tratamiento antibiótico. Revista Española de Quimioterapia 25(83):199-205.
- Frank J, Reich C, Sharma S, Weisbaum J, Wilson B, Olsen G. 2008. Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. Applied and Environmental Microbiology 74(8): 2461-2470.
- García M. 2014. Infecciones en úlceras de pie diabético: Epidemiología, factores predictivos de multirresistencia y pronósticos asociados con amputación. Estudio prospectivo 2008-2012. Universidad de Murcia. España [Tesis doctoral]. Consultado el 08 de junio del 2018. Disponible: <https://www.tdx.cat/handle/10803/277177>.
- Gee J, Sacchi C, Glass M, De B, Weyant R, Levett P, Whitney A, Hoffmaster A, Popovic T. 2003. Use of 16S rRNA Gene Sequencing for Rapid Identification and Differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. Journal of Clinical Microbiology 41(10): 4647-4654.
- Hamdan A, González S, Bustos J. 2015. Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes *nucA* y *femB*. Revista de Ciencias Clínicas 16(2): 37-41.
- Hernández J. 2009. Biofilms en úlceras de pie diabético. Serie Sesiones Clínicas Podológicas 1(1): 7-12.
- Hirsel W. 2004. Implicancias del *Staphylococcus saprophyticus* en la patología infecciosa urinaria de la mujer. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 38(2): 217-220.
- López L, del Río G, Escalona R, Brossard G, Figueredo I, Duret Y. 2016. Detección de biofilm en estafilococo coagulasa negativa y su relación con variables clínicas epidemiológicas. Revista Archivo Médico de Camagüey 20(4): 351-358.
- Louie M, Louie L, Simor A. 2000. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. Canadian Medical Association Journal 163(3): 301-309.
- Martínez D. 2004. Tratamiento de la infección en el pie diabético. Cirugía Española 76(1): 9-15.

- Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* the accidental pathogen. Nature Reviews Microbiology 7: 555-557.
- Patel J. 2001. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Pathogen Identification in the Clinical Laboratory. Molecular Diagnosis 6(4): 313-321.
- Pedrari S. 2007. Estafilococos coagulasa negativos: el enemigo silente. Revista Argentina de Microbiología 39:1-3.
- Pérez E, Claverie F, Villar F, Méndez S. 2001. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. Journal of Clinical Microbiology 39(11): 4037-4041.
- Pérez S, Díaz A, González C, García Y. 2014. Crecimiento bacteriano en la úlcera del pie diabético previo al uso de Heberprot-P. Revista Cubana de Medicina Militar 43(2): 169-175.
- Rodicio M, Mendoza M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 22(4): 238-245.
- Rodríguez C, García S, Barberis C, Saposnik E, Weyland B, Nastro M, Losada M, Perazzi B, Almuzara M, Foccoli M, Vay C, Famiglietti A. 2013. *Enterococcus* spp.: Resistencia antimicrobiana en infecciones intrahospitalarias. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 47(1): 155-160.
- Rodríguez R, Aguilar C, Ayala L, Rocha J, Padilla V, Espinoza T. 2009. Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. Revista de Divulgación Científica AQM 1(1). Consultado el 06 de junio de 2018. Disponible: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%201/AQMmicroorganismos.html>.
- Ruiz H, Miranda A, González J, Ochoa F. 2007. Microorganismos bacteriológicos más frecuentes y resistencia en las infecciones de pie del diabético en el Hospital Regional "Dr. Valentín Gómez Farías" del ISSSTE, Zapopan, Jalisco. Revista Mexicana de Angiología 35(4): 177-184.
- Valenzuela F, Casillas R, Villalpando E, Vargas F. 2015. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. Ciencias Marinas 21(4): 297-313.
- Zendejas Manzo, G. Avalos Flores, H. Soto Padilla, M. 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generealesidades, patogenicidad y métodos de identificación. Revista Biomédica 25: 129-143.

Anexos

Anexo 3A. Dendrograma de los cultivos bacterianos obtenidos en cada paciente.





Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

Quick
PROTOCOL

Isolation of Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Pellet Cells

Centrifuge 1ml of overnight culture for 2 minutes at 13,000–16,000 × g^* .
Discard the supernatant.

A. For Gram Positive Bacteria

1. Suspend cells in 480µl 50mM EDTA.
2. Add lytic enzyme(s) (120µl) [lysozyme and/or lysostaphin].
3. Incubate at 37°C for 30–60 minutes.
4. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × g^* and remove supernatant.
5. Go to Step 1, **Lyse Cells** (below).

B. For Gram Negative Bacteria

Go to Step 1, **Lyse Cells** (below).

Lyse Cells

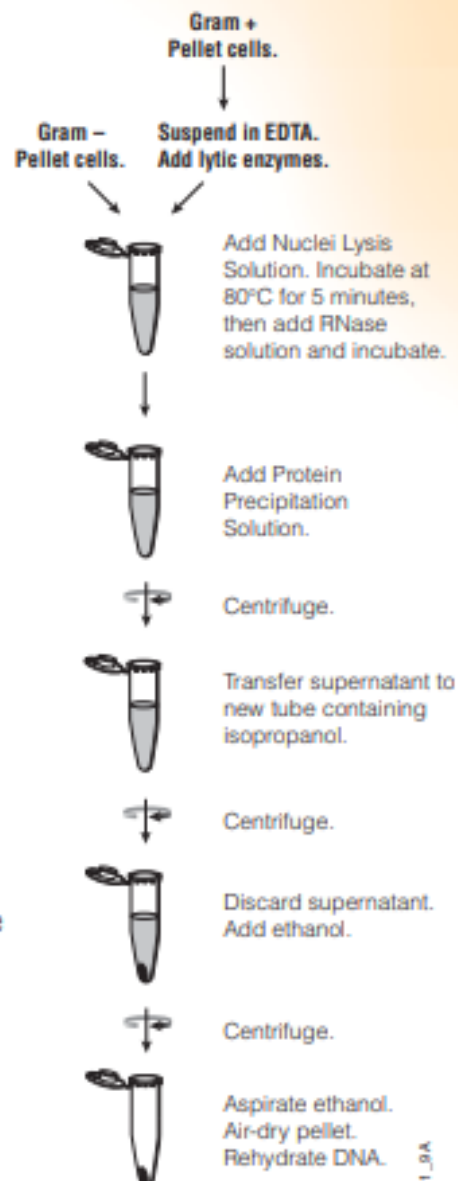
1. Add 600µl Nuclei Lysis Solution. Pipet gently to mix.
2. Incubate for 5 minutes at 80°C, then cool to room temperature.
3. Add 3µl of RNase Solution. Mix, incubate at 37°C for 15–60 minutes, then cool to room temperature.

Protein Precipitation

4. Add 200µl of Protein Precipitation Solution. Vortex.
5. Incubate on ice for 5 minutes.
6. Centrifuge at 13,000–16,000 × g^* for 3 minutes.

DNA Precipitation and Rehydration

7. Transfer the supernatant to a clean tube containing 600µl of room temperature isopropanol. Mix.
8. Centrifuge as in "Pellet Cells" above, and decant the supernatant.
9. Add 600µl of room temperature 70% ethanol. Mix.
10. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × g^* .
11. Aspirate the ethanol and air-dry the pellet for 10–15 minutes.
12. Rehydrate the DNA pellet in 100µl of Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.



*Maximum speed on a microcentrifuge.

Additional protocol information is available in Technical Manual #TM050,
available online at: www.promega.com

Anexo 3C. Secuencias del gen 16S rRNA de los cultivos bacterianos aislados de úlceras infectadas en pie diabético.

1Da

TGGCCAGGCTATCCGCGTATACATGCAGTCGAGCGACAGATAAGGAGCTT
GCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTAC
CTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACAT
TTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAG
ATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGC
GACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGA
CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG
GCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTTCGGCTC
GTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAAGTGTGCACGT
CTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
CGCGTAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTG
GAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAAT
TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGA
TCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT
AAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA
CTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
GGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG
AACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGAAACTCTAGAGATAGAGCCTTC
CCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAG
TTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGG
AGGAAGGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCT
ACACCCTGCTACAATGGACAATAAAAGGGGGCTTAACCCCGAGGCATGC
AAATCCCTAAAATTGTTCTCCATTCCGAATTGAATCTGGAAGTCCACTAA
CTGAAAGCGGGAATCCCTTTAAATCGAAATACCAAGGTTCCGGGAAAAAA
TTTCCCGGGCTTGGTAAACCCGCCCTTCAACCACCAAATTTGTAACCCC
AAACCCGGGGGGTACATTTTTGATTTCTCCAAAGGA

1Da1

TTCGTCCGTATACGTGTGCTTTGACCTGGGCCGGAAAAATGAAAAGGGGC
GCGAAAGTGGGGGAGTGACAGGGTGGGACGACCCGCCTAAGCTGAGCTAA
TACCGGATAACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTG
CTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAC
GGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
AGGGTTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAG
TAACTGTGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT
TGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCA
CGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAG

AGGAAAGTGG AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGG
AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGATGTGC
GAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCT
AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGGGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGAAA ACTCTAG
AGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGGGGTGCATGGTGG
T

1Ad1

GTGCTGGACTGGCTGCCAGTAATGCAGTCGAGCGAACAGATAAAGGAGCTT
GCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTAC
CTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACAT
TTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAG
ATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGC
GACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGA ACTGAGA
CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG
GCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTCCGGCTC
GTA AA ACTCTGTTATTAGGGAAGAACA AATGTGTAAGTAACTGTGCACGT
CTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
CGCGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTG
GAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTG CAGAAGAGGAAAGTGGAAT
TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGA
TCAAACAGGATTACATAACCCTGGTAGTCCACGCCGCAAACGATGAGTGCT
AAGTGTTAGGGGGATTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA
CTCCGTCTGGGTAGTACGACCACAAGGTTGCAACTCCAACGAATTGACGA
GGACGCGCACACGCGCTGGAGCATGCGC

1Ae

TCCCTAGGCTATACGCTGAGACCATTGCTCGTGGCTCGAGAGATAAGGAA
CATGTGCTCCTCTGTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
AACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGG
ATAACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCA
CTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTA
CCAAGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGA
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
GCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTT
TCGGCTCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACA AATGTGTAAGTAACTG
TGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCG
TAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTC
AACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTG CAGAAGAGGAAA
GTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGATGTGCGAAAGC

GTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTACACGAT
GAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCTCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGTA
TTAAGCACTCCTCCTGGGGATTAAG

1Af

TCTATTAGTATACGCTGTATCTGCTAGTCGAGCGAACAGATTAGGAGCTG
TGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTA
CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACA
TTTGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATA
GATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGG
CGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGA
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTCGGCT
CGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAAGTGTGCACG
TCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
GCGCGTAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT
GGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAA
TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGG
ATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC
TAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC
ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGAAACTCTAGAGATAGAGCCTT
CCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT
GTCCTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTA
GTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCG
GAGGAAAGGTGGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGATTTGG
GGCTACCACCGTGCTACAATGGGACAATACAAAGGGCAGCTTAAACCGCG
AGGTCATGCAAATCCCCTAAAGTTGTCTTCCAGTTCGGAATTGGAATCTG
GCAACTCGACTAACTGAAACCTGGAATCCCTTGAATCGGAAATAACCAT
GGTTACGGGGAAAACTTTCCCGGGTTTGTTACAACCGCCGGTTCACCCC
ACAGAATTGTTAACCCCAAACCCGTGGGGTACCTTTTTTTGGGTTTCCTC
CCAAGGGGAAAAATAGGGAGGGG

3Aa

TTCTTCAGGTATACGCTTATCTGCTCGTCGATCGCTTCTTTCCTCCCGAG
TGCTTGCACCTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATAC
CGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGT
GTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG
CTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG
GTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTA
ACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGT

GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG
GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG
GAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAA
CACCCTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGCTCGA
AAGCGTGGGGAGCAAACACGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACTCCGTAA
ACGATGACTGCTAAGTGTGATGGTTTCTGCCCTTCGCGCTGCATCAC
ATTTATTAAGTTCTCCTGTCTGGGC

3Aa1

TTTTGGTACGCGATCCGCGAATCTGCAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCT
TGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTA
CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATA
TTTTGAACCGCATGGTTCAAAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACTTATA
GATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGG
CAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGG
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGAT
CGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCACA
TCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
GCGCGTAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT
GGAGGGTCATTGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAA
TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGG
ATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGC
TAAGTGTTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA
CTCCGGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGACCCGCACAAGCGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG
AACCTTATCAAATCTTGACATCCTTTTGACACTCTAGAGATAGAGCCTTC
CCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGCTTGTCGCTAGCCTCGTG
TCTGAAATGCTCGGTTAAGTCCCGCCAACCAACTGCACCCTTTAAGCCTA
AGCTGCCACTCTTAGAGTTGGCACTCTAGCTGACTGGCCGGTGCACAAGA
TCGTAAGTAAGAGGGGAATGTACCGC

3Da

GAGGGTGTCCGGTAAGCTGCTATACATGCAGTCGAGCGAACGGACGAGAA
GCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAAC
CTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATA
ATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACTT
ATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCA
AGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGT
GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA
ATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCG
GATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGC
ACATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA

AGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAAC
CGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAACTTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTG
GAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTG
GGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
TGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTA
AGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAGGAATTG
ACGGGACCCGACACAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAATTGCAAGCAACGCGA
GGACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACACTCTAGAGATAGAGCTTCC
TCTTCGGGGACAAGTGACAGTGTGCATGGTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTA
GATGTTGGGTTAAGTCCGCACGAGCGCACCCCTAGCTAAGTGCAATCATAA
GTGGGCACTCTAGGTGACTGCGTGACACCGAGACGTGGGATGACGTCATC
ATCATGCCCGTATGATAGCTTACACTGCTCATGCAATCATGTCACGGACG
TAGATCAGGCCAATTCCATAAAGAGT

4Aa

TCGTTAGCTATACGCGTGTCTGCAGTCGAGCGAACAGACAAGGAGCTTGC
TCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCT
ATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTT
CGAACCGCATGGTTCGATAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGAT
GGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGA
CGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACA
CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGC
GAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGT
AAAAGTCTGTTATTAGGGAAGAACATACGTGTAAGTAACTATGCACGTCT
TGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG
CGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGA
GGGTCATTGGAAACTGGAAACTTGAAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATC
CATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAA
GGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA
GTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACT
CCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
ACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACCTCTAGAGATAGAGCCTTCCC
CTTCGGGGGACAAAGGGACAGGGGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCCTGTC
GTGAGAAGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAAG
TTGCCTTCATTAAGTTGGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCG
GAAGGAAGGGGGGATGACGTCCAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGC
TACCACCGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGGGAGGCAAACCGGCAGGT
CAAGCAAATCCCTTAAGGTTGTTCCCATTTCCGAATTGGATTTCCGCAA
CTCGAACTACTTGAGCCTGGAAATCCCAAGAAATCCAAGAATACCAAGGG
TTCAGGGGGATAACCGTTCCCGGGGGTTTGGGACCCACCGGCCTTTCCGC
CCCAAAGATTTGTTAACCCCCCAAAGCCCGGGAAAATTACCATTTGAAA
TTACCCCTTAAGTTGGGACAATTTATTGGGGGGGACT

4Aa1

TACCTCTCGTATACGCGTGTCATGCAGTCGAGCGACAGACAAGGAGCTTG
CTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACC
TATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATT
TCGAACCGCATGGTTTCGATAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGA
TGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCG
ACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGAC
ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGG
CGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCG
TAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATACGTGTAAGTAACTATGCACGTC
TTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
GCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG
AGGGTCATTGGAAACTGGAAACTTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAAT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGAT
CAAACAGGATTAGATACCCTGGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT
AAGTGTTAGGGGGGTTTTCCGCCCTCATGCTGCAGCTAACTCATTAAATCA
CTCCGTCTGGGGAGTACGACCCGGTACGCTGATACTCAAATTGAATTGAC
GTGGACCCGCACCAGCCGGTG

4Aa2

GTAGCTTGCCATACGCGTATCATGCTAGTCGAGCGACAGACGAGGAGCT
TGCTCCTCTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTA
CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATA
TATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCACTTATA
GATGGATCCGCGCCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGG
CAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAG
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGAT
CGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTATGCACG
TCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
GCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT
GGAGGGTCATTGGAAACTGGAAACTTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAA
TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGG
ATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC
TAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC
ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAATCTTGACATCCTCTGACCCTCTAGAGATAGAGTTTTCC
CCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTTGCATGGATGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTTGGGTTAGTCCCGCACGAGCGCACCCCTTAGGCTTAGTT
GCATCATAGTGGCACTCTAGGTTGACTGCCGTGACAACGAGAAGGTGGGG
ATGACGTCCATCATCATGCCTTATTGATTGGCTACACTGCTCATGAACAT
ACCAGGCAGCGCAACTGCTAGGGTCAGCAAAGTTC

4Ab

CCGTTAGCTATACGCTTACAATGCAGTCGAGCGAACAGACAAGGAGCTTG
CTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACC
TATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATT
TCGAACCGCATGGTTCGATAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGA
TGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCG
ACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGAC
ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGG
CGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCCGATCG
TAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATACGTGTAAGTAACTATGCACGTC
TTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
GCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG
AGGGTCATTGGAAACTGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGAT
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA
AGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCAC
TCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACCTCTAGAGATAGAGCCTTCC
CCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGT
TGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGA
GGAAAGTGGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTA
CCACCGTGCTACAATGGACAATAAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTCAA
GCAAATCCCCTAAAGTTGTTCTCCGTTTTCGGATTGGAGTCTGCACTCGAC
TACTTGAAGCTGGAATCCCTTGAAATCCGAAATACCATTGGCTACGGGGA
ATAACTTTCCCGGGGTTTTGTACAACCGCCCGTTCAACCCAAGAAAGTTT
GTAACCCCCCGAACCCGGGGGAGTACCTTTGGGATTCCCCTCCAGGGGGA
CAGTTTGGGGGGGGGTTTTTCCAAGGGGGGGC

4Ac

TCGCTAGGATACGCTGTATCTGCAGTCGATCGAACAGACAGGAGCTTGCT
CCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTA
TAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTC
GAACCGCATGGTTCGATAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATG
GACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGAC
GATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACAC
GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCG
AAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCCGATCGTA
AAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATACGTGTAAGTAACTATGCACGTCTT
GACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCCGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC
GCATGCGGTTTTTTAATTCTGATGTGAAAGCCCACCGCTCACCCGTGGAG
GGTCATTGGAAACTGTTAACTTGTGTTGTAGAAGAGGAAGGAGGAACTCC

CTTTTGTTGCCGTGATCTGACCAAATTTACGTGGAACCATCCCTGGGTTA
GGCAATCTTCCTTCCTGTCACTTCACTTTCCCGCGAGGTGAGTGTGGGGA
GCGGAG

4Ad2

TTCGGTCAGCTAGACGCTTACACTGCTCGTGGAGCGAACAGACTAGGAGC
TGTGCTCCTCTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACC
TACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAA
TATATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCACTTA
TAGATGGATCCGCGCCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAA
GGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGT
AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA
TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGG
ATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTATGCA
CGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACC
GTGGAGGGTCATTGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG
AATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTG
GCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGG
GGATCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
GCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
GCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGACCCCTCTAGAGATAGAGTT
TTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCT
TAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAAGTGGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGG
GCTACACACGGGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGG
TCAAGCAAATCCCCTAAAGTTGTTCTCATTTCGGATTGTAGTCTGGCAC
TCCCCTATTTAAAACCTGGAAATCGCTTGAATCCGAAATAACCCTGGCT
ACGGGGAAAACCTTTCCCGGGGTTTTGTTAACACCGGCCGGTTCACCCCA
AGAATTTGTTACCCCGAACCCGGGGGGGAAACCATG

4Da

TTCTACGTAACGCTTACCTTGATCCTGGATCGAGCAGACTTGGAACT
TGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTA
CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATA
TTTCGAACCGCATGGTTTCGATAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATA
GATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGG
CGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGT
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCCGAT
CGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAACATACGTGTAAGTAACTATGCACG
TCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC

GCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT
GGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAA
TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGG
ATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC
TAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC
ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA
AGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACCTTTGAAGATAGAGCC
TTTTCCCTTCGGGGGGACAAAGTGACAGGTGGGTGCATGGGTTGTCCGTC
AGCTCCGTGTCCGGGAAAATGTTGAGGTTAAGTCCCGCCAACCAACCGCA
ACCCCTTAAGCCTTAGTTTGCCATCCTTTAAGTTTGGGGCACTCTAAGGT
TGAAGTGCCTGGTTGACCAACCCGAAGGAAAGGTGGGGGATTGACGGTC
AAATTCTTCATGCCCCCTTATGGATTTGGGGCTTACCACCGGGGGTTACA
ATGGGAACAAAACCAAGGGGGGGAGGGAAATCCGCGCAGGTTGAGACAAA
ATTGCCCTTAAGGTTGGGGTTCCAGTTTCCGGAATTGGAATTCGGGCAA
CTTCCGCATTCTTGAAACCTGGGAACCTCGCCCTTGAAATTCGGGATA
TACCGCCCTGCTCATTGTGTTAAAACCCAGGACCCCCGGGG

4Da1

GTGGTCTGGCTATCGCGTGTACATGCAGTCGAGCGAACAGACAAGGAGCT
TGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTA
CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATA
TTTCGAACCGCATGGTTCGATAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATA
GATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGG
CGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGG
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGAT
CGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAACATACGTGTAAGTAAGTATGCACG
TCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
GCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT
GGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAA
TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGG
ATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC
TAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC
ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACCTTAGAGATAGAGCCTT
CCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTA
GTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCG
GAGGAAGGGTGGGGATGACGTCCAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGC
TACCACCGGGCTACAATGGACAATAAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTC
AAGCAAATCCCTTAAAGTTGTTTCTCAGTTCGGATTGTATTTTGGAACTC
CCATCACTGAAGCCTGGAATCCCTTGAAATCCGAAATCAAATGTTCCGG

GGAATAACTTTCCCGGGGTTTGGTACACCCGCCCTTTCAACACCCGAGAT
TTTTTAACCCCAAGCCCGGGGGGATAACCTTTGGGATTGCCCTCCAAT
GGGCACGATTGGCTTTGGGTTCGGCCAAGCGCCCGGCGGAACAGGTACCC
TTGGGTTTGGGCCTTGAATTAGCGGGGA

4Db

GGGGCATGGGCGGCGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGACAGACAAGGAGC
TTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
ACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAAT
ATTTGAAACCGCATGGTTCGATAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTAT
AGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAG
GCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGA
GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGA
TCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATACGTGTAAGTAACTATGCAC
GTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
CGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG
TGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGA
ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGG
CGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGG
GATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTG
CTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG
CACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA
AGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACCTCTAGAGATAGAGCCT
TCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTT
AGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACC
GGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCAAATCATCCTGGCCCCTTTTATTGG
GGGTACACACCGGCTTCAATGGGACATACAAAAGGGGCGCGGAAACCGCC
GAGGGCAGCAAATCCCTCAAAAATGGTTCTCACTTCCGGATTGGAGGTT
GGCAATCCACTACTTGGAAGTGGGAATCCCTTGAAATCCGAAATCACAAG
GCTACCGGGAAAACATTTCCGGGGTCTGGTACCACCGCCGCTCACACCAC
AAAATTTGAACACCCCAACCCGGGGGAACCTTTGGATTCCCATGCATTG
ATGGGGGGAGGTGGTCTGTAAGTCCGAATTGAATAGAAGATATATAGGTA
ATTCAAGGGGCAGGGATAA

4Dc

CTAGGCGTGGCTAGACTGCTTAACACATGCAGTCGAGCGACAGACAAGGA
GCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATA
ATATTTGAAACCGCATGGTTCGATAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTT
ATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCA
AGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGT
GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA
ATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCG

GATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACATACGTGTAAGTAACTATGC
ACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAAC
CGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTG
GAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTG
GGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
TGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTA
AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGC
GAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACTCTAGAGATAGAGC
CTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTGCGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGC
TTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCCAATCATCATGCCCCCTTATGATTT
GGGGCTAACACCGTGGCTACAATGGGACAATAAACAAAGGGCAGCCAAAC
CCGCCAGGTCAAGCCAATTCCCTAAAAGTTGGTTTCCAGTTCCGGATTGG
AGTTCGCAACTCGACTAATTGGAACCTGGGAATCCGCTTGAATTGGGGAA
TACCAATGGTTACGGGGAAAAAAGTTTCCCGGGCCTTGGTAACCCCGGCC
CGGGTCAACCCAAGAGGTTGGTAAACCCCGAGCCCGGGGGGAATAACCT
TTGGGAATCGCCTCCCAAGGGGCCAAAGTAGGGGGAAAAGGTTGGTGAAC
ACGTTAAGCGCTCAAGCTTCGAATTCCGGGGGTTTTTG

Conclusiones generales

En conclusión, el presente estudio demuestra que la aplicación de larvas (terapia larval) de mosca *Lucilia sericata* logró la desbridación total de tejido necrótico en tres de cuatro úlceras estudiadas en pie diabético; además se observó en todos los casos la disminución de secreción purulenta y mal olor, y por consiguiente la formación de tejido de granulación.

En cuanto al control de la carga bacteriana por acción de las larvas, el control biológico de *Staphylococcus aureus* no se comprobó más que probablemente en uno de cuatro pacientes; las bacterias identificadas en pie diabético persistieron, diferencialmente tras aplicar terapia larval y pertenecen mayormente al género *Staphylococcus*.

Staphylococcus aureus no fue en este estudio el principal microorganismo aislado.

Capítulo 4

Transferencia de tecnología

Introducción

La transferencia de tecnología es el movimiento del “saber –hacer” en determinada disciplina; se trata de transferir conocimientos y habilidades, generalmente nuevas e innovadoras, entre diferentes identidades, tales son: universidades, empresas, gobiernos y otras organizaciones con el fin de continuar su desarrollo tecnológico y ofrecer nuevos productos, servicios, procesos o aplicaciones que cubran las necesidades específicas de la sociedad (Castro et al., 2008; Zulueta et al., 2014).

Las universidades desempeñan un papel importante en la generación y difusión del conocimiento; generalmente están relacionadas con organizaciones públicas y privadas para producir, usar y transferir conocimiento y tecnología a la sociedad (Guerrera y Urbano, 2012).

La transferencia de conocimiento y tecnología por las universidades, frecuentemente son el resultado de investigaciones; en el caso de esta investigación: “Aplicación de larvas de mosca *Lucilia sericata*, como control biológico de *Staphylococcus aureus* en úlceras de pie diabético”, pretende principalmente contribuir a restablecer la salud de los pacientes y aportar mayor evidencia clínica (difusión) acerca de los beneficios de la utilización de la terapia larval en úlceras infectadas y necrosadas en pie diabético; sin embargo, a pesar de sus bondades, el proceso terapéutico es rechazado debido a prejuicios estéticos y desinformación. Este procedimiento desde sus inicios a la actualidad ha ido innovando en cuanto a su forma de aplicación y utilización se utiliza en otras naciones con buenos resultados; por lo que es necesario formalizar esta práctica en el sector salud y científico en México.

Como parte del programa de la Maestría en Ecología Aplicada, la transferencia de tecnología o conocimiento debe emplearse para resolver o dar respuesta a problemas que se susciten en la sociedad y el medio ambiente; en este caso, la transferencia de la tecnología se realizó como se describe en las páginas siguientes.

1. Plática informativa acerca del tratamiento con larvas de *Lucilia sericata* (terapia larval) a pacientes diabéticos con úlcera infectada en pie.

La plática se realizó en la primera cita con el paciente durante los meses febrero-septiembre de 2017; a cada uno se le informó a cerca de los lineamientos necesarios para su participación en el proyecto y se diseñó un folleto informativo acerca del pie diabético y la terapia larval como alternativa para su tratamiento, se describió su mecanismo de acción, proceso terapéutico y cuidados.

2. Aplicación de terapia larval en pacientes con pie diabético vulnerables a amputación.

Mediante la firma de su consentimiento informado el paciente aceptó participar en el proyecto de investigación; posteriormente tras una valoración física y visual (incluida en la historia clínica que se realizó al paciente), se determinó el grado de afectación del pie y con esto las pautas para aplicar tratamiento con larvas de mosca *Lucilia sericata*. Se aplicó terapia larval en cuatro pacientes diabéticos con úlcera infectada en pie, el tratamiento resultó exitoso principalmente ante la desbridación de tejido necrótico en la superficie de las úlceras y la subsecuente aparición de tejido de granulación (esto fue en todos los casos); además de la disminución de la secreción y mal olor en tres de cuatro pacientes.

3. Difusión del proyecto en la Galería de las Ciencias de la UAM-X.

A partir de la iniciativa de la Dra. María del Carmen Vera Rosales, se trabajó una recopilación de fotografías y escritos acerca del desarrollo del proyecto para realizar la exposición titulada: “Las Chicas SUPER Panteoneras. Un tratamiento alternativo para el pie diabético”, exhibida en julio del 2017 a través de la Galería de las Ciencias de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco.

4. Exposición de la investigación en el pasaje Zócalo-Pino Suárez.

La exposición fotográfica de “Las Chicas SUPER Panteoneras. Un tratamiento alternativo para el pie diabético”, se presentó en el pasaje del metro Zócalo-Pino Suárez de la Ciudad de México en el mes de octubre de 2017; además fue presentado por la Dra. María del Carmen Vera Rosales una exposición del tema: “Tratamiento de pie diabético con larvas de mosca *Lucilia sericata*” como parte del

programa Un paseo por la ciencia, el arte y las humanidades; salud-enfermedad, costos y consecuencias.

5. Manual para taller de terapia con larvas de mosca para heridas crónicas y consideraciones herbolarias, en la Fiesta Nacional de la Planta Medicinal en Morelos.

Se trabajó un manual con la información necesaria para llevar a cabo un taller en la Fiesta Nacional de la Planta Medicinal en Morelos impartido por la Dra. María del Carmen Vera Rosales, durante los días 15, 16 y 17 de septiembre de 2017.

6. Publicación en el Boletín informativo cauce Diciembre 2017, 14(3-4).

Se realizó la redacción de un resumen a petición del jefe de la sección y difusión del equipo de CAUCE, acerca de la epidemia del siglo XXI: la diabetes mellitus, sus complicaciones y enfoque al pie diabético; de este último se describió su fisiopatología, su epidemiología y su alternativa de tratamiento mediante la aplicación de terapia larval. A grandes rasgos se mencionó el mecanismo de acción por parte de las larvas y sus antecedentes de implementación en la UAM-X, así como, los resultados del proyecto que actualmente se llevó a cabo en la Maestría de Ecología Aplicada por la alumna Wendy Jacquelin Cifuentes Garcia, titulado: "Aplicación de larvas de mosca *Lucilia sericata*, como control biológico de *Staphylococcus aureus* en úlceras de pie diabético".

Los probatorios se presentan a continuación:

Literatura citada

- Castro E, Fernández I, Pérez M, Criado F. 2008. La transferencia de conocimientos desde las humanidades: posibilidades y características. ARBOR 732: 616-636.
- Guerrero M, Urbano D. 2012. Transferencia de conocimiento y tecnología, mejores prácticas en las universidades emprendedoras españolas. Gestión y Política Pública 21(1): 107-139.
- Zulueta J, Medina A, Negrín E. 2014. La transferencia de tecnologías universidad-empresa sustentadas en redes de valor. Ingeniería Industrial 35(2): 184-198.

1. Folleto utilizado en la plática informativa acerca del tratamiento con larvas de *Lucilia sericata* (terapia larval) a pacientes diabéticos con úlceras infectadas en pie.

DIVISIÓN DE CBS

DEPARTAMENTO DEL HOMBRE Y SU AMBIENTE

MAESTRÍA EN ECOLOGÍA APLICADA

Terapia Larval

La terapia larval (TL) tiene grandes beneficios, como: la eliminación de tejidos muertos (necrótico), la desaparición del mal olor en las primeras 24 horas después de la primera aplicación, el crecimiento acelerado de tejido sano y la remoción con facilidad de agentes patógenos infecciosos en úlceras de pie diabético.

Este tratamiento presenta una tasa de éxito que oscila alrededor del 68% en lesiones que no responden a tratamientos convencionales.



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PARTICIPAN

Dra. María del Carmen Vera Rosales^{1,2}
Dra. María Teresa Núñez Cardona^{1,3}
Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez^{1,2}
LN. Wendy Jacquelin Cifuentes García^{1,3}

Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Xochimilco¹
Departamento de Atención a la Salud²
Departamento del Hombre y su Ambiente³
Edificio G, Laboratorio 008

Contacto

Teléfono: 5548589864

Teléfono: 5549355835

Correo: carmen.vera@hotmail.com



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

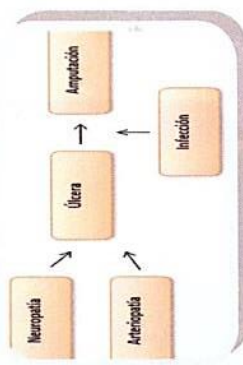


PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Larvas en pie diabético
“Una solución a un problema emergente”

Las úlceras en pie diabético se consideran como la principal causa de hospitalización por diabetes mellitus y están relacionadas con la amputación de la extremidad afectada.

El origen de las úlceras puede ser como consecuencia de neuropatía o enfermedad vascular periférica, así como la combinación de ambas. A este padecimiento se le agrega comúnmente un factor agravante, la infección, que impedirá la óptima evolución de la herida.



Esta complicación impacta enormemente al sector salud en México, principalmente por estancias largas hospitalarias, altos costos económicos para su prevención y tratamiento, que puede ser de hasta 300 mil pesos ya que no solo requiere cirugía, sino además implica participación multidisciplinaria de profesionales de la salud y finalmente los costos sociales, originados por la incapacidad de los pacientes de realizar sus actividades diarias.

Este panorama hace necesaria la implementación de medidas alternativas para el tratamiento de esta complicación y surge la terapia larval.

La **terapia larval (TL)** consiste en aplicar larvas estériles de mosca *Lucilia sericata* (mosca verde) en heridas de difícil cicatrización. Estudios científicos han demostrado que es eficaz en el tratamiento de úlceras en pie diabético.

Su mecanismo de acción en las úlceras es primeramente la **remoción del tejido muerto** que se encuentra en la superficie de la herida, seguido de la **desinfección** de la misma a partir de la secreción de sustancias como: enzimas proteolíticas, ácido fenilacético, fenilacetaldéhid y lucifensina, finalmente la **regeneración de tejido** de granulación.



La aplicación de las larvas es dentro de la úlcera, a partir de un apósito-jaula para evitar su fuga. El tiempo de aplicación es de entre 48 y 72 horas y dependerá de las condiciones del paciente. Se realiza la valoración de la herida en tratamiento cada 8 horas.

El paciente debe evitar movimientos bruscos que puedan ejercer presión sobre la herida.

Es necesario mencionar que entre las sensaciones que causa el tratamiento con larvas son: un ligero **cosquilleo** u **hormigueo**.

Al finalizar el tratamiento con larvas se limpiará la herida con suero fisiológico y se vendará para evitar reinfeción.

Se recomienda al paciente adoptar un estilo de vida saludable antes, durante y después, con una alimentación adecuada, medicación prescrita y actividad física.

A continuación se indican algunas recomendaciones de alimentación para controlar tu diabetes:

- Consumir cereales integrales, frutas y verduras crudas con cáscaras.
- Tomar al menos 3 vasos de agua simple al día.
- Evitar alimentos dulces: miel, jarabes o piloncillo, caramelos, mermeladas, ate, pasas, jugos de fruta, bebidas endulzadas y pan dulce.
- Evitar embutidos, chicharrón o manteca, mantequilla, margarina o crema y carnes grasosas.
- Consumir preferiblemente alimentos naturales. **NO PROCESADOS.**
- Evitar freír los alimentos. cocinar a la plancha, al vapor o hervidos.



2. Aplicación de terapia larval en pacientes con pie diabético vulnerables a amputación (firma de consentimiento informado).

Consentimiento informado para participar en el proyecto de investigación:
Aplicación de larvas de mosca *Lucilia sericata*, como control biológico de
Staphylococcus aureus en úlceras de pie diabético que se realiza en la Universidad
Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco

Fecha: 23/02/17 No. de expediente: 061
Señor (a): Mra. Lourdes Medina González 2 / 50 años
No. telefónico: 58483794 No. celular: 5563739308
Dirección: Av. del comercio N° 45. San Juan Xotayopem
Clave de INE: MAGNLR66041009M800

Informo que en pleno uso de mis facultades mentales he sido debidamente informado sobre los beneficios de la terapia larval con mosca *Lucilia sericata* para el tratamiento de úlceras infectadas en pie diabético, por lo cual autorizo que se me realicen:

- a) Preguntas sobre mis datos personales, enfermedad que padezco y mis hábitos de alimentación
- b) Una exploración física y visual detallada de mis pies
- c) La colecta de muestras, en su caso, para análisis microbiológico de úlceras infectadas en pie diabético
- d) Aplicación de tratamiento con larvas de mosca *Lucilia sericata* en úlceras infectadas de pie diabético

Declaro que:

- a) Comprendo en su totalidad el propósito del estudio
- b) Me han aclarado las dudas sobre mi participación como paciente para el tratamiento experimental
- c) Estoy satisfecho (a) con la información que me fue proporcionada
- d) Que mi participación en esta fase experimental es **VOLUNTARIA** y que no recibiré compensación económica por el tratamiento que me aplicarán
- e) Me comprometo a seguir las indicaciones de alimentación y cuidados de la herida antes, durante (48 a 72 horas) y después de la terapia larval (posterior a 72 horas)

Eximo de toda responsabilidad sobre mi salud a quienes aplican el tratamiento con larvas.

Lourdes Medina González
Nombre y firma del paciente

MA. CARMEN VERA ROSALES
Dra. María del Carmen Vera Rosales
Responsable del proyecto

Consentimiento informado para participar en el proyecto de investigación:
Aplicación de larvas de mosca *Lucilia sericata*, como control biológico de
Staphylococcus aureus en úlceras de pie diabético que se realiza en la Universidad
Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco

Fecha: 12-04-17 No. de expediente: 002
Señor (a): Jose Cornelio Chit Navarrete
No. telefónico: 56753797 No. celular: 5591065686 Otro: 43274226
Dirección: Fincas del puente N-81 Bosques Residencial del sur
Clave de INE: CMNVCR40091609H100


Informo que en pleno uso de mis facultades mentales he sido debidamente informado sobre los beneficios de la terapia larval con mosca *Lucilia sericata* para el tratamiento de úlceras infectadas en pie diabético, por lo cual autorizo que se me realicen:

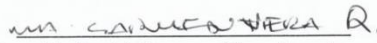
- Preguntas sobre mis datos personales, enfermedad que padezco y mis hábitos de alimentación
- Una exploración física y visual detallada de mis pies
- La colecta de muestras, en su caso, para análisis microbiológico de úlceras infectadas en pie diabético
- Aplicación de tratamiento con larvas de mosca *Lucilia sericata* en úlceras infectadas de pie diabético

Declaro que:

- Comprendo en su totalidad el propósito del estudio
- Me han aclarado las dudas sobre mi participación como paciente para el tratamiento experimental
- Estoy satisfecho (a) con la información que me fue proporcionada
- Que mi participación en esta fase experimental es **VOLUNTARIA** y que no recibiré compensación económica por el tratamiento que me aplicarán
- Me comprometo a seguir las indicaciones de alimentación y cuidados de la herida antes, durante (48 a 72 horas) y después de la terapia larval (posterior a 72 horas)

Eximo de toda responsabilidad sobre mi salud a quienes aplican el tratamiento con larvas.


Nombre y firma del paciente
Jose Cornelio Chit Navarrete


Dra. María del Carmen Vera Rosales
Responsable del proyecto

**Consentimiento informado para participar en el proyecto de investigación:
Aplicación de larvas de mosca *Lucilia sericata*, como control biológico de
Staphylococcus aureus en úlceras de pie diabético que se realiza en la Universidad
Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco**

Fecha: 18/04/2017 No. de expediente: 003
Señor (a): Raúl García Pérez
Número telefónico: _____ No. celular: 48175573
Dirección: Auditorio Yauhtepac, Mz: 3, Lt: 2, Col. Emiliano Zapata
Clave de INE: GRPRRL66041109 Edad: 51 años
H000

Informo que en pleno uso de mis facultades mentales he sido debidamente informado sobre los beneficios de la terapia larval con mosca *Lucilia sericata* para el tratamiento de úlceras infectadas en pie diabético, por lo cual autorizo que se me realicen:

- a) Preguntas sobre mis datos personales, enfermedad que padezco y mis hábitos de alimentación
- b) Una exploración física y visual detallada de mis pies
- c) La colecta de muestras, en su caso, para análisis microbiológico de úlceras infectadas en pie diabético
- d) Aplicación de tratamiento con larvas de mosca *Lucilia sericata* en úlceras infectadas de pie diabético

Declaro que:

- a) Comprendo en su totalidad el propósito del estudio
- b) Me han aclarado las dudas sobre mi participación como paciente para el tratamiento experimental
- c) Estoy satisfecho (a) con la información que me fue proporcionada
- d) Que mi participación en esta fase experimental es **VOLUNTARIA** y que no recibiré compensación económica por el tratamiento que me aplicarán
- e) Me comprometo a seguir las indicaciones de alimentación y cuidados de la herida antes, durante (48 a 72 horas) y después de la terapia larval (posterior a 72 horas)

Eximo de toda responsabilidad sobre mi salud a quienes aplican el tratamiento con larvas.

RAÚL GARCÍA P.
Nombre y firma del paciente

MA. CARMEN VERA ROSALES
Dra. María del Carmen Vera Rosales
Responsable del proyecto

**Consentimiento informado para participar en el proyecto de investigación:
Aplicación de larvas de mosca *Lucilia sericata*, como control biológico de
Staphylococcus aureus en úlceras de pie diabético que se realiza en la Universidad
Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco**

Fecha: 19/Sep/17 No. de expediente: 005
Señor (a): Federico Gomez Vega
Número telefónico: 5563368055 No. celular: 5546768076
Dirección: _____
Clave de INE: _____ Edad: 60 años

Informo que en pleno uso de mis facultades mentales he sido debidamente informado sobre los beneficios de la terapia larval con mosca *Lucilia sericata* para el tratamiento de úlceras infectadas en pie diabético, por lo cual autorizo que se me realicen:

- a) Preguntas sobre mis datos personales, enfermedad que padezco y mis hábitos de alimentación
- b) Una exploración física y visual detallada de mis pies
- c) La colecta de muestras, en su caso, para análisis microbiológico de úlceras infectadas en pie diabético
- d) Aplicación de tratamiento con larvas de mosca *Lucilia sericata* en úlceras infectadas de pie diabético

Declaro que:

- a) Comprendo en su totalidad el propósito del estudio
- b) Me han aclarado las dudas sobre mi participación como paciente para el tratamiento experimental
- c) Estoy satisfecho (a) con la información que me fue proporcionada
- d) Que mi participación en esta fase experimental es **VOLUNTARIA** y que no recibiré compensación económica por el tratamiento que me aplicarán
- e) Me comprometo a seguir las indicaciones de alimentación y cuidados de la herida antes, durante (48 a 72 horas) y después de la terapia larval (posterior a 72 horas)

Eximo de toda responsabilidad sobre mi salud a quienes aplican el tratamiento con larvas.

Federico Gerardo Gomez Vega

Nombre y firma del paciente

MD. CARMEN VERA ROSALES

Dra. María del Carmen Vera Rosales
Responsable del proyecto

3. Difusión del proyecto en la Galería de las Ciencias de la UAM-X.



La Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
a través de la Galería de las Ciencias de la
Coordinación de Extensión Universitaria otorga el presente

RECONOCIMIENTO a:

Mtra. Wendy Jacquelin Cifuentes García

por la investigación para realizar la exposición



exhibida durante el mes de julio de 2017.

Mtra. Catalina Durán McKinster
COORDINADORA DE EXTENSION UNIVERSITARIA

DCG. Cecilia Ezeta Genis
RESPONSABLE DE LA GALERIA DE LAS CIENCIAS

Coordinación de
Extensión Universitaria
Galería de las Ciencias

Ciudad de México a 31 de julio de 2017

4. Exposición de la investigación en el pasaje Zócalo-Pino Suárez.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO.

México, D.F. 4 de Dic. 2017

A QUIEN CORRESPONDA

P R E S E N T E

Por medio de la presente ha constar que la LN WENDY JACQUELIN CIFUENTES GARCÍA. Participó en el programa: Un Programa por la ciencia el arte y las humanidades, Salud, enfermedad, costos y consecuencias, con la exposición: *Tratamiento del pie diabético con larvas de mosca Lucilia sericata*, que se exhibió en el pasaje Zócalo-Pino Suárez, el mes de octubre del año en curso.

Se extiende la presente para los fines que convenga a la interesada.

ATTE

MA. CARMEN VERA ROSALES

Dra. Ma. Del Carmen Vera Rosales

Dpto Atención a la Salud



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

La Universidad Autónoma Metropolitana
otorga la presente

CONSTANCIA

a la

Dra. María del Carmen Vera Rosales

Por su participación en el programa Un paseo por la ciencia, el arte y las humanidades; Salud- enfermedad costos y consecuencias, con la exposición: "Tratamiento de pie diabético con larvas de mosca *Lucilia sericata*", que se exhibió en el pasaje Zócalo Pino Suárez a lo largo del mes de octubre

Mtro. Francisco Mata Rosas
Coordinador General de Difusión

Lic. María del Carmen García Guízar
Jefa de la Sección Comunicación de la Ciencia

Ciudad de México, octubre de 2017

5. Manual para taller de terapia con larvas de mosca para heridas crónicas y consideraciones herbolarias, en la Fiesta Nacional de la Planta Medicinal en Morelos.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO.

México, D.F. 4 de Dic. 2017

A QUIEN CORRESPONDA

P R E S E N T E

Por medio de la presente haho constar que la LN WENDY JACQUELIN CIFUENTES GARCÍA. Colaboró en el diseño y organización de taller de Terapia con larvas de Mosca, que se impartió en el Instituto Mexicano de Medicinas Tradicionales, Tlahuilli, en Xilitepec Morelos.

En dicha actividad se realizó un manual de enseñanza de dicha terapia.

Sin mas por el momento, quedo de usted.

ATTE

MA. CARMEN VERA ROSALES

Dra. Ma. Del Carmen Vera Rosales

Dpto Atención a la Salud

Xochitepec, Mor., a 17 de Septiembre de 2017

El Instituto Mexicano de Medicinas Tradicionales Tlahuilli, A. C.
y el H. Ayuntamiento del Municipio de Xochitepec,

otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

A

Dra. Carmen Vera Rosales

por impartir el taller:

*Terapia con larvas de mosca (TLM), para heridas
crónicas y consideraciones herbolarias*

el cual tuvo una duración total de 22 horas y fue realizado durante
la **XXXIII Fiesta Nacional de la Planta Medicinal**, los días 15, 16 y 17 de
Septiembre de 2017 en Xochitepec, Morelos, México.



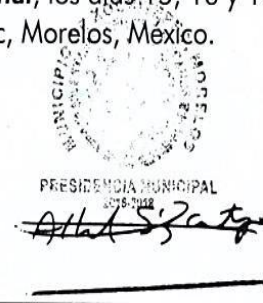
**Fiesta Nacional
de la Planta Medicinal**



Xochitepec
Gobierno Municipal 2016-2018



Dr. Horacio Rojas Alba
Presidente del Instituto Mexicano de
Medicinas Tradicionales Tlahuilli, A. C.



Alberto Sánchez Ortega
Presidente Municipal del Municipio
de Xochitepec, Morelos

TERAPIA CON LARVAS DE MOSCA PARA HERIDAS CRÓNICAS EN PIE DIABÉTICO: OBSERVACIONES PRELIMINARES.



Autores

Dra. María del Carmen Vera Rosales
LN. Wendy Jacquelin Cifuentes Garcia

Tratamiento alternativo del pie diabético

Wendy Jacquelin Cifuentes García

En la actualidad se considera a la *diabetes mellitus* como la epidemia del siglo XXI; en nuestro país se ubica como la primera causa de muerte, seguida de enfermedades cardiovasculares (Soto *et al.*, 2016). Se reportan más de 6.4 millones de personas diabéticas, de ellas, un 30 por ciento presentan complicaciones, lo cual es un reto para el sector nacional de salud en México.

Las úlceras en pie diabético se consideran como la complicación más grave de la *diabetes mellitus* y se caracteriza por alteraciones anatómicas funcionales de las extremidades; la neuropatía es la enfermedad vascular periférica e infección provocan una ruptura tisular que puede presentarse, desde una pequeña lesión hasta la gangrena, que conduce a una amputación (Cisneros *et al.*, 2016).

El proceso infeccioso es un factor agravante en las ulceraciones y responsable del retraso en la cicatrización, entre las bacterias asociadas se encuentran cocos Gram positivos, de los cuales, el *Staphylococcus aureus*, el *Streptococcus spp* y el *Enterococcus spp* son las más frecuentes. Sobre los bacilos Gram negativos, diversos estudios han descrito que se cultivan principalmente las *Pseudomonas spp* y Enterobacterias como: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella* (Martínez-Gómez DA. 2004; Beltrán *et al.* 2001).

Se recomienda identificar tempranamente a las bacterias presentes en las ulceraciones, lo cual permite conocer la etiología de las infecciones, que sin duda contribuye a la elección del tratamiento antibiótico adecuado y de esta manera se puedan evitar amputaciones.

Un dato alarmante es que en 2013 se registraron 75 mil amputaciones dentro del Sistema Nacional de Salud (Gutiérrez, 2014), lo cual impacta al sector de salud pública (Rivero, 2006) debido a largos periodos de hospitalización, altos costos económicos para su prevención y tratamiento, que puede ser de hasta 300 mil pesos ya que no solo requiere cirugía, sino además implica participación multidisciplinaria de profesionales de la salud (Cisneros *et al.*, 2016). Además deben tomarse en cuenta los costos sociales, originados por la incapacidad laboral de los pacientes, entre diversas situaciones que afectan su calidad de vida y la de sus familiares.

Debido a lo anterior, surge la necesidad de emplear nuevas medidas para el tratamiento del pie diabético, ya que las cifras de amputaciones actuales nos reflejan la incapacidad sanitaria para resolver el problema y controlar esta afección.

Es necesario asumir la problemática de salud pública que representa esta situación, lo cual repercutirá de manera favorable en el paciente y por lo tanto en el Sistema Nacional de Salud.

Una alternativa antigua aunque poco estudiada en México, es el uso terapéutico de larvas de mosca como las de *Lucilia sericata* (Diptera: *Calliphoridae*). Esta terapia puede ser una alternativa complementaria para tratar al pie diabético, que ayuda a controlar el desarrollo de poblaciones bacterianas y a obtener una curación de la herida más rápida, reductible (Figuroa y Uherek, 2006) y, sobre todo, disminuye el riesgo

de amputación y de perder la vida. Esta terapia no tiene efectos secundarios, es inocua para la salud y debe ajustarse a los aspectos éticos, tomando en cuenta en todo momento, los cuidados de asepsia y la integridad de los pacientes, la sociedad y el ambiente.

La técnica consiste en aplicar larvas de mosca *Lucilia sericata* previamente esterilizadas en heridas crónicas y de difícil cicatrización, generalmente el número de larvas debe ser entre cinco a diez por centímetro cuadrado de la herida (Ríos *et al.*, 2013). El efecto de la aplicación, primero, es la remoción de tejido necrótico en la herida, seguido de la muerte bacteriana; finalmente la regeneración de tejido de granulación (Figuroa y Uherek, 2006).

Antecedentes del tratamiento en la UAM-X

El desarrollo por primera vez de la investigación, en la UAM-X, fue en el año 2010, a partir de un estudio piloto, en el cual participó un grupo de alumnos del módulo: procesos celulares fundamentales a cargo de la doctora María del Carmen Vera Rosales. Se logró el desarrollo y primeras afinaciones de técnicas, en todas las fases. Estas bases permitieron profundizar en la temática y se consiguió la aprobación del proyecto por el Consejo Académico Universitario; con el título: "Producción y esterilización de larvas de mosca *Lucilia sericata*, consideraciones en el tratamiento de úlcera crónica en el pie diabético". Se dispone de un laboratorio en el edificio G-008 con un criadero de moscas y larvas estériles, así como del material y equipo para tratar a los pacientes. En la actualidad la alumna Wendy Jacquelin Cifuentes García desarrolla en la Maestría de Ecología Aplicada de la UAM-X, el proyecto: "Aplicación de larvas de mosca *Lucilia sericata*, como control biológico de *Staphylococcus aureus* en

úlceras de pie diabético”, en el que se implementa la aplicación de larvas de mosca estériles en pacientes proclives a la amputación, con la finalidad de valorar su efecto benéfico, principalmente ante la desinfección de la herida y por consiguiente en su óptima evolución. Respecto del procesamiento de las muestras microbiológicas de úlceras infectadas se cuenta con el apoyo del Laboratorio de Ecología Microbiana, a cargo de la doctora María Teresa Núñez Cardona y del Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular que coordina el doctor Jaime Amadeo Bustos Martínez.

Referencias

- Beltrán C, Fernández A, Giglio S, Biagini L, Morales, R. Perez, J. Aburto, A. 2001. Tratamiento de la infección en el pie diabético. *Revista Chilena de Infectología*: 18(3).
- Cisneros, N. Ascencio, I. Libreros, V. Rodríguez, H. Campos, A. Dávila, J. Kumate, J. Borja, V. 2016. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 54(4): 472-9.
- Figueroa, L. Uherek, F. 2006. Experiencia de terapia larval en pacientes con úlceras crónicas. *Parasitología Latinoamericana* 61:160-164.
- Gutiérrez, A. 2014. Amputación de extremidades. ¿Van a la alza? *Revista Mexicana de Angiología* 42(3):112-114.
- Martínez, D. 2004. Tratamiento de la infección en el pie diabético. *Cirugía Española* 76(1):9-15.
- Ríos, Y. Mercadillo, P. Yuil, R. Ríos, C. 2013. Terapia con larvas de mosca para heridas crónicas: alternativa en una época de creciente resistencia a los antimicrobianos. *Dermatología Cosmética Médica y Quirúrgica*: 11(2).
- Rivero, F. 2006. Programa de prevención del pie diabético. Iniciativa local para un problema global. *Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vasculat* 7(1):1-3.
- Soto, G. Moreno, L. Pahuá, D. 2016. Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM* 59(6):8-22.




Fotografías: Carlos Montes Hernández.



Producto de trabajo

- Septiembre 2016 – Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. XXI Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud. Ponente: “Aplicación de larvas de *Lucilia sericata* como control biológico de *Staphylococcus aureus* en úlceras de pie diabético”.


 Universidad Autónoma Metropolitana
 Unidad Iztapalapa


La Universidad Autónoma Metropolitana
 y
 el Departamento de Ciencias de la Salud


Otorgan la presente

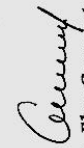
Constancia
 a:

Cifuentes García Wendy Jacquelín, Cruz Pauseno Guadalupe, Núñez Cardona María Teresa, Vera Rosales María del Carmen

Por la presentación del trabajo:
APLICACIÓN DE LARVAS DE *Lucilia sericata* COMO CONTROL BIOLÓGICO DE *Staphylococcus aureus* EN ÚLCERAS DE PIE DIABÉTICO


en el **XXI Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud**
 17 al 21 de octubre, 2016
 Sala Sandoval Vallarta




 Norma E. López Dig. G.
 Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero

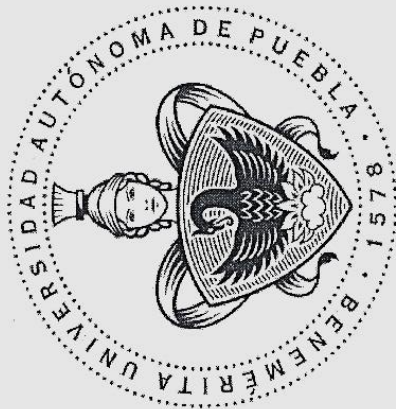

 Elsa Cervantes Ríos
 Dra. Elsa Cervantes Ríos

Jefe del Dpto. de Ciencias de la Salud

Coordinadoras


 POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL


 LAB BRANDS



BUAP

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

CICM - ICUAP

otorga la presente

CONSTANCIA

A: Wendy J Cifuentes García; Guadalupe Cruz Pauseno; María T Núñez Cardona; María C Vera Rosales; Jaime A Bustos Martínez

Por su valiosa participación con el trabajo de investigación en modalidad de cartel con el tema:

BACTERIAS ASOCIADAS A INFECCIÓN EN ÚLCERAS DE PIE DIABÉTICO

Durante el 2do. Congreso Nacional de Investigaciones Microbiológicas, llevado a cabo los días 7 al 9 de Noviembre de 2016 en el Teatro del Complejo Cultural Universitario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., 9 de Noviembre de 2016


Dr. C. Jesús F. López Regalado
PRESIDENTE DEL CICM-ICUAP


Dr. C. Fabiola Acuña Flores
COORDINADORA DEL CICM-ICUAP


Dra. Constanza Morán Raya
SECRETARIA DE ACADÉMICA DEL CICM-ICUAP


Dra. Mariana Lilia Cepeda Ramírez
PRESIDENTE DEL CONITE

- Noviembre 2016 - Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2do. Congreso Nacional de Investigaciones Microbiológicas. Ponente: " Bacterias asociadas a infección en úlceras de pie diabético".

- Mayo 2017 - Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. 2ª Reunión de Ecología Aplicada. Ponente: "Aplicación de larvas de mosca *Lucilia sericata* en úlceras infectadas de pie diabético".

CELEBRANDO EL DÍA
INTERNACIONAL DE LA DIVERSIDAD
BIOLÓGICA 22/5/2017

SEGUNDA REUNIÓN ACADÉMICA
EN ECOLOGÍA APLICADA



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD **UNIDAD XOCHIMILCO**
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE



Se otorga la presente
CONSTANCIA

A: Cifuentes García Wendy Jacquelin, Núñez Cardona María Teresa,
Vera Rosales María del Carmen y Jaime Amadeo Bustos Martínez

Como autores del Cartel: APLICACIÓN DE LARVAS DE MOSCA *Lucilia sericata* EN ÚLCERAS
INFECTADAS DE PIE DIABÉTICO

M. EN SIG. GILBERTO SVENGINQUIST CERVANTES

Jefe del Departamento:
El Hombre y su Ambiente



"HAY UN LIBRO ABIERTO SIEMPRE PARA TODOS LOS OJOS:
LA NATURALEZA" (JEAN JACQUES ROUSSEAU).

DR. LUIS AMADO AYALA PÉREZ

Coordinador de la Maestría
en Ecología Aplicada

- Octubre 2017 – Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 13° Congreso de Investigación. Ponente: “Uso de larvas de *Lucila sericata* como alternativa para controlar el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en úlceras infectadas de pie diabético”.



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO

CONSTANCIA

Que otorga la
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
a través del Departamento
de Educación Continua

a *Wendy Jacquelin Cifuentes García, María Teresa
Niñez Cardona, María Del Carmen Vera Rosales,
Jaime Amadeo Bustos Martínez*

Por la presentación del Trabajo en Cartel: **Uso de Larvas de *Lucilia sericata* como Alternativa para Controlar el Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en úlceras Infectadas de Pie Diabético**, dentro del 13° Congreso de Investigación, organizado por la División de Estudios de Posgrado e Investigación de esta Facultad el 19 de octubre del año en curso.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 20 de octubre de 2017.



Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez
Director



- Diciembre 2017 – Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. XXII Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud. Ponente: “Caracterización fisiológica de las bacterias presentes en úlceras de pie diabético”.

XXII Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud 2017
 UAM Iztapalapa

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
 y
 EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
 UNIDAD IZTAPALAPA

Otorgan la presente
Constancia
 a:

Cifuentes García Wendy Jacquelin, Núñez Cardona Ma. Teresa, Vera Rosales Ma. Del Carmen,
 Bustos Martínez Jaime Amadeo

Por la presentación del trabajo:
"CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS BACTERIAS PRESENTES EN ÚLCERAS DE PIE DIABÉTICO"

en el **XXII Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud**
 18 y 19 de septiembre, 13 al 15 de diciembre, 2017
 Sala Cuicacalli

Dr. Eduardo Casas Hernández
 Jefe del Depto. de Ciencias de la Salud

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
 Coordinadora

Dra. Elsa Cervantes Ríos
 Coordinadora

- Enero 2018 –Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Encuentro Académico Día del Biólogo 2018. Ponente: “Bacterias heterótrofas asociadas a úlceras en pie diabético”.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
 División de Ciencias Biológicas y de la Salud
 Departamento El Hombre y su Ambiente

OTORGAN LA PRESENTE CONSTANCIA

A: Cifuentes García Wendy Jacquelin, Núñez Cardona Ma. Teresa, Vera Rosales Ma. Del Carmen, Bustos Martínez Jaime Amadeo

Por su participación en la presentación del cartel científico “BACTERIAS HETERÓTROFAS ASOCIADAS A ÚLCERAS DE PIE DIABÉTICO” en el Encuentro Académico Día del Biólogo 2018.


Celebrado en la Ciudad de México, 25 de Enero de 2018.

Mtro. Rafael Díaz García
 Director de la División de CBS

M. en C. Araceli Cortes García
 Coordinadora del Evento

Dra. Jueth Castellanos Moguel
 Coordinadora de la Licenciatura en Biología

- Mayo 2018 –Centro de Investigaciones en Óptica. XV Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia. Ponente: “Factores de virulencia en cultivos obtenidos de úlceras infectadas en pie diabético”.



Centro de Investigaciones en Óptica, A.C.


XV encuentro
 Participación de la
Mujer
 en la
Ciencia


23-25 MAYO 2018 León, Guanajuato


Orga el presente
Reconocimiento
por su valiosa participación a:

Wendy Jacquelin Cifuentes Garcia, María Teresa Núñez Cardona, María del Carmen Vera Rosales y Jaime Amadeo Bustos Martínez

FACTORES DE VIRULENCIA EN CULTIVOS OBTENIDOS DE ÚLCERAS INFECTADAS EN PIE DIABÉTICO
 Por el trabajo:


Dra. Gloria Verónica Vázquez García
 Representante del Comité Organizador


Dr. Elder de la Rosa Cruz
 Director General del CIO


Por: David Crougfoot Hodgkin