



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**



“Patrones de asociación de los genes que codifican adhesinas en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*”

**TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO**

PRESENTA:

Diego Arturo Ornelas Ayala

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. Gloria Luz Paniagua Contreras

AGRADECIMIENTOS

Agradezco eternamente a mis padres por todo el apoyo brindado en todos los compromisos de mi vida, gracias a su soporte, consejos y paciencia he podido titularme como Biólogo el día de hoy, a ustedes les debo todo lo que fui, soy y seré, muchas gracias.

También quiero agradecer a todos los profesores que me formaron como Biólogo en estos últimos 4 años, pero en especial a mi directora de Tesis, la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras, por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo de tesis, además de brindarme la oportunidad de asistir a mi primer congreso nacional, muchas gracias. También agradezco al Dr. Eric Monroy Pérez por los comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Por último, quiero agradecer a la UNAM, la mejor universidad de todas, la cual me ha cobijado entre sus puertas desde hace ya 7 años cuando ingresé al CCH, gracias a ella y a todo lo antes mencionado soy ahora un Biólogo, gracias.

ÍNDICE

Resumen	4
Introducción	4
Características de <i>Staphylococcus aureus</i>	5
Contaminación bacteriana de los catéteres de hemodiálisis.....	6
Resistencia de <i>S. aureus</i> a la meticilina.....	7
Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Antecedentes	13
Objetivo general	15
Objetivos particulares	15
Material y métodos	16
Selección de pacientes y toma de muestras.....	16
Extracción de ADN de <i>S. aureus</i>	16
Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> por PCR.....	17
Detección del gen <i>mecA</i> en las cepas de <i>S. aureus</i> por PCR.....	17
Detección de los genes que codifican adhesinas y otros genes por PCR convencional de las cepas de <i>S. aureus</i>	18
Origen de las muestras	22
Causas de la IRC de los pacientes estudiados	23
Detección del gen <i>mecA</i> en las cepas de <i>S. aureus</i> por PCR convencional.	26
Detección de los genes que codifican adhesinas por PCR convencional de las cepas de <i>S. aureus</i>	26
Diferentes combinaciones de genes encontradas en catéter y narinas.....	33
Discusión	35
Análisis de pacientes	35
Detección de los genes que codifican adhesinas y otros genes por PCR convencional de las cepas de <i>S. aureus</i>	39
Diferentes combinaciones de genes encontradas en catéter y narinas.....	44
Conclusiones	46
Bibliografía	47

RESUMEN

La inserción de catéteres vasculares representa una alternativa para el tratamiento de la insuficiencia renal crónica (IRC), sin embargo, constituye un factor de riesgo para contraer bacteremias. *Staphylococcus aureus*. posee una familia de genes que codifican adhesinas llamadas MSCRAMMs (microbial surface components recognising adhesive matrix molecules), las cuales sirven de unión a diferentes superficies del hospedero y a biomateriales como los catéteres. Esta adherencia puede causar posteriormente la internalización de la bacteria, provocando enfermedades como la osteomielitis, endocarditis y pneumonia.

Para la realización del trabajo se tomaron muestras del catéter y de las narinas de 112 pacientes con IRC provenientes de distintos hospitales, de los cuales 48 fueron mujeres y 64 hombres, con edades entre los 17-77 años. La identificación de *S. aureus* se realizó por PCR, mediante la detección de los marcadores *femA*, *femB* y *nuc*. La identificación de las adhesinas: *bbp*, *clfB*, *ebpS*, *map/eap*, *sdrC*, *sdrD* y *sdrE*; y otros genes: *chp*, *efb*, *V8* y *arcA* también se realizó por PCR convencional.

De las 112 muestras de catéteres, 55 (49.1%) presentaron *S. aureus*, y de estas, 38 (69 %) presentaron la misma especie en narinas. La frecuencia de adhesinas en catéteres fueron: *sdrD* (94.5%, n=52), *sdrE* (92.7%, n=51), *sdrC* (89.0%, n=49), *ebpS* (85.4%, n=47), *clfB* (81.8%, n=45), *bbp* (78.1%, n=43) y *map/eap* (63%, n=35); y la frecuencia de otros genes fue: *efb* (92.7%, n=51), *V8* (92.7%, n=51), *arcA* (90.9%, n=50) y *chp* (89.0%, n=49). En el caso de narinas las frecuencias para adhesinas fueron: *ebpS* (100%, n=37), *sdrD* (97.2%, n=36), *clfB* (97.2%, n=36), *sdrC* (83.7%, n=31), *sdrE* (81.0, n=30), *bbp* (75.6%, n=28) y *map/eap* (67.5%, n=25); mientras la frecuencia de otros genes fue: *efb* (100%, n=37), *chp* (94.5%, n=35), *V8* (94.5%, n=35) y *arcA* (64.8%, n=24). No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias encontradas en catéter con las frecuencias encontradas en narinas. Se encontraron 31 patrones genotípicos distintos, de los cuáles, el más común fue el patrón conformado por todos los genes estudiados, y se encontró en el 45% (n=25) de las cepas aisladas de catéter y en el 42.1% (n=16) de las cepas aisladas de narinas, además de que este patrón coincidió en las cepas aisladas de catéter y narinas en 10 pacientes distintos. La elevada frecuencia de estos marcadores en las cepas de *S. aureus*, demostró el alto riesgo de diseminación a otros órganos, por lo que se administró el tratamiento médico correspondiente a los pacientes infectados y portadores de *S. aureus*.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, MSCRAMMs, IRC, catéter, narinas.

INTRODUCCIÓN

Características de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un microorganismo que pertenece a la familia *Micrococcaceae* y al género *Staphylococcus*, que contiene más de 30 especies diferentes, y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas; no tienen otros hábitats importantes, excepto cuando están involucradas en infecciones (Kloss, 1997). *Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo que mide 1µm de diámetro, no tiene movilidad y no forma esporas. Puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. El microorganismo produce catalasa, coagulasa y crece rápidamente en agar sangre. Los estafilococos crecen bien en rangos de pH de 4.8 a 9.4 y a temperaturas de 25 a 43 °C. Sus colonias miden de 1 a 3 mm, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas (Velázquez-Meza, 2005).

Staphylococcus aureus posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis. Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales. Provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del shock tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo. Además, causa septicemia, impétigo y fiebre (Kanafani&Fowler, 2006).

El éxito de la colonización y la producción de enfermedades por *S. aureus* se debe a la expresión de factores de virulencia que participan en adhesión, adquisición de nutrientes y evasión de la respuesta inmune del huésped. Los factores de virulencia se clasifican en tres categorías:(a) factores involucrados en la adherencia de la célula

huésped o matriz extracelular, proteínas de unión a fibrinogeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; (b) factores involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas (SEs), SEA-SEE, SEG-J, la toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST), proteína A, lipasas y polisacáridos capsulares, tipos 1, 5 y 8; (c) factores involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, α toxina, β , γ , y δ hemolisinas (Projan, 1997).

Contaminación bacteriana de los catéteres de hemodiálisis

La Insuficiencia Renal Crónica (IRC) se caracteriza por una pérdida lenta, progresiva e irreversible del filtrado glomerular. Generalmente cursa asintomática, hasta que el filtrado glomerular desciende por debajo de 10 ml/min. Entonces, aparecen las complicaciones propias del síndrome urémico, y se manifiesta mediante alteraciones: digestivas, hematológicas, cardiovasculares, neurológicas y metabólicas. Si la función renal no se estabiliza, desencadena en enfermedad renal terminal (Martin de Francisco *et al*, 1997)

En México la IRC constituye un problema de salud frecuente en la población, que genera un alto costo social y económico. Se estima que cada año ocurren alrededor 35 mil casos en todo el sistema de salud (Trujillo-Gutiérrez, 1999). Las causas de IRC se pueden agrupar en enfermedades vasculares, enfermedades glomerulares, túbulo intersticiales y uropatías obstructivas. Actualmente en nuestro país la etiología más frecuente es la diabetes mellitus, siendo responsable del 50% de los casos de enfermedad renal (USRDS), seguida por la hipertensión arterial y las glomerulonefritis.

México es uno de los países con mayor ocurrencia de diabetes mellitus en el mundo. En 1995 ocupaba el noveno lugar con mayor número de casos de diabetes y se

espera que para el año 2030 ocupe el séptimo con casi 12 millones de pacientes con diabetes tipo 2 (international Diabetes Federation).

El trasplante renal constituye la mejor alternativa de tratamiento para el paciente urémico crónico, sin embargo, no a todos los pacientes se les puede realizar por lo que la inserción de catéteres vasculares representa otra alternativa para el tratamiento de la IRC (Stolic *et al*, 2008); sin embargo, constituye un factor de riesgo para contraer infecciones. (Marschall, 2008). Se han reportado casos de bacteremias relacionadas con catéteres en donde se han aislado bacterias como *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* meticilina resistente (MRSE), *Enterococcus* spp, *Escherchia coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp y *Pseudomonass* sp, entre otras (Poole *et al.*, 2004).

En México las estadísticas sobre las bacteremias asociadas a los catéteres en pacientes de hemodiálisis a nivel nacional son muy escasas, tan sólo se encuentran los reportes locales realizados por algunas instituciones de salud (Salazar *et al*, 2002); sin embargo, en los EUA anualmente se reportan de 7,000 a 15,000 episodios de bacteremias relacionadas con los catéteres (Donland, 2001). La fuente principal de las bacteremias en los pacientes de hemodiálisis es el desarrollo de una película bacteriana en el interior de los túneles de los catéteres (Allon, 2004). Las bacterias presentes en las biopelículas son resistentes a la respuesta inmune del hospedero y a los antibióticos (Croes *et al*, 2009) lo que representa un problema importante para el tratamiento de los enfermos.

Resistencia de *S. aureus* a la meticilina.

Actualmente las cepas de *S. aureus* presentan un alto rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes y multiresistentes. La adquisición

de esta resistencia se debe principalmente al intercambio de manera horizontal de genes que son transportados por elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones y secuencias de inserción (Bustos-Martínez *et al*, 2006).

La introducción de la penicilina a principios de los años 40 como tratamiento en las infecciones causadas por *S. aureus* combatió de manera importante las enfermedades ocasionadas por este microorganismo. Sin embargo, un año después de su empleo ya se tenían cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina. En 1959 apareció la meticilina, una penicilina semisintética, que sirvió como antimicrobiano de elección para estas cepas, y en 1961 Jevons, en Londres, hizo el primer reporte de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA), constituyéndose como una importante causa de infección nosocomial en Europa (Barret *et al*, 1968). El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales de EUA determinó que en pacientes hospitalizados la prevalencia de cepas MRSA se incrementó del 4% en 1980 a 31.9% en 1996. En 2001 se tenía un 55% de prevalencia y para el 2004, llegó al 60.7%. En algunos hospitales se han reportado incidencias hasta del 80% (National Nosocomial Infectious Surveillance System, NNIS, 2004). La prevalencia actual de cepas MRSA está sujeta a variaciones geográficas. Por ejemplo, en Europa se tienen porcentajes elevados, como un 58% en Italia y 54% en Portugal, mientras que en Japón se tiene un 70%. En México existe un número limitado de estudios sobre la prevalencia de cepas MRSA. De acuerdo a algunos estudios realizados, se ha visto que la prevalencia de cepas MRSA se ha incrementado rápidamente en los hospitales durante los últimos años. Se estima que ha cambiado del 7% al 30% (Velázquez- Meza, 2004).

Se han descrito tres mecanismos que explican la resistencia de *S. aureus* a β -lactámicos: Hiperproducción de β -lactamasa, modificación de las proteínas de unión a la penicilina (PBPs) y resistencia intrínseca a meticilina. No se conoce muy bien la significancia clínica de los dos primeros mecanismos, en cambio el último es el más importante y ampliamente estudiado (Gil, 2000). Este mecanismo se refiere a la

presencia del gen *mecA*, que codifica la proteína PBP2a de 78 kDa. Los antibióticos β -lactámicos se unen a las PBPs en la pared celular, lo que interrumpe la síntesis de la capa de péptidoglucano y causa la muerte de la bacteria. Debido a que los β -lactámicos no se pueden unir a PBP2a, la síntesis de peptidoglucano y la pared celular puede continuar, y así, la bacteria no muere. El gen *mecA* está regulado por el represor *MecI*, y por el transductor de señal transmembranal que censa β -lactámico *MecRI*. En ausencia de un antibiótico β -lactámico, *MecI* reprime la transcripción de *mecA* y de *mecRI-mecI*. En presencia de un β -lactámico, *MecRI* se rompe autocatalíticamente y esto activa a un dominio de metaloproteasa localizado en la parte citoplásmica de *MecRI*. La metaloproteasa degrada al represor *MecI*, que se encuentra unido al operador *mecA*, lo que permite la transcripción de *mecA*, sintetizándose la PBP2a (Deurenberg et al, 2007). El gen *mecA* (2.1 kb) está localizado en un elemento genético móvil llamado Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (*SCCmec*) (Ito et al, 2003). Actualmente se han clasificado 11 tipos diferentes de *SCCmec* (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements, 2011), dentro de los cuales los *SCCmec* tipo I (34.3 kb), IV (20.9-24.3 kb) y V (28 kb) codifican exclusivamente para resistencia a β -lactámicos. Los *SCCmec* tipo II (53 kb) y III (66.9 kb) confieren resistencia a más antibióticos (kanamicina, tobramicina, bleomicina, tetraciclina), debido a que poseen genes de resistencia adicionales en plásmidos integrados (pUB110, pl258 y pT181), además de que contienen el transposón Tn554 que posee el gen *ermA*, el cual confiere resistencia inducible a macrólidos, lincosamida y estreptogramina (Deurenberg et al., 2007). El plásmido pUB110 tiene el gen *ant(4')*, responsable de la resistencia a kanamicina, tobramicina y bleomicina, y pl258 codifica la resistencia a penicilinas y metales pesados. El plásmido pT181 codifica la resistencia a tetraciclina (Deurenberg et al., 2007).

Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

Las MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) son proteínas ancladas en la pared celular y están involucradas en la fijación de *S. aureus* a las células del hospedero o a la matriz extracelular, este es el primer paso en el desarrollo de la infección. Las MSCRAMMs fueron identificadas por su habilidad para unirse a proteínas de la matriz extracelular como el fibrinógeno (*ClfA*, *ClfB*), fibronectina (*FnbpA*, *FnbpB*), colágeno (*cna*) y elastina (*ebpS*) (Foster *et al*, 1998). Muchas proteínas del hospedero tienen la habilidad de unir más de una MSCRAMM y ciertas MSCRAMMs pueden unirse a múltiples proteínas del hospedero, este es el caso de *map/eap* que se puede unir a fibronectina, fibrinógeno, protrombina, trombospondina, entre otras (McGavin *et al*, 1993). Múltiples MSCRAMMs contribuyen a la colonización nasal, incluyendo *ClfB* (O'Brien *et al*, 2002), *SasG*, *Pls* (Roche *et al*, 2003), *IsdA*, *SdrC*, y *SdrD* (Corrigan *et al*, 2009).

La adhesión de *S. aureus* a materiales extraños, como dispositivos médicos, depende de *ClfA* y *ClfB*, así mismo de *FnBPA* y *FnBPB* (Vaudaux *et al*, 1995). *FnBPA* y *FnBPB* asumen un rol en la patogénesis de la endocarditis (Kuypers *et al*, 1989), aunque este descubrimiento ha sido discutido (Flock *et al*, 1996). Se ha encontrado que el fibrinógeno y la fibrina están depositados en los dispositivos médicos, así como en el trombo del coágulo sanguíneo. *ClfA* y *ClfB* median la unión de células estafilocócicas a estos sustratos (Vaudaux, *et al*, 1995), aunque la relevancia patofisiológica de estos mecanismos de adhesión no está totalmente claro. El gen *bbp* se encuentra relacionado con la osteomielitis y artritis séptica (Rydén *et al*, 1989), mientras que el gen *cna* es un factor de virulencia en la artritis séptica, aunque una cepa mutante *cna* negativa isogénica fue capaz de inducir artritis séptica en un 30% en ratones infectados, comparado con el 70% para la cepa silvestre estafilocócica (Patti *et al*,

1994). Estos datos indican que varios mecanismos de adhesión están involucrados en el proceso de infección de *S. aureus*.

Recientemente se han encontrado tres genes que codifican proteínas con repeticiones de serina-aspartato (SD), *sdrC*, *sdrD*, *sdrE* (Josefsson *et al*, 1998), La función de estas proteínas Sdr es desconocida, pero se ha descubierto que juega un importante rol en la adhesión al fibrinógeno en plaquetas (Nirajet *al*, 2006).

Además de adhesinas *S. aureus* cuenta con otras exoproteínas que le sirven para inhibir la respuesta inmune del hospedero. La proteína que inhibe la quimiotaxis de *S. aureus* (CHIPS), la cual es codificada por el gen *chp*, es capaz de inhibir la migración de los neutrófilos y monocitos al sitio de infección (Veldkamp *et al.*, 2000). El gen *efb* es codifica una molécula secretada por *S. aureus* para evadir la respuesta inmune del hospedero, ya que bloquea el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección e inhibe la activación del sistema inmune (Ya-Ping *et al*, 2011). El gen *arcA* es un cluster que forma parte del elemento ACME (Arginine Catabolic Mobil Element), al cual se le atribuye, en parte, la resistencia a la meticilina (Diep *et al*, 2006.). El gen *arcA* codifica una arginina deiminasa que convierte L-arginina a dióxido de carbono, ATP y amoníaco, importantes para sobrevivir a bajo pH y para la inhibición de la respuesta inmune contra infecciones bacterianas (Degnan *et al*, 2000).

Staphylococcus aureus cuenta con un sistema de quórum-sensing codificado por el gen *agr* (accessory gen regulator). Este gen regula la expresión de V8, el cuál codifica una serina proteasa que inhibe la unión de la superficie celular al fibrinógeno permitiendo que las bacterias lleguen a tejidos profundos e inicien la fase de colonización (McGavin *et al*, 1997).

Debido a que en México los estudios sobre las bacteremias, y sobre todo de la caracterización de marcadores de virulencia en cepas de *S. aureus* asociadas a los catéteres son muy escasos, el propósito de este estudio fue determinar las

combinaciones de genes de *S. aureus* que codifican adhesinas y otros genes, así como el gen *mecA* que codifica la resistencia a la meticilina, en cepas de *S. aureus* aisladas de narinas y catéteres de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica.

ANTECEDENTES

- Darouiche y colaboradores en 1997 compararon la virulencia de una cepa mutante de *S. aureus* poseedora de tres MSCRAMMs, (de unión de fibrinógeno, colágeno y fibronectina) contra una cepa que carece de los tres tipos de MSCRAMMs. Se realizó en un modelo de infección en conejo relacionada a un dispositivo ortopédico. Dos semanas después se realizaron evaluaciones bacteriológicas e histopatológicas del tejido de hueso y los implantes ortopédicos, pero no se encontraron diferencias significativas.
- Gillapsy y colaboradores en 1998 investigaron los factores que afectan la capacidad de unión de *S. aureus* al colágeno. Encontraron que el gen *cna* codifica la principal adhesina que se une al colágeno; el gen *sarA* es el principal elemento regulador que controla la expresión de *cna*; y los efectos reguladores de *sarA* y *agr* en la transcripción de *cna* son independientes de la interacción entre *sarA* y *agr*.
- Poole y sus colaboradores en el 2004 compararon durante 150 días el tratamiento de diálisis estándar, antibióticos y cambio de catéter, contra un tratamiento con más concentración de antibiótico en el lumen del catéter después de la diálisis. Encontraron que el tratamiento con mayor concentración de antibiótico fue exitoso en el 70% de los pacientes. Fue efectivo contra el 87% de las infecciones de Gram-negativos, 75% de infecciones por *Staphylococcus epidermidis*, y el 40% para infecciones por *Staphylococcus aureus*. El tratamiento con más concentración de antibiótico mantuvo al catéter libre de infecciones durante más días que la rutina de cambio de catéter (154 contra 71 días).
- Weiy colaboradores en el 2006 demostraron que la unión del fibrinógeno es dependiente de las adhesinas de *S. aureus* ClfA y SdrC, D y E, mientras que Spa es el receptor dominante para vWF (factor de Von Willebrand).

- Campbell y colaboradores en el 2008 detectaron los factores de virulencia de una colección de *S. aureus* aisladas de pacientes de EUA y Sudáfrica. Encontraron que las cepas resistentes a la meticilina sólo se encontraban en EUA. También describieron que las cepas resistentes a la meticilina tenían más probabilidad de tener genes que codifican adhesinas que los que no son resistentes a la meticilina. Las cepas de *S. aureus* de diferentes regiones, tienen distintas frecuencias de genes de virulencia, debido a que las cepas susceptibles a la meticilina de Sudáfrica presentaron más genes con respecto a las cepas susceptibles a la meticilina de EUA.
- En el 2009 Acosta-Pérez y colaboradores analizaron 140 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestras clínicas de diferentes departamentos del hospital regional No. 1 del IMSS. Compararon diferentes métodos para la identificación de MRSA (producción de β -lactamasa, sensibilidad a oxacilina con MIC-Vitek 2-XL, ChromID MRSA, difusión en agar para discos de 30 μ g de cefoxitina, detección de PBP2a y PCR para el gen *mecA*), y encontraron una prevalencia del 90.7%. Todos los métodos para la identificación de MRSA utilizados son buenos, la elección de cada uno dependerá de la infraestructura de cada laboratorio.

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar los marcadores de virulencia involucrados en la adhesión celular en cepas de *S. aureus* aisladas de narinas y catéteres de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Detectar el gen *mecA* que codifica la resistencia a la meticilina en cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres, así como de las narinas.
- Identificar otros genes de virulencia (*chp*, *efb*, *V8* y *arcA*) en las cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres y narinas.
- Comparar las frecuencias de los genes que codifican adhesinas y otros genes de virulencia en las cepas de *S. aureus* aisladas de narinas y catéteres de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica.
- Encontrar los diferentes patrones de asociación de los genes de virulencia en las cepas de *S. aureus* aisladas de narinas y catéteres de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de pacientes y toma de muestras

Para el desarrollo de este estudio se seleccionaron pacientes con insuficiencia renal crónica que presentaron infección en el sitio de inserción del catéter tipo Mahurkar durante su asistencia al servicio de Hemodiálisis del Hospital Regional No. 72 del IMSS (segundo nivel de atención ubicado en el municipio de Tlalnepantla, Edo. de México). La recolección de las muestras de los pacientes se realizó en condiciones asépticas. La toma del inóculo del catéter tipo Mahurkar se realizó de la parte exterior terminal por medio de hisopos estériles, y también se muestrearon las fosas nasales. Las muestras se depositaron en el medio de transporte Stuart y se trasladaron al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de la Salud Integral (CUSI), ubicada en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, (FESI), UNAM. Posteriormente las muestras fueron sembradas en el medio líquido de Infusión-Cerebro-Corazón (BHI) y se incubaron por 24 h a 37 °C. Al término las muestras se sembraron en Agar S110 y se incubaron por 24 h a 37°C. Finalmente las cepas de *Staphylococcus* spp fueron identificadas por la prueba de la coagulasa y por la fermentación del manitol.

Extracción de ADN de *S. aureus*

Las cepas de *S. aureus* fueron crecidas en placas de agar S-110 a 37°C durante 24 horas. Al término de este tiempo se tomó una colonia por medio un asa estéril y se depositó en un tubo de 13 x100 con 2ml de agua desionizada estéril. Se agitó en un vortex durante 30 segundos y se colocó a baño maría durante 20 minutos. Posteriormente el tubo con la muestra fue colocado en hielo por 10 minutos. Finalmente la muestra se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante (contenía el ADN) se transfirió a otro tubo estéril y se guardó a -20°C hasta su utilización.

Identificación de *Staphylococcus aureus* por PCR.

Las cepas de *S. aureus* se identificaron por PCR de punto final mediante la detección de los marcadores cromosómicos *femA*, *femB* (Kobayashi *et al*, 1994) y *nuc* (Nashev *et al*, 2004). Los oligonucleótidos utilizados fueron: FemA1 (AGACAAATAGGAGTAATGAT), FemA2 (AATCTAACACTGAGTGATA), FemB1 (TTACAGAGTTAACTGTTACC), FemB2 (ATACAAATCCAGCACGCTCT), *nuc1* (GCGATTGATGGTGATACGGTT) y *nuc2* (ACGCAAGCCTTGACGAACTAAAGC) (Integrated DNA Technologies). Para la amplificación por PCR de cada gen por separado se utilizaron las perlas PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR (GE Healthcare), que contenían 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs, para un volumen final de 25 µl por mezcla de reacción; 1 µl de cada oligonucleótido (Sigma-Genosys) a las concentraciones de 180 pmol para *femA* y *femB*, y de 10 pmol para *nuc*, 20 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl (100 ng) de ADN molde. La amplificación del ADN se realizó en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones para *femA* y *femB*: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 25 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 57°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C. Para *nuc* las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 37 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos). Finalmente la extensión final fue de 10 minutos a 72°C. El tamaño de los amplicones fue para *femA* de 509 pb, *femB* de 651 pb y *nuc* de 279 pb.

Detección del gen *mecA* en las cepas de *S. aureus* por PCR.

Para detectar *mecA* por PCR se utilizaron las perlas PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR (GE Healthcare) (1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs), en un volumen final de 25 µl por mezcla de reacción; 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies; MecAF5'-

GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3' y MecAR 5'-
CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3' a la concentración de 5 pmol (Geha *et al*,
1994), 18 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl (100 ng) de ADN. Las
condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por
5 minutos, seguida de 10 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación
a 66°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos). Posteriormente 5 ciclos
(desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineación a 64°C por 45 segundos y
extensión a 72°C por 60 segundos) y 25 ciclos (desnaturalización a 94°C, 45
segundos, alineación a 50°C, 45 segundos y extensión a 72°C, 60 segundos).
Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C.

Detección de los genes que codifican adhesinas y otros genes por PCR convencional de las cepas de *S. aureus*.

Los oligonucleótidos (cuadro 1) y las condiciones de PCR utilizadas fueron las
descritas por Campbell *et al* en el 2008. El volumen final de la mezcla de reacción fue
de 25 µl; 3 µl de ADN molde, 20 µl de agua libre de nucleasa estéril, 1 µl de cada
oligonucleótido a la concentración de 20 pmol, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de
AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads).
Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a
95°C durante 7 minutos, seguida de 32 ciclos a 95 °C por 60 segundos, 60 °C por 1.3
minutos y 72 °C por 60 segundos. Finalmente se realizó una extensión final a 72°C
por 10 minutos.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño(pb)
Adhesinas			
<i>bbp</i>	Forward	TCAAAGAAAAGCCAATGGCAAACG	500
	Reverse	AACGTTGGCGTGTAACTGCTG	
<i>clfB</i>	Forward	TGGCGGCAAATTTTACAGTGACAGA	404
	Reverse	AGAAATGTTTCGCGCCATTTGGTTT	
<i>ebpS</i>	Forward	GCAAGTAATAGTGCTTCTGCCGCTTCA	550
	Reverse	CATTTTCCGGTGAACCTGAACCGTAGT	
<i>map/eap</i>	Forward	GCATGATAGAGGTATCGGGGAACGTG	655
	Reverse	TCCCTTGATCATTTGCCATTGCTG	
<i>sdrC</i>	Forward	CGCATGGCAGTGAATACTGTTGCAGC	731
	Reverse	GAAGTATCAGGGGTGAACTATCCACAAATTG	
<i>sdrD</i>	Forward	CCACTGGAATAAAGTTGAAGTTTCAACTGCC	467
	Reverse	CCTGATTTAACTTTGTCATCAACTGTAATTTGTG	
<i>sdrE</i>	Forward	GCAGCAGCGCATGACGGTAAAG	894
	Reverse	GTCGCCACCGCCAGTGTCATTA	
Otros genes			
<i>chp</i>	Forward	AACGGCAGGAATCAGTACACACCATC	479
	Reverse	GGCAAGTTATGAAATGTCTGCCAAACC	
<i>efb</i>	Forward	CGGTCCAAGAGAAAAGAAACCAAGTGAAG	303
	Reverse	TGTGCTTTTCTGTGTGCACTGACAGTATG	
V8	Forward	CAACGAATGGTCATTATGCACCCGTA	529
	Reverse	TTTGGTACACCGCCCCAATGAA	
<i>arcA</i>	Forward	CACGTAACCTGCTAGAACGAG	724
	Reverse	GAGCCAGAAGTACGCGAG	

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes.

Análisis de las muestras amplificadas por electroforesis en Geles de Agarosa.

Después de la amplificación del ADN, 4 µl de cada muestra fue analizada por electroforesis en geles de agarosa al 1 y 2% bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliampers por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con BrEt y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de foto documentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK).

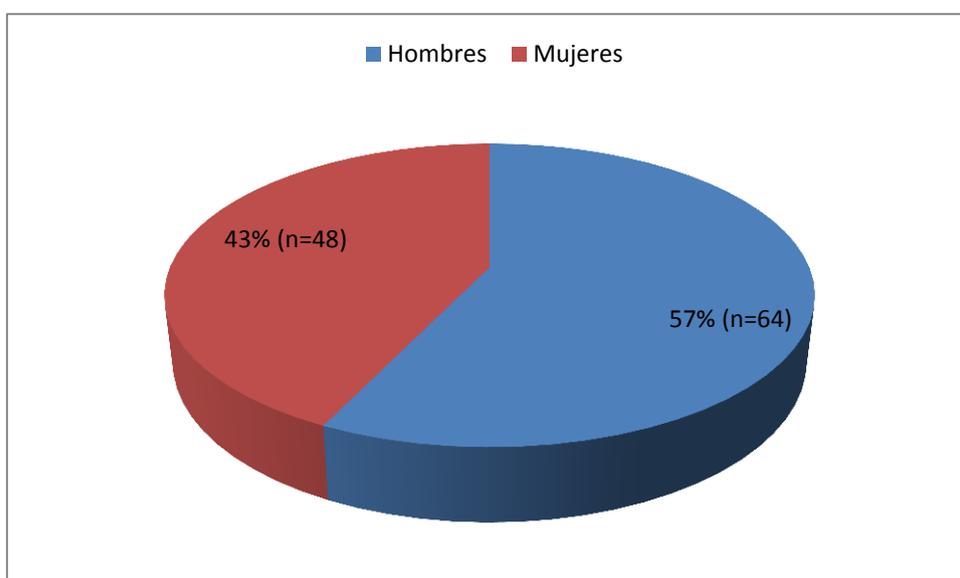
Análisis de resultados

La frecuencia de aparición de los genotipos detectados entre las cepas de *S. aureus* aisladas de narinas y de los catéteres se analizó utilizando la prueba independiente de la X^2 , con $P < 0.005$.

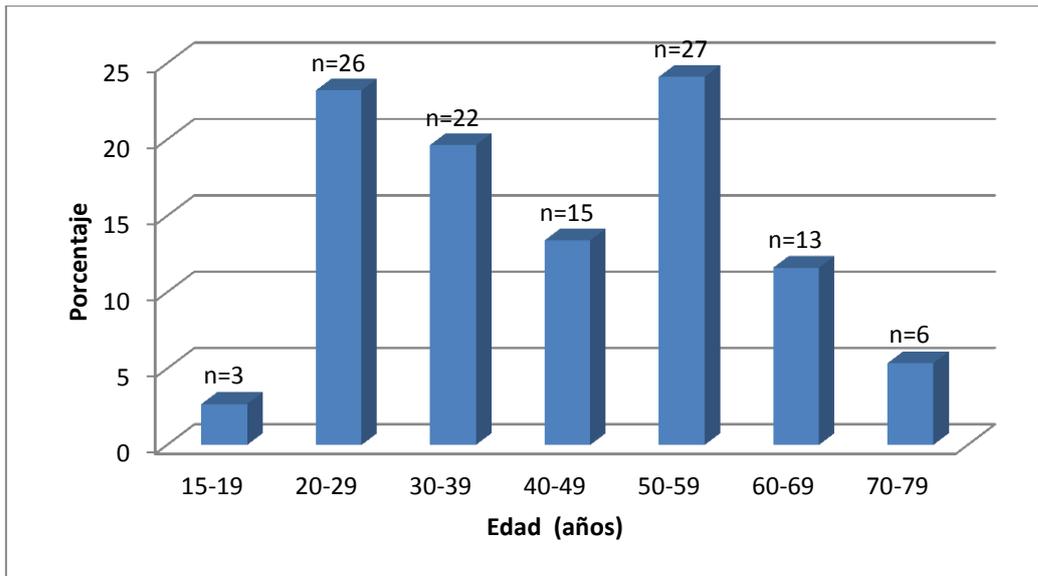
RESULTADOS

Pacientes estudiados.

Se estudiaron 112 pacientes con infección en el sitio de inserción del catéter tipo Mahurkar, de los cuales el 57% (n=64) fueron hombres y el 43% (n=48) mujeres (Gráfica 1). La edad de los pacientes se encontró situada en el intervalo de 17 a 77 años (Gráfica 2). La frecuencia más alta se encontró en el intervalo de 50 a 59 años con un 24% (n=27), seguida por el intervalo de 20 a 29 años con un 23% (n=26). La frecuencia más baja se detectó en el intervalo de 15 a 19 años con un 2.6% (n=3).



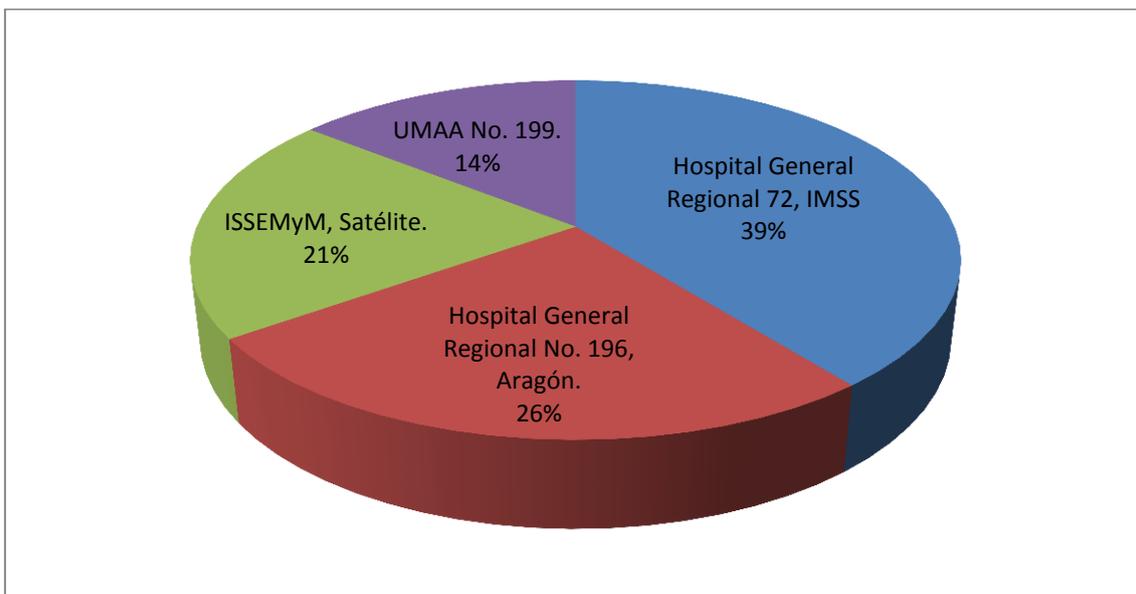
Gráfica 1. Distribución de los pacientes por sexo.



Gráfica 2. Distribución de pacientes por edad.

Origen de las muestras

El 39% (n=44) de las muestras provinieron del Hospital General Regional 72 del IMSS, el 26% (n=29) del Hospital General Regional No. 196 Aragón, el 21% (n=23) del ISSEMyM (satélite) y el 14%(n=16) de la UMAA no.199 (Gráfica 3).



Gráfica 3. Origen de las muestras de los pacientes por hospital.

Causas de la IRC de los pacientes estudiados

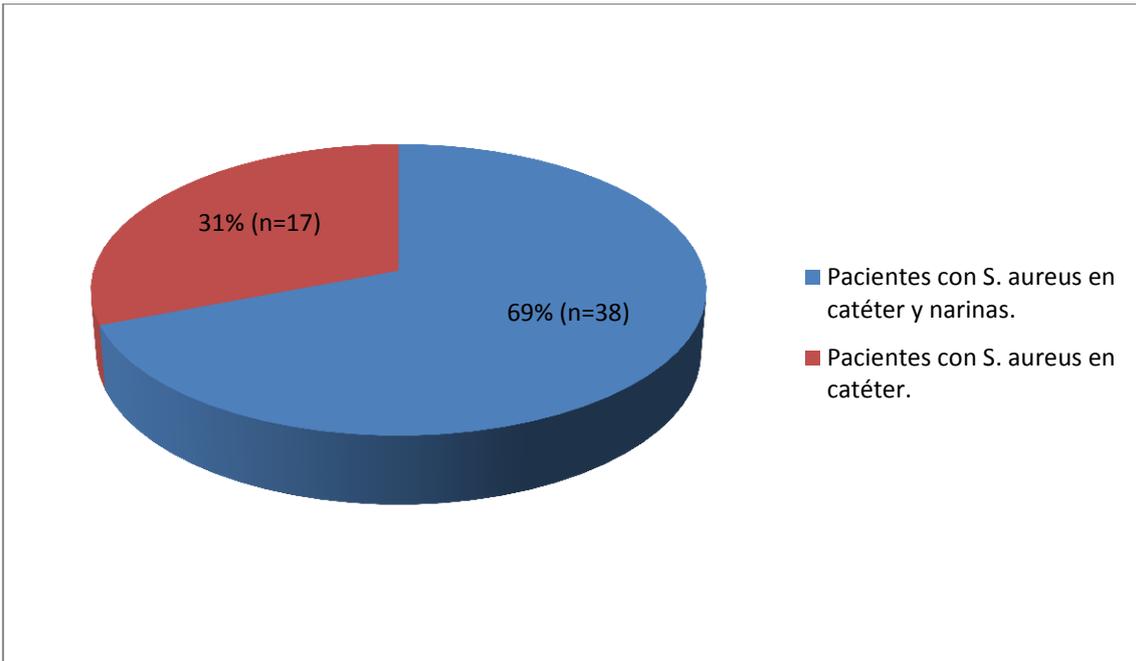
El origen de la IRC del 32.1% (n=36) de los pacientes fue la diabetes mellitus, seguida por la glomerulonefritis (17.0 %, n =19) y la hipertensión (9.8%, n=11) (Cuadro 2). En el 35.7% (n= 40) de los pacientes estudiados no se logró establecer por los médicos de los hospitales el origen de la enfermedad renal. En menor porcentaje se identificó a la poliquistosis renal (1.79%), a la IRC secundaria a vejiga neurogénica (0.90%), a la Malformación congénita (0.90%), a la Nefritis lúpica (0.90%) y a la preclampsia (0.90%) como responsables de la IRC (Cuadro 2).

ETIOLOGÍA	No	%
Diabetes mellitus	36	32.1
Glomerulonefritis	19	17
Hipertensión	11	9.8
Poliquistosis renal	2	1.8
IRC secundaria a vejiga neurogénica	1	0.9
Malformación congénita	1	0.9
Nefritis lúpica	1	0.9
Preclampsia	1	0.9
No determinada	40	35.7

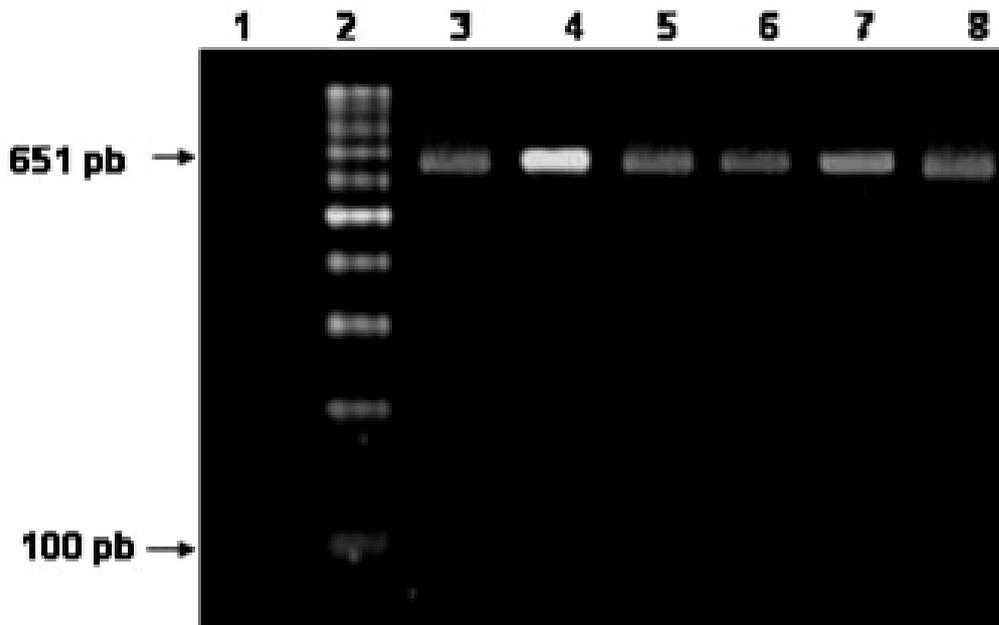
Cuadro 2. Origen de la insuficiencia renal crónica de los pacientes.

Identificación de *Staphylococcus aureus* por PCR

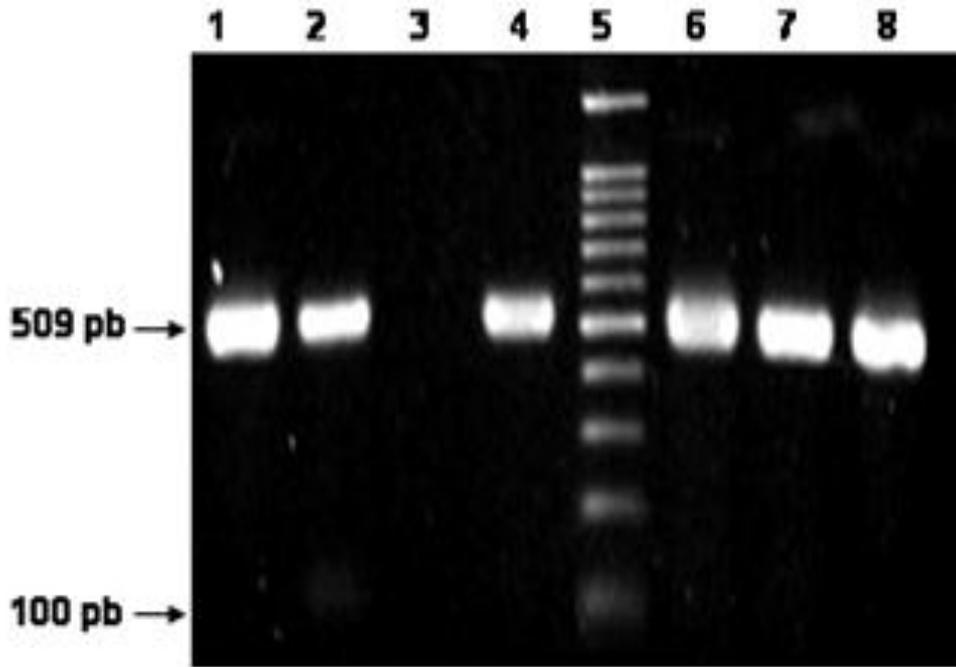
La identificación de *Staphylococcus aureus* por PCR se realizó mediante la detección de los marcadores cromosómicos *femA*, *femB*, y *nuc* (Fotografías 1-3). Del total de las muestras analizadas (n=112), el 49.1 % (n=55) presentó *S. aureus*, y de estas el 69% (n=38) presentó la misma especie en narinas (Gráfica 4).



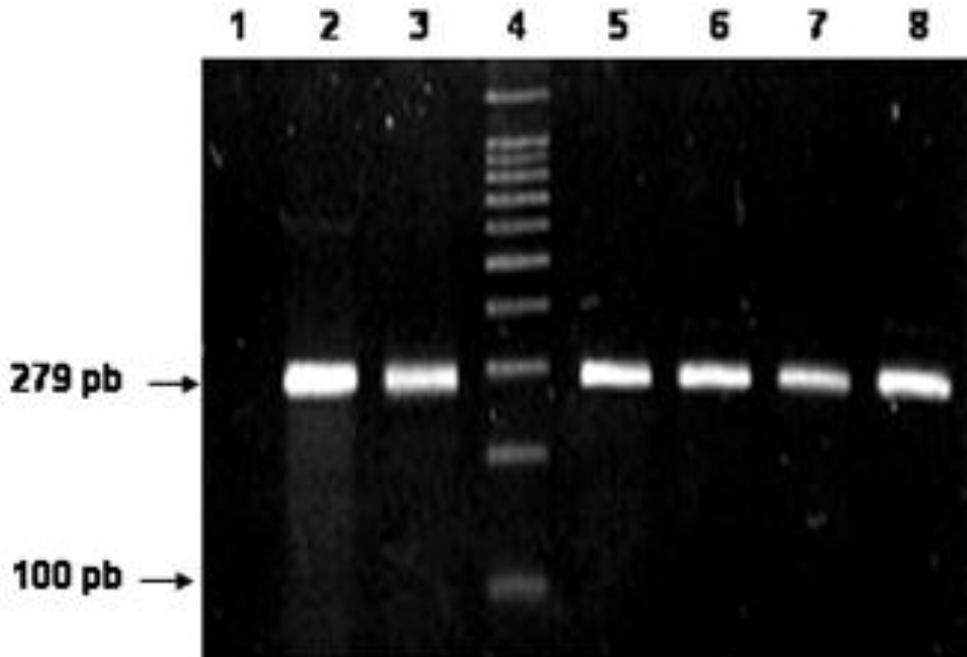
Gráfica 4. Prevalencia de *S. aureus* en catéter y narinas.



Fotografía 1. Detección por PCR convencional de *femA* en *S. aureus*. Carril 1, Control negativo (*S. epidermidis* ATCC 35984); Carril 2, MPM 100 pb-ladder; Carril 3, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carriles 4-8, *femA* (amplificación de 651 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres.



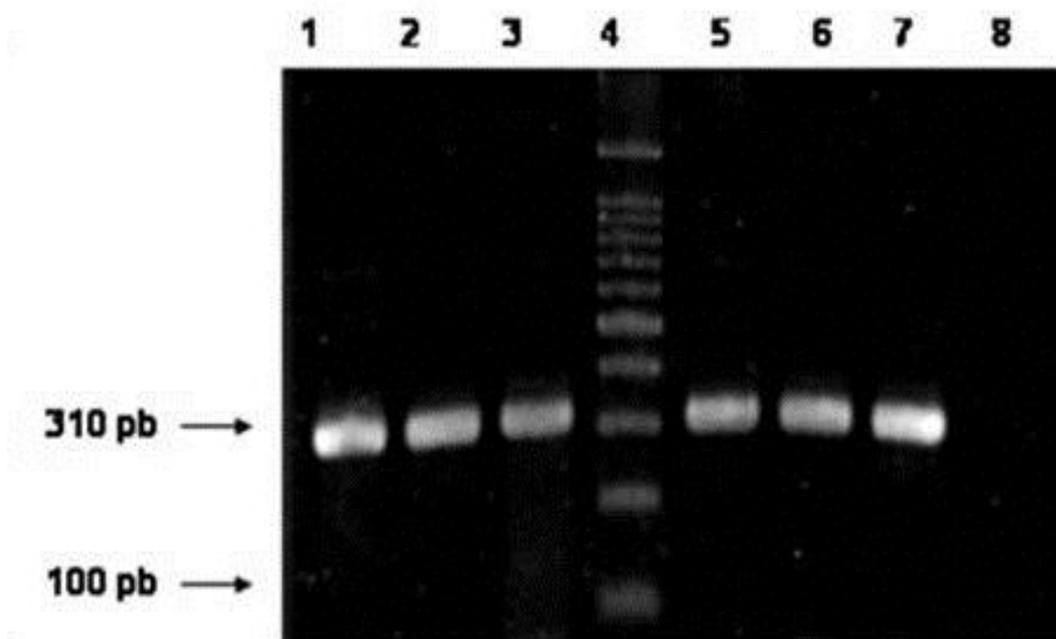
Fotografía 2. Detección por PCR convencional de *femB* en *S. aureus*. Carril 2, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 3, Control negativo (*S. epidermidis* ATCC 35984); Carril 5, MPM 100 bp-ladder; Carriles 1,4, 6-8, *femB* (amplicón de 509 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres.



Fotografía 3. Detección por PCR convencional de *nuc* en *S. aureus*. Carril 1, Control negativo (*S. epidermidis* ATCC 35984); Carril 2, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 4, MPM 100 pb-ladder; Carriles 3,5-8, *nuc* (amplicón de 279 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres.

Detección del gen *mecA* en las cepas de *S. aureus* por PCR convencional.

El genotipo *mecA* se detectó en el 81.8% (n=45) de las cepas aisladas de catéter, mientras que en las cepas aisladas de narinas se detectó un 100% (n=38) (Fotografía 4).



Fotografía 4. Detección por PCR convencional de *mecA* en *S. aureus* Carriles 1-3, *mecA* (amplicón de 310 pb) en las cepas de *S. aureus* aisladas de catéter; Carril 5, 6, cepas de *S. aureus* aisladas de narinas; Carril 4, MPM 100 bp-ladder; Carril 7, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 8, control negativo (H₂O, sin ADN molde).

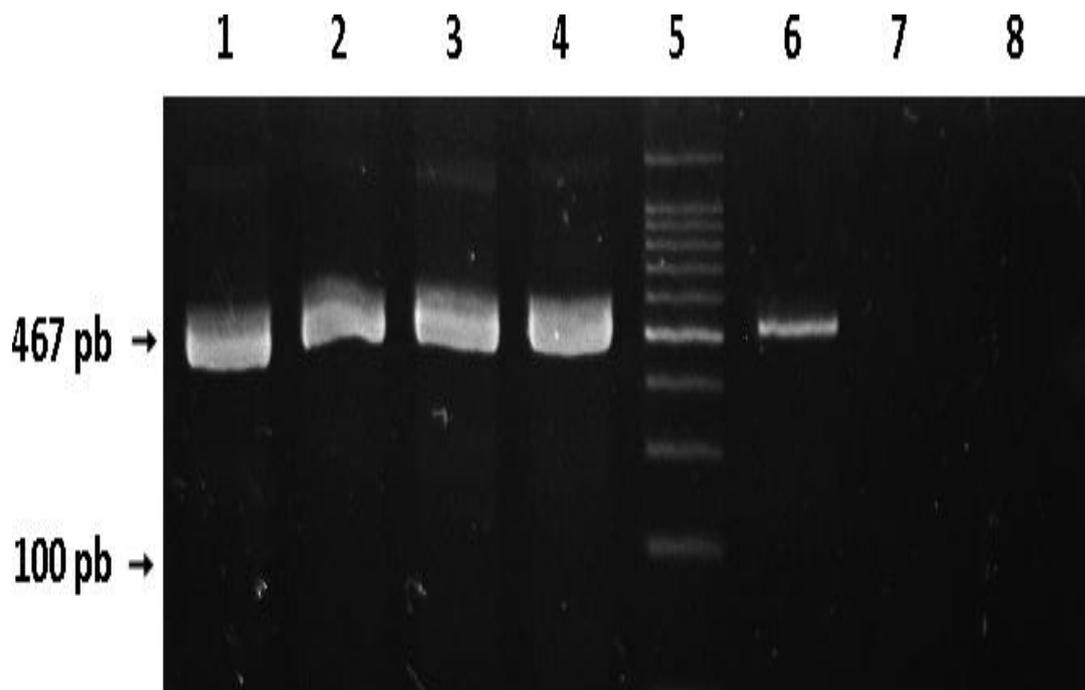
Detección de los genes que codifican adhesinas por PCR convencional de las cepas de *S. aureus*.

La frecuencia de adhesinas y otros genes en catéter y narinas se aprecian en el cuadro 2. En catéteres los genes con mayor frecuencia, fueron: *sdrD* (94.5%, n=52) (Fotografía 5), *sdrE* (92.7%, n=51) (Fotografía 6), *efb* (92.7%, n=51) (Fotografía 7), y *V8* (92.7%, n=51) (Fotografía 8); mientras que *map/eap* (63%, n=35) y *bbp* (78.1%, n=43) presentaron la menor frecuencia (Fotografía 9 y 10, respectivamente). En el caso de narinas los genes con mayor frecuencia fueron: *ebpS* (100%, n=38) (Fotografía 11), *efb* (100%, n=38), *sdrD* (97.3%, n=37) y *clfB* (97.3%, n=37)

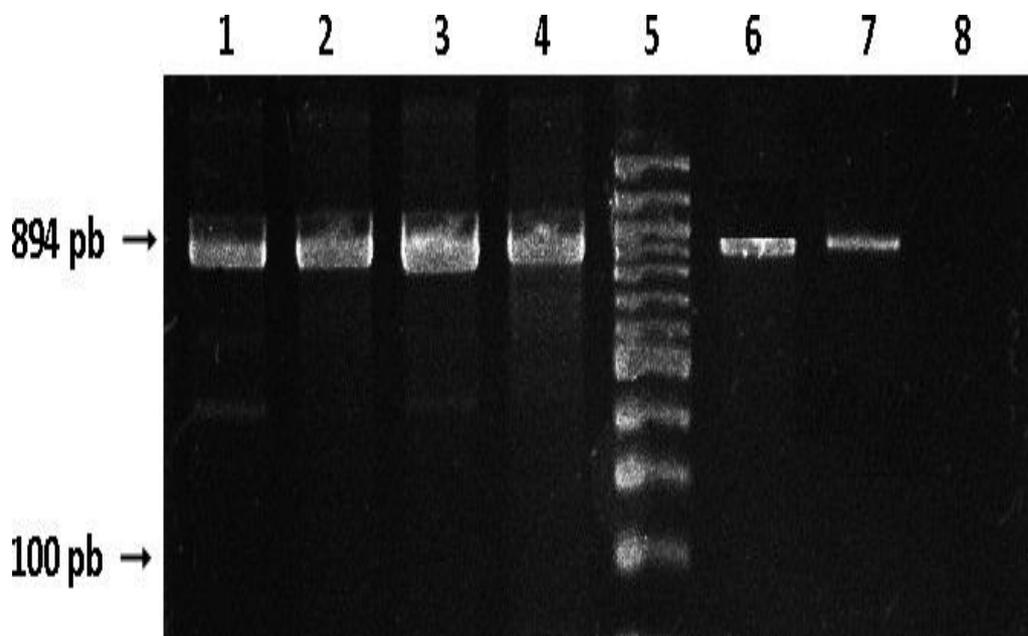
(Fotografía 12); a su vez *map/eap* (68.4%, n=26) y *arcA* (68.4%, n=26) (Fotografía 13) presentaron la menor frecuencia.

Tipo	Gen	Catéter		Narinas	
		N=55 No.	%	N=38 No.	%
Adhesinas	<i>bbp</i>	43	78.1	29	76.3
	<i>clfB</i>	45	81.8	37	97.3
	<i>ebpS</i>	47	85.4	38	100
	<i>map/eap</i>	35	63.6	26	68.4
	<i>sdrC</i>	49	89	32	84.2
	<i>sdrD</i>	52	94.5	37	97.3
	<i>sdrE</i>	51	92.7	31	81.5
Otros genes	<i>chp</i>	49	89	36	94.7
	<i>efb</i>	51	92.7	38	100
	V8	51	92.7	36	94.7
	<i>arcA</i>	50	90.9	26	68.4

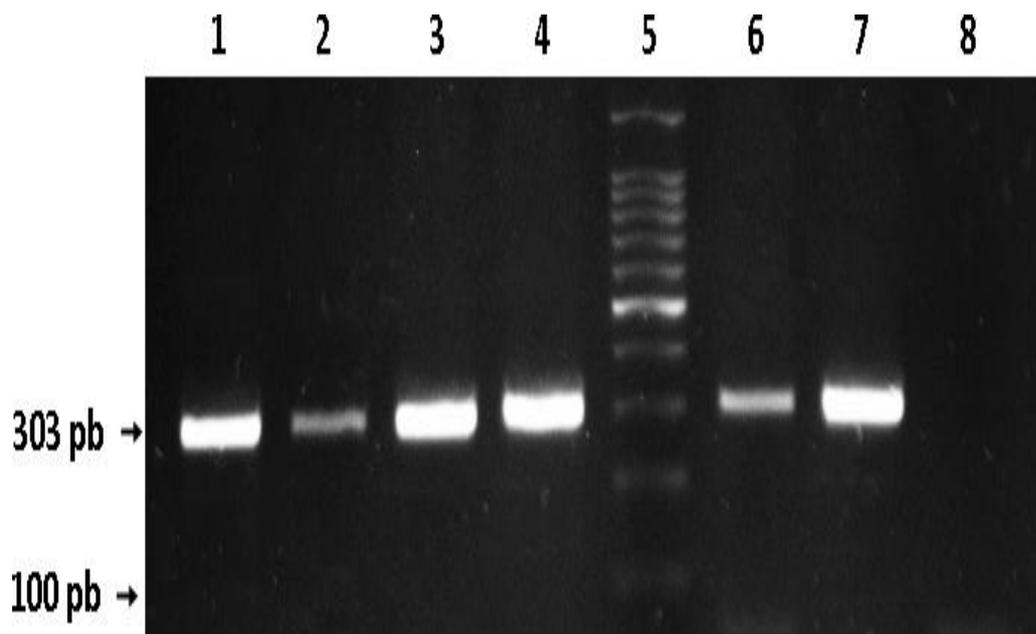
Cuadro 2. Porcentaje de genes de *S. aureus* en narinas y catéteres.



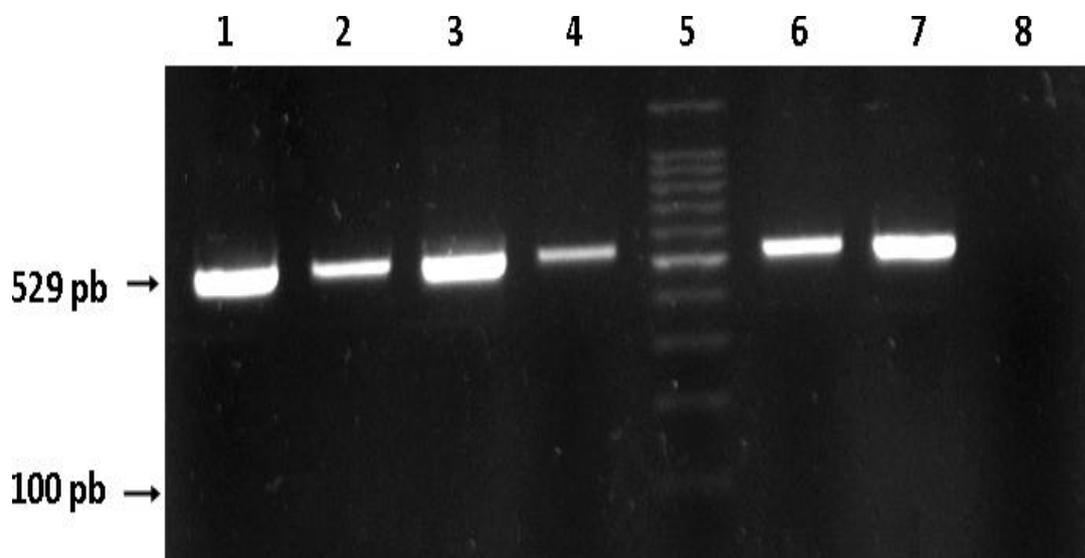
Fotografía 5. Detección de *sdrD* en *S. aureus*. Carril 1, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 2-4, *sdrD* (Amplicón de 467 pb) en cepas de *S.aureus* aisladas de catéteres; Carril 6-7 cepas de *S. aureus* aisladas de narinas; Carril 5, MPM 100 pb-ladder; Carril 8, control negativo (sin DNA molde).



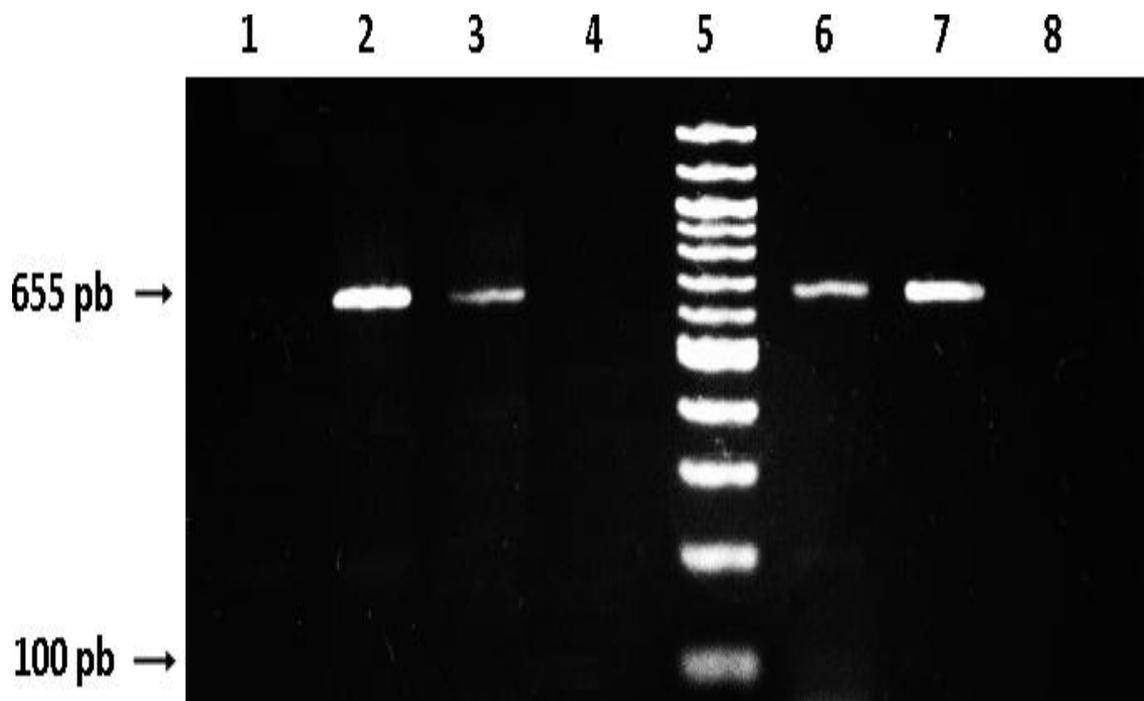
Fotografía 6. Detección de *sdrE* en *S. aureus*. Carril 1, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 2-4, *sdrE* (Amplicón de 894 pb) en cepas de *S.aureus* aisladas de catéteres; Carril 6-7, cepas de *S. aureus* aisladas de narinas; Carril 5, MPM 100 pb-ladder; Carril 8, control negativo (sin DNA molde).



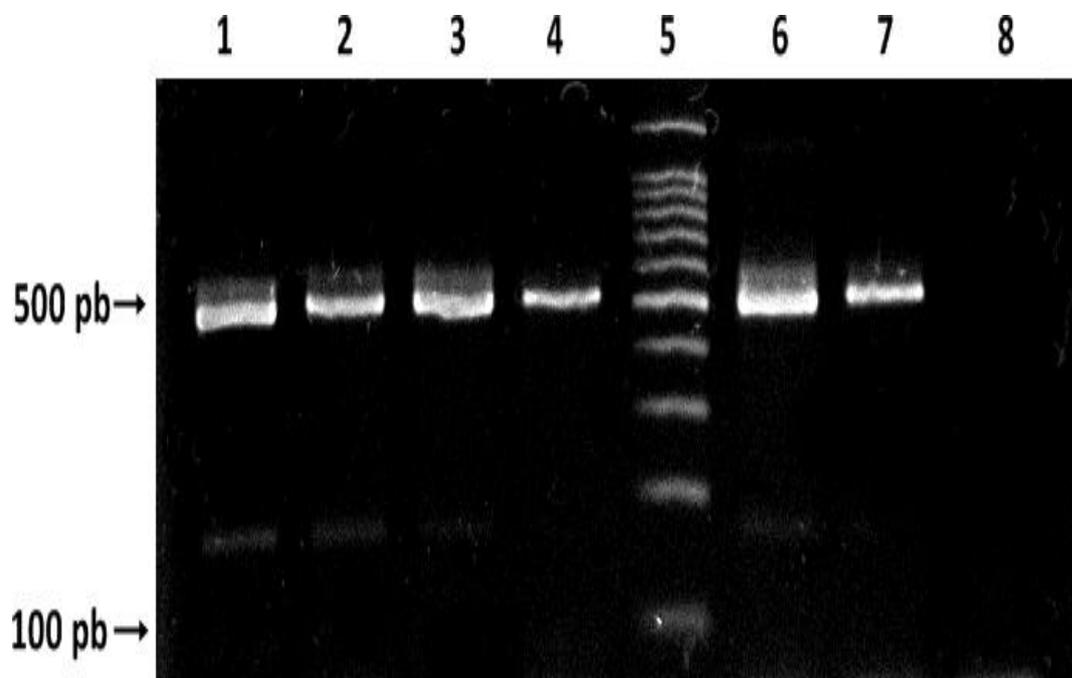
Fotografía 7. Detección de *efb* en *S. aureus*. Carril 1, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 2-4, *efb* (amplicón de 303 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres; Carril 6-7, cepas de *S. aureus* aisladas de narinas; Carril 5, MPM 100 pb-ladder; Carril 8, control negativo (sin DNA molde).



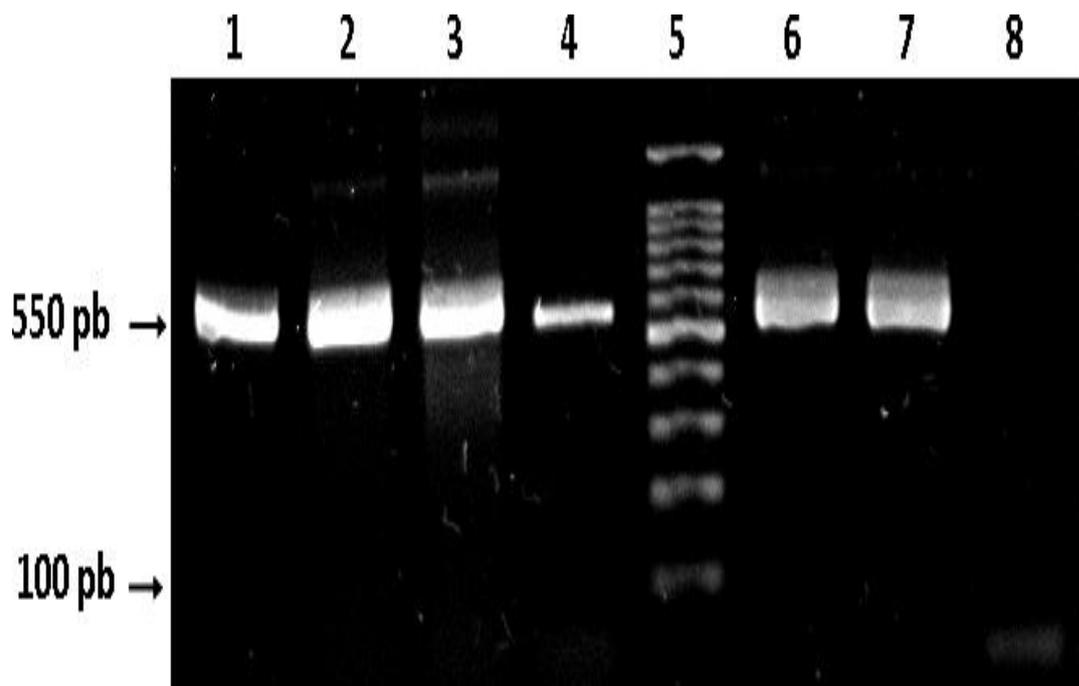
Fotografía 8. Detección de *V8* en *S. aureus*. Carril 1, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 2-4, *V8* (amplicón de 529 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres; Carril 6-7, cepas de *S. aureus* aisladas de narinas; Carril 5, MPM 100 pb-ladder; Carril 8, control negativo (sin DNA molde).



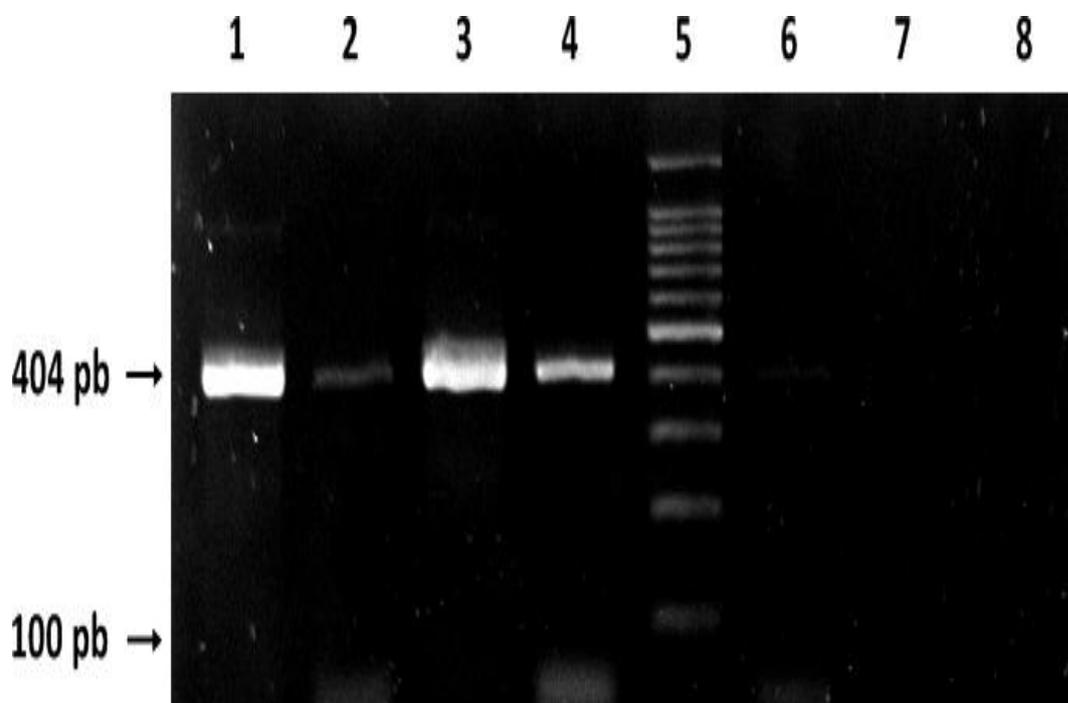
Fotografía 9. Detección de *map/eap* en *S. aureus*. Carril 1-3, *ebpS* (amplicón de 655 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres; Carril 4, 6, cepas de *S. aureus* aisladas de narinas; Carril 5, MPM 100 pb-ladder; Carril 7, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).



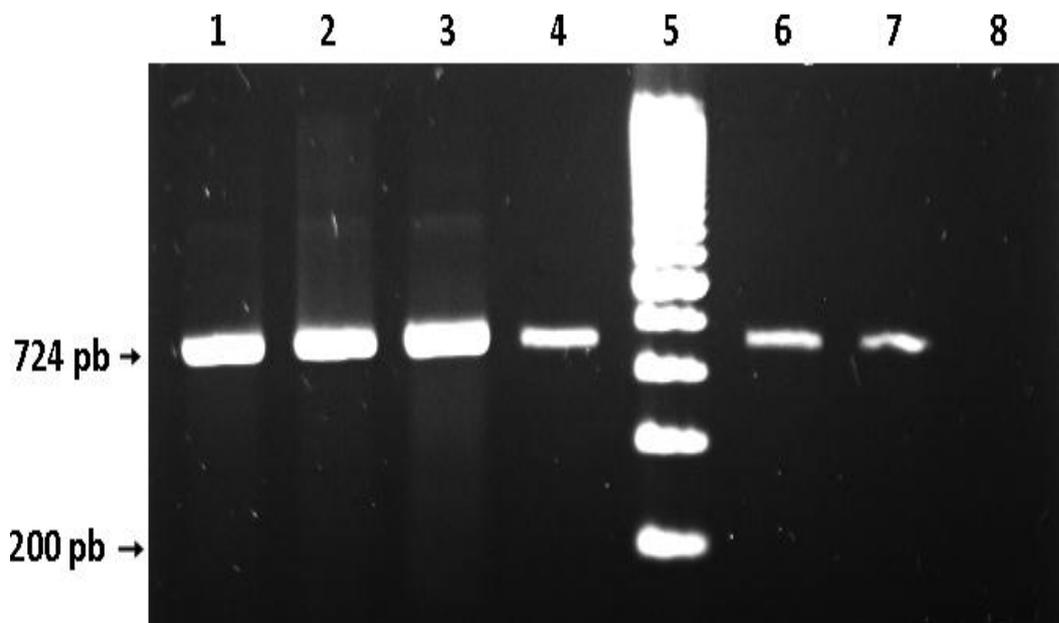
Fotografía 10. Detección de *bbp* en *S. aureus*. Carriles 1-3, *bbp* (amplicón de 500 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres; Carril 4, 6, cepas de *S. aureus* aisladas de narinas; Carril 5, MPM 100 pb-ladder; Carril 7, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 8, Control negativo (sin DNA molde).



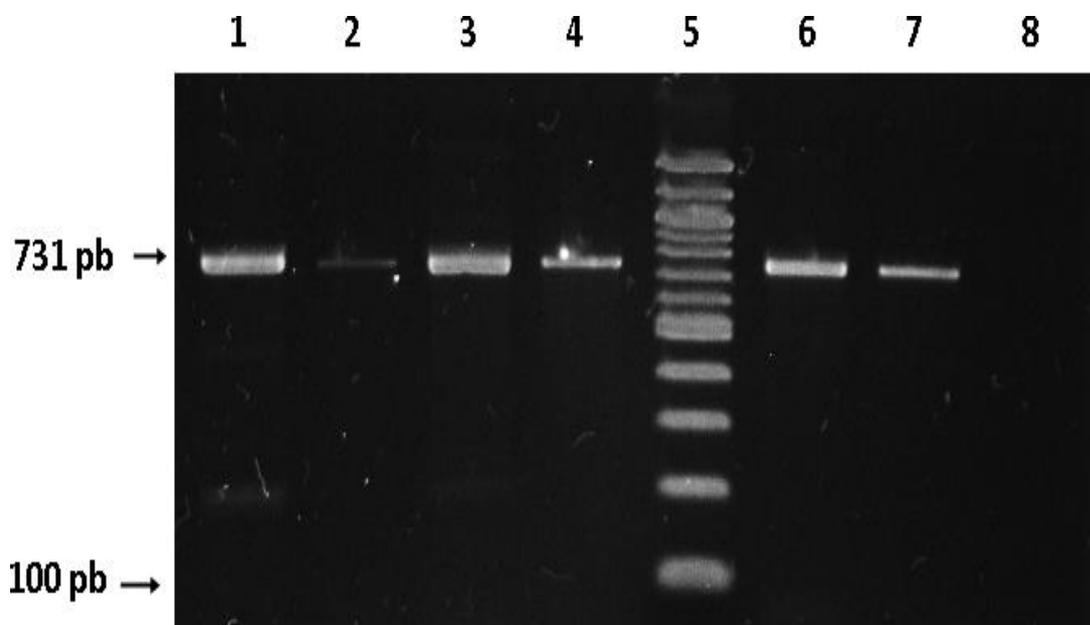
Fotografía 11. Detección de *ebpS* en *S. aureus*. Carril 1-3, *bbp* (Amplicón de 550 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres; Carril 4, 6, cepas de *S. aureus* aisladas de narinas; Carril 5, MPM 100 pb-ladder; Carril 7, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).



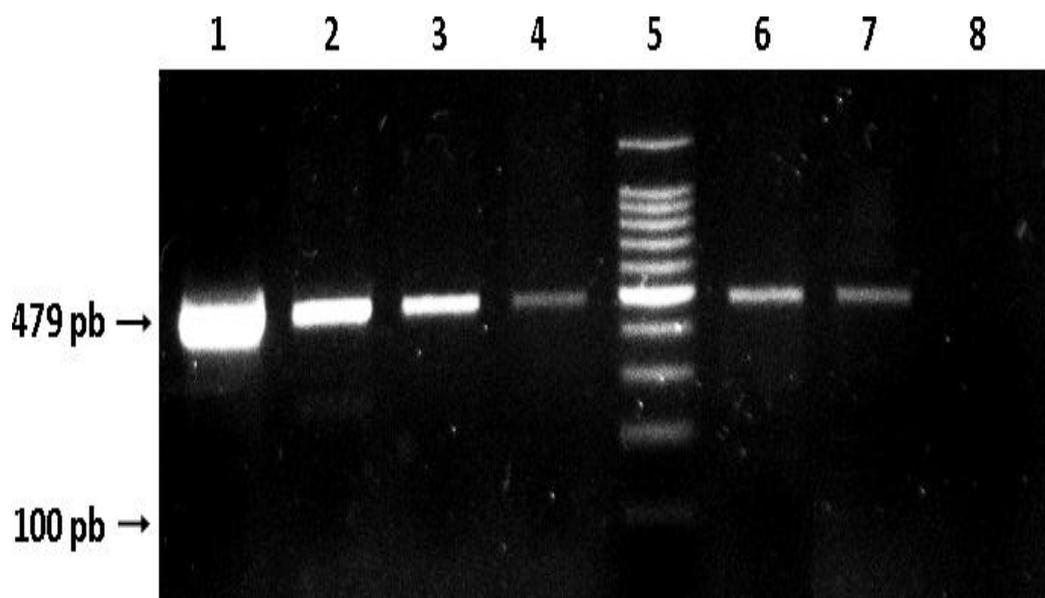
Fotografía 12. Detección de *clfB* en *S. aureus*. Carril 1, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) Carril 2-4, *clfB* (Amplicón de 404 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres; Carril 6, 7, cepas de *S. aureus* aisladas de narinas; Carril 5, MPM 100 pb-ladder; Carril 8, control negativo (sin DNA molde).



Fotografía 13. Detección de *arcA* en *S. aureus*. Carril 1, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 2-4, *arcA* (Amplicón de 724 pb) en cepas de *S.aureus* aisladas de catéteres; Carril 6, 7, cepas de *S. aureus* aisladas de narinas; Carril 5, MPM 200pb-ladder; Carril 8, control negativo (sin DNA molde).



Fotografía 14. Detección de *sdrC* en *S. aureus*. Carril 1-3, *sdrC* (Amplicón de 731 pb) en cepas de *S.aureus* aisladas de catéteres; Carril 4, 6, cepas de *S. aureus* aisladas de narinas; Carril 5, MPM 100 pb-ladder; Carril 7, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).



Fotografía 15. Detección de *chp* en *S. aureus*. Carril 1, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Carril 2-4, *chp* (Amplicón de 479 pb) en cepas de *S.aureus* aisladas de catéteres; Carril 6, 7, cepas de *S. aureus* aisladas de narinas; Carril 5, MPM 100 pb-ladder; Carril 8, control negativo (sin DNA molde).

Diferentes combinaciones de genes encontradas en catéter y narinas.

Se encontraron 31 patrones genotípicos diferentes en las 55 cepas de *S. aureus* analizadas (Cuadro 4). El patrón 1 (*bbp*, *clfB*, *ebpS*, *map/eap*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *chp*, *efb*, *V8*, *arcA*) conformado por todas los genes estudiados, se identificó en 25 (45%) de las cepas aisladas de catéteres y en 16 (42.1%) de las cepas aisladas de narinas y el patrón 2 (*bbp*, *clfB*, *ebpS*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *chp*, *efb*, *V8*, *arcA*) se identificó en 9 (16.3%) de las cepas aisladas de catéteres y en 2 (5.2%) de las cepas aisladas de narinas. También se encontraron 24 patrones diferentes entre sí (8-31), representados por una sola cepa en cada caso.

No. de patrón	Combinaciones de genes que codifican adhesinas y otros productos	Catéter (N=55)		Narinas (N=38)	
		No	%	No	%
1	<i>bbp, clfB, ebpS, map/eap, sdrC, sdrD, sdrE, chp, efb, V8, arcA.</i>	25	45	16	42.1
2	<i>bbp, clfB, ebpS, sdrC, sdrD, sdrE, chp, efb, V8, arcA.</i>	9	16.3	2	5.2
3	<i>bbp, clfB, ebpS, map/eap, sdrC, sdrD, sdrE, chp, efb, V8</i>	2	3.6	6	15.7
5	<i>bbp, map/eap, sdrC, sdrD, sdrE, chp, efb, V8, arcA.</i>	2	3.6	00	
4	<i>clfB, ebpS, map/eap, sdrC, sdrD, sdrE, chp, efb, V8, arcA.</i>	1	1.8	2	5.2
6	<i>clfB, ebpS, sdrC, sdrD, sdrE, chp, efb, V8, arcA.</i>	0	0	2	5.2
7	<i>bbp, clfB, ebpS, sdrD, chp, efb, V8,</i>	0	0	2	5.2
8-31	Otras combinaciones	16	29	8	21

Cuadro 3. Diferentes combinaciones de genes presentes en narinas y catéteres

DISCUSIÓN

Análisis de pacientes

En este estudio se analizaron 112 pacientes con Insuficiencia Renal Crónica (IRC) que presentaron infección en el sitio de inserción del catéter durante su asistencia al servicio de hemodiálisis de hospitales públicos, dentro de los cuales el 57% (n=64) fueron hombres y el 43% (n=48) mujeres (Gráfica 1), y el rango de edad más frecuente fue entre los 50 y 59 años con un 24% (n=27), seguida por los pacientes entre 20 y 29 años con un 23% (n=26) (Gráfica 2). En nuestro país la IRC es una de las principales causas de atención hospitalaria, con 128,000 pacientes, de los cuales sólo el 40% tiene la oportunidad de ser atendido en el Sector Salud. La tasa de crecimiento de la IRC ha sido aproximadamente del 11% anual en los últimos 10 años (Fundación Mexicana del Riñón, 2009). En los EUA en el 2010, la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) de Atlanta estimó que más de 20 millones, sobre los 20 años de edad tienen IRC. Siendo más común entre mujeres que hombres, mientras que en Japón dos tercios del total de pacientes en diálisis están por encima de los 60 años y la mitad son mayores de 65 años (Kurokawa *et al*, 2002).

La causa más frecuente de la IRC en los 112 pacientes analizados fue la Diabetes Mellitus con un 32.1% (n=36), seguida de una causa no determinada con 35.7% (n=40), glomerulonefritis con 17% (n=19) y la hipertensión arterial con 9.8% (n=11). Anteriormente la glomerulonefritis era considerada la causa más frecuente de insuficiencia renal, sin embargo la nefropatía diabética ha llegado a ocupar el primer lugar, sobre todo en los países desarrollados seguido por la hipertensión arterial y en tercer lugar se coloca la glomerulonefritis (Korokawa *et al*, 2002).

En un estudio realizado recientemente en México, en el cual se incluyó a 31,712 pacientes de 127 hospitales generales, 20,702 de Diálisis Peritoneal y 11,010 de Hemodiálisis, cuyo promedio de edad fue 60 (rango: 10-84) años, se encontró que las causas de la IRC fueron diabetes mellitus con el 48,5%, hipertensión arterial con el 19%, glomerulopatías crónicas con el 12,7% y otras con el 19,8% (Mendez *et al*, 2010).

La Asociación Americana de Diabetes en 2008, hace mención que la diabetes es la principal causa de IRC, ocasionando el 44% de los nuevos casos a nivel mundial. Tan sólo en EUA se registraron 48,374 casos de IRC. En EUA viven un total de 202, 290 pacientes con enfermedad renal crónica secundaria ocasionada por diabetes tratados con diálisis o con un riñón trasplantado.

En México no existe un registro real de la tasa de pacientes con diabetes, pero se estima que la incidencia de pacientes con IRC es de 377 casos por millón, con una prevalencia de 1,142 pacientes. De los 52,000 pacientes en terapias sustitutivas, 80% son atendidos en instituciones públicas (IMSS) (Mendez et al, 2010).

El gasto médico total derivado de la atención de la IRC, considerando los supuestos del escenario base, se estimó en 4,013 millones de pesos para el 2007, equivalentes al 2,5% del gasto del SEM (Seguro de Enfermedades y Maternidad) de ese año (Mendez et al, 2010).

Se ha estimado para la atención en programas de diálisis según el escenario base (2007), que la enfermedad alcanzará un incremento máximo en el número de casos para el 2043, lo cual representará una inversión de 20,000 mil millones de pesos, mientras que lo estimado en un escenario catastrófico tendría un ascenso continuo y para el año 2050 los costos de inversión estarán alcanzando los 50,000 mil millones de pesos, cifras que no podrá costear el instituto Mexicano del Seguro Social o algún otro tipo de Institución pública dirigida a la salud (García, 2012).

Identificación de *Staphylococcus aureus* por PCR

La frecuencia de *S. aureus* en los sitios de inserción infectados de los catéteres fue del 49.1 % (n=55) y de estos pacientes, el 69% (n=38) presentaron la misma especie en narinas (Gráfica 4). *Staphylococcus aureus* es la bacteria más común aislada de infecciones asociadas a catéteres de hemodiálisis (Stolic *et al*, 2008). Marshall, en el 2002 analizó muestras de infecciones asociadas a catéter y encontró que el 57% de las infecciones fue por bacterias Grampositivas y el 17% por bacterias Gramnegativas. Poole y colaboradores en el 2004 analizaron bacteremias asociadas a los catéteres, encontrando que el 72% de estas, fueron ocasionadas por cepas de *S. aureus* y por cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), mientras que el 28% restante fue ocasionado por bacterias Gramnegativas.

En este estudio para la identificación de *Staphylococcus aureus* se realizó una PCR convencional utilizando los marcadores cromosómicos *femA*, *femB*, y *nuc* (Fotografía 1-3). Se ha descrito que los genes *femA* y *femB* codifican proteínas que están involucradas en la biosíntesis del peptidoglucano, además de que están relacionadas con la resistencia a la meticilina. Genes con alta similitud a *fem* de *S. aureus* han sido descritos en diferentes especies del género *Staphylococcus*, como son *S. epidermidis*

y *S. haemolyticus* (Ehlert *et al*, 1997). Otro de los genes para la detección de *S. aureus* fue el gen *nuc* que codifica una termonucleasa, la cual se ha descrito como uno de los marcadores más importantes en la identificación de *S. aureus* (Nashev *et al*, 2004).

El tratamiento de las bacteremias asociadas a los catéteres se ha complicado en los últimos años, debido a que las cepas de han seleccionado como resistentes a la meticilina (Allon, 2004). Las cepas MRSA en los pacientes infectados representan un grave problema de salud que puede ocasionar endocarditis, bacteremia, septicemia o shock séptico, pudiendo llegar a comprometer la vida de los pacientes (Campbell *et al*, 2008; Deurenberg *et al*, 2007); sin embargo, estas infecciones se pueden prevenir utilizando diferentes protocolos de antibióticos durante las sesiones de hemodiálisis. (Poole *et al*, 2004; Vardhan *et al.*, 2002).

Identificación del gen *mecA* en las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres y narinas de los pacientes con IRC.

En este trabajo fue detectado el genotipo *mecA* en el 81.8% (n=45) de las cepas aisladas de catéter y en el 100% (n=38) de las cepas aisladas de narinas (Cuadro 3) (Fotografía 4). Campbell y colaboradores en el 2008 encontraron una prevalencia del 78.5% de cepas MRSA aisladas de infecciones de piel en EUA, mientras que en muestras aisladas de infecciones en piel provenientes de África no se identificaron cepas MRSA. Por otro lado Shore y colaboradores en el mismo año (2008) identificaron que el 84% de cepas de *S. aureus* aisladas de un hospital en Irlanda fueron multiresistentes, además de que todas contenían el gen *mecA*. El gen *mecA* se localiza en un elemento genético móvil llamado Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) y confiere a la bacteria resistencia contra la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, debido a que codifica una proteína con poca afinidad a estos antibióticos (Deurenberg *et al*, 2007). Existe una alta diversidad de elementos SCCmec, tanto en su organización estructural y su contenido genético, por lo que se han clasificado en tipos y subtipos. El grupo encargado de estudiar y clasificar los elementos SCCmec es el International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC), actualmente ha clasificado 11 diferentes tipos de SCCmec (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI) (http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html). El elemento móvil SCCmec se ha encontrado en otras especies de *Staphylococcus*, incluyendo *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, y *S. warneri*. (Hanssen *et al*, 2004). Diferentes estudios han

demostrado la inestabilidad genética de este elemento, una delección o inserción en la región *mec* puede darse por un proceso de selección natural en cepas clínicas (Inglis *et al*, 1993), así como también el estrés inducido con vancomicina puede dar la delección del gen *mecA* (Adhikari *et al*, 2004).

El elemento móvil SCC*mec* codifica recombinasas que pueden catalizarlo e integrarlo en el cromosoma de la bacteria, haciendo que no tenga un locus específico (Archer *et al*, 1994). Existe evidencia de que la transferencia horizontal del gen *mecA* puede ocurrir *in vivo* de *S. epidermidis* a *S. aureus* (Wielders *et al*, 2001), o bien, de *S. haemolyticus* a *S. aureus* (Berglund y Söderquist, 2008). A pesar de existir evidencia de una posible transferencia horizontal del gen *mecA* entre especies de *Staphylococcus* o entre diferentes especies Gram-positivas, estos mecanismos siguen siendo desconocidos (Ibrahim *et al*, 2009).

Las cepas MRSA antes eran sólo identificadas en hospitales o en otros ambientes dedicados a la salud, sin embargo, desde mediados de la década de los 90's se han identificado cepas MRSA asociadas a la comunidad (CA-MRSA) (Deurenberg *et al*, 2007). Estas cepas CA-MRSA se caracterizan por poseer principalmente elementos SCC*mec* pequeños (IV o V), el cual lo hace más móvil (Berglund y Söderquist, 2008). En el 2008 se realizó el primer reporte de cepas CA-MRSA en hospitales de México (Velazquez-Meza *et al*, 2011).

La alta capacidad para transmitir genes de resistencia, la facilidad de contraer infecciones entre pacientes en los hospitales y el incremento de cepas CA-MRSA ha incrementado la mortalidad en pacientes, así como los costos en el sector salud (Huang *et al*, 2006). Para combatir las infecciones por MRSA se utilizan antibióticos glicopeptídicos tales como la vancomicina y el teicoplan, sin embargo ya se han reportado casos de cepas clínicas resistentes a estos antibióticos (Howden, 2010) por lo que es necesario crear nuevas estrategias para contrarrestar las infecciones por MRSA.

Detección de los genes que codifican adhesinas y otros genes por PCR convencional de las cepas de *S. aureus*.

Para este trabajo se identificaron mediante PCR convencional los genes *bbp*, *clfB*, *ebpS*, *map/eap*, *sdrC*, *sdrD* y *sdrE* (Cuadro 3), los cuales codifican proteínas pertenecientes a la familia de las MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules). Estas proteínas se encuentran ancladas en la pared celular y están involucradas en la fijación de *S. aureus* a las células del hospedero o a la matriz extracelular (Foster y Hook, 1998). La fase de unión en el proceso de infección se encuentra mediada por estas proteínas (Patti *et al*, 1994), y se han identificado un total de 21 MSCRAMMs, pero aún se desconocen muchas proteínas del hospedero a las cuales estas MSCRAMMs se adhieren (Roche *et al*, 2003). También se identificaron otros genes de virulencia: *efb*, *chp*, *arcA* y *V8*. Los primeros tres genes se encuentran involucrados en la inhibición de la respuesta inmune (Degnan *et al*, 2000; Koet *et al*, 2011; Veldkamp *et al*, 2000), mientras que el último está más relacionado con el proceso de colonización del hospedero (McGavin *et al*, 1997).

En este estudio se encontraron frecuencias similares del gen *bbp* (Fotografía 10) en catéter y narinas (78.1% y 76.3%, respectivamente) (Cuadro 3). Campbell y colaboradores encontraron una frecuencia del 100% en cepas de *S. aureus* de EUA y un 91% en cepas de África, ambas aisladas de infecciones de piel, mientras que Peacock y colaboradores en el 2002 en un estudio realizado en Reino Unido encontraron un 43% en cepas aisladas de pacientes sanos y un 38% en cepas aisladas de pacientes con infecciones invasivas, lo que nos indica que la distribución de genes difiere en diferentes partes del mundo. El gen *bbp* codifica una proteína de 1117 aminoácidos que posee la capacidad de unirse al núcleo de la sialoproteína de hueso (BSP). Se ha reportado que cada célula bacteriana tiene hasta 1000 sitios de unión a BSP (Rydén *et al*, 1989). La BSP se encuentra sólo en los huesos y la dentina. Altas concentraciones de BSP son encontradas en el osteoide, nuevo tejido formado del crecimiento del hueso, el cuál es el sitio más común donde se puede dar una osteomielitis (Hultenby *et al*, 1994). Se ha reportado que la unión a la BSP se encuentra potencialmente en cepas aisladas de casos con osteomielitis, ya que en otro tipo de infecciones por *S. aureus*, como la endocarditis, las cepas no se unen a la BSP (Rydén *et al*, 1987). La proteína *bbp* contiene repeticiones de serina-aspartato (SD) por lo que se puede clasificar en la familia de las proteínas Sdr (SD-repeat) (Tung *et al*, 2000). Algunas de estas proteínas se han identificado por su capacidad para

unirse a componentes específicos del plasma como el fibrinógeno (ClfA y ClfB) (Josefsson *et al*, 1998) o al calcio como la proteína SdrD (Josefsson *et al*, 1998). Se ha demostrado que la capacidad de unión de *S. aureus* a la BSP aumenta en presencia de Ca^{2+} (Yacoub *et al*, 1994).

El gen *clfB* (fotografía 12) tuvo una frecuencia de 81.8% en las cepas aisladas de los catéteres y en el 97.3% de las cepas aisladas de las narinas (Cuadro 3). Campbell *et al* en el 2008 encontraron una frecuencia del 100% de este gen en cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones de piel en pacientes de África y de EUA, al igual que Peacock y colaboradores en el 2002 en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes sanos y con infecciones invasivas en el Reino Unido. *Staphylococcus aureus* expresa dos proteínas asociadas a la unión al fibrinógeno, la proteína ClfA y ClfB (clumping factor A y B) (McDevitt, *et al* 1994). Estas proteínas se encuentran en la pared celular y median la adherencia de la bacteria al fibrinógeno, a coágulos de sangre, a biomateriales, y al trombo en válvulas de corazón dañadas en ratas modelos de endocarditis (McDevitt *et al*, 1994) (Moreillon *et al*, 1995). A diferencia de ClfA, que está presente en todas las fases de crecimiento de *S. aureus*, ClfB sólo presenta un nivel funcional y detectable en la fase del crecimiento exponencial (Ní Eidhin *et al*, 1998). Esto sugiere que la transcripción del gen *clfB* se reprime durante la fase exponencial y la superficie proteica puede ser degradada por proteasas (McAleese *et al*, 2001). La transcripción de los genes *spa*, *fnb* y *cna*, que codifican la proteína A, proteínas de unión a fibronectina y proteínas de unión al colágeno, respectivamente, sólo ocurre de igual manera en la fase exponencial, pero en la mayoría de los casos las proteínas permanecen en la superficie de las células en la fase estacionaria para promover la unión al ligando (Gillaspay *et al*, 1998). La proteína ClfB es una MSCRAMM bifuncional, ya que puede unirse a citoqueratina 10, encontrada en la superficie de las células descamadas epiteliales, y al fibrinógeno. Esta habilidad de *S. aureus* para unirse a las células descamadas es la mayor determinante para que pueda colonizar las narinas anteriores (O' Brien *et al*, 2002).

El gen *ebpS* (fotografía 11) se identificó en el 85.4% de las cepas aisladas de catéteres, mientras que en las cepas aisladas de narinas se encontró en el 100% (Cuadro 3). Peacock y colaboradores en el 2002 encontraron un 62% del gen *ebpS* en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes sanos y un 68% en cepas aisladas de pacientes con infecciones invasivas. Campbell y colaboradores en el 2008 encontraron un 100% de prevalencia de este gen en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infecciones en piel provenientes de África y EUA. El gen *ebpS* codifica una proteína de 59 aminoácidos, que se encuentra integrada a la membrana bacteriana, que tiene la

capacidad de unirse a la elastina y a la tropoelastina soluble, que es la precursora de la elastina (Downer *et al*, 2002). La elastina, junto con los componentes microfibrilares, son los mayores componentes de la matriz extracelular y están presentes en tejidos que requieren elasticidad como el pulmón, la piel y los vasos sanguíneos (Mecham y Davis, 1994). La elastina es quimiotáctica para los neutrófilos como señal de daño en el tejido, por lo que es posible que la proteína EbpS sea parte de un sistema de transducción de señales para impedir el flujo de neutrófilos (Downer *et al*, 2002). También se sugiere que la expresión de la proteína EbpS está relacionada con la regulación del crecimiento celular (Downer *et al*, 2002).

El gen *map/eapse* (fotografía 9) se detectó en el 63% de las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres y en el 68.4% de las cepas aisladas de narinas (Cuadro 3). Este gen fue el que menos se presentó tanto en narinas como en catéter. Campbell y colaboradores en el 2008 encontraron una frecuencia de 80% de este gen en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infecciones en la piel provenientes de EUA y un 38% en cepas provenientes de África, mientras que Peacock y colaboradores en el 2002 en reino unido encontraron un 93% de este gen en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes sanos y un 96% en cepas de aisladas de pacientes con una infección invasiva. El gen *eap* codifica una proteína multifuncional que puede unirse al fibrinógeno, fibronectina, protrombina, vitronectina, sialoproteína de hueso y trombospodina (McGavin *et al*, 1993). La proteína Eap contiene subdominios repetidos que tienen una homología con un segmento del péptido que se une a la cadena B de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II en mamíferos, por lo que se considera que es igual a la proteína Map (Mayor histocompatibility complex class II complex analog protein) (McGavin *et al*, 1993), sin embargo Map y Eap presentan diferencias en su estructura por lo que no son completamente iguales (Palma *et al*, 1999). Eap puede formar oligómeros y posee la capacidad para unirse a la superficie de las células bacterianas, por lo que se sugiere que Eap puede facilitar la aglutinación de *S. aureus*, además de que puede servir como una molécula “puente” entre los componentes del hospedero y la bacteria (Palma *et al*, 1999). También es capaz de unirse a células epiteliales, a fibroblastos (Hussain *et al*, 2002), a dispositivos plásticos (Kreikemeyer *et al*, 2002), además de que afecta la respuesta inmune del hospedero, ya que altera la función y proliferación de las células T (Lee *et al*, 2002).

Los genes *sdrC*, *sdrD* y *sdrE* (fotografías 14, 5 y 6, respectivamente) fueron identificados en el 89%, 94.5% y 92% de las cepas aisladas de catéteres, respectivamente (Cuadro 3); mientras que en las cepas de narinas las frecuencias

fueron del 84.2%, 97.3% y 81.5%, respectivamente (Cuadro 3). Campbell y colaboradores en el 2008 encontraron una frecuencia del 88% para *sdrC*, 95% para *sdrD* y 88% para *sdrE* en cepas aisladas de infecciones de piel por *S. aureus* provenientes de EUA, mientras que en cepas provenientes de África encontraron el 68% para *sdrC*, 100% para *sdrD* y 68% para *sdrE*. Peacock y colaboradores en el 2002 en reino unido encontraron una frecuencia de 100% para *sdrC*, 41% para *sdrD* y 40% para *sdrE* en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes sanos, mientras que en cepas aisladas de pacientes con infecciones invasivas encontraron un 100% de *sdrC*, 48% de *sdrD* y 56% de *sdrE*. En otro estudio realizado por Sabat y colaboradores en el 2006 con cepas de *S. aureus* de diferentes países de Europa, encontraron una frecuencia del 100% para el gen *sdrC*, 59% para *sdrD* y 89% para *sdrE*. Las proteínas SdrC, SdrD y SdrE, junto con las MSCRAMMs ClfA y ClfB, forman parte de una familia de proteínas que presentan en la región R múltiples repeticiones de serina-aspartato y se encuentran ancladas a la pared celular (Josefsson *et al*, 1998; Foster y Hook, 1998; Ní Eidhin *et al*, 1998). Se ha reportado que el gen *sdrC* se encuentra siempre en el locus *sdr*, mientras que *sdrD* y *sdrE* se encuentran heterogéneamente (Sabat *et al*, 2006). Existe una correlación entre las cepas invasivas y de pacientes sanos con la presencia o ausencia del gen *sdrE* (Peacock *et al*, 2002). Las cepas que sólo tienen el gen *sdrC* poseen un bajo potencial para causar infecciones de hueso, a comparación de las que tienen *sdrD* y/o *sdrE*, ya que se ha encontrado una relación entre el gen *sdrD* y la osteomielitis (Sabat *et al*, 2006), además de que se han identificado variaciones alélicas de *SdrE* que funcionan como proteínas de unión a la sialoproteína de hueso (Tung *et al*, 2000). Las proteínas Sdr también han sido asociadas a la adherencia a células epiteliales (Corrigan *et al*, 2009), además de que *sdrD* es crucial en la formación de los abscesos en la piel (Cheng *et al*, 2009). El gen *sdrD* reacciona de diferente manera que *SdrC* y *SdrE*, y se cree que también puede tener un rol en las interacciones entre el patógeno y el sistema inmune del hospedero, ya que su expresión aumenta con la sangre humana (Sitkiewicz, 2011).

El gen *efb* (fotografía 7) se identificó en el 92.7% de las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres y en el 100% de las cepas aisladas de las narinas, Campbell y colaboradores en el 2008 encontraron una frecuencia de 100% de este gen en las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infecciones en piel provenientes de África y de EUA, mientras que Peacock y colaboradores en el 2002 sólo encontraron 60% en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes sanos y un 68% en cepas aisladas de pacientes con infecciones invasivas. El gen *efb* tiene la capacidad de unirse al fibrinógeno que está en la superficie de las plaquetas activadas, y también al

componente localizado en la superficie de las plaquetas, por lo que puede inhibir la agregación de plaquetas, independientemente del fibrinógeno. Este efecto explica el retraso de la cicatrización en la presencia de Efb (Shannon y Flock, 2004). La capacidad de unión de la proteína Efb al fibrinógeno presenta una mayor afinidad que la de las proteínas MSCRAMMs, además de que esta interacción impide la adhesión de los neutrófilos (Ko *et al*, 2011). Esto se debe a que la proteína Efb tiene dos sitios de unión al fibrinógeno uno en la región C-terminal y otra en la región N-terminal. También se ha demostrado que los humanos producen anticuerpos para Efb, incluso sin una infección previa por *S. aureus* (Olander, 2008).

El gen *chp* (fotografía 15) fue identificado en el 89% de las cepas aisladas de catéter y en el 94.7% en las cepas provenientes de narinas. Campbell y colaboradores en el 2008 encontraron una frecuencia de 98% de este gen en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infecciones en piel provenientes de EUA y un 100% en cepas provenientes de África, mientras que de Haas y colaboradores en el 2004 encontraron un 62% de frecuencia para este gen en cepas clínicas de *S. aureus* aisladas de narinas e infecciones en sangre. El gen *chp* produce una proteína llamada CHIPS (Chimiotaxis, inhibitor protein *Staphylococcus aureus*), la cual es más específica para humanos y puede inhibir la quimiotaxis de los neutrófilos, *in vivo* e *in vitro* (de Haas *et al*, 2004). El gen *chp*, junto con otros genes, han sido identificados como parte de un cluster para evadir la respuesta inmune, además de que se han encontrado en el ADN del bacteriofago β C- ϕ S, lo que indica que *S. aureus* puede transferir este cluster mediante bacteriófagos (van Wamel *et al*, 2006).

El gen *V8* (fotografía 8) fue encontrado en el 92.7% de las cepas aisladas de catéter y en el 94.7% de cepas aisladas de narinas. Campbell y colaboradores en el 2008 encontraron un 91% de este gen en cepas aisladas de infecciones en piel de EUA y un 85% en cepas de *S. aureus* aisladas de África, mientras que Peacock y colaboradores en el 2002 en Reino Unido encontraron un 94% en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes sanos y un 96% en cepas aisladas de pacientes con infecciones invasivas. El gen *V8* codifica una exoenzima serina proteasa que modifica la unión de *S. aureus* a la fibronectina durante el curso de la infección. La función de la *V8* es limitar la unión al tejido, su expresión requiere de *agr*, el cual es el mayor mecanismo inducido por alta densidad celular por un sistema del quórum sensing (Bjorkklind y Arvidson, 1980). Estudios han sugerido que las bacterias adheridas al sitio de infección requieren de una actividad proteolítica para promover la infección a otros lugares. Esto se ha descrito para *Pseudomonas aeruginosa* que produce una proteasa elastina inducida a una alta densidad celular mediante un mecanismo del quórum sensing (Passador e

Iglewski, 1995) y *Vibrio Cholerae* que expresa una hemaglutinina proteasa que degrada receptores epiteliales de la célula a los cuales la bacteria se adhiere (Finkelstein *et al*, 1992).

El gen *arcA* (fotografía 13) fue encontrado en el 90.9% de las cepas aisladas de catéter y un 68.4% en las cepas aisladas de narinas. Campbell y colaboradores en el 2008 encontraron este gen en todas las cepas de *S. aureus* provenientes de EUA. El gen *arcA* es un cluster, junto con *opp-3*, que se encuentra en un elemento móvil llamado ACME (Arginine catabolic mobile element). El cluster *arc*, codifica una arginina deaminasa que convierte la L-arginina a dióxido de carbono, ATP y amonio, importantes para sobrevivir a bajo pH y para la inhibición de la respuesta inmune contra las infecciones bacterianas (Degnan *et al*, 2000). *Staphylococcus aureus* tiene un cluster *arc* nativo que codifica la arginina deaminasa, el cual difiere al cluster ACME-*arc*. El cluster ACME-*arc* contribuye a la patogenicidad de las cepas USA300 de *S. aureus*, ya que su delección disminuye su capacidad y patogenicidad (Diep *et al*, 2008).

Se realizó una prueba de X^2 comparando las frecuencias de los genes de adhesión y otros genes presentes en catéter y en narinas y no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$). Esto concuerda con Sabat y colaboradores en 2006, en donde no encuentran diferencias significativas entre las frecuencias de los genes *sdrCDE* presentes en narinas y en otras infecciones. Este estudio sólo evaluó la presencia o ausencia de los genes basada en la PCR, por lo que no se puede diferenciar entre la presencia o ausencia del gen completo y la presencia o ausencia de una variante alélica en un locus polimórfico.

Diferentes combinaciones de genes encontradas en catéter y narinas.

En este trabajo se agruparon los genes que codifican adhesinas y otros genes para encontrar posibles combinaciones y poder compararlas. En total se encontraron 31 combinaciones diferentes, de las cuáles la combinación detectada con mayor frecuencia en las cepas aisladas de catéter fue el patrón 1 (45%; n=25) conformado por los 11 genes estudiados (cuadro 4), mientras que en las cepas aisladas de narinas este mismo patrón (1) se encontró en el 42.1% (n =16). Todas las demás combinaciones encontradas tuvieron frecuencias menores al 20%, y algunas de estas se presentaron tanto en catéter como en narinas. Esto nos puede indicar que no existe

alguna combinación de genes específica para colonizar los catéteres de los pacientes con IRC.

Es importante mencionar que las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres y de las narinas en 10 pacientes presentaron la misma combinación de genes (patrón 1; Cuadro 4). El mismo genotipo en catéter y narinas nos hace suponer que probablemente se trata de la misma cepa, y que fue probablemente el mismo paciente quién infectó el catéter con su propia flora nasal. Al menos el 10% de las personas sanas portan un *Staphylococcus* en sus narinas anteriores, y del 70% al 90% son portadores pasajeros. Estos portadores tienen un riesgo mucho más alto de contraer una infección oportunista que los que no son portadores (Williams, 1963).

Para asegurarse que se trata de la misma cepa de *S. aureus* se pueden realizarse pruebas fenotípicas y genotípicas. Las fenotípicas incluyen actividad hemolítica, antibiogramas, presencia de enterotoxinas y la fagotipificación. Las genotípicas pueden ser la presencia de genes, el número de repeticiones de alguna región de un gen o la determinación de polimorfismos en algún gen. También se pueden comparar los ADN de las cepas utilizando la electroforesis en gel por campos pulsados (PFEG) (Toshkova et al, 2001). Weinstein en 1959 fagotipificó cepas de *S. aureus* y encontró que el 94% de los *S. aureus* aislados de infecciones en heridas y el 92% de los aislados de narinas mostraban fagotipos idénticos. Otro estudio de 5 años hecho en pacientes con hemodialisis demostró que el 93% de las infecciones por *S. aureus* fueron causadas por el mismo fagotipo contenido en sus narinas (Yu et al, 1986). En otro estudio realizado por Ena y colaboradores en 1994, se encontraron pacientes tratados con hemodiálisis infectados por cepas de *S. aureus* con fagotipos idénticos a los que llevaban en sus narinas. Una asociación entre las cepas de *S. aureus* contenidas en las narinas y una infección ha sido también descrita en pacientes con diálisis peritoneal continua ambulatoria (Sesso et al, 1989) y en infecciones de piel (Gould y Cruickshank, 1957) (Kay, 1962) (Tullochl, 1954) (Toshkova et al, 2001). En otro estudio hecho en México por Hamdan-Partida y colaboradores en el 2010 se analizaron cepas de *S. aureus* aisladas de narinas y garganta con PFEG, encontrando que el 81% de cepas MSSA y el 64% de las cepas MRSA eran iguales o similares en las narinas y la garganta del mismo paciente.

CONCLUSIONES

- *Staphylococcus aureus* fue responsable del 49.1 % de las infecciones asociadas a los catéteres de los pacientes con IRC, dentro de los cuales el 69% presentó la misma especie en las narinas.
- La mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres y de las narinas de los pacientes de hemodiálisis fueron MRSA.
- Se identificaron 31 combinaciones de los genes diferentes, dentro de las cuales el patrón conformado por los 11 genes estudiados fue el más frecuente entre las cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres y de narinas.
- Los resultados encontrados reflejaron que no existió ninguna combinación de genes específica para colonizar los catéteres.
- La alta incidencia de marcadores de virulencia y la elevada frecuencia de cepas MRSA representa un riesgo para los pacientes que en algún momento puede comprometer la vida de estos, por lo que se administró el tratamiento médico adecuado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adhikari RP, Scales GC, Kobayashi K, Smith JMB, Berger-Bächi B, Cook GM. 2004. Vancomycin-induced deletion of the methicillin resistance gene *mecA* in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.*54:360–363.
2. Allon M. 2004. Dialysis catheter-related bacteremia: Treatment and Prophylaxis. *Am J Kidney Dis.* 5:779-791.
3. Archer GL, Niemeyer DM. 1994. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol.* 2:343–47.
4. Barret FF, Mc Ghee RP, Findland M. 1968. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. *NEJM.* 279: 441-8.
5. Berglund C, Söderquist B. 2008. The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden—possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome *mec* between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 14:1048–1056
6. Bjorklind A, Arvidson S. 1980. Mutants of *Staphylococcus aureus* affected in the regulation of exoprotein synthesis. *FEMS Microbiol Lett.* 7:203–206.
7. Bustos-Martínez JA., Hamdan-Partida A., Gutiérrez-Cárdenas M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed.* 17:287-305.
8. Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, Bae In-Gyu, Stryjewski ME, Federspiel JJ, Tonthat GT, Rude TH, Barriere SL, Corey R, Fowler VG. 2008. Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *Journal of Clinical Microbiology.* 46:678-684.
9. Cheng AG, Kim HK, Burts ML, Krausz T, Schneewind O y Missiakas DM. 2009. Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues. *FASEB J.* 23:3393–3404
10. Corrigan R, Miajlovic H, Foster TJ. 2009. Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiol.* 9:22.
11. Croes S, Deurenberg R, Boumans M, Beisser P, Neef C, Stobberingh E. 2009. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC Microbiology.* 9:1-19.

12. Degnan BA, Fontaine MC, Doebereiner AH, Lee JJ, Mastroeni P, Dougan G, Goodacre JA, Kehoe MA. 2000. Characterization of an isogenic mutant of *Streptococcus pyogenes* Manfredo lacking the ability to make streptococcal acid glycoprotein. *Infect Immun.* 68: 2441–2448.
13. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 13:222-235.
14. Diep BA., Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A., Etages SA, Jones A, Palazzolo-Balance AM, Perdreau-Remington F, Sensabaugh GF, DeLeo FR, Chambers HF. 2008. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette *mec* linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 197:1523–1530.
15. Donland RM. 2001. Biofilm formation: A clinically relevant microbiologic process. *Clin Infect Dis.* 33:1387-1392.
16. Downer R, Roche F, Park PW, Mecham RP, Foster TJ. 2002. The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *J Biol Chem.* 277:243-50.
17. Ehlert K, Schröder W, Labischinski H. 1997. Specificities of *FemA* and *FemB* for different glycine residues: *FemB* cannot substitute for *FemA* in staphylococcal peptidoglycan pentaglycine side chain formation. *J Bacteriol.* 179:7573.
18. Ena J, Boelaert JR, Boyken L, van Landuit HW, Godart HW, Herwaldt LA. 1994. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in patients on hemodialysis. *Infect Cont Hosp Epidemiol.* 15:78-81.
19. Finkelstein RA, Boesman-Finkelstein M, Chang Y, Häse CC. 1992. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infect Immun.* 60:472–478.
20. Foster TJ, Höök M. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6:484–488.
21. Flock JI, Heinz SA, Heimdahl A, Schenning T. 1996. Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 64:1876–1878.
22. García GO. 2012. Insuficiencia renal crónica. Centro Integral de Especialidades Nefrológicas. Leon, Guanajuato, México.

23. Gil, M. 2000. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. Rev Chil Infect. 17 : 145-152.
24. Gillaspay AF, Lee CY, Sau S, Cheung AL, Smeltzer MS. 1998. Factors affecting the collagen binding capacity of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 66:3170-8.
25. Gould JC, Cruickshank JD. 1957. Staphylococcal infections in general practice. Lancet. 2:1157-1161.
26. de HaasCJC, Veldkamp KE, Peschel A , Weerkamp F, Van Wamel WJB, Heezius ECJM, Poppelier MJG, Van Kessel KPM y Van Strijp JAG. 2004. Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus*, a Bacterial Antiinflammatory Agent. JEM. 199 : 687-695
27. Hamdan-Partida A, Sainz-Espuñes T, Bustos-Martínez J. 2010. Characterization and Persistence of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from the Anterior Nares and Throats of Healthy Carriers in a Mexican Community. J of clinical microbiology. 1701–1705.
28. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. 2010. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 23:99-139.
29. Huang H, Flynn NM, King JH, Monchaud C, Morita M, Cohen SH. 2006. Comparisons of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and hospital-associated MRSA infections in Sacramento, California. J Clin Microbiol. 44:2423–72427
30. Hultenby K, Reinholt FP, Norgård M, Oldberg A, Wendel M, Heinegård D. 1994. Distribution and synthesis of bone sialoprotein in metaphyseal bone of young rats show a distinctly different pattern from that of osteopontin. Eur J Cell Biol. 63:230-9.
31. Hussain M, Haggar A, Heilmann C, Peters G, Flock J, Herrmann M. 2002. Insertional Inactivation of *eap* in *Staphylococcus aureus* Strain Newman Confers Reduced Staphylococcal Binding to Fibroblasts. Infection and immunity. 70:2933-40.
32. Ibrahim S, Salmenlinna S, Virolainen A, Kertulla AM, Lyytikäinen O, Jägerroos H, Broas M, Varkila VJ. 2009. Carriage of methicillin-resistant staphylococci and their SCC*mec* types in a long-term-care facility. J Clin Microbiol. 47:32–37.

33. Inglis, B, El-Adhami W, y Stewart PR. 1993. Methicillin-sensitive and resistant homologues of *Staphylococcus aureus* occur together among clinical isolates. *J Infect Dis.* 167:323–328.
34. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Prevalence estimates of diabetes mellitus (DM), 2030. Disponible en <http://www.diabetesatlas.org/content/prevalence-estimates-diabetes-mellitus-dm-2030>
35. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Update.* 6: 41–52.
36. Josefsson E, McCrea KW, Eidhin DN, O'Connell D, Cox J, Hook M, Foster TJ. 1998. Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* 144: 3387–3395.
37. Josefsson E, O'Connell D, Foster TJ, Durussel I, Cox JA. 1998. The binding of calcium to the B-repeat segment of SdrD, a cell surface protein of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 273:31145-52.
38. Kay CR. 1962. Sepsis in the home. *Br Med J.* 1: 1048-1052
39. Kloss W.1997. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. En: Crossley KB, Archer GL, eds. *The Staphylococci in human disease.* Nueva York: Churchill Livingstone, 1997:113-215.
40. Ko YP, Liang X, Smith CW, Degen JL, Höök M.2011. Binding of Efb from *Staphylococcus aureus* to Fibrinogen Blocks Neutrophil Adherence. *The journal of biological chemistry.* 286 : 9865–9874.
41. Kobayashi N, Wu H, Kojima K, Taniguchi K, Urasawa S, Uehara N, Omizu Y, Kishi Y, Yagihashi A Kurokawa I. 1994. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect.* 113:259-266.
42. Kreikemeyer B, McDevitt D, Podbielski A. 2002. The role of the map protein in *Staphylococcus aureus* matrix protein and eukaryotic cell adherence. *Int J Med Microbiol.*292:283-95.
43. Kanafani ZA, Fowler VG. 2006. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 24:182-93.
44. Kurokawa K, Nangaku M, Saito A, Inagi R, Miyata T. 2002. Current issues and future perspectives of chronic renal failure. *J Am SocNephrol.* 13: 53-56.
45. Kuypers JM, Proctor RA.1989. Reduced adherence to traumatized rat heart valves by a low-fibronectin-binding mutant of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 57:2306–2312.

46. Lee LY, Miyamoto YJ, McIntyre BW, Höök M, McCrea KW, McDevitt D, Brown EL. 2002. The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J Clin Invest.* 110:1461-71.
47. Marschall J. 2008. Catheter-associated bloodstream infections: Looking outside of the ICU. *Am J Infect Control.* 36:S172.e5-8.
48. Martín de Francisco AL, Rodríguez-Puyol D, Praga M. 1997. *Nefrología clínica.* 1997: 528-545.
49. McAleese FM, Walsh EJ, Sieprawska M, Potempa J, Foster TJ. 2001. Loss of clumping factor B fibrinogen binding activity by *Staphylococcus aureus* involves cessation of transcription, shedding and cleavage by metalloprotease. *J Biol Chem.* 276: 29969–29978.
50. McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ. 1994. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 11:237-48.
51. McGavin MH, Krajewska PD, Rydén C, Höök M. 1993. Identification of *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. *Infect Immun.* 61:2479-2485.
52. McGavin MJ, Zahradka C, Rice K, Scott JE. 1997. Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. *Infect Immun.* 65:2621–2628.
53. Mecham, RP y Davis EC. 1994. Extracellular matrix assembly and structure. En: Yurchenco PD, Birk DE, Mecham RP, eds. Academic Press, Inc., San Diego. 281–314.
54. Méndez DA, Méndez-Bueno JF, Tapia YT, Muñoz MA, Aguilar SL. 2010. La enfermedad renal en personas con Diabetes. *Dial Traspl.* 31:7-11
55. Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, François P, Vaudaux P. 1995. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun.* 63: 4738–4743.
56. Nashev D, Toshkova K, Salasia S, Hassan A, Lämmler C, Zschöck M. 2004. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiology Letters.* 233: 45–52
57. Ní Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Höök M, Foster TJ. 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 30:245-57.

58. Niraj PEG, Qi W, Pyong KS, Konstantinos K, Ross JM. 2006. *Staphylococcus aureus* Adhesion via Spa, ClfA, and SdrCDE to Immobilized Platelets Demonstrates Shear-Dependent Behavior. *Arterioscler Thromb Vasc Biology*. American Heart Association. 26:2394-2400
59. O'Brien LM, Walsh EJ, Massey RC, Peacock SJ, Foster TJ. 2002. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cel Microbiol*. 4:759–770.
60. Olander F. 2008. The extracellular fibrinogen-binding protein (Efb) from *S. aureus* binds divalently to fibrinogen and gives rise to a specific antibody response. Mälardalen University.
61. Palma M, Haggar A, Flock JI. 1999. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J. Bacteriol*. 181:2840–2845.
62. Passador L, Iglewski. 1995. Quorum sensing and virulence generegulation in *Pseudomonas aeruginosa*, En: J. A. Roth, C. A. Bolin, K. A. Brogden, F. C. Minion, and M. J. Wannemuehler (ed.). *Virulencemechanisms of microbial pathogens*. ASM Press, Washington, D.C.p. 65–78.
63. Patti JM, Bremell T, Krajewska-Pietrasik D, Abdelnour A, Tarkowski A, Ryde!n C, Höök M. 1994. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun*. 62:152–161.
64. Poole CV, Carlton D, Bimbo L, Allon M. 2004. Treatment of catheter-related bacteremia with an antibiotic lock protocol: effect of bacterial pathogen. *Nephrol Dial Transplant*. 19:1237-1244.
65. Projan SJ, Novick RP. 1997. The molecular basis of pathogenicity. En: Crossley KB, Archer GL, eds. *The Staphylococci in human disease*. Nueva York: Churchill Livingstone. 1997:55-81.
66. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day PJN. 2002. Virulent Combinations of Adhesin and Toxin Genes in Natural Populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 70: 4987–4996.
67. Roche F, Meehan M, Foster TJ. 2003. The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiol*. 149:2759 –2767.
68. Rydén C, Maxe I, Franzen A, Ljungh A, Heinegård D, Rubin K. 1987. Selective binding of bone matrix sialoprotein to *Staphylococcus aureus* in osteomyelitis. *Lancet*. 2: 515.

69. Rydén C, Yacoub AI, Maxe I, Heinegård D, Oldberg A, Franzén A, Ljungh A, Rubin K. 1989. Specific binding of bone sialoprotein to *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis. *Eur J Biochem.* 184:331–336.
70. Sabat A, Melles DC, Martirosian G, Grundmann H, van Belkum A y Hryniewicz W. 2006. Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding *sdr* genes among nasal carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* 44:1135–1138
71. Salazar HH, Mireles HMC, Moreno DMR, Martínez BLE. 2002. Infecciones nosocomiales en un hospital de segundo nivel. *Rev Med IMSS.* 40:43-51.
72. Sesso R, Dribe S, Castelo A, Sato I, Leme I, Bardosa D y Ramos O. 1998. *Staphylococcus aureus* skin carriage and development of peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin. Nephrol.* 31:264-268.
73. Shannon O, Flock JI. 2004. Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* binds to platelets and inhibits platelet aggregation. *Thromb Haemost.* 91:779-89.
74. Shore AC, Rossney SA, O'Connell B, Herra MC, Sullivan JD, Humphreys H, Coleman CD. 2008. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec-associated DNA segments in multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and identification of *Staphylococcus epidermidis* *ccrAB4* in both methicillin-resistant *S. aureus* and MSSA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:4407–4419.
75. Sitkiewicz I, Babiak I, Hryniewicz W. 2011. Characterization of transcription within *sdr* region of *Staphylococcus aureus*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 99:409–416
76. Stolić R, Trajković G, Perić V, Jovanovic A, Stolić D, Sovtić S, Lazarević T, Živić Ž, Šubarić G. 2008. Central venous catheters in hemodialysis: to accept recommendations or to stick to own experience. *Voj Pregl.* 65: 21–26.
77. Toshkova K, Annemüller C, Akineden Ö y Lämmle Ch. 2001. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections. *FEMS Microbiology Letters.* 202: 17- 24.
78. Trujillo-Gutierrez JJ, Méndez-Gaona JA, Sierra-Palomino R de la Cruz. 1999. Diagnóstico situacional de las afecciones de vías urinarias en la población derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Comunitaria.* 3 :enero-abril.
79. Tulloch LG. 1954. Nasal carriage in staphylococcal skin infections. *Br Med J.* 2:912-913.

80. Tung H, Guss B, Hellman U, Persson L, Rubin K, Rydén C. 2000. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdrfamily. *Biochem J.* 345:611–619
81. Vardhan A, Davies J, Daryanani I, Crowe A, McClelland P. 2002. Treatment of haemodialysis catheter-related infections. *Nephrol Dial Transplant.* 17:1149–1150
82. Vaudaux PE, Francois P, Proctor RA, McDevitt D, Foster TJ, Albrecht RM, Lew DP, Wabers H, Cooper SL. 1995. Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. *Infect. Immun.* 63:585-590.
83. Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Pública Méx.* 47:381-7.
84. Velázquez-Meza ME, Ayala-Gaytán J, Carnalla-Barajas MN, Soto-Noguerón A, Guajardo-Lara CE, Echaniz-Aviles G. 2011. First Report of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (USA300) in Mexico. *Journal of clinical microbiology.* 3099–3100
85. Veldkamp KE, Heezius HC, Verhoef J, van Strijp JA, van Kessel KP. 2000. Modulation of neutrophil chemokine receptors by *Staphylococcus aureus* supernate. *Infect. Immun.* 68:5908–5913.
86. van Wamel WJ, Rooijackers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. 2006. The innate immune modulators staphylococcal complementinhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on -hemolysin-converting bacteriophages. *J. Bacteriol.* 188:1310–1315.
87. Wielders CL, Vriens MR, Brisse S, de Graaf-Miltenburg LA, Troelstra A, Fleer A, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. 2001. *In-vivo* transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 357:1674–1675.
88. Weinstein HJ. 1959. The relationship between the nasal staphylococcal carrier state and the incidence of post-operative complications. *N Engl J Med.* 260:1303-1308.
89. Williams RE. 1963. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev.* 27: 56-71.
90. Yacoub A, Lindahl P, Rubin K, Wendel M, Heinegård D, Rydén C. 1994. Purification of a bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem.* 222:919-25.

91. Yu VL, Goetz A, Wagener M, Smith PB, Rihs JD, Hanchett J, Zuravle JJ.1986. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. N Engl J Med. 315: 91-96.