



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



EXPRESION DE GENES QUE CODIFICAN ADHESINAS EN CEPAS DE *S. aureus* UTILIZANDO UN MODELO *IN VITRO* DE EPITELIO ORAL.

TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

PRESENTA:
Luis Javier Machorro Arvizu

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Eric Monroy Pérez

Los Reyes Iztacala, Edo. De México Mayo 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

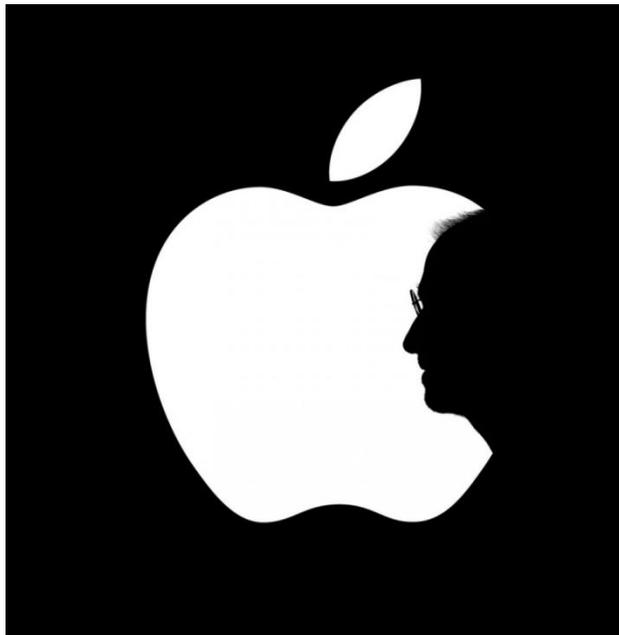
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

**Ser el más rico del cementerio no es lo que me importa,
acostarme por las noches pensando que he hecho algo genial...**

eso es lo que más me importa.

-Steve Jobs.



AGRADECIMIENTOS

Tengo el gran honor de haber realizado mi trabajo de tesis en uno de los mejores laboratorios de la FES Iztacala, fue hermoso e histórico el capturar la esencia de la biología molecular a lo cual lo encontré fascinante. Esto es en gran parte al apoyo, consejos y dedicación hacia mí por parte del Dr. Eric Monroy Pérez y en especial a la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras quien fue la que me acepto en este estupendo trabajo de tesis, muchas gracias profesores.

Esto que he logrado ha sido también al apoyo de mis amigos que nunca me dejaron caer, gracias Juan Manuel (Medico Cirujano), Carlos Alberto (Psicólogo), Yeyetzi Aragón (Cirujano Dentista), Sebastián Muratalla (Biólogo) y Jonathan Padilla (Licenciado en Ciencias Genómicas). A mis compañeros de laboratorio Cinthya Herrera, Ángel Caballero y en especial a mi hermano Luis Monroy. A mis amigos con los cuales inicié, disfruté y gocé una de las mejores etapas de mi vida, la universidad, quienes son Nancy Carmona Díaz, Chantal Gleasson, Luis Luna, Melania Salazar, Alma Martínez, Mariela Gómez, Estela Choncohua, Andrea Balderas y Manuel (Rasta).

En especial quiero agradecer a tres grandes personas y amigos que he tenido desde muy pequeño, a mi papá, Marcos Machorro, a mi hermano, Carlos Machorro y por supuesto a mi mamá Bertha Arvizu que aun que te marchaste muy rápido de mi vida marcaste diferencia en mí, sin ustedes mi vida sería muy distinta a la de hoy en día, gracias con todo corazón, así como también quiero agradecer a una amiga casi hermana, quien me ha aconsejado en muchas ocasiones, gracias Yarentzy.

Por último quiero agradecer a la mejor universidad que pueda existir, gracias Universidad Nacional Autónoma de México, ¡te amo!

ÍNDICE

Introducción	7
Características generales de <i>Staphylococcus aureus</i>	8
Factores de virulencia.....	8
Contaminación por <i>Staphylococcus aureus</i> en catéteres de hemodiálisis.....	8
Antecedentes	14
Objetivo general	15
Objetivo particular	15
Material y métodos	16
Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Extracción de DNA de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> por PCR.....	17
Infección <i>in vitro</i> del epitelio oral.....	18
Extracción y purificación de ARN para la PCR Tiempo Real.....	18
Reversotranscripción con eliminación de DNA genómico.....	19
Preparación de la Master Mix para la reversotranscripción.....	20
PCR Tiempo Real.....	21
Electroforesis de campos pulsados (PFGE).....	22
Resultados	24
Discusión	44
Análisis de pacientes con insuficiencia renal crónica.....	44
Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> por biología molecular.....	45
Determinación de la expresión de los genes que codifican adhesinas por PCR Tiempo Real de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Diferentes combinaciones de genes de <i>Staphylococcus aureus</i>	50
Patrones de PFGE- <i>Sma</i> I en cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de catéteres de pacientes de hemodiálisis.....	51

Conclusiones	53
Bibliografía	54

Resumen

La inserción de catéteres vasculares representa una alternativa para el tratamiento de la insuficiencia renal crónica (IRC), sin embargo esto puede representar un factor de riesgo para contraer bacteremias. *Staphylococcus aureus* posee una familia de genes que codifican adhesinas llamadas MSCRAMMs (Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), las cuales permiten la 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 neumonía.

Para el desarrollo de este estudio se analizaron 21 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infecciones en el sitio de infección del catéter, de los cuales el 62% (n=13) fueron hombres y el 38% (n=8) fueron mujeres con edades entre 17-77 años. La identificación de *Staphylococcus aureus* se realizó por PCR convencional mediante la detección de los genes *spa* (región X) y *rRNA*, además de ser positivas para la prueba de la coagula y del manitol. La expresión de los genes *spa*, *ebps*, *map/eap*, *bbp*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *sdrC*, *sdrD* y *sdrE* se realizó por PCR en Tiempo Real.

El 100% (n=21) de las cepas estudiadas correspondió a la especie de *S. aureus*. Los porcentajes de expresión de los genes en las cepas de *S. aureus* fueron: *bbp* (100%, n=21), *clfB* (100%, n=21), *cna* (100%, n=21), *sdrC* (100%, n=21), *sdrD* (95%, n=20), *map/eap* (90%, n=19), *ebps* (85%, n=18), *sdrE* (76%, n=16), *fnbA* (47%, n=10), *fnbB* (47%, n=10), *spa* (47%, n=10) y *clfA* (28%, n=6). Se encontraron 5 patrones diferentes de expresión de genes en las 21 cepas de *S. aureus* analizadas. El elevado porcentaje de expresión de los genes en las cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas evidenció que durante la infección del epitelio reconstituido humano podrían encontrarse asociados diferentes perfiles de expresión de los marcadores de adhesión celular, además de que los genes *sdrC*, *sdrD* y *sdrE*, de los cuales no se conoce alguna función específica fueron capaces de expresarse utilizando un modelo *in vitro* de infección de epitelio oral humano.

INTRODUCCIÓN

Características generales de *Staphylococcus aureus*

Los cocos se asociaron por primera vez a enfermedades humanas cuando fueron observados en materiales purulentos provenientes de abscesos humanos. En el año 1882, Ogston llamo a estos cocos "*Staphylococcus*", del griego staphylé (racimo de uvas) y kokkus (frutilla), debido a la morfología que adoptan las células de *Staphylococcus* en tinciones que se realizaron a partir de cultivos en medios de agar. *Staphylococcus* 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 de 0.5 a 1 μm de diámetro, no móvil, no forma esporas y generalmente no está capsulado. Es un anaerobio facultativo. Puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o racimos. *Staphylococcus aureus* crece favorablemente con altas concentraciones de NaCl, produce coagulasa, DNAasa, catalasa positiva y fermenta el manitol, lo que permite diferenciarlo del resto de especies del genero *Staphylococcus* (Bannerman, 2003). Crece entre rangos de pH de 4.8 a 9.4 y a temperaturas de 25 a 43°C. Sus colonias miden entre 1 a 3 mm, producen un color amarillento debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemolisis entre 24 a 36 horas (Velázquez-Meza, 2005).

Staphylococcus aureus posee múltiples factores de virulencia 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 alimento, produce el síndrome del shock tóxico al liberar súper antígenos en el torrente sanguíneo, causa septicemia, impétigo,

fiebre e infecciones asociadas a los catéteres de pacientes de hemodiálisis (Kanafani y Fowler, 2006).

Staphylococcus aureus puede identificarse por pruebas bioquímicas (manitol, coagulasa, catalasa), o mediante el empleo de pruebas de biología molecular como la detección por PCR usando marcadores cromosómicos *femA*, *femB* (participa en la síntesis del peptidoglucano) (Kbayashi *et al.*, 1994) y *nuc* (Nashev *et al.*, 2004).

Factores de virulencia

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 (Monday y Bohach, 1999). Los mecanismos patogénicos moleculares de diferentes infecciones estafilocócicas se conocen por completo, pero los estudios sugirieron que un factor crítico para el éxito patógeno de este organismo depende de su capacidad de adherirse eficazmente a los tejidos del huésped (Clarke y Foster, 2006; Patti *et al.*, 1994; Patti, 1994). En *S. aureus* la adherencia es mediada por una serie de adhesinas pertenecientes a la familia de las proteínas MSCRAMMs (Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) (Foster y Hook, 1998) (Tabla 1). Estas proteínas están en la mayoría de los casos unidos covalentemente al peptidoglucano de la pared celular. Entre ellas se encuentran la proteína A (Spa), que se une a fibronectina (Greene *et al.*, 1995); estas proteínas poseen una región LPXTG (Leu-Pro-any-Thr-Gly) (Figura 1) que es digerida por un enzima (sortasa) que corta el péptido entre los aminoácidos treonina (T) y glicina (G), a continuación el grupo carboxilo de la treonina se une covalentemente al grupo carboxilo del peptidoglucano, que en el caso de *S. aureus* es la secuencia de pentaglicinas.

Las proteínas tienen diferentes sitios de adherencia como la proteína A (Spa) y la proteína Cumpling factor (ClfA y ClfB), las cuales se unen a fibronectina (McDevitt *et al.*, 1994; Ni Eidhin *et al.*, 1998). La proteína Cna se une a colágeno (Patti *et al.*,

1992), la proteína EbpS está integrada a la membrana citoplasmática de *S. aureus* y podría también estar implicada en la adherencia a biomateriales recubiertos de elastina (Downer *et al.*, 2002; Park *et al.*, 1996). La proteína Bbp se une a la sialoproteína (Tung *et al.*, 2000), además se encuentran también las proteínas que son excretadas al medio como la proteína de adherencia extracelular (EAP) que pueden actuar como puente entre un ligando de la superficie y la bacteria favoreciendo la autoagregación de *S. aureus* y facilitando la formación de la biopelícula (Jonsson *et al.*, 1995; McGavin *et al.*, 1993; Palma *et al.*, 1999) y finalmente las proteínas SdrC, SdrD, y SdrE de las cuales se desconoce su función (Josefsson *et al.*, 1998).

Nombre de la proteína	Símbolo de la proteína	Símbolo del gen
<i>Staphylococcus aureus</i> protein A	Spa	<i>Spa</i>
Elastin-binding protein of <i>Staphylococcus aureus</i>	EbpS	<i>Ebps</i>
Extracellular adhesion protein	Map/Eap	<i>map/eap</i>
Sialoprotein-binding protein	Bbp	<i>Bbp</i>
Fibronectin-binding protein A	FnbA	<i>fnbA</i>
Fibronectin binding protein B	FnbA	<i>fnbB</i>
Clumping factor A	ClfA	<i>Clfa</i>
Clumping factor B	ClfB	<i>Clfb</i>
Collagen adhesin	Cna	<i>Cna</i>
Serine aspartate repeat protein C	SdrC	<i>sdrC</i>
Serine aspartate repeat protein D	SdrD	<i>sdrD</i>
Serine aspartate repeat protein E	SdrE	<i>sdrE</i>

Tabla 1. Genes que codifican adhesinas de *S. aureus*.



Figura 1. Esquema de la estructura de las proteínas MSCRAMMs.

Los factores de virulencia (Tabla 2) se clasifican en tres categorías: (a) factores involucrados en la adherencia de la célula huésped o matriz extracelular, proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; (b) factores involucrados en la evasión de las defensas del huésped (enterotoxinas estafilocócicas); factores involucrados en la invasión de la célula huésped y (c) penetración de los tejidos, α toxina, β y δ hemolisina (Projan, 1997).

Toxinas	Enzimas	Proteínas de superficie
Alfa hemolisina (<i>hla</i>)	Betalactamasas (<i>blaZ</i>)	Proteína de unión al hueso de sialoproteína
Beta hemolisina (<i>hlb</i>)	Coagulasa (<i>coa</i>)	clumping factor A (<i>clf A</i>)
Delta hemolisina (<i>hld</i>)	Fostatasa alcalina	clumping factor B (<i>clf B</i>)
Enterotoxina A (<i>sea</i>)	Lipasa (<i>lip</i>)	Proteína de unión a colágeno (<i>cna</i>)
Enterotoxina B (<i>seb</i>)	Fosfolipasa C (<i>plc</i>)	Fibrinógeno extracelular
Enterotoxina C (<i>sec</i>)	Proteasa serina V8 (<i>sspA</i>)	Proteína de unión a fibronectina A (<i>fnbA</i>)
Enterotoxina E-I (<i>entE-I</i>)	Enzima modificadora de ácidos grasos (<i>FAME</i>)	Proteína de unión a fibronectina B (<i>fnbB</i>)
Toxina exfoliativa A (<i>etaA</i>)	Metaloproteasa	Lectina
Toxina exfoliativa B (<i>etaB</i>)	Termonucleasa (<i>nuc</i>)	Proteína A (<i>spa</i>)
Gamma hemolisina (<i>hlgA-C</i>)	Estafilocinasa (<i>sak</i>)	Sdr A-D (<i>sdrA,B,C,D</i>)
Toxina del síndrome del shock toxico-1 (<i>tst</i>)	Hialuronato liasa (<i>hysA</i>)	Proteína de unión de vitronectina.

Tabla 2. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*.

Contaminación por *Staphylococcus aureus* en catéteres de hemodiálisis

La Insuficiencia Renal Crónica (IRC) se caracteriza por la pérdida lenta, progresiva e irreversible del filtrado glomerular. Generalmente es asintomática, hasta que el filtrado glomerular desciende por debajo de 10 ml/min. Entonces, suceden las complicaciones propias del síndrome urémico manifestándose mediante alteraciones como 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 es un problema de salud frecuente en la población, que genera un alto costo social y económico. Se estima que cada año ocurren alrededor de 35 mil casos en todo el sistema de salud (Trujillo-Gutiérrez, 1999). Las causas de IRC se pueden agrupar en Nefropatía diabética, Glomerulopatías, Hipertensión arterial, Nefropatía gotosa, Enfermedad renal poliquística, enfermedades sistémicas e Infección crónica de vías urinarias, siendo la diabetes Mellitus y la hipertensión arterial las dos causas más frecuentes que condicionan la insuficiencia renal crónica y considerando que actualmente el 30.8 % de la población mayor de 20 años tiene hipertensión y alrededor del 10% tiene diabetes Mellitus, hace de la IRC un gran problema de salud en México (Fundación Mexicana del Riñón, 2012).

México es uno de los países con mayor ocurrencia de diabetes Mellitus en el mundo, en 1995 ocupaba el noveno puesto 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, 2013).

Existen tres alternativas terapéuticas para el tratamiento de la insuficiencia renal que son: la diálisis peritoneal, la hemodiálisis y el trasplante renal, siendo la última la mejor opción terapéutica (Treviño, 2004). El trasplante renal es la mejor alternativa para el tratamiento de la IRC, sin embargo, no a todos los pacientes se les puede trasplantar, por lo que la inserción de catéteres vasculares es la opción más viable (Stolic *et al.*, 2008). Si bien la inserción de los catéteres vasculares representa una alternativa, también 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* metilina resistente (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* metilina resistente (MRSE), *Enterococcus* spp, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp y *Pseudomonas* spp (Poole *et al.*, 2004). La hemodiálisis es un procedimiento de sustitución renal extracorpóreo que consiste en extraer la sangre del organismo y pasarla a un dializador de doble compartimiento, uno por el cual pasa la sangre y otro el líquido de diálisis, separados por una membrana semipermeable para eliminar residuos en exceso (Daugirdas, 2003). En este procedimiento se utiliza un catéter tipo Mahurkar en la vena subclavia del paciente, el cual es frecuentemente contaminado por bacterias u hongos causando infección en el sitio de inserción (Aguilar *et al.*, 2004). La infección relacionada a catéteres constituye una de las principales complicaciones y la principal causa de bacteremia nosocomial, siendo *Staphylococcus aureus* la bacteria con mayor frecuencia contamina los catéteres de pacientes sometidos a hemodiálisis (Fica, 2003).

En México las estadísticas sobre bacteremias relacionadas a catéteres de pacientes con hemodiálisis a nivel nacional son escasas, sin embargo existen algunos reportes locales realizados por instituciones de salud (Salazar *et al.*, 2002). A diferencia de los que se reporta en nuestro país, en los Estados Unidos de Norte América anualmente se reportan entre 7,000 y 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 biopelícula en el interior de los túneles de los catéteres (Allon, 2004), Ésta biopelícula evade la respuesta inmune del hospedero y a los antibióticos (Croes *et al.*, 2009), representando un gran problema para el tratamiento de los pacientes de hemodiálisis infectados.

Los pacientes con hemodiálisis tienen un mayor riesgo de ser portadores intermitentes o persistentes de *S. aureus* desde el inicio de la diálisis (Wertheim *et al.*, 2005). Siendo los portadores de *S. aureus* en tratamiento de hemodiálisis

quienes tienen un aumento de 4 a 8 veces más riesgo de contraer infecciones vasculares así como también sufrir de bacteriemia en comparación con los no portadores (Yu *et al.*, 1986). Las cepas de *S. aureus* frecuentemente son las mismas que se recuperan de infecciones posteriores de los pacientes (Ena *et al.*, 1994). La mayoría de las infecciones por *S. aureus* en pacientes en hemodiálisis son consideradas por autoinfección (Boelaert *et al.*, 1995).

La incidencia de bacteremia, el índice de bacteremia (0.25 por paciente por año) y la prevalencia de portadores nasales de *S. aureus* pueden disminuir recibiendo adecuadamente el tratamiento de los portadores nasales de *S. aureus* o tratando profilácticamente a todos los pacientes dializados (portadores o no), pues el 80% de la población es potencialmente un portador nasal (Di Bernardo *et al.*, 2003).

La expresión de los factores de virulencia de *S. aureus* ha sido estudiada *in vivo* en modelos de infección en animales (Burian *et al.*, 2010; Montgomery *et al.*, 2008), sin embargo los factores celulares inmunes y las condiciones nutritivas han afectado la expresión de los determinantes de virulencia, por lo que en este estudio nosotros proponemos un nuevo modelo de infección *in vitro* en reconstituted human epithelium (RHE) para analizar los patrones de expresión de los genotipos de virulencia en cepas MRSA aisladas de infecciones asociadas a los catéteres de pacientes de hemodiálisis.

ANTECEDENTES

- Pattel y colaboradores en 1987 realizaron estudios de cepas mutantes del gen *spa* de *S. aureus* en roedores (Murinae) con artritis séptica, demostrando que la proteína A es un importante factor de virulencia que tiene un efecto modesto en infecciones subcutáneas.
- Randall y colaboradores en el 2006 estudiaron el papel de las proteínas de superficie ClfB, SdrC y SdrD en la adhesión a células escamosas. Realizaron la expresión de estas proteínas mediante pruebas de mutantes individuales y combinados de cepas de *S. aureus* Newman. Encontraron que las proteínas SdrC y SdrD promueven la adhesión a células escamosas.
- Trad y colaboradores en el 2004 estudiaron las proteínas que codifican los genes *sdr* en cepas de *S. aureus* recolectadas de hisopos nasales de 259 pacientes asintomáticos de diferentes nosocomios y de 89 pacientes de pacientes con infecciones masivas como osteomielitis. Encontraron que por lo menos dos genes *sdr* están presentes en todas las cepas de *S. aureus*, además reportaron una mayor prevalencia del gen *sdrD* en las cepas de *S. aureus* responsables de las infecciones de hueso.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la expresión de los genes que codifican adhesinas en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de infecciones asociadas a los catéteres de pacientes de hemodiálisis utilizando un modelo *in vitro* de epitelio reconstituido humano (RHE)

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar la expresión de *spa*, *ebps*, *map/eap*, *bbp*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *sdrC*, *sdrD* y *sdrE* en las cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones asociadas a los catéteres de pacientes de hemodiálisis mediante PCR en Tiempo Real.
- Identificar los patrones de expresión de los genes que codifican adhesinas en las cepas de *S. aureus*.
- Comparar los patrones de restricción del ADN cromosómico de las cepas de *S. aureus* mediante electroforesis en campos pulsados (PFGE).

MATERIAL Y METODOS

Cepas de *Staphylococcus aureus*

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de la Salud Integral (CUSI), ubicada en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, (FESI), UNAM. Para el desarrollo de este estudio se seleccionó un grupo de 21 cepas de *S. aureus* previamente aisladas de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica que presentaron infección en el sitio de inserción del catéter tipo Mahurkar del servicio de Hemodiálisis del Hospital General Regional 72, IMSS.

Extracción de ADN de *S. aureus*

Las cepas bacterianas fueron crecidas en placas de agar S-110 por el método de estría cruzada y se incubaron a 37°C por 24 hrs. Posteriormente se tomó una colonia con un asa estéril y se depositó en un tubo de 13 x 100 con 2 ml de agua desionizada estéril. El inóculo se agitó por medio de un vortex por 30 segundos y se colocó a baño maría durante 20 minutos. Al término la muestra se colocó en hielo por 10 minutos y fue centrifugada a 14 000 rpm durante 10 minutos, se colectó el sobrenadante (ADN) y fue transferido a un tubo estéril, este se mantuvo a una temperatura de -20° hasta su uso.

Identificación de *S. aureus* por pruebas bioquímicas

A partir de los cultivos puros, y de acuerdo con los protocolos microbiológicos estándar, se tomaron 5 colonias y se les realizaron la tinción de Gram, la prueba de la catalasa, la prueba de la coagulasa en tubo y la prueba del Manitol (Bioxon, México). La cepa *S. aureus* ATCC 33592 fue utilizada como control positivo y la cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 como control negativo.

Extracción de DNA bacteriano

Las cepas bacterianas fueron crecidas en placas de agar S-110 por el método de estría cruzada y se incubaron a 37°C por 24 hrs. Posteriormente se tomaron varias

colonias por medio de un asa estéril y se depositaron en un tubo de 13 x 100 con 2 ml de agua desionizada estéril. El inóculo se agitó por medio de un vortex por 30 segundos y se colocó en baño maría durante 20 minutos. Al término, la muestra se colocó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante que contenía el ADN fue transferido a otro tubo estéril, y se guardó a -20° hasta su utilización.

Identificación de *Staphylococcus aureus* por PCR

Las cepas bacterianas de la especie *S. aureus* fueron identificadas por PCR mediante la detección de los marcadores cromosómicos *spa* y rRNA. Los oligonucleótidos utilizados fueron: *spa1* (CAAGCACCAAAGAGGAA), *spa2* (CACCAGGTTTTAACGACAT), rRNA1 (ACGGAGTTACAAAGGACGAC) y rRNA2 (AGCTCAGCCTTAACGAGTAC) (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), 20 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl (100 ng) de ADN molde. La amplificación del DNA se realizó en un Termociclador modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones para *spa*: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C. Para el gen rRNA las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 37 ciclos (desnaturalización a 94°C por 40 segundos, alineación a 64°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 75 segundos). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C. El tamaño de los amplicones para rRNA fue de 1250 pb y para *spa* el tamaño fue distinto, debido al polimorfismo del gen.

Infección *in vitro* del epitelio oral

Con un asa de siembra estéril se tomó una colonia de *S. aureus* crecida en S110 y se depositó en un tubo con 2 ml del medio de cultivo de caldo de soya Trypticaseína, se agitó en vortex por 30 segundos y se incubó a 37°C por 24 hrs. Las células del cultivo fueron colectadas por centrifugación a 2,000 rpm por 3 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 2 mL de PBS 0.1 M. Nuevamente se centrifugó a 2,000 rpm por 3 minutos y se decantó el sobrenadante, posteriormente a la pastilla se le agregaron 200 µL de PBS 0.1M, a partir de los cuales se tomaron 100 µL de la suspensión con PBS (2×10^7 células) y se depositaron en la superficie del epitelio. Posteriormente se incubó a 37°C x 48 horas, en 5% de CO₂ y humedad saturada. El medio de mantenimiento se cambió cada 24 horas de acuerdo a lo descrito por Schaller (Schaller, 2008). El epitelio oral humano (TR146) fue adquirido comercialmente en el laboratorio SkinEthic, Francia.

Extracción y purificación de ARN para la PCR en tiempo real.

La recolección bacteriana se realizó agregando 500 µl de PBS (0.1 mol) a la superficie del epitelio oral humano reconstituido (TR146), se raspó el epitelio con un asa de siembra y se recuperó la carga bacteriana con una micro pipeta de 100 µl. El volumen bacteriano fue depositado en tubos eppendorf de 2 mL.

El ARN total de *S. aureus* se extrajo mediante el empleo del Kit RNeasy (Qiagen, N° de catálogo 76506) con base a las instrucciones del fabricante para lo cual se empleo el equipo QIAcube^R, que incrementó la eficacia y el tiempo para la extracción de ARN. Para lo cual las bacterias colectadas se suspendieron en tubos eppendorf con una dilución de PBS (5×10^8 células). El tubo se centrifugó a 1300 rpm a 4°C por 5 minutos. El sobrenadante se decantó y se resuspendieron las células de *S. aureus* en 2 mL de buffer TE (10mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0 + 20 mg / ml de lisozima) y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente el tubo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos para la

formación del pellet y se decantó el sobrenadante. El tubo se incorporó al equipo QIAcube^R, el cual realizó lo siguiente: Primero se adicionaron 350 µL de buffer RLT (3000 µL de RLT + 30 µL de β-mercaptoetanol), se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugó por 2 minutos a 10,000 rpm. Al término se adicionaron 350 µL de etanol al 70% para homogeneizar el lisado, posteriormente se transfirieron 700 µL a una columna con una membrana contenida en un tubo eppendorf de 2 mL, ésta se centrifugo a 10 000 rpm por 15 segundos para lavar la membrana, el líquido de flujo se decantó. A continuación se adicionaron 700 µL de buffer RW1 a la columna y se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 segundos para lavar la membrana y el líquido de flujo fue decantado, se adicionaron posteriormente 500 µL de buffer RPE y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 segundos para lavar la membrana y el líquido de flujo fue decantado. Nuevamente se adicionaron 500 µL de buffer RPE y se centrifugó a 10,000 rpm por 2 minutos para lavar la membrana y el líquido de flujo fue decantado. Al terminó se colocaron la columna en un tubo colector nuevo de 2 mL, se centrifugaron a 10,000 rpm por 1 minuto. Reiteradamente se colocaron la columna en un tubo colector nuevo de 1.5 mL se adicionaron 50 µL de agua libre de RNAsas directamente sobre la membrana de la columna y se centrifugaron a 10,000 rpm por 1 minuto para obtener el ARN, el ARN obtenido se mantuvo a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

Reversotranscripción con eliminación de ADN genómico

Para realizar el proceso de la reversotranscripción de ARN a cDNA se utilizo el kit Quantitec Reverse Transcription (Qiagen; No. De catálogo 205311) siguiendo las instrucciones del fabricante como se indica:

Se descongelaron los componentes del equipo comercial a temperatura ambiente (15-25°C). Para un volumen final por reacción de 14 microlitros se depositó en un tubo eppendorf de 0.2 ml cada uno de los siguientes componentes (Tabla 3).

Componente	Volumen/reacción	Concentración final
gADN Wipeout buffer, 7x	2 microlitros	1x
ARN templado	1 microgramo	-
Agua libre de RNasa	11 microlitros	-
Volumen total	14 microlitros	-

Tabla 3. Componentes de reacción que se utilizaron para eliminar el ADN genómico.

Posteriormente se incubó el tubo a 42°C por 2 minutos e inmediatamente se colocó en hielo.

Preparación de la master mix para la reversotranscripción

La master mix contenía todos los componentes necesarios para la síntesis de la primera cadena de cDNA. Para un volumen final por reacción de 20 microlitros se depositó en un tubo eppendorf de 0.2 ml cada uno de los siguientes componentes (Tabla 4).

Componente	Volumen/reacción	Concentración final
Quantiscript Reverse Transcriptasa (contiene inhibidor de RNasas)	1 microlitro	
Quantiscript RT buffer, 5x (incluye MG ²⁺ y dNTPs)	4 microlitros	1x
RT Primer Mix	1 microlitro	-
ARN Templado (obtenido en la reacción anterior)	14 microlitros	-
Volumen total	20 microlitros	-

Tabla 4. Componentes de reacción utilizados para la reversotranscripción.

Al término se mezcló el tubo, se incubó en hielo y posteriormente se incubó a 42°C por 15 minutos. Al término se incubó a 95°C por 3 minutos para inactivar la transcriptasa reversa. Finalmente se guardó la reacción (cDNA) a -20°C hasta su utilización por PCR en Tiempo Real.

PCR en Tiempo Real

Para la expresión de los genes que codifican adhesinas en *S. aureus* por PCR tiempo real se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Campbell *et al.*, (2008; Cuadro 1), Para la preparación de la mezcla de PCR en tiempo Real se utilizó el kit PCR Rotor-Gene™ SYBER® Green I, de Qiagen® siguiendo las instrucciones del fabricante. Para un volumen final de reacción de 25 µl se depositaron en un tubo de 0.1 mL, las cantidades de la reacción que se muestran en la Tabla 5. Durante el desarrollo de la PCR en tiempo real los tubos con las mezclas de reacción se mantuvieron a 0°C al colocarlos en una gradilla metálica previamente enfriada.

Adhesina	Descripción del oligonucleótido	Secuencia
<i>bbp</i>	Forward	5'-TCAAAGAAAAAGCCAATGGCAAACG-3'
	Reverse	5'-ACCGTTGGCGTGTAACTGCTG-3'
<i>clfA</i>	Forward	5'-ATTGGCGTGGCTTCAGTGCTTG-3'
	Reverse	5'-GCTTGATTGAGTTGTTGCCGGTGT-3'
<i>clfB</i>	Forward	5'-TGGCGGCAAATTTTACAGTGACAGA-3'
	Reverse	5'-AGAAATGTTCCGCGCCATTTGGTTT-3'
<i>cna</i>	Forward	5'-TTCACAAGCTTGGTATCAAGAGCATGG-3'
	Reverse	5'-GAGTGCCTTCCCAAACCTTTTGAGC-3'
<i>ebps</i>	Forward	5'-GCAAGTAATAGTGCTTCTGCCGCTTCA-3'
	Reverse	5'-CATTTTCCGGTGAACCTGAACCGTAGT-3'
<i>fnbA</i>	Forward	5'-GCGGCCAAAATGAAGGTCAACA-3'
	Reverse	5'-TCTGGTGTGGCGGTGTTGGAG-3'
<i>fnbB</i>	Forward	5'-CAGAAGTACCAAGCGAGCCGGAAA-3'
	Reverse	5'-CGAACAAACATGCCGTTGTTTGTGA-3'
<i>map/eap</i>	Forward	5'-GCATGATAGAGGTATCGGGGAACGTG-3'
	Reverse	5'-TCCCTTGATCATTTGCCATTGCTG-3'
<i>sdrC</i>	Forward	5'-CGCATGGCAGTGAATACTGTTGCAGC-3'
	Reverse	5'-GAAGTATCAGGGGTGAACTATCCACAAATTG-3'
<i>sdrD</i>	Forward	5'-CCACTGGAATAAAGTTGAAGTTTCAACTGCC-3'
	Reverse	5'-CCTGATTTAACTTTGTCATCAACTGTAATTTGTG-3'
<i>sdrE</i>	Forward	5'-GCAGCAGCGCATGACGGTAAAG-3'
	Reverse	5'-GTCGCCACCGCCAGTGTCATTA-3'
<i>spa</i>	Forward	5'-CAAGCACCAAAGAGGAA-3'
	Reverse	5'-CACCAGTTTTAACGACAT-3'

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la PCR tiempo real.

Componente	Volumen/reacción	Concentración final
<i>Master Mix SYBER´Green I</i> (Dntp, <i>TaqADN</i> polimerasa, MgCl ₂ y el SYBR´Green I)	12.5 µL	1x
Primero <i>reverse</i>	1µL	1 µM
Primero <i>forward</i>	1µL	1 µM
DNAc	1µL	≤ 100 ng
Agua libre de RNasa	9.5µL	
Volumen final de reacción	25µL	

Tabla 5. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR en tiempo real.

Para la realización de la PCR en Tiempo Real se utilizó el equipo de Rotor-Gene™. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C durante 5 minutos (activación de la HotStart), 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 5 segundos y la combinación de alineación/extensión de 60°C por 10 segundos. Los resultados se analizaron con el software del equipo Gene™ 6000 (Corbett®).

Pasos	Tiempo	Temperatura	No. ciclos
Activación inicial PCR	5 minutos	95°C	1
Desnaturalización	5 segundos	95°C	40
Alineación/extensión	10 segundos	60°C	40
Melting	-	60°C	95

Tabla 6. Condiciones de PCR en Tiempo Real para la expresión de genes de *S. aureus*.

Electroforesis de campos pulsados PFGE

Las cepas bacterianas fueron sembradas en medio S-110 por el método de estría cruzada y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se tomó una colonia aislada y se inoculó por duplicado en un tubo con 5 ml de medio BHI, se incubaron toda la noche a 37°C. La concentración de bacterias se ajustó a una concentración de 3 en la escala de Mc Farland ó de 1.3 a 1.4 a 610 nm, 1 x 10⁹ bacterias /mL. Una vez crecidas las bacterias se tomó una muestra de 500 µL y se colocó en un

tubo eppendorff, se centrifugó a 13000 rpm durante 4 minutos, el sobrenadante fue retirado y se le adicionaron 500 µL de buffer PIV (10mM Tris base, 1 M NaCl, pH 7.6). La muestra se centrifugó durante 4 minutos a 13000 rpm (se verificó que el paquete celular tuviera un densidad aproximada de 2 mm de diámetro), nuevamente se le agregaron 150 µL de buffer PIV y se incubó a 50°C por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 150 µL de agarosa de bajo punto de fusión, mezclando el paquete celular perfectamente mediante un vortex. Los moldes para plug se llenaron con la mezcla anterior dejando un menisco, estos se refrigeraron por 15 minutos a 4°C y a continuación se depositaron en un tubo para micro centrifuga agregando 500 µL del buffer de Lisis celular [6mM Tris pH7.6, 100 mM EDTA, 51M NaCl, 5.0g. polyoxyethylene 20 cetyl ether] y se incubaron toda la noche Posteriormente se lavaron con buffer TE1X [TE 10X: 50mM Tris pH 7.6m 50 mM EDTA pH 7.5, dilución 1:10) y se adicionaron 500 µL de buffer ESP (398 mM EDTA, 34mM Sodium Lauroyl Sarcosine, 500 mg Proteinasa K). Finalmente se incubaron a 50°C toda la noche. Al término se lavaron con TE1X y se incubaron a 35°C por 30 minutos, este paso se repitió 5 veces (todos los plugs de reserva se mantuvieron con buffer TE1X), se estabilizó el plug con 300 µL de buffer J 10X [100 mM Tris-HCL, 70 mM MgCl₂, 500 mM KCL, 10 mM DTT (1-4 Dithiothreitol) pH 7.5, (dilución 1:10)] para cada muestra; la digestión se llevó a cabo con la enzima de restricción (*Sma*1) por 30 minutos a 37°C .

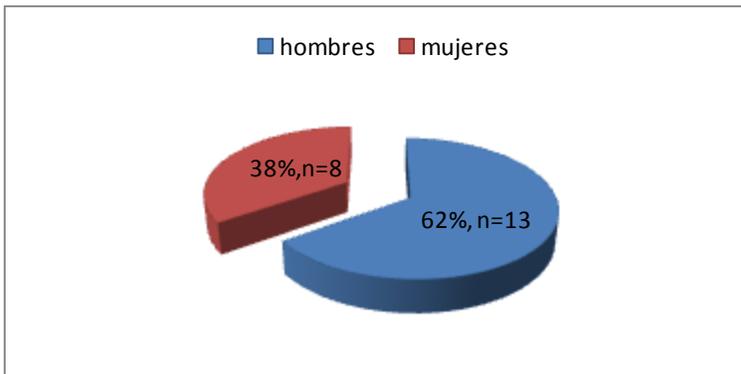
El gel se preparó con 1.1 g de agarosa para PFGE (Pulse Field Certified Agarose, Ultra Pure DNA Grade Agarosa, Bio-Rad) y 110mL de buffer TBE 5X. Se incorporaron los plugs a los pozos y se aplicó una capa de agarosa al 2% como sellador. El equipo se programó con un tiempo inicial de 2.2 segundos, un voltaje de 6V/cm a una temperatura de 14 °C y un tiempo final de 45 segundos, el tiempo de corrida fue de 21 horas, cuando las condiciones se ajustaron se colocó el gel en la cámara de PEGE para la corrida.

Al finalizar el gel se tiñó con Bromuro de Etidio por un tiempo de 20 a 30 minutos y posteriormente se observó en el sistema de fotodocumentación (Kodak) con luz ultra violeta. El análisis se realizó mediante los criterios de Tenover *et al.*(1995).

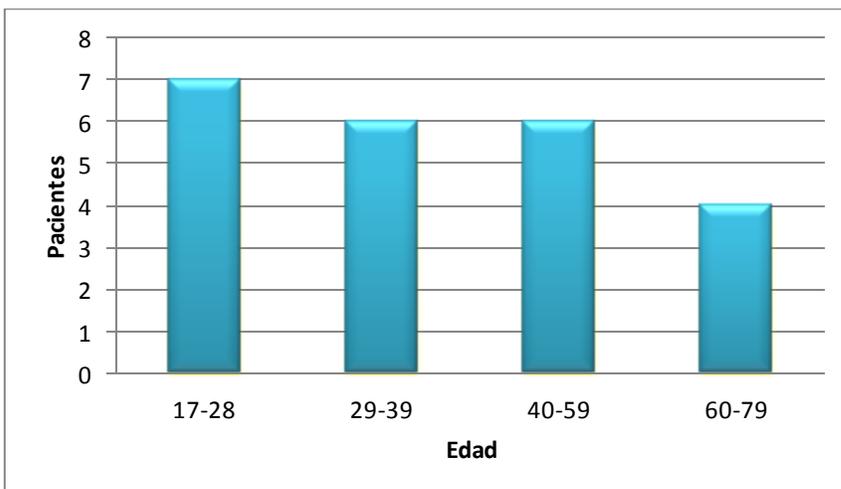
RESULTADOS

Pacientes estudiados

Se analizaron 21 cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones asociadas a catéteres de pacientes de hemodiálisis. El 62% (n=13) fueron hombres y el 38% (n=8) fueron mujeres (Gráfica 1). La edad de los pacientes de hemodiálisis se encontró situada entre un intervalo de 17 a 77 años (Gráfica 2). La frecuencia más alta se encontró en el intervalo de 17 a 28 años con un 33% (n=7), seguida por los siguientes intervalos de edad de 29 a 39 años con un 28% (n=6), de 40 a 59 años con un 28% (n=6). La frecuencia más baja se detectó en el intervalo de 60 a 79 años con un 9% (n=2).



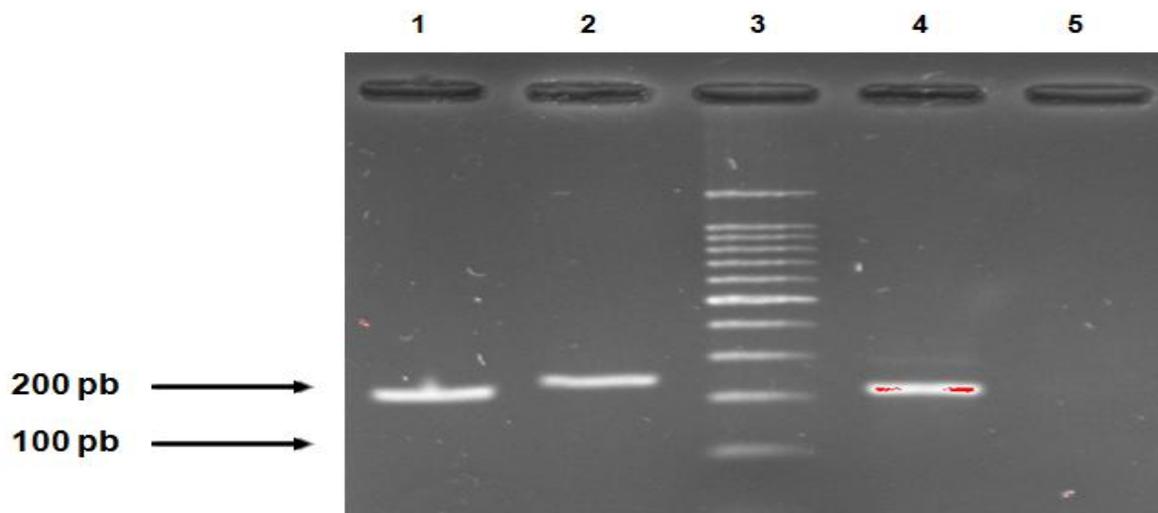
Gráfica 1. Distribución de los pacientes estudiados por sexo.



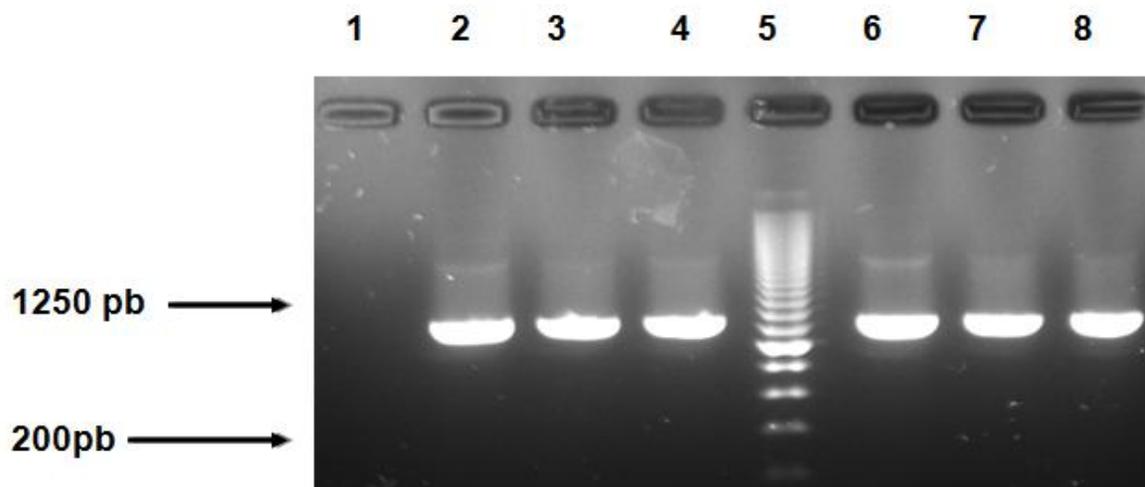
Gráfica 2. Edad de los pacientes estudiados.

Identificación de *Staphylococcus aureus* por PCR convencional

La identificación de *Staphylococcus aureus* mediante PCR convencional se realizó mediante la detección de los marcadores cromosómicos *spa* y rRNA (Fotografías 1-2). El 100% (n=21) de las cepas correspondió a la especie de *S. aureus*.



Fotografía 1. Detección por PCR convencional del gen *spa* en *S. aureus*. Carril 1-2, *spa* (amplicón de 200 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres de pacientes de hemodiálisis; Carril 3, MPM 100pb-ladder; Carril 4, Control positivo (*S. aureus* ATCC 25923); Carril 5, Control negativo (*S. epidermidis* ATCC 35984).



Fotografía 2. Detección por PCR convencional del gen rRNA en *S. aureus*. Carril 1, Control negativo (*S. epidermidis* ATCC 35894); Carril 2 Control positivo (*S. aureus* ATCC 25923); Carril 5, MPM 200pb-ladder; Carril 3, 4,6-8, rRNA (amplicón

de 1250 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres de pacientes de hemodiálisis.

Determinación de la expresión de los genes de adhesión por PCR en Tiempo Real en las cepas de *S. aureus*

El 100% (n= 21) de las cepas de *S. aureus* aisladas de los pacientes de hemodiálisis expresaron los genes *bbp* (n=21) (Tabla 7; Figura 2), *clfB* (n=21) (Tabla 7; Figura 3), *cna* (n=21) (Tabla 7; Figura 4) y *sdrC* (n=21) (Tabla 7; Figura 5). El gen *sdrD* se expresó en el 95% de las cepas (n=20) (Tabla 7; Figura 6), *map/eap* en el 90% (n=19) (Tabla 7; Figura 7), *ebps* en el 85% (n=18) (Tabla 7; Figura 8), *sdrE* en el 76% (n=16) (Tabla 7; Figura 9), los genes *fnbA*, *fnbB* y *spa* se expresaron en el 47% (n=10) de las cepas (Tabla 7; Figura 10, 11, 12) y *clfA* en el 28% de las cepas (n=6) (Tabla 7; Figura 13). Las curvas de fusión (Melting point) obtenidas durante las corridas de PCR en Tiempo Real utilizando SYBERGreen para *spa*, *ebps*, *map/eap*, *bbp*, *fnbA*, *fnbB*, *clfa*, *clfb*, *cna*, *sdrC*, *sdrD* y *sdrE* en las cepas de *S. aureus* se aprecian en las Figuras 14-25.

Gen	Expresión (%) No. (%)
<i>cna</i>	21 (100)
<i>bbp</i>	21 (100)
<i>sdrC</i>	21 (100)
<i>clfB</i>	21 (100)
<i>sdrD</i>	20 (95)
<i>map/eap</i>	19 (90)
<i>ebps</i>	18 (85)
<i>sdrE</i>	16 (76)
<i>fnbA</i>	10 (47)
<i>fnbB</i>	10 (47)
<i>spa</i>	10 (47)
<i>clfA</i>	6 (28)

Tabla 7. Expresión de los genes que codifican adhesinas en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres de pacientes con hemodiálisis.

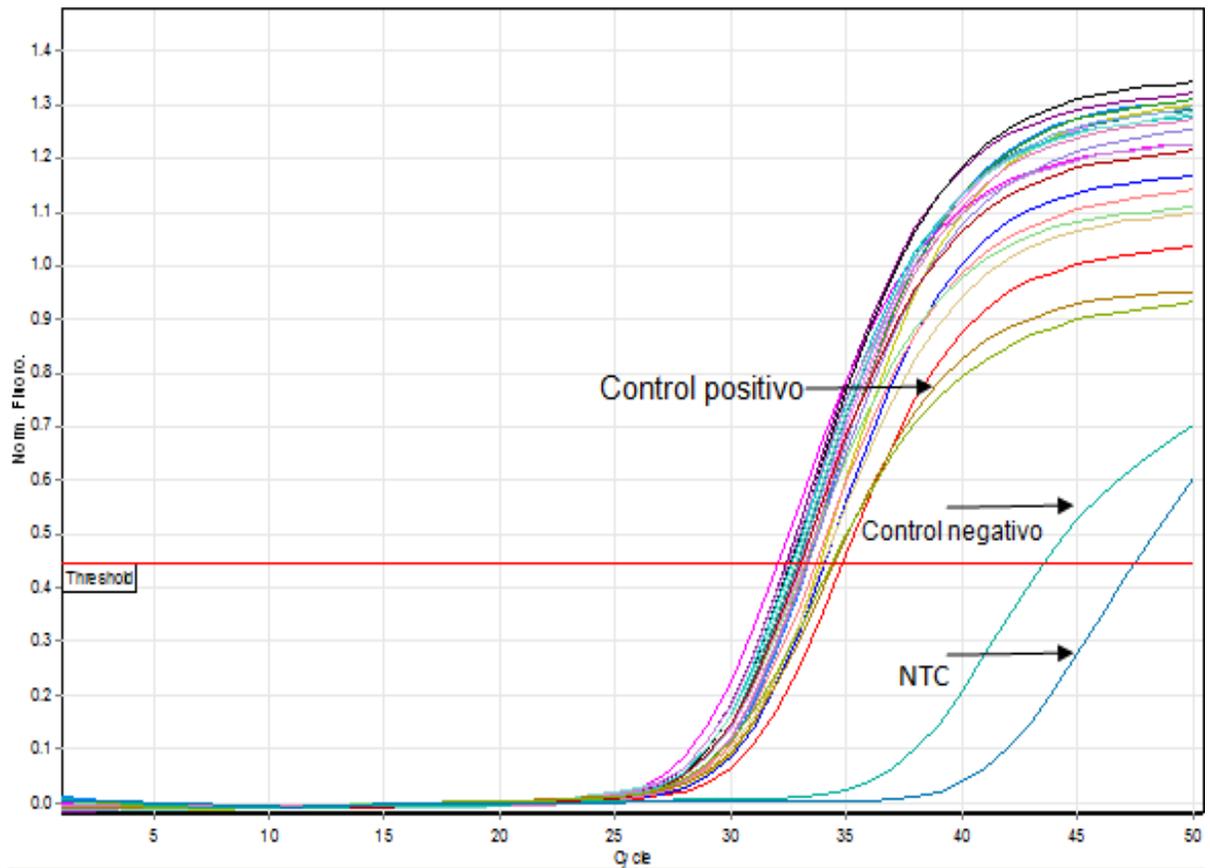


Figura 2. Detección de la expresión de *bbp* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBR®Green. La lectura se realizó en el canal verde. NTC= No Control Templado; Control positivo= *S. aureus* 25923; Control negativo= *S. epidermidis* ATCC 35984.

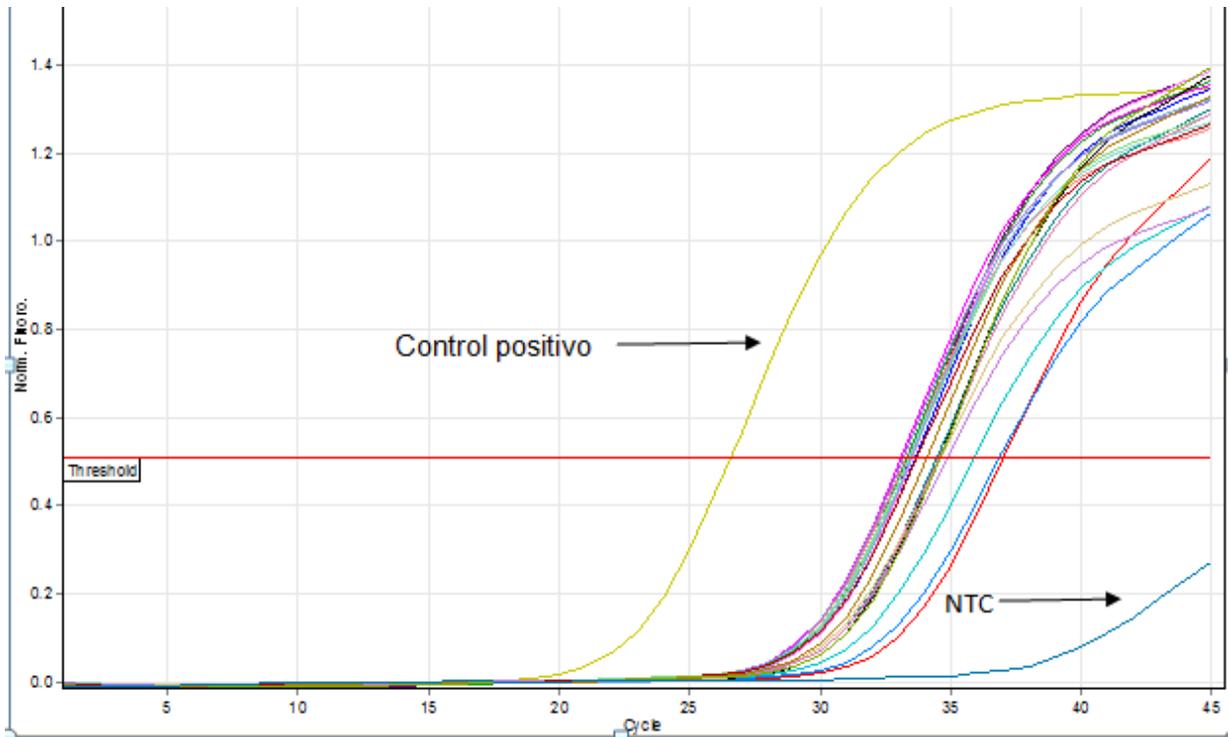


Figura 3. Detección de la expresión de *clfB* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real. Utilizando SYBR[®] Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC= No Control Templado; Control positivo= *S. aureus* 25923.

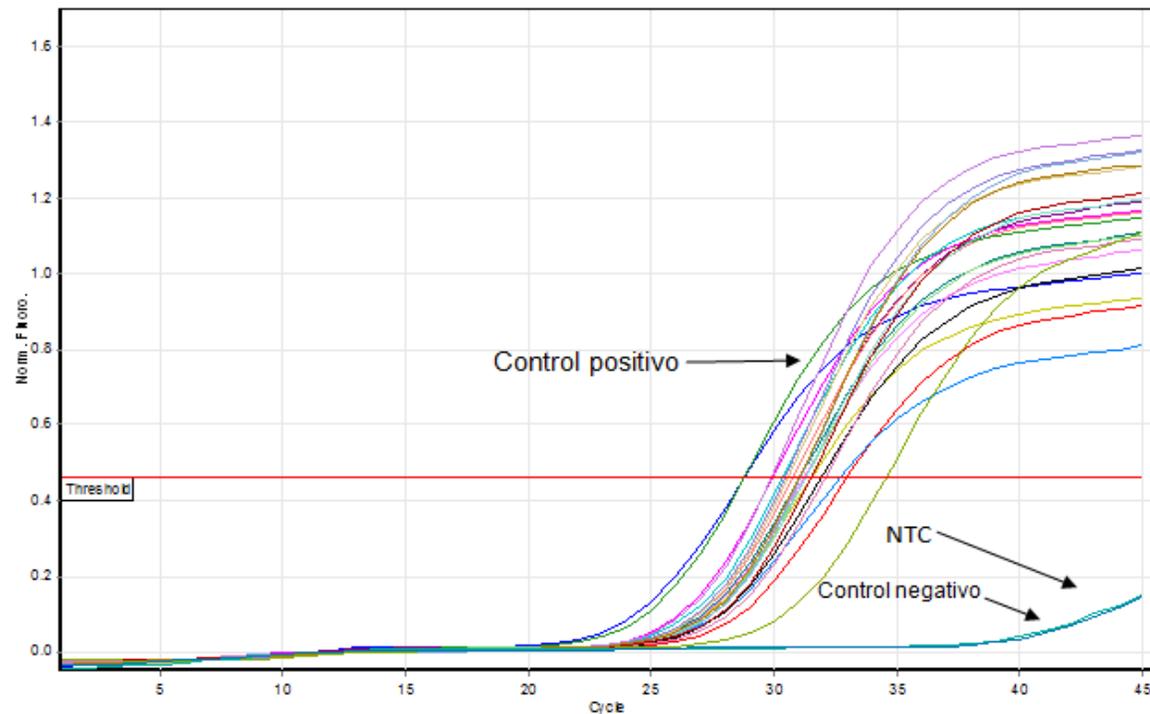


Figura 4. Detección de la expresión de *cna* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real. Utilizando SYBR® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC= No Control Templado; Control positivo= *S. aureus* 25923; Control negativo= *S. epidermidis* ATCC 35984.

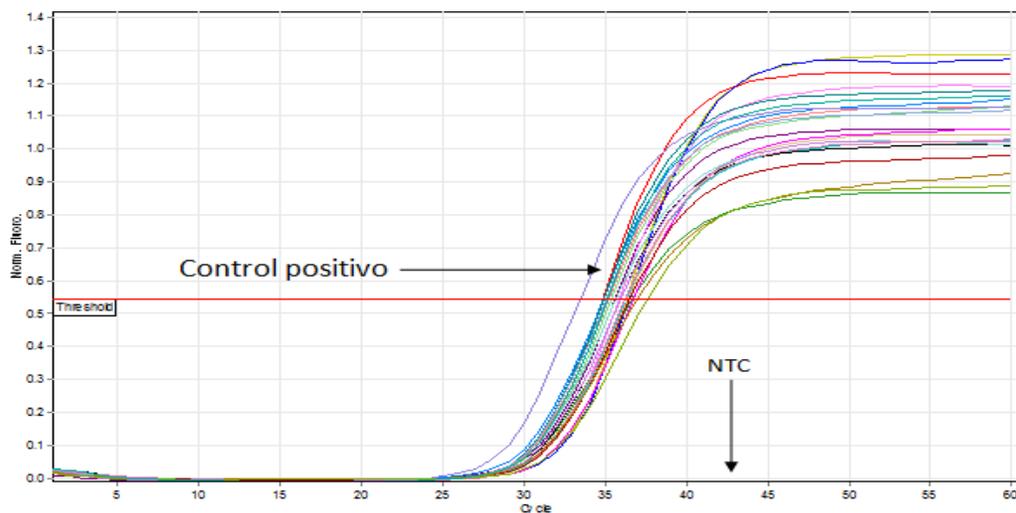


Figura 5. Detección de la expresión de *sdrC* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real. Utilizando SYBR® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo= *S. aureus* 25923.

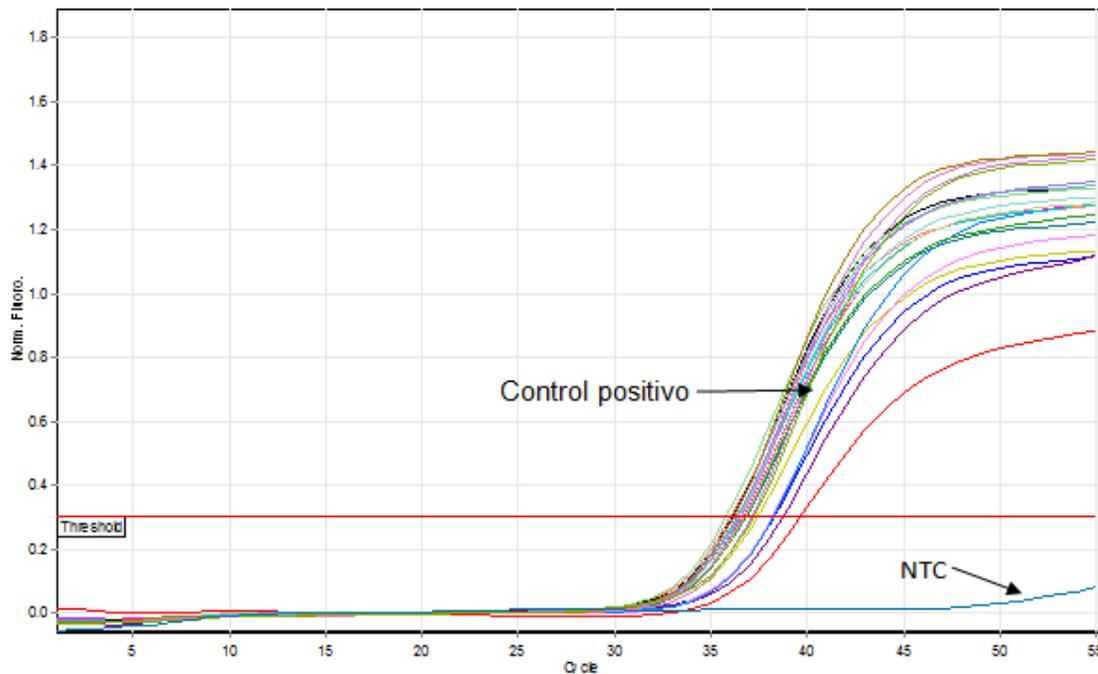


Figura 6. Detección de la expresión de *sdrD* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real. Utilizando SYBR® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC= No Control Templado; Control positivo= *S. aureus* 25923.

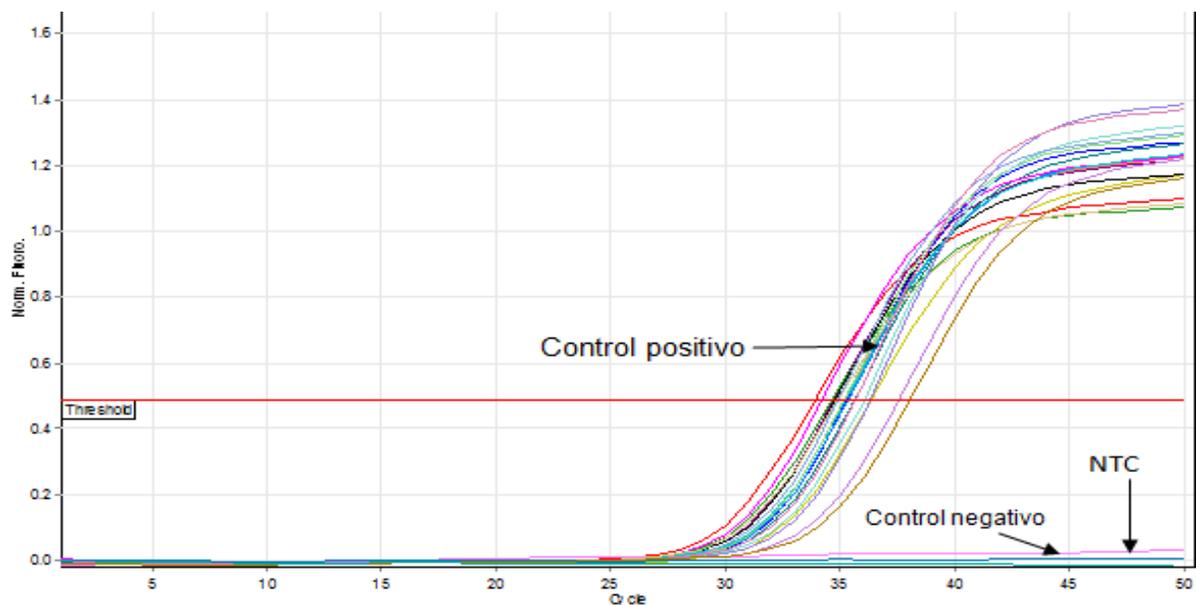


Figura 7. Detección de la expresión de *map/eap* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real. Utilizando SYBR® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC= No Control Templado; Control positivo= *S. aureus* 25923; Control negativo= *S. epidermidis* ATCC 35984.

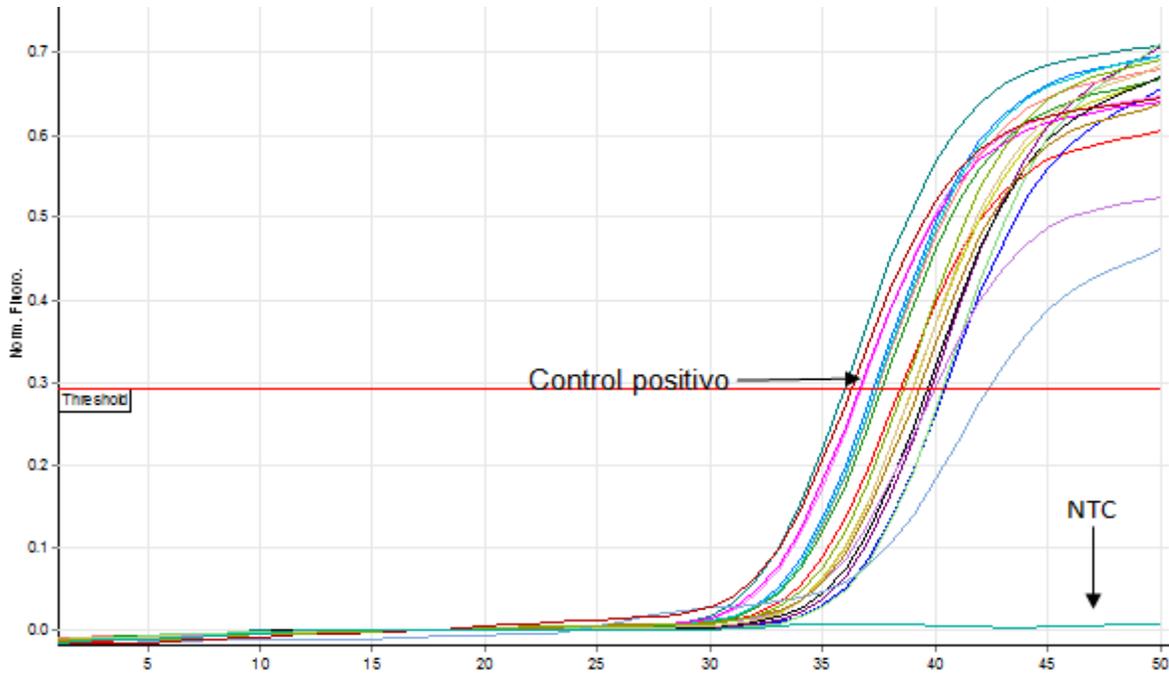


Figura 8. Detección de la expresión de *ebps* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBR® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC= No Control Templado; Control positivo= *S. aureus* 25923.

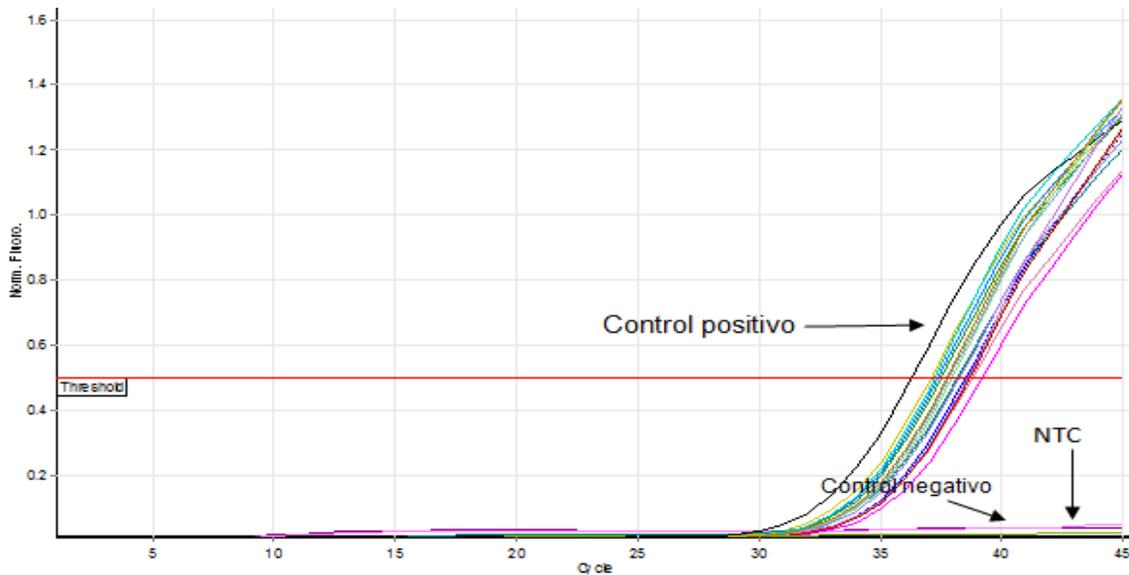


Figura 9. Detección de la expresión de *sdrE* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBR® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC=No Control Templado; Control positivo= *S. aureus* 25923; Control negativo= *S. epidermidis* ATCC 35984.

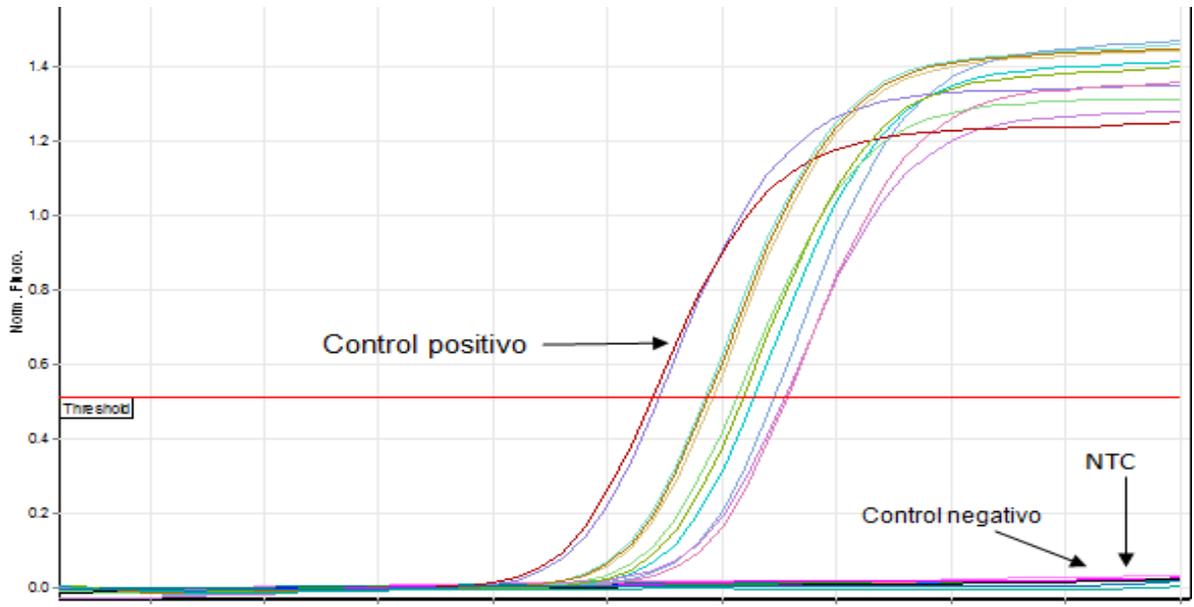


Figura 10. Detección de la expresión de *fnbA* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizado SYBR[®] Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC=No Control Templado; Control positivo= *S. aureus* 25923; Control negativo= *S. epidermidis* ATCC 35984.

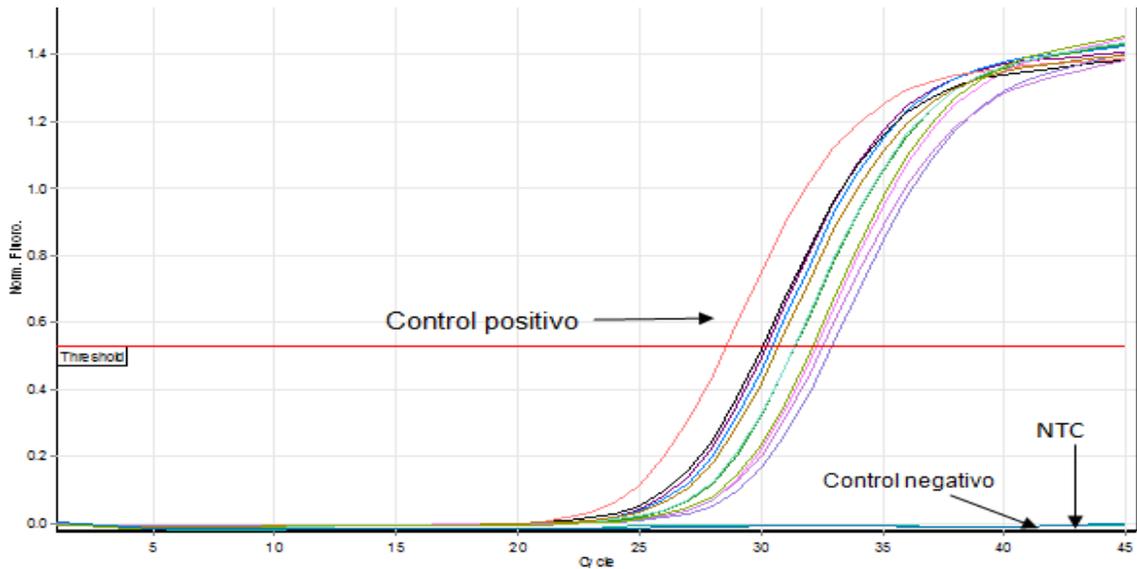


Figura 11. Detección de la expresión de *fnbB* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBR[®] Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC=No Control Templado; Control positivo= *S. aureus* 25923; Control negativo= *S. epidermidis* ATCC 35984.

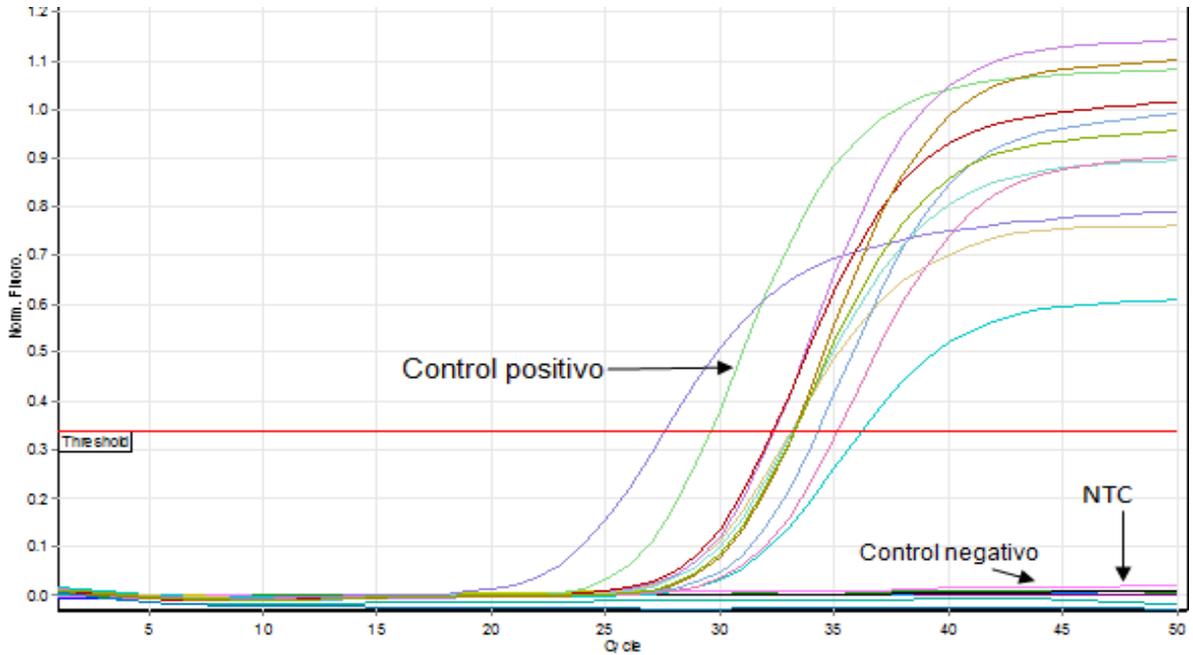


Figura 12. Detección de la expresión de *spa* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBR® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC= No Control Templado; Control positivo= *S. aureus* 25923; Control negativo= *S. epidermidis* ATCC 35984.

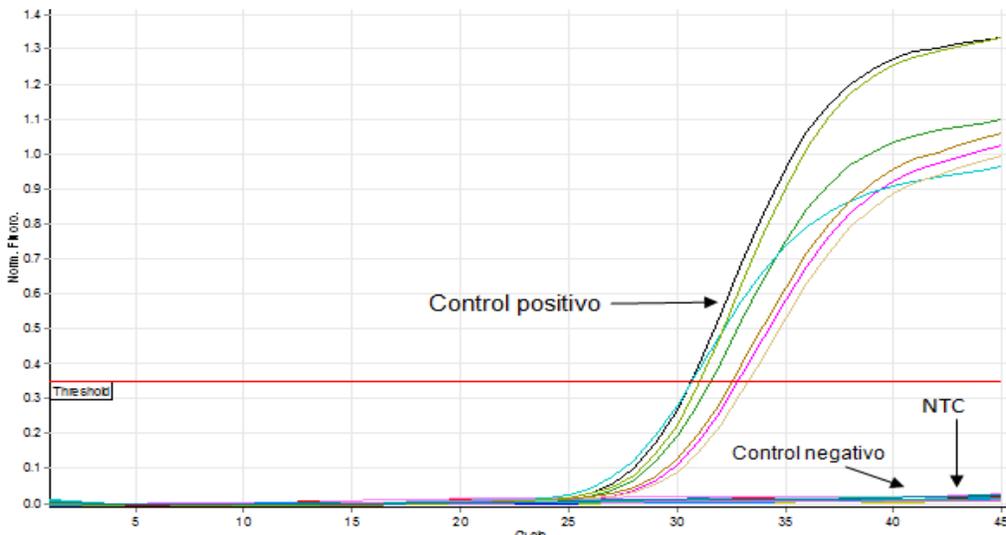


Figura 13. Detección de la expresión de *clfA* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBR® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC=No Control Templado; Control positivo= *S. aureus* 25923; Control negativo= *S. epidermidis* ATCC 35984.

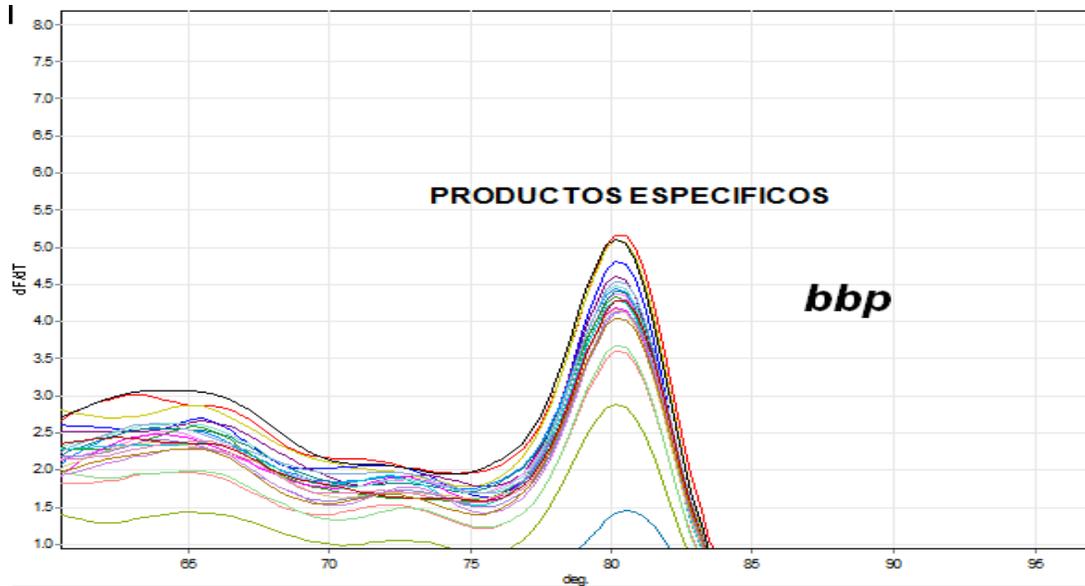


Figura 14. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *bbp*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos

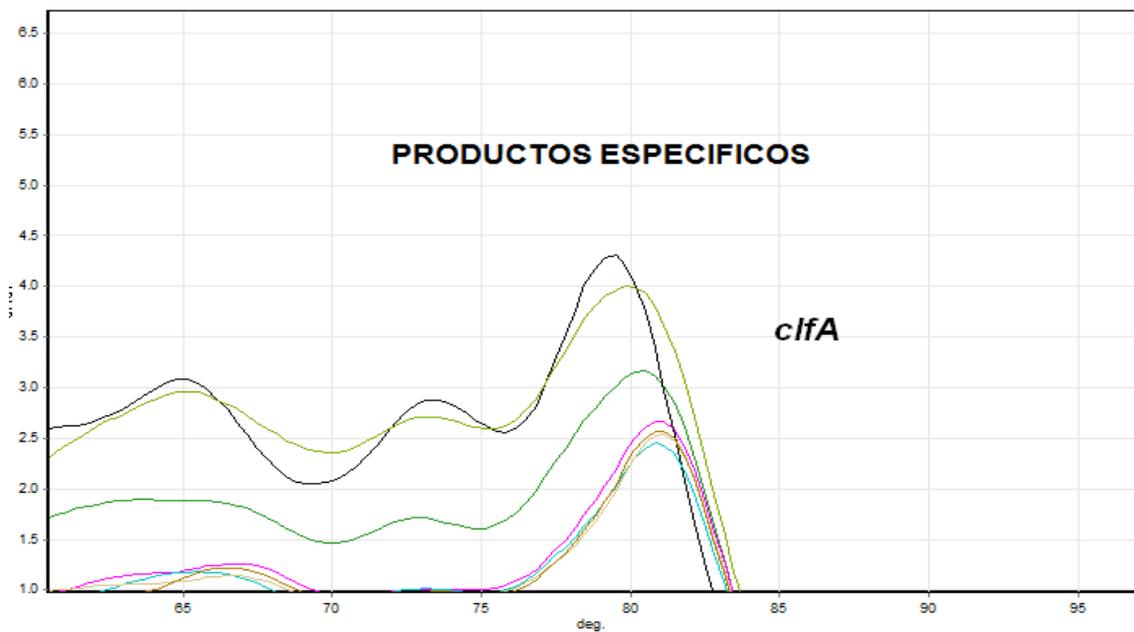


Figura 15. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *clfA*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos

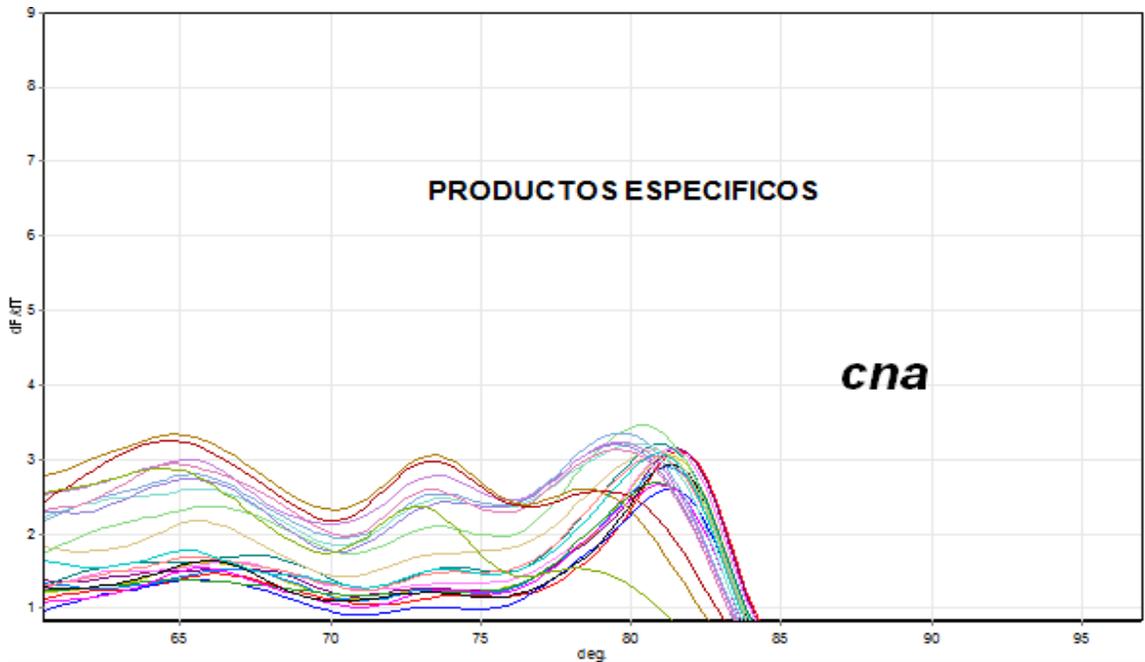


Figura 16. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *cna*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

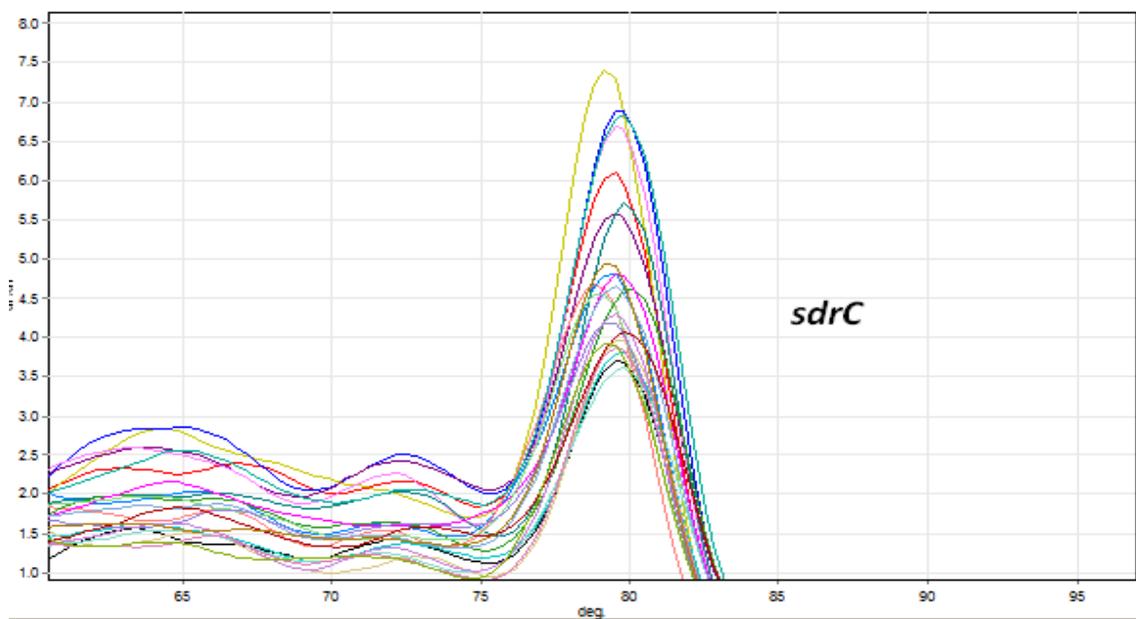


Figura 17. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *sdrC*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

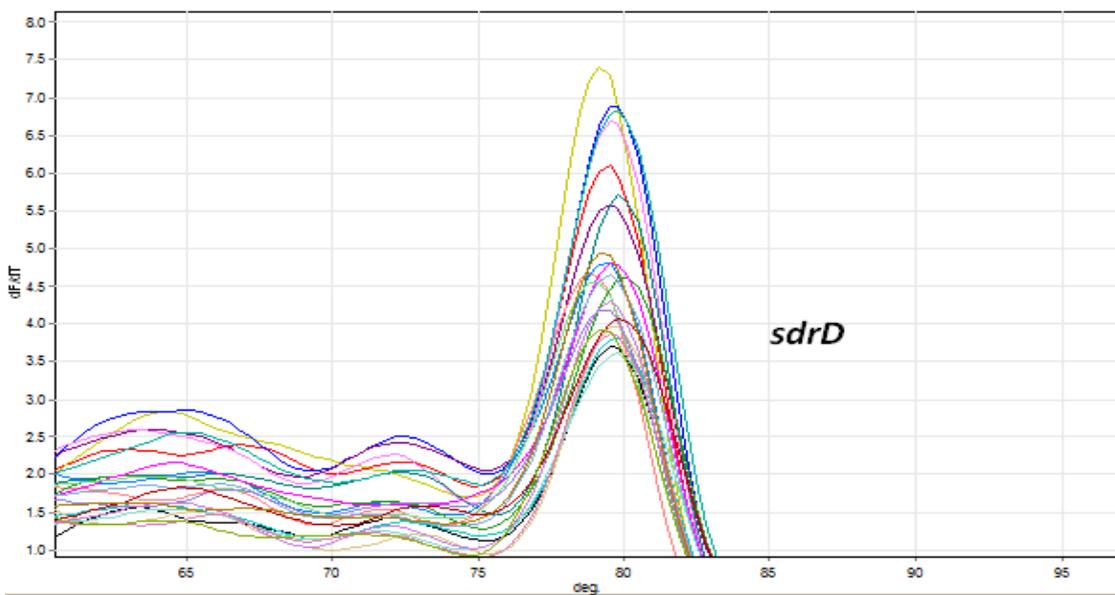


Figura 18. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *sdrD*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

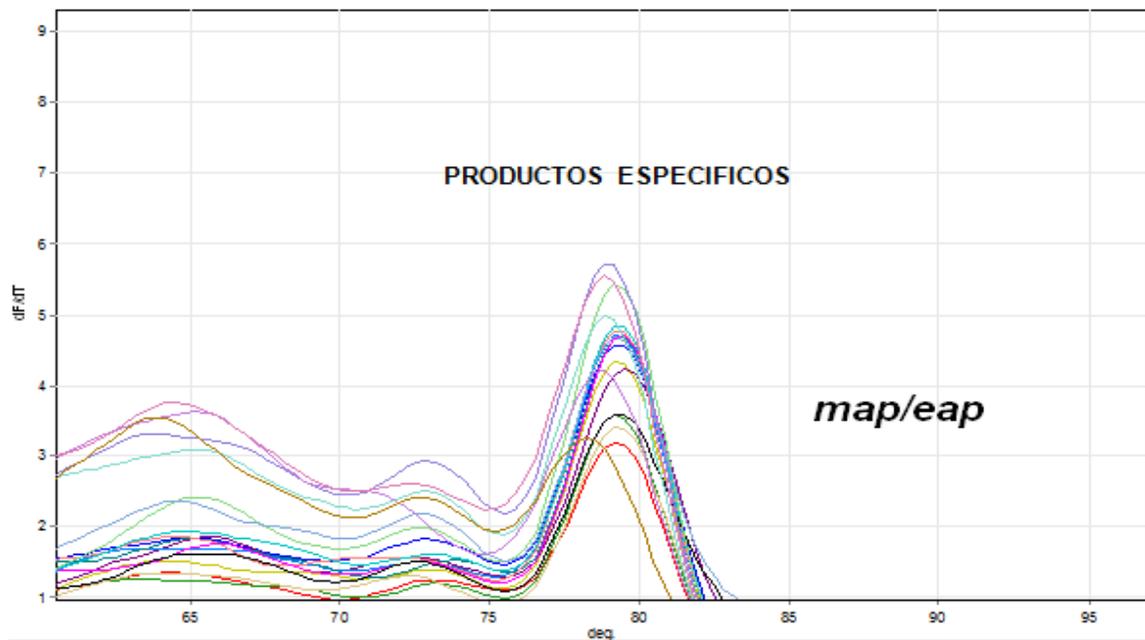


Figura 19. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *map/eap*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

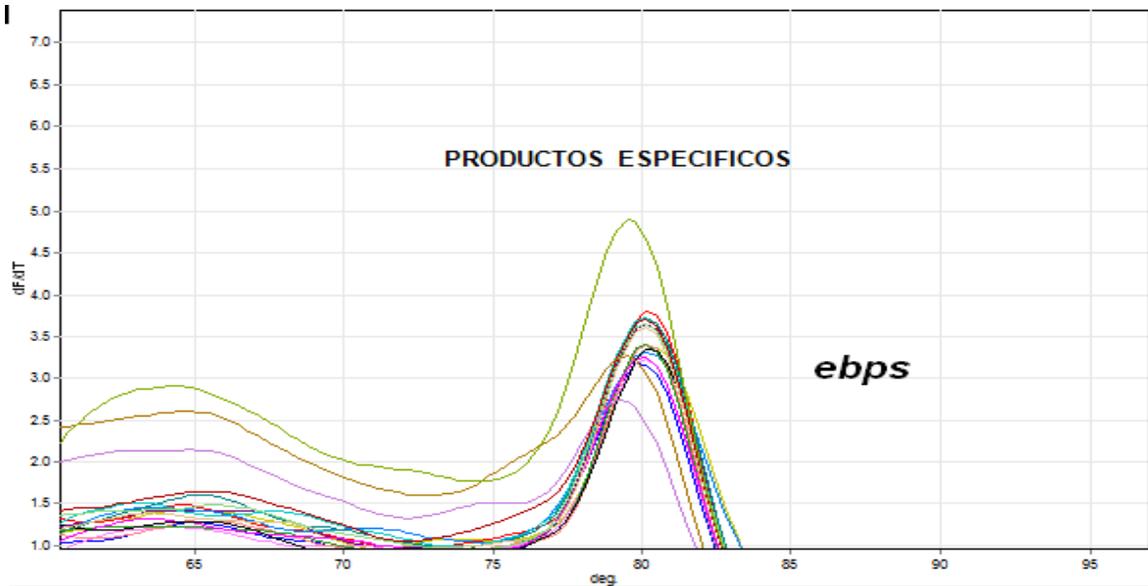


Figura 20. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *ebps*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

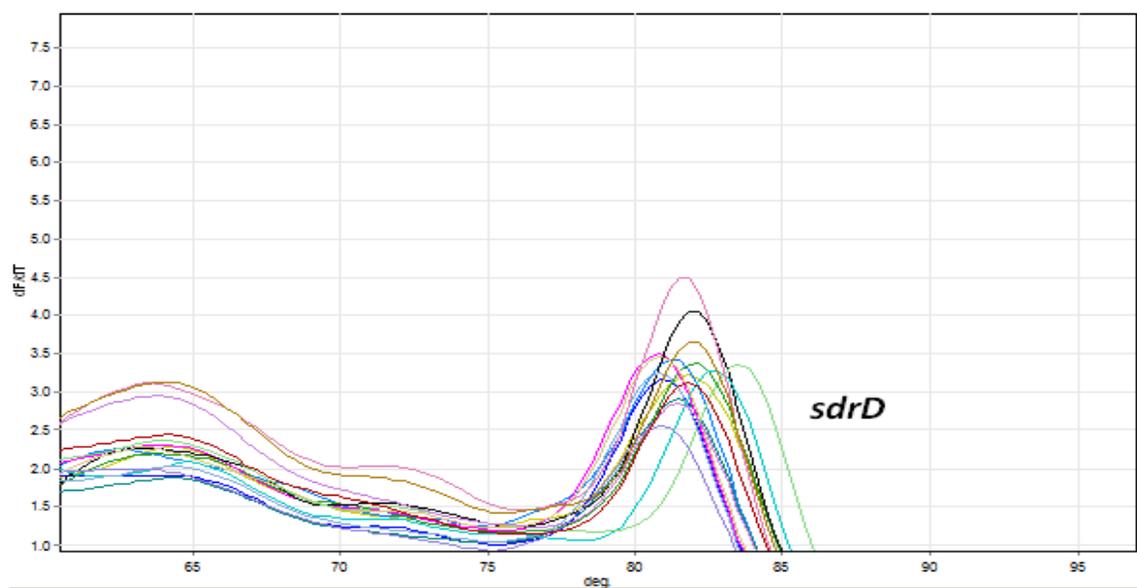


Figura 21. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *sdrE*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

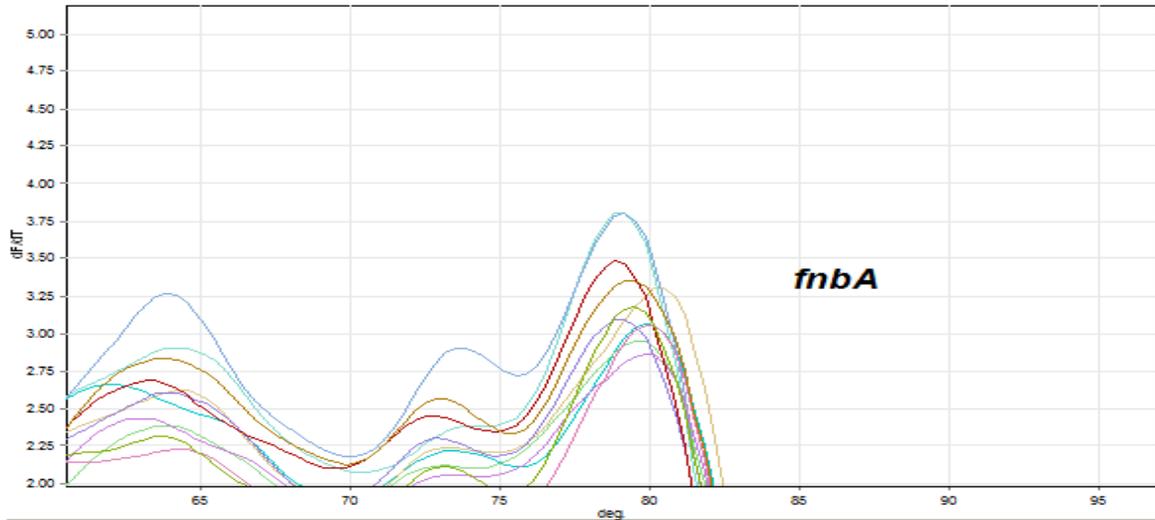


Figura 22. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *fnbA*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

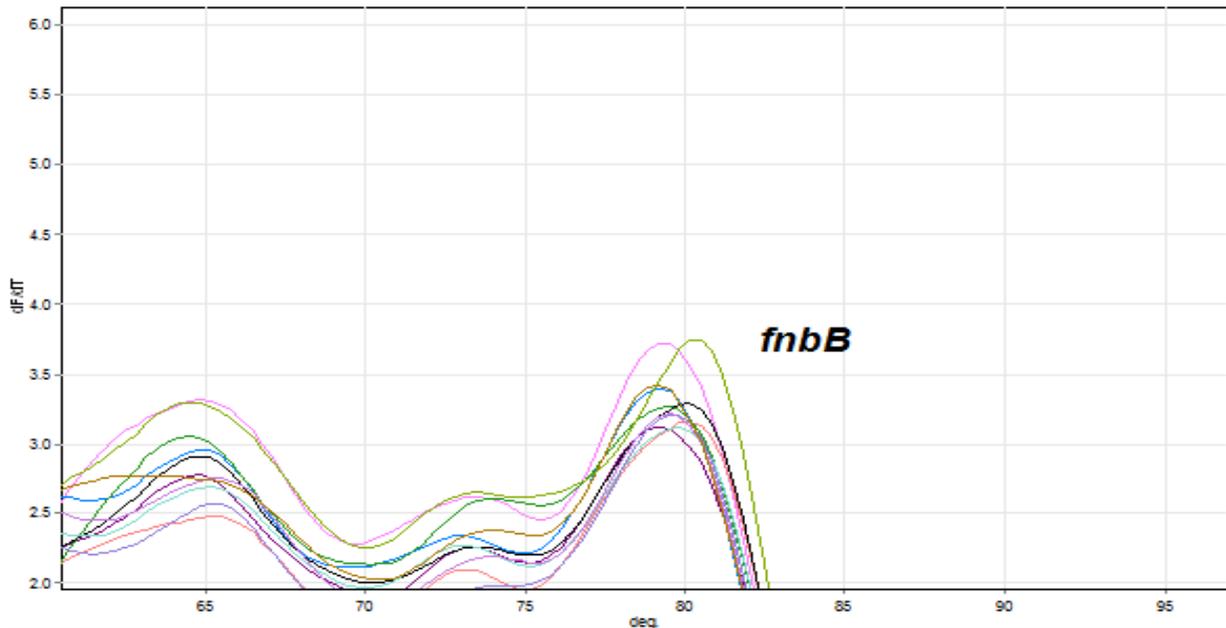


Figura 23. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *fnbB*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

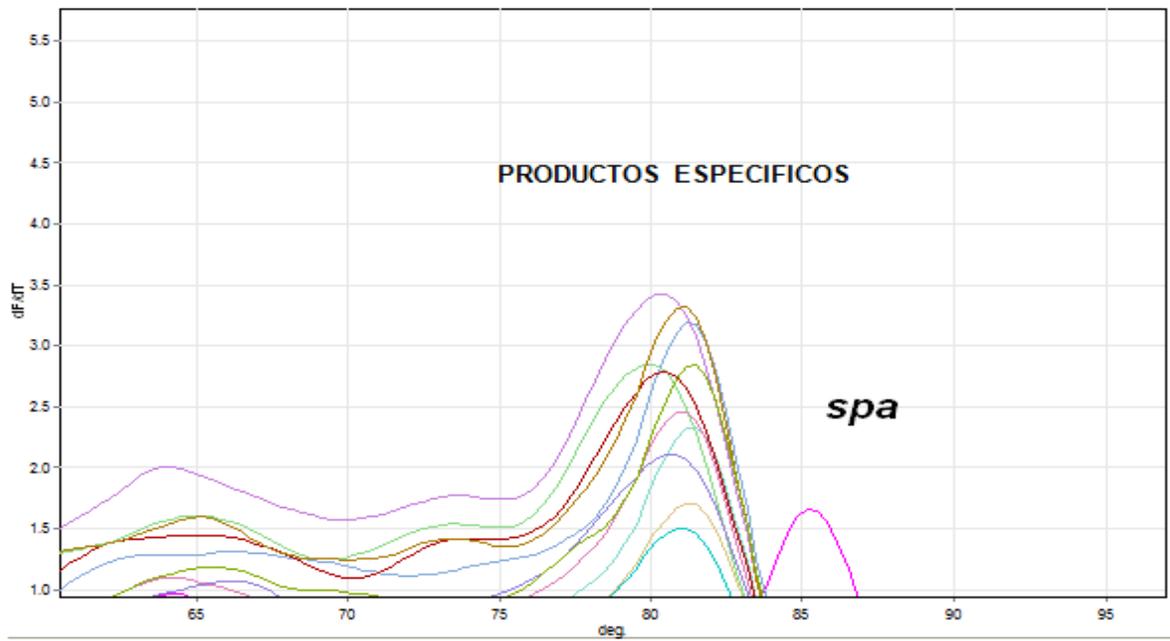


Figura 24. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *spa*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

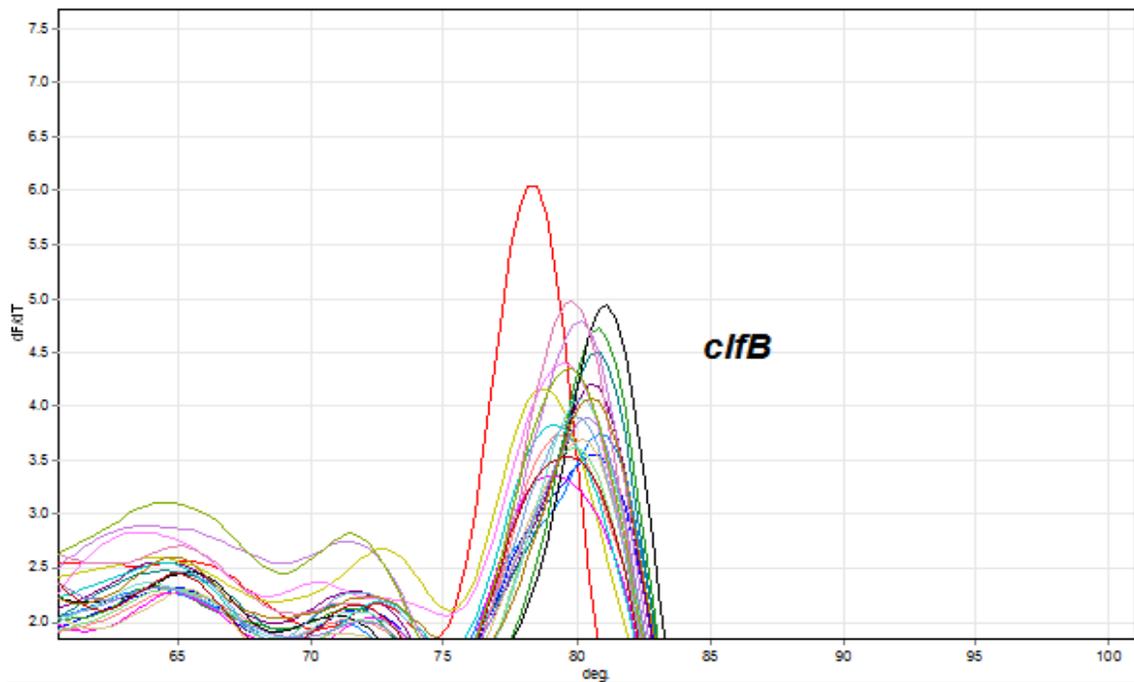


Figura 25. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *cIfB*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

Gen *gyrB* usado como referencia en la expresión de adhesinas en *S. aureus*

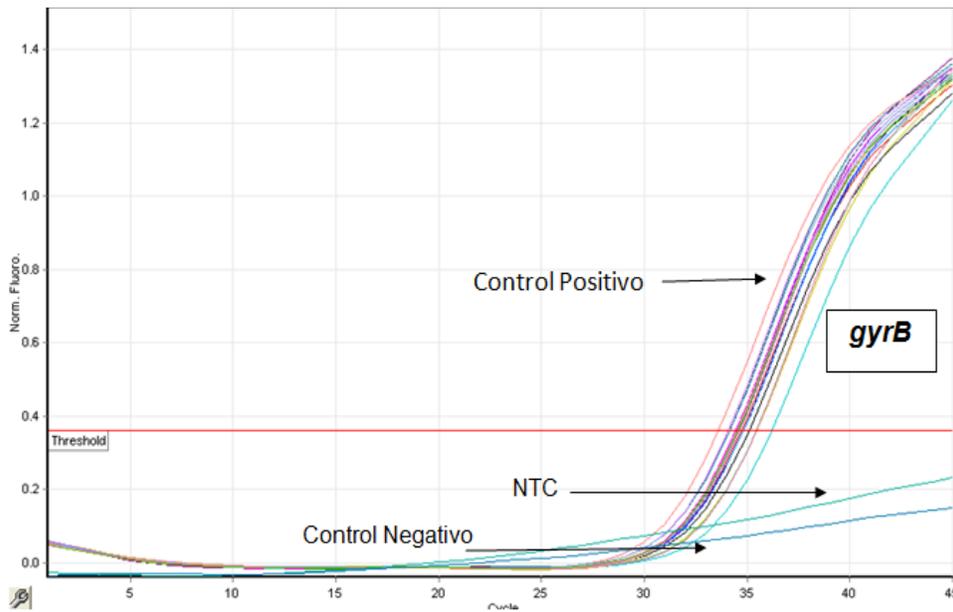


Figura 26. Detección de la expresión de *gyrB* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBR® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC=No Control Templado; Control positivo= *S. aureus* 25923; Control negativo= *S. epidermidis* ATCC 35984.

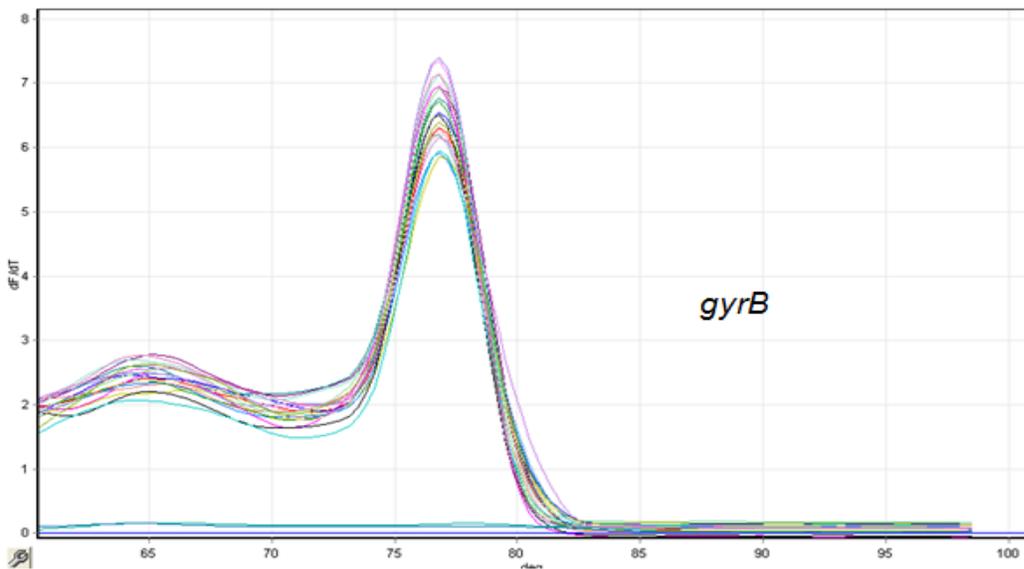


Figura 27. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *gyrB*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

Patrones de expresión de los genes de adhesión después de la infección del epitelio oral reconstituido

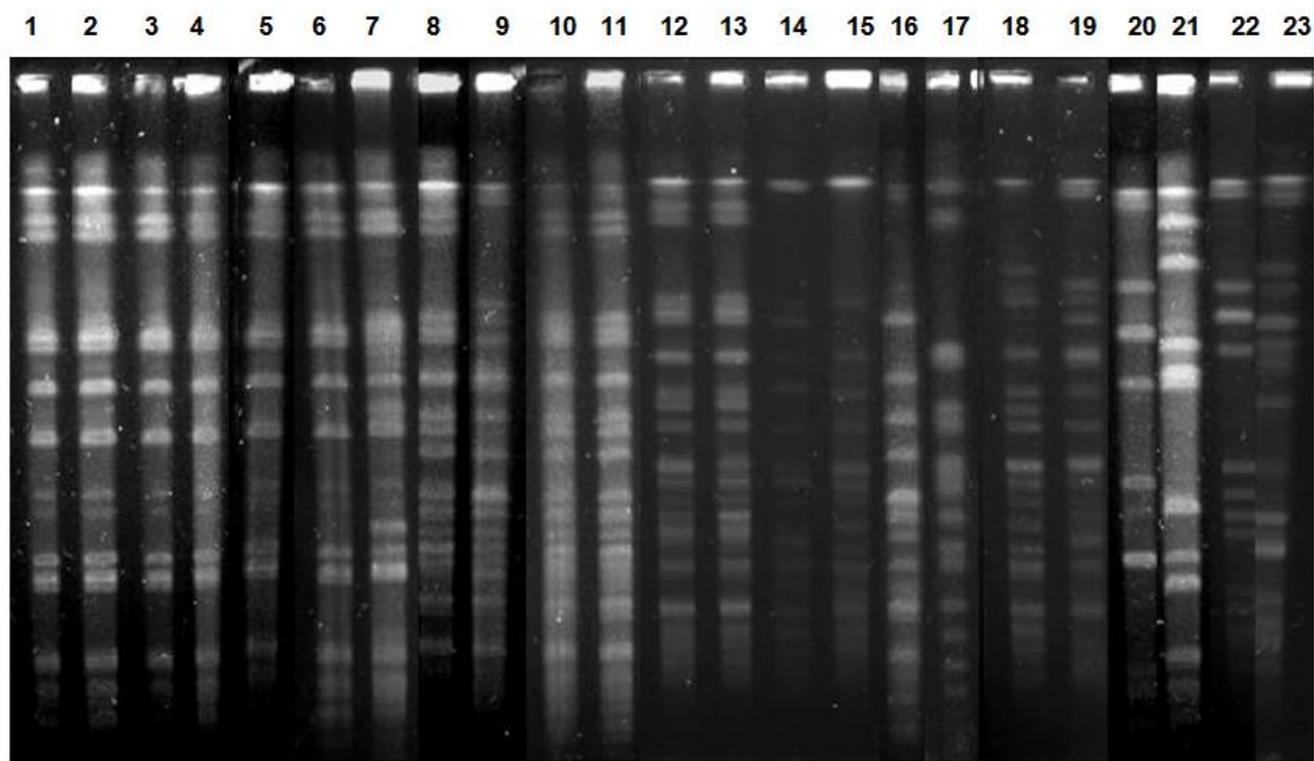
Se encontraron 5 patrones genotípicos diferentes en las 21 cepas de *S. aureus* analizadas (Tabla 8). El patrón 1 (*ebps, bbp, map/eap, clfb, cna, sdrC, sdrD, sdrE*) se identificó en 3 (14%) de las 21 cepas aisladas de catéter de pacientes de hemodiálisis, el patrón 2 (*ebps, bbp, map/eap, fnbB, clfb, cna, sdrC, sdrD*) en 3 (14%), el patrón 3 (*ebps, bbp, map/eap, fnbB, clfa, clfb, cna, sdrC, sdrD, sdrE*) en 2 (9%) cepas, el patrón 4 (*ebps, bbp, map/eap, fnbA, spa, clfa, clfb, cna, sdrC, sdrD, sdrE*) en 2 (9%) cepas y el patrón 5 (*ebps, bbp, map/eap, fnbA, spa, cna, sdrC, sdrD, sdrE*) en 2 (9%) cepas.

No. de patrón	Combinaciones de genes que codifican adhesinas	Catéter (n=22)	
		Número	%
1	<i>ebps, bbp, map/eap, clfb, cna, sdrC, sdrD, sdrE</i>	3	14
2	<i>ebps, bbp, map/eap, fnbB, clfb, cna, sdrC, sdrD</i>	3	14
3	<i>ebps, bbp, map/eap, fnbB, clfa, clfb, cna, sdrC, sdrD, sdrE</i>	2	9
4	<i>ebps, bbp, map/eap, fnbA, spa, clfa, clfb, cna, sdrC, sdrD, sdrE</i>	2	9
5	<i>ebps, bbp, map/eap, fnbA, spa, cna, sdrC, sdrD, sdrE</i>	2	9

Tabla 8. Diferentes combinaciones de genes presentes en las cepas de *S. aureus*.

Patrones de restricción del ADN cromosómico de las cepas de *S. aureus* por Electroforesis en Gel de campos pulsados (PFGE)

Como resultado de la digestión enzimática del ADN cromosómico con *sma I* (Fotografía 3), se obtuvieron los diferentes perfiles del ADN constituidos por 12 a 15 fragmentos de restricción. El análisis del ADN de las 21 cepas aisladas de catéteres de pacientes de hemodiálisis se aprecia en la fotografía 3.



11 12 16 19 22 32 52 MPM 58 59 66 73 75 76 77 79 82 93 103 109 111 112 CP

Fotografía 3. Patrones de PFGE-*SmaI* en cepas aisladas de catéteres de pacientes de hemodiálisis infectados por *Staphylococcus aureus*. Patrones similares en Carriles 5-6 y 10-16, Carril 8: Marcador de Peso Molecular.

Expresión de los genes que codifican adhesinas en las cepas de *S. aureus* y su asociación con los patrones de restricción del ADN cromosómico por PFGE.

El análisis de los patrones de restricción del ADN cromosómico de las cepas de *S. aureus* por PFGE demostró la existencia de dos pares de cepas idénticas entre sí (cepa 22 y 32 y cepa 59 y 66; Cuadro 9), además de otras tres cepas también iguales entre sí (cepas 77, 79 y 82; Cuadro 9). También se identificó que las cepas 11 y 112 se encuentran cercanamente relacionadas entre sí, al igual que las cepas 16 y 19 que posiblemente se encuentran relacionadas entre sí (Cuadro 9.)

# Cepa	Genes													PFGE
	<i>ebps</i>	<i>Bbp</i>	<i>map/eap</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>spa</i>	<i>cifA</i>	<i>cifB</i>	<i>cna</i>	<i>sdrC</i>	<i>sdrD</i>	<i>sdrE</i>		
22	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	Idénticas	
32	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+		
66	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	Idénticas	
59	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+		
77	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	Idénticas	
79	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-		
82	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+		
11	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	Cercanamente Relacionadas	
112	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
16	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	Posiblemente Relacionadas	
19	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-		
12	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	No Relacionadas	
52	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+		
58	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-		
73	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+		
75	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+		
76	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	No Relacionadas	
93	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
103	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+		
109	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+		
111	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	No Relacionadas	

Cuadro 9. Perfiles de expresión de los genes que codifican adhesinas en *S. aureus* y su asociación mediante PFGE.

DISCUSIÓN

Análisis de Pacientes con Insuficiencia Renal Crónica

En este estudio se analizaron 21 pacientes con insuficiencia Renal Crónica (IRC), los cuales presentaron infección por *Staphylococcus aureus* en el sitio de inserción del catéter durante su estancia en el servicio de hemodiálisis de un hospital público, dentro de los cuales el 65% (n=13) fueron hombres y el 35% (n=8) fueron mujeres (Gráfica 1), con edades comprendidas en un intervalo de 17 a 77 años (Gráfica 2). Los datos obtenidos de los pacientes son semejantes a los reportados por la Fundación Mexicana del Riñón (2010), en donde se describió que el género masculino es el más frecuente en los pacientes de hemodiálisis estudiados con un porcentaje de 55%, situación similar a la observada en E.E.U.U. (53%) siendo afectado más las personas entre 45 y 65 años de edad. La IRC constituye un gran problema de salud pública a nivel mundial, siendo actualmente riesgo de muerte para pacientes en hemodiálisis (HD) y esto se ve relacionado por edad, sexo y etnia, aunque el riesgo de muerte se asocia principalmente a edad avanzada, mayor prevalencia de cardiopatía isquémica, insuficiencia cardiaca, insuficiencia venosa periférica, hematocrito elevado y al hecho de cambiar de modalidad terapéutica (Ganesh *et al.*, 2003). En México la IRC genera un alto costo social y económico pues en la actualidad existen más de 100 mil casos de pacientes, siendo una de las principales causas de atención hospitalaria en donde se emplea la alternativa terapéutica más recurrida que es la implementación de hemodiálisis, el cual es un procedimiento que utiliza un catéter tipo Mahuark en una vena del paciente generalmente la subclavia, la cual es frecuentemente contaminada, causando infección en el sitio de inserción. (Aguilar *et al.*, 2004). La IRC constituye un gran problema de salud pública a nivel mundial, cada año comienzan un tratamiento con diálisis entre 80-120 pacientes por cada millón de habitantes, convirtiéndose en un problema sanitario, social y económico de primera magnitud (Bernardo, 2001).

Wild en el 2004 destacó un estudio realizado por la OMS en el cual se declaró que en el mundo hay aproximadamente 150 millones de personas con diabetes, las

cuales si no reciben un cuidado estricto de su padecimiento estarán ocupando por completo las Unidades Nefrológicas, que en el momento actual ya están resultando insuficientes para la atención de los pacientes diabéticos con enfermedad renal. Los datos compilados por la OMS muestran la existencia aproximada de 150 millones de personas a nivel mundial con diabetes, predicen que este dato puede ser doblado a más de 300 millones para el 2025.

Identificación de *Staphylococcus aureus* por biología molecular

Las infecciones relacionadas a catéteres es conocida como ser la segunda causa de muerte en pacientes de hemodiálisis, siendo *Staphylococcus aureus* la bacteria que con mayor frecuencia se aísla de los catéteres causando la infección del acceso vascular provocando bacteremia (Di Bernardo, 2004). En nuestro estudio se describió que el 100% de las cepas (n=21) aisladas de los catéteres de los pacientes de hemodiálisis se encontraron contaminados por *Staphylococcus aureus*, siendo identificadas mediante la detección de los marcadores cromosómicos *spa* y rRNA. Esto datos coincide con los resultados reportados por Stolic *et al.*, (2008) y Parameswaran *et al.*, (2010), quienes propusieron que *Staphylococcus aureus* es la bacteria aislada con mayor frecuencia en infecciones asociadas a los catéteres, esto se puede explicar debido a que la bacteria se encuentra en el 80% de las fosas nasales del ser humano, pudiendo ser así que la contaminación de lo catéteres puede haber venido de la misma flora de los convalecientes. Raad *et al.*, (1995) realizó un estudio en el que demostró en un análisis microbiológico y ultraestructural que la piel y los dispositivos del equipo de hemodiálisis son las principales fuentes de colonización de *S. aureus*. La adherencia y colonización de la bacteria al catéter con formación de una matriz biológica representa uno de los eventos iniciales que conducen posteriormente a la septicemia en el paciente. La contaminación del catéter por *S. aureus* es un gran problema de salud ya que puede originar complicaciones como shock séptico, endocarditis, osteomielitis y bacteremias. poniendo en riesgo la vida de los pacientes (Nassar *et al.*, 2001).

Determinación de la expresión de los genes que codifican adhesinas por PCR en Tiempo Real de las cepas de *Staphylococcus aureus*.

En este estudio se utilizó un nuevo modelo de infección *in vitro* en epitelio reconstituido humano (RHE) para analizar los patrones de expresión de los genotipos de virulencia en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de infecciones asociadas a los catéteres de pacientes de hemodiálisis. La determinación de la expresión de los genes *spa*, *ebps*, *map/eap*, *bbp*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *sdrC*, *sdrD* *sdrE* que codifican para proteínas pertenecientes a la familia de las MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) se realizó por PCR en Tiempo Real (Figuras 2-25). Los genes *cna* (Tabla 7, Figura 4), *sdrC* (Tabla 7, Figura 5), *bbp* (Tabla 7, Figura 2) y *clfB* (Tabla 7, Figura 3) se expresaron en un 100% (n=21). Se ha descrito que el gen *cna* de *S. aureus* codifica para una adhesina que específicamente enlaza al colágeno (Patti *et al.*, 2002). A diferencia de otras adhesinas se ha comprobado que la proteína CNA es producida en menor frecuencia por las cepas de *S. aureus* (Ryding *et al.*, 1997). Estos datos contrastan con los resultados encontrados en este estudio, en donde todas las cepas analizadas (n=21) expresaron el gen *cna*. También se ha reportado que la proteína CNA es necesaria para la adhesión de *S. aureus* al cartílago (Switalski *et al.*, 1993).

El gen *bbp* que codifica para una de las proteínas consideradas más importantes para la localización de *Staphylococcus aureus* en el tejido óseo y por lo tanto de relevancia en la patogenicidad de la osteomielitis (Hui-shan *et al.*, 2000) se expresó en este estudio en el 100% (n=21) de las cepas (Tabla 7, Figura 2). El gen *bbp* codifica para una proteína de 1117 aminoácidos que posee la capacidad de unirse al núcleo de la sialoproteína de hueso (BSP) y se ha reportado que cada célula bacteriana tiene hasta 1000 sitios de unión a BPS (Rydén *et al.*, 1989). La proteína *bbp* contiene repeticiones de serina-aspartato (SD), por lo que se le considera dentro de la familia de las proteínas Sdr (SD-repeat) (Tung *et al.*, 2000). Siendo algunas de estas proteínas identificadas por su capacidad para unirse a componentes específicos del plasma, como el fibrinógeno (ClfA y ClfB), o al calcio como la proteína SdrD (Josefsson *et al.*, 1998).

Cheun *et al.* (1991) demostró que genes como *cna*, *fnbA* y *fnbB* contribuyen significativamente a la colonización de tejidos, provocando diferentes patologías como queratitis ocular, osteomielitis y artritis séptica. Carla *et al.* (2009) realizaron un estudio en donde *S. aureus* se aisló de infecciones nosocomiales y reportaron que los genes *fnbA* y *fnbB* son imprescindibles para que *S. aureus* colonice al humano. En este estudio los genes *fnbA* (Tabla 7, Figura 10) y *fnbB* (Tabla 7, Figura 11) se expresaron en el 47% (n=10) de las cepas de *S. aureus*. De acuerdo con Greene *et al.* (1995) la ausencia del gen *fnbB* no afecta la capacidad de adherencia de *S. aureus*, sin embargo la ausencia de este gen puede afectar la capacidad de invadir células portadoras (Salmenlinna *et al.*, 2002). La presencia combinada de *fnbA* y *fnbB* es importante para la adhesión específica de *S. aureus* en pacientes nosocomiales (Ami *et al.*, 2006). Menzies (2003) mencionó que los genes *fnbA* y *fnbB*, los cuales codifican para las proteínas FnBPA y FnBPB, median la unión de la bacteria a la fibronectina y contribuyen en la adherencia de *S. aureus* a los coágulos sanguíneos y a los biomateriales, con los que se encuentran implicadas en la colonización e inicio de la infección de biomateriales como prótesis y catéteres intravasculares (Greene *et al.*, 1995), además estudios hechos por Dziejwanowska *et al.* (1999) demostraron que también intervienen en el proceso de invasión intracelular de los fagocitos, en la colonización del epitelio respiratorio (Mongodin *et al.*, 2002) y también están implicados en la infección endovascular (Greene *et al.*, 1995).

El gen *clfB* se expresó en el 100% en las cepas (n=21). *Staphylococcus aureus* expresa diversas proteínas que se pueden unir específicamente a fibrinógeno incluyendo los factores de aglutinación A y B (ClfA y ClfB) y la fibronectina (Wann *et al.*, 2000), ClfB solamente se expresa en las células de superficie durante la fase exponencial de crecimiento de *S. aureus* (McAleese *et al.*, 2001), esto podría explicar el hecho de que se haya expresado en el 100% de las cepas estudiadas (Tabla 7, Figura 3). La habilidad de *S. aureus* para que la proteína ClfA se pueda adherir al fibrinógeno se debe a la expresión de la proteína ClfB (Wann *et al.*, 2000). El gen *clfA* en este estudio se expresó en el 28% (n=6) de las cepas de *S. aureus* (Tabla 7, Figura 13). Se ha descrito que *clfA* es capaz de expresarse en la

fase postexponencial de crecimiento (Wolz *et al.*, 1996), lo que coincide con la baja frecuencia de expresión detectada en las cepas aquí estudiadas (n=6).

Los genes *sdrC* (Tabla 7, Figura 5), *sdrD* (Tabla 7, Figura 6) y *sdrE* (Tabla 7, Figura 9) se expresaron en el 100% (n=21), 95% (n=20) y 76% (n=16) de las cepas analizadas respectivamente. Estos genes codifican para las proteínas SdrC, SdrD y SdrE, que junto con las MSCRAMMs, ClfA y ClfB son parte de una familia de proteínas que presentan múltiples repeticiones de serina-aspartato y que se encuentran ancladas a la pared celular (Josefsson *et al.*, 1998). Se ha reportado que el gen *sdrC* se encuentra en el locus *sdr*, mientras que *sdrD* y *sdrE* se encuentran heterogéneamente (Sabat *et al.*, 2006). Las cepas que solo tienen el gen *sdrC* poseen un bajo potencial para causar infecciones de hueso a diferencia de las que tienen los genes *sdrD* y *sdrE*, ya que se ha encontrado una relación entre el gen *sdrD* y la osteomielitis (Sabat *et al.*, 2006), además de que se han reportado variaciones alelicas de SdrE funcionando como una proteína de unión a la sialoproteína de hueso (Tung *et al.*, 2000). El gen *sdrD* actúa de manera diferente de *sdrC* y *sdrE*, ya que permite la interacción entre el patógeno y el sistema inmune del hospedero, en donde su expresión aumenta con la sangre humana (Sitkiewicz, 2011).

El gen *map/eap* se expresó en el 90% (n=19) de las cepas estudiadas (Tabla 7, Figura 7). Se ha descrito que *map/eap* es importante en las interacciones de *S. aureus* con células epiteliales facilitando su adherencia al hospedero (Hussain *et al.*, 2002), por lo que es importante en infecciones nosocomiales, como por ejemplo la adhesión de *S. aureus* a dispositivos quirúrgicos y catéteres, debido a que la proteína EAP es capaz de unirse al fibrinógeno, fibronectina, protrombina, vitronectina, sialoproteína de hueso y trombospodina (McGavin *et al.*, 1993) uniéndose al plasma (Palma *et al.*, 1999). También EAP facilita que *S. aureus* se adhiera a los fibroblastos (Hussain *et al.*, 2002) que son responsables de sintetizar colágeno. EAP puede formar oligómeros y posee la capacidad de unirse a la superficie bacteriana, por lo que se sugiere que puede facilitar la aglutinación de *S. aureus*, además de servir como un puente entre componentes del hospedero y

la bacteria (Palma *et al.*, 1999) y también se conoce que afecta la respuesta inmune del hospedero, ya que altera la función y proliferación de células T (Lee *et al.*, 2002).

En este estudio el gen *ebps* se expresó en el 85% (n=18) de las cepas estudiadas (Tabla 7, Figura 8). Se ha descrito que *ebps* codifica para la proteína que se enlaza a la elastina (EbpS) y a las fibras elásticas, está presente en abundancia en el tejido de mamíferos en los que la elasticidad es muy importante para mantener la integridad estructural y la función de tejidos, en donde la deformación o la extensibilidad reversible es necesaria (Sandberg *et al.*, 1981). *Staphylococcus aureus* enlaza la tropoelastina soluble, vía la proteína EbpS, esta interacción promueve la colonización y adhesión bacteriana de *S. aureus* (Downer *et al.*, 2002).

En este trabajo se describió que los genes *fnbA* (Tabla 7, Figura 10) y *fnbB* (Tabla 7, Figura 11) se expresaron en el 47% de las cepas analizadas (n=10). Higgins *et al.* (2006) mencionaron que los genes *fnbA* y *fnbB* codifican para proteínas que están involucradas en la evasión de la respuesta inmune del hospedero, debido a que estas proteínas tienen la capacidad de unirse al fibrinógeno Cheung *et al.* (2006) reportaron que la proteína SarA regula la expresión de los genes *clfB*, *fnbA* y *fnbB* durante la fase de crecimiento exponencial de *S. aureus*.

La expresión del gen *spa* de *S. aureus* después de la infección del epitelio reconstituido humano fue del 47% (n=10) (Tabla 7, Figura 12). Estudios recientes sobre la actividad del gen *spa* han mostrado que es capaz de regular la actividad de la proteína SarA, la cual permite responder a cambios microambientales para *S. aureus*, así como también para la unión y función del DNA (Ambrosio *et al.*, 2009). Datos recientes sobre la proteína A (Spa), mencionan que es un factor de virulencia de la pared celular de *S. aureus*, causa una marcada disminución en la capacidad endocítica de las células endoteliales (Aguirre *et al.*, 2009), esto puede ser una de las razones por la cual *S. aureus* es capaz de producir endocarditis, sin embargo también se sabe que el gen *spa* está altamente relacionado con la

evitación de la fagocitosis, esto se debe a que el gen *spa* tiene la capacidad de unirse a la fracción Fc de la inmunoglobulina G (González, 2013).

En este estudio se logró establecer que todos los genes de adhesión de la familia MSCRAMMs de *S. aureus* se expresaron después de la infección del epitelio reconstituido humano (Tabla 7, Figuras 2-25). Se ha descrito que la familia de proteínas (MSCRAMMs) está involucrada 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 medida por estas proteínas (Patti *et al.*, 1994), 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). Las proteínas de la familia MSCRAMMs son capaces de adherirse a trombos de fibrina y plaquetas que se forman en las superficies valvulares dañadas, aumentando el riesgo de endocarditis por *S. aureus* (Moren, 1999), sin embargo Jaime *et al.*, (2006) detallaron que la capacidad para invadir un tejido vascular también favorece la diseminación a otros tejidos por lo que las proteínas de los componentes de la superficie bacteriana que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz extracelular son capaces de infectar tanto huesos y articulaciones fácilmente. La expresión de adhesinas puede ser temporalmente modulada por el ciclo celular y la fase de infección de *S. aureus* (Gillaspy *et al.*, 1998).

Diferentes combinaciones de genes de *Staphylococcus aureus*

En nuestro estudio se agruparon los genes que codifican adhesinas para encontrar posibles combinaciones encontrando un total de cinco combinaciones diferentes, de las cuales la combinación detectada con mayor frecuencia en las cepas aisladas de catéter fueron los patrones 1 y 2 con un 14% (n=3) pues está conformado en la mayoría de los genes estudiados, las demás combinaciones encontradas tuvieron una frecuencia menor del 9% esto nos puede indicar que no existe alguna combinación de genes específica para colonizar los catéteres de pacientes de hemodiálisis. Estos resultados nos reflejan que durante el modelo de infección *in vitro* del epitelio reconstituido humano las cepas de *S. aureus* aisladas

de los catéteres de pacientes de hemodiálisis presentaron diferentes perfiles de expresión de los genes que codifican adhesinas, por lo que creemos que durante la patogénesis de la enfermedad las bacterias requieren la presencia de varias adhesinas.

Patrones de PFGE-SmaI en cepas aisladas de catéteres de pacientes de hemodiálisis

La electroforesis en gel de campos pulsados se basa en el análisis del genoma bacteriano por la digestión con endonucleasas de restricción que reconocen secuencias de nucleótidos específicos en el DNA y producen clivajes en la doble cadena que rompe el DNA en fragmentos más pequeños (Shimizu *et al*, 2000).

En muchas digestiones, la electroforesis produce la separación de varios tamaños de fragmentos diferentes, estos fragmentos de diferentes tamaños migran a través de la agarosa a diferentes velocidades de acuerdo a su peso molecular y pueden separarse mientras están expuestos al campo eléctrico. La electroforesis en gel de campos pulsados ha demostrado ser un método útil para las investigaciones, relacionadas con la diseminación y transmisión de infecciones nosocomiales (Forbes *et al*, 2004). Esta técnica permite la tipificación molecular de patógenos, permitiendo diferenciar cepas de bacterias causantes de infecciones nosocomiales y de brotes infecciosos, en centros hospitalarios y en la comunidad (Malathum *et al*, 1998).

La selección de la enzima de restricción depende del contenido G + C del organismo que es evaluado sobre la secuencia de reconocimiento de la enzima. Puesto que el contenido de G + C de *S. aureus* es de 32 a 36 % (Kloss y Schleifer, 1986), la enzima de restricción que reconoce sólo G y C es *Sma I* (CCCGGG) que corta para generar largos fragmentos de DNA. *Sma I* corta el DNA de estafilococos en aproximadamente 15 a 20 fragmentos y dicha distribución es apropiada para la separación en la EGCP (McDougal *et al*, 2003).

En este trabajo se utilizó la electroforesis en gel de campo pulsado (EGCP) digiriendo el genoma completo del microorganismo con *Sma I* de 21 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de catéteres de pacientes de hemodiálisis. Al realizar el análisis correspondiente se demostró la existencia de dos pares de cepas idénticas entre sí (cepa 22 y 32 y cepa 59 y 79; Tabla 9), además de otras tres cepas también iguales entre sí (cepas 77, 79 y 82; Tabla 9). Estos resultados nos demuestran que probablemente la contaminación de los catéteres de estos pacientes por estas cepas pudo ser debida por el personal médico que manipula las maquinas de hemodiálisis durante su asistencia a este servicio, por lo que se recomienda incrementar las medidas higiénicas y de desinfección, tanto del personal, como de las máquinas.

CONCLUSIONES

- ❖ En este estudio se demostró por PCR tiempo real que los genes *spa*, *ebps*, *map/eap*, *bbp*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *sdrC*, *sdrD* y *sdrE* fueron capaces de expresarse en un epitelio humano reconstituido *in vitro*.
- ❖ Las cepas de *S. aureus* presentaron 5 distintos patrones de expresión de genes de adhesinas durante el modelo de infección, dentro de los cuales los genes *bbp*, *clfB*, *cna* y *sdrC* se expresaron al mismo tiempo en todas las cepas estudiadas.
- ❖ Mediante la técnica de electroforesis en campos pulsados (PFGE) se hallaron solamente 2 patrones de bandas diferentes por lo que la contaminación de los catéteres pudo ser por el personal médico que manipula las máquinas de hemodiálisis durante su asistencia al servicio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar EM, García LB, Hernández TI, Rosas R, María T. 2004. Las infecciones nosocomiales: registrar para prevenir. Instituto Nacional de Salud Pública de México. Rev Enferm IMSS 12:89-92.
2. Allon M. 2004. Dialysis catheter-related bacteremia: Treatment and Prophylaxis. Am J Kidney Dis. 55:779-791.
3. Ambrose L Cheung, Koren A Nishina, Sandeep Tamber, 2009. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. Int J Biochem Cell Biol; 40(3):355-361.
4. Bannerman TL. 2003. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. A Manual of Clinical Microbiology. 8^a Ed. Eitor. P R Murray. ASM Press, Washington D.C. (EEUU).
5. Boelaert JR, Van Landuyt HW, De Baere YA, Deruyter MM, Daneels RF, Schurgers ML, Matthys EG, Gordts BZ. 1995. *Staphylococcus aureus* infections in hemodialysis patients: Pathophysiology and use of nasal mupirocin for prevention. J Chemother 7: 49–53.
6. Burian Marc, Wolz Christiane and Goerke Christiane. 2010. Regulatory Adaptation of *Staphylococcus aureus* during Nasal Colonization of Humans. April 06. DOI:10.1371/journal.pone.0010040.
7. Campbell JS, Deshmkh SH, Nelson LC, Stryjewski EM, Federspiel JJ, Tonthat TG, Rude HT, Barriere LS, Corey R, Fowler GV. 2008. Genotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from a Multinational Trial of Complicated Skin and Skin Structure Infections. J Clin Micriobiol46:678-684.
8. Cheung AL, Bayer AS, Zhang G, Gresham H, Xiong YQ. 2004. Reglamento de determinantes de virulencia *in vitro* e *in vivo* en *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol 40:1-9.
9. Cheung. AL & Fischetti, V A. 1991. The role of fibrinogen in mediating staphylococcal adherence to fibers. J Surg. Res. 50, 150-155.
10. Clarke SR, Foster SJ. 2006. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. Adv Microb Physiol 51: 187–224.

11. Carla Renata Arciola, Davide Campoccia, Simonnetta Gaberini, Lucilla Baldassarri, Lucio Montaro. 2005. Prevalence of *can*, *fnbA* and *fnbB* adhesin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. FEMS Microbiology Letters 246 (2005) 8186.
12. 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.
13. Daudirdas TJ, Bkake PG. 2003, Manual de dialysis. Ed Todd S. ling. 2 edicion, Masson.
14. Di Bernardo, Juan J. Soto Toia, Sandra. Lazzeri Silvio. Portillo Fabian. 2004. El *Staphylococcus aureus* en la hemodiálisis albergue y travesía. Fisiopatología. Area Bioquímica Clínica-Carrera de Bioquímica-FACENA-UNNE. Centro del estudio: Unidad Renal Corrientes. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.
15. Donland RM. 2001. Biofilm formation: A clinical relevant microbiologic process. Clin Infect Dis. 33:1387-1392.
16. Downer R, Roche F, Park PW, Mecham RP, Foste 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; 277:243-250.
17. Downer R, F Roche, PW Park, RP Mecham & TJ Foster. 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. 277:243–250.
18. Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA. 1999. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. Infect Immun. Sep;67(9):4673-4678.

19. Ena J, Boelaert JR, Boyken LD, Van Landuyt HW, Godard CA, Herwaldt LA. 1994. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in patients on hemodialysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 15: 78-81.
20. Fica AC. 2003. Consenso nacional sobre infecciones asociadas a catéteres vasculares centrales. *Rev Chil Infect* 20: 39-40.
21. Foster TJ, Hook M. 1998. Surface protein adhesines of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6:84-8.
22. Forbes, B Sahn, D Weissfeld. 2004. Diagnóstico microbiológico. Buenos Aires- Argentina. Editorial médica Panamericana. 175-196.
23. Fundación Mexicana del Riñón, A C. <http://fundrenal.org.mx>.
24. Ganesh SK, Hulbert-Shearon TE, Eagle K, Stack AG. 2003. Mortality differences by dialysis modality among incident ESRD patients with and without coronary artery disease. *J Am Soc Nephrol* 14:415-424.
25. Gillaspay AF, Lee CY, Sau S, Cheung AL & Smeltzer MS. 1998. Factor addecting the collagen binding capacity of *Staphylococcus aureus*. *Infect Ummun.* 66, 3170-3178.
26. González Gómez Carmen. 2013. *Staphylococcus aureus* en población pediátrica: epidemiología molecular y factores de virulencia. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. Departamento de Microbiología I.
27. Greene C, D McDevitt, P Francois, PE Vaudaux, DP Lew & TJ Foster. 1995. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol. Microbiol.* 17:1143–1152.
28. Higgins J, Loughman A, van Kessel KPM, van Strijp JAG, Fomentar TJ. 2006. Factor de aglutinación A de *Staphylococcus aureus* inhibe la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares humanos. *FEMS Microbiol. .Lett* 258: 290-296.
29. Hui-shan TUNG, Bengt GUSS, Ulf HELLMAN, Lena PERSSON, Kristofer RUBIN and Cecilia RYDÉNS. 2000. A bone sialoprotein-binding protein

- from *Staphylococcus aureus*: a member of the spathylococcal Sdr family. Biochem. J; 345, 611-619 (Printed in Great Britain).
30. Hussain M, Haggar A, Heilmann C, Peters G, Flock JI & Herrmann M. 2002. La inactivación por inserción de EAP en cepas de *Staphylococcus aureus* Newman confiere reduce estafilocócica unión a los fibroblastos. Infect Immun 70, 2933 -2940.
 31. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Prevalence estimates of diabetes mellitus (DM), 2030. Disponible en <http://diabetesatlas.org/content/prevalence-estimates-diabetes-mellitus-dm2030>.
 32. Jaime A, Bustos-Martínez A, Hamdan M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev. Biomed; 17:287-305
 33. Jonsson, K., D. McDevitt, M. H. McGavin, J. M. Patti, and M. Hook. 1995. *Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog. J. Biol. Chem. 270:21457–21460.
 34. Josefsson E, KW McCrea, D Ni Eidhin, D O'Connell, J Cox, M Hook & TJ Foster. 1998. Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. Microbiology 144:3387–3395.
 35. 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.
 36. Kanafani ZA, Fowler VG. 2006. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. Enferm Infecc Microbiol Clin. 24:182-93.
 37. Kloos W, Schleifer K. 1986. List of species the genus *Staphylococcus*. J Clin Microbiol. 23(2): 1015-1019.
 38. 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. 113-215.
 39. 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.
40. Lee LY, Miyamoto YJ, McIntyre BW, Hook 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.
 41. Malathum K, Kavindra V, Weinstock G; Murray B. 1998. Repetitive sequence-based PCR versus pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level. *J Clin Microbiol*. 36(1): 211-215.
 42. Marschall J. 2008. Catheter-associated bloodstream infections: Looking outside of the ICU. *AM J Infect Control*. 36: S172.e5-8.
 43. Martin de Francisco AL, Rodríguez-Puyol D, Praga M. 1997. *Nefrología clínica*. 1997:528-545.
 44. 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.
 45. McDevitt D, P Francois, P Vaudaux, and TJ Foster. 1994. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol*. 11:237–248.
 46. McDougal L, Steward C, Killgore G, Chaitram J, McAllister S, Tenover F. 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a National Database. *J Clin Microbiol*. 41(11): 5113-5120.
 47. McGavin MH, D Krajewska-Pietrasik, C RydeN & M Hook. 1993. Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. *Infect. Immun*. 61:2479–2485.

48. Menzies BE. 2003. The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Opin Infect Dis* 2003 Jun;16(3):225-229.
49. Monday SR, Bohach GA. 1999. Properties of *Staphylococcus aureus* enterotoxins and toxins shock syndrome toxin-1. Londres: Academic Press, 1999:589-610.
50. Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, Bonnet N, Dupuit F, Puchelle E. 2002. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun*, Feb;70(2): 620-630.
51. Moren, P. 1999. Informe del Colegio Oficial de Medicos de Barcelona.
52. Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Adem PV, Lee JC, Husain AN, Clasen J, Daum RS. 2008. Comparison of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pulsotypes USA300 and USA400 in a rat model of pneumonia. Department of Pediatrics, Section of Critical Care Medicine, University of Chicago, Illinois, USA. *Aug* 15 198(4):561-70.
53. Nashev D, Toshkova K, Salasia ISO, Hassan AA, Lammler C, Zschöck M. 2004. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol Lett* 233:445-52.
54. Nassar GM, Ayus JC. 2001. Infectious complications of the hemodialysis access. *Kidney Int* 60:1-13.
55. Ni Eidhin D, S Perkins, P Francois, P Vaudaux, M Hook, & TJ Foster. 1998. Clumping factor B (*clfB*), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 30:245–257.
56. Que YA, Francois P, Haefliger JA, Entenza JM, Vaudaux P, Moreillon P. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun* 2001 Oct;69(10):6296-6302.
57. Palma M, Hagggar A & Flock JI. 1999. La adhesión de *Staphylococcus aureus* se ve reforzada por una proteína secretada endógena con una amplia actividad de unión. *J Bacteriol* 181, 2840 -2845.

58. Parameswaran R, Sherchan J, Varma M, Chiranjay M, Mukhopadhyay C, Vidyasagar S. 2010. Intravascular catheter-related infections in an Indian tertiary care hospital. *J Infect Dev Ctries* 5:452-458.
59. Park P, WJ Rosenbloom, WR Abrams & RP Mecham. 1996. Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (ebpS) in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 271:15803–15809.
60. Patel AH, P Nowlan, ED tejedores & TJ Foster. 1987. La virulencia de los mutantes de proteína A-deficientes y la toxina alfa-deficientes de *Staphylococcus aureus* aislados por reemplazo alelo. *Infect. Immun.* 55:3103-3110.
61. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 48: 585–617.
62. Patti JM, Hook M. 1994. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr Opin Cell Biol* 6: 752–758.
63. Patti JM, H Jonsson, B Guss, LM Switalski, K Wiberg, M Lindberg, & M Hook. 1992. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. *J. Biol. Chem.* 267:4766–4772.
64. Patti JM, H Jonsson, B Guss, LM Switalski, LM Wingberg & M. 2002. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin (MSCRAMM). *J. Biol. Chem.* 270:12005-12011.
65. 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 Trasplant.* 19:1237-1244.
66. 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.
67. Raad I, Costerton W, Sabharwal U, Sacilowski M, Anaissie E, Bodey G. 1995. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a

- quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis*; 168: 400-7
68. Randall SM, Valtulina V, Speziale P, Walsh E. 2006. Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. *Infect Immun*. 74(4):2145-2153.
69. 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.
70. Rydén C, Yacoub AI, Maxe I, Heinegard D, Oldberg A, Franzen 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
71. Ryding U, Flock JL, Flock M, Soderquist B, Chirstensson B. 1999. Expression of collagen-binding protein and types 5 and 8 capsular polysaccharide in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 176(4): 1096-1099.
72. Sabat A, Melles DC, Matirosian 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.
73. Salmenlinna S. 2002. Academic dissertation, Helsinki Finlandia: University of Helsinki.
74. Sandberg LB, Soskel NT, Leslie JG. 1981. Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. *N Engl J Med*; 304:566-579.
75. Shimizu A, Fujita M, Igarashi H, Takagi M, Nagase N, Sasaki A, Kawano J. 2000. Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from Staphylococcal food poisoning outbreaks (1980-1995) in Tokio, Japan, by pulsed-field gel electrophoresis. 38 (10): 3746-3749.

76. Speller V, Learmonth A & Harrison D. 1997. The search for evidence of effective health promotion. *BMJ* 315: 361-3
77. Stolic R, Trajkovic G, Peric V, Jovanovic A, Stolic D, Sovtic, S, Lazarevic T, Zivic Z, Subaric G. 2008. Central venous catheter in hemodialysis: to accept recommendations or to stick to own experience. *Voj Pregl.* 65: 21-26.
78. Switalski LM, Patti Jm, Butcher W, Gristina AG, Speziale P, Hook M. 1993 A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. *Mol Microbiol.* Jan;7(1): 99-107.
79. Trad S, J Allignet, L Frangeul, M Davi, M Vergassola, E Couve, A Morvan, A Kechrid, C Buchrieser, P Glaser & N El Solh. 2004. Macrochips ADN para la identificación y tipificación de cepas de *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. . Microbiol* 42: 2054 -2064.
80. Treviño BA. 2004. Insuficiencia Renal Crónica: Enfermedad emergente, catastrófica y por ello prioritaria. *Academia Mexicana de Cirugia. Cir Ciruj* 72:3-4.
81. Trujillo-Gutiérrez JJ, Méndez-Gaona JA, Sierra-Palomino R de la Cruz. 1999. Diagnostico situacional de las afecciones de vías urinarias en la población derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Comunitaria.* 3:enero-abril.
82. Tung H, B Guss, U Hellman, L Persson, K Rubin & C Ryden. 2000. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem. J.* 345:611–619.
83. Velazquez-Meza ME, Ayala-Gaytan J, Carnalla-Barajas MN, Soto-Noguerón A, Guajardo-Lara CE, Echaniz-Avilez G. 2011. First Report of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (USA300) in México. *Journal of clinical microbiology.* 3099-3100.
84. Wann ER, Gurusiddappa S & Hook M. 2000. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Biol Chem* 275, 13863–13871.

85. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, Van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5: 751–762.
86. Wilde C. 2004. Diabetic nephropathy –who-cares? *EDTNA ERCA J.* Jul-Sep;30(3): 163-5.
87. Wolz C, McDevitt D, Fomentar TJ, Cheung AL. 1996. Influencia de *AGR* en la unión del fibrinógeno en *Staphylococcus aureus* Newman. *Infect. Immun* 64: 3142-3147.
88. Yu VL, Goetz A, Wagener M, Smith PB, Rihs JD, Hanchett J, Zuravleff JJ. 1986. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis: Efficacy of antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* 315: 91–96.