



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“FACTORES DE VIRULENCIA INVOLUCRADOS EN LA FORMACIÓN DE LA
BIOPELÍCULA DE *Staphylococcus aureus*”**

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

**PRESENTA:
ANGELICA ILIANA CETINA CORDERO**

**DIRECTORA DE TESIS:
M. en C. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS**



Los Reyes Iztacala Noviembre de 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero agradecer y dedicar esta tesis a las personas que más amo en este mundo: mis padres Haroldo Cetina Herrera y a Illeana Cordero Martínez, ya que fueron un gran apoyo para mí en todos estos años, no solo en la carrera sino desde que llegue a este mundo, y no me refiero a solo el apoyo económico, que reconozco fue de mucha ayuda en toda mi vida, sino también al apoyo emocional, gracias a ustedes he llegado a concluir mi tesis y así cumplir la primera de muchas metas en la vida y me he convertido en la persona que soy ahora. También quiero agradecer y dedicar mi tesis a una personita muy especial para mí que siempre me ha dado su apoyo incondicional y aunque es menor que yo creo que su madurez me ha abierto los ojos en muchas ocasiones, además de que me ha guiado en el sendero que hemos recorrido juntas: a mi hermana Marisol, que gracias a la ligera presión, bueno no una gran presión que me metiste en este año no hubiera concluido mi tesis, pero gracias a eso por fin lo he logrado, muchas gracias hermanita te quitesito muchísimisimoo y si, yo también me siento orgullosa de ti. Gracias a los tres por apoyarme todo este tiempo, se que sin su mirada atenta que siempre pusieron en mí, no lo hubiera logrado, por ello se los agradeceré infinitamente. Quiero decirles que hicieron un buen trabajo en criarnos, ustedes han sembrado la semilla, esa semilla ha crecido y ahora es un árbol que muy pronto dará sus frutos, en verdad Muchas gracias por todo!! Los Amo muchisimo. También quiero dedicar esta tesis a mis abuelitos Haroldo Cetina Ayuso y Rosa María Herrera Leon porque aunque ya no estén conmigo siempre estarán en mi corazón y en mis pensamientos, muchas gracias por sus atenciones, su cariño y amor incondicional, los extraño muchísimo!!, A mis abuelos

Jose Juan Cordero Rosas y Julia Martinez Liñan que siempre me han apoyado, y me han dado su cariño, estoy muy agradecida con ustedes Los quiero mucho!. Así mismo, a mis queridas tías Gaby, Lupita y Rosa María que se interesaron mucho por la conclusión de esta tesis y nos han dado su apoyo todas las veces que vamos a visitarlas a Mérida, Muchas gracias!! Las quiero muchísimo!!. A mis primos: (del mayor al menor, para que no piensen otra cosa y se ofendan) Claudia, María Jose, Tzahatcil, Carlos, Pepe y Junnuene, que siempre han estado ahí para mi, me han escuchado, aconsejado, además de que hemos vivido tantas emociones y experiencias juntos, han convertido mi vida en una aventura, de verdad no tengo como agradecerseles Los amo muchísimo primos!!!. Quiero agradecer a las puerkas Dalia, Viridiana y Joselin porque han sido y serán las mejores amigas que tuve en la universidad, hemos pasado por muchas experiencias juntas, hemos aprendido, reído, peleado, pero a pesar de todo demostramos que la amistad estuvo por encima de todo, agradezco que hayan estado ahí para apoyarme y escucharme, han sido unas excelentes amigas y me siento muy afortunada de tenerlas Muchas gracias! Las quiero muchísimo!!. También a las kuskas Lisa y Liliana que han sido y serán mis mejores amigas del cch, y que aunque nuestros caminos tomaron diferentes rumbos y nuestras salidas han sido muy pocas últimamente, me han demostrado que nuestra amistad puede más, gracias por apoyarme todos estos años y por esas aventuras que hemos disfrutado juntas, considero que su amistad vale mil y no quiero perderla, Las quiero muchísimo!!. Quiero agradecer a mi compañera Staphylococa Stephanie porque fue una gran amiga en el laboratorio, creo que formamos una relación simbiote en donde las dos nos beneficiamos con la procesión de todas

esas muestras para un fin común: nuestra tesis Muchas gracias!!. También a los Candidos Selma y Miguel porque también fueron unos amigos excelentes y disfrute de su compañía en el laboratorio, gracias a ellos tuve un agradable ambiente de trabajo y muy divertido. A las Biólogas Susan y Paty porque siempre estuvieron ahí para apoyarme en resolver mis dudas (enseñarme como se realizaba una técnica, para explicarme el funcionamiento de los aparatos, etc.), para ayudarme a procesar mis muestras, para platicar y distraernos un rato, etc. Muchas gracias aprendí mucho de ustedes!!. Agradezco a la M. en C. Gloria Luz Paniagua y al M. en C. Erick Monroy por su apoyo, supervisión y su paciencia para la realización de esta tesis, también por darme una oportunidad de entrar a su laboratorio, por todas sus enseñanzas en clase y en el lab, y también por facilitarme los materiales que necesitaba para llevar a cabo todas las actividades propuestas para el desarrollo de esta tesis. Al Dr. Sergio Vaca Pacheco y las Biólogas Alina Uribe y Susana González por las revisiones y correcciones que ayudaron a finalizar esta tesis.

Ahora si puedo decir que lo he logrado!! Gracias a todas estas personas que hicieron mi vida en la universidad muy especial.

Muchas Gracias!!

ÍNDICE

1) Resumen	7
2) Introducción	9
○ Características de <i>Staphylococcus aureus</i>	
○ Contaminación bacteriana de los catéteres de hemodiálisis	
○ Formación de la biopelícula bacteriana en los catéteres de pacientes de hemodiálisis	
○ Resistencia bacteriana de <i>S. aureus</i> a la meticilina (Methicillin- resistant <i>Staphylococcus aureus</i> : MRSA)	
3) Antecedentes	18
4) Objetivo general	20
5) Objetivos particulares	20
6) Materiales y métodos	21
○ Selección de pacientes y toma de muestras	
○ Extracción de ADN de las bacterias para la identificación de <i>S.</i> <i>aureus</i>	
○ Identificación de <i>S. aureus</i> por PCR	
○ Detección cualitativa de la formación de la biopelícula de <i>S.</i> <i>aureus</i> mediante el uso del Agar Rojo Congo (CRA)	
○ Cuantificación de la formación de la biopelícula de <i>S. aureus</i> mediante la adhesión a placas de microtítulo de poliestireno	
○ Detección de los genes que confieren resistencia a meticilina (<i>mecA</i>) y mupirocina (<i>ileS-2</i>) por PCR	

- Detección de *icaA* por PCR convencional en las cepas de *S. aureus*
- Detección de los genes *rbf sar* y *agr* por PCR convencional en las cepas de MRSA
- Análisis de las muestras amplificadas por electroforesis en Geles de Agarosa

7) Resultados.....28

- Pacientes analizados
- Origen de las muestras de los pacientes por hospital
- Causas de la Insuficiencia Renal Crónica de los pacientes
- Identificación de *Staphylococcus aureus* por PCR convencional
- Detección del polisacárido de adhesión inetercelular en Agar Rojo Congo (CRA)
- Cuantificación de la formación de la biopelícula de *S. aureus* mediante la adhesión a placas de microtítulo de poliestireno
- Detección de los genes de virulencia y de resistencia a antibióticos en *S. aureus* por PCR convencional
- Asociación de los marcadores de virulencia y de resistencia a la meticilina en las cepas de *S. aureus*

8) Discusión.....39

- Pacientes analizados
- Prevalencia de *Staphylococcus aureus* en los catéteres de los pacientes analizados
- Detección del polisacárido de adhesión intercelular (PIA) en *S. aureus* utilizando el Agar Rojo Congo y la formación de biofilm en placas de microtítulo de poliestireno
- Detección del gen *mecA* en las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres de los pacientes con IRC

- Detección de los genes *icaA*, *sar*, *rbf* y *agr* involucrados en la formación de biofilm

9) **Conclusiones**.....54

10) **Bibliografía**.....55

RESUMEN

Staphylococcus aureus es una bacteria que frecuentemente contamina los catéteres de los pacientes con insuficiencia renal crónica, debido a la formación de una biopelícula, en donde la comunidad bacteriana se encuentra unida por un polisacárido de adhesión intercelular, codificado por el operón *ica*. Debido al incremento de la resistencia de las cepas de *S. aureus* a los antibióticos como la meticilina, ha dificultado el tratamiento médico en estos pacientes. El objetivo de este trabajo fue la identificación de los marcadores de virulencia involucrados en la síntesis del polisacárido de adhesión intercelular (PIA), y de los que le confieren resistencia a la meticilina y mupirocina en cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres de pacientes con insuficiencia renal crónica. La identificación de los genotipos de *S. aureus* se realizó por PCR convencional. Se analizaron microbiológicamente los catéteres de 112 pacientes infectados, dentro de los cuales 48 fueron mujeres y 64 hombres, cuyas edades estuvieron comprendidas en el intervalo de 17-77 años. *S. aureus* fue identificado mediante los marcadores cromosómicos *femA*, *femB*, y *nuc* en el 49% (n = 55) de los casos. El operón *ica* fue detectado en el 96% (n = 53), el gen *rbf* en el 40% (n = 22), el gen *sarA* en el 75% (n = 41) y el gen *agr* en el 100% (n = 55). Las cepas con el genotipo *agr*

fueron distribuidas en cuatro grupos; el Grupo I se encontró en 13 cepas, el II en 14, el III en 10 y el IV en 6 cepas. También encontramos 5 cepas portadoras de los grupos II y III, 3 cepas con los grupos III y IV, 2 cepas con los grupos I y II y 1 cepa con los grupos I y III y otra con los grupos I, II y III. Finalmente el gen *mecA* que confiere resistencia a la meticilina se identificó en el 82% (n = 45) de las cepas bacterianas. La elevada frecuencia de los marcadores de virulencia involucrados en la formación de la biopelícula y en la dispersión bacteriana, además de la alta resistencia a la meticilina detectadas en las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres de los pacientes, demostró la elevada patogenicidad de las cepas, por lo que fue necesario la prescripción del tratamiento médico oportuno, para evitar complicaciones médicas más severas.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, marcadores de virulencia, biopelícula, resistencia

INTRODUCCIÓN

Características de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pertenece al género *Staphylococcus* de la familia Micrococcaceae, el cual contiene más de 30 especies diferentes, muchas de las cuales son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas del hombre. Es un coco Gram positivo de 0.5 a 1 micrómetro de diámetro, no móvil, que no forma esporas y se agrupa en forma de racimos. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. Este microorganismo produce catalasa, coagulasa y crece rápidamente en agar sangre. Sus colonias miden de 1 a 3 mm, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas (Howe *et. al.*, 1996). *S. aureus* posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis. Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales. Provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del shock tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo. Además, causa septicemia, impétigo y fiebres (Kanafani & Fowler, 2006). *S. aureus* posee diferentes factores de virulencia que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el humano: **a) estructurales** (adhesinas denominadas MSCRAMMs que median la unión al fibrinógeno, la fibronectina y el colágeno de la matriz extracelular del hospedero; péptidoglucano, polisacáridos, capsulares, **b)**

enzimas (coagulasa, nucleasas, proteasas), **c) toxinas** (hemolisinas, enterotoxinas).

S. aureus puede identificarse mediante las tradicionales pruebas bioquímicas (manitol, coagulasa, catalasa, etc) o por PCR mediante la detección de los marcadores cromosómicos *femA*, *femB* y *nuc*. (Kobayashi *et. al.*, 1994; Nashev *et. al.*, 2004)

Contaminación bacteriana de los catéteres de hemodiálisis

La diabetes mellitus afecta a 240 millones de personas en el mundo y tiene una alta incidencia en países subdesarrollados como México, que cuenta con aproximadamente 8 millones de diabéticos. Una de las complicaciones más severas de la diabetes es la insuficiencia renal crónica (IRC), cuyo mejor tratamiento es el trasplante renal. Ante la incapacidad de realizar trasplantes al gran número de pacientes con insuficiencia renal crónica, la opción terapéutica más adecuada es la hemodiálisis, procedimiento que requiere insertar un catéter tipo Mahurcar en una vena del paciente, generalmente la subclavia (Stolić *et. al.*, 2008). Sin embargo, la inserción del catéter constituye un factor de riesgo para contraer infecciones (Marschall, 2008) que pueden ocasionar complicaciones como shock séptico, endocarditis, osteomielitis, o abscesos epidurales, que en determinado momento resultan fatales para los pacientes (Kanafani & Fowler, 2006). En México las estadísticas sobre las bacteremias asociadas a los catéteres en pacientes de hemodiálisis a nivel nacional son muy escasas, tan sólo se encuentran los reportes locales realizados por algunas instituciones de salud (Salazar *et. al.*, 2002). En los EUA anualmente se reportan de 7,000 a 15,000

episodios de bacteremias relacionadas con los catéteres (Donland, 2001). La fuente principal de las bacteremias en los pacientes de hemodiálisis es el desarrollo de una película bacteriana en el interior de los túneles de los catéteres (Allon, 2004). Se ha reportado que en casos de bacteremias relacionadas con los catéteres se han aislado bacterias como *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA, por sus siglas en inglés), *Staphylococcus epidermidis* meticilina resistente (MRSE), *Enterococcus* sp, *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Klebsiella* sp y *Pseudomonas* sp, entre otras. (Poole *et. al.*, 2004)

Formación de la biopelícula bacteriana en los catéteres de pacientes de hemodiálisis

Una biopelícula o biofilm, es una comunidad de bacterias adheridas a una superficie y unidas entre sí por una matriz extracelular (Davey & O'Toole, 2000). *S. aureus* puede formar biofilms sobre varios tejidos del hospedero y sobre implantes médicos y, como consecuencia de ello, producir infecciones crónicas (Harris & Richards, 2006; Furukawa, *et. al.*, 2006). Las bacterias presentes en las biopelículas son resistentes a la respuesta inmune del hospedero y a los antibióticos (Leid *et. al.*, 2002; Davies, 2003; Patel, 2005), lo que representa un problema importante para el tratamiento de los enfermos. Se ha demostrado que *Pseudomonas aeruginosa*, uno de los primeros organismos modelo en los que se estudió la formación de biopelículas, requiere comunicación célula-célula (quórum-sensing) para la formación de biofilms (Davies *et. al.*, 1998). Se han descrito dos etapas en la formación del biofilm por *S. aureus*. En la primera, las bacterias se adhieren a una superficie por medio de adhesinas asociadas a su pared celular. En la segunda etapa del desarrollo del biofilm ocurre multiplicación bacteriana y se

forma una comunidad estructurada por varias capas (Götz, 2002). El sistema de quórum-sensing de *S. aureus* está codificado por el locus del gen accesorio regulador *agr* (accessory gene regulator) (figura 1).

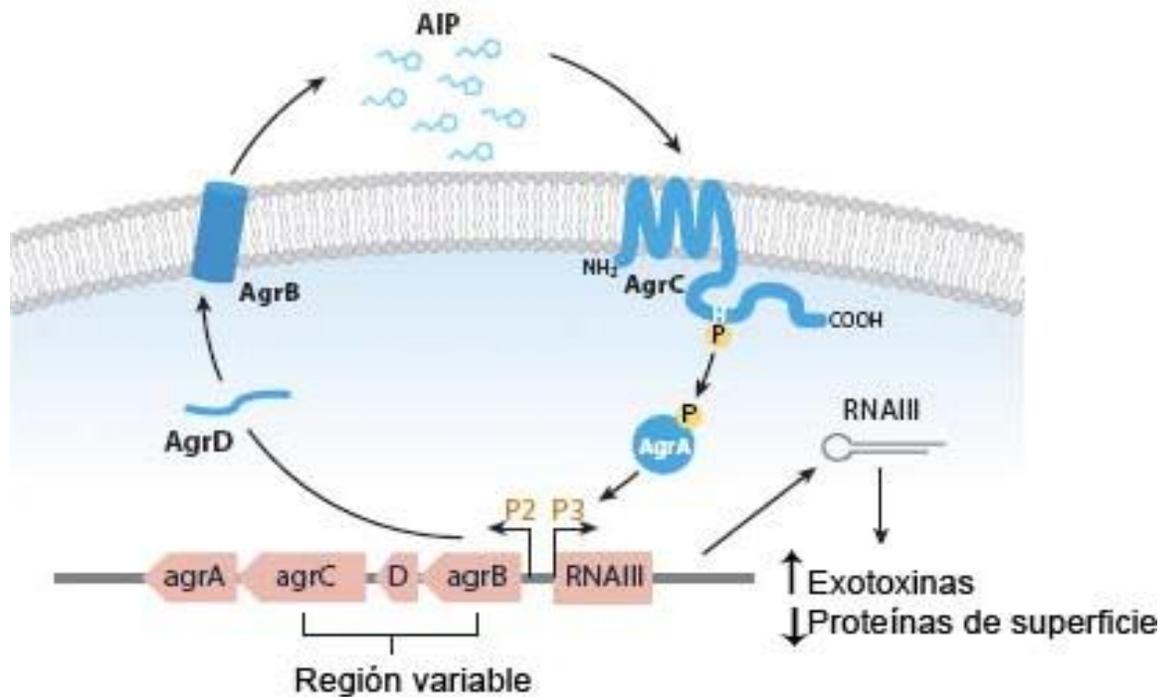


Figura 1. Mecanismo de diseminación de *S. aureus*. Locus *agr*: accessory gene regulator

La molécula que produce y censa (detecta) el locus *agr* es el péptido autoinductor AIP (autoinducing peptide), el cual es un péptido de 7-9 aminoácidos, con los últimos 5 formando un anillo cíclico de tiolactona (Ji *et. al.*, 1997). Durante el crecimiento de la población bacteriana, *S. aureus* produce el AIP y lo secreta; una vez que éste alcanza una concentración crítica se une a receptores celulares e inicia una cascada regulatoria que controla la expresión de una gran cantidad de factores de virulencia: proteasas, hemolisinas, toxinas (Novick, 2003). El locus *agr* se expresa a partir de dos promotores divergentes: P2 y P3. P2 forma parte de un

operón que contiene 4 genes: *agrB*, *agrD*, *agrC* y *agrA*; mientras que a partir del promotor P3 se transcribe el RNAIII. AgrA y AgrC constituyen un clásico sistema de señalización de dos componentes, y AgrB y AgrD se combinan para generar el activador AIP (Novick & Geisinger, 2008). La unión de AIP activa a AgrC, el cual activa a su vez a AgrA y éste, la transcripción a partir de P2 y de P3 (Novick *et. al.*, 1995). El efector intracelular del sistema *agr* es el RNAIII (Novick *et. al.*, 1993), un RNA de 514 nucleótidos que posee una estructura secundaria compleja. El RNAIII funciona como un RNA antisentido, regula la traducción de los mRNAs blanco al aparearse con ellos. Así, el RNAIII incrementa la producción de α -hemolisina al aparearse con el extremo 5' del RNAm del gen *hla* (que codifica a α -hemolisina), lo que contrarresta la estructura secundaria que impide la traducción (Morfeldt *et. al.*, 1995). El RNAIII disminuye la traducción del RNAm de la proteína A al aparearse con la región de inicio de la traducción, lo que bloquea la unión de los ribosomas (Novick *et. al.*, 1993). A diferencia del papel que juega el quórum sensing promoviendo la formación del biofilm por *P. aeruginosa*, en *S. aureus* el sistema *agr* ejerce el efecto contrario. En un estudio de 105 cepas de *S. aureus*, el 78% de las *agr*-negativas y sólo 6% de las *agr*-positivas formaron biofilms sobre poliestireno (Vuong *et. al.*, 2000). Se ha reportado también que mutantes *agr*-, deficientes en quórum sensing, forman biofilm sobre vidrio recubierto de fibronectina, cubriendo una superficie igual o mayor que la cubierta por la cepa silvestre *agr*+ (Pratten *et. al.*, 2001). Recientemente se demostró que en *S. aureus* se requiere la represión del sistema de quórum-sensing para que las células formen la biopelícula, y que la activación de *agr* provoca que las células del biofilm se desprendan de él. Se ha propuesto que esta desagregación de las células del

biofilm funciona como un mecanismo de dispersión que facilita la colonización de nuevos sitios.

La clasificación de las cepas de *Staphylococcus aureus* en cuatro diversos grupos de interferencia (I, II, III y IV) se debe al polimorfismo en una región hipervariable del locus *agr* que comprende secuencia de nucleótidos que codifica para *AgrD*, la secuencia para las dos terceras partes de la porción C-terminal de *AgrB* y la secuencia que codifica para la porción N-terminal de *AgrC*. (Gilot *et. al.*, 2002; Jarraud *et. al.*, 2000; Nagao *et. al.* 2009; Jarraud *et. al.*, 2002)

Aparentemente la formación del biofilm por represión del sistema *agr* es independiente del operón *ica*, que codifica las enzimas responsables de la formación del polisacárido adhesivo intercelular (PIA) (Boles & Horswill, 2008). *S. aureus* y *S. epidermidis* forman biopelículas dependientes de *ica* (Cramton *et. al.*, 1999; Götz, 2002). El operón *ica* está formado por los genes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* y el gen regulador *icaR* (Gerke *et. al.*, 1998). La expresión de este operón conduce a la formación de PIA, el cual es un polímero de N-acetilglucosamina, y por esta razón ha sido también referido como PNAG (Gerke *et. al.*, 1998). La interacción funcional entre *icaA* e *icaD* podría ser necesaria para la unión entre los residuos de N-acetilglucosamina en la posición beta-1,6. Aún no se conoce el papel específico de *icaB*, aunque se sugiere que podría codificar para una deacetilasa que remueve algunos grupos acetilo, originando residuos de glucosamina cargados positivamente (Götz, 2002). La coexpresión de *icaA*, *icaD*, e *icaC* causa la síntesis de cadenas más largas de PNAG, que la coexpresión de los genes *icaA* e *icaD* (Gerke *et. al.*, 1998). La mayoría de las cepas de *S. aureus* contienen el operón *ica*. (Arciola *et. al.*, 2001, Cramton *et. al.*, 2001, Martín-Lopez *et. al.*, 2002)

La expresión de *ica* y la formación de PIA son altamente variables en el género *Staphylococcus* (Valle *et. al.*, 2003). Existen reportes que indican que la expresión de *ica* en *S. epidermidis* y *S. aureus* se encuentra sujeta a regulación ambiental (Cramton *et. al.*, 2001). Factores como la elevada osmolaridad, la alta temperatura y la concentración subinhibitoria de ciertos antibióticos favorecen la expresión del operón y la síntesis de PIA (Rachid *et. al.*, 2000). Se ha demostrado que el crecimiento anaeróbico también induce la expresión del operón *ica* y la producción de PIA en *S. epidermidis* y *S. aureus* (Cramton *et. al.*, 2001). Existen otros mecanismos independientes de *ica* para la formación de PIA en *S. aureus* (Fitzpatrick *et. al.*, 2005, Kogan *et. al.*, 2006), dentro de los cuales se encuentran involucrados los genes *rbf* (regulator of biofilm formation) y *sarA* (staphylococcal accessory regulator). El gen *rbf* en *S. aureus* codifica para una proteína reguladora transcripcional de 190 kDa que es necesaria para el desarrollo de la biopelícula en medio de cultivo con glucosa o NaCl, pero no regula la expresión del operón *ica* (Lim *et. al.*, 2004). El gen *sarA* codifica para una proteína de 14.5 kDa (SarA) que se une a los promotores de *agr* para promover la transcripción de RNAIII y consecuentemente inhibir la producción de PNAG (Heinrichs *et. al.*, 1996). Se ha reportado que la mutación de *sarA* inhibe la producción de RNAIII (Beenken *et. al.*, 2004). Valle *et. al.*, (2003) demostraron que la mutación de *sarA* disminuye la producción de PNAG e impide completamente la formación de biofilm.

Resistencia bacteriana de *S. aureus* a la meticilina (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)

La aparición y propagación de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina se ha convertido en un grave problema de salud a nivel mundial (Enright *et. al.*, 2002; Ko *et. al.*, 2005). La resistencia de *S. aureus* a la meticilina se debe la presencia del gen *mecA*, que codifica la penicillin-binding protein PBP2a de 78 kDa. Los antibióticos beta-lactámicos se unen a las PBPs en la pared celular, lo que interrumpe la síntesis de la capa de péptidoglicano y causa la muerte de la bacteria. Como los antibióticos beta-lactámicos no pueden unirse a la PBP2a, la síntesis de la capa de péptidoglicano y de la pared celular continúa, y la bacteria no es muerta. El gen *mecA* está regulado por el represor *MecI*, y por el transductor de señal transmembranal que censa beta-lactámicos *MecRI*. En ausencia de un antibiótico beta-lactámico, *MecI* reprime la transcripción de *mecA* y de *mecRI-mecI*. En presencia de un beta-lactámico, *MecRI* se rompe autocatalíticamente y esto activa a un dominio de metaloproteasa localizado en la parte citoplásmica de *MecRI*. La metaloproteasa degrada al represor *MecI*, que se encuentra unido al operador de *mecA*, lo que permite la transcripción de *mecA* y la producción subsecuente de PBP2a (Deurenberg *et. al.*, 2007). El gen *mecA* (2.1 kb) está localizado en un elemento genético móvil llamado el Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*; Ito *et. al.*, 2003). Se conocen 5 tipos principales de SCC*mec* cuyos tamaños oscilan entre 20.9 y 66.9 kb. Los SCC*mec* tipo I (34.3 kb), IV (20.9-24.3 kb) y V (28 kb) codifican exclusivamente para resistencia a beta-lactámicos. Los SCC*mec* tipo II (53 kb) y III (66.9 kb) confieren resistencia a más antibióticos (kanamicina, tobramicina, bleomicina, tetraciclina), debido a que

poseen genes de resistencia adicionales en plásmidos integrados, además de que contienen el transposón Tn554, que posee el gen *ermA*, el cual confiere resistencia inducible a macrólidos, lincosamida y estreptogramina. (Deurenberg *et. al.*, 2007)

Desde la introducción de la meticilina para uso clínico en 1959, la ocurrencia de cepas clínicas de MRSA se ha incrementado de manera constante y las infecciones nosocomiales se han convertido en un serio problema de salud mundial (Barber, 1961; Panlilio *et. al.*, 1992; Voss *et. al.*, 1994). El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales de EUA determinó que en pacientes hospitalizados la prevalencia de cepas MRSA se incrementó del 4% en 1980 a 31.9% en 1996. En 2001 se tenía un 55% de prevalencia y para el 2004, llegó al 60.7%. En algunos hospitales se han reportado incidencias hasta del 80% (National Nosocomial Infectious Surveillance System (NNIS) 2004). La prevalencia actual de cepas MRSA está sujeta a variaciones geográficas. Por ejemplo, en Europa los porcentajes son elevados, del 58% en Italia y del 54% en Portugal, mientras que en Japón este porcentaje es del 70%. En México existe un número limitado de estudios sobre la prevalencia de cepas MRSA. De acuerdo a algunos estudios realizados, se ha visto que la prevalencia de cepas MRSA se ha incrementado rápidamente en los hospitales durante los últimos años. Se estima que ha cambiado del 7% al 30%. (Velázquez-Meza *et. al.*, 2004)

Para evitar la formación de la biopelícula en el interior de los catéteres y de otros dispositivos médicos se ha utilizado de manera tópica la mupirocina, un antibiótico que no se administra para el tratamiento de las bacteremias, sin embargo, su uso ha ocasionado la selección de cepas MRSA resistentes a mupirocina (Berns,

2003). El gen responsable de la resistencia a la mupirocina es *ileS-2*. En España la resistencia de MRSA a la mupirocina se ha incrementado del 7.7% en 1998 al 19% en 2000. (Pérez-Roth *et. al.*, 2002)

Debido a que en nuestro país las estadísticas sobre las bacteremias asociadas a los catéteres son escasas y también al incremento de las cepas MRSA, el propósito de éste estudio será contribuir al conocimiento de los factores de virulencia de las cepas de *S. aureus* que causan infecciones a pacientes con insuficiencia renal crónica, sometidos a hemodiálisis.

ANTECEDENTES

Debido al gran número de infecciones relacionadas a la formación de biofilm en cepas de *S. aureus* resistentes a la metilina, en los últimos años se han estudiado los mecanismos involucrados en la síntesis de la biopelícula en cepas de *S. aureus* de distinto origen. En el 2007 se estudió la capacidad de 11 cepas de *S. aureus* (5 aisladas de alimentos y 5 clínicas) y 1 de *S. epidermidis* para producir la biopelícula bajo diferentes condiciones de estrés (temperatura, cloruro de sodio, glucosa y etanol). Los resultados mostraron que las temperaturas subóptimas para el crecimiento aumentaron la producción de la biopelícula. La presencia combinada de cloruro de sodio y glucosa mejoró la formación de la biopelícula. Tanto la temperatura como la osmolaridad afectaron la expresión de varios genes asociados a la biopelícula (*icaA* y *rbf*). Las variaciones en la expresión génica (*icaA*, *agrA*) entre las cepas también fueron observadas. Estos autores concluyeron la existencia tanto de los mecanismos *ica*-dependientes como *ica*-independientes en la producción de la biopelícula por *S. aureus* (Rode *et. al.*,

2007). En el mismo año Francois *et. al.*, (2007) compararon tres ensayos (uno desarrollado por estos autores y dos equipos comerciales) para la identificación rápida de 93 cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) aisladas entre 1993 a 2005. La detección del gen *mecA* resultó ser la mejor opción en la detección de cepas resistentes a la meticilina.

El uso de PCR multiplex y PCR en Tiempo Real (RT) han mejorado los métodos de diagnóstico molecular, de tal manera que Zmantar *et. al.*, (2008) detectaron por PCR la presencia de los genes *icaA*, *icaD*, *cna*, *fnbA* y *clfA* en 46 cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. La mayoría de las cepas presentaron estos marcadores de virulencia. En el mismo año Shore *et. al.*, (2008) detectaron por PCR en Tiempo Real el Cassette Chromosome *mecA* en cepas MRSA recuperadas entre 2002 y 2006 en hospitales de Irlanda.

El incremento de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina en los últimos años en todo el mundo ha originado el estudio molecular del gen que confiere la resistencia a la meticilina, así Ibrahim *et. al.*, (2009) compararon la estructura de SCC*mec* en cepas de *S. epidermidis* (MRSE) y en cepas de *S. aureus* (MRSA) aisladas de las fosas nasales de la misma persona, bajo la sospecha de la transferencia horizontal de SCC*mec in vivo*. En el mismo año en Dinamarca Larsen *et. al.*, (2009) describieron la aparición y caracterización de infecciones por cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina asociadas a la comunidad (MRSA-CA) durante el periodo de 1999 a 2006 y Liu *et. al.*, (2009) realizaron estudios moleculares sobre la distribución geográfica de cepas de MRSA aisladas en 18 hospitales de enseñanza en 14 ciudades de China entre 2005 y 2006.

OBJETIVO GENERAL

- Identificación de los marcadores de virulencia involucrados en la síntesis del polisacárido de adhesión intercelular (PIA), en cepas MRSA aisladas de los catéteres de pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Detección cualitativa de la formación de la biopelícula de *S. aureus* mediante el uso del Agar Rojo Congo.
- Cuantificación de la formación de la biopelícula de *S. aureus* mediante la adhesión a placas de microtítulo de poliestireno.
- Detección por PCR del gen *mecA* que confiere resistencia a la meticilina y del gen *ileS-2* que confiere resistencia a la mupirocina en las cepas de *S. aureus*.
- Identificación por PCR de los genes *icaA*, *rbf* y *sarA* involucrados en la formación de la biopelícula y del gen *agr* responsable de la dispersión bacteriana en cepas MRSA.

METODOLOGÍA

Selección de pacientes y toma de muestras

Para el desarrollo de este estudio se seleccionó un grupo de pacientes con insuficiencia renal crónica que presentaron infección (eritema, dolor, supuración, etc.) en el sitio de inserción del catéter tipo Mahurkar, que acudieron al servicio de Hemodiálisis del Hospital Regional No. 72 del IMSS, de la UMAA 199 (Unidad Médica de Atención Ambulatoria) del IMSS, del Hospital Regional No. 196 del IMSS, Aragón y del ISSEMyM Satélite, todos ubicados en el Estado de México. Las muestras fueron tomadas del sitio de inserción de los catéteres por medio de hisopos estériles, los cuales se depositaron en el medio de transporte Stuart. Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de la Salud Integral de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM. Las muestras se sembraron en el medio Infusión-Cerebro-Corazón (BHI) y se incubaron 24 h a 37°C. Los cultivos se sembraron en Agar S-110 y se incubaron 24 h a 37°C. Las cepas pertenecientes al género *Staphylococcus* se identificaron por morfología colonial y microscópica utilizando la tinción de Gram, y por pruebas bioquímicas. Se determinó la susceptibilidad de las cepas a la meticilina con discos impregnados con 1 microgramo de oxacilina (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003).

Extracción de ADN de las bacterias para la identificación de *S. aureus*

El ADN de las cepas de *Staphylococcus* se extrajo mediante el método de ebullición, que se realizó de la siguiente manera; se tomó una asada del cultivo de

Staphylococcus en S-110 sembrado el día anterior. El inóculo se depositó en un tubo de ensayo de 16 x 150 mm, estéril, con tapón de rosca, que contenía 2 mL de agua desionizada estéril libre de nucleasas. Se suspendieron las bacterias en el agua por agitación en un Vórtex durante 20 s y los tubos se calentaron a baño María (100 °C) durante 20 min, una vez pasado este tiempo se enfriaron en hielo (0 °C) por 10 min.

Utilizando puntas de micropipeta nuevas se tomó 1 mL de cada muestra y se depositó en un tubo eppendorf nuevo y estéril. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante, que contenía el DNA bacteriano, se separó con una micropipeta de 1000 µL y se depositó en otro tubo eppendorf nuevo y estéril y se almacenó a -20 °C hasta su utilización para la reacción de PCR.

Identificación de *S. aureus* por PCR

Las cepas de *S. aureus* se identificaron mediante la detección de los marcadores cromosómicos *femA*, *femB* y *nuc* por PCR, con los oligonucleótidos *femA1* 5'-AGACAAATAGGAGTAATGAT-3' y *femA2* 5'-AAATCTAACACTGAGTGATA-3', con los que se obtuvo un amplicón de 509 pb, *femB1* 5'-TTACAGAGTTAACTGTTACC-3' y *femB2* 5'-ATACAA ATCCAGCACGCTCT-3', con los que se obtuvo un amplicón de 651 pb (Kobayashi *et. al.*, 1994), *nuc1* 5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3' y *nuc2* 5'-ACGCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3', con los que se obtuvo un amplicón de 279 pb (Nashev *et. al.*, 2004). El volumen final por mezcla de reacción para *femA* y

femB fue de 25 µl; 5 µl de ADN molde, 18 µl de agua libre de nucleasas estéril, 1 µL de cada oligonucleótido (Sigma-Genosys) a las concentraciones de 100 pmol, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads), y para *nuc* el volumen final por mezcla de reacción fue de 25 µl; 5 µl de ADN molde, 18 µl de agua libre de nucleasas estéril, 1 µL de cada oligonucleótido (Sigma-Genosys) a las concentraciones de 10 pmol, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del ADN se realizó en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: para *femA* y *femB* fueron desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 57°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos) con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Para *nuc* fue desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 37 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos) con una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Detección cualitativa de la formación de la biopelícula de *S. aureus* mediante el uso del Agar Rojo Congo (CRA)

La detección cualitativa de la formación de la biopelícula se realizó por cultivo en el Agar Rojo Congo (Freeman *et. al.*, 1989). Las cepas se sembraron en placas de Agar Rojo Congo [36 g de sacarosa, (SIGMA); 0.8 g de Rojo Congo en un litro de agar de infusión cerebro corazón (BHI; Biorad)] y se incubaron 24 h a 37 °C. Al término los resultados fueron interpretados de la siguiente manera: Colonias muy

negras, negras y casi negras o rojizas negras con una consistencia áspera, seca y cristalina sobre CRA, fueron clasificadas como cepas productoras de biopelícula, mientras que colonias muy rojas o rojas, fueron clasificadas como no productoras de biopelícula.

Cuantificación de la formación de la biopelícula de *S. aureus* mediante la adhesión a placas de microtítulo de poliestireno

Cada una de las cepas se sembró en caldo de soya y tripticasa (TSB) por 24 horas a 37°C (Moretro *et. al.*, 2003). Al término el cultivo se diluyó 1:100 en TSB con 2 % de glucosa y 2 % de cloruro de sodio. Posteriormente 200 µL de esta suspensión celular se transfirieron a cada uno de los 6 pozos paralelos de la placa de microtítulo de poliestireno (96 pozos), la placa se incubó 24 horas a 37°C y se midió la absorbancia a 600 nanómetros en un Lector de ELISA (Multiscan, Labsystems, Helsinki, Finlandia) como una medida del crecimiento total. Posteriormente los cultivos fueron removidos y las placas se lavaron 3 veces con 200 µL de agua peptonada (salina con 0.1 % de peptona), para remover las células no adheridas, y se secaron en posición invertida a temperatura ambiente por 30 minutos. La biopelícula se tiñó con 100 µL de safranina al 0.1 % por 3 minutos. Se elimino el exceso de safranina y la placa se seco a temperatura ambiente por 2 horas. La cuantificación de la biopelícula se realizó por medición de la absorbancia a 492 nanómetros.

Detección de los genes que confieren resistencia a meticilina (*mecA*) y mupirocina (*ileS-2*) por PCR

Para detectar *mecA* (Geha DJ, Uhl JR, Gustaferro CA y Persing DH. 1994. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical

laboratory. J Clin Microbiol. 32:1768–1772.) e *ileS-2* (Anthony RM, Connor AM, Power EGM y French GL. 1999. Use of the polymerase chain reaction for rapid detection of high-level mupirocin resistance in staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 18:30–34) por PCR, el volumen final por mezcla de reacción fue de 25 μ L; 5 μ L de ADN molde, 18 μ L de agua libre de nucleasa estéril, 1 μ L de cada uno de los 4 oligonucleótidos (Sigma-Genosys); *mecA1* 5'-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3' (10 pmol), *mecA2* 5'-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3' (10 pmol), *iles2-F* 5'-TATATTATGCGATGGAAGGTTGG-3 (10 pmol) e *iles2-R* 5'-AATAAAATCAGCTGGAAAGTGTTG-3 (10 pmol), 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaqTM Ready-To-GoTM PCR beads). El ADN se amplificó en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 66°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos). Posteriormente 5 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineación a 64°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos) y 25 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineación a 50°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos). Finalmente la extensión se prolongó a 72°C por 10 minutos. El tamaño del amplicón esperado para *mecA* fue de 310 pb y para *ileS-2* fue de 456 pb.

Detección de *icaA* por PCR convencional en las cepas de *S. aureus*

Los oligonucleótidos que se emplearon para la PCR fueron: *icaA-F* 5'-AAACTTGGTGCGGTTACAGG-3' e *icaA-R* 5'-TCTGGGCTTGACCATGTTG-3' (Campbell *et. al.*, 2008). El volumen final por mezcla de reacción fue de 25 μ L; 5 μ L de ADN molde, 18 μ L de agua libre de nucleasa estéril, 1 μ L de oligonucleótido a las concentraciones de 10 pmol, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaqTM Ready-To-GoTM PCR beads). La amplificación del ADN se hizo en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineación a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto), finalmente la extensión se prolongó a 72°C por 10 minutos. El tamaño del amplicón esperado para *icaA* fue de 936 pb.

Detección de los genes *rbf*, *sarA* y *agr* por PCR convencional en las cepas de MRSA

Los oligonucleótidos que se utilizaron para el PCR se aprecian en la tabla 2. El volumen final por mezcla de reacción fue de 25 μ L; 5 μ L de ADN molde, 18 μ L de agua libre de nucleasa estéril, 1 μ L de cada oligonucleótido a la concentración de 10 pmol (todos los primers fueron de Sigma-Genosys), 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaqTM Ready-To-GoTM PCR beads). La amplificación del ADN se hizo en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: para *rbf* la desnaturalización inicial fue a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 95°C por 40 segundos, alineación a 62°C por 50 segundos y extensión a 72°C por 40 segundos), la extensión se prolongó a 72°C por 10 minutos, para *sarA* la desnaturalización inicial

fue a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineación a 66°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto), la extensión se prolongó a 72°C por 10 minutos y para *agr* la desnaturalización inicial fue a 95°C por 45 segundos, seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 95°C por 45 segundos, alineación a 52°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto), finalmente la extensión se prolongó a 72°C por 10 minutos.

Primer	Secuencia (5' →3')	Tamaño del amplicón	Referencia
<i>rbf1</i> <i>rbf2</i>	GAATTCTAGAAAGAGGTAAAGTTATGGC CACTCATAAAAAGCTTCTTC	1200 pb	Lim <i>et. al.</i> , 2004
<i>sar1</i> <i>sar2</i>	CAATCACTGTGTCTAATGAA GTGCCATTAGTGCAAACCTC	700 pb	Blevins <i>et. al.</i> , 1999
<i>Pan</i> <i>agr I</i>	ATG CAC ATG GTG CAC ATG C GTC ACA AGT ACT ATA AGC TGC GAT	441 pb	Gilot <i>et. al.</i> , 2002
<i>Pan</i> <i>agr II</i>	ATGCACATGGTGCACATGC TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAGC	575 pb	Giltot <i>et. al.</i> , 2002
<i>Pan</i> <i>agr III</i>	ATGCACATGGTGCACATGC GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	323 pb	Gilto <i>et. al.</i> , 2002
<i>Pan</i> <i>agr IV</i>	ATGCACATGGTGCACATGC CGATAATGCCGTAATACCCG	659 pb	Giltot <i>et. al.</i> , 2002

Tabla 1. Primers utilizados en la detección de los genotipos *rbf*, *sarA* y los grupos de *agr*

Análisis de las muestras amplificadas por electroforesis en Geles de

Agarosa

Después de la amplificación del ADN, 8 µL de cada muestra fue analizada por electroforesis en geles de agarosa al 1 ó 2% según el genotipo, bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliampers por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con BrEt y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK).

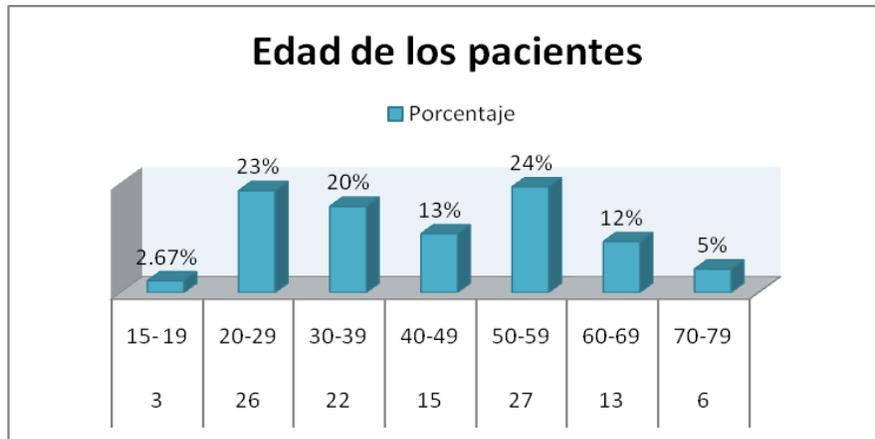
RESULTADOS

Pacientes analizados

Se analizaron microbiológicamente los catéteres de 112 pacientes, dentro de los cuales el 43% (n = 48) fueron mujeres y el 57% (n = 64) hombres (gráfica 1). La edad de los pacientes se encontró en el rango de 17 a 77 años (gráfica 2). El rango de edad más abundante fue el de 50-59 años con 24% (n = 27), seguido por el de 20-29 años con 23% (n = 26), 30-39 años con 20% (n = 22), de 40-49 años con 13% (n = 15), de 60-69 años con 12% (n=13), de 70-79 años con 5% (n = 6) y finalmente el rango menos frecuente fue el de 15-19 años con 2.67% (n = 3).



Gráfica 1. Distribución de los pacientes analizados por sexo



Gráfica 2. Distribución de los pacientes por rango de edad.

Origen de las muestras de los pacientes por hospital

Las 112 muestras de catéteres que se utilizaron en este estudio, provinieron de diferentes hospitales. El 39% (n = 44) provino del Hospital General Regional 72 del IMSS, seguido de un 26% (n = 29) que procedieron del Hospital General Regional No. 196 Aragón, el ISSEMyM (Satélite) con un 21% (n = 23) y finalmente la UMAA (Unidad Médica de Atención Ambulatoria) No. 199 con el 14% (n = 16).

Causas de la Insuficiencia Renal Crónica de los pacientes

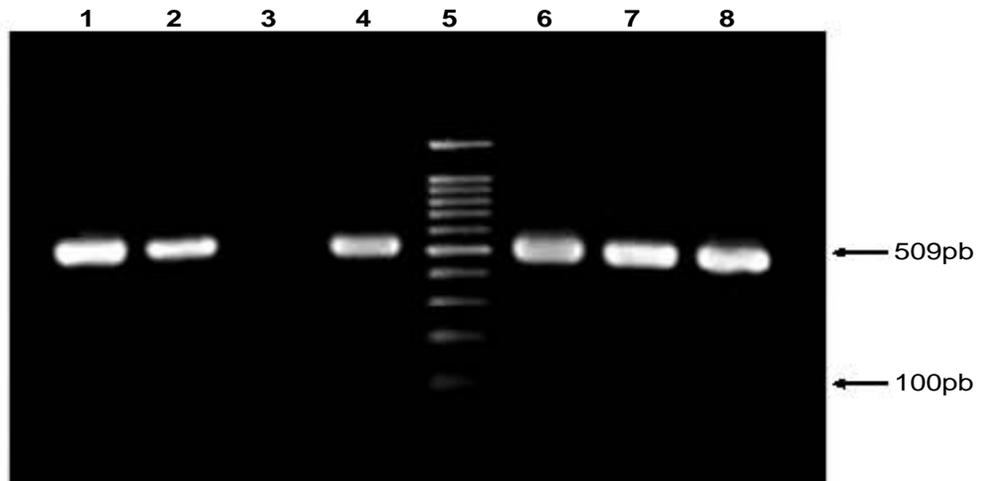
En la tabla 2 se muestran las causas de la IRC de los pacientes analizados, siendo la más frecuente la Diabetes Mellitus con el 30.76%, seguida de una enfermedad no determinada con el 27.5%, la Glomerulonefritis con el 18.68%, la Hipertensión Arterial con el 9.89%, la IRC secundaria con un 2.19% y el rechazo de trasplante renal con el 2.19%. Las que menos se presentaron fueron el Hipertiroidismo, la ERCT, Hiperuricemia, Malformación congénita, Nefritis lúpica, Poliquistosis renal, Preclampsia y Riñones poliquisticos con un 1.09% en cada una.

ETIOLOGÍA	No	%
Diabetes Mellitus	28	30.76
No determinada	25	27.47
Glomerulonefritis	17	18.68
Hipertensión Arterial	9	9.89
IRC Secundaria Vejiga Neurogénica	2	2.19
Rechazo trasplante renal	2	2.19
Hipertiroidismo	1	1.09
ERCT	1	1.09
Hiperuricemia	1	1.09
Malformación Congénita	1	1.09
Nefritis lúpica	1	1.09
Poliquistosis renal	1	1.09
Preclampsia	1	1.09
Riñones poliquísticos	1	1.09

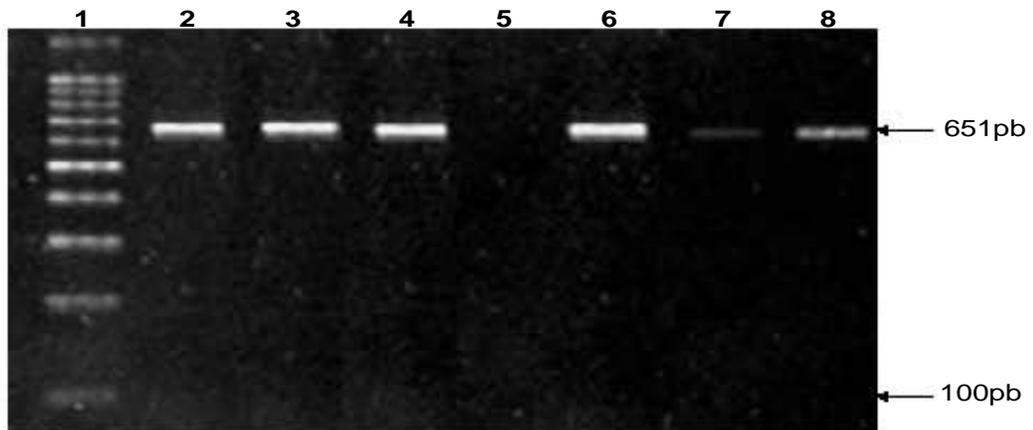
Tabla 2. Porcentaje de las causas de la IRC

Identificación de *Staphylococcus aureus* por PCR convencional

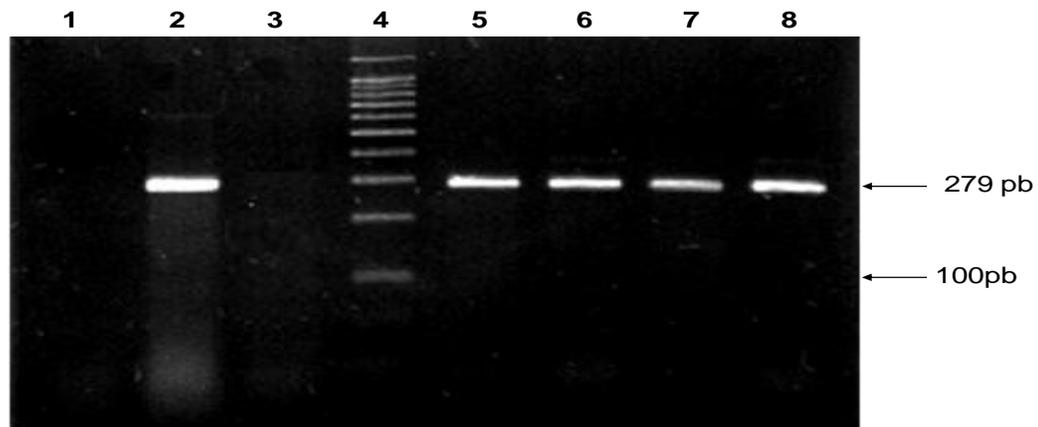
La identificación de *S. aureus* por el método de PCR se realizó mediante la detección de los marcadores cromosómicos *femA*, *femB* y *nuc*. A partir del total de los catéteres analizados (n = 112), *S. aureus* se identificó en el 49% (n = 55) de los catéteres (fotografías 1, 2 y 3) y *Staphylococcus epidermidis* en el 51% (n = 57) (gráfica 3).



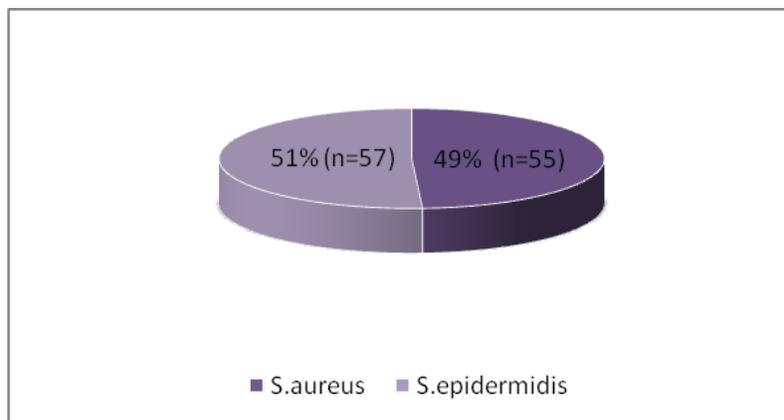
Fotografía 1. Gel de agarosa al 2%. Detección por PCR de *femA* en *S. aureus*. Carril 1; Control positivo (*S. aureus* ATCC 33592). Carril 3; Control negativo (*S. epidermidis* ATCC 35984). Carril 5; MWM (100 pb ladder). Carriles; 2,4,6,7 y 8 *femA* en cepas de *S. aureus*



Fotografía 2. Gel de agarosa al 2%. Detección de *femB* por PCR en *S. aureus*. Carril 1; MWM (100 pb ladder). Carril 2 Control positivo (*S. aureus* ATCC 33592). Carril 5; Control negativo (*S. epidermidis* ATCC 35984). Carriles; 3,4,6,7 y 8 *femB* en cepas de *S. aureus*



Fotografía 3. Gel de agarosa al 2%. Detección de *nuc* por PCR en *S. aureus*. Carril 1; Control negativo (*S. epidermidis* ATCC 35984). Carril 2; Control positivo (*S. aureus* ATCC 33592). Carril 3; cepa negativa de *S. aureus*. Carril 4; MWM (100 pb ladder). Carriles; 5,6,7 y 8 *nuc* en cepas de *S. aureus*



Gráfica 3. Prevalencia de *S. aureus* y *S. epidermidis* en los catéteres de los pacientes de hemodiálisis

Detección del polisacárido de adhesión intercelular en Agar Rojo Congo (CRA)

En la figura 2 se aprecia que el 71% (n = 39) de las cepas de *S. aureus* analizadas fue productora del polisacárido y el 29% (n = 16) fue negativa. Como control

positivo se utilizó la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 33592 y como control negativo la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228.



Figura 2. Detección del polisacárido de adhesión intercelular en el medio Rojo Congo

Cuantificación de la formación de la biopelícula de *S. aureus* mediante la adhesión a placas de microtítulo de poliestireno

En la figura 3 se observa la cuantificación de la biopelícula en las cepas de *S. aureus* mediante la adhesión a placas de poliestireno. El 73% (n = 40) de las cepas produjo biopelícula y el 27% (n = 15) no formó biopelícula. Como controles positivos se utilizaron las cepas de referencia *S. aureus* ATCC 33592 y *S. epidermidis* ATCC 35984 y como control negativo la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228.

Interpretación: U.de abs.
 Neg.----- menos de 0.2
 Moderado- 0.2-1.0
 Fuerte ----- más 1.0

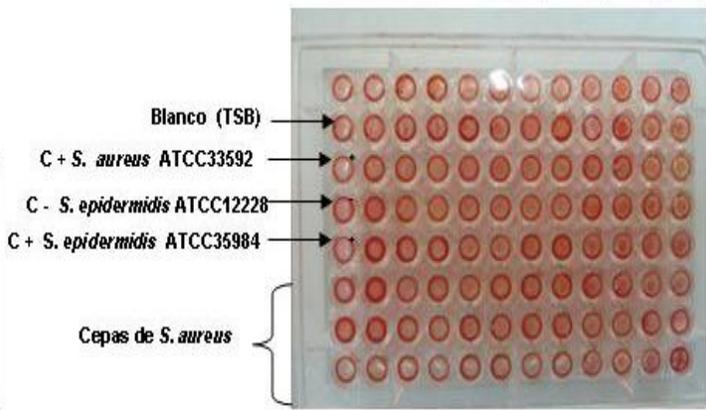


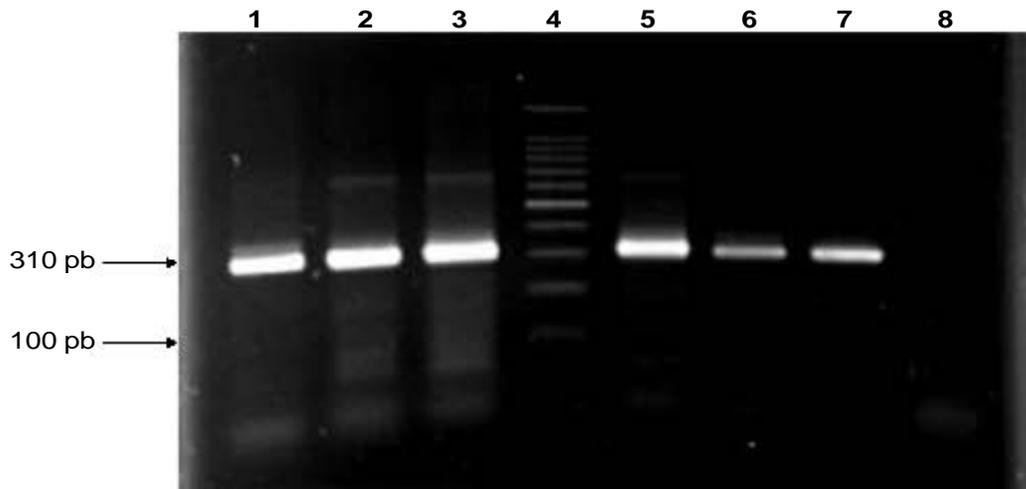
Figura 3. Cuantificación de la biopelícula por *S. aureus* mediante la adhesión a placas de poliestireno.

Detección de los genes de virulencia y de resistencia a antibióticos en *S. aureus* por PCR convencional

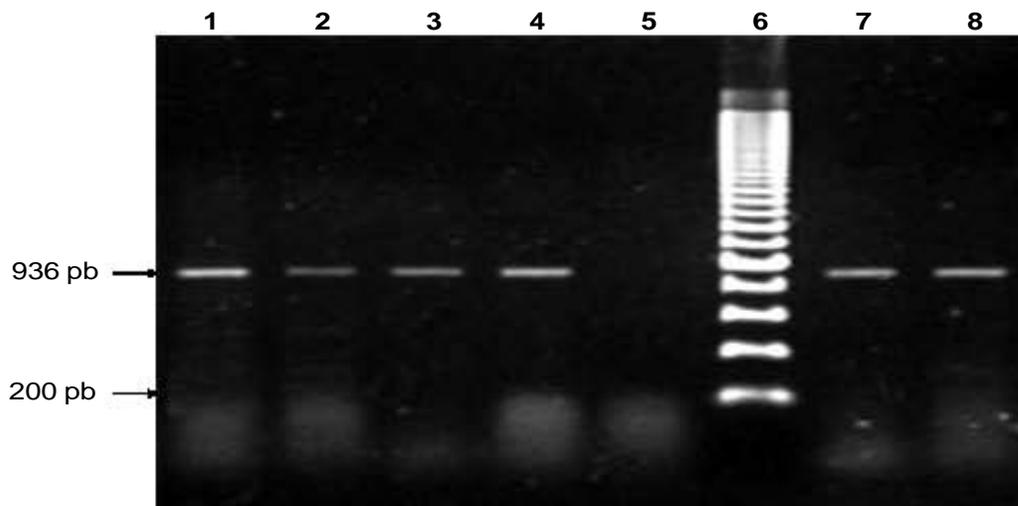
En la tabla 3 y fotografías 4-8 se presentan las frecuencias de los genes de virulencia y de resistencia a los antibióticos identificados en las cepas de *S. aureus* estudiadas. El genotipo *mecA* se detectó en el 82% (n = 45) de las cepas y el gen *ileS-2* no se identificó en ninguna. El genotipo *icaA* se detectó en el 96% (n = 53), *rbf* en el 40% (n = 22), *sarA* en el 75% (n = 41) y *agr* en el 100% (n = 55).

Genotipo	No. de cepas	%
<i>mecA</i>	45	82
<i>mup</i>	0	0
<i>icaA</i>	53	96
<i>rbf</i>	22	40
<i>sarA</i>	41	75
<i>agr</i>	55	100

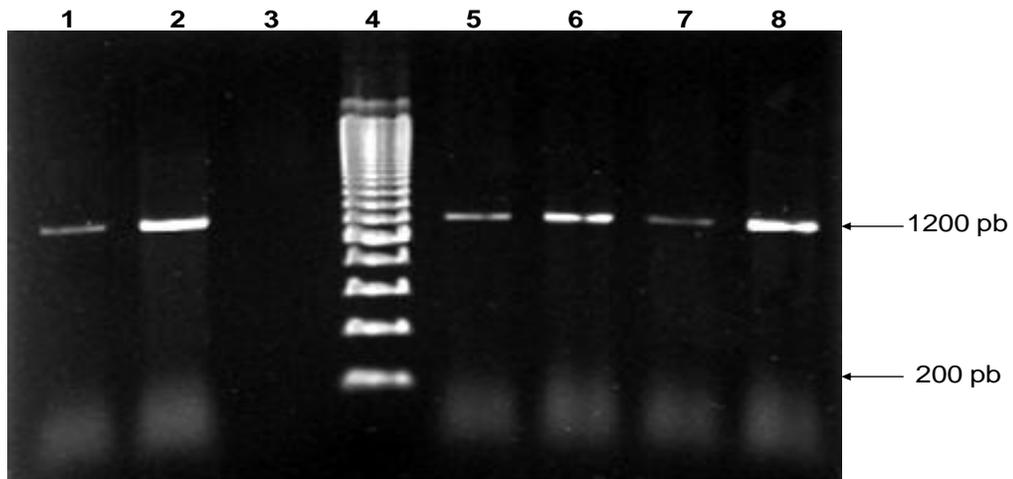
Tabla 3. Porcentaje de genes identificados en las cepas de *S. aureus*



Fotografía 4. Gel de agarosa al 2%. Detección por PCR de *mecA* en *S. aureus*. Carril 1; Control positivo de *mecA* (*S. aureus* ATCC 33592). Carril 8; Control negativo de *mecA* (*S. aureus* ATCC 25923). Carril 4; MWM (100 pb ladder). Carriles; 2, 3, 5, 6 y 7 *mecA* en cepas de *S. aureus*



Fotografía 5. Gel de agarosa al 1%. Detección por PCR de *icaA* en *S. aureus*. Carril 1; Control positivo de *icaA* (*S. aureus* ATCC 33592). Carril 5; Control negativo de *icaA* (*S. aureus* ATCC 12228). Carril 6; MWM (200 pb ladder). Carriles; 2, 3, 4, 7 y 8 *icaA* en cepas de *S. aureus*

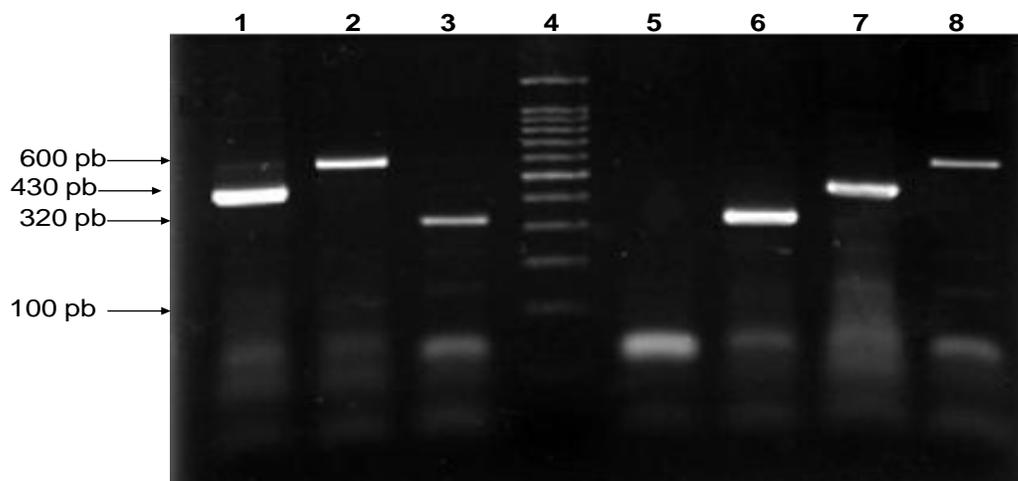


Fotografía 6. Gel de agarosa al 1%. Detección por PCR de *rbf* en *S. aureus*. Carril 1; Control positivo (*S. aureus* ATCC 33592). Carril 3; Control negativo (sin ADN templado). Carril 4; MWM (200 pb ladder). Carriles; 2, 5, 6, 7 y 8 *rbf* en cepas de *S. aureus*

En la tabla 4 y fotografía 8 se aprecian los distintos grupos de *agr*. El grupo *agr* I se detectó en el 24% (n = 13), el grupo *agr* II se detectó en el 25% (n = 14), el grupo *agr* III en el 18% (n = 10) y *agr* IV se identificó en el 11% (n = 6), en cada caso. También se encontró que el 9% (n = 5) de las cepas presentaron los grupos II y III, el 5% (n = 3) los grupos III y IV, el 4% (n = 2) los grupos I y II y finalmente el 2% (n = 1) los grupos I y III; I, II y III.

Grupo	No. de cepas	%
<i>agr</i> I	13	24
<i>agr</i> II	14	25
<i>agr</i> III	10	18
<i>agr</i> IV	6	11
<i>agr</i> II - III	5	9
<i>agr</i> III - IV	3	5
<i>agr</i> I - II	2	4
<i>agr</i> I - III	1	2
<i>agr</i> I - II - III	1	2
Total	55	100

Tabla 4. Distribución de los diferentes grupos de *agr* detectados en las cepas de *S. aureus*



Fotografía 8. Gel de agarosa al 2%. Detección por PCR multiplex de *agr* en *S. aureus*. Carril 1; Control positivo de *agr* tipo I (Sa111). Carril 2; Control positivo de *agr* tipo II (Sa110). Carril 3; Control positivo de *agr* tipo III (Sa100). Carril 4; MWM (100 pb ladder). Carril 5; Control negativo (sin ADN templado). Carriles; 6, 7 y 8 *agr* tipo I, II, III en cepas de *S. aureus*.

Asociación de los marcadores de virulencia y de resistencia a la meticilina en las cepas de *S. aureus*

Se encontraron 14 patrones diferentes en las 55 cepas de *S. aureus* analizadas (Tabla 5). El patrón 1 (*mecA/icaA/sarA*) se identificó en 12 cepas (21.81%), el patrón 2 (*mecA/icaA/sarA/rbf/agr*) se identificó en 9 cepas (16.36%), el patrón 3 (*mecA/icaA/sarA/rbf*) se identificó en 7 cepas (12.72%), el patrón 4 (*mecA/icaA/agr*) se identificó en 5 cepas (9.09%), el patrón 5 (*icaA/sarA*) se identificó en 5 cepas (9.09%), el patrón 6 (*mecA/icaA*) se identificó en 4 cepas (7.27%), el patrón 7 (*mecA/icaA/sarA/agr*) se identificó en 4 cepas (7.27%), el patrón 8 (*icaA/sarA/agr*) se identificó en 2 cepas (3.63%), el patrón 9 (*mecA/icaA/rbf/agr*) se identificó en 2 cepas (3.63%), el patrón 10 (*mecA/icaA/rbf*) se identificó en 1 cepa (1.81%), el patrón 11 (*mecA/rbf/agr*) se identificó en 1 cepa (1.81%), el patrón 12 (*sin genotipos*) se identificó en 1 cepa (1.81%), el patrón 13 (*icaA/sarA/rbf/agr*) se identificó en 1 cepa (1.81%) y el patrón 14 (*icaA/sarA/rbf*) se identificó en 1 cepa (1.81%).

No. de patrón	Genotipos	No. de cepas	Porcentaje
1	<i>mecA/icaA/sarA</i>	12	21.81
2	<i>mecA/icaA/sarA/rbf/agr</i>	9	16.36
3	<i>mecA/icaA/sarA/rbf</i>	7	12.72
4	<i>mecA/icaA/agr</i>	5	9.09
5	<i>icaA/sarA</i>	5	9.09
6	<i>mecA/icaA</i>	4	7.27
7	<i>mecA/icaA/sarA/agr</i>	4	7.27
8	<i>icaA/sarA/agr</i>	2	3.63
9	<i>mecA/icaA/rbf/agr</i>	2	3.63
10	<i>mecA/icaA/rbf</i>	1	1.81
11	<i>mecA/rbf/agr</i>	1	1.81
12	<i>sin genotipos</i>	1	1.81
13	<i>icaA/sarA/rbf/agr</i>	1	1.81
14	<i>icaA/sarA/rbf</i>	1	1.81

Tabla 5. Patrones de los marcadores de virulencia y *mecA* en las cepas de *S. aureus*

DISCUSION

Pacientes analizados

Para la realización de este estudio se analizaron los catéteres de 112 pacientes con Insuficiencia Renal Crónica (IRC) que presentaron infección en el sitio de inserción del catéter tipo Mahurkar durante su asistencia al servicio de hemodiálisis, dentro de los cuales el 43% (n = 48) fueron mujeres y el 57% (n = 64) hombres (Figura 1). La Insuficiencia Renal Crónica (IRC) es una enfermedad progresiva que se caracteriza por el deterioro de la función renal (una disminución del filtrado glomerular), ésta afecta a un porcentaje significativo de la población y las causas principales son la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, y la enfermedad vascular. (Hernando *et. al.*, 2009).

En este estudio describimos que las etiologías de la IRC de los pacientes analizados, fueron la diabetes mellitus con un 31% (n = 28), seguido de alguna

etiología no determinada con un 27% (n = 25), Glomerulonefritis con 19% (n = 17) y la Hipertensión Arterial con 10% (n = 9) (tabla 2). Estos datos coinciden con lo reportado por Hernando *et. al.*, (2009), quienes mencionan que hoy en día las causas más frecuentes de la IRC son el incremento de la diabetes mellitus tipo II, las Enfermedades Vasculares Renales, la Glomerulonefritis, la Hipertensión Arterial y envejecimiento de la población, al menos en los países desarrollados y subdesarrollados.

En un estudio realizado por la American Diabetes Association (Rosas *et. al.*, 2010) describió que la diabetes y otras enfermedades crónicas degenerativas son hoy en día, los problemas de salud principales en América Latina. El predominio de la diabetes en varios de estos países latinoamericanos está entre el más alto del mundo, uno de ellos es México. Tan solo en el año 2000 el costo anual para el cuidado de la diabetes en América Latina fue de 65 mil millones de dólares, de los cuales 15 mil millones se obtuvieron de México.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) en el año 2000 reportó que en el continente americano se estima que hay 35 millones de personas que padecen diabetes mellitus tipo II, de los cuales 19 millones viven en América Latina, por ello si se sigue con esta tendencia la cifra ascenderá en ésta región a 40 millones de personas con DM2 para el año 2025. Siendo así que la prevalencia de esta enfermedad en menores de 30 años es menor al 5% y después de los 60 años se incrementa a más del 20%. (González *et. al.*, 2004)

Con esta expectativa de la enfermedad y la creciente prevalencia de DM2 en México se estima que los gastos, hoy y en un futuro, para los tratamientos de ésta

y otras enfermedades causadas por ella como la IRC pueden ser muy elevados, representando así un costo enorme para las instituciones públicas de nuestro país.

Prevalencia de *Staphylococcus aureus* en los catéteres de los pacientes analizados

En este estudio utilizamos un método de PCR convencional que nos permitió identificar a *Staphylococcus aureus* mediante la detección de los marcadores cromosómicos *femA*, *femB* y *nuc* (fotografías 1, 2 y 3). La frecuencia de *Staphylococcus aureus* en los sitios de infección de los catéteres fue del 49% (n = 55). Se ha descrito que entre las complicaciones más frecuentes en los pacientes de hemodiálisis, son las infecciones en el sitio de inserción del catéter (Stolić *et. al.*, 2008), principalmente por *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Martín-López *et. al.*, 2002). El tratamiento de las bacteremias asociadas a los catéteres se ha complicado en los últimos años, debido a la selección de bacterias resistentes a los antibióticos. (López-Aguilar *et. al.*, 2007).

El uso indiscriminado e inapropiado de los antibióticos ha conducido al surgimiento de cepas resistentes a la meticilina en *S. aureus* (MRSA) (Francois *et. al.*, 2003), y a otros antibióticos betalactámicos. De esta manera, la contaminación de los catéteres por cepas de *S. aureus* representa un grave problema de salud, que puede desencadenar en endocarditis, bacteremia, septicemia o shock séptico, que pueden llegar a comprometer la vida del paciente. (Deurenberg *et. al.*, 2007), (Campbell *et. al.*, 2008), (Grisold *et. al.*, 2002)

Para este estudio identificamos a *S. aureus* mediante la detección por PCR de los marcadores cromosómicos *femA* y *femB* descritos por Kobayashi *et. al.*, 1994. Este ensayo de PCR nos permitió identificar con precisión las infecciones de los

sitios de inserción ocasionadas por *S. aureus* de las ocasionadas por *S. epidermidis*. Se ha descrito que los genes *femA* y *femB* codifican para proteínas que considerablemente afectan los niveles de resistencia a la meticilina. (Berger *et. al.*, 1989). Otro de los genes que se utilizó para la detección de *S. aureus* fue el gen de la term nucleasa (*nuc*), el cual se ha descrito como uno de los marcadores más importantes en la identificación de *S. aureus*. (Nashev *et. al.*, 2004)

Detección del polisacárido de adhesión intercelular (PIA) en *S. aureus* utilizando el Agar Rojo Congo y la formación de biofilm en placas de microtítulo de poliestireno

En este estudio se utilizó un método cualitativo para la detección del PIA en Agar Rojo Congo (CRA) descrito por Freeman *et. al.*, 1989 y el método cuantitativo para la formación del biofilm fue mediante la adhesión a placas de microtítulo de poliestireno (Rode *et. al.*, 2007). En el 71% de las cepas de *S. aureus* (n = 39) estudiadas se detectó el PIA mediante el método de Agar Rojo Congo, y el 73% (n = 40) de las cepas fue productora del biofilm en placas de microtítulo de poliestireno. Tres cepas de *S. aureus* fueron productoras fuertes de biofilm, mientras que las demás fueron productoras moderadas de biofilm.

Este resultado es parecido al publicado por Ziebuhr *et. al.*, (1997) que determinaron la morfología colonial y el cambio fenotípico en CRA, así como la adherencia inicial en superficies de polímero en placas de poliestireno a 52 cepas de *S. epidermidis* aisladas de los dispositivos médicos de pacientes con infección, encontrando que 87% (45 de 52) fueron formadoras de biofilm en las placas, mientras que en el CRA la misma cantidad de cepas crecieron como colonias

negras, resultando ser positivas. Lo que claramente comparándolo con nuestro trabajo solo hubo una cepa que discrepo entre ambas técnicas.

En otro estudio, Arciola *et. al.* (2001) analizaron 91 cepas aisladas de infecciones en catéteres intravenosos, de las cuales 68 fueron *S. epidermidis* y 23 *S. aureus*, determinando la producción de biofilm en CRA, encontrando que 33 de 68 (48.5%) cepas de *S. epidermidis* y 14 de 23 (60.8%) cepas de *S. aureus* fueron positivas.

Estos mismos autores en 2005 analizaron 400 cepas clínicas de *S. epidermidis* aisladas de infecciones asociadas a prótesis, determinando la producción de biofilm por CRA, publicando que 228 de 400 cepas (57%) formaron colonias negras o casi negras.

Ellos mencionan que entre las 172 cepas que formaron colonias rojas (no formaron biofilm) 8 cepas demostraron presentar un sistema completo de genes *ica*, sugiriendo la posibilidad de que cierta condición ambiental o la presencia de genes accesorios pueden influenciar el comportamiento fenotípico en la placa de CRA, dando colonias que no expresaron completamente los genes *ica*. Considerando esto, esta puede ser la explicación por la que en este estudio también se hayan encontrado tales diferencias.

Además, Zmantar *et. al.* (2008) examinaron 46 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infección auricular, evaluando la detección cualitativa de la formación de biofilm mediante el cultivo en CRA, obteniendo que 26 cepas (56.5%) fueron productoras desarrollando colonias casi negras o muy negras. Reportan que las cepas productoras de biofilm en *S. aureus* son más virulentas y son responsables de severas infecciones postquirúrgicas. Asimismo, mencionan que en cepas clínicas la PCR permite el diagnóstico rápido de cepas virulentas

productoras de biofilm con respecto al método tradicional de cultivo en CRA, el cual requiere mucho más tiempo.

Un trabajo diferente fue el de Rode *et. al.* (2007) que trabajaron con 11 cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes brotes alimenticios, aplicando la prueba de adhesión a placas de poliestireno y probando una gran diversidad de patrones complejos de la formación de biofilm en estas cepas, exponiéndolas a una variedad de combinaciones de temperaturas de crecimiento y concentraciones de etanol, glucosa y NaCl.

Estos autores reportaron que la presencia de una fuente apropiada de azúcar es esencial para la producción de PIA/PNAG, y que la concentración baja de azúcar constituye a menudo un factor limitador. Indicando así que la glucosa promueve la formación de biofilm en *S. aureus*, mientras que la Glucosa y NaCl por separado y/o junto, pueden incrementar la formación de biofilm, mediante la expresión del operon *icaADBC* en *S. epidermidis* y en *S. aureus*, por lo que pudiera ser el motivo de que la mayoría de las cepas analizadas hayan resultado formadoras de biofilm. Así parece ser que, la formación de biofilm pudiera ser una estrategia de supervivencia para *S. aureus*.

Por otro lado, Freeman *et. al.*, (1989) reporta que el método CRA es rápido, sensible, reproductivo y tiene la ventaja de que las colonias sigan siendo viables en el medio. Sin embargo, el mecanismo exacto del método Agar Rojo Congo es hasta ahora desconocido, aunque está claro que el cambio de color en las colonias ocurre solamente en las últimas etapas de la incubación sugiriendo que un producto secundario puede estar implicado.

Aunque las comunidades formadas por los staphylococci en placas de CRA se detectaron por los cambios en el aspecto colonial, este método se ha descrito como no recomendable para determinar la producción de biofilm en *S. aureus*. (Rode *et. al.*, 2007) (Freeman *et. al.*, 1989)

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

En este estudio describimos previamente que el gen *mecA* fue identificado en el 82% (n = 45) de las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres de los pacientes infectados (tabla 3, fotografía 4). Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) contienen en el cromosoma el gen *mecA*, el cual se encuentra localizado en un elemento genético móvil llamado Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) que le confiere resistencia frente a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, debido a la baja afinidad que posee para estos agentes (Chambers, 1997). Actualmente el International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) ha clasificado 11 diferentes tipos de SCC*mec* (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X y XI) (www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html). El SCC*mec* no es exclusivo de *S. aureus* ya que también se ha encontrado en otras especies de *Staphylococcus*, incluyendo *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, y *S. warneri* (Hanssen *et. al.*, 2004, Hanssen y Sollid, 2007, Takeuchi *et. al.*, 2005, Wisplinghoff *et. al.*, 2003) Se ha descrito que en algunas cepas de MRSA o en algunas circunstancias específicas (durante la ausencia de la presión selectiva antibiótica), SCC*mec* puede ser inestable y puede ser suprimido (Daskalaki *et. al.*, 2007; Desjardins *et. al.*, 2006). También, una fuerte exposición de las cepas MRSA a la vancomicina

puede conducir a la supresión de *mecA* (Donnio *et. al.*, 2007) y *S. aureus* puede desarrollar susceptibilidad al antibiótico suprimiendo todo o una porción de *SCCmec*. Cuando *SCCmec* es suprimido de las cepas MRSA, las cepas MSSA resultantes pueden portar un amplio número de determinantes de resistencia de los que usualmente son encontrados en cepas MSSA. (Donnio *et. al.*, 2007)

Se ha reportado que la transferencia de *mecA* de *S. epidermidis* a *S. aureus* puede ocurrir probablemente in vivo (Wielders *et. al.*, 2001). Sin embargo, los mecanismos responsables de la posible transferencia horizontal de *mecA* entre especies de *Staphylococcus* o entre diferentes especies Gram-positivas son desconocidos. (Ibrahim *et. al.*, 2009)

La epidemiología de infecciones por cepas MRSA ha cambiado por todo el mundo, de ser estrictamente nosocomial, ahora con frecuencia se encuentran cepas MRSA asociadas a la comunidad (CA). (Larsen *et. al.*, 2009)

La facilidad de transmisión de estas cepas resistentes entre pacientes de los hospitales, y la capacidad de las bacterias para transmitir genes de la resistencia conlleva a una amenaza para el control y tratamiento de MRSA en hospitales, puesto que los portadores son desconocidos y pueden llegar a causar una transmisión intra-hospital. (Larsen *et. al.*, 2009)

Por otro lado, Geha *et. al.* (1994) publica que el gen *mecA* no se expresa constantemente, y hay evidencia que sugiere que ciertos genes auxiliares tales como *femA*, *mecR1*, entre otros, pueden participar en el control de su expresión.

Desde la introducción de las penicilinas semisintéticas, tales como la meticilina y la oxacilina, para el tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus*, la presencia de cepas resistentes ha aumentado constantemente, el uso de los

antibióticos actualmente disponibles se ha reducido dramáticamente, por lo que, las infecciones con cepas MRSA requieren tratamiento de antibióticos glicopeptídicos tales como la vancomicina (Grisold *et. al.*, 2002).

Por otra parte el hecho de que ninguna de las cepas de *S. aureus* analizadas en este estudio fuera portadora del gen *ileS-2* que confiere la resistencia a la mupirocina, puede deberse a que este agente no se administra de manera tópica en ninguno de los pacientes que acuden a los diferentes servicios médicos de los hospitales del IMSS o ISSEMyM, en cuyo caso, las bacterias aún no se han seleccionado como resistentes a este antimicrobiano, sin embargo en España, en donde si se utiliza de manera tópica este agente, se ha incrementado la resistencia bacteriana de 7.7% en 1998 a 19% en 2000. (Pérez-Roth *et. al.*, 2002)

Detección de los genes *icaA*, *sar*, *rbf* y *agr* involucrados en la formación de biofilm

El gen *icaA* fue identificado en el 96% (n = 53) de las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres (tabla 3, fotografía 5). *Staphylococcus aureus* tiene la capacidad de adherirse a los catéteres y otros dispositivos médicos y formar una biopelícula (Mack *et. al.*, 2006) que protege a la bacteria frente a las defensas del hospedero e impide la penetración de ciertos antibióticos (Stewart, 2002). Se han descrito 4 fases en la formación de la biopelícula, unión (attachment), acumulación, maduración y dispersión (Christensen *et. al.*, 1994). La fase de unión parece ser mediada por diferentes tipos de adhesinas, principalmente por las MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) (Patti *et. al.*, 1994) que son las responsables de la unión inicial tanto a los tejidos naturales del hospedero como a los biomateriales, mientras que la fase de acumulación que

promueve la interacción de adhesión entre las células bacterianas (Götz, 2002) es debida a la síntesis del PIA (Polysaccharidic intercellular adhesin) codificado por 4 genes contenidos en el operón *ica* (*icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*) (Heilmann *et. al.*, 1996). PIA consiste en un polímero de *N*-acetilglucosamina, por lo que también ha sido llamado PNAG (Maira-Litran *et. al.*, 2002). Se ha reportado que el gen *icaR* que se encuentra inmediatamente localizado río debajo del operón *ica* codifica para un represor importante para la regulación ambiental de la expresión de *ica* (Valle *et. al.*, 2003).

El elevado porcentaje del gen *icaA* detectado en nuestras cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres (tabla 3, fotografía 5) es semejante al estudio reportado por Campbell *et. al.* (2008) que encontraron que el 89.6% (n = 56) de las cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones complicadas de piel (7 aisladas de catéteres) en pacientes de Estados Unidos, fueron positivas para este gen.

Existen otros trabajos como el de Zmantar *et. al.*, (2008) que publicaron que 36 cepas (78.26%) de 46 en total fueron positivas para *ica* en *S. aureus*. Ziebuhr *et. al.*, (1997) analizaron 52 cepas *S. epidermidis* aisladas de los dispositivos médicos de pacientes con infección, y mencionan que el gen *ica* estuvo presente en el 85% (44 de 52), presentándose así en la mayoría de las cepas. Demostraron que hay una fuerte correlación entre la producción del biofilm, las colonias negras en CRA y la presencia de los genes de adhesión intercelular. Martín-López *et. al.*, (2002) identificaron el operón *ica* en 55 (89.7%) de las 65 cepas de *S. aureus* analizadas, concluyendo que el operon *ica* es muy común entre cepas de *S. aureus*. Arciola *et. al.*, (2001) que determinaron la presencia de los genes *icaA* e *icaD* en 23 cepas *S. aureus* aisladas de catéteres con posible infección, encontrando que en todas las

muestras analizadas estuvieron presentes ambos genes. Esto se debe, principalmente como lo reportan ellos en un trabajo realizado en el 2005, a que el operon *ica* surge como un operon unido en el cual, sus genes están siempre del todo presentes o del todo ausentes.

Además, Cramton *et. al.*, (2001) publicaron que la pérdida del operon *ica* da lugar a una incapacidad para producir PIA y desarrollar biofilms, lo que demuestra la importancia de este operon en cepas de *S. aureus*.

Por otra parte, la diferencia encontrada en este trabajo entre la presencia de *ica* (96%, n = 53) (tabla 3, fotografía 5) y la producción de la biopelícula en Agar Rojo Congo (71%, n = 39) (figura 2) puede deberse al hecho de que la expresión del operón *ica* se encuentra sujeto a varios factores ambientales como niveles de glucosa, elevada osmolaridad (3% NaCl), anaerobiosis, temperatura, niveles de hierro y la concentración subinhibitoria de ciertos antibióticos (Cramton *et. al.*, 2001; Lim *et. al.*, 2004; Rachid *et. al.*, 2000). Estos datos corroboran lo propuesto por otros autores, quienes han descrito que la mayoría de las cepas de *S. aureus* son portadoras de *ica*, pero solo algunas de ellas expresan el operón *ica* y producen biopelícula en Agar Rojo Congo (Cramton *et. al.*, 1999; Arciola *et. al.*, 2001; Martin-Lopez *et. al.*, 2002). Un estudio reciente realizado en cepas de *S. epidermidis* demostró que no existió asociación entre la detección cualitativa de la biopelícula y la presencia de *ica* (Chaieb *et. al.*, 2005).

Es importante destacar que, en este estudio no se evaluaron las diferentes condiciones ambientales para la formación de la biopelícula en las cepas de *S.*

aureus estudiadas en las placas de CRA, por lo que se sugiere que en posteriores estudios se analicen estos factores involucrados en la formación de PIA.

Por otro lado, se ha descrito (Francois *et. al.*, 1996) que la adherencia bacteriana se ha considerado como un factor de virulencia que contribuye a las infecciones asociadas a los catéteres y otros dispositivos médicos. Estos autores han sugerido que la interacción bacteriana con los biomateriales tiene un papel crucial en el condicionamiento del progreso de estas infecciones severas. En esta interacción, las células bacterianas exhiben varios mecanismos, de acuerdo a las condiciones ambientales y características superficiales del material y de la bacteria.

En este trabajo describimos que el gen *rbf* fue detectado en el 40% (n = 22) de las cepas de *S. aureus* (tabla 3, fotografía 6). Se ha descrito que *rbf* codifica para una proteína reguladora transcripcional de 190 kDa que es necesaria para el desarrollo de la biopelícula en medios de cultivo con glucosa o NaCl, pero no regula la expresión del operón *ica* (Lim *et. al.*, 2004). Se ha propuesto que la proteína Rbf puede promover la expresión de un factor desconocido que se une a la región reguladora de *icaR*, reprimiendo de esta manera la síntesis del represor *icaR*. La represión de *icaR* permitiría el desbloqueo del promotor de *icaADBC*, y por consiguiente la activación del operón y la producción de PNAG (Cue *et. al.*, 2009).

El genotipo *sarA* se identificó en el 75% (n = 41) de las cepas de *S. aureus* (tabla 3, fotografía 7). Se ha reportado que mutaciones de *sarA* (staphylococcal accessory regulator) disminuyen la transcripción del operón *ica* y reducen la capacidad de producir PNAG (Valle *et. al.*, 2003). La proteína SarA puede promover la formación de la biopelícula de una manera indirecta suprimiendo la

transcripción del represor de PNAG o mediante una proteína envuelta en activar/desactivar (turnover) la síntesis de PNAG (Valle *et. al.*, 2003). SarA también regula la síntesis de proteínas de unión a fibronectina y fibrinógeno, hemolisinas, enterotoxinas, la toxina TSST-1, la síntesis de cápsula, proteasas, proteína A y proteínas de unión a la colágena. Además SarA se une a los promotores de *agr* y regula la transcripción de RNAIII (Blevins *et. al.*, 1999; Cheung *et. al.*, 1992; Cheung *et. al.*, 2001; Cheung *et. al.*, 2008; Manna y Cheung, 2006; Manna y Ray, 2007; Rehtin *et. al.*, 1999; Schmidt *et. al.*, 2001).

Entre los trabajos que investigaron con mutaciones de *sarA* se encuentra el publicado por Trottonda *et. al.* (2005) que trabajaron con cuatro cepas *S. aureus*, reportando que dieron como resultado una baja regulación en la transcripción del operon *ica*, por lo que, disminuyeron la producción de PNAG y deterioraron totalmente el desarrollo del biofilm, además sugieren que *sarA* es un regulador importante que controla la formación de biofilm en *S. aureus* por varios mecanismos. Beenken *et. al.*, (2004) generaron mutaciones de *sarA* en cepas aisladas clínicamente de *S. aureus* y examinaron su relativa capacidad de formar biofilm *in vitro*, encontrando que esta mutación da como resultado una capacidad reducida para formar biofilm, y que también se reduce la transcripción del operon *ica* y por lo tanto la producción de PNAG.

Por otra parte, reportamos en este estudio que el grupo *agr* I se identificó en el 24% (n = 13), el grupo *agr* II en el 25% (n = 14), el grupo *agr* III en el 18% (n = 10) y el grupo *agr* IV en el 11% (n = 6) de las cepas de *S. aureus*. (tabla 4, fotografía 8)

Se ha postulado la posible relación entre un grupo de *agr* y la capacidad de inducir una enfermedad específica de *S. aureus*, tal es el caso de cepas *agr* I o II implicadas en enfermedades de enterotoxinas *Staphylococcus* (SE), cepas *agr* III relacionadas a enfermedades mediadas por la TSST-1 (síndrome del shock tóxico toxina 1) y cepas *agr* IV envueltas en el síndrome exfoliativo generalizado y al impétigo bulloso (Jarraud *et. al.*, 2002), la asociación de *agr* IV en cepas productoras de ET (Jarraud *et. al.*, 2000), y cepas aisladas de narinas y de sangre portadoras de *agr* II con genes *lukD-lukE* (Von Eiff *et. al.*, 2004).

En este estudio también describimos que el 9% (n = 5) de las cepas presentó dos grupos de *agr* (II y III), el 5% (n = 3) los grupos III y IV, el 4% (n = 2) los grupos I y II, el 2% (n = 1) los grupos I y III y también el 2% (n = 1) los grupos I, II y III. Las cepas de *S. aureus* portadoras de los grupos *agr* I y II y *agr* I y III han sido descritas previamente y se ha postulado que probablemente estas cepas se encuentran en un proceso de evolución de un grupo a otro (Gilot *et. al.*, 2002).

Se ha descrito que en el locus *agr* existe una región hipervariable entre las cepas de *Staphylococcus aureus* que comprende: la secuencia de nucleótidos que codifica para *AgrD*, la secuencia para las dos terceras partes de la porción C-terminal de *AgrB* y la secuencia que codifica para la porción N-terminal de *AgrC*. Esta variación en la secuencia de nucleótidos entre las cepas, ha permitido la clasificación del operón *agr* en 4 grupos distintos (I, II, III y IV). (Gilot *et. al.*, 2002; Jarraud *et. al.*, 2000; Nagao *et. al.* 2009; Jarraud *et. al.*, 2002)

La distribución de los distintos grupos de *agr* detectado en las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres, evidencio la virulencia de las bacterias, sobre todo

considerando que el locus *agr* es capaz de regular la producción de la mayoría de las exoproteínas, incluyendo exoenzimas, toxinas, proteínas de superficie y otros factores de virulencia (Ji *et. al.*, 1995).

La presencia de los distintos grupos de *agr* en cepas de *S. aureus* ha sido descrita por otros autores, por ejemplo Jarraud *et. al.* (2000) realizaron un estudio en 15 cepas de *S. aureus*, reportando que 8 cepas presentaron el grupo IV, 2 el grupo I y 5 el grupo II. Estos autores también reportaron que existe una relación entre las cepas poseedoras del grupo IV de *agr* y la producción de la toxina exfoliativa (ET). Jarraud *et. al.* (2002) analizaron 198 cepas de *S. aureus*, encontrando que 61 cepas presentaron el grupo I, 49 el grupo II, 43 el grupo III y 45 el grupo IV. Croes *et. al.* (2009) analizaron once cepas de *S. aureus*, reportando que 5 cepas presentaron el grupo I, 3 el grupo II, 2 el grupo III y 1 el grupo IV. Finalmente, Francois *et. al.* (2006) analizaron 80 cepas de *S. aureus*, obteniendo que 18 pertenecieron al grupo I, 20 al grupo II, 20 al grupo III y 22 al grupo IV, reportando que el grupo II de *agr* predominó entre las cepas que contienen el gen de la toxina *lukD-lukE*.

CONCLUSIONES

1. *Staphylococcus aureus* fue responsable del 49% de las infecciones provocadas en los catéteres de los pacientes analizados con IRC que asistieron al servicio de hemodiálisis.
2. Se demostró la producción del polisacárido adhesivo intercelular en la mayoría de las cepas bacterianas aisladas de los catéteres mediante el Agar Rojo Congo y la adhesión a placas de microtítulo de poliestireno.
3. Las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres fueron elevadamente patógenas debido a la presencia de los genotipos *icaA*, *sarA*, *rbf* y los diversos grupos de *agr* que han sido asociados a algunas enfermedades.
4. La elevada frecuencia del genotipo *mecA* evidenció el notable incremento de las cepas MRSA en las infecciones asociadas a los catéteres en nuestro país, por lo que se prescribió el tratamiento adecuado para erradicar la bacteria de los pacientes con IRC analizados en este estudio.
5. Se recomienda la desinfección y la esterilización de los materiales e instrumentos antes de conectar a los pacientes a las máquinas de hemodiálisis, para evitar la contaminación y posteriormente las infecciones provocadas por cepas multiresistentes de *Staphylococcus aureus*, que además pueden provocar el deceso de los pacientes con IRC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allon M. 2004. Dialysis catheter-related bacteremia: Treatment and Prophylaxis. *Am J Kidney Dis.* 5:779-791.
2. Anthony RM, Connor AM, Power EGM y French GL. 1999. Use of the polymerase chain reaction for rapid detection of high-level mupirocin resistance in staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 18:30–34.
3. Arciola CR, Baldassarri L y Montanaro L. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter associated infections. *J Clin Microbiol.* 39:2151–2156.
4. Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L y Montanaro L. 2005. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis- associated infections. Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res.* 75A: 408–413.
5. Barber M. 1961. Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol.* 14:385–393
6. Beenken KE, Blevins JS y Smeltzer MS. 2003. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect Immun.* 71:4206–4211.
7. Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Blevins JS y Smeltzer MS. 2004. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Bacteriology.* 186:4665-4684.

8. Berger-Bachi B, Barberis-Maino L, Strassle A y Kayser FH. 1989. *FemA*, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. *Mol Gen Genet.* 219: 263-9.
9. Berns JS. 2003. Infection with antimicrobial-resistant microorganisms in dialysis patients. *Seminars in Dialysis.* 16:30–37.
10. Blevins JS, Gillaspay AF, Rehtin TM, Hurburt BK y Smeltzer MS. 1999. The staphylococcal accessory regulator (*sar*) represses transcription of the *S. aureus* collagen adhesin gene (*cna*) in an *agr*-independent manner. *Mol Microbiol.* 33:317–326.
11. Boles BR y Horswill AR. 2008. *agr*- Mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* 4(4): e1000052. doi:10.1371/journal.ppat.1000052.
12. Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, Bae In-Gyu, Stryjewski ME, Federspiel JJ, Tonthat GT, Rude T H, Barriere SL, Corey R. y Fowler VG. 2008. Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *Journal of Clinical Microbiology.* 46:678-684.
13. Chaieb K, Mahdouani K y Bakhrouf A. 2005. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *J Hosp Infect.* 61:225–230.
14. Chambers HF. 1997. Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 10:781-791.

15. Cheung AL, Koomey JM, Butler CA, Projan SJ y Fischetti VA. 1992. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. Proc Natl Acadb Sci USA. 89:6462–6466.
16. Cheung AL, Nishina KA, Trotonda MP y Tamber S. 2008. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. Int J Bioche Cell Biol. 40:355–361.
17. Cheung AL, Schmidt KA, Bateman B y Manna AC. 2001. SarS, a SarA homolog repressible by *agr*, is an activator of protein A synthesis in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 69:2448–2455.
18. Christensen GD, Baldassarri L, Simpson WA. 1994. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. p. 45–78. In A. L. Bisno and F. A. Waldvogel (ed.). Infections associated with indwelling medical devices, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
19. Conlon KM, Humphreys H y O’Gara JP. 2002. Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. FEMS Microbiology Letters. 216:171-177.
20. Cramton SE, Gerke C, Schnell F, Nichols WW, Götz F. 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect Immun. 67:5427–5433.
21. Cramton SE, Ulrich M, Gotz F y Doring G. 2001. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun. 69:4079–4085.
22. Croes S, Deurenberg RH, Boumans ML, Beisser PS, Neef C y Stobberingh EE. 2009. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic

- glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. BMC Microbiology. 9:229:1-9.
- 23.** Cue D, Lei MG, Luang TT, Kuechenmeister L, Dunman PM, O'Donnell S, Rowe S, O'Gara JP y Lee CY. 2009. Rbf Promotes Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* via Repression of *icaR*, a Negative Regulator of *icaADBC*. J Bacteriol. 191:6373-6377.
- 24.** Daskalaki M, Otero JR, Sanz F y Chaves F. 2007. Bacteremia due to clonally derived methicillin-resistant, gentamicin-susceptible isolates and methicillin-susceptible, gentamicin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 45:3446–3448.
- 25.** Davey ME y O'Toole GA. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev. 64:847–867.
- 26.** Davies D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov. 2:114–122.
- 27.** Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW y Greenberg EP. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science. 280:295–298.
- 28.** Desjardins M, Guibord C, Lalonde B, Toye B y Ramotar K. 2006. Evaluation of the IDI-MRSA assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasal and rectal specimens pooled in a selective broth. J Clin Microbiol. 44:1219–1223.
- 29.** Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA y Stobberingh EE. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 13:222-235.

- 30.** Donland RM. 2001. Biofilm formation: A clinical relevant microbiologic proces. *Clin Infect Dis.* 33:1387-1392.
- 31.** Donnio PY, Fevrier F, Bifani P, Dehem M, Kervegant C, Wilhelm N, Gautier-Lerestif AL, Lafforgue N, Cormier M y Le Coustumier A. 2007. Molecular and epidemiological evidence for spread of multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:4342–4350.
- 32.** Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H y Spratt BG. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci. USA.* 99:7687–7692.
- 33.** Fitzpatrick F, Humphreys H y O'Gara JP. 2005. The genetics of staphylococcal biofilm formation will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection. *Clin Microbiol Infect.* 11:967–973.
- 34.** Fluckiger U, Ulrich M, Steinhuber A, Doring G, Mack D, Landmann R, Goerke C y Wolz C. 2005. Biofilm Formation, *icaADBC* Transcription, and Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis by Staphylococci in a Device-Related Infection Model. *Infection and Immunity.* 73:1811–1819.
- 35.** Francois P, Bento M, Renzi G, Harbarth S, Pittet D y Schrenzel J. 2007. Evaluation of three molecular assays for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 45:2011–2013.
- 36.** Francois P, Koessler T, Huyghe A, Harbarth S, Bento M, Lew D, Etienne J, Pittet D y Schrenzel J. 2006. Rapid *Staphylococcus aureus agr* Type

- Determination by a Novel Multiplex Real-Time Quantitative PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:1892–1895.
- 37.** Francois P, Pittet D, Bento M, Pepey B, Vaudaux P, Lew D y Schrenzel J. 2003. Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Sterile or Nonsterile Clinical Samples by a New Molecular Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:254–260.
- 38.** Francois P, Vaudaux P, Foster TJ y Lew D P. 1996. Host-bacteria interactions in foreign body infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 17:514–520.
- 39.** Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S y Lemeland JF. 2000. PCR-Based Assay for Discrimination between Invasive and Contaminating *Staphylococcus epidermidis* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:877-880.
- 40.** Freeman D, Falkiner FR y Keane CT. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*. 42:872–874.
- 41.** Furukawa S, Kuchma SL y O'Toole GA. 2006. Keeping their options open: acute versus persistent infections. *J Bacteriol*. 188:1211–1217.
- 42.** Geha DJ, Uhl JR, Gustaferrero CA y Persing DH. 1994. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 32:1768–1772.
- 43.** Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O y Götze F. 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem*. 273:18586–18593.

44. Gilot P, Gérard L, Cochard T y Poutrel B. 2002. Analysis of the Genetic Variability of Genes Encoding the RNA nIII-Activating Components Agr and TRAP in a Population of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cows with Mastitis. J Clin Microbiol. 40:4060–4067.
45. González L, Flores V y Vélez Ma. G. 2004. Valoración de factores de riesgo para DM2 en una comunidad semiurbana de la Ciudad de México. Rev Enferm IMSS. 12:65-70.
46. Götz F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. Mol Microbiol. 43:1367–1378.
47. Grisold A, Leitner E, Mühlbauer G, Marth E y Kessler H. 2002. Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Simultaneous Confirmation by Automated Nucleic Acid Extraction and Real-Time PCR. Journal of Clinical Microbiology. 40:2392–2397.
48. Hanssen AM, Kjeldsen G y Sollid JU. 2004. Local variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer. Antimicrob Agents Chemother. 48:285–296.
49. Hanssen AM y Sollid JU. 2007. Multiple staphylococcal cassette chromosomes and allelic variants of cassette chromosome recombinases in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from Norway. Antimicrob Agents Chemother. 51:1671–1677.
50. Harris LG y Richards RG. 2006. *Staphylococci* and implant surfaces: a review. Injury 37 Suppl. 2:3–14.

51. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D y Götz F. 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol.* 20:1083–1091.
52. Heinrichs JH, Bayer MG, Cheung AL. 1996. Characterization of the *sar* locus and its interaction with *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 178:418–423.
53. Hernando L, Aljama P, Caramelo C, Arias M, Egido J y Lamas S. 2009. Nefrología Clínica. Tercera edición. España. Editorial Médica Panamericana S.A. 1086 pp
54. Howe RA, Brown NM y Spencer RC. 1996. The new threats of Gram positive pathogens: re-emergence of things past. *J Clin Pathol.* 49:444-449.
55. Ibrahim S, Salmenlinna S, Virolainen A, Kerttula AM, Lyytikäinen O, Jägerroos H, Broas M y Varkila VJ. 2009. Carriage of methicillin-resistant staphylococci and their SCC*mec* types in a long-term-care facility. *J Clin Microbiol.* 47:32–37.
56. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H y Hiramatsu K. 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Update.* 6:41-52.
57. Jarraud S., Lyon GJ, Figueiredo AM, Gerard L, Vandenesch F, Etienne J, Muir TW y Novick RP. 2000. Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology.* 182:6517–6522.
58. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J y Vandenesch F. 2002. Relationships between *Staphylococcus*

- aureus* Genetic Background, Virulence Factors, *agr* Groups (Alleles), and Human Disease. *Infection and Immunity*. 70:631–641.
59. Ji G, Beavis R y Novick RP. 1995. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Aca Sci USA*. 92:12055–12059.
60. Ji G, Beavis R y Novick RP. 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*. 276:2027–2030.
61. Kanafani ZA y Fowler VG. 2006. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 24:182-193.
62. Ko K, Lee JSY, Suh JY, Oh WS, Peck KR, Lee N y Song JH. 2005. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Asian countries. *J Clin Microbiol*. 43:421–426.
63. Kobayashi N, Wu H, Kojima K, Taniguchi K, Urasawa S, Uehara N, Omizu Y, Kishi Y, Yagihashi A y Kurokawa I. 1994. Detection of *mecA*, *femA* and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect*. 113:259–266.
64. Kogan G, Sadovskaya I, Chaignon P, Chokr A y Jabbouri S. 2006. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Let*. 255:11–16.
65. Larsen AR, Stegger M, Böcher S, Sørnum M, Monnet DL y Skov RL. 2009. Emergence and characterization of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Denmark, 1999 to 2006. *J Clin Microbiol*. 47:73–78

66. Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW y Stoodley AP. 2002. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun.* 70:6339–6345.
67. Lim Y, Jana M, Luong TT y Lee CY. 2004. Control of glucose- and NaCl induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 186:722–729.
68. Liu Y, Wang H, Du N, Shen E, Chen H, Niu J, Ye H y Chen M. 2009. Molecular evidence for spread of two major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones with a unique geographic distribution in Chinese Hospitals. *Antimicrob Agent Chemoter.* 53:512–518.
69. López-Aguilar C, Pérez-Roth E, Méndez-Álvarez S, Moreno A, Duran M. C, Casanova C y Aguirre-Jaime A. 2007. Association between the Presence of the Panton-Valentine Leukocidin-Encoding Gene and a Lower Rate of Survival among Hospitalized Pulmonary Patients with Staphylococcal Disease. *Journal of Clinical Microbiology.* 45:274–276.
70. Luong TT, Lei MG y Lee CY. 2009. *Staphylococcus aureus* Rbf Activates Biofilm Formation In Vitro and Promotes Virulence in a Murine Foreign Body Infection Model. *Infection and Immunity.* 77:335–340.
71. Mack D, Rohde H, Harris LG, Davies AP, Horstkotte MA y Knobloch JK. 2006. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs.* 29:343–359.
72. Maira-Litran T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark Gr, Goldmann DA y Pier GB. 2002. Immunochemical properties of the

staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun.* 70:4433–4440.

73. Manna AC y Cheung AL. 2006. Transcriptional regulation of the *agr* locus and the identification of DNA-binding residues of the global regulatory protein SarR in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 60:1289–1301.
74. Manna AC y Ray B. 2007. Regulation and characterization of *rot* transcription in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* 153:1538–1545.
75. Marschall J. 2008. Catheter-associated bloodstream infections: Looking outside of the ICU. *Am J Infect Control.* 36:S172.e5-8.
76. Martín-López JV, Díez-Gil O, Morales M, Batista N, Villar J, Claverie-Martín F y Méndez-Álvarez S. 2004. Simultaneous PCR detection of *ica* cluster and methicillin and mupirocin resistance genes in catheter-isolated *Staphylococcus*. *International Microbiology.* 7:63-66.
77. Martín-Lopez JV, Perez-Roth E, Claverie-Martin F, Diez-Gil, Batista O, Morales NM y Mendez-Alvarez S. 2002. Detection of *Staphylococcus aureus* clinical isolates harboring the *ica* gene cluster needed for biofilm establishment. *J Clin Microbiol.* 40:1569–1570.
78. Moretro T, Hermansen L, Holck AL, Sidhu MS, Rudi K y Langsrud S. 2003. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among *Staphylococci* from food and food processing environments. *Appl Env Microbiol.* 69:5648-5655.
79. Morfeldt E, Taylor D, von Gabain A y Arvidson S. 1995. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAlII. *EMBO J.* 14:4569-4577.

- 80.** Nagao M, Okamoto A, Yamada K, Hasegawa T, Hasegawa Y y Ohta M. 2009. Variations in amount of TSST-1 produced by clinical methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates and allelic variation in accessory gene regulator (*agr*) locus. *BMC Microbiology*. 9:52:1-5.
- 81.** Nashev D, Toshkova K, Isrina S, Salasia O, Hassan A, Lammler C y Zschock M. 2004. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiology Letters*. 233:45-52.
- 82.** National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; aproved standard, ed 6. NCCLS document M7-A6. Wayne, PA, National Committee for Laboratory Standards.
- 83.** Novick RP. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*. 48:1429–1449.
- 84.** Novick RP y Geisinger E. 2008. Quorum sensing in *Staphylococci*. *Annu Rev Genet*. 42:541-564.
- 85.** Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, Vandenesch F y Moghazeh S. 1995. The *agr P2* operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet*. 248:446-58.
- 86.** Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B y Moghazeh S. 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J*. 12:3967-3975.

- 87.** Panlilio AL, Culver DH, Gaynes RP, Banerjee S, Henderson TS, Tolson JS y Martone WJ. 1992. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975–1991. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 13:582–586.
- 88.** Patel R. 2005. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res.* 41–47 pp.
- 89.** Patti JM, Allen BL, McGavin MJ y Hook M. 1994. MSCRAMMs mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol.* 48:585–617.
- 90.** Pérez-Roth E, Claverie-Martín F, Batista N, Moreno A y Méndez-Álvarez S. 2002. Mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in a Spanish hospital. Co-application of multiplex PCR assay and conventional microbiology methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 43:123–128.
- 91.** Poole CV, Carlton D, Bimbo L y Allon M. 2004. Treatment of catheter-related bacteremia with an antibiotic lock protocol: effect of bacterial pathogen. *Nephrol Dial Transplant.* 19:1237-1244.
- 92.** Pratten J, Foster SJ, Chan PF, Wilson M y Nair SP. 2001. *Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. *Microb Infect.* 3:633-637.
- 93.** Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J y Ziebuhr W. 2000. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 3357–3363.

94. Rechtin TM, Gillaspay AF, Schumacher MA, Brennan RG, Smeltzer MS y Hurlburt BK. 1999. Characterization of the SarA virulence gene regulator of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 33:307–316.
95. Rode TM, Langsrud S, Holck A y Moretro T. 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology.* 116:372–383.
96. Rosas J, Lyra R, Aguilar C. A, Cavalcanti S, Escaño F, Tambasia M, Duarte E y ALAD Consensus Group. 2010. Treatment of type 2 diabetes in Latin America: a consensus statement by the medical associations of 17 Latin American countries. *Revista Panamericana de Salud Pública.* 28 (6).
97. Salazar HH, Mireles HMC, Moreno DMR y Martínez BLE. 2002. Infecciones nosocomiales en un hospital de segundo nivel. *Rev Med IMSS.* 40:43-51.
98. Schmidt KA, Manna AC, Gill S y Cheung AL. 2001. SarT, a repressor of alpha-hemolysin in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 69: 4749–4758.
99. Shore CA, Rossney SA, O'Connell B, Herra M C, Sullivan JD, Humphreys H y Coleman CD. 2008. Detection of *Staphylococcal* cassette chromosome *mec*-associated DNA segments in multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and identification of *Staphylococcus epidermidis ccrAB4* in both methicillin-resistant *S. aureus* and MSSA. *Antimicrob Agent and Chemoter.* 52:4407–4419.
100. Stewart PS. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol.* 292:107–113.
101. Stolić R, Trajković G, Perić V, Jovanovic A, Stolić D, Sovtić S, Lazarević T, Živić Ž y Šubarić G. 2008. Central venous catheters in hemodialysis: to

accept recommendations or to stick to own experience. *Voj Pregl.* 65: 21–26.

- 102.** Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, Kuroda M, Cui L, Takahashi M, Ankai A, Baba S, Fukui S, Lee JC y Hiramatsu K. 2005. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol.* 187:7292–7308.
- 103.** Trotonda MP, Manna AC, Cheung AL, Lasa I y Penadés JR. 2005. SarA Positively Controls Bap- Dependent Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology.* 187:5790-5798.
- 104.** Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo JM, Amorena B, Penades JR y Lasa I. 2003. SarA and not σ B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 48:1075–1087.
- 105.** Velázquez-Meza ME, Aires de Sousa M, Echaniz AG, Solórzano SF, Miranda NG, Silva SJ y de Lencastre H. 2004. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City: a 7 year period (1997 to 2003). Clonal evolution and impact of infection control. *J Clin Microbiol.* 42:3877-3880.
- 106.** Von Eiff CA, Friedrich W, Peters G y Becker K. 2004. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 49:157–162.

- 107.** Voss AD, Milatovic C, Wallrauch-Schwarz V, Rosdahl T y Braveny I. 1994. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 13:50–55.
- 108.** Vuong C, Saenz HL, Gotz F y Otto M. 2000. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. 182: 1688–1693.
- 109.** Wielders CL, Vriens MR, Brisse S, de Graaf-Miltenburg LA, Troelstra A, Fleer A, Schmitz FJ, Verhoef J y Fluit AC. 2001. In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus*. Lancet. 357:1674–1675.
- 110.** Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W y Archer GL. 2003. Related clones containing SCC*mec* type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 47:3574–3579.
- 111.** [www.sccmec.org/Pages/ SCC_TypesEN. html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html)
- 112.** Ziebuhr W, Heilmann C, Gotz F, Meyer P, Wilms K, Straube E y Hacker J. 1997. Detection of the Intercellular Adhesion Gene Cluster (*ica*) and Phase Variation in *Staphylococcus epidermidis* Blood Culture Strains and Mucosal Isolates. Infection and Immunity. 65: 890-896.
- 113.** Zmantar T, Chaieb K,, Maknin H, Miladi H, Abdallah F B, Mahdouani K y Bakhrouf A. 2008. Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus*. J Bas Microbiol. 48:308–314.