



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *icaA*, *rbf*,
sarA y *agr* EN LAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* POR PCR
EN TIEMPO REAL”.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

ADRIANA IRAIS ROCHA MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA ESTADO DE MÉXICO 2013

ÍNDICE

Resumen.....	5
Introducción.....	6
• Insuficiencia Renal Crónica	
• <i>Staphylococcus aureus</i> : Morfología, Características y Factores de Virulencia	
• Formación de la biopelícula por <i>Staphylococcus aureus</i>	
Antecedentes	19
Objetivo general.....	21
Objetivos particulares.....	21
Materiales y Métodos	22
• Origen de las cepas	
• Preparación de las cepas de <i>S. aureus</i> para la expresión de <i>icaA</i> , <i>rbf</i> , <i>sarA</i> y <i>agr</i>	
• Extracción y purificación de ARN	
• Reversotranscripción con eliminación de ADN genómico.	

- Eliminación del ADN genómico.
- Preparación de la master mix para la reversotranscripción
- Determinación de la expresión de *icaA*, *rbf*, *sarA* y *agr* por PCR en Tiempo Real.

Resultados.....32

- Pacientes estudiados.
- Origen de los pacientes por hospital.
- Origen de la Insuficiencia Renal Cronica en los Pacientes.
- Determinación de la expresión de *icaA*, *rbf*, *sarA* y *agr* por PCR en Tiempo Real.
- Expresión de los dos grupos de *agr* presentes en las cepas de *S. aureus* por RT-PCR.

Discusión.....46

- Pacientes estudiados
- Contaminación de los catéteres por *S. aureus*
- Detección de *icaA*, *sarA*, *rbf* y *agr* en las cepas de *S. aureus*

- Determinación de la expresión de *icaA*, *rbf*, *sarA* y *agr* por PCR en tiempo Real

Conclusiones.....54

Bibliografía.....55

RESUMEN

El propósito del presente, trabajo fue determinar por PCR en tiempo real la expresión de los genes *icaA*, *rbf* y *sarA* involucrados en la formación de la biopelícula y del locus *agr* responsable de la dispersión celular en un grupo de cepas de *Staphylococcus aureus* (n = 55) pertenecientes al cepario del Laboratorio de Análisis Clínicos, CUSI Iztacala. Las cepas bacterianas analizadas habían sido previamente aisladas e identificadas por métodos moleculares de catéteres de pacientes de hemodiálisis. El origen de la insuficiencia renal en los pacientes fue: 39.4% Diabetes Mellitus, seguido de enfermedad no determinada con el 29.3%, glomerulonefritis con el 13.7%, hipertensión arterial con el 10.0% y otras patologías con el 7.3%. El 100% de las cepas analizadas y portadoras de los genes *icaA* (n=53); *rbf* (n = 22); *sarA* (n = 41) y *agr* (n =55) expresaron estos marcadores posterior a su crecimiento en medio líquido de TSB suplementado con 5% de glucosa y 5% de NaCl por 24 h a 37°C. El gen de referencia utilizado para la expresión en cada corrida de PCR en Tiempo Real fue *gyrB*. Los resultados evidenciaron la virulencia de las cepas de *S. aureus* estudiadas, debido a la expresión *in vivo* de los genotipos involucrados en la formación de la biopelícula y en la dispersión celular.

INTRODUCCIÓN

Insuficiencia Renal Crónica

La Insuficiencia Renal Crónica (IRC) ocurre como consecuencia de la pérdida progresiva e irreversible de la función renal. Se inicia con el deterioro progresivo del volumen de filtrado glomerular dado por el reclutamiento de nefronas dañadas al que se agregan los trastornos tubulares de homeostasis y finalmente la falla de las funciones hormonales generando grandes repercusiones orgánicas, el reclutamiento es progresivo hallándose las nefronas en grados variables de daño estructural y funcional que confiere a esta entidad fases evolutivas que van desde la etapa totalmente subclínica hasta el deterioro terminal conocido como uremia, siendo necesario el tratamiento sustitutivo, como la diálisis o el trasplante renal (Soriano, 2004).

La IRC constituye un gran problema de salud pública a nivel mundial, y cada año comienzan tratamiento con diálisis entre 80-120 pacientes por cada millón de habitantes, convirtiéndose en un problema sanitario, social y económico de primera magnitud (Bernardo, 2001). En México la IRC constituye un problema de salud frecuente en la

población, que genera un alto costo social y económico, en la actualidad existen más de 100 mil personas que padecen insuficiencia renal crónica y es una de las principales causas de atención hospitalaria.

Las principales causas que condicionan la Insuficiencia Renal Crónica son la Nefropatía diabética, Glomerulopatías, Hipertensión arterial, Nefropatía gotosa, Enfermedad renal poliquística, enfermedades sistémicas e Infección crónica de vías urinarias, siendo la diabetes mellitus y la hipertensión arterial las dos causas más frecuentes que condicionan la insuficiencia renal crónica y considerando que actualmente el 30,8% de la población mayor de 20 años tiene hipertensión y alrededor del 10% tiene diabetes mellitus, hace de la IRC un gran problema de salud en México (Fundación Mexicana del Riñón, 2012).

Existen tres alternativas terapéuticas para el tratamiento de la insuficiencia renal que son: la diálisis peritoneal, la hemodiálisis y el trasplante renal, siendo la última la mejor opción terapéutica (Treviño, 2004). Actualmente la alternativa terapéutica más usada en el mundo es la hemodiálisis, procedimiento de sustitución renal extracorpóreo que consiste en extraer la sangre del organismo y pasarla a un

dializador de doble compartimiento, uno por el cual pasa la sangre y otro el líquido de diálisis, separados por una membrana semipermeable para eliminar residuos en exceso (Daugirdas, 2003), en este procedimiento se utiliza un catéter tipo Mahurkar en una vena del paciente generalmente la subclavia, el cual es frecuentemente contaminado por bacterias u hongos causando infección en el sitio de inserción (Aguilar *et al.*, 2004). La infección relacionada a catéteres constituye una de las principales complicaciones y la principal causa de bacteriemia nosocomial, siendo *Staphylococcus aureus* la bacteria que con mayor frecuencia contamina los catéteres de pacientes sometidos a hemodiálisis (Fica, 2003).

***Staphylococcus aureus*: Morfología, Características y Factores de Virulencia**

Staphylococcus aureus es una bacteria de la familia *Micrococaceae*, género *Staphylococcus*. Es un coco Gram-positivo, no móvil, no forma esporas, puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos. Es anaerobio facultativo, crece especialmente en condiciones aerobias y puede ser cultivado rápidamente en agar sangre. Sus colonias miden de 1 a 3 mm, producen un pigmento

amarillo debido a la presencia de carotenoides y existen cepas capaces de producir hemólisis a las 24-36 horas. (Bustos *et al.*, 2006). Puede identificarse por pruebas bioquímicas (manitol, coagulasa, catalasa), o mediante la detección por PCR de los marcadores cromosómicos *femA*, *femB* (participa en la síntesis del peptidoglucano) (Kobayashi *et al.*, 1994) y *nuc* (Nashev *et al.*, 2004). Se encuentra ampliamente distribuida, estimándose que una de cada tres personas esta colonizada.

S. aureus es parte de la flora normal de piel y de las mucosas nasales de portadores asintomáticos. Puede causar una amplia variedad de infecciones: lesiones superficiales, infecciones sistémicas con riesgo de vida (endocarditis, osteomielitis, neumonía, abscesos cerebrales, meningitis y bacteremia), y enfermedades producidas por toxinas (intoxicación alimentaria, síndrome de la piel escaldada o síndrome de shock tóxico) (Nabón 2004).

S.aureus presenta diversos factores de virulencia (Tabla 1) y (Figura 1). Uno de ellos es la familia de adhesinas llamadas MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) (Patti, 1994), que son responsables de la adhesión a los componentes

de matriz celular del hospedero, como fibronectina (Jönsson, 1991), colágeno (Patti, 1992) y fibrinógeno (Ni Eidhin, 1998). La unión a la fibronectina está mediada por dos proteínas estrechamente relacionadas, FnBPA y FnBPB (fibronectin binding protein), codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB*, respectivamente (Jönsson, 1991). La proteína de unión al colágeno CNA (colagen adhesin) es la segunda molécula adhesiva, está codificada por el gen *cna* (Patti, 1992). La unión al fibrinógeno está dada por la adhesina *clfA* y la proteína A codificadas por los genes *clf* (clumping factor) y *spa* (surface protein anchoring), respectivamente (Wann, 2000).

Factor de virulencia	Efecto
Coagulasa	Convierte el fibrinógeno en fibrina y coagula el plasma de la sangre
Hialuronidasa	Hidroliza los ácidos hialurónicos degradando el tejido conectivo
Staphylocinasa	Degrada coágulos de la sangre
Lipasa	Hidroliza lípidos y ayuda a colonizar la piel
Nucleasas	Hidroliza el ADN
Penicilinasas	Producen betalactamasa que inactiva la penicilina
Hemolisinas Alfa beta	lisa eritrocitos
Leucocidina	Lisa neutrófilos y macrófagos
Enterotoxinas A-E, G-I	Superantígeno, estimula la proliferación de células T y la liberación de citocinas y mediadores inflamatorios
Toxina exfoliativa A y B	Proteasas séricas que rompen los puentes intercelulares en el estrato granuloso de la epidermis causando descamación de la piel
Toxina del síndrome del shok tóxico	Superantígeno produce la destrucción de células endoteliales y produce fiebre, vómito, daño en órganos
Proteína A	Quimioatrayente leucocitario antifagocítica, y lesiona a las plaquetas
Capsula	Inhibe la quimiotaxis y la fagocitosis
Peptidoglicano	Proporciona estabilidad osmótica, estimula la producción de pirógenos endógenos, inhibe la fagocitosis

Tabla 1. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

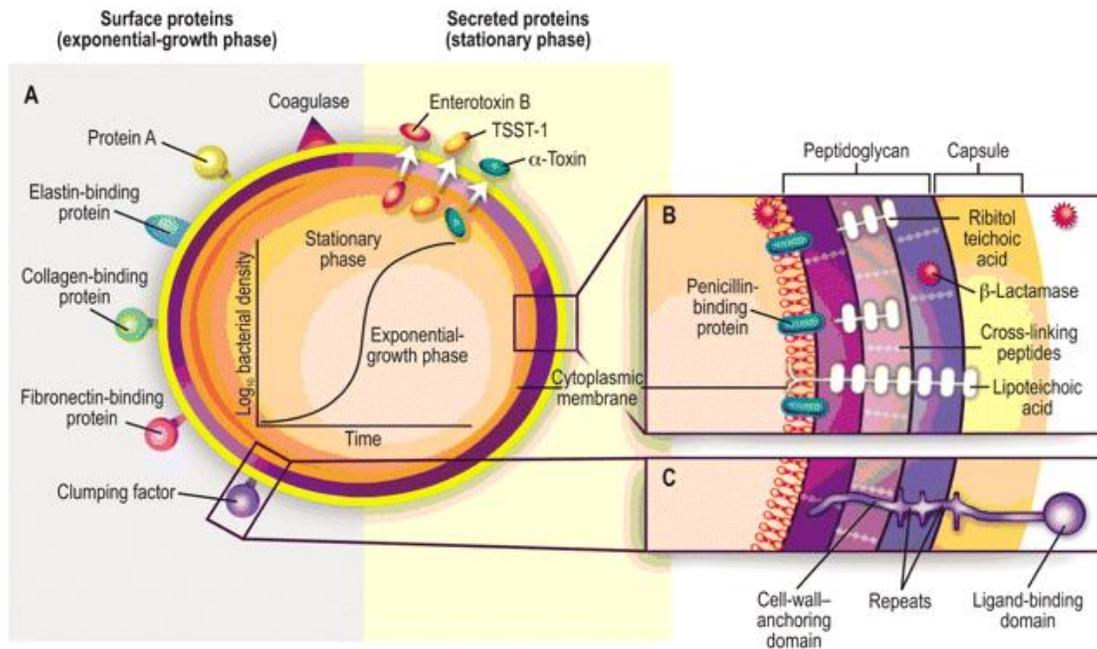


Figura 1. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*.

Formación de la biopelícula por *Staphylococcus aureus*

La capacidad de *S. aureus* de contaminar los catéteres de los pacientes sometidos a hemodiálisis, se debe a la síntesis de una película de polisacárido (biofilm) en cuyo interior se desarrollan colonias de bacterias. La formación de la biopelícula permite a la bacteria adherirse, resistir al ataque del hospedero como al tratamiento con los antibióticos (Lasa *et al*, 2005). La formación de la biopelícula ocurre por la producción de un polímero de N-acetilglucosamina también conocida como polisacárido de adhesión intercelular (PIA), el cual está regulado por el operón *icaADBC* y el gen

regulador *icaR*. La etapa inicial del proceso de formación de la biopelícula es la adherencia sobre el epitelio adyacente a la inserción del catéter por las adhesinas FnBPA y FnBPB. Una vez que las bacterias están adheridas a una superficie, éstas se multiplican y forman microcolonias con estructuras que incrementan paulatinamente su organización en forma de mosaicos, llegando a alcanzar una alta organización que requiere de adherencia intercelular. El polisacárido de adherencia intercelular (PIA) es codificado por los genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, Las enzimas codificadas por *IcaA* e *IcaD* forman oligómeros de N-acetilglucosamina dentro de la célula bacteriana, *IcaC* une a esos oligómeros en grandes polímeros entrelazados en la posición 1,6 e *IcaB* aún no se conoce su papel específico, pero se sugiere que podría movilizarlos al exterior de la célula formando así la biopelícula (Novales *et al* 2007) (Figura 2). La expresión de *ica* y la formación de PIA son muy variables en el género *Staphylococcus* (Valle *et. al.*, 2003). Se ha descrito que cambios en la osmolaridad, la temperatura y la concentración de subunidades de antibióticos favorecen la expresión del operón *ica*, con la consecuente formación de la biopelícula. Existen otros mecanismos independientes del gen *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* codifica para una proteína reguladora transcripcional de 190 KDa que es necesaria para el desarrollo de la biopelícula en medios de cultivo con glucosa y con NaCl y es independiente a la expresión de *ica* (Lim *et. al.*, 2004). El gen *sarA* codifica para una proteína de 14.5 KDa que se une a los promotores de *agr* para promover la transcripción de RNAIII y consecuentemente inhibir la producción de PIA, se ha reportado que la mutación de *sarA* inhibe la producción de RNAIII e impide la formación de la biopelícula (Beenken *et. al.*, 2004.)

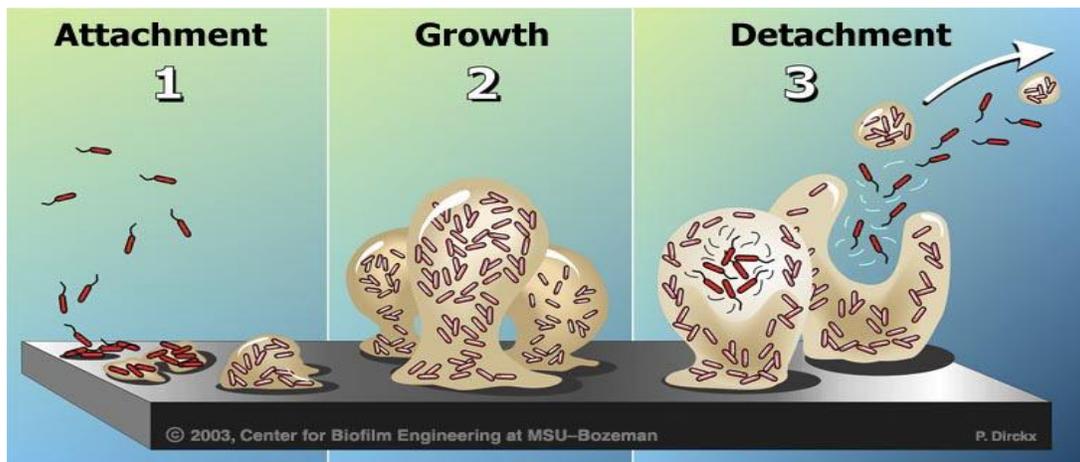


Figura 2. Formación de la biopelícula.

La última fase de la formación de la biopelícula es la dispersión celular, que se encuentra regulada por el “*quórum sensing*”, mecanismo por el cual las bacterias, detectan la concentración de señales químicas autoinductoras, que brindan información acerca de la densidad celular en el interior de la biopelícula, cuanto mayor sea la población, mayor será la concentración de estas señales y se alcanzará una concentración umbral, indicando de esta manera que la población ha llegado al *quórum*, por lo que se activa la expresión del locus *agr* encargado de la dispersión celular (Jeremy *et al* 2003). 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 G *et al.*, 1997). Durante el crecimiento de la población bacteriana, *S. aureus* produce el AIP y lo secreta, una vez que este 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 (Novick, 2003) el locus *agr* se expresa a partir de dos promotores divergentes P2 y P3. P2 forman parte del operón *agr*, mientras que a partir del promotor P3 se transcribe el RNAIII. AgrA y AgrC que constituyen un sistema de señalización de dos

componentes, AgrB y AgrD se combinan para generar el activador AIP (Novick y Geisinger, 2008). La unión de AIP activa a AgrC, el cual activa a AgrA y este la transcripción a partir de P2 y P3 (Novick *et. al.*, 1995). El efecto intracelular del sistema *agr* es el RNAIII, un RNA de 514 nucleótidos que posee una estructura secundaria compleja y regula la traducción de los mRNAs blanco e impide la traducción. *S. aureus* requiere la represión del sistema de quórum-sensing para que las células formen la biopelícula y la activación de *agr* que provoca la dispersión celular que facilita la colonización a nuevos sitios llegando a causar bacteremia (Jeremy *et al.*, 2003) (Figura 3).

En el locus *agr* existe una región hipervariable entre las cepas de *S. aureus*, que comprenden la secuencia de nucleótidos que codifican 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 en las cepas es lo que ha permitido la clasificación del operon *agr* en 4 grupos distintos (I, II, III, IV) (Gilot *et. al.*, 2002; Jarraud *et.al.*, 2000; Nagao *et. al.*, 2009; Jarraud *et.al.*, 2002).

presente trabajo se cuantificará la expresión de los genes *icaA*, *rbf*, *sarA* y *agr* involucrados en la formación de la biopelícula y en la dispersión celular, respectivamente, en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de pacientes con infección en el sitio de inserción del catéter.

ANTECEDENTES

Debido a la gran prevalencia de infecciones causadas por *S. aureus* en México y en el mundo, en los últimos años se han estudiado los mecanismos involucrados en la formación de la biopelícula y de otros factores de virulencia. De esta manera en el 2004 Beenken *et al.*, realizaron un estudio sobre la expresión de los genotipos de virulencia en *S. aureus*, y describieron que el operon *ica* y los genes *sarA*, *rbf* y *agr* se encontraron asociados en la formación del biopelícula. En el 2004 Fluckiger y colaboradores reportaron que la transcripción del operon *icaADBC* se relacionó con la formación de la biopelícula en un modelo *in vitro*. En el 2003 Valle y colaboradores reportaron que el desarrollo de la biopelícula se ve afectada por cambios en el medio extracelular, como oxígeno, osmolaridad, temperatura y pH. Rode *et al.*, en el 2007 demostraron que las temperaturas subóptimas y la presencia de glucosa y cloruro de sodio favorecieron la formación de la biopelícula. Parameswaran y colaboradores en el 2010 realizaron un estudio sobre infecciones en catéteres intravasculares, y reportaron que *S. aureus* fue la bacteria responsable de la mayoría de las infecciones, por otro lado Cetina en el 2011 realizó un estudio en

cepas clínicas de *S. aureus* aisladas de catéteres, en donde detectó los genes *icaA* en el 96% de las cepas, *rbf* en el 40%, *sarA* en el 75%, y *agr* en el 100%.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la expresión de los genes *icaA*, *rbf*, *sarA* y *agr* en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de catéteres por PCR en Tiempo Real.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Promover la expresión de los genes involucrados en la formación de la biopelícula y en la dispersión celular.
- Establecer la expresión de los diferentes grupos de *agr* en las cepas de *Staphylococcus aureus* mediante RT- PCR

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las cepas

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron 55 cepas de *S. aureus* previamente aisladas y caracterizadas genotípicamente de los catéteres de pacientes de hemodiálisis por Cetina en el 2011 (Tabla 2).

Gen	No. de cepas Positivas	Porcentaje (%)
<i>icaA</i>	53	96.3
<i>sarA</i>	41	74.5
<i>Rbf</i>	22	40
<i>agr II</i>	20	36.3
<i>agr I</i>	13	23.6
<i>agr III</i>	10	18.2
<i>agr II + agr III</i>	9	16.3
<i>agr I + agr II</i>	2	3.6
<i>agr I + agr III</i>	1	1.8

Tabla 2. Frecuencia de los genes involucrados en la formación de la biopelícula y en la dispersión celular en las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres

Preparación de las cepas de *S. aureus* para la expresión de *icaA*, *rbf*, *sarA* y *agr*

Las condiciones utilizadas para promover la expresión de los genes involucrados en la formación de la biopelícula y la dispersión celular fueron reportadas previamente por Rode *et al.*, (2007). Para lo cual las cepas de *S. aureus* fueron crecidas en anaerobiosis a 37°C por 24 horas utilizando un incubador de CO₂ (Lab-line), en caldo de soya y tripticasa (TSB) suplementado con 2 % de Glucosa y 2% de NaCl. Posteriormente los cultivos fueron diluidos 1:100 y cultivados a 37° C en agitación constante (200 rpm) hasta obtener una DO₆₀₀ = 0.4 que correspondió a 1x10⁹ células/ml.

Extracción y purificación de ARN

El ARN total de *S. aureus* fue extraído, utilizando el kit RNeasy (Qiagen; No. de catálogo 74104) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para lo cual se depositó en un tubo eppendorf nuevo y estéril 500 microlitros del cultivo bacteriano a la concentración de 7.5×10^8 (7500,000000 millones), posteriormente se agregaron 1000 microlitros de RNA Protect bacteria Reagent, se agitó el tubo en un vortex por 30 segundos y se incubó a temperatura ambiente (15-25°C) por 5 minutos. Al término la muestra se centrifugó a $7,500 \times g$ (9375 rpm) por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y los residuos fueron removidos invirtiendo el tubo y dando golpes suaves sobre una toalla de papel por 10 segundos. Enseguida se agregaron 200 microlitros de buffer TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8), que contenía 10 mg/ml de lisozima (Sigma Catálogo L7651) y 40 mg/ml de lisostafin (Sigma Catálogo L7386). La muestra se mezcló por 10 segundos, y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Durante la incubación el tubo fue agitado en un vortex por 10 segundos al menos cada 2 minutos. Posteriormente se adicionaron 700 microlitros del reactivo RLT (contenía β - mercaptoetanol 14.3 M),

se agitó vigorosamente el tubo en un vortex (si partículas del material fueron visibles, entonces se centrifugó el tubo por 2 minutos a máxima velocidad y se utilizó el sobrenadante para el siguiente paso). Al cabo de esto, se adicionaron 500 microlitros de etanol, la muestra se mezcló por pipeteo y se transfirieron 700 microlitros del lisado (incluyendo algún precipitado que se haya formado) a un tubo de columna (que contenía una membrana) colocado dentro de un tubo colector de 2 ml. El tubo se centrifugó a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) por 15 segundos. Se decantó el líquido de flujo (contenía buffer RLT), se adicionaron 700 microlitros de buffer RW1 al tubo de columna y se centrifugó a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) por 15 segundos para lavar la membrana. De nueva cuenta se decantó el líquido de flujo (contenía buffer RLT) junto con el tubo colector. Posteriormente se colocó el tubo de columna en un nuevo tubo colector de 2 ml, se adicionaron 500 microlitros de buffer RPE (contenía 4 volúmenes de etanol 96-100%) y se centrifugó a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) por 15 segundos. Se decantó el líquido de flujo y se reutilizó el tubo colector en el siguiente paso. Posteriormente se adicionaron 500 microlitros de buffer RPE (contenía 4 volúmenes de etanol 96-100%) y se centrifugó a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) por 2

minutos. Se decantó el líquido de flujo y se reutilizó el tubo colector en el siguiente paso. Nota: Esta larga centrifugación aseguró que no existiera nada de etanol que pudiera interferir en el siguiente paso). Al término se colocó el tubo de columna en un nuevo tubo colector de 1.5 ml, se agregaron 30 microlitros de agua libre de nucleasas y se centrifugó a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) por 1 minuto para eluir el ARN. La concentración y pureza total del ARN fue medida utilizando un Nanodrop 2000. Si el ARN fue ≥ 30 microgramos, se adicionaba 30 microlitros de agua libre de nucleasas al tubo utilizando el mismo tubo colector. El ARN es muy inestable, por lo que inmediatamente se realizó la reversotranscripción a ADNc.

. Reversotranscripción con eliminación de ADN genómico.

Para realizar el proceso de la reversotranscripción de ARN a ADNc se utilizó el kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen; No. de catálogo 205311) siguiendo las instrucciones del fabricante como sigue:

Eliminación del ADN genómico.

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

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

Tabla 3. Componentes de reacción utilizados para eliminar el ADN genómico.

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

Preparación de la master mix para la reversotranscripción

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

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

Tabla 4. Componentes de reacción utilizados para la reversotranscripción.

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

Determinación de la expresión de *icaA*, *rbf*, *sarA* y *agr* por PCR en Tiempo Real.

Para la cuantificación de expresión de *icaA* y del gen de referencia *gyrB* los primers utilizados fueron descritos por Valle *et al.*, (2003) y por Beenken *et al.*, (2004), respectivamente (Tabla 5). Las sondas utilizadas fueron las descritas por Rode *et al.*, (2007) con algunas modificaciones. La sonda *icaA* presentó un reportero fluorescente marcado con FAM en el extremo terminal 5' y un quencher marcado con BHQ-1 en el extremo terminal 3', mientras que la sonda *gyrB* presentó un reportero fluorescente marcado con JOE en el extremo 5' y un quencher marcado con BHQ-1 en el extremo 3' (Tabla 5). Para el ensayo de PCR en Tiempo Real se utilizó el kit Rotor Gene Probe PCR (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen final de la mezcla de reacción, fue de 25 microlitros; 12.5 microlitros de 2x Rotor-Gene Probe RT-PCR Master Mix, 1 microlitro del primer Forward (0.4 micromolar), 1 microlitro del primer Reverse (0.4 micromolar), 2 microlitros de la sonda para cada gen (0.2 micromolar), 3 microlitros (20 ng de ADNc) y 5.5 microlitros de RNasa-Free-Water. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C durante 5 minutos

(activación de la HotStart), 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 5 segundos y la combinación, de alineación/extensión de 95°C por 10 segundos. El ensayo de PCR en Tiempo Real fue realizado en el equipo Corbert, Rotor Gene 6000.

Los primers utilizados para la cuantificación de la expresión de *rbf* fueron descritos por Lim *et al.*, (2004), de *sarA* por Weinrick *et al.*, (2004) y de *agr* por Wolz *et al.*, (1996). Para el ensayo de PCR en Tiempo Real se utilizó el kit Rotor Gene SYBR Green PCR (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 microlitros; 12.5 microlitros Master Mix SYBR Green, microlitro del primer Forward (1 μ m), 1 microlitro del primer Reverse (1 μ m), 2 microlitro (20 ng de ADNc) y 8.5 microlitros de RNasa-Free-Water. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C durante 5 minutos (activación de la HotStart), 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 5 segundos y la combinación de alineación/extensión de 60°C por 10 segundos.

Gene	Sonda/oligonucleótidos	Secuencia 5' →3'
<i>icaA</i>	Sonda	TGGATGTTGGTTCCAGAAACATTGGGAG
	Forward	TGAACCGCTTGCCATGTG
	Reverse	CACGCGTTGCTTCCAAAGA
<i>gyrB</i> (DNA girasa Subunidad B)	Sonda	CCGCCACCGCCGAATTTACCACCA
	Forward	AGTAACGGATAACGGACGTGGTA
	Reverse	CCAACACCATGTAAACCACCAGAT
<i>Rbf</i>	Forward	TTAGAAGGAATCTTTAA AACCTTATTGAATAA
	Reverse	TTGTGAATTTTTCTTCTTCGGACA
<i>sarA</i>	Forward	TTTTTTTACGTTGTTGTGCATTAACA
	Reverse	CATTTAACTACAAACAACCACAAGTTG
<i>Agr</i>	Forward	TGAAATTCGTAAGCATGACCCA
	Reverse	CCATCGCTGCAACTTTGTAGAC

Tabla 5. Oligonucleótidos y sondas utilizados en la PCR en Tiempo Real para la determinación de la expresión de los genes.

RESULTADOS

Pacientes estudiados.

Las cepas estudiadas se obtuvieron de los catéteres de 109 pacientes infectados del servicio de hemodiálisis del IMSS: Hospital General Regional 72, UMAA (Unidad médica de atención ambulatoria) No 199, Hospital general Regional No. 196 Aragón y del ISSEMyM (Satélite). Donde el 44%(n=48) fueron mujeres y el 56%(n=61) hombres (Figura 4.)

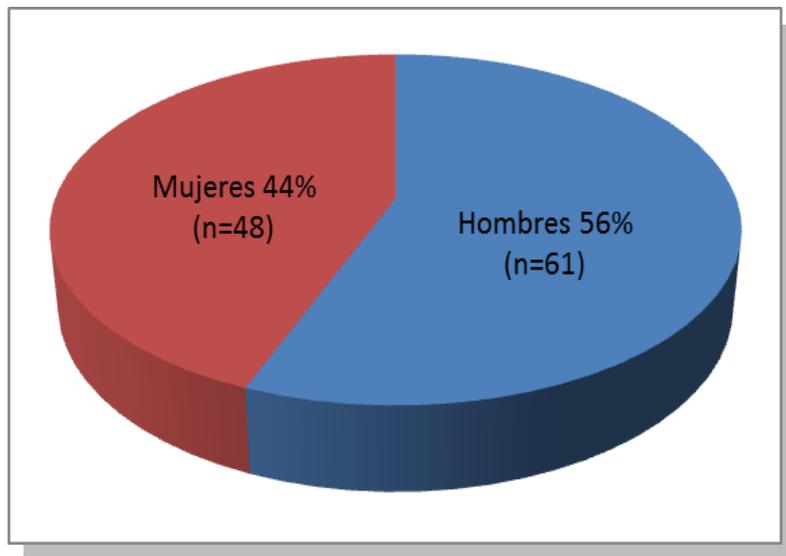


Figura 4. Distribucion de los pacientes analizados por sexo.

La edad de los pacientes se encontró en el intervalo 17-77 años. El 24.7% (n = 27) de los pacientes se encontró en el rango de edad de 50-59 años, seguido del rango de 20-29 años con 23.9% (n = 26), de

30-39 años con el 17.4% (n = 19), de 40-49 años con un 13.8% (n = 15), de 60-69 con el 11.9% (n = 13), de 70-79 con el 5.5% (n = 6) y de 10-19 años con el 2.8% (n = 3) (Figura 5).

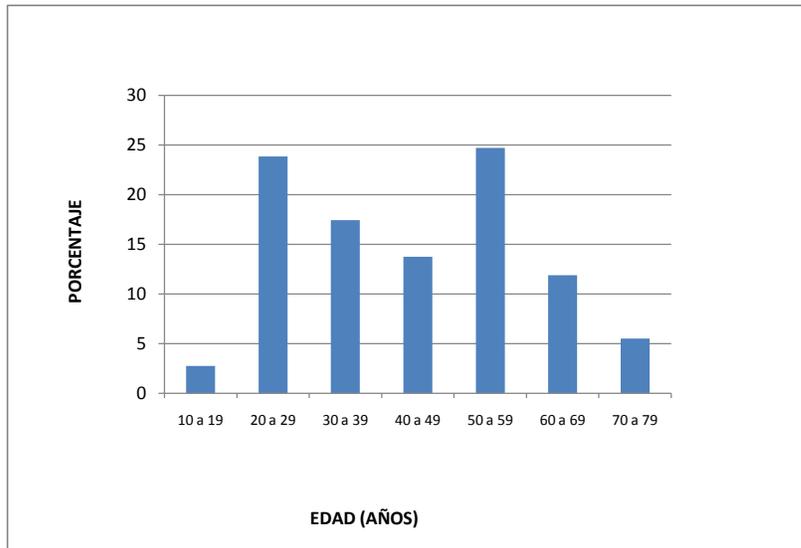


Figura 5. Edad de los pacientes analizados.

Origen de los pacientes por hospital.

En la figura 6 se observa la distribución de los pacientes infectados por Hospital. El 40.4% (n = 44) de las muestras provinieron del Hospital General Regional 72 del IMSS, seguida del Hospital General Regional No. 196 Aragón con 26.6% (n = 29), del ISSEMyM (Satélite)

con el 21.1% de las muestras procesadas (n = 23) y por último la UMAA (unidad médica de atención ambulatoria) No 199 con el 11.9% (n = 13).

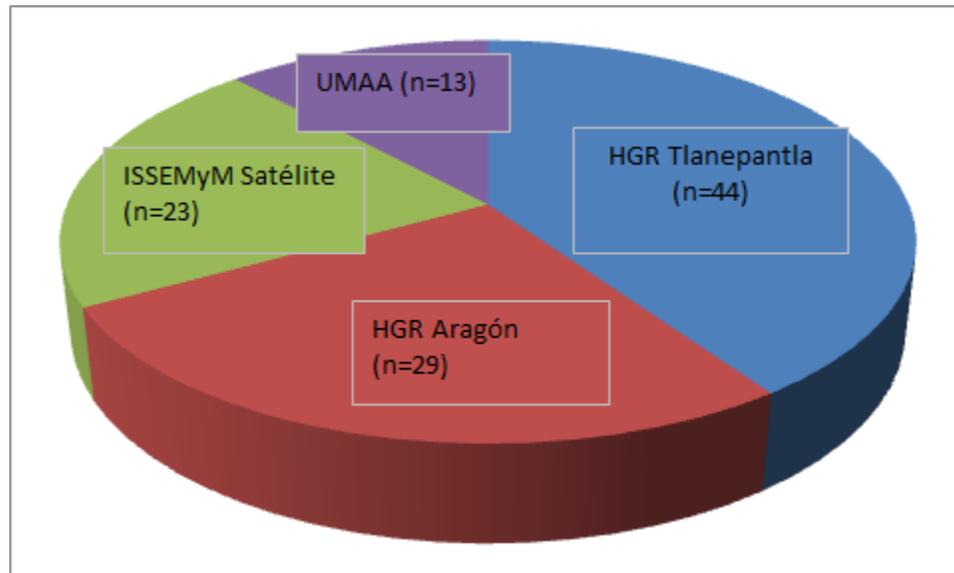


Figura 6. Origen de los pacientes estudiados por hospital.

Origen de la Insuficiencia Renal Cronica en los Pacientes.

El origen de la insuficiencia renal en en los pacientes fue de 39.44% para Diabetes Mellitus, seguido de enfermedad no determinada con el 29.35%,glomerulonefritis con el 13.76% e hipertension arterial con el 10.0%. Las menos frecuentes fueron hipertiroidismo, hiperuricemia, malformacion congenita, nefritis lupica, poliquistosis renal, preclampsia y riñones poliquisticos con el 7.33% (Figura 7).

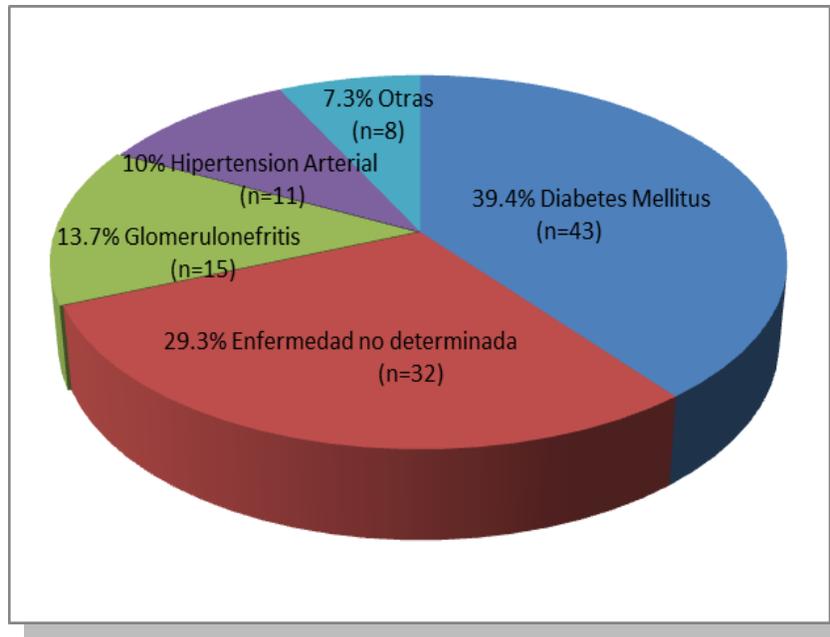


Figura 7. Porcentaje del origen de la IRC en pacientes

Determinación de la expresión de *icaA*, *rbf*, *sarA* y *agr* por PCR en Tiempo Real.

Con el propósito de determinar si las cepas de *S. aureus* portadoras de los genotipos *icaA* (n=53), *rbf* (n=22), *sarA* (n=41) y *agr* (n=55) expresaban los genes involucrados en la formación de la biopelícula y la dispersión bacteriana, las cepas fueron crecidas en agitación en el medio líquido de TSB suplementado con 5% de glucosa y 5% de NaCl durante 24 h a 37°C. El 100% de las cepas portadoras de los genes expresó *icaA* (Tabla 6; Figura 8), *rbf* (Tabla 6; Figura 9), *sarA* (Tabla

6, Figura 10) y *agr* (Tabla 6; Figura 11). El gen de referencia utilizado para la expresión por PCR en Tiempo Real fue *gyrB* (Figura 12 y 13). Las curvas de fusión (Melting point) obtenidas durante las corridas de PCR TR utilizando SYBRGreen para *rbf*, *sarA* y *agr* en las cepas de *S. aureus*, se aprecian en las Figuras 14,15 y 16 respectivamente.

Gen	Cepas portadoras del gen (No.)	Expresión (%)
<i>icaA</i>	53	100
<i>rbf</i>	22	100
<i>sarA</i>	41	100
<i>agr</i>	55	100

Tabla 6. Expresión de los genes de *S. aureus* involucrados en la formación de la biopelícula y en la dispersión celular.

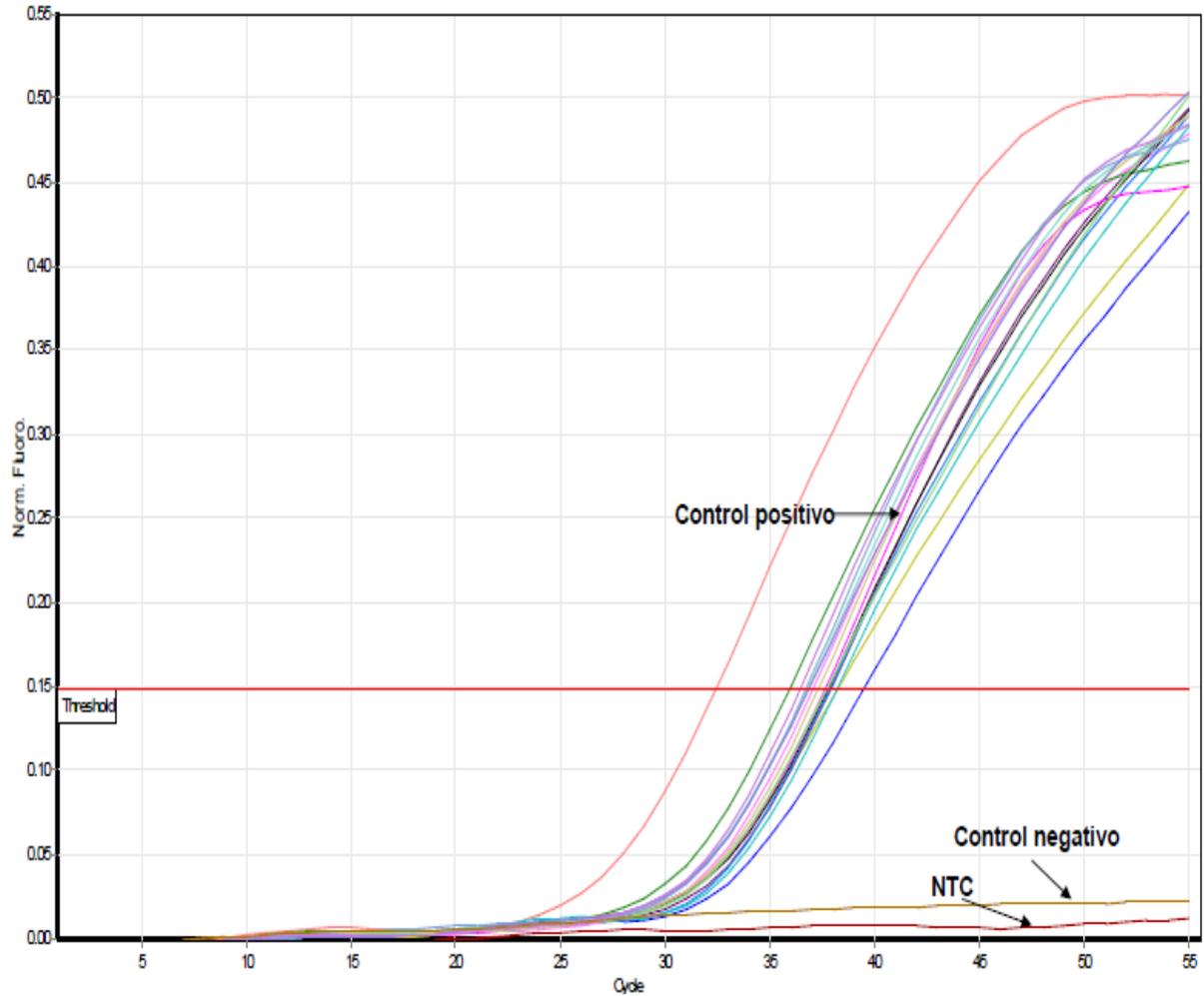


Figura 8. Detección de la expresión de *icaA* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real utilizando sonda Taqman marcada en el extremo 5' con FAM. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = Control sin DNA; Control positivo = *S. aureus* ATCC 33592; Control negativo = *S. epidermidis* ATCC 35984

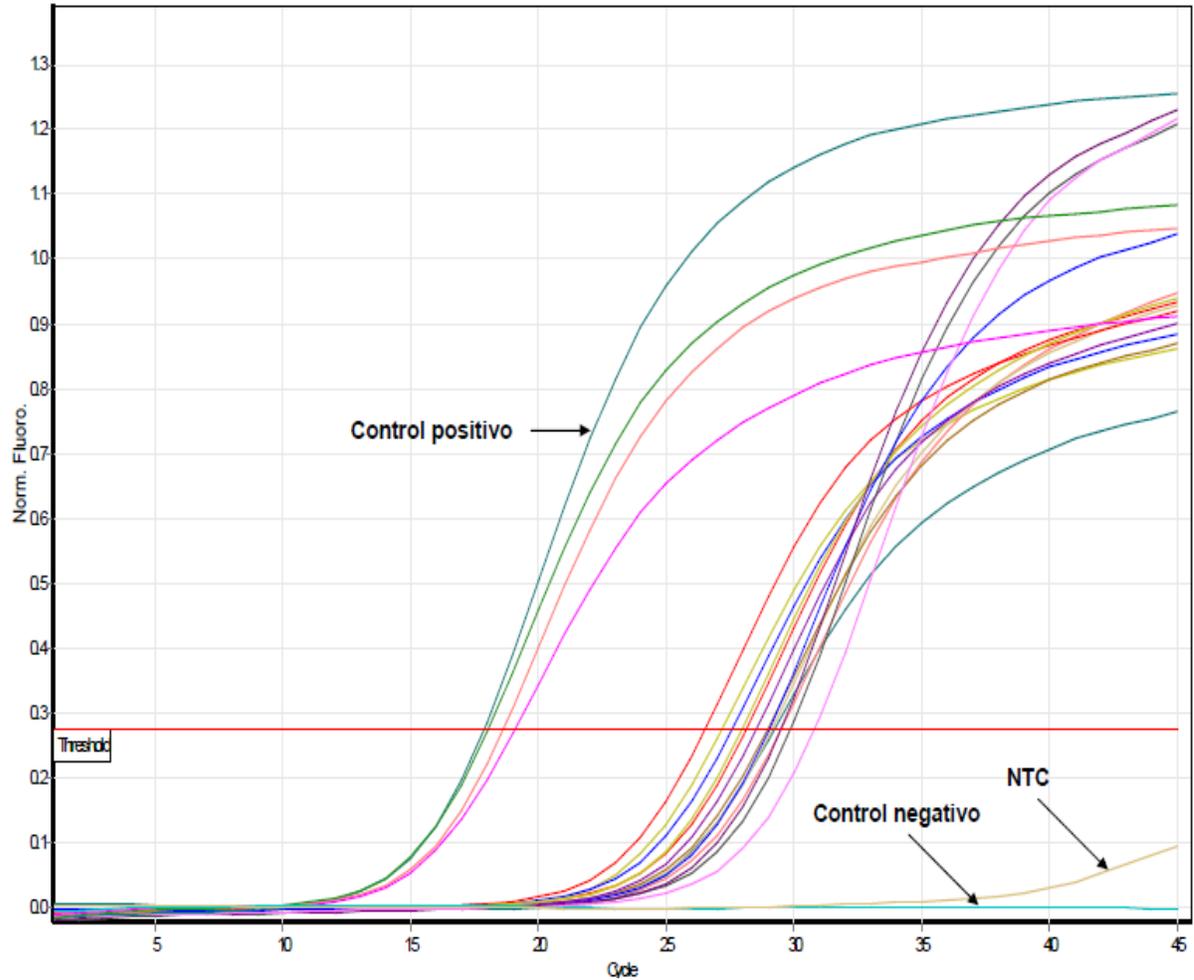


Figura 9. Detección de la expresión de *rbf* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBRGreen. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = Control sin DNA; Control positivo = *S. aureus* ATCC 33592; Control negativo = *S. aureus* No. 22 (sin el gen *rbf*).

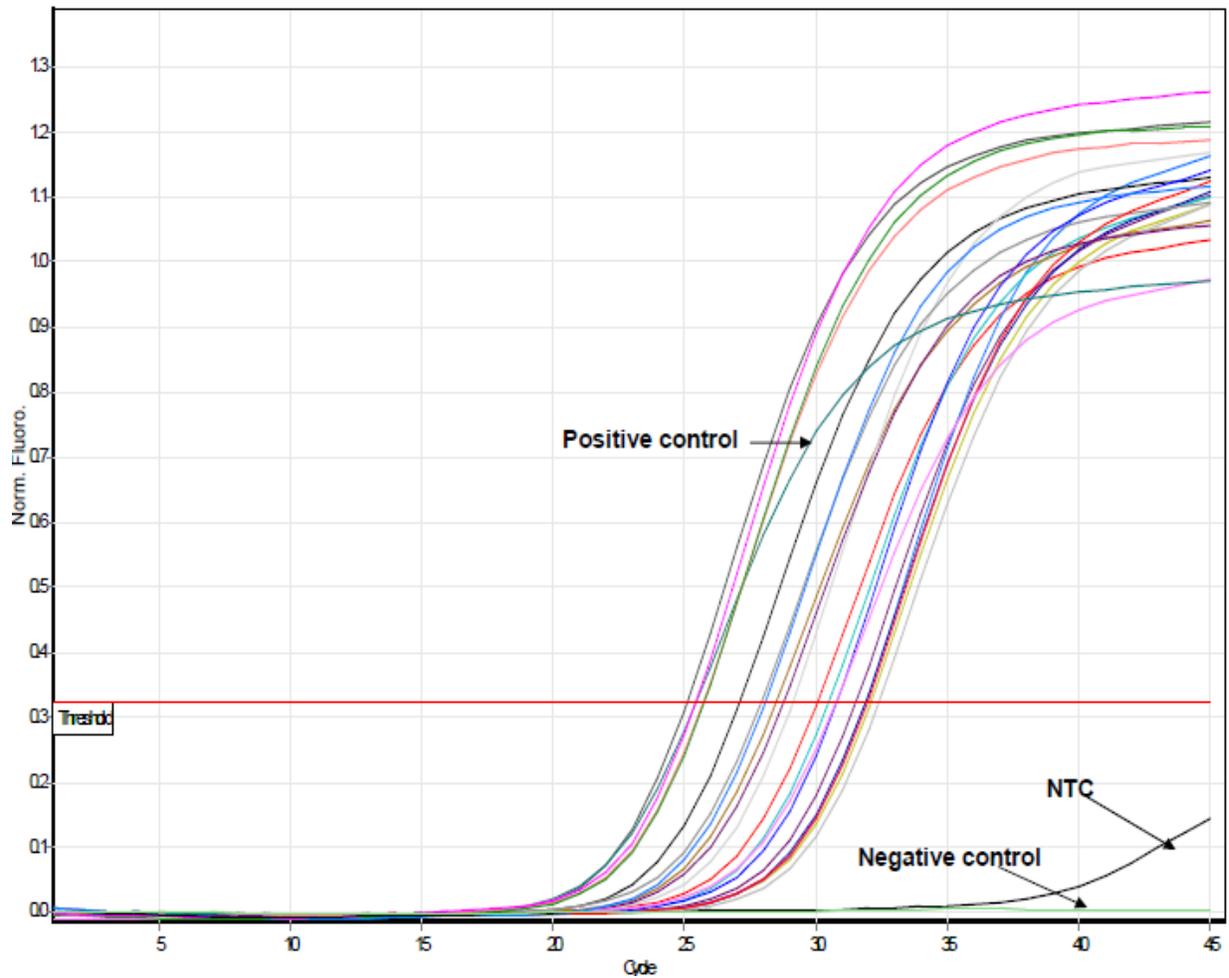


Figura 11. Detección de la expresión de *agr* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBRGreen. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = Control sin DNA; Control positivo = *S. aureus* ATCC 33592; Control negativo = *E. coli* ATCC 11775

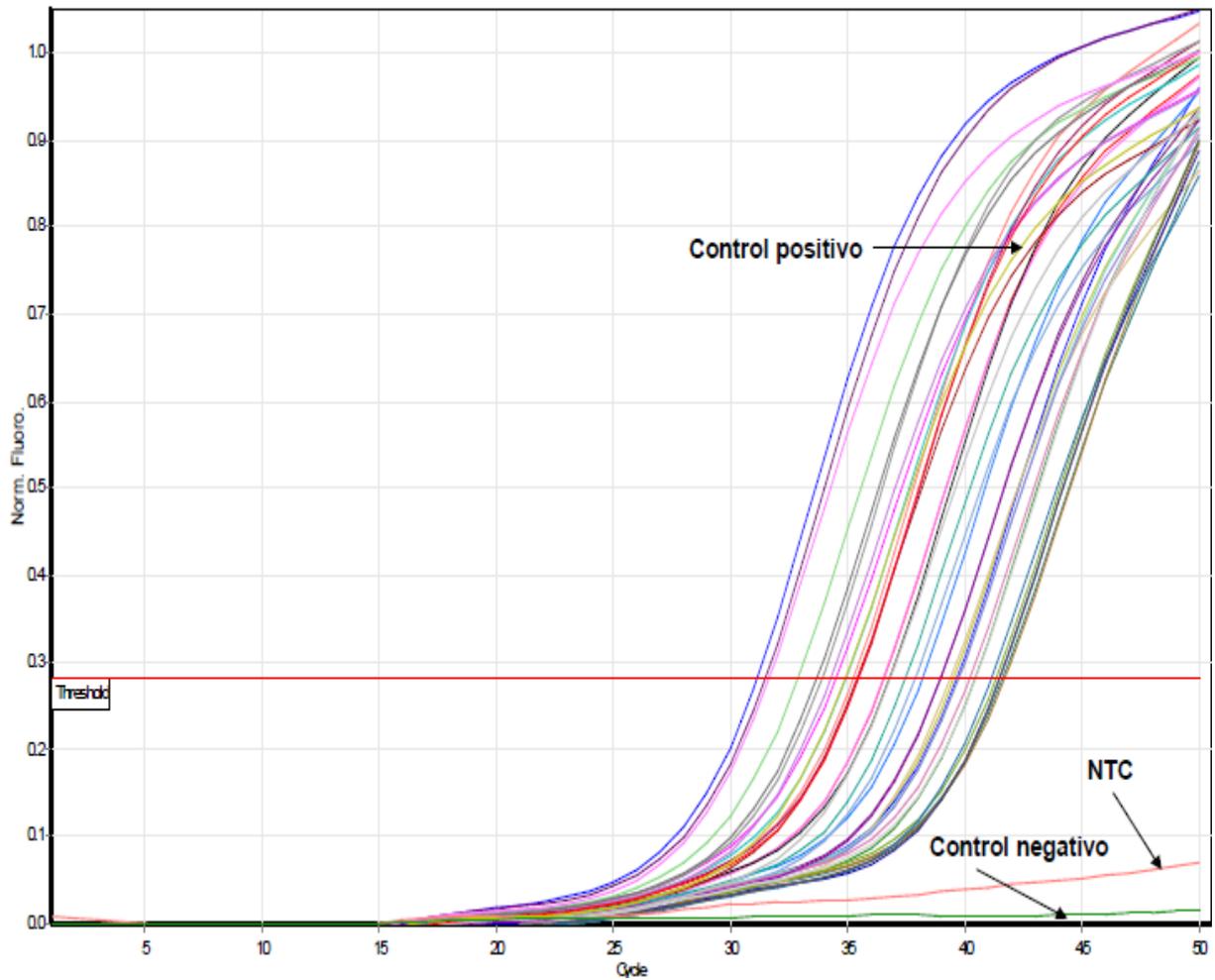


Figura 10. Detección de la expresión de *sarA* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBRGreen. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = Control sin DNA; Control positivo = *S. aureus* ATCC 33592; Control negativo = *S. aureus* No. 103 (sin el gen *sarA*).

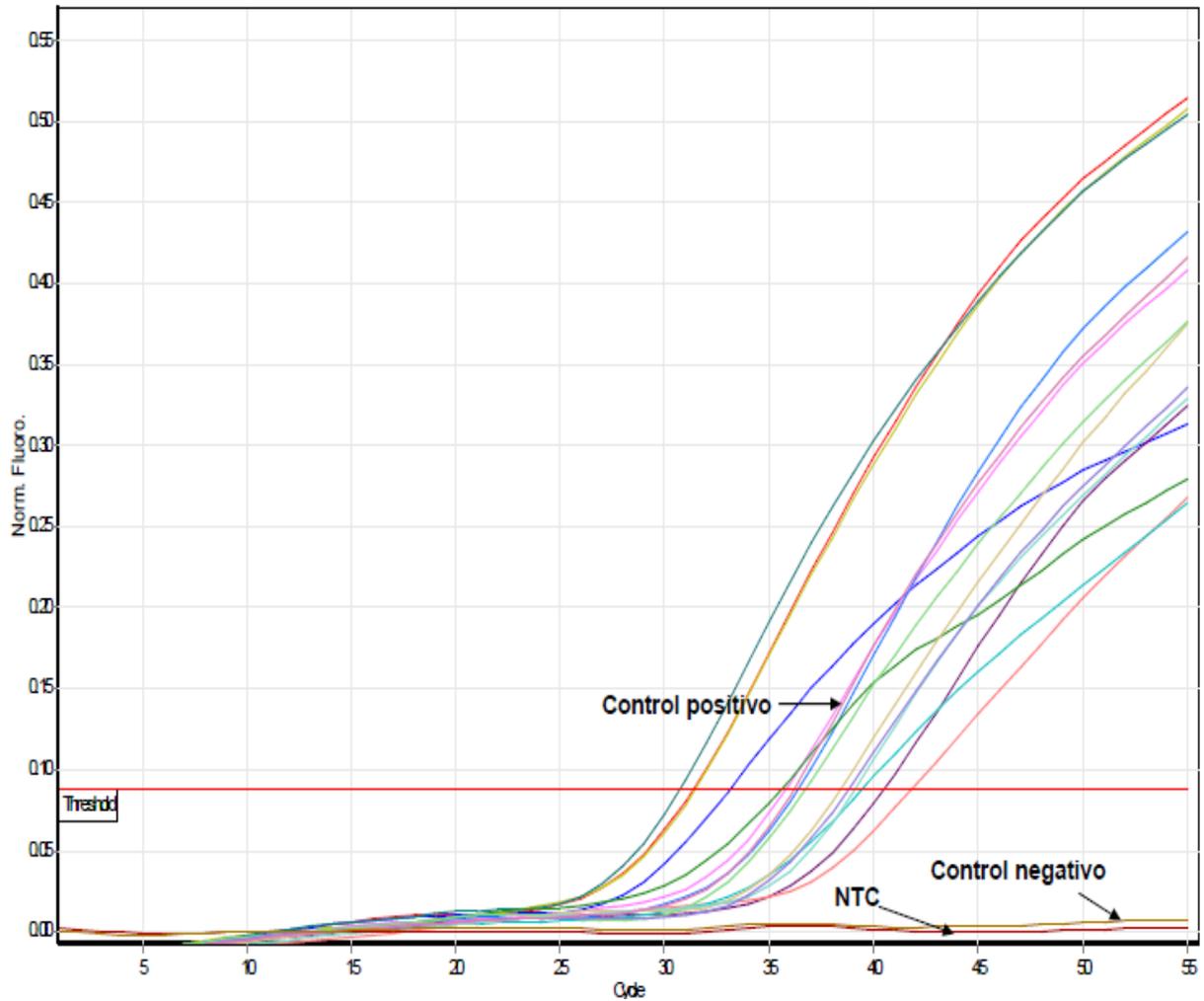


Figura 12. Detección de la expresión de *gyrB* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real utilizando sonda Taqman marcada en el extremo 5' con JOE. La lectura se realizó en el canal amarillo. NTC = Control sin DNA; Control positivo = *S. aureus* ATCC 33592; Control negativo = *S. epidermidis* ATCC 35984.

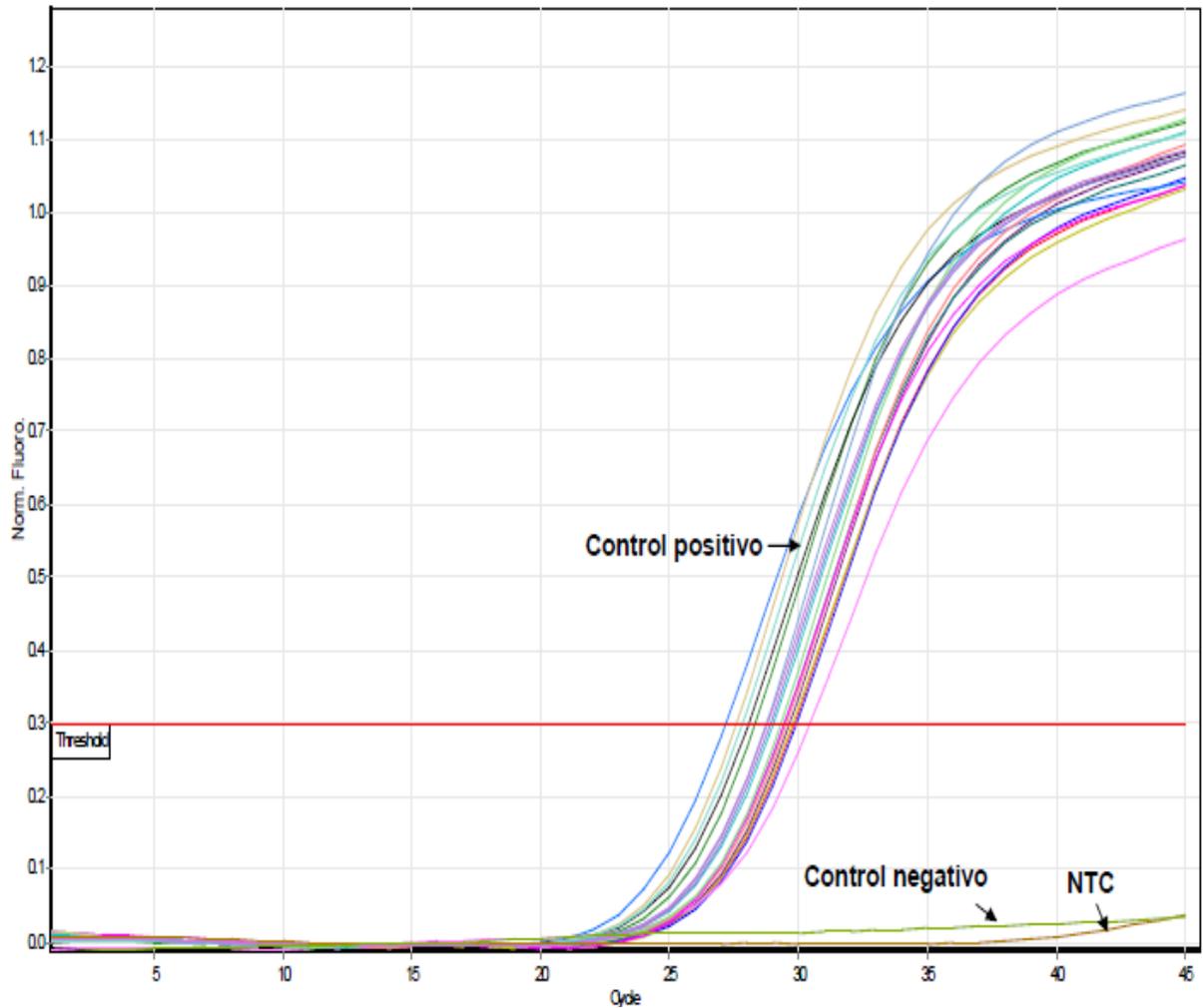


Figura 13. Detección de la expresión de *gyrB* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBRGreen. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = Control sin DNA; Control Positivo = *S. aureus* ATCC 33592; Control negativo = *S. epidermidis* ATCC 35984.

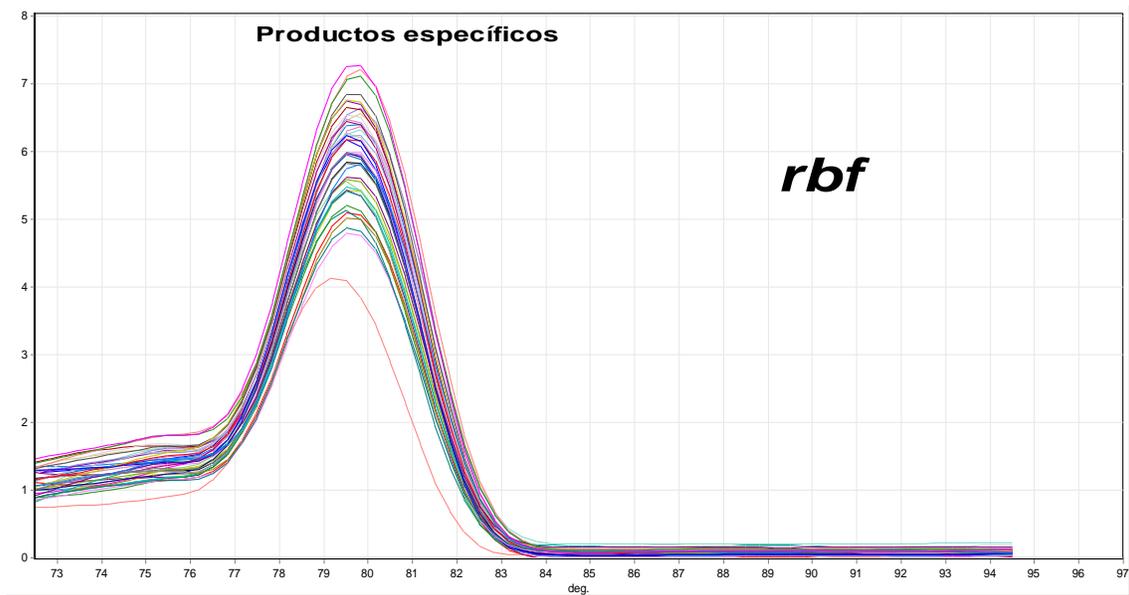


Figura 14. Curva de fusión (Melting point) de la corrida de *rbf*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

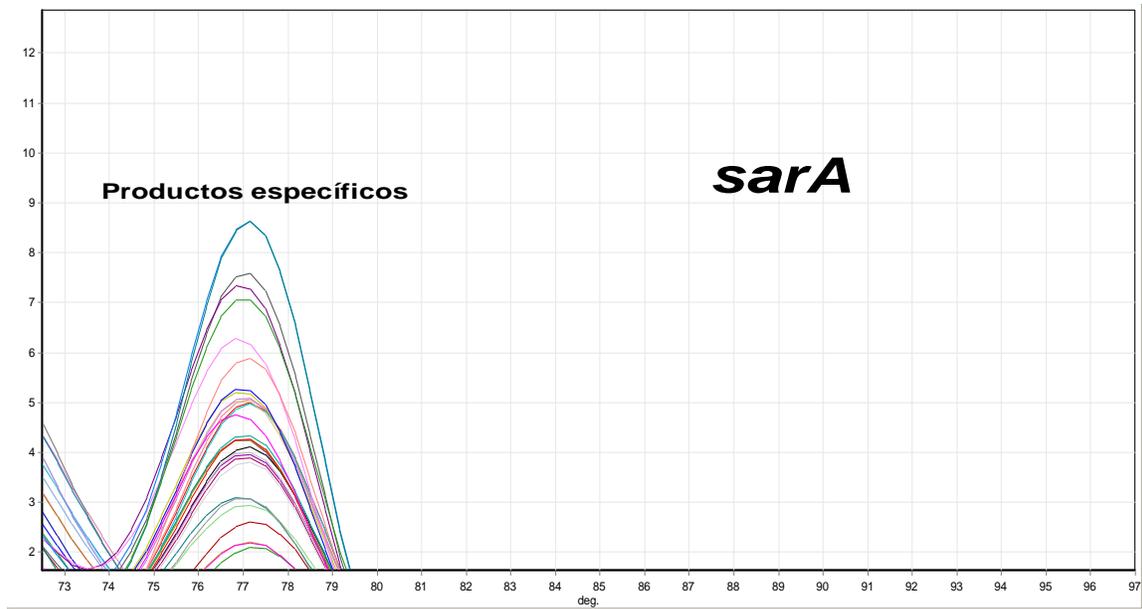


Figura 15. Curva de fusión (Melting point) de la corrida de *sarA*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

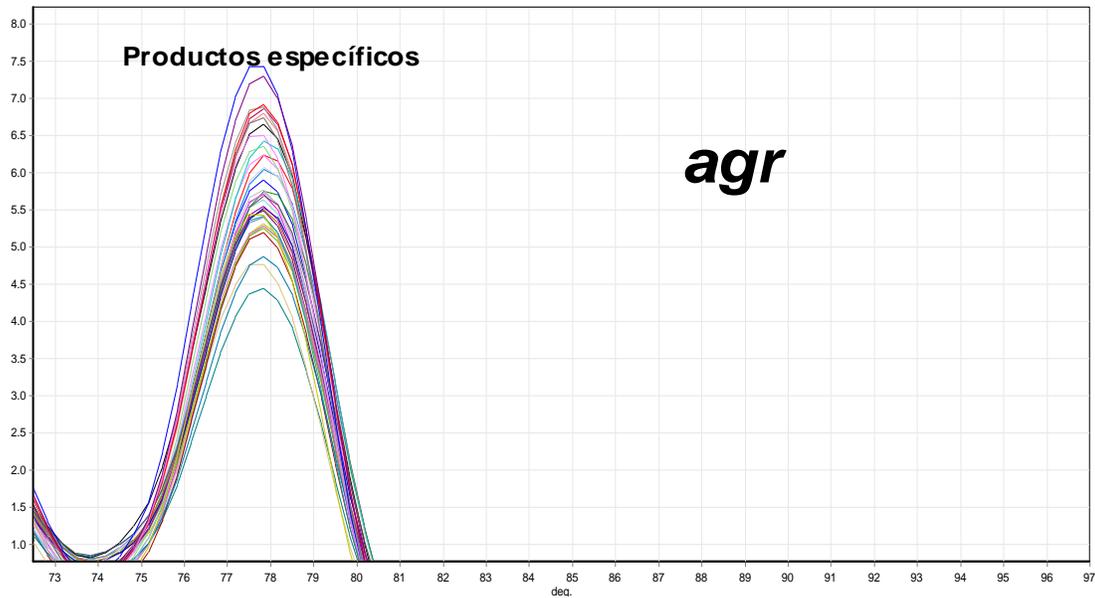


Figura 16. Curva de fusión (Melting point) de la corrida de *agr*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

Expresión de los dos grupos de *agr* presentes en las cepas de *S. aureus* por RT-PCR.

Para establecer si los dos grupos de *agr* presentes en las 12 cepas de *S. aureus* (Tabla 2) se expresaban, se seleccionaron 12 cepas con la combinación de *agrI* + II, dos cepas con la combinación de *agrI* + III y una cepa con la combinación de *agrI* + III, y se llevó a cabo un ensayo de RT-PCR utilizando los primers descritos por Gilot *et al.*, (2002). Las cinco cepas de *S. aureus* probadas expresaron ambos grupos de *agr* (Figura 17).

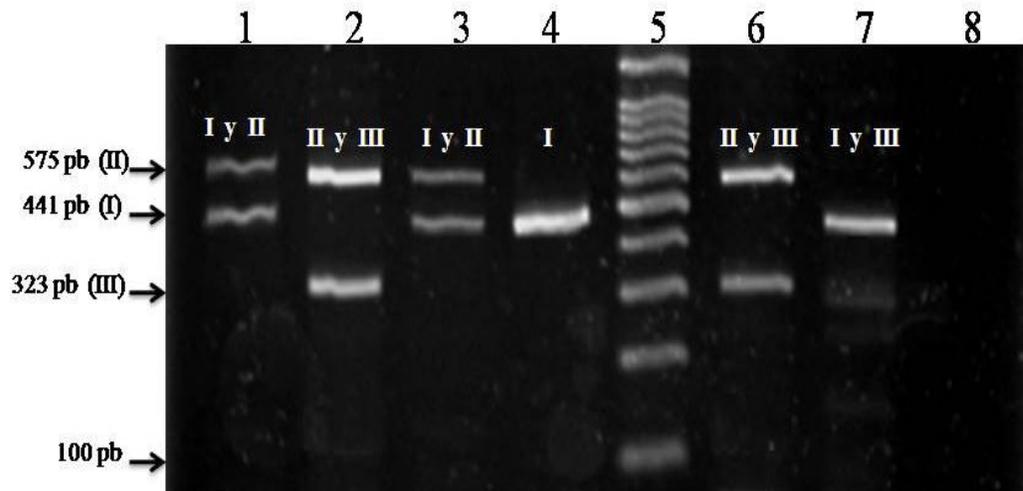


Figura 17. Detección de la expresión por RT-PCR de los dos grupos de *agr* presentes en las cepas de *S. aureus*. Carriles 1 y 3, *agrI* + II en *S. aureus* aisladas de catéter (amplicones de 575 pb y 441 pb); Carriles 2 y 6, *agrII* + III en *S. aureus* aisladas de catéter (amplicones de 575 pb y 323 pb); Carril 4, Control positivo para *agrI* (*S. aureus* ATCC 33592) (amplicón de 441 pb); Carril 5, MPM 100 pb ladder; Carril 7, *agrI* + III en *S. aureus* aislada de catéter (amplicones de 441 pb y 323 pb); Carril 8, Control negativo (sin DNA).

DISCUSIÓN

Pacientes estudiados

El propósito del presente trabajo fue determinar por PCR en Tiempo Real la expresión de los genes *icaA*, *rbf* y *sarA* involucrados en la formación de la biopelícula, y el locus *agr* responsable de la dispersión celular en un grupo de cepas de *Staphylococcus aureus* previamente aisladas, identificadas y caracterizadas a partir de 109 catéteres de pacientes infectados del servicio de hemodiálisis con Insuficiencia Renal Crónica (Cetina, 2011), en donde el 44% (n=48) fueron mujeres y el 56%(n=61) hombres (Figura 4), con edades comprendidas en el intervalo de 17-77 años (Figura 5). El origen de la insuficiencia renal en el 39.4% de los pacientes estudiados fue la Diabetes Mellitus, seguido de enfermedades no determinadas con el 29.3%, glomerulonefritis con el 13.7% e hipertension arterial con el 10.0% (Figura 7). Los datos obtenidos coinciden con los reportados por Soriano (2004), quien ha descrito que existen diversos factores de riesgo para desarrollar IRC, entre los cuales se encuentra la edad, la hipertension arterial y la Diabetes Mellitus como causa principal.

En este estudio y con base a la historia clínica generada en cada paciente por los médicos responsables de los servicios de hemodiálisis de cada hospital, no se logró establecer cuál fue el origen de la IRC en el 29.3% de los pacientes estudiados (Figura 7). La IRC constituye un gran problema de salud pública a nivel mundial, y cada año comienzan tratamiento con diálisis entre 80-120 pacientes por cada millón de habitantes, convirtiéndose en un problema sanitario, social y económico de primera magnitud (Bernardo, 2001). En México la IRC constituye un problema de salud frecuente en la población, que genera un alto costo social y económico, en la actualidad existen más de 100 mil personas que padecen insuficiencia renal crónica y es una de las principales causas de atención hospitalaria la alternativa terapéutica más usada es la hemodiálisis en este procedimiento se utiliza un catéter tipo Mahurkar en una vena del paciente generalmente la subclavia, el cual es frecuentemente contaminado causando infección en el sitio de inserción (Aguilar *et al.*, 2004).

Contaminación de los catéteres por *S. aureus*

La infección relacionada a catéteres constituye una de las principales complicaciones y la principal causa de bacteriemia nosocomial, siendo

Staphylococcus aureus la bacteria que con mayor frecuencia contamina los catéteres de pacientes sometidos a hemodiálisis (Fica, 2003). En este estudio se encontró que el 50.5 % (55 cepas) de los catéteres se encontró contaminado por *Staphylococcus aureus* y el 49.5% (54 cepas) por *Staphylococcus epidermidis* (identificado previamente por Cetina 2011 mediante la detección de los marcadores cromosómicos *femA femB* y *nuc*). Estos resultados concuerdan con los reportados por Stolic *et al.*, (2008) y Parameswaran *et al.*, (2010) quienes en ambos casos describieron que *S. aureus* fue la bacteria aislada con mayor frecuencia en infecciones asociadas a los catéteres, seguida por *S. epidermidis*, *Escherica coli*, *P. aeruginosa* y *Candida spp*. El alto porcentaje de contaminación por *Staphylococcus aureus* se puede explicar debido a que esta bacteria pertenece a la flora normal de la piel y las membranas mucosas de la nariz (portadores asintomáticos), en cuyo caso la contaminación de los catéteres puede haber venido de la misma flora de los convalecientes. En un estudio realizado por Toshkova *et al.*, (2001), se demostró la existencia de una relación epidemiológica entre cepas nasales de *S. aureus* e infecciones en heridas de pacientes. La contaminación del catéter por *S. aureus* es un gran

problema de salud ya que puede originar complicaciones como shock séptico, endocarditis, osteomielitis y bacteremias comprometiendo la vida de los pacientes (Nassar *et al*, 2001).

Detección de *icaA*, *sarA*, *rbf* y *agr* en las cepas de *S. aureus*

En un estudio previo el gen *icaA* fue detectado en el 96.3% (n=53) de las cepa (Tabla 2), Este porcentaje es semejante al 89.6% (n=56) encontrado en cepas de *S. aureus* de origen clínico (7 aisladas de catéteres) y al 100% (n= 56) en cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones complicadas de piel de los pacientes (Campbell *et al.*, 2008). *S. 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, 2001).

El gen *rbf* fue detectado en el 40% (n=22) de las cepas de *S. aureus* (Tabla 2). Se ha descrito que *rbf* 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). 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 74.5% (n=41) de las cepas de *S. aureus* (Tabla 2). La proteína SarA puede promover la formación de la biopelícula de una manera indirecta, suprimiendo la transcripción del represor del operón *ica*, y desbloqueado el operador, se activa el promotor para la transcripción del PNAG o mediante una proteína envuelta en activar/desactivar (turnover) la síntesis de PNAG (Valle *et al.*, 2003). Además SarA se une al promotor P3 de *agr* y regula la transcripción de RNAIII (Schmidt *et al.*, 2001). 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 distribución de los distintos grupos de *agr* detectados en las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres, evidenció la virulencia de las bacterias, sobre todo considerando que el locus *agr* es capaz de regular la producción de la mayoría de las exoproteínas, como

exoenzimas, toxinas, proteínas de superficie y otros factores de virulencia (Ji *et al.*, 1995; 1997).

Determinación de la expresión de *icaA*, *rbf*, *sarA* y *agr* por PCR en tiempo Real

Todas las cepas de *S. aureus* portadoras de los genotipos *icaA* (n=53), *rbf* (n=22), *sarA* (n=41) y *agr* (n=55) (Tabla 6), expresaron los genes cuando se crecieron en el medio líquido de caldo de soya y tripticasa (TSB) suplementado con glucosa 5% y NaCl 5% a 37°C durante 24 h. (Tabla 6; Figuras 8-13). La expresión del operón *ica* se ha asociado con la formación de la biopelícula en *S. aureus*; sin embargo, un incremento en la transcripción no se relaciona necesariamente con un aumento en la formación de la biopelícula (Fitzpatrick *et al.*, 2005a, 2005b). Cramton *et al.*, (1999) demostraron que una delección del operón *ica* de *S. aureus* resultó en un fenotipo de biopelícula negativo. Se ha descrito que la glucosa y NaCl por separado y/o juntos pueden inducir la formación de la biopelícula mediante el operón *icaADBC* en *S. aureus* (Moretro *et al.*, 2003). La combinación de la glucosa y NaCl no solamente fue necesaria para la expresión del operón *ica* en las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres, sino que también se

requirió para la expresión de *rbf*, corroborando lo propuesto por Lim *et al.*, (2004). La expresión de *sarA* en las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres sugiere su probable participación en la formación de la biopelícula. La expresión de *icA*, *rbf*, *sarA* y *agr* ha sido estudiada recientemente en cepas de *S. aureus* aisladas de alimentos bajo diferentes condiciones de stress (Rode *et al.*, 2007).

En este estudio el locus *agr* se expresó en todas las cepas de *S. aureus* estudiadas (n=55) (Tabla 6). Para establecer si los dos grupos de *agr* presentes en las 12 cepas de *S. aureus* se expresaban (Tabla 6), se utilizó un ensayo RT-PCR en 5 de las 12 cepas con cada una de las diferentes combinaciones, encontrando que las dos cepas con los grupos *agr* I y II, y *agr* II y III, y la cepa con los grupos I y III, expresaron ambos grupos (Figura 17). Se ha descrito que *agr* se expresa durante la transición de la fase de crecimiento exponencial a estacionaria (Ji *et al.*, 1995). La posible relación entre determinado grupo de *agr* y la capacidad de inducir una enfermedad específica, tal es el caso de las cepas *agr* I y *agr* II involucradas con enfermedades supurativas, cepas *agr* III relacionadas con enfermedad mediada por la Toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1) (Jarraud *et al.*, 2002) y

la asociación de *agr IV* con cepas productoras de la Toxina exfoliativa e impétigo (Jarraud *et al.*,2000). Se ha reportado que las cepas que contienen dos grupos probablemente se encuentran en un proceso de evolución de un grupo a otro (Gilot *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

- *Staphylococcus aureus* fue el responsable de más de la mitad de las infecciones asociadas a los catéteres de los pacientes del servicio de hemodiálisis.
- Por PCR en tiempo Real se demostró que todas las cepas de *S. aureus* portadoras de los genotipos involucrados en la formación de la biopelícula (*icaA*, *rbf*, y *sarA*) y en la dispersión celular (*agr*) fueron capaces de expresar los genes en un medio de TSB suplementado con glucosa y NaCl.
- La expresión de los distintos grupos de *agr* en las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres evidenció la virulencia de las bacterias,
- El aislamiento e identificación de las cepas de *S. aureus*, permitió a los médicos responsables de los servicios de hemodiálisis, prescribir el tratamiento médico oportuno, para erradicar la bacteria, y evitar probables complicaciones a los portadores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar EM, García LB, Hernández TI, Rosas R, Maria T. 2004. Las infecciones nosocomiales: registrar para prevenir. Instituto Nacional de Salud Pública de México. Rev Enferm IMSS 12:89-92.
2. Beenken EK, Dunman MP, McAleese F, Macapagal D, Murph E, Projan JS, Blevins SJ, Smeltzer SM. 2004. Global Gene Expression in *Staphylococcus aureus* Biofilms. J Bacteriol 186:4665-4684.
3. Bernardo DJ, 2001. Insuficiencia Renal Cronica. Facultad de Medicina. UNNE.
4. Bustos M, Aída HP, Marcia GC. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed 17:287-305.
5. Campbell JS, Deshmukh SH, Nelson LC, Stryjewski EM, Federspiel JJ, Tonthat TG, Rude HT, Barriere LS, Corey R, Fowler GV. 2008. Genotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from a Multinational Trial of Complicated Skin and Skin Structure Infections. J Clin Microbiol 46:678–684.

6. Cetina CA. 2011. Factores de virulencia involucrados en la formacion de labiopelícula de *Staphylococcus aureus*. Tesis de de Biología, FES Iztacala.
7. 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.
8. Cue D, Lei MG, Luang TT, Kuechenmeister L, Dunman PM, O'Donnell S, Rowe S, O'Gara JP, Lee CY. 2009. Rbf promotes biofilm formation by *Staphylococcus aureus* via repression of *icaR*, a negative regulator of *icaADBC*. J Bacteriol 191:6373-6377.
9. Daudirdas TJ, Bkake PG. 2003. Manualde diálisis. Ed Todd S. ling. 2 edicion, Masson 2003.
10. Fica AC. 2003. Consenso nacional sobre infecciones asociadas a catéteres vasculares centrales. Rev Chil Infect 20: 39-40.
11. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. 2005a. Evidence for *icaADBC* independent biofilm development mechanism in

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J Clin Microbiol 43:1973-1976.
12. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. 2005b. 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
 13. Fluckiger U, Ulrich M, Steinhuber A, Doring G, Mack D, Landemann R, Goerke C, Wolz C. 2005. Biofilm Formation, icaADBC Transcription, and polysaccharide intercellular Adhesin Synthesis by Sthaphyloccoci in a Device-Related. Infect Immun. 73:1811-1819.
 14. Fundación Mexicana del Riñón, A C. <http://www.fundrenal.org.mx>. Visitado en septiembre del 2011
 15. Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. 2002. Analysis of the Genetic Variability of Genes Encoding the RNA III-Activating Components Agr and TRAP in a Population of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cows with Mastitis. J Clin Microbiol 40:4060–4067.
 16. Jarraud S, Lyon GJ, Figueiredo AM, Gerard L, Vandenesch F, Etienne J, Muir TW, Novick RP. 2000. Exfoliatin-producing

- strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 182:6517-6522.
17. Jarraud S, Mougel CN, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, agr Groups (Alleles), and Human Disease. Infect Immun 70:631–641.
 18. Jeremy M, Yarwood, Patrick MS. 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections J Clin Invest 112:1620–1625.
 19. Ji G, Beavis R, Novick RP. 1997. Bacterial Interference caused by autoinducing peptide variants. Science. 276:2027- 2030.
 20. Ji G, Beavis R, Novick R. 1995. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. Proc Natl Aca Sci USA 92:12055-12059.
 21. Jönsson K, Signäs C, Muëller HP, Lindberg M. 1991. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. Eur J Biochem 202:1041–1048.

22. Kobayashi N, Wu H, Kojima K, Taniguchi K, Urasawa S, Uehara N, Omizu Y, Kishi Y, Yagihashi A, Kurokawa I. 1994. Detection of *mecA*, *femA* and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 113:259–266.
23. Kogan G, Sadovskaya I, Chaignon P, Chokr A, y Jabbouri S, 2006. Biofilm of clinical strains of staphylococcus that do not contain polysaccharide intercellular adhesion. *FEMS Microbiol* 255:11-16.
24. Lasa J, Pozo L, Penadés JR, Leiva J. 2005. Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit. Navar* 28:163-175.
25. Lim Y, Jana M, Luong TT, Lee YC. 2004. Control of Glucose- and NaCl-Induced Biofilm Formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 186:722–729.
26. Mack D, Rohde H, Harris LG, Davies AP, Horstkotte MA, Knobloch JK. 2006. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* 29:343-359
27. Moretro T, Hermansen L, Holck AL, Sidhu MS, Rudi K, 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.
28. Nabón A, 2004. *Staphylococcus aureus* resistente a betaláctamicos en infecciones detectadas en la comunidad. 2do. Congreso Uruguayo de bioquímica Clínica.
 29. 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* (MRS) isolates and allelic variation in accessory gene regulator (*agr*) locus *BMC Microbiology* 9:52:1-5.
 30. Nashev D, Toshkova K, Salasia ISO, Hassan AA, Lämmler C, Zschöck M. 2004. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol Lett* 233:45–52.
 31. Nassar GM, Ayus JC. 2001. Infectious complications of the hemodialysis access. *Kidney Int* 60:1-13.
 32. Ni Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Hook M, Foster TJ. 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 30:245–257.

33. Novales GM, Diamond JB. 2007. Biofilm: Latent Threat or Protective Factor State of Art Enf Inf Microbial 2007 27: 22-28.
34. Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, Vandenesch F, Moghazeh S. 1995. The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. Mol Gen Genet 248:446-58.
35. Novick RP. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol Microbiol 48:1429-1449.
36. Novick RP, Geisinger E. 2008. Quorum sensing in Staphylococci. Annu Rev Genet 42:541-564.
37. Parameswaran R, Sherchan J, Varma M, Chiranjay M, Mukhopadhyay C, Vidyasagar S. 2010. Intravascular catheter-related infections in an Indian tertiary care hospital. J Infect Dev Ctries 5:452-458.
38. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. 1994. MSCRAMM mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu Rev Microbiol 48:585–617.

39. Patti JM, Jönsson K, Guss B, Switalski LM, Wiberg K, Lindberg M, Hook M. 1992. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. J Biol Chem 267:4766–4772.
40. Rode MT, Langsrud S, Holck A, Moretro T. 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. International J Food Microbiol 116:372–383.
41. Schmidt KA, Manna AC, Gill S, Cheung AL 2001. SarT, a repressor of alpha-hemolysin in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun 69:4749-4758.
42. Soriano CS. 2004. Clasificación de los estudios de la enfermedad crónica, prevalencia, claves para el diagnóstico precoz, factores de riesgo de la enfermedad renal crónica. Nefrol 2004; 24:16.
43. Stewart PS y Costerton JW 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 158:135-138.
44. Stolić R, Trajković G, Perić V, Jovanović A, Stolić D, Sovtić S, Lazarević T, Živić Z. 2008. Central venous catheters in

- hemodialysis: to accept recommendations or to stick to own experience. *Clinic Urol Nefrol* 65: 21–26.
45. Toshkova K, Annemu C, Akineden O, Lammler CH. 2001. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections. National Center of Infectious and Parasitic Diseases. *FEMS Microbiol Lett* 202:17-24.
46. Treviño BA. 2004. Insuficiencia Renal Crónica: Enfermedad emergente, catastrófica y por ello prioritaria. Academia Mexicana de Cirugia. *Cir Ciruj* 72: 3-4.
47. Valle J, Toledo A, Barasain C, Jean M, Penades R, Lasa I. 2003 *SarA* and not *B* is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 48:1075-1087.
48. Velazquez ME, Aires M, Echaniz AG, Solorzano SF, Miranda NG, Silva SJ, Lencastre H. 2004. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City during a 7-years period (1997 to 2003): clonal evolution and impact of infection control. *J Clin Microbiol.* 42:3877-3880.
49. Wann ER, Gurusiddappa S, Hook M. 2000. The fibronectin-binding MSCRAMM *FnbpA* of *Staphylococcus aureus*

is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Biol Chem* 275: 13863–13871.

50. Weinrick B, Dunman MP, McAleese F, Murphy E, Projan JS, Fang Y, Novick PR. 2004. Effect of Mild Acid on Gene Expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 186(24): 8407-8423.

51. Wolz C, McDevitt D, Foster TJ, Cheung AL. 1996. Influence of *agr* on fibrinogen binding in *Staphylococcus aureus* Newman. *Infect Immun* 64: 3142-3147.