



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“Caracterización de genes que codifican
toxinas en cepas clínicas de
Staphylococcus aureus”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

NALLELI PADILLA NAVARRETE

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS.



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



*Hay una fuerza motor más poderosa
que el vapor, la electricidad y la
energía atómica;
LA VOLUNTAD*

Albert Einstein

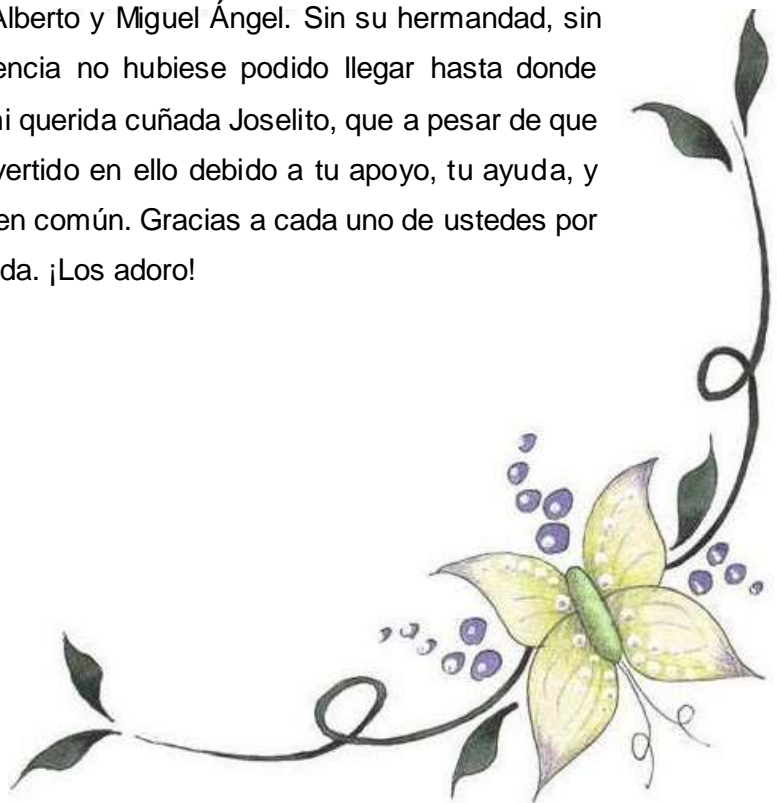


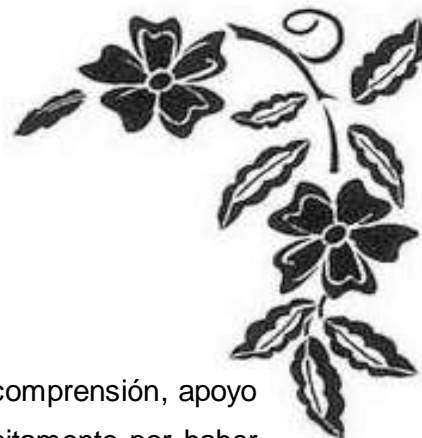


Dedicatoria

A mis padres Silvia y Alejandro a quienes amo profundamente, les agradezco infinitamente, todo su apoyo, su esfuerzo y su amor incondicional. Sin ustedes la vida no sería la misma, ya que durante mi trayectoria académica aprendimos y nos equivocamos juntos. Sus consejos, su orientación, su sabiduría y sus ánimos brindados para seguir en esta batalla llamada vida, me han convertido en lo que siempre soñé ser Bióloga, a pesar de todas las adversidades lo he logrado y estaré eternamente agradecida por todo lo que me han ofrecido, pues este es simplemente el inicio de un exitoso futuro juntos.

A mis amados hermanos Alejandra, Jorge Alberto y Miguel Ángel. Sin su hermandad, sin su apoyo, sin sus conocimientos y experiencia no hubiese podido llegar hasta donde estoy ahora, gracias por su compañía. Y a mi querida cuñada Joselito, que a pesar de que no eres mi hermana de sangre te has convertido en ello debido a tu apoyo, tu ayuda, y tus locuras, de las cuales tenemos muchas en común. Gracias a cada uno de ustedes por contribuir a que esto fuera una meta alcanzada. ¡Los adoro!





Agradecimientos

A mi Directora de Tesis, Dra. Gloria Luz Paniagua por su tolerancia, comprensión, apoyo y sobre todo por los conocimientos que me brindó, le agradezco infinitamente por haber hecho que el laboratorio de Análisis Clínicos fuera mi segundo hogar. Al Dr. Eric Monroy Pérez por el gran apoyo como profesor, por sus conocimientos impartidos, por haber estado al pendiente de mi trabajo, por aquellos días en los que nos robó una sonrisa a todos los adscritos del laboratorio, gracias por su comprensión su tolerancia y sus asesorías.

A mis sinodales de tesis: Dr. Sergio Vaca Pacheco, M. en. C David Segura Cobos y a la Biól. Susana Esther González Almazán en quienes encontré un gran apoyo, orientación y conocimiento. Gracias por sus valiosas sugerencias, observaciones y correcciones para la culminación de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio de Análisis Clínicos: Diego, Gaby, Jesús, Leo, pero en especial a las Biólogas, que con el tiempo se convirtieron en mis amigas, a ti Susana que aparte de haberme apoyado en mi Tesis, te convertiste en una persona especial, te agradezco por haberme compartido y enseñado, todo lo del laboratorio, al igual que a Paty, que con el tiempo se ganó mi confianza, mi admiración y mi respeto, las quiero y las aprecio mucho, las extrañaré, pero siempre estarán en mi corazón.

A mis grandes amigos: Andrea, Diana, Verito, Héctor, Paquito, Maricela, Rizo, Hernán y Elias, quienes me acompañaron durante esta gran aventura. Con cada uno de ustedes compartí y viví cosas únicas e inigualables que jamás podré olvidar, gracias por permitirme ser parte de su vida como ustedes son parte de la mía.

A mi querido Daniel, quien se ha convertido en una persona importante para mí, por siempre escucharme, comprenderme, apoyarme y animarme. Por asesorarme, por hacerme pensar y comprender que las posibilidades son infinitas y que ser directos es lo mejor y lo más sencillo.

ÍNDICE

Resumen.....	7
1. Introducción.....	8
1.1. Características de <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.2. Factores de virulencia y patogenicidad de <i>S. aureus</i>	8
1.3. Contaminación bacteriana en catéteres de hemodiálisis.....	14
1.4. Resistencia antimicrobiana.....	16
2. Antecedentes.....	19
3. Justificación.....	21
4. Objetivos.....	22
4.1. Objetivo general.....	22
4.2. Objetivos particulares.....	22
5. Metodología.....	23
5.1. Pacientes estudiados.....	23
5.2. Toma de muestra.....	23
5.3. Identificación bioquímica.....	23
5.4. Extracción de ADN bacteriano para los aislamientos.....	24
5.5. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> por PCR.....	24
5.6. Detección del gen que confiere resistencia a meticilina (<i>mecA</i>).....	25
5.7. Detección de los genes que codifican toxinas en cepas de <i>S. aureus</i> por PCR convencional y multiplex.....	26
5.8. Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de agarosa.....	27
6. Resultados.....	29
6.1. Pacientes estudiados.....	29
6.2. Causas de la IRC de los pacientes estudiados.....	31
6.3. Identificación de <i>S. aureus</i>	31
6.4. Detección del gen <i>mecA</i>	34
6.5. Detección de los genes que codifican toxinas por PCR convencional y multiplex en cepas de <i>S. aureus</i> de catéteres y narinas.....	35
6.6. Diferentes combinaciones de genes encontradas en cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de catéter y narinas.....	40

7. Discusión.....	42
7.2. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	42
7.3. Detección del gen <i>mecA</i>	43
7.4. Identificación de los genes que codifican toxinas por PCR convencional y multiplex en cepas de <i>S. aureus</i>	45
7.5. Combinaciones de los genes en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas de catéteres y narinas.....	51
10. Conclusiones.....	52
12. Literatura citada.....	53

RESUMEN

Las infecciones por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) asociadas a los catéteres de pacientes sometidos a hemodiálisis representan un serio problema de salud, debido a la gran cantidad de factores de virulencia presentes en estas cepas, capaces de ocasionar la muerte. El objetivo de este estudio fue caracterizar los genes que codifican toxinas en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres y narinas en pacientes de hemodiálisis. Las cepas de *S. aureus* fueron identificadas por las pruebas del manitol y la coagulasa, y mediante la detección por PCR de los marcadores cromosómicos *femA*, *femB* y *nuc*. El gen *mecA* y los genes que codifican toxinas fueron identificados por PCR convencional y multiplex, respectivamente. Se analizaron los catéteres y narinas de 112 pacientes de hemodiálisis, a partir de los cuales se identificaron 55 cepas de *S. aureus* de los catéteres y 38 cepas de *S. aureus* de las narinas. El gen *mecA* se detectó en todas las cepas aisladas de narinas (n=38) y en el 81.8% (n=45) de las cepas aisladas de los catéteres. La frecuencia de los genes en las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres fueron; *hlg* con el 96.3% (n=53), seguido por *sei* con el 94.5% (n=52), *seg* con el 89.0% (n= 49), *seh* con el 78.1% (n=43), *sea* con el 47.2% (n=26), *eta* con el 40% (n=22), *see* con el 27.2% (n=15), *seb*, *etb* y *tst* con el 23.6% (n=13), en cada caso, *sed* con el 10.9% (n=6) y *sec* con el 5.4% (n=3). Los genes *pvl* y *sej* no fueron detectados en ninguna de las cepas. La frecuencia de los genes en las cepas aisladas de las narinas fueron; *hlg* con el 100% (n=38), *seg* con el 97.3% (n=37), *sei* con el 89.4% (n=34). *sec*, *eta*, y *seh* con el 10.5% (n=4), en cada caso, *sea*, *seb*, y *pvl* con el 7.8% (n= 3), *see* y *etb* con el 5.2% (n=2), *sed* con el 2.6% (n=1) y finalmente *tst* y *sej* no se identificaron en ninguna de las cepas. Se obtuvieron 23 combinaciones diferentes de los genes que codifican toxinas en las 55 cepas de *S. aureus* provenientes de los catéteres y 10 combinaciones diferentes en las 38 cepas de *S. aureus* provenientes de narinas. Los resultados demostraron la virulencia de las cepas de *S. aureus*, debido a la elevada frecuencia de los genes que codifican toxinas en las cepas bacterianas asociadas a las infecciones de los pacientes de hemodiálisis.

Palabras claves: *Staphylococcus aureus*, toxinas, insuficiencia renal crónica, catéter, narinas, *mecA*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria de gran importancia médica, pertenece a la familia *Micrococaceae*, al género *Staphylococcus* y contiene más de 30 especies diferentes. Es un coco Grampositivo que mide de 0.5 a 1µm, no es móvil y no forma esporas, puede encontrarse en pares, en cadenas cortas o en racimos, que llegan a medir de 1 a 3 mm. Es un microorganismo anaerobio facultativo, pero tiende a desarrollarse mejor en condiciones con presencia de oxígeno diatómico (Kanafani & Fowler, 2006). Los estafilococos producen catalasa, coagulasa y crecen en medio químicamente selectivos tales como el medio S-110, Bair Parker, Manitol Salado, con glucosa, cloruro de sodio (NaCl), aminoácidos y ácido nítrico (HNO₃), a un pH que oscila entre los 4.8 a los 9.4, y a temperaturas que van desde los 25 a los 43°C (Velázquez, 2005). *S. aureus* se puede identificar en el laboratorio mediante la fermentación del manitol, por ser positivos a la catalasa y coagulasa y por la técnica de la PCR (Reacción en la Cadena de la Polimerasa) mediante la detección del marcador cromosómico *femb*, que participa en la síntesis de peptidogluano (Kobayashi *et al.*, 1994).

1.2. Factores de virulencia y patogenicidad de *S. aureus*

La infección por *Staphylococcus aureus* es una de las principales causas de las enfermedades nosocomiales en muchos países. El hombre es el principal reservorio para *S. aureus*, ya que habita de forma natural en la mucosa nasal, de ahí coloniza otras áreas corporales como la cavidad orofaríngea, las vías respiratorias altas, la piel, glándulas mamarias, el aparato genitourinario e intestinal (Fueyo, 2005). La tasa de portadores sanos se estima en el intervalo del 30-40%, dependiendo de los factores estacionales y epidemiológicos locales (Fernández *et al.*, 2001). En los animales puede producir cuadros clínicos similares a los humanos, pero en los rumiantes productores de leche origina la mastitis. Si las cepas infectivas son enterotoxigénicas y pasan a la leche, tanto

ésta como los alimentos de origen lácteo se pueden convertir en un problema de salud pública (Digne *et al.*, 2000)

La patogenicidad de *S. aureus* se debe principalmente a su pared celular, que está formada por un 50% de mureína, que es un péptidoglucano compuesto de subunidades alternas de polisacáridos, dicha pared celular puede tener actividad endotóxica y estimular la liberación de las citoquinas (Hurtado *et al.*, 2002). Otros componentes importantes de la pared celular son los ácidos teicoicos que contribuyen alrededor del 40% de su peso, estos son de gran importancia en la patogenia ya que están involucrados en la adherencia a los órganos y a las mucosas del hospedero (Kessler *et al.*, 1991). Algunas cepas producen una microcápsula responsable del 75% de las infecciones humanas. Por otro lado las estafiloxantinas producidas por *S. aureus* son capaces de destruir a los neutrófilos del sistema inmune y son las responsables de la pigmentación oro-amarillenta, característica de esta especie (Song *et al.*, 2009).

Estudios recientes han reportado que las exoproteínas estafilocócicas como la citolisina y los superantígenos provocan un mayor daño que los factores de virulencia de superficie celular, como la capsula bacteriana (Lin & Peterson, 2010). La mayoría de las cepas producen un grupo de enzimas, exotoxinas y citotoxinas (Cuadro 1), dentro de las citotoxinas se encuentran cinco hemolisinas, la nucleasa, proteasa, lipasa, hialuronidasa y colagenasa que tienen como función principal la degradación de los tejidos del huésped para convertirlos en nutrientes (Madigan *et al.*, 2004).

La pared celular, la capsula, las proteínas, las toxinas y enzimas, además de otros componentes, forman parte de los factores de virulencia de *S. aureus*. Los factores de virulencia son los responsables de las lesiones severas a mujeres en periodo de lactancia, neonatos, niños, pacientes portadores de VIH, diabéticos e hipertensos, especialmente aquellos con afección pulmonar e insuficiencia renal crónica (Lee *et al.*, 1997), así como la causa de infecciones cutáneas, pulmonares, de huesos, endocarditis, bacteriemia, neumonía necrotizante y del shock séptico (Campbell *et al.*, 2008).

Algunas cepas de *S. aureus* producen exotoxinas pirogénicas como las enterotoxinas estafilocócicas y la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), que es codificada por el gen *tst*. En 1978 esta toxina fue reconocida por el uso de tampones vaginales colonizados por cepas de *S. aureus*, siendo las responsables del 90% de las enfermedades menstruales y generalmente ocurren dentro de dos días antes o después de la menstruación (Lin *et al.*, 2011). Sin embargo existe el shock tóxico no menstrual, que ocurre con una complicada infección por *S. aureus*, después de que el paciente se ha sometido a una intervención quirúrgica, quemadura o neumonía post-influenza y su prevalencia es de un 25% en todos los aislados clínicos (Foster, 2005). Las características clínicas de TSST-1 es fiebre (≥ 38.9 ° C), erupciones cutáneas, descamación tardía de palmas, manos y pies (después de una o dos semanas del inicio de la enfermedad), hipotensión y disfunción multiorgánica, lo cual es grave y potencialmente mortal (Bernal *et al.*, 1999).

En el siglo XXI, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) siguen siendo hoy en día uno de los principales problemas para la salud pública. *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico más frecuente entre las intoxicaciones de origen alimentario (Le Loir *et al.*, 2003). Estas exotoxinas son causadas por la contaminación introducida por los mismos manipuladores o bien por la utilización de materia prima contaminada. Las enterotoxinas estafilocócicas (SE) son proteínas simples termoestables y de bajo peso molecular y los principales genes que codifican para estas toxinas son *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* (Manfredi *et al.*, 2010), sin embargo hoy en día se sabe que existen quince genes que codifican las enterotoxinas estafilocócicas (Letertre *et al.*, 2003).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos contaminados por SE, son de gran importancia clínica, es una de las principales causas de hospitalización a nivel mundial, ya que el 10% de los pacientes contaminados han ingresado al hospital, se ha reportado que la cantidad mínima para causar una intoxicación severa por *S. aureus* es de 10^6 UFC/g de alimento de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana y el período de incubación es de 2 a 6 horas, después de la ingestión de las toxinas preformadas (Bergdoll, 1967). La colonización en los

alimentos se ha asociado en gran parte con la formación de gastroenteritis y enterocolitis, que se manifiesta clínicamente con náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea (Balaban & Rasooly, 2000) siendo los ancianos los más susceptibles a la morbilidad (Klots *et al.* 2003).

La gama Hemolisina (*hlg*) y Pantón Valentine Leucocidina (*pvl*), pertenecen a la familia de las toxinas sinérgohimenotrópicas (Mesrati *et al.*, 2010), que ejercen acción exclusiva sobre células humanas y de conejo (Duman *et al.*, 2013). El gen *pvl* codifica para una citotoxina codificada solo por *S. aureus*, esta se encarga de destruir las células polimorfonucleares e induce algunas veces a la apoptosis de estas mismas, ocasionando en el ser humano, daño en los tejidos blandos, abscesos mamarios, infección en la piel, neumonía necrotizante e incluso puede conducir a complicaciones graves en los pacientes hospitalizados (Xiao *et al.*, 2008). Se ha estudiado que solo el 5% de las cepas de *S. aureus* contienen el gen *pvl*, sin embargo durante la última década, la morbilidad del gen ha incrementado en todo el mundo, los países más afectados son Inglaterra y Gales que al año tienen 2,000 casos, principalmente con pacientes menores de 40 años, pero cualquier individuo puede estar susceptible, lo cual es un problema de salud pública de gran interés.

Finalmente, de las toxinas exfoliativas (ETS) codificadas por los genes *eta*, *etb*, *etc*, y *etd*, solo tres están asociados con el ser humano *eta*, *etb* y *etd*, mientras que el gen *etc* he detectado solo en cepas de *S. aureus* aisladas de equinos (Sato *et al.*, 1994). Sin embargo los genes con mayor relación al impétigo por *S. aureus* son *eta* y *etb*, mientras que *etd* se detecta principalmente en las cepas aisladas de pacientes con infección en tejido blando y en abscesos cutáneos (Nakaminami *et al.*, 2008). Las toxinas exfoliativas A y B son proteínas extracelulares que desarrollan la enfermedad de Ritter o bien el síndrome de la escaldadura estafilocócica (SSSS), que fue descrita en 1878 (Mockenhaupt *et al.*, 2005) provocando en recién nacidos y niños menores de seis años, ampollas o vesículas en la piel, descamación intraepidérmica por diseminación hematogénea de las toxinas, siendo la cara, la boca, la nariz, los oídos, los brazos y las piernas, las zonas más afectadas (Fuminori *et al.*, 2011). En los países occidentales se han

presentado un 90% con la toxina *eta* y un 85% de los casos con la toxina *etb*, sin embargo en Japón se obtiene un índice mayor con respecto a la toxina *etb* en hospitales pediátricos (Guerrer, 2002).

Los factores de virulencia que presenta *Staphylococcus aureus* son de gran importancia médica ya que sus toxinas pueden ocasionar la muerte principalmente a paciente vulnerables, por lo que hoy en día las investigaciones para contrarrestar dichas enfermedades y para el entendimiento de la evolución de esta bacteria durante los últimos años siguen en proceso de estudio.

Cuadro 1. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*
(Tómado de Quisberth. 2007)

Factores	Efectos biológicos
Componentes de la estructura	
Cápsula	Adhesina que impide la quimiotaxis y fagocitosis, impide la proliferación de las células mononucleares.
Peptidoglicano	Proporciona estabilidad osmótica, y estimula la producción de pirógenos, endógenos y es un quimioatrayente leucocitario.
Acido teicoico	Regula la concentración catiónica de la membrana celular, uniéndose a la fibronectina
Toxinas	
Citotoxinas α , β , δ , Υ y Leucocidina de PV	Tiene un mecanismo de poro-perforadora, sobre las membranas de leucocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos.
Toxina exfoliativa (ETA y ETB)	Son proteasas, que rompen los puentes intracelulares en el estrato granuloso de la epidermis
Enterotoxinas	Super antígenos que estimulan la proliferación de células T y la liberación de citocinas. Estimula la proliferación de mediadores químicos inflamatorios en los mastocitos, aumentando el peristaltismo.
Toxina del Síndrome de shock tóxico (TSST-1)	Super antígenos que estimulan la proliferación de células T y la liberación de citocinas. Produce la destrucción celular de las células endoteliales.
Enzimas	
Coagulasa	Convierte el fibrinógeno en fibrina.
Catalasa	Cataliza la descomposición del peróxido de hidrogeno.
Hialuronidasa	Hidroliza los ácidos hialurónicos en el tejido conectivo, facilitando la diseminación de los estafilococos en los tejidos.
Fibrinolisisina	Disuelve los coágulos de fibrina.
Lipasas	Hidroliza los lípidos.
Nucleasas	Hidroliza el ADN.
Penicilasa	Hidroliza las penicilinas.

1.3. Contaminación bacteriana en catéteres de hemodiálisis.

En el año 2002 en las guías de la National Kidney Foundation de Estados Unidos se definió a la Insuficiencia Renal Crónica (IRC) como la presencia de daño renal, caracterizado por anomalías estructurales o funcionales con o sin descenso de la tasa de filtración glomerular (TFG) a menos de 60ml/min/1.73m². Esto implica una incapacidad renal para realizar las funciones de depuración y excreción de residuos tóxicos y nitrogenados. La regulación del equilibrio ácido-básico e hidroeléctrico, ocasionaron complicaciones propias del síndrome urémico, manifestándose mediante alteraciones digestivas, hematológicas, cardiovasculares, neurológicas y metabólicas. La IRC causa diversas enfermedades crónico degenerativas, fenómeno que ocurre de manera similar en todo el mundo, si no se trata conduce lamentablemente a la muerte (Kidney, 2002).

En México se ha demostrado un incremento importante en la prevalencia de la IRC, los últimos datos establecidos por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), estiman una incidencia de 52,000 pacientes en terapias sustitutivas, de los que el 80% se atienden en esta institución. Se registró un incremento de 92 pacientes por millón de habitantes (ppmh) en el año 1999 a 400 ppmh en el año 2008 (Martínez, 2011). Las causas de la IRC se pueden agrupar en enfermedades vasculares, glomerulares, túbulo intersticiales y uropatías obstructivas. Actualmente en nuestro país la etiología más frecuente es la diabetes mellitus, siendo la responsable del 50% de los casos de enfermedad renal, seguida por la hipertensión arterial y las glomerulonefritis. México es uno de los países con mayor ocurrencia de diabetes mellitus en el mundo. La demanda de atención hospitalaria por diabetes mellitus en el IMSS, medida según los egresos hospitalarios para el periodo 2004 a 2010 ha permanecido constante, representando el 74.7%. Es común después de los 40 años de edad, alcanzando su frecuencia máxima a los 60 años y se estima que para el año 2030 incremente dicho porcentaje entre un 86 a un 93% (Castro *et al.*, 2012).

El trasplante renal constituye la mejor alternativa de tratamiento para el paciente urémico crónico, sin embargo, no a todos los pacientes se les puede realizar el

trasplante renal, por lo que la inserción de catéteres vasculares representa otra alternativa para el tratamiento de la IRC, lamentablemente constituye un factor de riesgo para contraer infecciones (Marschall, 2008). A pesar de su gran utilidad en los hospitales, su uso no está exento de posibles infecciones bacterianas, la colonización en catéteres puede estar presente desde las primeras 24 h, la contaminación puede ser a partir de la flora y/o piel del paciente, su inoculación puede predominar en menos de 10 días de su inserción, ocupando un 80% de los casos (Barbara *et al.*, 2004). Debido a lo anterior se han realizado cultivos en catéteres y/o en piel con el propósito de determinar la presencia bacteriana, y se ha descrito que estafilococos coagulasa negativa presenta la mayor frecuencia (30-40%), siendo *Staphylococcus aureus* la más cuantiosa (5-10%), seguida de *Enterococcus ssp*, (4-6%) y finalmente *Pseudomonas aeruginosas* con un 3 a un 6% (Widmer, 1997).

La bacteriemia causada por *S. aureus* en catéter (CRSAB) es una de las infecciones más graves en todo el mundo que puede ocasionar complicaciones en los pacientes hospitalizados durante la terapia, como es la endocarditis, tromboflebitis séptica, infección metastásica y la muerte (Park *et al.*, 2012), estudios recientes demuestran que del 12 al 24% de los pacientes son infectados por bacteriemia causada por *S. aureus* (Eck *et al.*, 2012).

Una vez colonizada la superficie interna o externa del catéter *S. aureus* produce un biofilm o biopelícula que se adhieren a la superficie celular acumulándose para la formación de grupos celulares de capa múltiple, las bacterias proliferan produciendo exopolímeros dentro de la biopelícula proporcionando una alta resistencia a los agentes antimicrobianos (Götz, 2002). El desarrollo de estas biopelícula en la superficie de los catéteres durante las primeras dos semanas después de la colocación, procede a la migración de las bacterias en el torrente sanguíneo. Existen varias estrategias y evaluaciones clínicas para la prevención de las infecciones en catéter ocasionadas por *S. aureus* (Álvarez *et al.*; 2010).

1.4. Resistencia antimicrobiana.

Hoy en días las cepas de *S. aureus* presentan un amplio rango de resistencia a diversos antibióticos y se pueden encontrar cepas multirresistentes (Cuadro 2). La adquisición de dicha resistencia se debe al intercambio de manera horizontal de genes que son transportados por elementos genéticos móviles como son los plásmidos, transposones y secuencias de inserción (Deurenberg *et al.*, 2007).

A principios de los años 40 la introducción de la penicilina para el tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus* disminuyó la frecuencia, sin embargo diez años después de su utilización se reportaron elevados porcentajes de resistencia bacteriana a este antimicrobiano (Speller *et al.*, 1997). En 1959 se sintetizaron en Europa otros antibióticos para contrarrestar las infecciones ocasionadas por *S. aureus*, uno de estos fue un derivado semisintético de la penicilina denominado meticilina, y después de un año se detectó la primera cepa resistente (methicillin resistant *S. aureus*; MRSA). Cuatro años después se reportó el primer brote nosocomial causado por cepas MRSA, desde entonces se han notificado cepas de *S. aureus* meticilinorresistentes en todo el mundo (Hiramatsu *et al.*, 1998). Dicha resistencia a meticilina se debe a la adquisición del gen *mecA*, el cual no es endógeno de esta bacteria y se encuentra integrado en el cromosoma *ma*. El gen *mecA* codifica para una proteína de unión a la penicilina (PBP2A) la cual presenta baja afinidad para los antibióticos β -lactámicos (Sauer *et al.*, 2008).

El sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (National Nosocomial Infectious Surveillance System, NNIS) de EUA determinó que en pacientes hospitalizados la prevalencia de las cepas MRSA en el 2001 fue de un 80%. Esta prevalencia se debe a las variaciones geográficas y periódicas (Edmond *et al.*, 2001). Estudios en México sobre la prevalencia de cepas de MRSA en el hospital de pediatría del Centro Médico Nacional, siglo XXI-IMSS, reportan que la frecuencia de cepas MRSA se ha incrementado del 7% al 30% en el periodo de 1997 a 2001 (Velázquez *et al.*, 2004).

Debido a la resistencia a la meticilina por las cepas de *S. aureus*, se introdujo la vancomicina a principios de los años 90 como único antibiótico efectivo contra *S. aureus*, pero en el 2002 se detectaron las primeras cepas resistentes a este

antibiótico (vancomycin resistant *S. aureus* VRSA). Actualmente se analizan nuevas alternativas para combatir a este microorganismo, tales como la telavancina, dalbavancina, tigeciclina, daptomicina, linezólido y la quinupristina-dalfopristina. Se espera que algunos de estos antibióticos en estudio sirvan para controlar las infecciones ocasionadas por *S. aureus* (Wilcox, 2003).

Cuadro 2. Principales antibióticos de resistencia en cepas de *S. aureus*(Tomado de Bustos *et al.*, 2006).

Antibiótico	Genes de resistencia	Producto del gen	Mecanismo de resistencia	Localización
Penicilina	<i>blaZ</i>	β -lactamasa	Hidrólisis enzimática del núcleo β -lactámico	Plásmidos: Tn552
β -láctamicos	<i>mecA</i>	PBP2a	Afinidad reducida al antibiótico	Cromosoma SSC- <i>mec</i> : Tn4291
Aminoglucosidos	<i>aacA-aphD</i>	Acetiltransferasa, fosforotransferasa	Modificación por acetilación o fosforilación	Cromosoma: plásmidos: Tn4001, Tn5404, Tn5405
Macrólidos, lincosamidas	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i>	Acarreadores ABC, Acetiltransferasa	Bomba de expulsión. Modificación por acetilación	Plásmidos
Tetraciclinas	<i>tetK</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM</i>	Sistemas clase K, L y M	Bombas de expulsión protección ribosomal	Plásmidos, Tn916
Rifampicina	<i>rif</i>	RNA polimerasa	Mutación en la subunidad β del RNA polimerasa	Cromosoma
Ácido fusídico	<i>fusA</i> , <i>fusB</i>	Factor de elongación G	Alteración del factor de elongación G	Plásmidos
Quinolonas	<i>par</i> <i>gyrA</i> o <i>gyrB</i>	Componente ParC de la topoisomerasa IV componentes GyrA o GyrB de la girasa	Mutación en la subunidad A de la girasa y topoisomerasa IV	Cromosoma
Mupirocina	<i>mupA</i>	Isoleucil tRNA sintetasa	Producción de una isoleucil tRNA sintetasa modificada	Plásmidos
Trimetoprim-sulfametoxazol	<i>dfrA</i> <i>sula</i>	Dehidrofolato reductasa (DHFR) dehidropteroato sintasa	Afinidad reducida de la DHFR Sobreproducción de ácido p-aminobenzoico	Cromosoma Cromosoma: Tn4003
Glicopéptidos	<i>van</i>	Peptidoglicano alterado D-Ala-D-Lac	Se atrapa la vancomicina en la pared celular. Síntesis de un dipéptido que reduce la afinidad de la vancomicina	Cromosoma: Plásmidos: Tn1546.
Oazolidinonas	<i>rm</i>	rRNA 23S	Mutación en el dominio V del rRNA 23S, interfiere con la unión ribosomal	Cromosoma
Quinupristina dalfopristina (Q-D)	Q: <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> D: <i>vat</i> , <i>vatB</i>	Metilasa ribosomal Acetiltransferasa	Reduce la afinidad a la subunidad ribosomal 23S Modificación enzimática de la dalfopristina	Cromosoma: Plásmidos
Cloramfenicol	<i>cat</i>	rRNA 50S	Modificación por acetiltransferasa	Plásmidos
Fosfomicina	<i>fosB</i>	Glutación S Transferasa	Modificación en la síntesis de N-acetil murámico	Plásmidos

2. ANTECEDENTES

1. Mehrotra y colaboradores en el 2000, describieron la técnica de PCR multiplex como una técnica confiable en la biología molecular. Ellos analizaron 107 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de narinas, todas estas presentaron el gen *mecA*. También detectaron los genes que codifican para toxinas extracelulares, encontrando que la frecuencia del gen *tst* fue del 24.3%, seguido por *sea* con el 19.6%, *seb* con el 5.6%, *seb* con el 7.5% y el porcentaje más bajo fue para el gen *sed* con el 1%.
2. Peacock y colaboradores en el 2002, analizaron 178 cepas de *S. aureus* aisladas de narinas de pacientes donantes de sangre, recolectados durante un año en los hospitales de Oxford, Reino Unido. En este estudio se analizaron 14 toxinas y se reportó una alta frecuencia para los genes *hlg* (89%), *seg* (64%) y *sei* (60%), los genes que presentaron menor frecuencia en este estudio fueron *sed* (9%), *etb* (6%) y *pvl* (2%), para el caso del gen *see* la frecuencia fue nula. Además se reportaron 46 diferentes combinaciones de los genes que codifican toxinas.
3. Campbell y colaboradores en el 2008 aislaron y compararon microbiológicamente 90 cepas de *Staphylococcus aureus*, en pacientes con skin structure infections (cSSSI) de once sitios de los Estados Unidos (56 aislamientos) y siete de Sudáfrica (34 aislamientos), en éstas cepas se identificó el SCC*mec* (*Staphylococcus* cassette chromosome *mec*) y la presencia de 31 genes de virulencia.
4. Hamdan y colaboradores en el 2010 analizaron 1,243 cepas de la comunidad mexicana, de las cuales 743 (59.8%) fueron de pacientes asintomáticos, encontrando que el 39.8% de estas cepas fueron de origen nasal y de garganta, 165 (22.2%) de portadores nasales exclusivos y 282 (38%) de portadores exclusivos de garganta. Se reportó una alta resistencia de las cepas de *S. aureus* a la penicilina (91.1%), eritromicina (23.1%), tetraciclina (15.5%), cefalotina (7.1%) y clindamicina (6.2%), otros agentes antimicrobianos analizados fueron ciprofloxacina, fosfomicina, trimetoprim-

sulfametoxazol y gentamicina, que presentaron una resistencia menor del 2%. Para vancomicina no se encontró resistencia alguna.

5. Deboye y colaboradores en el 2013 analizaron 61 cepas de *S. aureus* en pacientes quirúrgicos hospitalizados de la universidad de Obafemi Awolowo, todas las cepas fueron positivas para el gen *mecA*. De las 61 cepas de *S. aureus*, 48 se aislaron de narinas y el resto se aisló de la piel de dichos pacientes. Se identificaron 15 genes que codifican toxinas, el gen *hlg* se identificó en casi todas las cepas analizadas (99%), seguido de las enterotoxinas *seg-sei* con el 42.6% y la leucocidina *pvl* con el 41%. Las toxinas identificadas con menor frecuencia entre las cepas de *S. aureus* fueron *etd* y *sej* con el 1.6% y finalmente la toxina *etb* no se presentó en ninguna de las cepas de *S. aureus*.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que actualmente en nuestro país no se han caracterizado genéticamente las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de catéteres y de narinas en pacientes sometidos a hemodiálisis, el propósito de este estudio fue identificar los genes que codifican toxinas, así como establecer las diferentes combinaciones de asociación de estos genotipos en cepas de *S. aureus* aisladas de las narinas y de los catéteres de pacientes con insuficiencia renal crónica.

4. OBJETIVOS

4.1. General.

- Caracterizar los genes que codifican toxinas en cepas de *S. aureus* aisladas e catéteres y narinas de pacientes con insuficiencia renal crónica.

4.2. Particulares.

- Detectar el gen *mecA* que codifica la resistencia a la meticilina en el grupo de cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres y de las narinas.
- Determinar la frecuencia de los genes que codifican toxinas en las cepas de *S. aureus*.
- Encontrar los diferentes patrones de asociación de los genes de virulencia de las cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres y narinas de pacientes con insuficiencia renal crónica.

5. METODOLOGÍA

5.1. Pacientes estudiados

Se seleccionaron 112 pacientes con infección en el sitio de inserción del catéter tipo Mahurkar durante su asistencia al servicio de hemodiálisis de las siguientes instituciones: Hospital General Regional 72 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Unidad Médica Ambulatoria (UMAA) n° 199, Hospital Regional n° 196 Aragón (HRA) y del Instituto de Seguridad Social del Estado de México y municipios (ISSEMyM) Satélite, ubicados en el Edo. de México. El tamaño de la muestra se eligió de acuerdo a lo establecido por el teorema central del límite (Scheaffer *at al.*, 1987) Los signos de infección se caracterizaron con la presencia de eritemas, inflamaciones, dolores y en algunos casos supuraciones de color amarillo-verdoso en los pacientes.

5.2. Toma de muestra

Después de obtener el consentimiento informado de cada paciente, la toma del inóculo se realizó de la parte terminal del catéter mediante hisopos estériles. Las muestras se depositaron en el medio de transporte Stuart, y se trasladaron al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de la Salud Integral (CUSI) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), UNAM. Posteriormente las muestras se inocularon en el medio líquido de Infusión-Cerebro-Corazón (BHI) (Bioxon, México) y se incubaron a 37°C por 24 h. Al término, el crecimiento bacteriano se cultivó en placas de agar nutritivo (Bioxon, México), suplementadas con 5% de sangre de carnero y agar S110 (Bioxon, México) las cuales se incubaron a 37°C por 24 h.

5.3. Identificación bioquímica

A partir de los cultivos puros y de acuerdo con los protocolos microbiológicos estándar, se tomaron 5 colonias, a estas se les realizó la tinción Gram, la prueba de la coagulasa y la prueba del manitol en tubo (Bioxon, México). Las cepas S.

aureus ATCC 33592 fue utilizada como control positivo y la cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 como control negativo.

5.4. Extracción de ADN bacteriano para los ensayos de PCR

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

5.5. Identificación de *Staphylococcus aureus* por PCR

Las cepas de *S. aureus* se identificaron por PCR punto final mediante la detección de los marcadores cromosómicos *femA*, *femB* (Kobayashi *et al.*, 1994) y *nuc* (Nashev *et al.*, 2004) (Cuadro 3). Para la amplificación por PCR de cada gen por separado se utilizaron las perlas PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR (GE Healthcare), que contenían 1.5 mmol de MgCl₂ 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs, para un volumen final de 25 µl por mezcla de reacción; 1 µl de cada oligonucleótido (Integrated DNA Technologies) a las concentraciones de 180 pmol para *femA* y *femB*; y de 10 pmol para *nuc*, 20 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl (100 ng) de ADN molde. La amplificación del ADN se realizó en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones para *femA* y *femB*: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 25 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 57°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto). Finalmente la extensión final fue de 10 minutos a 72°C. Se utilizó como control positivo la cepa de *S. aureus* ATCC 33592 y como control negativo la cepa de *S. epidermidis* ATCC 35984.

Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de *S. aureus*
(Tomado de Kobayashi *et al.*, 1994 y Nashev *et al.*, 2004)

Nombre del primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
FemAF	AGACAAATAGGAGTAATGAT.	509	Kobayashi <i>et al.</i> , 1994
FemAR	AAATCTAACACTGAGTGATA.		
FemBF	TTACAGAGTAACTGTTACC.	651	
FemBR	ATACAAATCCAGCACGCTCT.		
NucF	GCGATTGATGGTGATACGGTT.	279	Nashev <i>et al.</i> , 2004
NucR	ACGCAAGCCTTGACGAAC TAAAGC.		

5.6. Detección del gen que confiere resistencia a meticilina (*mecA*)

Para detectar a *mecA* por PCR se utilizaron las peras PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR (GE Healthcare) (1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs), en un volumen final de 25 µl por mezcla de reacción; 1 µl de cada oligonucleótido (Integrated ADN Technologies; Cuadro 4) a la concentración de 5 pmol (Geha *et al.*, 1994), 18 µl de agua estéril libre de nucleasas y 3 µl (100 ng) de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 10 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 66°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos). Posteriormente 5 ciclos (desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineación a 64°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos) y 25 ciclos (desnaturalización a 94°C, 45 segundos, alineación a 50°C, 45 segundos y extensión a 72°C, 60 segundos). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C.

Cuadro 4. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el marcador *mecA*.
(Tomado de Geha et al., 1994)

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
MecAF 5	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA	310	Geha <i>et al.</i> , 1994.
MecAR 5	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA		

5.7. Detección de los genes que codifican toxinas en cepas de *S. aureus* por PCR convencional y multiplex .

Los oligonucleótidos (Cuadro 5) y las condiciones de PCR multiplex y convencional utilizadas fueron las descritas por Campbell y colaboradores en el 2008. El volumen de las mezclas de reacción para la PCR multiplex de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *etb* y *tst* fue de 25 µl; 3 µl de ADN molde, 8 µl de agua libre de nucleasa estéril, 1 µl de cada oligonucleótido a la concentración de 20 pmol, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaqTMReady-To-GoTM PCR beads). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 minutos, seguida de 32 ciclos a 95 °C por 60 segundos, 60 °C por 1.3 minutos y 72 °C por 60 segundos. Finalmente se realizó una extensión final a 72°C por 10 minutos y un mantenimiento final a 4°C. Para la PCR convencional el volumen final de reacción fue de 25 µl; 3 µl de ADN molde, 20 µl de agua libre de nucleasa estéril, 1 µl de cada oligonucleótido a la concentración de 20 pmol. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 ° durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 60 segundo, 60°C durante 60 segundos y 72°C por 60 segundos. Finalmente se realizó una extensión final a 72°C por 10 minutos y se mantuvo a 4°C.

5.8. Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de agarosa

Después de la amplificación del ADN, 10 microlitros de cada muestra fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliamperes por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación GEL LOGIC 100 (KODAK).

Cuadro 5. Oligonucleótidos utilizados en la detección de los genes que codifican toxinas por PCR y en las cepas de *S. aureus*
(Tomado de Campbell *et al.*, 2008).

Gen	Descripción del oligonucleótido	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
eta	Forward	CGCTGCGGACATTCCTACATGG	676
	Reverse	TACATGCCCGCCACTTGCTTGT	676
etb	Forward	GAAGCAGCCAAAAACCCATCGAA	419
	Reverse	TGTTGTCCGCCTTTACCACTGTGAA	419
hlg	Forward	TTGGCTGGGGAGTTGAAGCACA	306
	Reverse	CGCCTGCCAGTAGAAGCCATT	306
pvl	Forward	TGCCAGACAATGAATACCCCCATT	894
	Reverse	TCTGCCATATGGTCCCAACCA	894
sea	Forward	TTGCAGGGAAACAGCTTTAGGCAATC	252
	Reverse	TGGTGTAACACCCGCACATTGA	252
seb	Forward	GACATGATGCCTGCAACAGGAGA	355
	Reverse	AACAAATCGTTAAAAACGGCGACACAG	355
sec	Forward	CCCTACGCCAGATGAGTTGCACA	602
	Reverse	CGCCTGGTGCAAGCATCATATC	602
sed	Forward	GAAAGTGAGCAAGTTGGATAGATTGCGGCTAG	830
	Reverse	CCGCGCTGTATTTTTCTCCGAGAG	830
see	Forward	TGCCCTAACGTTGACAACAAGTCCA	532
	Reverse	TCCGTGTAATAATGCCTTGCTGAA	532
seg	Forward	TGCTCAACCCGATCCTAAATTAAGACGA	117
	Reverse	CCTCTTCCTTCAACAGGTGGAGACG	117
seh	Forward	CATTCAATCATATGCGAAAGCAGAAG	358
	Reverse	GCACCAATCACCCCTTTCTGTGC	358
sei	Forward	TGGAGGGGCCACTTTATCAGGA	220
	Reverse	TCCATATTCTTTGCCTTTACCAGTG	220
sej	Forward	CTCCCTGACGTTAACACTACTAATAACCC	432
	Reverse	TATGGTGGAGTAACTGTCATCAAAA	432
tst	Forward	AGCCCTGCTTTTACAAAAGGGGAAAA	306
	Reverse	CCAATAACCAACCCGTTTTATCGCTTG	306

6. RESULTADOS

6.1. Pacientes estudiados

A partir de los 112 pacientes del servicio de hemodiálisis con infección en el sitio del catéter tipo Mahurkar estudiados, únicamente fueron positivos para *S. aureus*, dentro de los cuales el 54.55% (n=30) fueron del sexo masculino y el 45.45% (n=25) fueron del sexo femenino (Figura 1).



Figura 1. Distribución de los pacientes por sexo.

La distribución de los pacientes por edad se aprecia en la figura 2. El grupo de edad con mayor frecuencia fue el de 51 a 60 años (29.09%, n=16), seguidos por el grupo de 31 a 40 años (20.02%, n=11), 21 a 30 años (16.36%, n=9), 41 a 50 años (14.54%, n=8). Finalmente los grupos de edades con frecuencia menor fueron de 71 a 80 años (9.09%, n=5), los grupos de 15 a 20 años y de 61 a 70 años (5.45%, n=3).

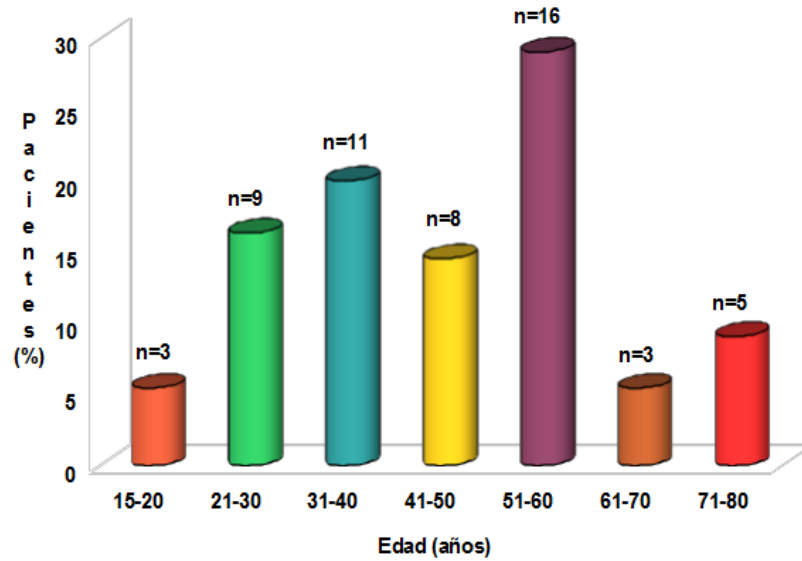


Figura 2. Distribución de los pacientes por edad.

En la gráfica 3 se aprecia la procedencia de los pacientes estudiados. El Hospital General Regional número 72 del IMSS presentó un 43.63% (n=24), seguido del Hospital General Regional número 196 Aragón con el 23.63% (n=13), ISSEMYM 18.20% (n=10) y 14.54% (n=8) la Unidad Médica de Atención Ambulatoria (UMAA) número 199.

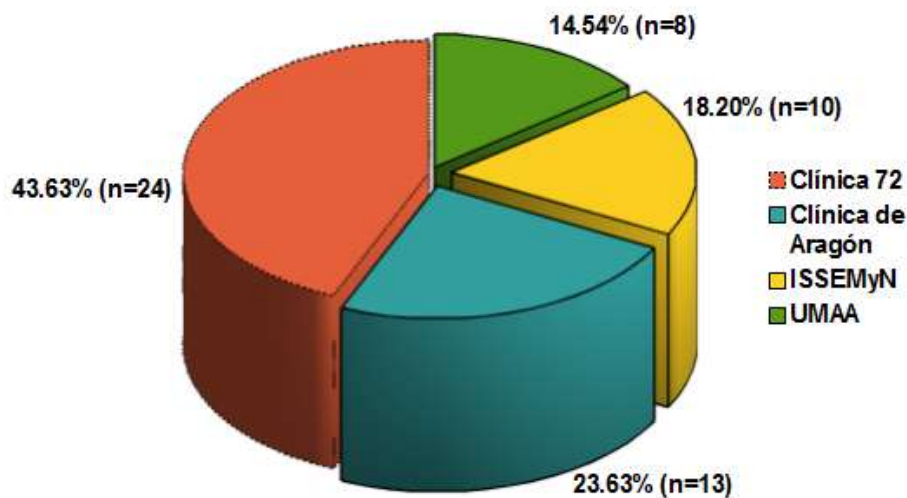


Figura 3: Procedencia de los pacientes por hospital

Figura 3. Procedencia de los pacientes por hospital.

6.2. Causas de la IRC de los pacientes estudiados

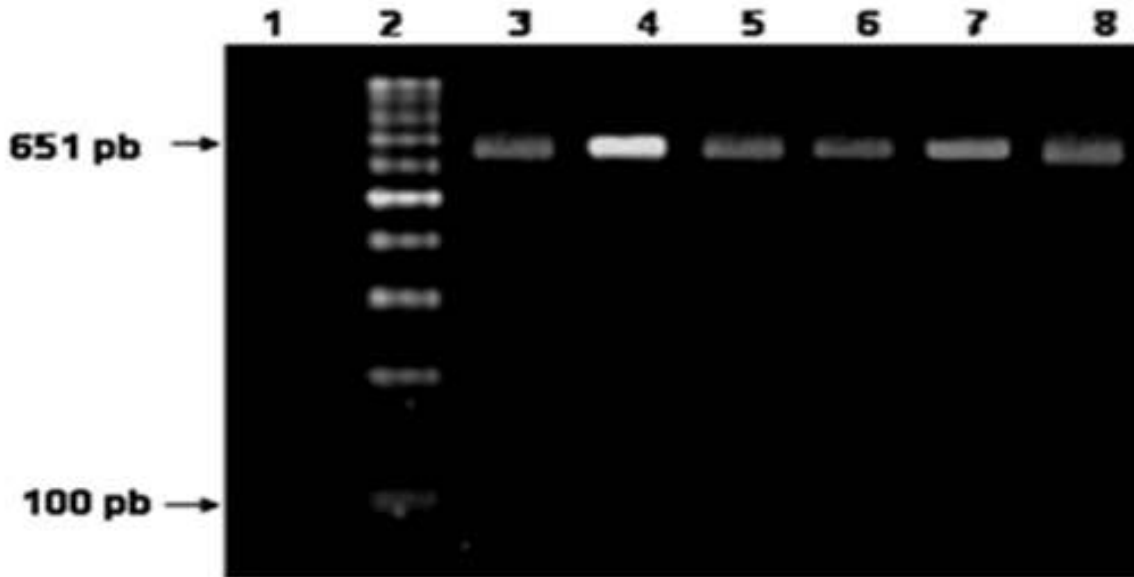
En el cuadro 6 se aprecian las diferentes causas de la Insuficiencia Renal Crónica (IRC) de los pacientes estudiados. En la mayoría de los pacientes (52.74%, n=29) no se logró establecer la causa original de la IRC, la Diabetes Mellitus fue la etiología principal que originó la IRC (23.63%, n =13) de los pacientes, seguido por la glomerulonefritis (12.72%, n=7) y la hipertensión arterial (3.63%, n=2). Finalmente las etiologías con menor frecuencia fueron la poliquistosis renal, la IRC secundaria a vejiga neurogénica y la preclampsia (1.81%, n=1).

Cuadro 6. Origen de la insuficiencia renal crónica de los pacientes.

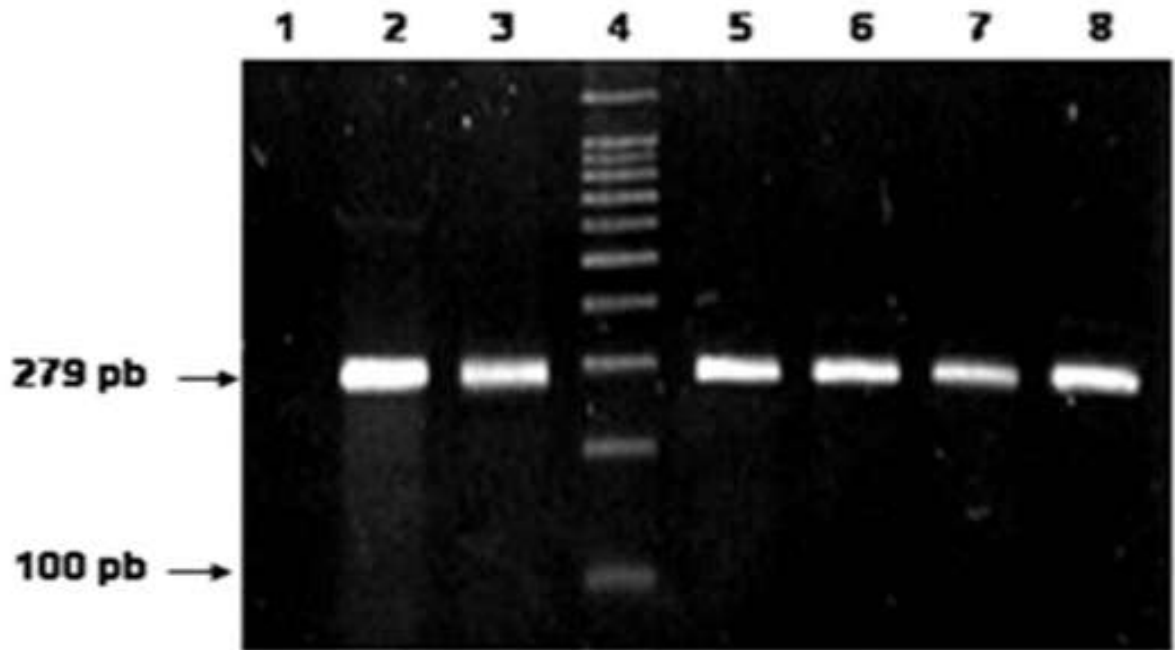
ETIOLOGÍA	No	%
No determinada	29	52.74%
Diabetes mellitus	13	23.63%
Glomerulonefritis	7	12.72%
Hipertensión	2	3.63%
Poliquistosis renal	1	1.81%
IRC secundaria a vejiga neurogénica	1	1.81%
Nefritis lúpica	1	1.81%
Preclampsia	1	1.81%

6.3. Identificación de *S. aureus*

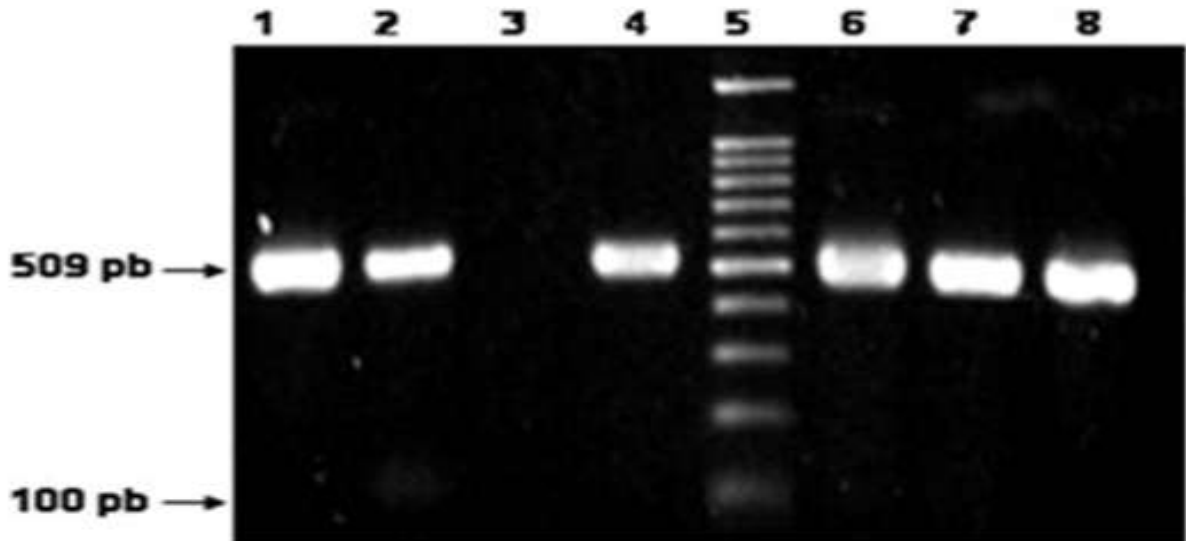
Staphylococcus aureus fue identificado por ser positivo para las pruebas del manitol y la coagulasa, y por PCR convencional mediante la detección de los marcadores cromosómicos *femA*, *femB* y *nuc* (Fotografía1-3). De los 112 pacientes con infección en los catéteres, la especie de *S. aureus* se identificó en el 49.1% (n = 55) y el 50.9% (n=57) restante correspondió a *S. epidermidis*. A partir los 55 pacientes con *S. aureus* en los catéteres, 38 de ellos también presentaron *S. aureus* en las narinas (69%).



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



Fotografía 2. Detección por PCR convencional de *femB* en *S. aureus*. Línea 1, control negativo (*S. epidermidis* ATCC 35984). Línea 2; control positivo (*S. aureus* ATCC 33592). Línea 4; MWM 100 pb-ladder. Línea 3,5-8, *femB* (amplicón de 509 pb) en cepas de *S. aureus*



Fotografía 3. Detección por PCR convencional de *nuc* en *S. aureus*. Línea 2, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592). Línea 3 control negativo (*S. epidermidis* ATCC 35984). Línea 5, MWM 100 pb-ladder. Línea 1, 2,4, 6-8, *nuc* (amplicón de 279 pb) en cepas de *S. aureus*.

6.4. Detección del gen *mecA*

El gen *mecA* (Figura 4) se detectó en 81.8% (n=45) de las cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres de los 55 pacientes estudiados. De estos 55 pacientes solo fue posible estudiar las cepas aisladas de narinas de 38 de ellos detectando al gen *mecA* en el 100% (n=38) de las cepas (Fotografía 4).

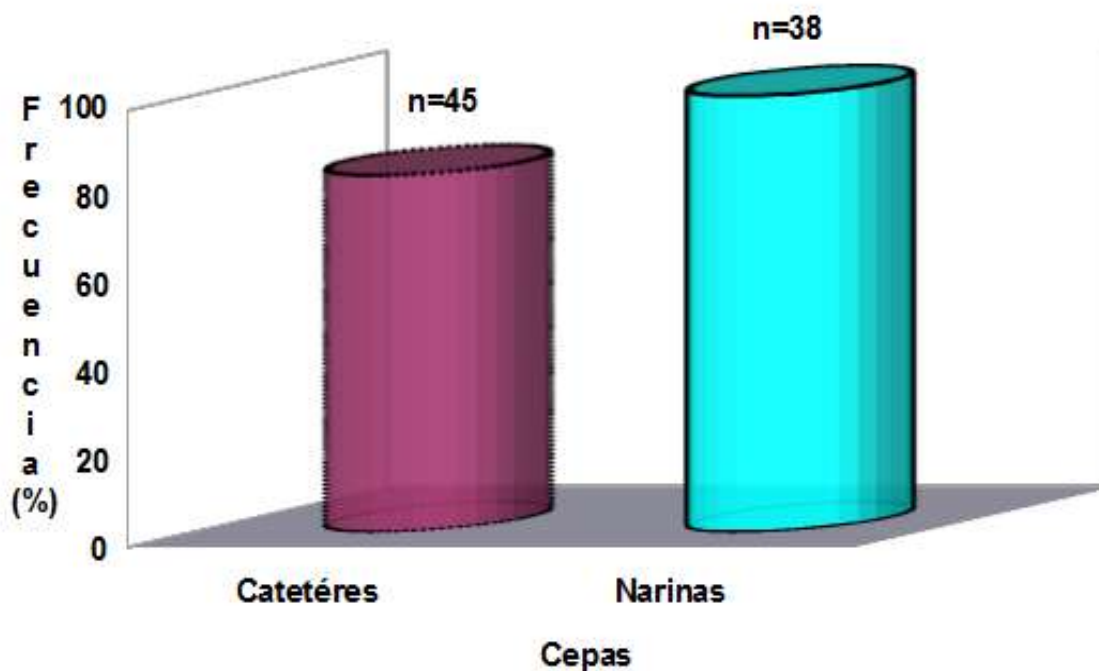
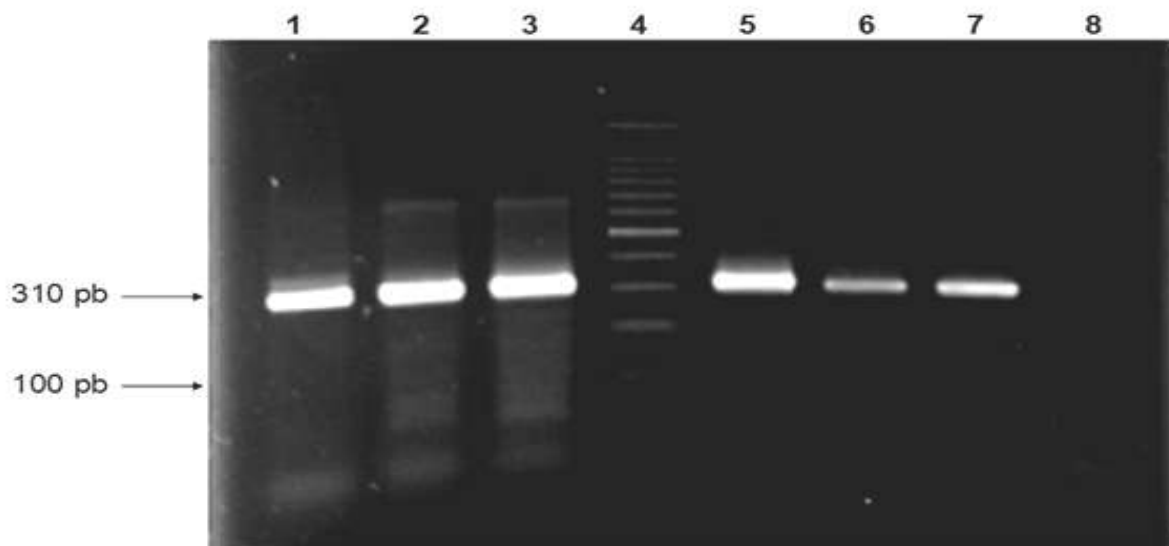


Figura 4. Detección del gen *mecA* en las cepas de *S. aureus* estudiadas.



Fotografía 4. Detección por PCR convencional de *mecA* en *S. aureus*. Carril 1, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592), Carriles 2,3, 5-7 *mecA* (amplicón de 310 pb) en las cepas de *S. aureus*, Carril 4, MWM 100 pb-ladder, Carril 8, control negativo (sin ADN molde).

6.5. Detección de los genes que codifican toxinas por PCR convencional y multiplex en las cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres y narinas.

En este estudio se determinó la frecuencia de 14 genes que codifican toxinas en las cepas de *S. aureus* (Cuadro 7 y Fotografías 5-10). La frecuencia de los genes detectados en las cepas aisladas de catéteres fueron; *hlg* con el 96.3% (n=53), seguido por *sei* con el 94.5% (n=52), *seg* con el 89.0% (n= 49), *seh* con el 78.1% (n=43), *sea* con el 47.2% (n=26), *eta* con el 40% (n=22), *see* con el 27.2% (n=15), *seb*, *etb* y *tst* con el 23.6% (n=13), en cada caso, *sed* con el 10.9% (n=6) y *sec* con el 5.4% (n=3). Los genes *pvl* y *sej* no fueron detectados en ninguna de las cepas. La frecuencia de los genes detectados en las cepas aisladas de las narinas fueron; *hlg* con el 100% (n=38), *seg* con el 97.3% (n=37), *sei* con el 89.4% (n=34). *sec*, *eta*, y *seh* con el 10.5% (n=4), en cada caso, *sea*, *seb*, y *pvl* con el 7.8% (n= 3), *see* y *etb* con el 5.2% (n=2), *sed* con el 2.6% (n=1) y finalmente *tst* y *sej* no se identificaron en ninguna de las cepas de narinas (Figura 5).

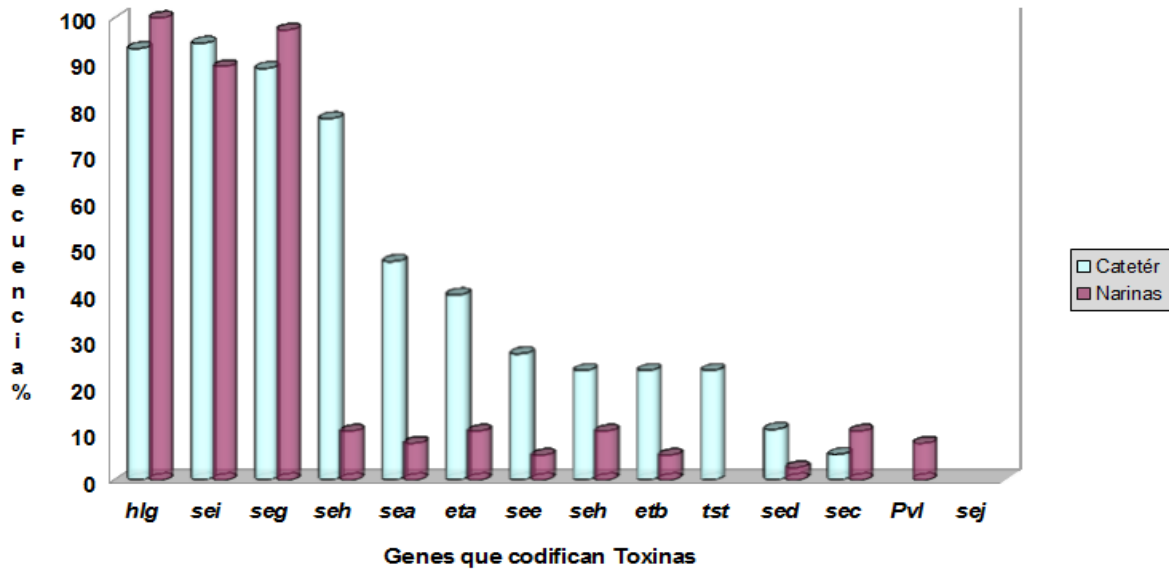
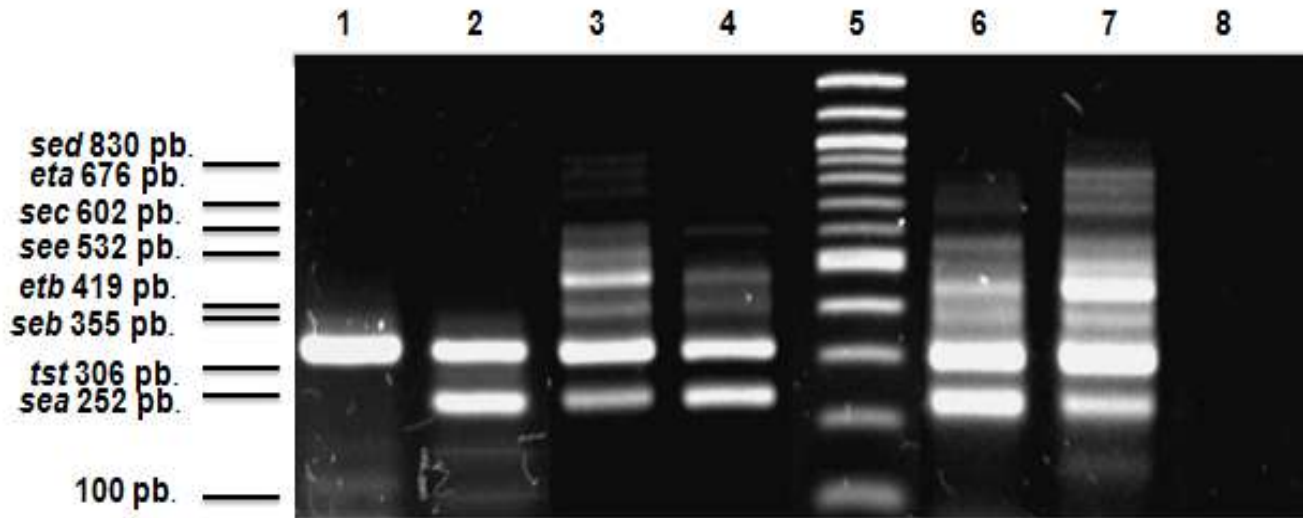


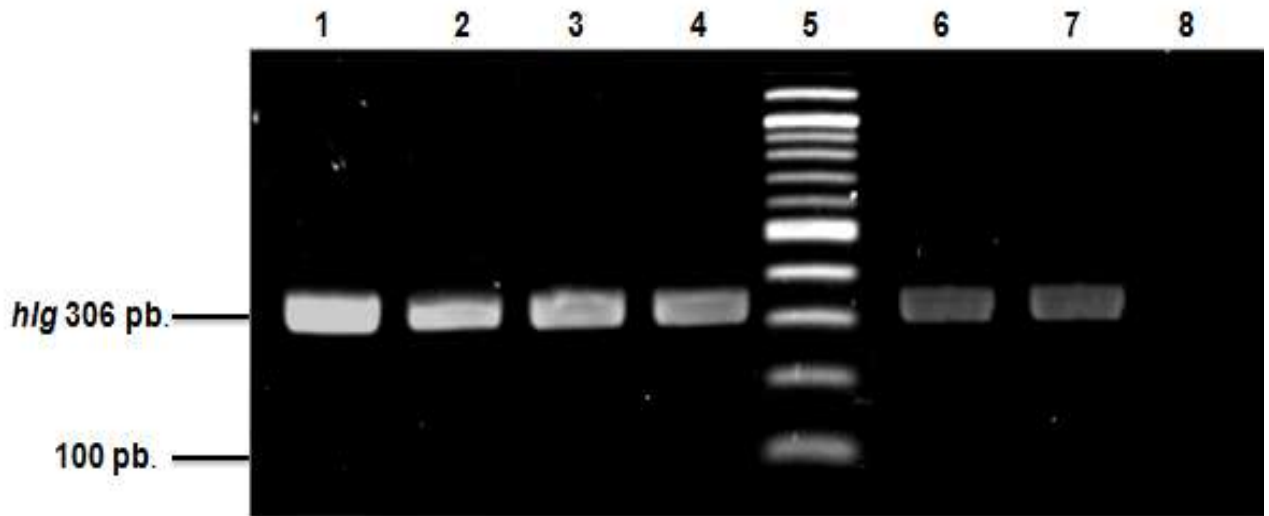
Figura 5. Comparación de los genes que codifican toxinas en las cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres y narinas

Cuadro 7: Porcentaje de los genes que codifican toxinas en las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres y narinas de los pacientes con insuficiencia renal crónica.

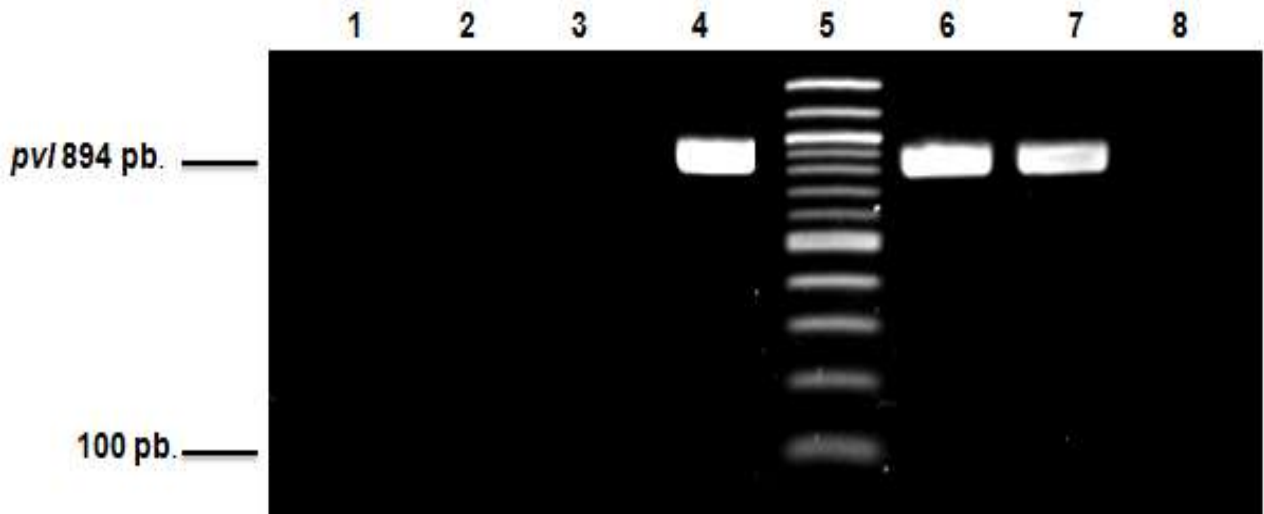
Toxinas	Catéter (n=55)		Toxinas	Narinas (n=38)	
	No.	%		No.	%
<i>hlg</i>	53	96.3%	<i>hlg</i>	38	100%
<i>sei</i>	52	94.5%	<i>seg</i>	37	97.3%
<i>seg</i>	49	89.0%	<i>sei</i>	34	89.4%
<i>seh</i>	43	78.1%	<i>seh</i>	4	10.5%
<i>sea</i>	26	47.2%	<i>sec</i>	4	10.5%
<i>eta</i>	22	40.0%	<i>eta</i>	4	10.5%
<i>see</i>	15	27.2%	<i>sea</i>	3	7.8%
<i>seb</i>	13	23.6%	<i>seb</i>	3	7.8%
<i>etb</i>	13	23.6%	<i>pvl</i>	3	7.8%
<i>tst</i>	13	23.6%	<i>see</i>	2	5.2%
<i>sed</i>	6	10.9%	<i>etb</i>	2	5.2%
<i>sec</i>	3	5.4%	<i>sed</i>	1	2.6%
<i>pvl</i>	0	0%	<i>tst</i>	0	0%
<i>sej</i>	0	0%	<i>sej</i>	0	0%



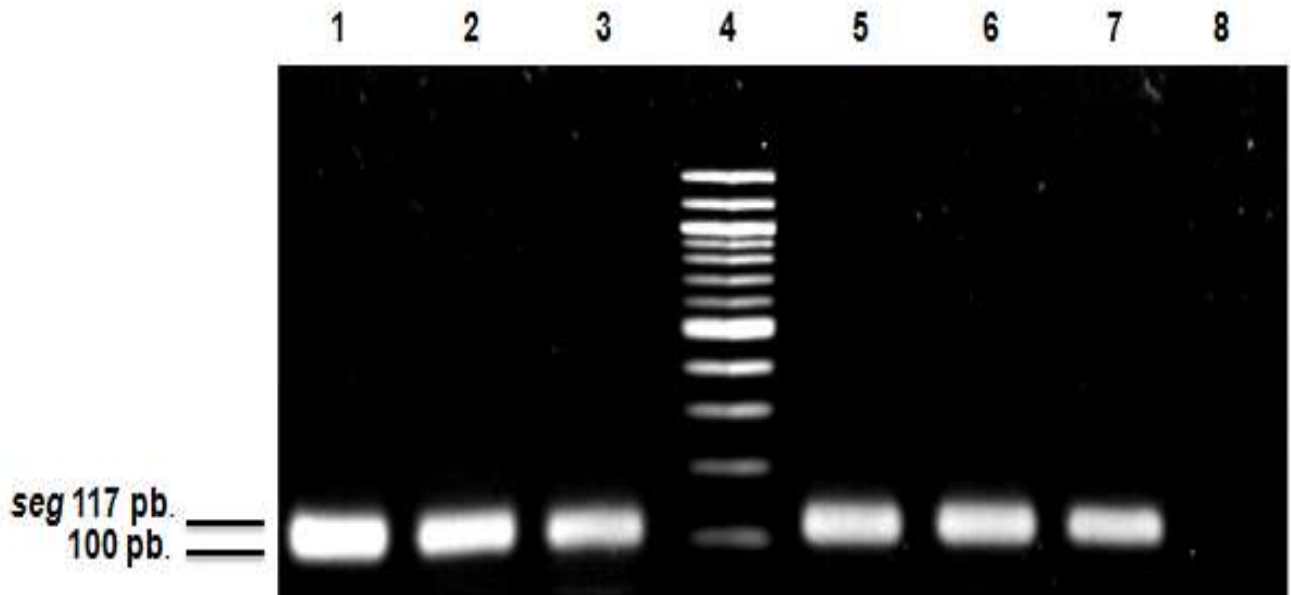
Fotografía 5. Detección por PCR Multiplex de los genes que codifican toxinas en las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de catéteres de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica. Línea 1: Detección del gen *seb* (355 pb el amplicón). Línea 2: *sea* (252 pb el amplicón) y *tst* (306 pb el amplicón). Línea 3: *sea* (252 pb el amplicón), *etb* (419 pb el amplicón), *sec* (602 pb el amplicón) y *sed* (830 pb el amplicón). Línea 4: *sea* (252 pb el amplicón), *etb* (419 pb el amplicón) y *sec* (602 pb el amplicón). Línea 5: MWM 100 pb-ladder. Línea 6: Control positivo (*S. aureus* ATCC 25923) *sea* (252 pb el amplicón), *tst* (306 pb el amplicón), *seb* (355 pb el amplicón), *etb* (419 pb el amplicón) y *see* (532 pb el amplicón). Línea 7: Control positivo (*S. aureus* ATCC 33592), *sea* (252 pb el amplicón), *tst* (306 pb el amplicón), *seb* (355 pb el amplicón), *etb* (419 pb el amplicón), *see* (532pb) y *sed* (830pb). Línea 8: Control negativo (sin ADN).



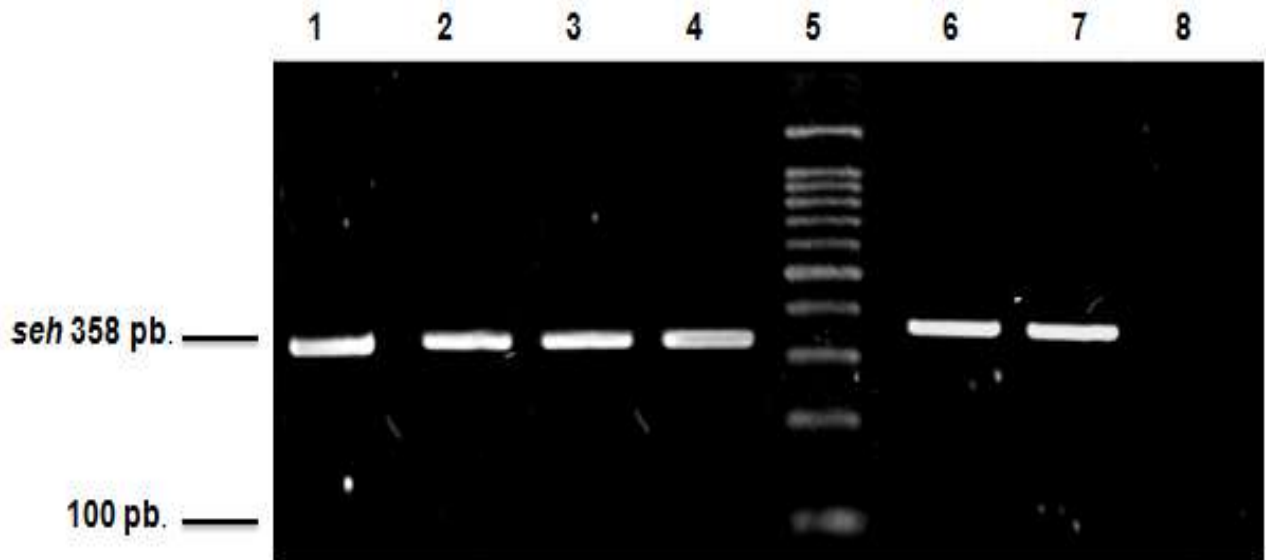
Fotografía 6. Detección del gen *hlg* (306 pb el amplicón) en las cepas de *Staphylococcus aureus* de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica. Línea 1-4: cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres. Línea 5: MWM 100 pb-ladder. Línea 6: Control positivo (*S. aureus* ATCC 25923). Línea 7: Control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) y Línea 8: Control negativo (sin ADN).



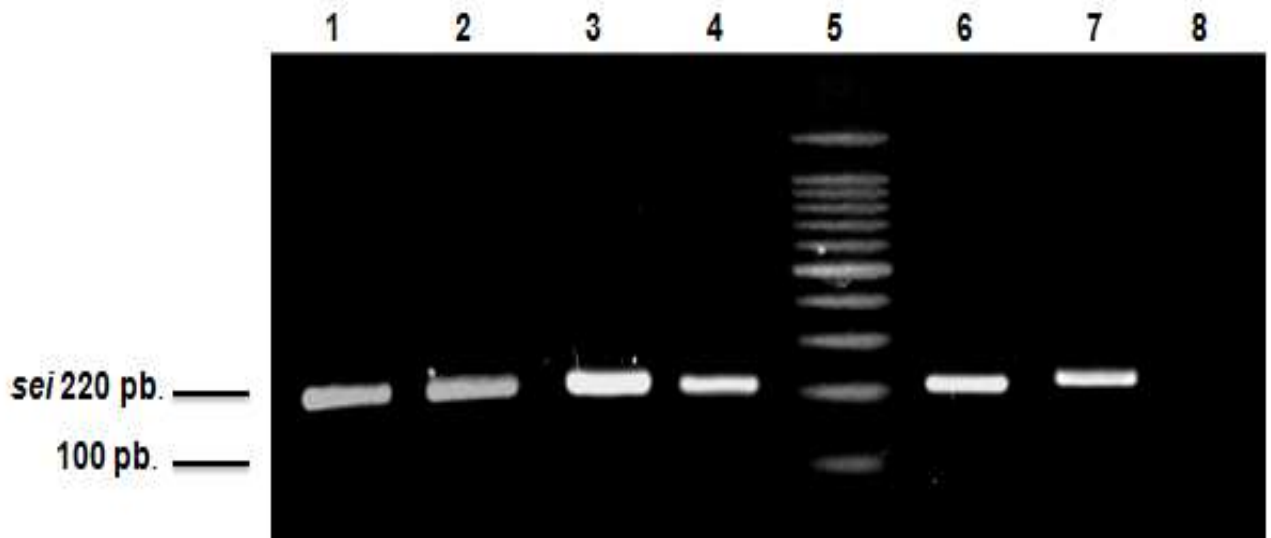
Fotografía 7. Detección del gen *pvl* (894 pb el amplicón) en las cepas de *Staphylococcus aureus* de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica. Línea 4: cepas de *S. aureus* aisladas de narinas. Línea 5: MWM 100 pb-ladder. Línea 6: Control positivo (*S. aureus* ATCC 25923). Línea 7: Control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) y Línea 8: Control negativo (sin ADN).



Fotografía 8. Detección del gen *seg* (117 pb el amplicón) en las cepas de *Staphylococcus aureus* de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica. Línea 1-3 y 5: Cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres. Línea 4: MPM 100 pb. Línea 6: Control positivo (*S. aureus* ATCC25923). Línea 7: Control positivo (*S. aureus* ATCC33592) y Línea 8: Control negativo (sin ADN).



Fotografía 9. Detección del gen *seh* (358 pb el amplicón) de las cepas de *Staphylococcus aureus* de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica. Línea 1- 4: cepas de *S. aureus* aisladas de narinas. Línea 5: MWM 100 pb-ladder. Línea 6: Control positivo (*S. aureus* ATCC 25923). Línea 7: Control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) y Línea 8: Control negativo (sin ADN).



Fotografía 10. Detección del gen *sei* (220 pb el amplicón) en las cepas de *Staphylococcus aureus* de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica. Línea 1- 4: cepas de *S. aureus* aisladas de narinas. Línea 5: MWM 100 pb-ladder. Línea 6: Control positivo (*S. aureus* ATCC 25923). Línea 7: Control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) y Línea 8: Control negativo (sin ADN).

6.6. Diferentes combinaciones de genes encontradas en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres y de narinas.

Se obtuvieron 23 combinaciones diferentes de los genes que codifican toxinas en las 55 cepas de *S. aureus* provenientes de los catéteres y 10 combinaciones diferentes en las 38 cepas de *S. aureus* provenientes de narinas (Cuadro 8). Para las cepas de catéteres, el patrón No. 3 conformado por los genes *hlg*, *seg*, *seh* y *sei* se identificó en el 25.4% (n = 14), seguido por el patrón No.1 (*sea*, *seb*, *eta*, *hlg*, *seg*, *seh*, *sei*) con el 7.2% identificado (n=4). También se observa que se encontraron 10 patrones diferentes (14-23) representados por una sola cepa en cada caso. En las cepas de *S. aureus* aisladas de narinas, el patrón 1 (*hlg*, *pvl*, *seg*, *seh*, *sei*) se identificó en el 68.4% (n = 26), seguido por el patrón 4 (*hlg*, *seg*, *seh*, *sei*) con el 7.8% (n = 3). Finalmente se encontraron 5 patrones diferentes (6-10) con una cepa en cada caso.

Cuadro 8. Diferentes combinaciones de genes que codifican toxinas en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres y narinas de pacientes de hemodiálisis

No. de patrón	Combinación de genes que codifican toxinas en cepas de <i>S. aureus</i>	Catéter (n=55)		No. de patrón	Combinación de genes que codifican toxinas en cepas de <i>S. aureus</i>	Narinas (n=38)	
		No.	%			No.	%
1	<i>sea, seb, eta, hlg, seg, seh, sei</i>	4	7.2%	1	<i>hlg, pvl, seg, seh, sei</i>	26	68.4%
2	<i>sea, eta, tst, hlg, seg, seh, sei</i>	2	3.6%	2	<i>sea, seb, sec sed, see, eta, eta hlg, seg, sei</i>	1	2.6%
3	<i>hlg, seg, seh, sei</i>	14	25.4%	3	<i>eta, hlg, seg, sei</i>	2	5.2%
4	<i>sea, see, eta, etb, tst, hlg, seg, seh, sei</i>	3	5.4%	4	<i>hlg, seg, seh, sei</i>	3	7.8%
5	<i>eta, hlg, seg, sei</i>	3	5.4%	5	<i>sea, seb, sec, see, etb, hlg, seg</i>	1	2.6%
6	<i>sea, seb, sed, see, eta, etb, hlg, seg, sei</i>	2	3.6%	6-10	Otras combinaciones	5	13.1%
7	<i>sea, see, tst, hlg, seg, seh, sei</i>	2	3.6%				
8	<i>sea, seb, see, hlg, seg, seh, sei</i>	3	5.4%				
9	<i>sed, seb, hlg, seg, seh, sei</i>	2	3.6%				
10	<i>sea, tst, hlg, seg, seh, sei</i>	3	5.4%				
11	<i>sea, sec, see, eta, etb, tst, hlg, seg, seh, sei</i>	2	3.6%				
12	<i>eta, hlg, seg, seh, sei</i>	3	5.4%				
13	<i>sea, seb, sed, see, etb, hlg, seg, sei</i>	2	3.6%				
14-23	Otras combinaciones	10	18.1%				

7. Discusión

7.1. Pacientes analizados

En este trabajo se estudiaron las cepas de *S. aureus* aisladas de 55 pacientes con Insuficiencia Renal Crónica (IRC) infectados, de los cuales 30 fueron hombres y 25 fueron mujeres (Figura 1). El grupo de edad más frecuente fue el de 51 a 60 años (Figura 2) y la principal causa de la IRC de estos pacientes fue la diabetes mellitus (23.63%, n=13) y la glomerulonefritis (12.72%, n= 7) (Cuadro 6). La IRC se encuentra entre las primeras 10 causas de mortalidad general en el IMSS, estos datos concuerdan con lo reportado por Méndez y colaboradores en el 2010 quienes analizaron los aspectos epidemiológicos de 10,921 pacientes de 127 hospitales generales de 21 estados de la República Mexicana con IRC y observaron que el sexo masculino es quien presenta mayor frecuencia (55%, n=5,600) que las mujeres (49%, n=5,545) y el rango de edad prevalente fue de 40 a 69 años, siendo la diabetes y la glomerulonefritis las principales causas de la IRC en estos pacientes, además la infección por *S. aureus* se encuentra entre las principales complicaciones de esta enfermedad (Méndez *et al.*, 2010). Recientemente en nuestro país se ha incrementado la diabetes, debido a complicaciones metabólicas, vasculares y neurológicas del paciente (Escobedo & Rico, 1996). Se ha estimado que para el año 2030 existirán 366 millones de diabéticos (Wild, 2004).

7.2. Identificación de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus fue identificado por ser positivos para las pruebas del manitol y la coagulasa, y por PCR convencional mediante la detección de los marcadores cromosómicos *femA*, *femB* y *nuc* (Fotografía1-3). De los 112 pacientes con infección en los catéteres, la especie de *S. aureus* se identificó en el 49.1% (n = 55) y el 50.9% (n=57) restante correspondió a *S. epidermidis*. A partir los 55 pacientes con *S. aureus* en los catéteres, 38 de ellos también presentaron *S. aureus* en las narinas (69%).

Se ha descrito que los genes *femA* y *femB* son marcadores específicos para *S. aureus*, además codifican proteínas que están involucradas en la biosíntesis del

peptidoglucano, relacionado con la resistencia a la meticilina. Genes con alta similitud a *fem* de *S. aureus* han sido descritos en diferentes especies del género *Staphylococcus*, como *S. epidermidis*, *S. capitis* y *S. haemolyticus* (Berger *et al.*, 1989). Kobayashi y colaboradores en 1994 realizaron un estudio con 237 pacientes de hospital, de los cuales 198 se encontraron infectados por *S. aureus*, 27 por *S. epidermidis* y 12 por estafilococos no identificados. Estos autores detectaron por PCR los genes *femA* y *femB* en las cepas de *S. aureus* en el 89.4% (n=177), en las 27 cepas de *S. epidermidis* y en las 12 cepas de estafilococos no identificados, no se presentaron estos genes, lo que demuestra que los genes *femA* y *femB* exclusivamente lo presentan las cepas de *Staphylococcus aureus* (Kobayashi *et al.*, 1994).

Otro de los genes utilizados para la detección de *S. aureus* fue el gen *nuc* que codifica una termonucleasa (TNasa), la cual se ha utilizado en muchos laboratorios para la identificación de *S. aureus*, sin embargo la actividad de la proteína TNasa no es específica para su identificación (Tucker *et al.*, 1978). Los datos de este estudio son semejantes a los reportados por Brakstad y colaboradores en 1992, en donde identificaron en 83 cepas de *S. aureus* por PCR el gen *nuc*, el cual se utiliza para el diagnóstico rápido de infecciones por *S. aureus* de muestras clínicas, incluyendo las muestras de pacientes con terapia antimicrobiana en curso (Brakstad *et al.*, 1992).

7.3. Detección del gen *mecA*

Durante las últimas décadas, se ha incrementado la aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), principalmente en las enfermedades nosocomiales (Hee Jin *et al.*, 2012). Nuestros resultados muestran que el 100% de las cepas de *S. aureus* aisladas de las narinas presentó el gen *mecA*, mientras que en las cepas aisladas de los catéteres el gen se detectó en el 81.8%. (n=45) (Fotografía y Figura 4). El gen *mecA* codifica para la proteína de unión a la penicilina (PBP) de 78kDa, llamada PBP2A, la cual presenta una alta afinidad para meticilina y todos los antibióticos β -lactámicos, tales como la dicloxacilina, ampicilina, penicilina, incluyendo la oxacilina, gentamicina,

pefloxacilina entre otros (Mehrotra *et al.*, 2000). Por lo que las cepas de *S. aureus* analizadas en este estudio probablemente son resistentes a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos suministrados por el sector salud (Fish & Ohlinger, 2006). La resistencia de *S. aureus* a la meticilina se debe a la adquisición de un elemento genético móvil llamado SCCmec (Staphylococcal Cassette Chromosome mec). Este casete es un fragmento de 21-67 kb de ADN que está integrado en el cromosoma de cepas de MRSA (Hamdan *et al.*, 2013). SCCmec contiene transposones integrados, copias de plásmidos que llevan resistencia contra antibióticos no β -lactámicos (Ito *et al.*, 2001). Este casete está situado cerca del sitio de replicación de *S. aureus*, dicha ubicación tiene una importancia estratégica, pues le permite a la bacteria aprovechar rápidamente los genes de resistencia a antibióticos útiles, traídos de otras especies bacterianas, teniendo como finalidad la evolución y supervivencia de dicha especie (Hiramatsu *et al.*, 2011).

Debido a la resistencia a meticilina por cepas de *S. aureus* surgió la vancomicina en 1991 y después de 11 años de su uso se presentaron las primeras cepas resistentes a este antibiótico (Hiramatsu *et al.*, 1998). Esta resistencia se debe a la adquisición del gen *van*, el cual se transfiere por un plásmido (Srinivasan *et al.*, 2002). Para que la vancomicina ejerza su acción, debe de llegar a la membrana citoplasmática y unirse a las moléculas de la pared celular, sin embargo las cepas de *Staphylococcus aureus* Resistentes a Vancomicina (VRSA) han realizado cambios en la biosíntesis del peptidoglucano, por lo que las cepas producen cantidades elevadas, dando como resultado la formación de una pared celular gruesa, de forma irregular, con la finalidad de atrapar y bloquear la acción del antibiótico (Lee *et al.*, 2005). Las infecciones ocasionadas por esta bacteria tienen un grave impacto económico y de mortalidad en los hospitales por lo que resulta necesario disponer de alternativas terapéuticas eficaces, tales como la producción del antimicrobiano tigeciclina, el cual posee un amplio espectro contra patógenos Grampositivos, Gramnegativos y anaerobios, incluyendo cepas multirresistentes, entre los que se encuentra *S. aureus* (Barriaga *et al.*, 2009).

7.4. Identificación de los genes que codifican toxinas por PCR convencional y multiplex en cepas de *S. aureus*.

La patogenicidad de *S. aureus* se debe a la gran cantidad de toxinas que produce (Letertre *et al.*, 2013). En este estudio se encontró que los genes con mayor frecuencia entre las cepas aisladas de catéteres y narinas fueron *hlg*, *sei* y *seg* (Cuadro 7 y Fotografías 5-10). La gama hemolisina *hlg* se presentó en todas las cepas de narinas y en un 96.3% de las cepas de catéteres (Figura 5 y Fotografía 6). Estos resultados coinciden con los descritos por Li y colaboradores en el 2011, quienes analizaron 38 cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina de pacientes inmunocomprometidos de 33 hospitales en China, en donde detectaron la presencia del gen *hlg* por PCR en 37 (97.37%) de las cepas analizadas. La gama hemolisina es producida por casi todas las cepas (99%) de *S. aureus* (Prevost *et al.*, 1995), esta toxina afecta los neutrófilos, macrófagos y es capaz de lisar muchas variedades de eritrocitos en mamíferos. El factor de virulencia que desarrolla en el humano es la invasión de células huésped y penetración en los tejidos, con la finalidad de convertir los tejidos circundantes en nutrientes que permitan la reproducción y el crecimiento bacteriano (Dignes *et al.*, 2000). Estudios recientes en cepas de *S. aureus* de pacientes hospitalizados han reportado que los genes *hlg*, *sei-seg* se presentan en mayor frecuencia en cepas aisladas de narinas con un 100% (48/48) y con un 41.6% (20/48), respectivamente. Por otro lado los genes *hlg*, *sei-seg* se han identificado en cepas aisladas de piel de pacientes con el 99.0% (12/13) y el 42.6% (6/13), respectivamente (Kalawole *et al.*, 2013).

En este estudio los genes *sei* y *seg* fueron identificados en el 94.5% y 89.0% en cepas aisladas de catéteres, respectivamente; mientras que en las cepas de narinas las frecuencias fueron 89.4% y 97.3%, respectivamente (Figura 5. Fotografía 8 y 9). El gen *sei* codifica la enterotoxina I y el gen *seg* codifica la enterotoxina G (Balaban & Rasooly., 2002). Varios estudios demuestran una similitud con los resultados obtenidos en este trabajo, tal es el análisis de Nashev y colaboradores en el 2007, estos autores analizaron las enterotoxinas de *S. aureus* de 87 cepas nasales por PCR multiplex, reportando que los genes *sei* y *sei*

se detectaron en el 63.1% (n=55), en contraste con los bajos porcentajes de las otras 8 enterotoxinas analizadas.

Se han identificado los factores de virulencia por PCR multiplex en 38 cepas nasales de *S. aureus* en pacientes hospitalizados (Kalawole *et al.*, 2013). Estos autores identificaron el gen *seh* en 5 cepas (10.4%). Este trabajo muestra una similitud con los datos obtenidos para este estudio en la detección del gen *seh* (codifica la enterotoxina H), en cepas nasales, con el 10.5% (4/38), sin embargo las cepas de catéter mostraron uno de los más altos porcentajes de frecuencia con el 78.1% (n=43) (Figura 5 y Fotografía 9).

Existe una gran asociación entre los genes *sei*, *sej* y *seh*, estudios anteriores han reportado que estas tres enterotoxinas tienen una característica en común, ya que se encuentran frecuentemente en alimentos de origen lácteo contaminados (El-Huneidi *et al.*, 2006). En Japón se analizaron estos genes por la técnica de ELISA para detectar la presencia de sus proteínas en 88 cepas de *S. aureus* de pacientes que presentaron intoxicación alimentaria. Se reportó que el gen *seg* presentó el mayor número (n=35), seguido del gen *sei* (n=32) y el gen *seh* (n=21) (Omoe *et al.*, 2002). Estos tres genes han demostrado inducir el síndrome gastrointestinal (Klotz *et al.*, 2003).

El gen *sea* codifica para la enterotoxina A y está comúnmente implicada en el envenenamiento alimentario por *S. aureus* (Balaban & Rasooly., 2002). Los resultados obtenidos en este estudio para la detección del gen *sea* en cepas asiladas de catéter y narinas fue del 47.2% y 7.8%, respectivamente (Figura 5 y Fotografía 5). Varios de los estudios analizados reportan que el gen *sea* posee un porcentaje intermedio, a pesar de ser el más común en las infecciones alimentarias, por ejemplo, el estudio realizado por Nashev y colaboradores en el 2007, describieron que el gen *sea* presentó un porcentaje del 20.23% (n=20) en 87 cepas de *S. aureus*. Sin embargo otros autores han descrito índices bajos como los de Manfredi y colaboradores en el 2010, estos reportaron únicamente 9 (14.8%) cepas positivas de un total 61 cepas de *S. aureus* asociadas a intoxicaciones alimentarias provenientes de diferentes provincias de Argentina.

El gen *sea* es llevado por una familia polimórfica de bacteriófagos lisogénicos el cual se inserta en el cromosoma bacteriano como un profago y se comporta como parte del genoma bacteriano. Sin embargo bajo condiciones de estrés ambiental el profago puede ser inducido para replicarse y liberar nuevos bacteriófagos (Schelin *et al.*, 2011).

La enterotoxina D y E son codificadas por el gen *sed* y *see* respectivamente, estas comparten un 90 % de aminoácidos con la enterotoxina A (Ortega *et al.*, 2010). En este estudio se encontró una baja frecuencia para el gen *sed* en las cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres con el 10.9% y de narinas con el 2.6% (Figura 5 y Fotografía 5). Para el gen *see*, se reportó una mayor frecuencia en cepas aisladas de catéter (27.2%), en contraste con la frecuencia encontrada en narinas (5.2%). Estos resultados son de gran importancia desde el punto de vista clínico ya que la enterotoxina E posee un dominio de cisteínas, el cuál es potencialmente tóxico para el plasma sanguíneo y el estómago (Ortega *et al.*, 2010), sin embargo, estudios previos no han reportado presencia de este gen en cepas aisladas de narinas y de piel de pacientes africanos y europeos hospitalizados; para el caso del gen *sed* se reportó un 4.1% solo en cepas aisladas de narinas (Nashev *et al.*, 2007 y Kolawole *et al.*, 2013).

La enterotoxina B es codificada por el gen *seb* y tiene la capacidad de activar los linfocitos T (DeGrasse, 2012). El gen *seb* fue encontrado en este estudio en el 23.6% de las cepas aisladas de catéter y en el 7.8% de las cepas aisladas de narinas (Figura 5 y Fotografía 5). Kamarehei y colaboradores (2013), reportaron la prevalencia de los genes *sea* y *seb* en 95 cepas MRSA aisladas de pacientes de la ciudad de Gorgan Irán, en donde la frecuencia de los genes *sea* y *seb* fueron del 61.3% y 58.8%, respectivamente.

En este estudio el gen *sej* (codifica la enterotoxina J) no se identificó en ninguna cepa de catéter y de narinas (Figura 5). Estos datos son similares a los diversos estudios que se han analizado para el gen *sej*, por ejemplo El-Hunedi y colaboradores (2006), no detectaron este gen por PCR en 100 cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y Kolawole y colaboradores (2013) reportaron solo una

cepa positiva de las 48 muestras de origen nasal y de las 13 cepas aisladas de narina ninguna fue positiva para dicho gen.

En este estudio las frecuencias de los genes *sec* en las cepas de *S. aureus* de catéteres y narinas fueron del 5.4% y 10.5%, respectivamente (Figura 5 y Fotografía 5). Resultados semejantes han sido descritos por Yan y colaboradores en el 2012. Estos autores analizaron 52 cepas de *S. aureus* de pacientes que sufrían dolor abdominal, diarrea, náuseas, vómitos, mareos y dolor de cabeza en China, por medio de la técnica de PCR detectaron las enterotoxinas estafilocócicas, de las cuales solo 4 (7.7%) presentaron el gen *sec*, lo cual concuerda con el número de cepas aisladas de narinas de este estudio. El gen *sec* codifica la enterotoxina C, y considera como el principal superantígeno que promueve las células o linfocitos T, siendo uno de los precursores del shock tóxico (Salgado *et al.*, 2013).

Las enterotoxinas actúan como superantígenos, que tienen como función la activación de los linfocitos T sin tener en cuenta la especificidad antigénica de estas células. La función de los linfocitos T es coordinar la respuesta inmune celular, además de construir el 70% del total de los linfocitos, la proliferación de los linfocitos T se debe a la liberación de un potente factor de crecimiento celular llamado interleucina 2 (Branda *et al.*, 2008). Para la protección de sustancias posiblemente nocivas se liberan las citoquinas, si no existe una liberación controlada estas pueden provocar un fallo multiorgánico e inflamación sistémica (Aguirre *et al.*, 2002).

El síndrome de shock tóxico 1 (TSST-1) es codificado por el gen *tst*, esta toxina actúa como superantígeno, al igual que las enterotoxinas antes descritas (Durand *et al.*, 2006). El gen *tst* codifica para la toxina TSST-1, que es una proteína altamente patógena para el ser humano. En este estudio el gen *tst* solo se identificó en las cepas de catéter con el 23.6% (Figura 5 y Fotografía 5). Sin embargo Campbell y colaboradores (2008), describieron una frecuencia del 73% (n=32), de una colección de *S. aureus* aisladas de pacientes con cSSSI. Otros estudios han reportado la presencia de *tst* en 26 (24.3%) cepas de las 107 cepas nasales analizadas (Mehrotra *et al.*, 2000). Finalmente Deboye y colaboradores

(2013) reportaron frecuencias bajas para este gen, en cepas aisladas de narinas se obtuvo un 4.1% (2/48) y un 7.7% (1/13) en cepas aisladas de piel. Una de las funciones de TSST-1 es la unión a las células epiteliales y se internaliza rápidamente, cruzando la barrera epitelial a través de transcitosis intracelular, además esta altera la integridad del epitelio de la mucosa, lo que puede facilitar la migración intercelular de la toxina, ocasionando inflamación de las células debido a la liberación de citocinas y quimiocinas (Breshears *et al.*, 2012).

Las toxinas exfoliativas A y B son codificadas por los genes *eta* (se encuentra en el cromosoma bacteriano) y *etb* (está situado en un plásmido) respectivamente y ambas tienen la capacidad de activar los linfocitos T y causar severos problemas a su hospedero. (Sahin *et al.*, 2012). En este estudio se encontró una mayor frecuencia del gen *eta* en las cepas aisladas de catéter con el 40%, mientras que en las cepas de las narinas la frecuencia fue del 10.5%. Para el caso del gen *etb* la frecuencia fue del 23.6% en las cepas aisladas de catéter y del 5.2% en las cepas aisladas de las narinas (Figura 5 y Fotografía 5). Peacock y colaboradores (2002), han descrito que la frecuencia de los genes *eta* y *etb* en cepas de *S. aureus* de pacientes sanos provenientes de Oxford, fue del 7% (n=12) y para del *etb* del 3% (n=6). Campbell y colaboradores (2008) reportaron la presencia de estos genes en una colección de *S. aureus* aisladas de pacientes con cSSSI, en donde la frecuencia para *eta* fue del 63% (35/56) y para *etb* del 39% (22/56).

La leucocidina PV es codificada por dos genes *lukS-PV* y *lukF-PV* (Sharma *et al.*, 2012). PVL es una exotoxina citotóxica para los neutrófilos induciendo la necrosis y la apoptosis celular mediante la producción de poros en la membrana celular de los neutrófilos (Abimanyu *et al.*, 2013) y es producida por un 2 a 3% de las cepas de *S. aureus* (Prevost *et al.*, 1995). En este estudio el gen *PVL* no fue identificado en las cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres, mientras que en las cepas de las narinas la frecuencia fue del 7.8% (n=3) (Figura 5 y Fotografía 7). Se ha descrito que *S. aureus* es la principal bacteria causante de la neumonía necrotizante severa. En EUA Sharma y colaboradores en el 2012 identificaron la presencia de *pvl* en 287 cepas, de las cuales la frecuencia fue del 8% (n=23). En otro estudio realizado por Renwick y colaboradores en el 2008 describieron la presencia del

Nalleli Padilla Navarrete

gen *PVL* en cepas nasales de 402 pacientes, de los cuales solo el 12.4% (n=50) presentó la leucocidina.

7.5. Combinaciones de los genes en las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de catéteres y narinas.

Se obtuvieron 23 combinaciones diferentes de los genes que codifican toxinas en las 55 cepas de *S. aureus* provenientes de los catéteres y 10 combinaciones diferentes en las 38 cepas de *S. aureus* provenientes de narinas (Cuadro 9). Para las cepas de catéteres, el patrón No. 3 conformado por los genes *hlg*, *seg*, *seh* y *sei* se identificó en el 25.4% (n = 14), mientras que en las cepas de *S. aureus* aisladas de narinas, el patrón 1 (*hlg*, *pvl*, *seg*, *seh*, *sei*) se identificó en el 68.4% (n = 26). Sauer y colaboradores (2008) analizaron los factores de virulencia (*tst*, *pvl*, *eta*, *etb*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* y *sej*) de 100 cepas de MRSA obtenidos de pacientes hospitalizados en el hospital universitario de Olomouc de la Republica Checa. Estos autores detectaron un número elevado de patrones de combinaciones de genes, dentro de los cuales, la combinación de los genes *seg-sei* se presentaron en 51 cepas MRSA, seguido de la combinación *sej-seg-sei-sed* en 15 cepas, mientras que en un patrón se detectaron 5 genes tóxicos *eta-seg-sei-sej-sed*. Los genes *seg* y *sei* se presentaron en 9 y 8 respectivamente de las 14 combinaciones analizadas.

8. Conclusiones

- El gen *mecA* que codifica la resistencia de *S. aureus* a la meticilina fue detectado en 81.8% de las cepas aisladas de catéteres, así como en el 100% de las cepas aisladas de narinas.
- Los genes *hlg*, *sei*, *seg* y *seh* fueron los más frecuentes en las cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres, mientras que los genes *hlg*, *seg*, y *sei* fueron los más frecuentes en las cepas de *S. aureus* aisladas de narinas.
- Los genes *sea*, *eta*, *see*, *seh*, *etb*, *tst*, *sed*, *sec*, *pvl* y *sej* se presentaron con menor frecuencia en cepas de *S. aureus* aisladas tanto de catéteres como de narinas.
- El patrón conformado por los genes *hlg-seg-seh-sei* fue identificado con mayor frecuencia en las cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres, mientras que el patrón conformado por los genotipos *hlg-pvl-seg-seh-sei* fue el más frecuente en las cepas de *S. aureus* aisladas de narinas.
- La elevada frecuencia de los genes que codifican toxinas entre las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres y narinas de los pacientes de hemodiálisis demostró la virulencia de las cepas de *S. aureus* y el riesgo de desarrollar complicaciones de salud más agudas para este grupo de pacientes.

9. LITERATURA CITADA

1. Abimanyu N., Krishnan A., Murugesan S., Subramanian G. K., Gurumurthy S. & Krishnan P. 2013. Use of Triplex PCR for Rapid Detection of PVL and Differentiation of MRSA from Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococci. **Journal of clinical and diagnostic research**.7 (2):215-218.
2. Aguirre M. V. Quintana R. & Brandan N. 2002. Citoquinas. Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina. U.N.N.E. (Documento en Internet). <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/citoquinas.pdf>
3. Alvarez F., Olaechea P. & Palomar M. 2010. Epidemiology of the primary and vascular catheter-related bacteremias in critical patients admitted to an Intensive Medicine Department. **Med Intensiva**. 34(7):437-445.
4. Balaban N. & Rasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**. 61 (2000): 1-10.
5. Barbara W., Trauther M. D., Rabih O. & Darouiche M. D. 2004. Catheter-associated infections: pathogenesis and preventions. **National institutes of health**. 164(8):840-850.
6. Barriaga G., Osorio M. L. & Sánchez E. A. 2009. Tigeciclina: actividad in vitro en aislamientos de un hospital de infectología. **Rev. Ints. Mexicano del Seguro Social**. 47(6):583-590.
7. Bergdoll M. S. 1967. The staphylococcal enterotoxins biochemistry of some foodborne Microbial Toxins. **MIT Press**. 22(19): 1-25.
8. Berger B., Barberis L., Strässle A. & Kayser F. 1989. *FemA*, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. **Mol Gen Genet**. 219: 263-269.
9. Bernal A., Proft T., Frasser J. D. & Posnett D. N. 1999. Superantigens in human disease. **J Clin Immunol**. 19(3): 149-157.
10. Beyrouthy R., Hamze M., Hleis S., Mallat H. & Dabbousi F. 2012. Panton Valentine leukocidin producing *Staphylococcus aureus* nasal carriage, in north-Lebanon. **Med Mal Infect**. 43(9): 386-390.

11. Brakstad O. G., Aasbakk K. & Maeland J. A. 1978. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. **Journal of Clinical Microbiology**. 30(7):1654-1660.
12. Branda N., Luponio A., González J. J., González R. W. & Klinzuk S. Linfocitos T. Catédra de Bioquímica. Facultad de Medicina. U.N.N.E. (Documento en Internet). <http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/linfot.pdf>
13. Breshears L., Schlievert P. & Peterson M. 2012. A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling drive the epithelial response to *Staphylococcus aureus* toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). **Journal of biological chemistry**. 287: 32578-32587.
14. Bustos M. J., Hamdan P. A. & Gutiérrez C. M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. **Biomed** 17(4): 287-291.
15. Campbell S. J., Deshmukh H. S., Nelson C. L., Bae I. G., Stryjewski J. J., Federspiel G. T., Tonthat T. H., Rudes S. L., Barriere R. C. & Fowler V. C. 2008. Genotypic characteristic of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infection. **Journal of clinical microbiology**. 46(2): 679-682.
16. Castro M. G., Godinez S., Liceaga Ma. G., Alexanderson G., Cabrera R., Carrillo R., Escobedo J., García J., Mercadillo Ma. G., Ortega C., Peña C., Ramo R. A., Tamez E., Wachter N., Vázquez J. L., Villagómez A.J., Aldrete J., Aldrete J., Cantú A. T., Alvaréz H. & Córdova V. H. 2012. Manejo de la hiperglucemia en pacientes hospitalizados. **Med Int Mexico**. 28(2): 124-153.
17. DeGrasse J. A. 2012. A single stranded that selectively binds to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. **Plos one**. 7(3): e33410.
18. Deurenberg R. H., Vink C., Kalenic S., Friedrich A. W., Bruggeman C. A. & Stobberingh E. E. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiol Infect**. 13: 222–235 pp.
19. Dinges M. M., Orwin P. M. & Schlievert P. M. 2000. Enterotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical microbiology reviews**. 13(1):16-34.

20. Duman Y., Tekerekoglu M. S. & Otlu B. 2013. Investigation of the Presence of Panton-Valentine Leukocidin and clonal Relationship of community and hospital acquired clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Mikrobiyol Bul.** 47(3): 389-400.
21. Durand G., Bes M., Maignier H., Enright M. C., Forey F., Liassine N., Wenger A., Kikuchi K., Lina G., Vandeneschi F. & Etienne J. 2006. Detection of new Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the Toxic Shock Syndrome Toxin 1 gene responsible for hospital and community-acquired infections in France. **Journal of clinical microbiology.** 44(3):847-853.
22. Eck A., Sluijs D., Oosterheert J. J., Ekkelenkamp M. B. Hoepelman I.M. & Peters J. 2012. Bacteremic complications of intravascular catheter tip colonization with Gram-negative micro-organisms in patients without preceding bacteremia. **Microbiol Infect.** 31:1027–1033.
23. Edmond M.B., Wallance S. E., McClish D. K., Pfaller M. A., Jones R. N. & Wenzel R. P. 2001. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: A three-year analysis. **Clin Infect Dis.** 29: 239-244.
24. El-Huneidi W., Bdour S. & Mahasneh A. 2006. Detection of enterotoxin genes *seg*, *she*, *sei* and of novel *aroA* genotype in Jordanian clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Diagn microbiology infectious disease.** 56(2):127-132.
25. Escobedo J. & Rico B. 1996. Incidencia y letalidad de las complicaciones agudas y crónicas de la diabetes mellitus en México. **Inst. Salud Pública de México.** 38(4):239-242.
26. Fernández J., Pinedo A. & Carnero M. 2001. Intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias. **Musson.** 10:481-482.
27. Fish D. N. & Ohlinger M. J. 2006. Antimicrobial resistance: factors and outcomes. **Crit Care Clin.** 22(2):291-311.
28. Foster T. J. 2005. Immune evasion by staphylococci. **Nat Rev Microbiol.** 3(12):948–958.
29. Fueyo J.M. 2005. Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos.

- Tesis Dr. Biol. Funcional. Univ. De Oviedo España. Área de Microbiología. 127 p.
30. Fuminori K., Noriko K., Yuko I., Katsuaki B., Hitoshi K. & Motoyuki S. 2011. Regulatory Mechanism for Exfoliative Toxin Production in *Staphylococcus aureus*. **Journal microbiology**. 79 (4): 1660-1662.
 31. Geha J. D., Uhl R. J., Gustafarro A. C. & Persing H. D. 1994. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant Staphylococci in the clinical laboratory. **Journal of clinical microbiology**. 32(7): 1768-1772.
 32. Götz F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular microbiology**. 43(6):1367-1378.
 33. Guerrero J. Síndrome de la Escaldadura Estafilocócica. (Monografía en Internet). Guerrero-Fdez J: Web PEDIátrica (en línea) (Actualizado en abril 2002). Disponible en: <http://www.webpediatria.com>
 34. Hamdan A. Sainz T. & Bustos J. 2013. Isolation of community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in healthy carriers in a Mexican community. **International journal of infection diseases**. S1201-9712(13)00270-1.
 35. Hamdan A., Saína T. & Bustos J. 2010. Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolates from the anterior nares and throats of healthy carries in a Mexican community. **Journal of clinical microbiology**. 48(5): 1701-1705.
 36. Hee Jin M. D., Eu Suk M. D. & Seok Lae M. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Nasal surveillance swabs at an intensive care unit: an evaluation of the LightCycler MRSA advanced test. **Annals of Laboratory Medicine**. 32(6):407-412.
 37. Hiramatsu K., Cui L., Kuroda M. & Ito T. 2011. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 9(10):486-492.
 38. Hiramatsu K., Hanaki H. & Ito, K. 1998. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains with reduced vancomycin susceptibility. **Journal Antimicrob Chemother**. 40 (1):135-136 pp.

39. Hurtado M. P., De la parte, M. A. & Brito A. 2002. *Staphylococcus aureus*: revisión de mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Soc. Ven. Microbiol.* 22(2): 9-12.
40. Ito T., Katayama Y., Asaba K., Mori N., Tsutsumimoto K., Tiensasitorn C. & Hiramatsu K. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. ***Antimicrob Agents Chemother.*** 45(5): 1323-1326.
41. Kamarehei F., Ghaemis D. A. & Dadgar T. 2013. Prevalence of enterotoxin A and B in *Staphylococcus aureus* isolates from clinical samples and healthy carriers in Gorgan city, north of Iran. ***Indian journal pathology microbiology.*** 56(3):265-268.
42. Kanafani Z. A. & Fowler V. G. 2006. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. ***Enferm Infect Microbiol Cli.*** 24(3):182-93.
43. Kessler C. M., Nussbaum, E & Tuazon C. U. 1991 Disseminated intravascular coagulation associated with *Staphylococcus aureus* septicemia is mediated by peptidoglycan-induced platelet aggregation. ***Journal Infect Dis.*** 164(1):101-107.
44. Kidney A. J. 2002. Clinical guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. ***National kidney foundation K/DOQUI*** 39 (1): S1-S266.
45. Klots M., Opper S., Heeg K. & Zimmerman S. 2003. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. ***Journal of clinical microbiol.*** 41(10): 4683-4684.
46. Klotz M., Opper S., Heeg K. & Zimmerman S. 2003. Selection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by realtime fluorescence PCR assay. ***Journal clinical microbiology.*** 41(10):4683-4687.
47. Kobayashi N., Wu H., Kojima K., Tanigachi K., Urasawa S., Uechara N., Omizu U., Kishi Y., Yagihashi A. & Kudorokawa I. 1994. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. ***Epidemiol Infect.*** 113: 259-266 259.

48. Kolawole D. O., Adeyanju A., Schaumburg F., Akinyoola A. L., Lawal O. O., Amusa Y. B., Köck R. & Becker K. 2013. Characterization of colonizing *Staphylococcus aureus* isolated from surgical wards' patients in a Nigerian university hospital. **PLoS One**. 8(7): e68721.
49. Le Loir Y., Baron F. & Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet Mol Res**. 2(1): 63-76.
50. Lee J. C., Park J. S., Shepherd S. E., Carey V. & Fattom, A. 1997. Protective efficacy of antibodies to the *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide in a model model of endocarditis in Rats. **Infect Immun**. 65(10): 4146-4151.
51. Lee S. Y., Kuti J. L. & Nicolau, D. P. 2005. Antimicrobial management of complicated skin and skin structure infections in the era of emerging resistance. **Surg Infect (Larchmt)**. 6(3):283-95.
52. Letertre C., Perelle S., Dilasser F. & Fach P. 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal Applied Microbiology**. 95(1):38-43.
53. Lin J., Wang W., Xu S. X., Magarvery N. A. & McCormick J. K. 2011. Lactobacillus reuteri-produced cyclic dipeptides quench agr-mediated expression of toxic shock syndrome toxin-1 in staphylococci. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 108(8):3360-3365.
54. Lin Y. C. & Peterson M. L. 2010. New insights into the prevention of staphylococcal infections toxic shock syndrome. **Expert Rev Clin Pharmacol**. 3(6):753-767.
55. Madigan T. M. Martinko M .J. & Parker J 10^a, eds. 2004. Biología de los microorganismos. España. **Pearson Pretice hall**. 864-865.
56. Manfredi E. A., Leotta G. A. & Rivas M. 2010. PCR múltiple para la detección de los genes SEA, SEB, SEC, SED y SEE de *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. **Argentina de Microbiología** 42(3):212-215.
57. Marschall, J. 2008. Catheter-associated bloodstream infections: Looking outside of the ICU. **Am. Journal of Infectology Control**. 36(10):172-178.

58. Martínez R. H. 2011. Estrategias para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad renal crónica temprana en primer nivel de atención. **Med. Int. Méx.**6: 44-50.
59. Mehrotra M., Wang G. & Johnson W. N. 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock, syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of clinical microbiology.** 38(3):1032-1035.
60. Méndez A., Méndez J., Tapia T., Muñoz A. & Aguilar L. 2010. Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. 31(1): 7-11.
61. Mesrati I. Saïdani M., Ennigrou S., Zouari B. & Redjeb S. 2010. Clinical isolates of pantone valentine leucocidin and gamma haemolysin producing *Staphylococcus aureus*: prevalence and association with clinical infections. **J Hosp Infect.** 75(4):265-8.
62. Mockenhaupt M., Idzko M., Grosber M., Schopf E. & Norgauer J. 2005. Epidemiology of staphylococcal scalded skin syndrome in Germany. **Journal of investigative dermatology.** 124(4):700-703.
63. Nakaminami, H. Noguchi, N. Ikeda, M. Hasui, M. Sato, M. Shinji, Yoshida, Y. T. Asano, T. Senoue, M. Sasatsu, M. 2008. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibilities of 273 exfoliative toxin-encoding-gene positive *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo in Japan. **Journal of Medical Microbiology.** 57(10):1251–1258.
64. Nashev D., K. Toshkova K., Bizeva L., Akineden O., Lämmler C. & Zschöck M. 2007. Distribution of enterotoxin genes among carriage and infection associated isolates of *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology.** 45:681-685.
65. Nashev D., Toshkova K., Salasia S. I., Hassan A. A. Lämmler C. & Zschöck M. 2004. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. **FEMS Microbiol Lett.** 233(1): 45-52.
66. Omoe K., Ishikawa M., Shimoda Y., Hu D. L., Ueda S. & Shinagawa K. 2002. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and

- determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *she*, or *sei* genes. **Journal clinical microbiology**. 40(3):857-862.
67. Paniagua G. L. & Monroy E. 2012. Curso de análisis clínicos I. Microbiología y parasitología clínica teórico-práctico. **CUSI.UNAM. Iztacala**. 12 p.
68. Park K. H., Lee Y. M., Hong H. L., Kim T., Park H. J., Parck Y. S., Moon S. M., Chong Y. P., Kim S. H., Lee S. O., Choi S. H., Jeong J. Y., Kim M. N., Woo J. H., Woo J. H. & Kim Y. S. 2012. Persistent Catheter-Related *Staphylococcus aureus* Bacteremia after Catheter Removal and Initiation of Antimicrobial Therapy. **PLoS One**.7(10):46389-463976.
69. Peacock S. J., Moore C. E., Justice A., Kantzanou M., Story L., Mackie K., Neill G. O. & Day N. P. 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. **Infection and immunity**. 70(9): 4987–4996.
70. Poole C. V., Carlton D., Bimbo L. & Allon M. 2004. Treatment of catheter-related bacteraemia with an antibiotic lock protocol: effect of bacterial pathogen. **Nephrology dialysis transplantation**. 19:1237-1244.
71. Prevost G., Couppie P., Prevost P., Gayet S., Petiau P., Cribier B. & Monteil H. 1995. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. **Journal medical microbiology**.42:237-245.
72. Quisberth S. R. 2007. Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* en niños menores de 5 años, en el hospital del niño “Dr. Ovidio Aliagara” durante los meses de enero a marzo 2007. Tesis Lic. Bioquímica. Univ. Mayor de San Andres Bolivia. 26 p.
73. Renwick L., Hardie A., Girvan E. K., Smith M., Leadbetter G., Claus E., Morrison D., Gibb A. P., Dave J. & Templeton K. E. 2008. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Panton Valentine leukocidin directly from clinical samples and the development of a multiplex assay using real-time polymerase chain reaction. **Journal clinical microbiology infection**. 27:791–796.
74. Sahin F., Karasartova D., Özsan T. M., Kiyan M., Karahan C. Z. & Tekeli A. 2012. Identification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carrying

- an exfoliative toxin A gene encoding phage isolated from a hospitalized patient in Turkey. **Canadian journal of microbiology**. 59(4):260-265.
75. Salgado W., Breshears L., Spaulding A. R., Merriman J. A., Stach C. S., Horswill A. R., Peterson M. L. & Schlievert P. M. 2013. Superantigens are critical for *Staphylococcus aureus* infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury. **MBio**. 4(4): pii: e00494-13.
76. Sato H., Matsumori Y., Tanabe T., Saito H., Shimizu A. & Kawano J. 1994. A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegmon. **Infect Immun** 62: 3780–3785.
77. Sauer P., Síla J., Stosová T., Vecerová R., Hejnar P., Vángnerová I., Kolár M., Raclavský V., Petrzalová J., Lovecková Y. & Koukalová D. 2008. Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from university hospital, Olomouc Czech republic. **Journal of medical microbiology**. 57:403-410.
78. Scheaffer R. L., Mendenhall W. & Lyman O. 1987. Elementos de muestreo. México. **Grupo Editorial Iberoamérica, S. A.** 321-322 p.
79. Schelin J., Carlquist N. W., Cohn M. T., Lindquist R., Barker G. C. & Radström P. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Landes bioscience**. 2(6):580-592.
80. Sharma-Kuinkel B. K., Ahn S. H., Rude T. H., Zhang Y., Tong S. Y., Ruffin F., Genter F. C., Braughton K. R., Deleo F. R., Barriere S. L., Vance G. & Fowler Jr. 2012. Presence of genes encoding Pantón-Valentine Leukocidin is not the primary determinant of outcome in patients with hospital acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**. 50(3):848-856.
81. Song Y., Liu C. I. & Lin F. Y. 2009. Inhibition of staphyloxanthin virulence factor biosynthesis in *Staphylococcus aureus*: *in vitro*, *in vivo*, and crystallographic results. **Journal of medicinal chemistry**. 52(13): 3869-3880.
82. Speller, D. C. Johnson, A. P. James, D. 1997. Resistance to methicillin and other antibiotics in isolates of *Staphylococcus aureus* from blood and

- cerebrospinal fluid, England and Wales, 1989-1995. **Journal of antimicrobial chemotherapy**. 250(3):323-325.
83. Srinivasan A., Dick J. D. & Perl T. M. 2002. Vancomycin resistance in staphylococci. **Clin Microbiol**. 15:430-438.
84. structure infections in the era of emerging resistance. **Surg. Infect**. 6(3): 283-295.
85. Tucker P. W., Hazen E. E. & Cotton F. A. 1978. Staphylococcal nuclease reviewed: a prototypic study in contemporary enzymology. I. Isolation, physical and enzymatic properties. **Mol. Cell. Biochem**. 22:67-77.
86. Velázquez M. E. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. **Salud Pública México**. 47:381-387.
87. Velázquez M. E., Aires M., Echaniz A. G., Solórzano S. F., Miranda N. G., Silva S. J. & 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. **Journal of clinical microbiology**. 42(8): 3877-3880.
88. Widmer, A. 1997 3rd.ed. 2012. Intravenous-related infections. In: Wenzel R, editor. Prevention and control of nosocomial infections. EUA. **Williams & Wilkin**. 771-805 pp.
89. Wilcox, M. H. 2003. Efficacy of linezolid versus comparator therapies in Gram-positive infections. **Journal of antimicrobial chemotherapy**. 51; 27-35 pp.
90. Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R. & King H. 2004 Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**. 27(5):1047-1053.
91. Xiao X. Ma., Ito T. Kondo Y., Choe M., Yukio Y., Kaneko J., Katai. 2008. Two different Panton-Valentine leukocidin phage lineages predominate in Japan. **Journal of clinical microbiology**. 46(10):3246-3258.
92. Yan X., Wang B., Tao X., Hu Q., Cui Z., Zhang J., Lin Y., You Y., Shi X. & Grundmann H. 2012. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning in Shenzhen, China. **Applied and environmental microbiology**. 78(18):6637-6642.