



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Patrones de expresión de genes que codifican toxinas en cepas de
Staphylococcus aureus de origen clínico”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LINCENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

LUIS ANTONIO HERNÁNDEZ MONROY

Directora de Tesis

Dra. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

Los Reyes Iztacala, Tlanepantla Estado de México, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis se la dedico a Dios por prestarme su creación para poder estudiarla y por haberme dado vida y salud para realizar este trabajo.

A mi Madre por desvelarse conmigo, por esas lágrimas, risas y asombros que durante la carrera descubrimos juntos.

A mis hermanitos, Ana Laura, Elvira y Miguel Ángel, siempre han sido mi inspiración y mi motivo de alegría al llegar a casa, los amo.

A mi Padre porque aunque lejos estuvo de mí todo este tiempo, me enseñó a ser fuerte siempre.

A todos mis hermanos de comunidad, por esas palabras de aliento que siempre me han ayudado.

A mi Tía Juanita por ser un apoyo incondicional para mi vida y a mi Tía Martha por ser como una segunda madre para mi guiándome siempre que lo necesité.

A mis mejores amigos de la carrera: “Luigui y Luis Luna” por esos momentos en los que más los necesité y ahí estuvieron en todos aspectos, fueron un hombro para llorar y mis consejeros, además fueron especiales para compartir todas mis locuras e invenciones; siempre seremos los luises.

A mis amigas Jackye y Miriam por esas noches tan divertidas llenos de todo luchando por terminar esos arduos y duros trabajos, además de enseñarme a nunca rendirme.

A Sophie mi Psicóloga particular cuyas terapias siempre terminaban en risas y bromas pesadas

A Chuy por ser quien me ayudo a no temer nada en ningún lugar donde fuera.

A la Dra. Gloria Luz Paniagua y al Dr. Eric Monroy por ser mis guías y apoyarme durante este proyecto de Tesis.

A todos mis Profesores y Compañeros que a lo largo de la carrera que me apoyaron en diversas circunstancias tanto académicas como personales.

A todos Muchas Gracias.



INDICE

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumen..... | 1 |
| Introducción..... | 2 |
| • Características Generales de <i>Saphylococcus aureus</i> . | |
| • Contaminación bacteriana de los catéteres de hemodiálisis. | |
| • Factores de virulencia de <i>S. aureus</i> . | |
| Antecedentes..... | 8 |
| Objetivo General..... | 10 |
| Objetivos Particulares..... | 10 |
| Materiales y Métodos..... | 11 |
| • Extracción de ADN de <i>S. aureus</i> . | |
| • Identificación de <i>S. aureus</i> por PCR. | |
| • Infección del epitelio oral humano reconstituido. | |
| • Extracción y purificación de ARN para PCR en Tiempo Real. | |
| • Reversotranscripción. | |
| • Preparación de la mezcla de PCR en Tiempo Real y configuración del equipo. | |
| • Electroforesis de campos pulsados PFGE. | |
| Resultados..... | 20 |



- Pacientes estudiados.
- Origen de las cepas aisladas.
- Etiología de la IRC de los pacientes.
- Identificación de *Staphylococcus aureus* por PCR.
- Determinación de la expresión de los genes que codifican toxinas por PCR. en tiempo Real (PCR RT) en las cepas de *S. aureus*.
- Expresión de los genes que codifican toxinas en las cepas de *S. aureus* y su asociación con los patrones de restricción del ADN cromosómico por PFGE.
- Combinaciones de expresión de los genes que codifican toxinas en las cepas de *S. aureus*

Discusión.....51

- Análisis de Pacientes con Insuficiencia Renal Crónica
- Contaminación de los Catéteres de Hemodiálisis por *S. aureus*
- Determinación de la expresión de los genes que codifican toxinas por PCR en tiempo Real (PCR RT) en las cepas de *S. aureus*.
- Combinaciones de expresión de los genes que codifican toxinas en las cepas de *S. aureus* y asociación con los patrones de restricción del ADN cromosómico por PFGE

Conclusiones.....58

Literatura Citada.....59



RESUMEN

El propósito de este trabajo fue establecer los niveles de expresión de los genes que codifican toxinas en cepas *S. aureus* utilizando un modelo *in vitro* de epitelio reconstituido humano (RHE). Se estudiaron 21 cepas de *S. aureus* de origen clínico. Las cepas bacterianas fueron identificadas por PCR convencional mediante la detección de los genes *spa* (región X) y *rRNA* además de ser positivas para las pruebas de la coagulasa y del manitol. Las cepas de *S. aureus* fueron inoculadas sobre la superficie de los epitelios e incubadas a 37°C por 48 horas. La extracción del RNA bacteriano, la reversotranscripción y la expresión por PCR en Tiempo Real de los genes: *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg* y *seh* (codifican enterotoxinas), *tst* (toxina 1 del síndrome del shock tóxico), *eta* y *etb* (toxina exfoliativa A y B), *hlg* (Alpha-toxin), así como de los genes *v8* (Serine protease), *efb* (Extracellular fibrinogen-binding protein), *chp* (Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*) y *arcA* (Arginine deiminase pathway) en las cepas de *S. aureus* se realizó mediante los equipos comerciales de Qiagen. El ADN bacteriano de las cepas de *S. aureus* fue analizado por PFGE (electroforesis en campos pulsados) utilizando el equipo CHEF MAPPER (BIORAD). Los genotipos *seg*, *seh*, *sei*, *efb* y *hlg* se expresaron en el 100% (n=21) de las cepas de *S. aureus*, *etb* en el 95% (n=20), *sea* en el 52% (n=11), *arcA* y *v8* en el 5% (n=1), en cada caso. Los genes *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sej*, *eta* y *tst* no se expresaron en ninguna cepa. Los resultados encontrados en este estudio evidenciaron que durante la infección del epitelio reconstituido humano se expresaron varios de los marcadores de virulencia de las cepas de *S. aureus*, lo que sugiere la existencia de distintos niveles y perfiles de expresión de estos genotipos.



INTRODUCCIÓN

Características Generales de *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus es un organismo que pertenece a la familia *Micrococcaceae* y al género *Staphylococcus*, el nombre proviene del griego “*staphylé*” o “racimo de uvas”, El género fue descrito por Alex Ogston en 1883 (Ogston, 1883) y comprende cocos Gram positivos con un diámetro entre 0.5 y 1 μm , son anaerobios facultativos, no forman esporas, no posee movilidad y crecen a temperaturas entre 18 a 40°C. En el medio de cultivo S-110 las colonias de la especie *Staphylococcus aureus* toman una coloración dorada o naranja debido a la producción de carotenoides (Winslow, 1919). *S. aureus* se diferencia de las demás especies dentro de su género debido a que fermenta el manitol bajo condiciones anaeróbicas (Bannerman, 2003). También fermenta la xilosa, lactosa, sucrosa y maltosa. Las colonias de *S. aureus* pueden producir hemólisis en el medio Agar sangre en un periodo de 24 a 36 horas (Velazquez-Meza, 2005 Zeina- Fowler, 2006).

Staphylococcus aureus es una bacteria que forma parte de la flora nasal del hombre (Vanden 1999), su comensalismo dentro de la población cada vez es más común (Vincenot *et al.*, 2008), es una de las principales causas de infecciones adquiridas a nivel hospitalario y en la comunidad (Diekema *et al.*, 2001). Puede ocasionar una gran gama de enfermedades debido a su alto grado de patogenicidad, es el responsable de serias infecciones de la piel y sistema nervioso central, como la osteomielitis y endocarditis (Schito 2006; Aguinaga & del Pozo 2011), infecciones respiratorias como neumonía y septicemia; además de que puede ocasionar diversas enfermedades mediadas a partir de toxinas, como el síndrome de choque tóxico al liberar súper antígenos en el torrente sanguíneo, síndrome de la piel escaldada y enfermedades transmitidas por alimentos tras liberar sus enterotoxinas (Plata *et al.*, 2009; Kanafani & Fowler, 2006)



Contaminación bacteriana de los catéteres de hemodiálisis

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que en el mundo existen aproximadamente 150 millones de personas que padecen diabetes mellitus, dentro de los cuales México es uno de los países con mayor incidencia, estimando que para el 2030 ocupe el séptimo lugar con casi 12 millones de pacientes (International Diabetes Federation 2013). La diabetes mellitus puede ocasionar en el 50% de los casos enfermedades renales terminales, como la Insuficiencia Renal Crónica (IRC). La diabetes mellitus es la responsable del 50% de los casos de enfermedades renales como la IRC, así como otras patologías como; las uropatías obstructivas, hipertensión arterial y glomérulo nefritis. (Fundación Mexicana del Riñón 2013)

La Insuficiencia Renal Crónica (IRC) es una alteración renal asintomática en donde hay una pérdida progresiva del filtrado glomerular, en una variante aguda, se caracteriza por uremia, oliguria o anuria, con hiperpotasemia y edema pulmonar, finalizando en una enfermedad renal terminal. La principal alternativa para los pacientes con IRC es el trasplante renal, en cuyo caso el Centro Nacional de Trasplantes reportó que en el año 2005 se realizaron un total de 2001 trasplantes, 2800 trasplantes en el 2006 y 2361 para el 2011 de donaciones cadavéricas y vivas (Centro Nacional de Trasplantes 2013); debido a que no se puede cubrir la alta demanda de trasplantes renales para pacientes con IRC se recurre a otras alternativas terapéuticas como la inserción de catéteres vasculares transitorios para efectuar la diálisis peritoneal y hemodiálisis, actualmente este último es una de las alternativas más usadas en todo el mundo (Withwort, 1990; Fundación Mexicana del Riñón 2013).

El propósito de la hemodiálisis es sustituir la función filtradora del riñón, extrayendo del cuerpo la sal, el sobre exceso de líquido y los desechos tóxicos del organismo, ayudando al paciente a mantener un control de la presión arterial y el equilibrio de electrolitos séricos como sodio, potasio, calcio y cloruro. (Withwort, 1990), el empleo de estos dispositivos transitorios tienen una gran utilidad clínica facilitando un rápido acceso al torrente sanguíneo para la administración de medicamentos y nutrición parenteral; así también permiten llevar a cabo una monitorización venosa



central o pulmonar (Allon, 2004), en Estados Unidos de Norte América aproximadamente de 75 000 de 300 000 pacientes utilizan catéteres vasculares (Tokards *et al.*, 2004) La inserción de catéteres de hemodiálisis para tratar la IRC constituye un factor de riesgo para contraer bacteremias e infecciones graves (Marschall, 2008), las cuales pueden comprometer la vida de los pacientes (Tanriover *et al.*, 2000).

Las infecciones asociadas a los catéteres de hemodiálisis son ocasionadas principalmente por bacterias Gram positivas (Katneni - Hedayati, 2007), como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp; *Enterococcus* spp. Y *Corynebacterium* spp. (Constituyentes de la microbiología epitelial) (Aguinaga – del Pozo 2011- Kaplowitz *et al.*, 1988).

En México las sesiones de hemodiálisis se han elevado en los últimos años, las estadísticas medicas del IMSS muestran que en el Estado de México y D.F. se realizaron 283,849 sesiones de Hemodiálisis de los cuales 14,626 fueron hospitalizados (IMMS, 2011), sin embargo las estadísticas sobre bacteriemias asociadas a catéteres de hemodiálisis son escasas, encontrando solo reportes locales de algunas instituciones públicas (Salazar *et al.*, 2002) En los Estados Unidos se reportó un incremento de infecciones relacionadas con catéter de hemodiálisis entre noviembre de 1997 y octubre de 1998 causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA).Las infecciones asociadas a los catéteres ocurren debido a que *S. aureus* es capaz de formar una biopelícula bacteriana en el interior de los túneles de los catéteres (Donland, 2001), mediada por la acción de un polisacárido adhesivo intercelular (PIA), el cual es sintetizado por enzimas codificadas por el operón de adhesión intercelular (*ica*) (Von Eiff *et al.*, 1999; Ziebuhr *et al.*, 1997).Se ha demostrado que la biopelícula protege a las cepas de *S. aureus* contra concentraciones de antibióticos comprendidas entre 100 y 1000 veces mayores a las requeridas para erradicarlas (Anderl *et al.*, 2000) así también las protege contra los mecanismos de defensa del hospedero (Katneni & Hedayati 2007).



Factores de virulencia de *S. aureus*

Staphylococcus aureus es un organismo capaz de producir una gran cantidad de proteínas que le proveen la capacidad de colonizar al hospedero y causarle severos daños, estas proteínas participan en la adhesión y adquisición de nutrientes para el microorganismo además de poder evadir la respuesta inmune del huésped (Cuadro 1).

| Estructurales | Enzimas | Toxinas |
|--------------------------|----------------|-------------------------------------------------|
| Peptidoglucano | Catalasa | Toxina α (Hemolisina α) |
| Proteína A | Hialuronidasa | Hemolisina β |
| Factores de adhesión | Lipasas | Hemolisina γ |
| Ácidos teicoicos | Coagulasa | Hemolisina δ |
| Polisacáridos capsulares | Nucleasas | Leucocidina de Pantone-Valentine (PVL) |
| | Proteasas | Enterotoxinas estafilocócicas (SE) |
| | Estafilocinasa | Toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1) |
| | Colagenasa | Toxinas exfoliativas (ETA y ETB) |

Cuadro 1. Principales Factores de Virulencia de *Staphylococcus aureus* (tomado de Bustos *et.al.*, 2006)

Dentro de esta gran gama de proteínas se localizan las enterotoxinas estafilocócicas o mejor conocidas como superantígenos pirogénicos. Estos superantígenos se encuentran dentro de una gran familia de toxinas: SEA, SEB, SEC, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEP, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER y SEU (SE's), las cuales son codificadas por los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* y los recientemente encontrados *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser* y *seu* (Balaban, 2000; Bustos *et al.*, 2006). Las cepas de *S. aureus* son capaces de



contaminar los alimentos (ensaladas de papas y huevos, pastelería, jamón, pollo, cremas, helados, etc) y producir las enterotoxinas, que desencadenan la Gastroenteritis (diarrea, náusea y vómitos) (Gouloumes 1996; Dinges *et al.*, 2000). *Staphylococcus aureus* también produce la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1) codificada por el gen *tst* de origen cromosómico (Schlievert, 1981), que al ser expresado suprime la quimiotaxis de los neutrófilos, induce la función supresora de los linfocitos T y bloquea el sistema retículo endotelial, al actuar como súper antígeno estimula la liberación de citosinas, prostaglandinas y leucotrienos los cuales son los causantes de su sintomatología (Dinges *et al.*, 2000; Herzer 2001). El síndrome del shock tóxico se caracteriza por causar fiebre alta, dolor de cabeza, vómito, diarrea, mialgias, meningitis, faringitis, conjuntivitis, vaginitis, edema, entre otros; Cuando la toxina TSST-1 es expresada en adultos puede ocasionar dificultad para respirar, coagulación intravascular y falla renal, esta toxina se encuentra sintomáticamente relacionada con el grupo de las SE's (Johnson *et al.*, 1991; Brosnahan *et al.*, 2013; Herzer 2001; Bustos *et al.* 2006), Las toxinas exfoliativas A (ETA) con un peso de 26.9 kDa de origen cromosómico y B (ETB) con un peso de 27.3 kDa a partir de un plásmido ligado, son codificadas por plásmidos, tienen una actividad biológica idéntica, y cuando son expresadas por los genes *eta* y *etb* causan el Síndrome Estafilocócico de la Piel Escaldada comúnmente en infantes y lactantes, provocando una dermatitis exfoliativa, que se caracteriza por la formación de grandes ampollas. (Bailey *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1987; O'Toole *et al.*, 1987). Así mismo se encuentra el gen *arcA*, el cual activa la vía de la arginina diseminasa, la cual realiza una conversión de la L-arginina en CO₂, ATP y amoníaco, el cual es importante para la supervivencia de pH bajo y también para la inhibición de la respuesta inmune contra infecciones bacterianas; Todos los aislados de *Staphylococcus aureus* tienen un cluster *arc* nativo que codifica a la ruta de la arginina diseminasa (Degnan *et al.*, 2000; Moncada & Higgs 1993; Pi *et al.*, 2009). *Staphylococcus aureus* posee una gran gama de enzimas entre las cuales se encuentran la variedad de las proteasas, en donde encontramos la exoenzima serina proteasa V8, codificada por el gen *v8* (Reed *et al.*, 2001); esta exoproteína es producida por el sistema regulador *agr* el cual regula positivamente la expresión



de la proteasa extracelular en respuesta del incremento de la densidad celular, en contraste el sistema regulador *sar* tiene un efecto negativo sobre la expresión de la proteasa; además de que Mc Gavin y colaboradores en 1997 reportó que la V8 proteasa modifica la unión de fibronectina a *S. aureus*, por lo tanto, estas proteasas secretadas son de elevada importancia en la regulación post traduccional de la actividad de exoproteínas de *S. aureus*, además de modificar las proteínas del huésped en beneficio de las bacterias, como la inactivación de los péptidos antimicrobianos (Chan *et al.*, 1998; Cheung *et al.*, 1994; Recsei *et al.*, 1985; Goguen *et al.*, 1995). Otro factor de virulencia presente en *S. aureus* es la α toxina, la cual es codificada por el gen *hlg*, y posee actividad dermonecrótica y neurotóxica. Es la responsable de la lisis celular de los eritrocitos, linfocitos y plaquetas, se encarga de la producción de tromboxano y prostaciclina provocando una vasoconstricción, tras romper la integridad celular aumenta la permeabilidad vascular, terminando con un edema pulmonar (Dinges *et al.*, 2000). El gen *efb*, codifica para la proteína extracelular de unión al fibrinógeno (Efb), la cual inhibe la función de los linfocitos T y la migración de los monocitos, interfiriendo con la respuesta inflamatoria temprana (Lee *et al.*, 2004). Finalmente la proteína chp (Proteína inhibidora de la quimiotaxis de *Staphylococcus aureus*) codificada por *chp* es responsable la migración temprana de leucocitos (Hass *et al.*, 2004).

Debido a que la participación de los distintos factores de virulencia de *S. aureus* en las infecciones relacionadas a los catéteres de los pacientes de hemodiálisis puede resultar fatal para este grupo, en este trabajo se evaluó la expresión de los genes que codifican toxinas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real utilizando un modelo *in vitro* de epitelio reconstituido humano (RHE).



ANTECEDENTES

- Mehrotra y colaboradores en el 2000 realizaron un ensayo de dos kits de PCR multiplex para la detección de genes de *S. aureus* en 176 cepas de origen clínico 129 cepas aisladas en Canadá (107 provenientes de pacientes sanos, 19 cepas eran de un estudio de vigilancia nacional y las tres restantes fueron aisladas de muestras clínicas) y 47 cepas de Holanda. Estos autores encontraron que de las cepas obtenidas en Canadá la frecuencia del gen *sea* fue del 19.6% (n=21), *seb* del 5.6% (n=8), *sec* del 1.9% (n=2) y *tst* del 24.3% (n=26), mientras que los genes *see*, *eta*, *etb* y *mecA* no fueron detectados; de las 47 cepas colectadas en Holanda, la frecuencia del gen *sea* fue del 12.76% (n=6), *seb* del 2.12% (n=1), *sec* del 6.38% (n=3), *eta* del 8.51 (n=4) y *tst* del 23.40% (n=11).
- Campbell y Colaboradores en el 2008 detectaron una gran cantidad de factores de virulencia, como adhesinas, las enterotoxinas, toxinas exfoliativas, la proteína del síndrome del shock toxico, en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de pacientes de Estados Unidos y Sudáfrica, encontrando elevadas frecuencias de estos genes. Estos autores reportaron que en las cepas de Sudáfrica se identificaron más genes de virulencia que en las cepas de Estados Unidos.
- Peacock y colaboradores en el 2002, estudiaron la asociación de 33 determinantes de virulencia, que incluían adhesinas y toxinas en 179 cepas de *S. aureus* (94 adquiridas en un hospital y 61 dentro de la comunidad), en donde a través de un análisis de PCR se identificó que 7 determinantes bacterianos (*fnbA*, *cna*, *sdrE*, *sej*, *eta*, *hlg* e *ica*) fueron los más comunes.



- Sauer y colaboradores en el 2008 analizaron la sensibilidad antimicrobiana y la asociación de diferentes factores de virulencia (*tst*, *pvl*, *eta*, *etb*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* y *sej*) en 100 cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico, encontrando elevadas frecuencias de estos genes y del gen *mecA* en un 100% (n=100), así también un elevado porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacina (85%), eritromicina (62%), clindamicina (60%). Concluyendo que existió una elevada resistencia a antibióticos y no hubo diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de estos factores de virulencia.
- Corredor y colaboradores en 2012 determinaron la prevalencia de los genes que codifican los superantígenos en cepas de *S.aureus* colectadas de secreciones, catéter, entre otros, mediante PCR multiplex, encontrando que existe una alta prevalencia de genes de enterotoxinas y una baja presencia de genes de toxinas exfoliativas y del síndrome del choque tóxico en las cepas.



OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de los genes que codifican toxinas en un grupo de cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones asociadas a los catéteres de pacientes de hemodiálisis, utilizando un modelo de infección *in vitro* de epitelio reconstituido humano

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer los patrones de expresión de los genes que codifican toxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *tst*, *eta*, *etb*, *efb*, *hlg*, *chp*, *arcA* y *v8*) en las cepas de *S. aureus* utilizando un modelo *in vitro* de epitelio reconstituido humano.
- Analizar los patrones de restricción del ADN cromosómico de las cepas de *S. aureus* por PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis).



MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de la Salud Integral (CUSI), ubicada en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, (FESI), UNAM

Para el desarrollo de este estudio se seleccionó un grupo de 21 cepas de *S. aureus* previamente aisladas de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica que presentaron infección en el sitio de inserción del catéter tipo Mahurkar del servicio de Hemodiálisis del Hospital General Regional 72, IMSS.

Extracción de ADN de *S. aureus*

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

Identificación de *S. aureus* por PCR

Se identificaron las cepas de *Staphylococcus aureus* por PCR convencional mediante la detección de los marcadores cromosómicos *rRNA* y *spa* (Nashev *et al.*, 2004). Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: *spa* 1 (CAAGCACCAAAGAGGAA), *spa*2 (CACCAGGTTTAACGACAT) y *rRNA*1 (ACGGAGTTACAAAGGACGAC) y *rRNA*2 (AGCTCAGCCTTAACGAGTAC), (Frénay *et al.*, 1996 & Brakstad *et al.*, 1992; Straub *et al.*, 1999). La amplificación por PCR se realizó mediante el empleo de las perlas PuRetaq Ready-To-Go™ PCR (GE Healthcare), que contenían 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 nmol de dNTPs, para un volumen final de 25µl por cada muestra de reacción (Cuadro 2); La amplificación del ADN para el gen *spa* se realizó mediante las



siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, 35 ciclos, (desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, alineación a 60°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto), la extensión final se prolongó por 10 minutos a 72°C. Para el gen *rRNA* las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, 35 ciclos, (desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, alineación a 60°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto), la extensión final se prolongó por 10 minutos a 72°C.

| Componente | Volumen/ reacción | Concentración final |
|----------------------------------|-------------------|---------------------|
| Agua libre de nucleasas | 20µl | 1 x |
| Primer <i>Forward</i> | 1 µl | 10 pmol |
| Primer <i>Reverse</i> | 1 µl | 10 pmol |
| ADN molde de <i>S.aureus</i> | 3 µl | 100 ng |
| Volumen final de reacción | 25 µl | - |

Cuadro 2. Preparación de la mezcla de reacción para PCR convencional.

Infección del epitelio oral humano reconstituido

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



Extracción y purificación de ARN para PCR en tiempo real.

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

El ARN total de *S. aureus* fue extraído utilizando el kit RNeasy® (Qiagen®; N.º de catálogo 74106) conforme a las instrucciones del fabricante. Para lo cual las bacterias colectadas se suspendieron en tubos eppendorf con una dilución de PBS (5×10^8 células). El tubo se centrifugó a 1300 rpm a 4°C por 5 minutos. El sobrenadante se decantó y se resuspendieron las células de *S. aureus* en 2 mL de buffer TE (10mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0 + 20 mg / ml de lisozima) y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente el tubo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos para la formación del pellet y se decantó el sobrenadante. Se adicionaron 350 µL de buffer RLT (3000µL de RLT + 30µL de β-mercaptoetanol), se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugó por 2 minutos a 10,000 rpm. Al término se adicionaron 350 µL de etanol al 70% para homogeneizar el lisado, posteriormente se transfirieron 700 µL a una columna con una membrana contenida en un tubo eppendorf de 2 mL, ésta se centrifugo a 10 000 rpm por 15 segundos para lavar la membrana, el líquido de flujo se decantó. A continuación se adicionaron 700 µL de buffer RW1 a la columna y se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 segundos para lavar la membrana y el líquido de flujo fue decantado, se adicionaron posteriormente 500µL de buffer RPE y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 segundos para lavar la membrana y el líquido de flujo fue decantado. Nuevamente se adicionaron 500µL de buffer RPE y se centrifugó a 10,000 rpm por 2 minutos para lavar la membrana y el líquido de flujo fue decantado. Al terminó se colocaron la columna en un tubo colector nuevo de 2 mL, se centrifugaron a 10,000 rpm por 1 minuto. Reiteradamente se colocaron la columna en un tubo colector nuevo de 1.5 mL se adicionaron 50 µL de agua libre de RNasas directamente sobre la membrana de la columna y se centrifugaron a 10,000 rpm por 1 minuto para



obtener el ARN, el ARN obtenido se mantuvo a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

Reversotranscripción

Se realizó el proceso de reversotranscripción del ARN a ADNc (ADN complementario) utilizando el kit Quantitect® Reverse Transcription (Qiagen N° de catálogo 205311) según las instrucciones del fabricante, se inició con la eliminación del ADN genómico, por lo que se descongelaron los tubos con ARN y los componentes del kit para llevarlos a una temperatura ambiente de (15-20°C), la preparación de la eliminación del ADN genómico fue de acuerdo al Cuadro 3 usando un tubo eppendorf de 0.2 ml.

| Componente | Volumen/reacción | Concentración final |
|-------------------------|-------------------------|----------------------------|
| gGNA Wipeout buffer, 7x | 2 µL | 1 x |
| ARN templado | 5 µL | - |
| Agua libre de Rnasa | 7 µL | - |
| Volumen total | 14 µL | - |

Cuadro 3. Preparación de la mezcla de reacción para la eliminación del DNA genómico

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

Para la síntesis de la primera cadena de ADNc se preparó la *master mix* con un volumen final de 20µl acorde al Cuadro 4 usando un tubo eppendorf de 0.2 mL



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

Cuadro 4. Preparación de la mezcla de reacción para la reversotranscripción

Una vez concluida la reacción, la concentración de ADNc se leyó en un Nanodrop 2000® (Thermo Scientific®). El ADNc fue guardado a -20°C hasta su utilización.

Preparación de la mezcla PCR en tiempo Real y configuración del equipo

Para la preparación de la mezcla de PCR en tiempo Real se utilizó el kit PCR Rotor-Gene™ SYBER® Green I, de Qiagen® conforme las instrucciones del fabricante. Para un volumen final de 25µl la mezcla de reacción se realizó empleando una gradilla metálica previamente congelada (Cuadro 5). Los oligonucleótidos utilizados para la reacción se observan en el cuadro 6. El gen de referencia utilizado para cada ensayo de PCR en Tiempo Real fue *gyrB* (Figura 24)



| Componente | Volumen/reacción | Concentración final |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------|
| Master Mix SYBR® Green I (contiene dNTP, Taq AND polimerasa, MgCl ₂ y el SYBR® Green I | 12.5 µL | 1x |
| Primer <i>forward</i> | 1 µL | 1 µM |
| Primer <i>reverse</i> | 1 µL | 1 µM |
| AND molde | 1 µL | ≥100 ng |
| Agua libre de RNasa | 9.5 µL | - |
| Volumen Total | 25 µL | - |

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

Para la expresión de los genes de toxinas por PCR en Tiempo Real se utilizó el equipo Rotor-Gene™ 6000 (Corbett®). Las condiciones de amplificación fueron: 95°C durante 5 minutos (activación de la HotStart), 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 5 segundos y la combinación de alineación/extensión de 60°C por 10 segundos tal como fueron descritas por Huygens *et. al.*, 2006). Los resultados se analizaron con el software del equipo Gene™ 6000 Corbett®.



| Gen | Oligonucleótido | Secuencia del primer (5'-3') | Tamaño (pb) | Referencia |
|------------|-----------------|---------------------------------|-------------|--------------------------------|
| Toxinas | | | | |
| sea | Forward | AAAGTCCCGATCAATTTATGGCTA | 216 | (Tsen&Chen1992) |
| | Reverse | GTAATTAACCGAAGGTTCTGTAGA | | |
| seb | Forward | TCGCATCAAACCTGACAAACG | 478 | (Johnson <i>et al.</i> , 1991) |
| | Reverse | GCAGGTA CTCTATAAGTGCC | | |
| sec | Forward | GACATAAAAGCTAGGAATTT | 257 | (Johnson <i>et al.</i> , 1991) |
| | Reverse | AAATCGGATTAACATTATCC | | |
| sed | Forward | CTAGTTTGGTAATATCTCCT | 317 | (Johnson <i>et al.</i> , 1991) |
| | Reverse | TAATGCTATATCTTATAGGG | | |
| see | Forward | TAGATAAGGTTAAAACAAGC | 170 | (Johnson <i>et al.</i> , 1991) |
| | Reverse | TAACTTACCGTGGACCCTTC | | |
| seg | Forward | AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC | 642 | (Jarraud <i>et al.</i> , 1999) |
| | Reverse | AAACTTATATGGAACAAAAGGTA CTAGTTC | | |
| seh | Forward | CAATCACATCATATGCGAAAGCAG | 375 | (Jarraud <i>et al.</i> , 1999) |
| | Reverse | CATCTACCCAAACATTAGCACC | | |
| sei | Forward | CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG | 576 | (Jarraud <i>et al.</i> , 1999) |
| | Reverse | AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC | | |
| sej | Forward | CATCAGAACTGTTGTTCCGCTAG | 142 | (Monday & Bonach1999) |
| | Reverse | CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC | | |
| eta | Forward | GCAGGTGTTGATTTAGCATT | 676 | (Steven <i>et al.</i> , 2008) |
| | Reverse | AGATGTCCCTATTTTTGCTG | | |
| etb | Forward | ACAAGCAAAGAATACAGCG | 419 | (Steven <i>et al.</i> , 2008) |
| | Reverse | GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG | | |
| efb | Forward | CGGTCCAAGAGAAAAGAAACCAGTGAG | 303 | (Steven <i>et al.</i> , 2008) |
| | Reverse | TGTGCTTTTCTGTGTGCACTGACAGTATG | | |
| hlg | Forward | TTGGCTGGGGAGTTGAAGCACA | 306 | (Steven <i>et al.</i> , 2008) |
| | Reverse | CGCCTGCCAGTAGAAGCCATT | | |



| Gen | Oligonucleótido | Secuencia del primer (5' - 3') | Tamaño (pb) | Referencia |
|-------------|-----------------|--------------------------------|-------------|-------------------------------|
| Toxinas | Forward | AACGGCAGGAATCAGTACACACCATC | 757 | (Steven <i>et al.</i> , 2008) |
| | Reverse | GGCAAGTTATGAAATGTCTGCCAAACC | | |
| arcA | Forward | CACGTAACCTTGCTAGAACGAG | 724 | (Steven <i>et al.</i> , 2008) |
| | Reverse | GAGCCAGAAGTACGCGAG | | |
| tst | Forward | ATGGCAGCATCAGCTTGATA | 306 | (Steven <i>et al.</i> , 2008) |
| v8 | Forward | CAACGAATGGTCATTATGCACCCGTA | 529 | (Steven <i>et al.</i> , 2008) |
| | Reverse | TTTGGTACACCGCCCCAATGAA | | |

Cuadro 6. Oligonucleótidos utilizados para la PCR en Tiempo Real.

Electroforesis de campos pulsados PFGE

Las cepas bacterianas fueron sembradas en medio S-110 por el método de estría cruzada y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se tomó una colonia aislada y se inoculó por duplicado en un tubo con 5 ml de medio BHI, se incubaron toda la noche a 37°C. La concentración de bacterias se ajustó a una concentración de 3 en la escala de Mc Farland o de 1.3 a 1.4 a 610 nm, 1×10^9 bacterias / mL. Una vez crecidas las bacterias se tomó una muestra de 500 µL y se colocó en un tubo eppendorff, se centrifugó a 13000 rpm durante 4 minutos, el sobrenadante fue retirado y se le adicionaron 500µL de buffer PIV (10mM Tris base, 1 M NaCl, pH 7.6). La muestra se centrifugó durante 4 minutos a 13000 rpm (se verificó que el paquete celular tuviera un densidad aproximada de 2 mm de diámetro), nuevamente



se le agregaron 150µL de buffer PIV y se incubó a 50°C por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 150µL de agarosa de bajo punto de fusión, mezclando el paquete celular perfectamente mediante un vortex. Los moldes para plug se llenaron con la mezcla anterior dejando un meñisco, estos se refrigeraron por 15 minutos a 4°C y a continuación se depositaron en un tubo para micro centrifuga agregando 500 µL del buffer de Lisis celular [6mM Tris pH7.6, 100 mM EDTA, 51M NaCl, 5.0g. polyoxyethylene 20 cetyl ether] y se incubaron toda la noche Posteriormente se lavaron con buffer TE1X [TE 10X: 50mM Tris pH 7.6m 50 mM EDTA pH 7.5, dilución 1:10) y se adicionaron 500 µL de buffer ESP (398 mM EDTA, 34mM Sodium Lauroyl Sarcosine, 500mg Proteinasa K). Finalmente se incubaron a 50°C toda la noche. Al término se lavaron con TE1X y se incubaron a 35°C por 30 minutos, este paso se repitió 5 veces (Todos los plugs de reserva se mantuvieron con buffer TE1X), se estabilizó el plug con 300 µL de buffer J 10X [100 mM Tris-HCL, 70 mM MgCl₂, 500 mM KCL, 10 mM DTT (1-4 Dithiothreitol) pH 7.5, (dilución 1:10)] para cada muestra; la digestión se llevó a cabo con la enzima de restricción (*Sma1*) por 30 minutos a 37°C .

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

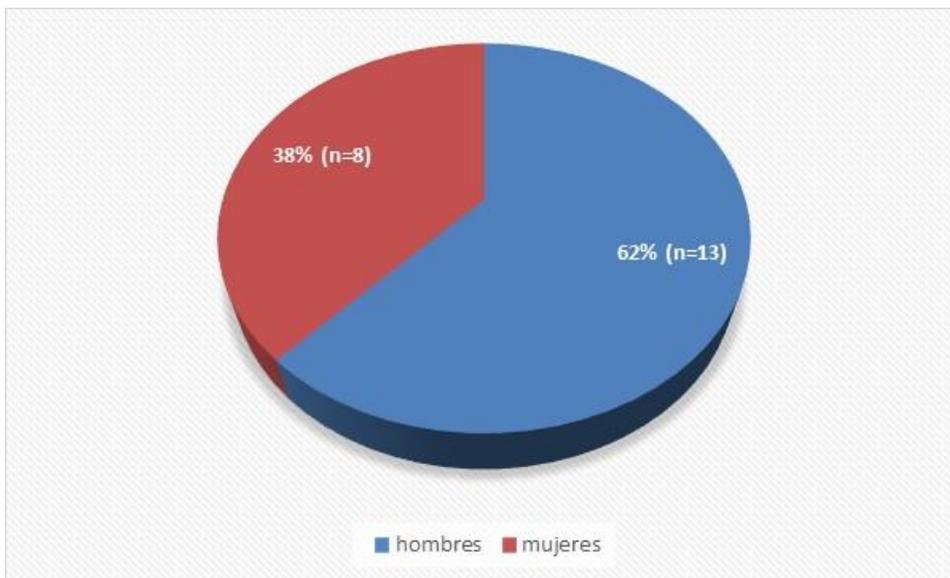
Al finalizar el gel se tiñó con Bromuro de Etidio por un tiempo de 20 a 30 minutos y posteriormente se observó en el sistema de foto-documentación (Kodak) con luz ultra violeta. El análisis se realizó mediante los criterios de Tenover *et al.*, 1995.



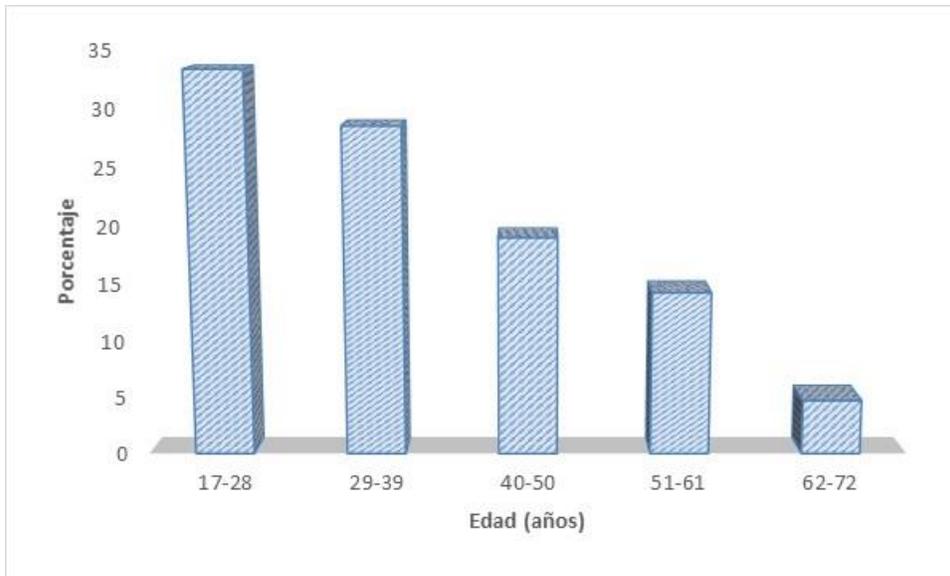
RESULTADOS

Pacientes estudiados

Se estudiaron 21 cepas de pacientes con infección en el sitio de inserción del catéter tipo Mahurkar, en donde el 62% (n= 13) fueron hombres y el 38% (n=8) fueron mujeres (Grafica 1). La edad de los pacientes se situó dentro del intervalo 17 a 72 años (Grafica 2). La frecuencia más alta se encontró dentro del intervalo 17 a 28 años con un 33.33% (n=7) de pacientes, posteriormente se encontró el intervalo de 28 a 39 años con un 28.57% (n=6). La frecuencia más baja se encontró dentro del intervalo de 61 a 72 años con un 4.76% (n=1).



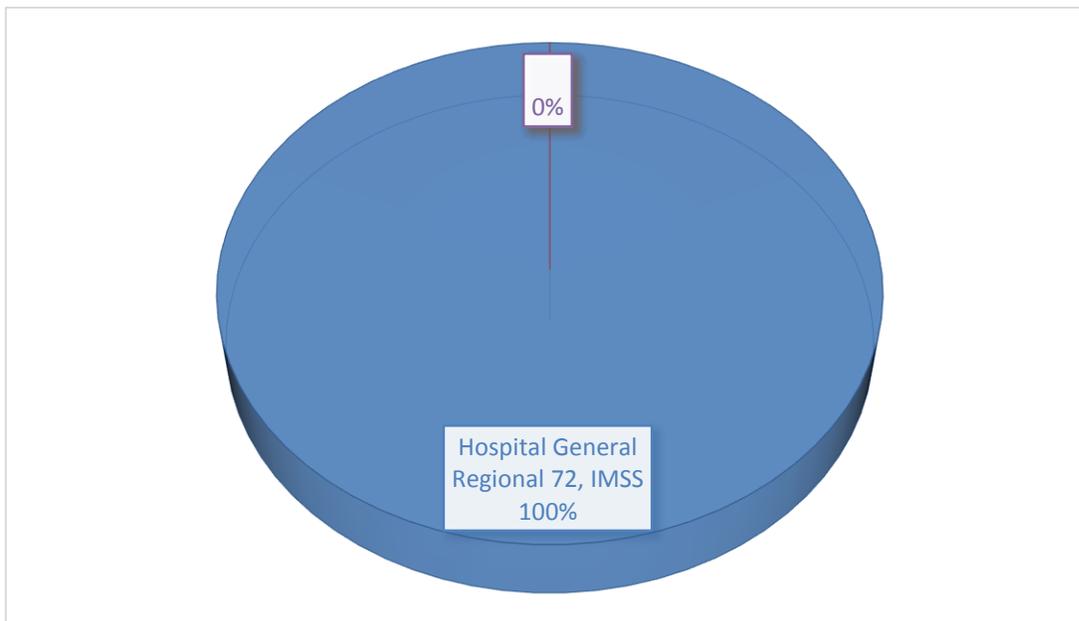
Grafica 1. Distribución de los pacientes por sexo.



Grafica 2. Distribución de los pacientes por edad.

Origen de las cepas aisladas

Se analizaron 21 cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres de pacientes infectados de un hospital del estado de México.



Grafica 3. Origen de las cepas de los pacientes del hospital del IMSS.

Etiología de la IRC de los pacientes

El origen de la enfermedad renal no se logró establecer por los médicos en el 42.85% (n=9) de los pacientes, en donde en el 28.57% (n= 6) la IRC fue debida a la Glomerulonefritis, 19.04% (n=4) a la Diabetes Mellitus y en menor porcentaje a la Hipertensión Arterial con el 9.52% (n=2) (Cuadro 7)

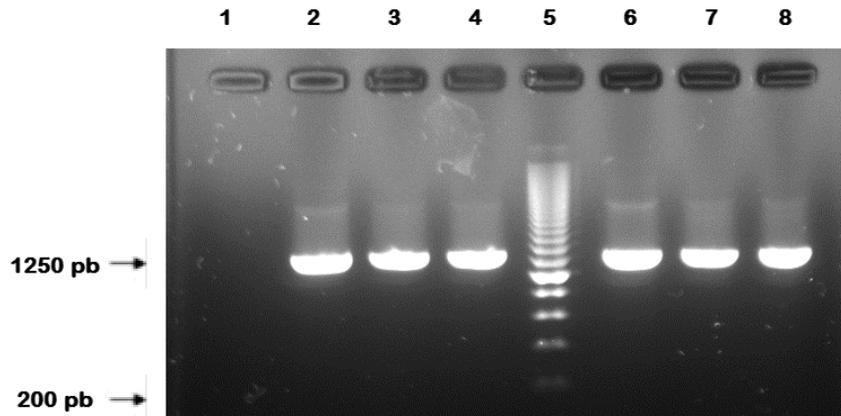
| ETIOLOGIA | No | % |
|------------------------------|-----------|----------|
| Hipertensión arterial | 2 | 9.52% |
| Diabetes Mellitus | 4 | 19.04% |
| Glomerulonefritis | 6 | 28.57% |
| No determinada | 9 | 42.85% |

Cuadro 7. Origen de la Insuficiencia Renal Crónica de los pacientes estudiados.

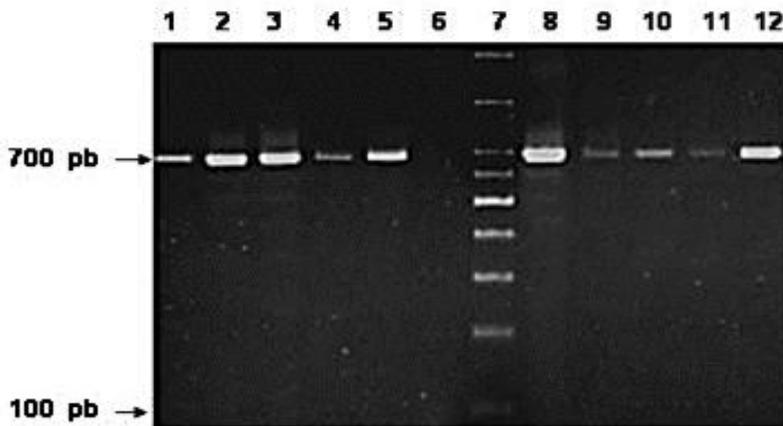


Identificación de *Staphylococcus aureus* por PCR

La identificación de *Staphylococcus aureus* se realizó mediante la detección por PCR convencional de los marcadores *rRNA* (Fotografía 1) y *spa* (Fotografía 2). El gen *spa* fue identificado en el 100% de las cepas analizadas (n=21).



Fotografía1. Identificación de *Staphylococcus aureus* por PCR convencional mediante la amplificación de *rRNA*. Línea 1, Control negativo (*S. epidermidis* ATCC 35984); Línea 2, Control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Línea 5, MPM 200 pb; Líneas 3-4 y 6-8, *rRNA* en cepas de *S. aureus*.



Fotografía2. Detección por PCR convencional de *spa*. Líneas 1-4, y 8-12 *spa* en cepas de *S. aureus* (700 pb el amplicón); Línea 5, Control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); Línea 6, Control negativo (sin ADN molde); Línea 7; MPM 100 pb.

Determinación de la expresión de los genes que codifican toxinas por PCR en tiempo Real (PCR-RT) en las cepas de S. aureus

La frecuencia de expresión de los genes de toxinas se observa en el Cuadro 8. Los genes expresados con mayor frecuencia fueron *seg* (100%, n=21) (Figura 2 y 3), *seh* (100%, n=21) (Figura 4 y 5), *sei* (100%, n=21) (Figura 6 y 7), *hlg* (100%, n=21) (Figura 8 y 9) y *efb* (100%, n=21) (Figura 10 y 11), posteriormente el gen *etb* (95.2%, n=20 (Figura 12 y 13), *sea* (52.3, n=11) (Figura 14 y 15), *arcA* (5% n=1) (Figura 16 y 17) y *yv8* (5%, n=1)(Figuras 18 y 19), Los genes *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sej*, *eta*, *tst* y *chp* no se expresaron, estos dos últimos se ejemplifican en las figuras 20,21,22 y 23.

| Genes de Toxinas | Expresión | |
|------------------|-----------|-----|
| | No | % |
| <i>seg</i> | 21 | 100 |
| <i>seh</i> | 21 | 100 |
| <i>sei</i> | 21 | 100 |
| <i>hlg</i> | 21 | 100 |
| <i>efb</i> | 21 | 100 |
| <i>etb</i> | 20 | 95 |
| <i>sea</i> | 11 | 52 |
| <i>arcA</i> | 1 | 5 |
| <i>V8</i> | 1 | 5 |
| <i>seb</i> | 0 | 0 |
| <i>sec</i> | 0 | 0 |
| <i>sed</i> | 0 | 0 |
| <i>see</i> | 0 | 0 |
| <i>sej</i> | 0 | 0 |
| <i>tst</i> | 0 | 0 |
| <i>chp</i> | 0 | 0 |

Cuadro 8. Expresión de los genes que codifican toxinas en las cepas de *S. aureus*.



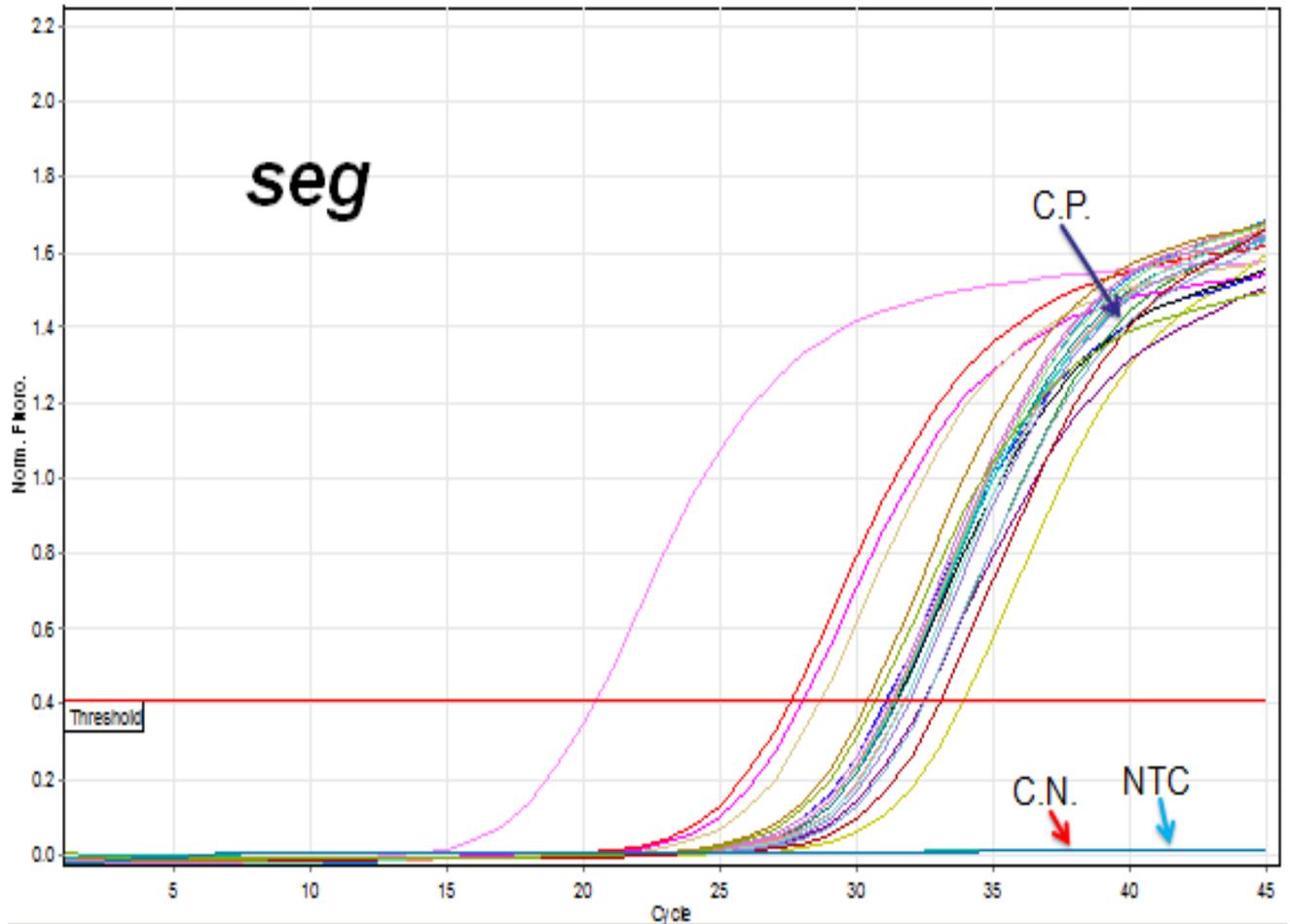


Figura 2. Detección de la expresión del gen *seg* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBER® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado; Control Positivo = *S. aureus* ATCC 25923, Control Negativo = *S. epidermidis* ATCC 35984.

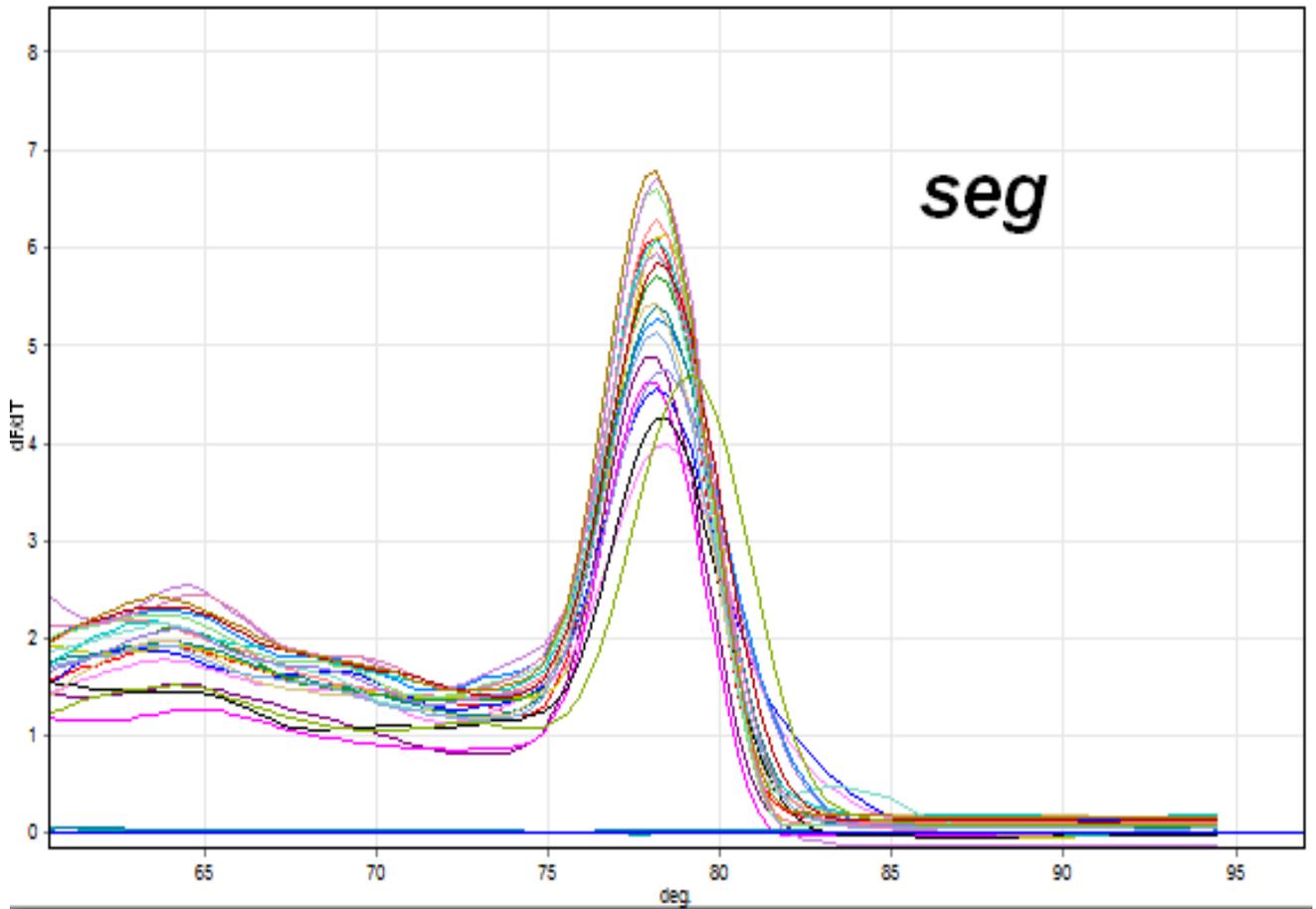


Figura 3. Curva de fusión (Melting point) de la corrida del gen *seg*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

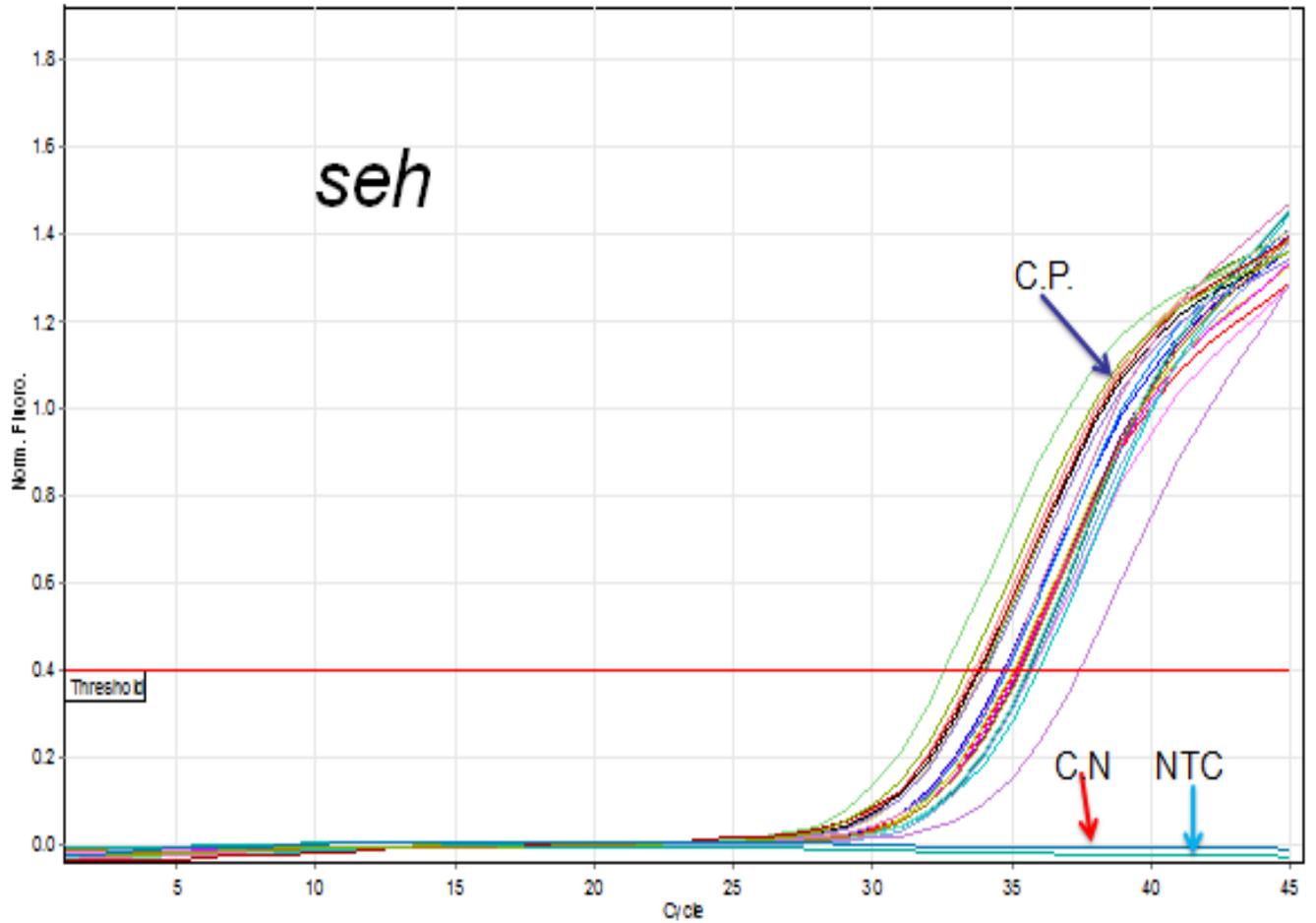


Figura 4. Detección de la expresión del gen *seh* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBER® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado; Control Positivo = *S. aureus* ATCC 25923, Control Negativo = *S. epidermidis* ATCC 35984.

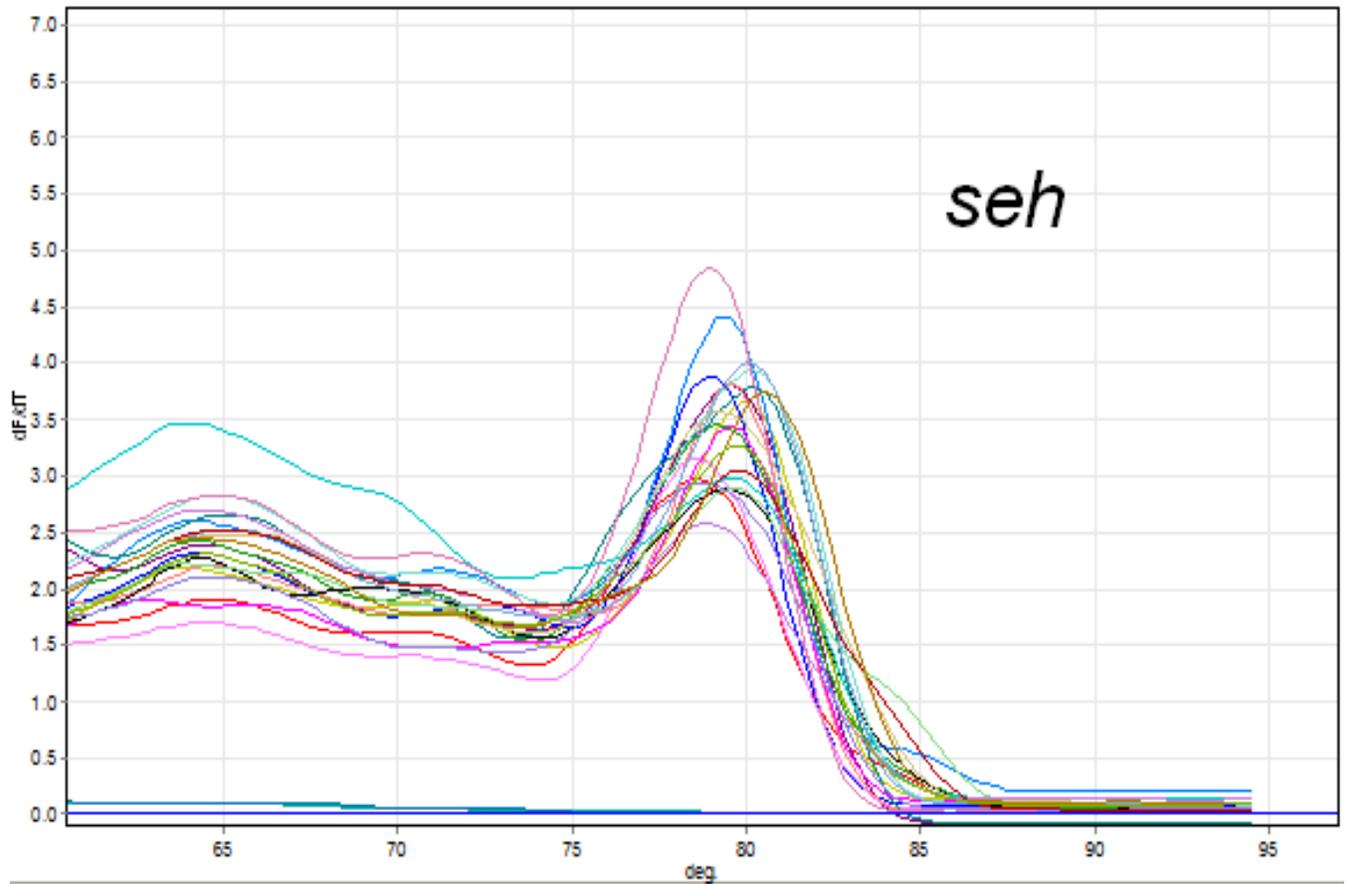


Figura 5. Curva de fusión (Melting point) de la corrida del gen *seh*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

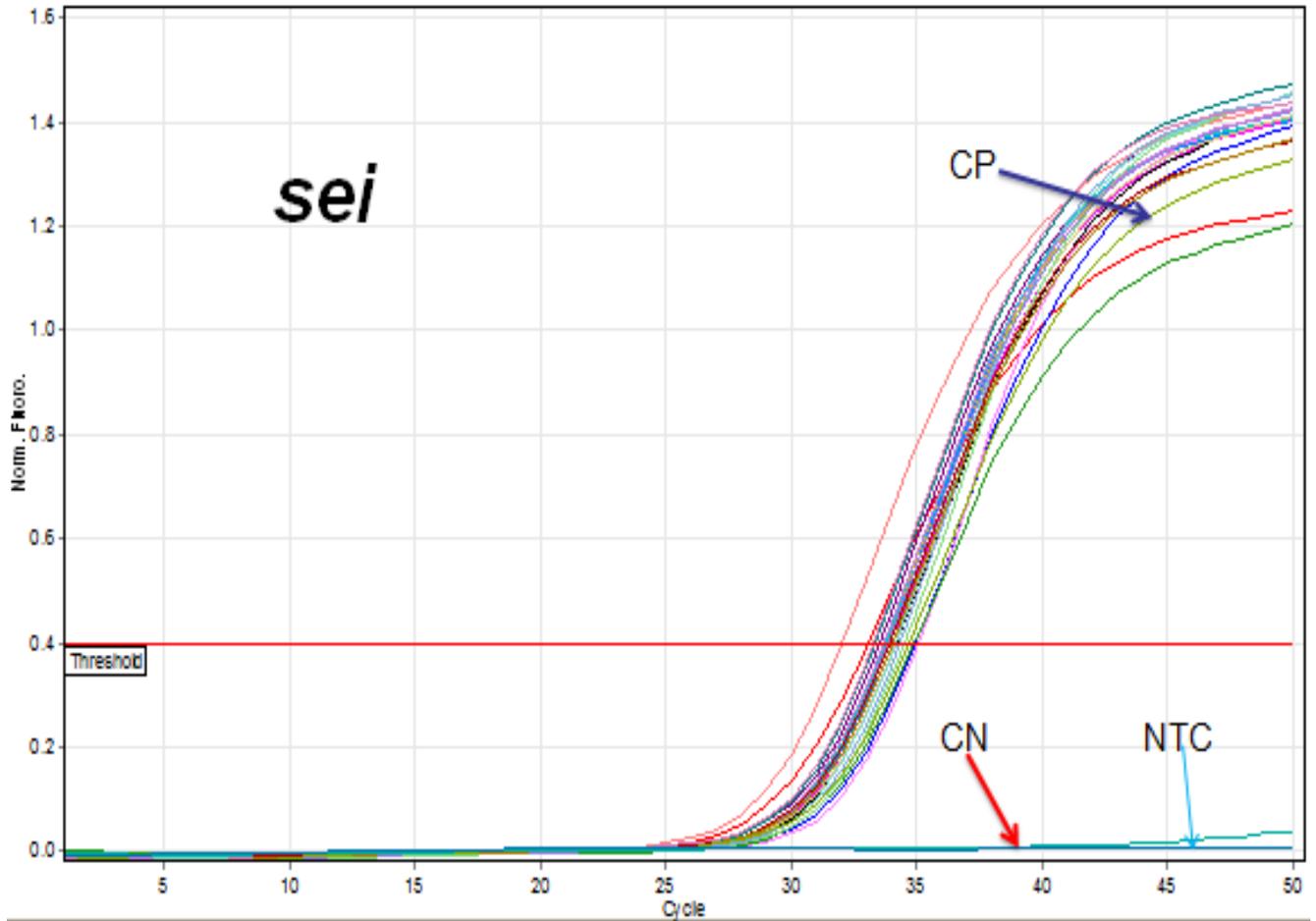


Figura 6. Detección de la expresión del gen *sei* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBER® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado; Control Positivo = *S. aureus* ATCC 25923, Control Negativo = *S. epidermidis* ATCC 35984.

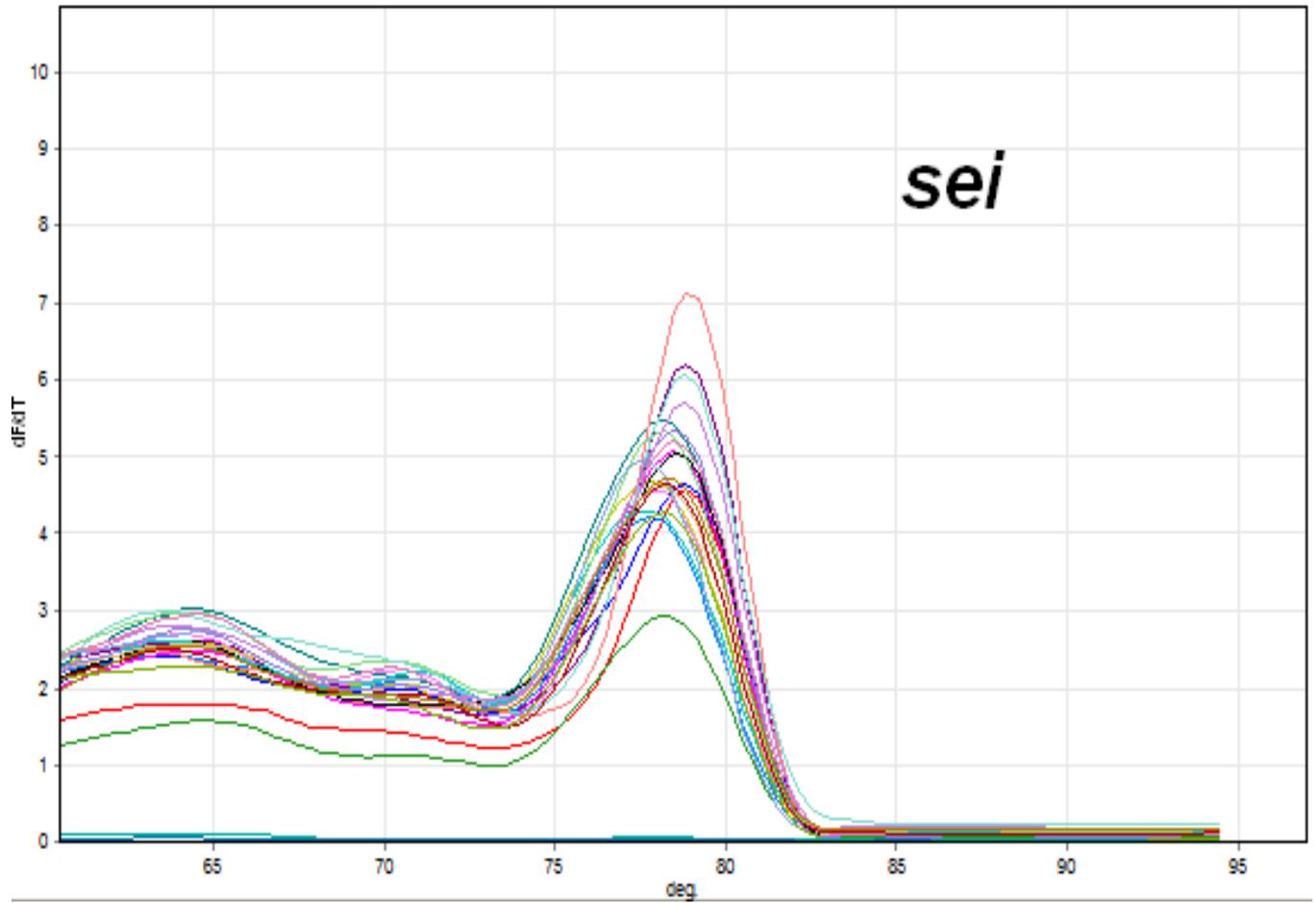


Figura 7. Curva de fusión (Melting point) de la corrida del gen *sei*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

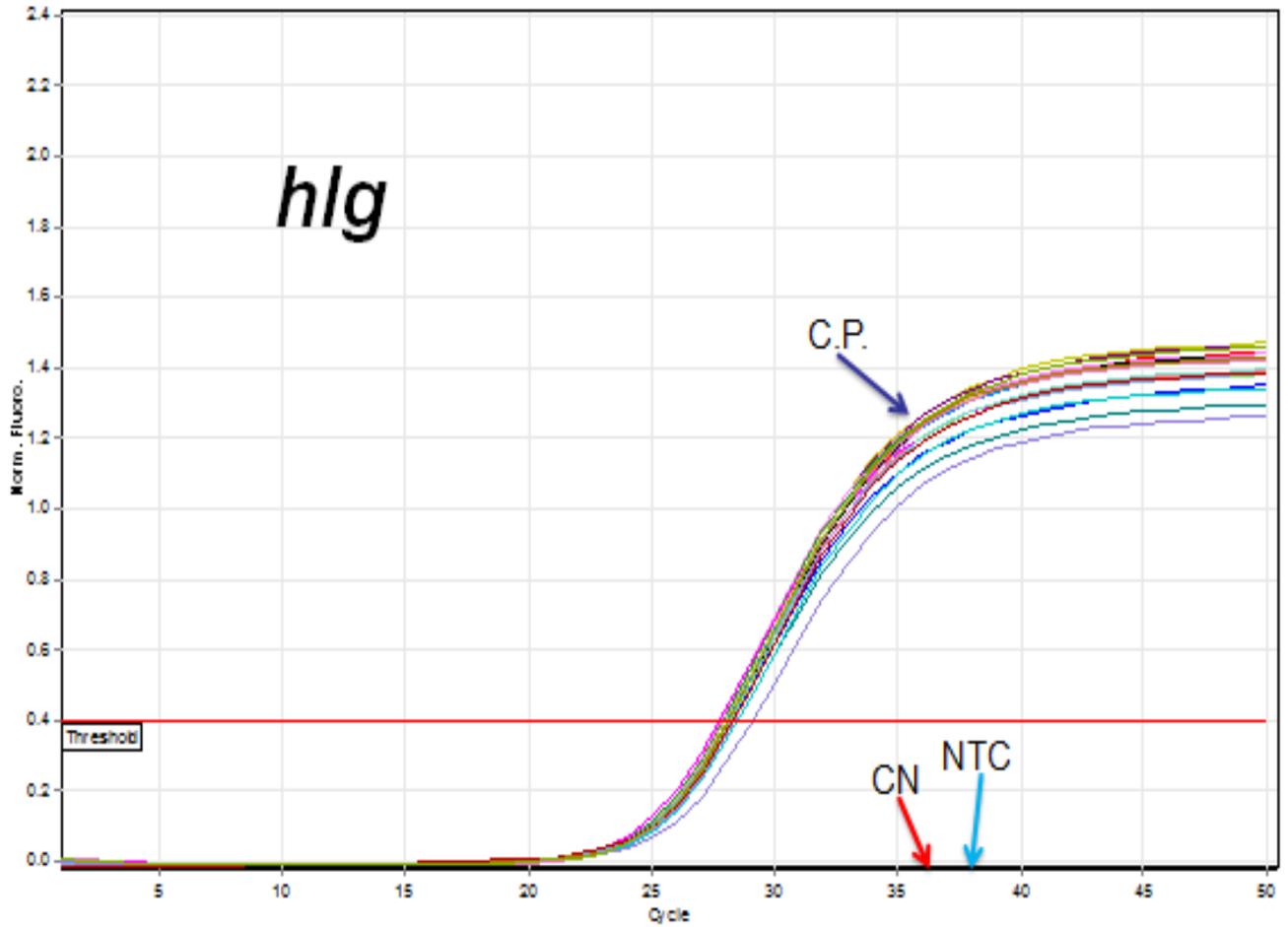


Figura 8. Detección de la expresión del gen *hlg* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBER® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado; Control Positivo = *S. aureus* ATCC 25923, Control Negativo = *S. epidermidis* ATCC 35984.

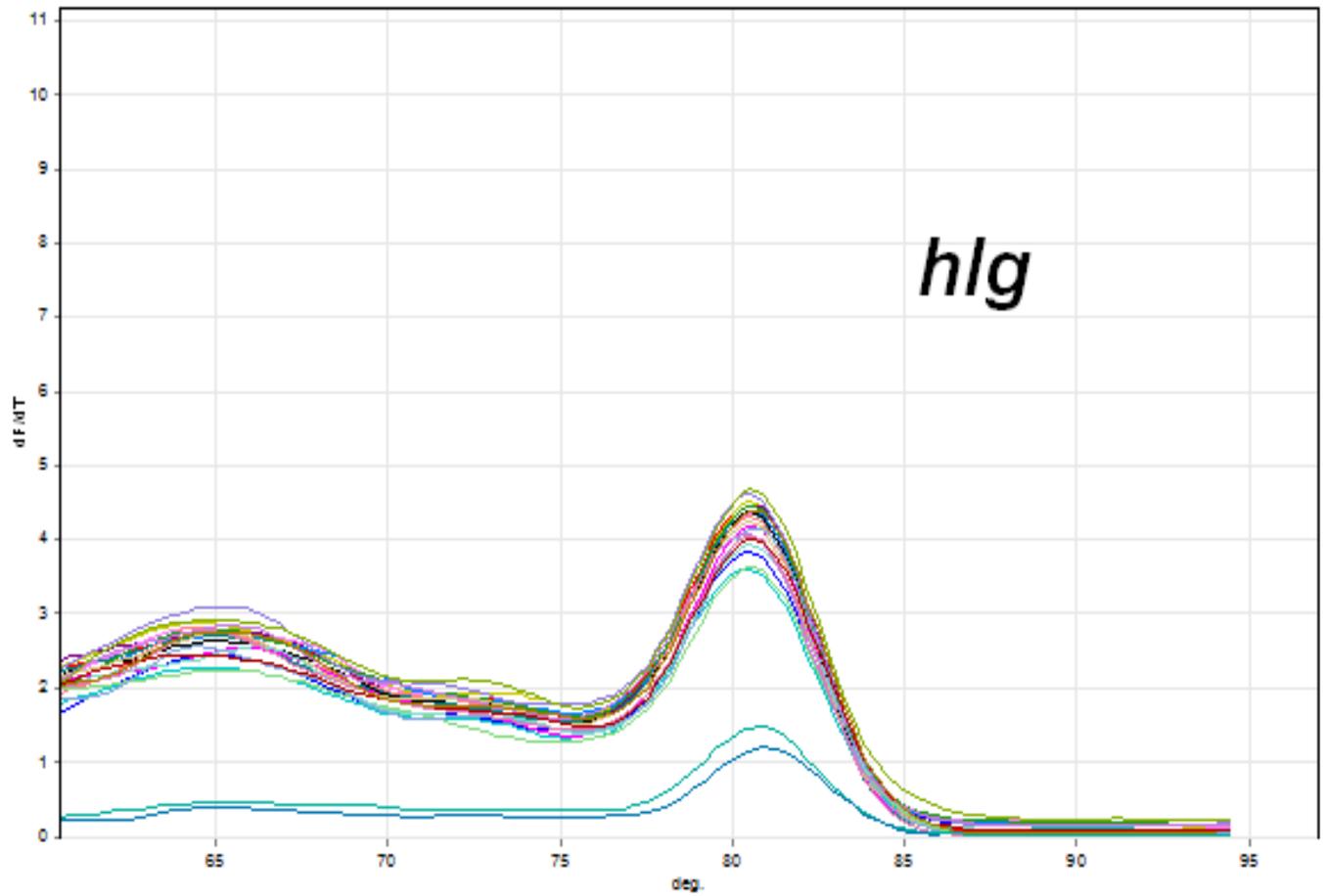


Figura 9. Curva de fusión (Melting point) de la corrida del gen *hlg*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

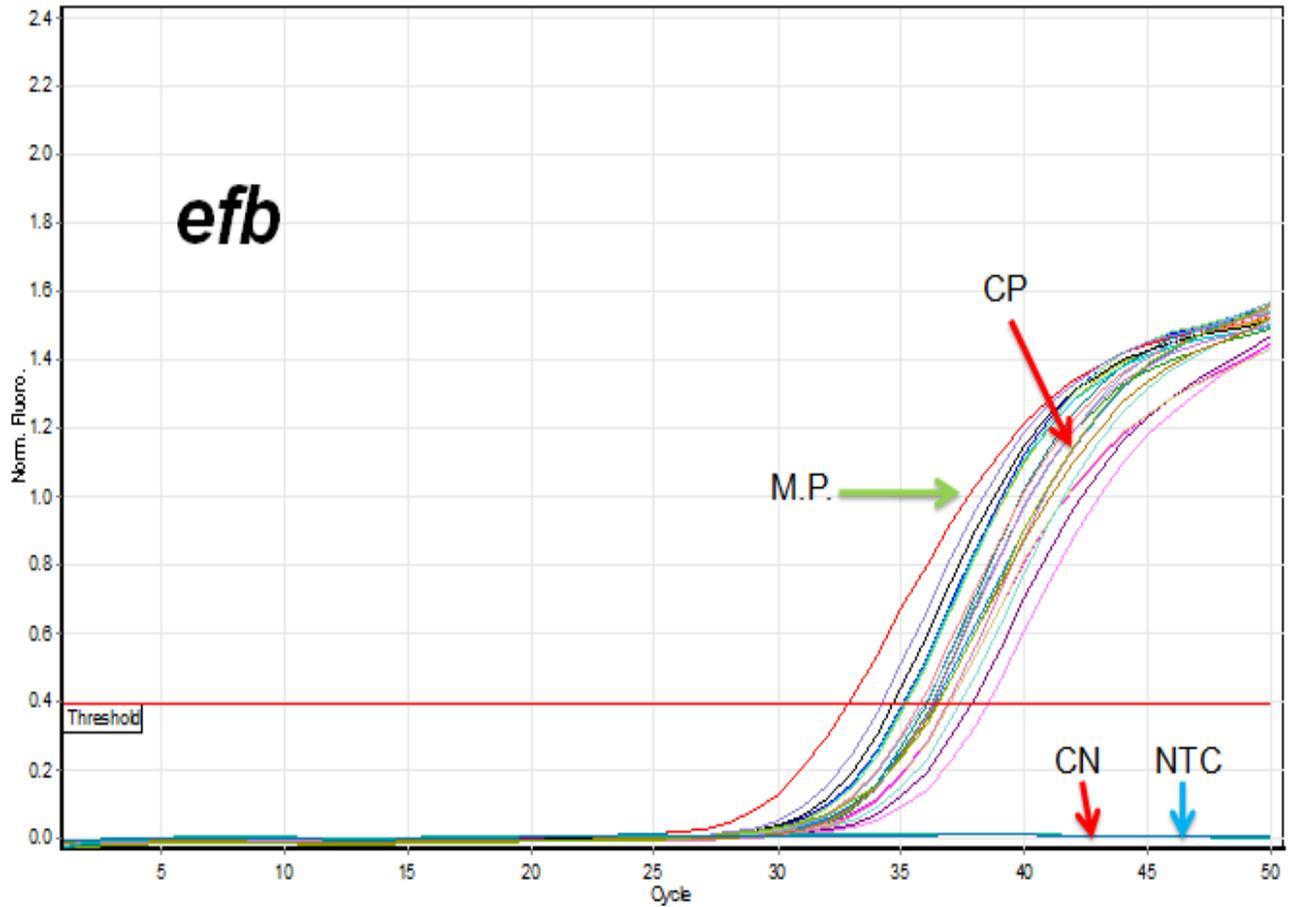


Figura 10. Detección de la expresión del gen *efb* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBER® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado; Control Positivo = *S. aureus* ATCC 25923, Control Negativo = *S. epidermidis* ATCC 35984.

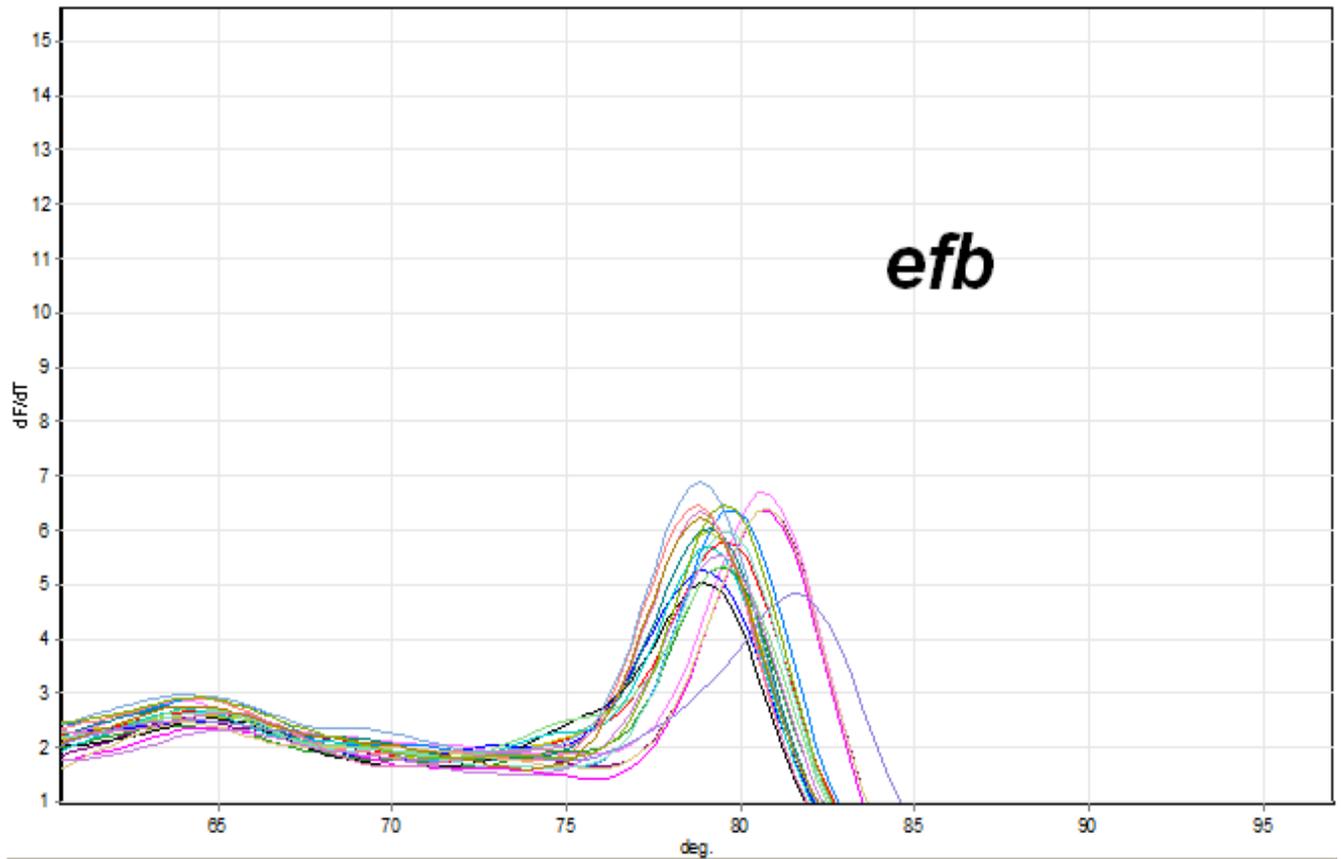


Figura 11. Curva de fusión (Melting point) de la corrida del gen *efb*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

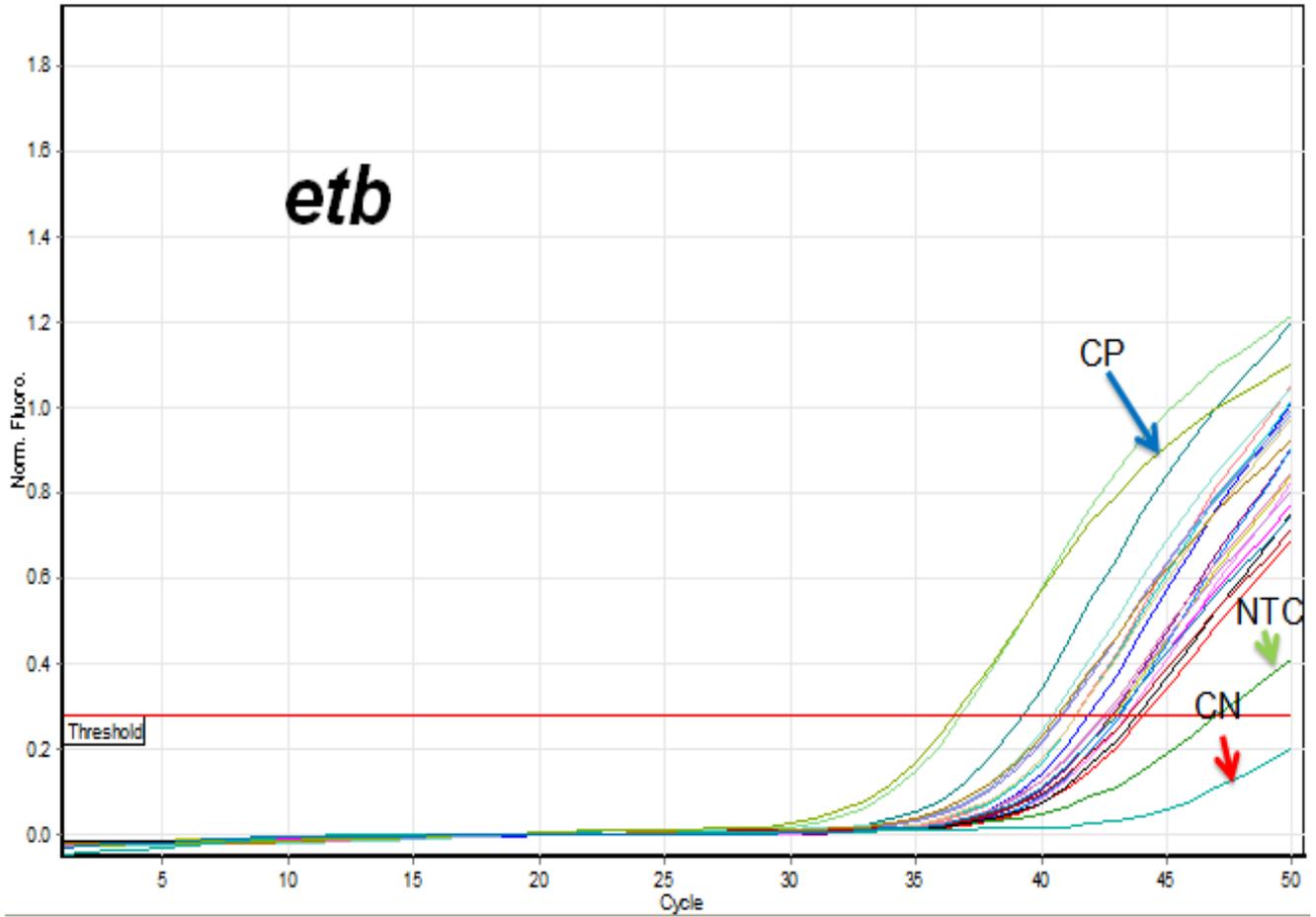


Figura 12. Detección de la expresión del gen *etb* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBER® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado; Control Positivo = *S. aureus* ATCC 25923, Control Negativo = *S. epidermidis* ATCC 35984.

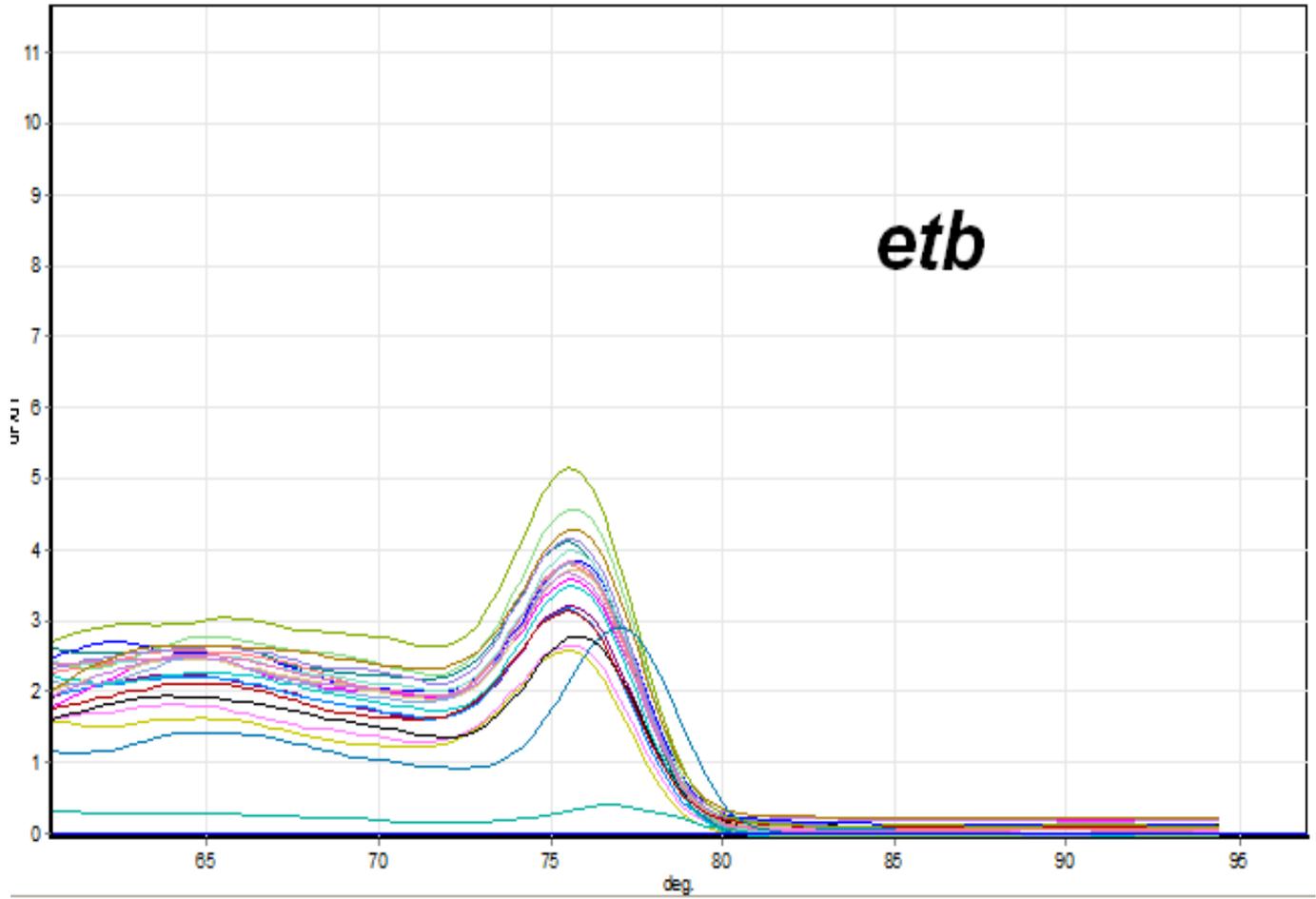


Figura 13. Curva de fusión (Melting point) de la corrida del gen *etb*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

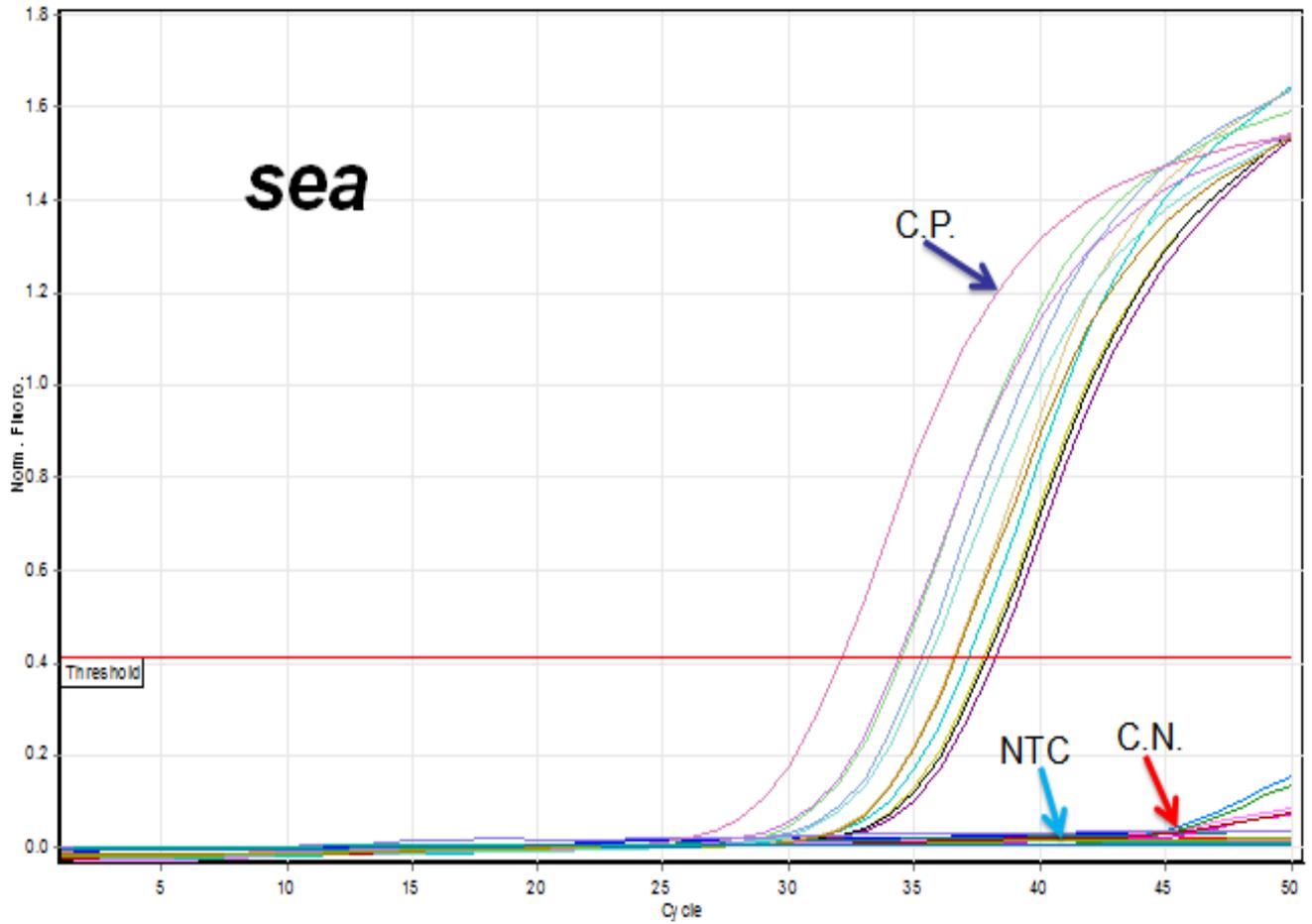


Figura 14. Detección de la expresión del gen *sea* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBER® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado; Control Positivo = *S. aureus* ATCC 25923, Control Negativo = *S. epidermidis* ATCC 35984.

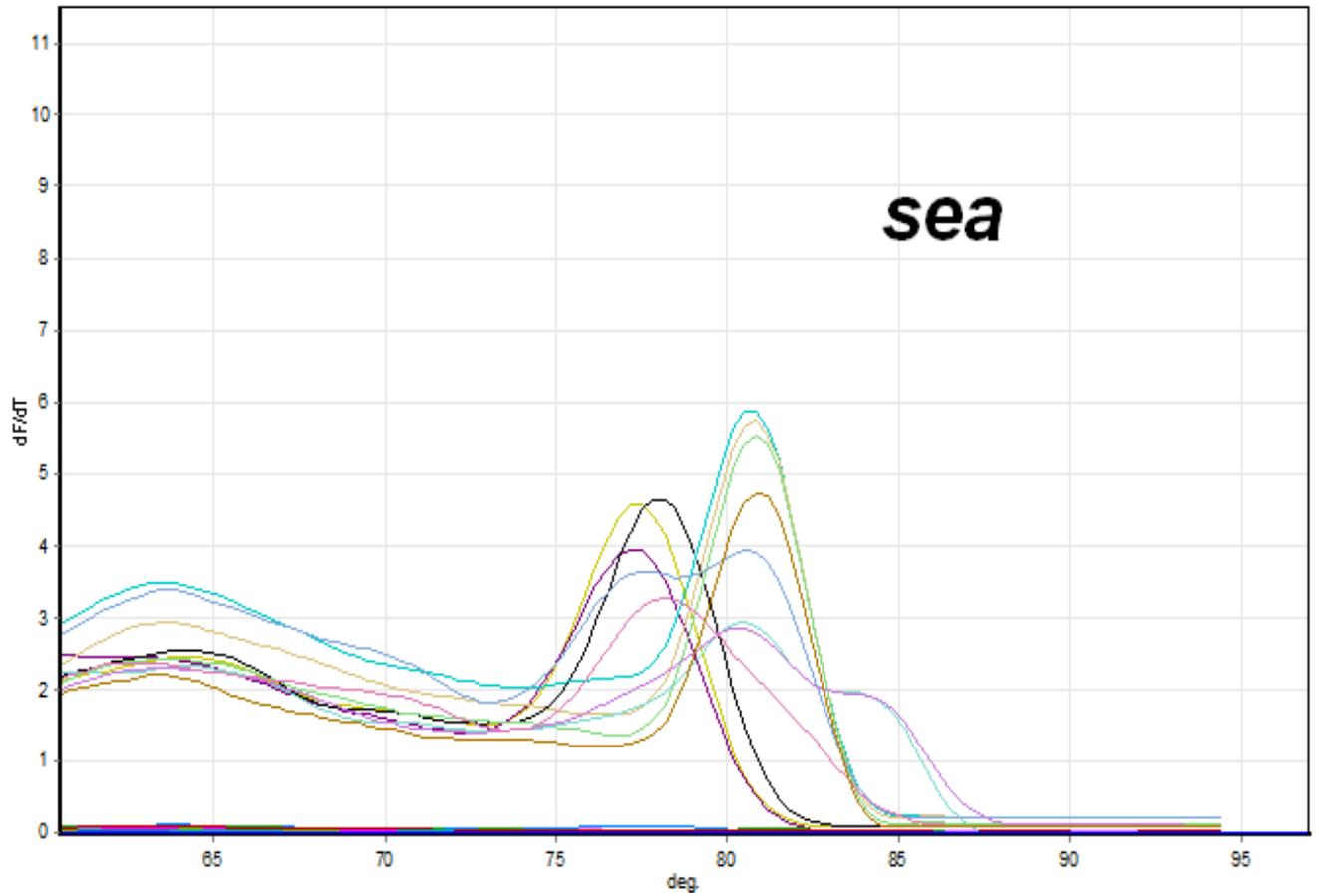


Figura 15. Curva de fusión (Melting point) de la corrida del gen sea. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

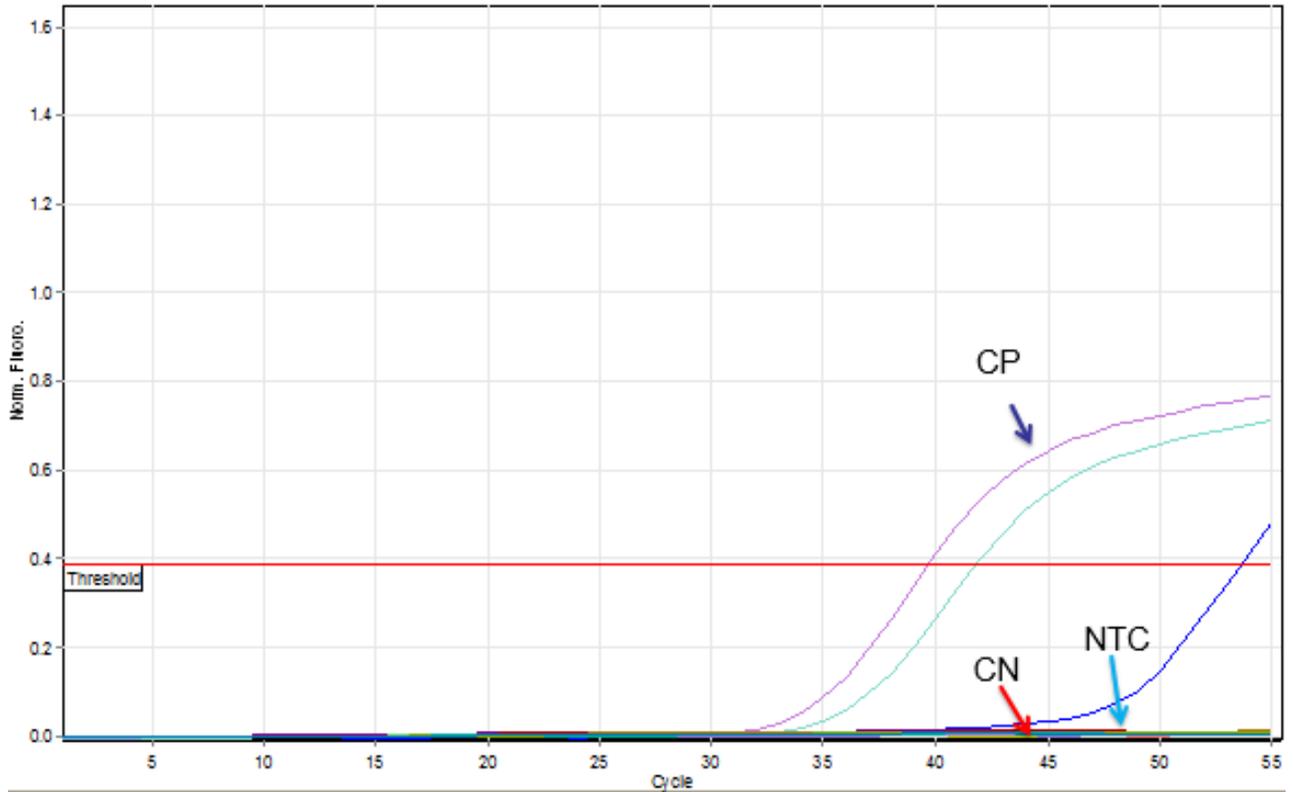


Figura 16. Detección de la expresión del gen *arcA* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBER® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado; Control Positivo = *S. aureus* ATCC 25923, Control Negativo = *S. epidermidis* ATCC 35984.

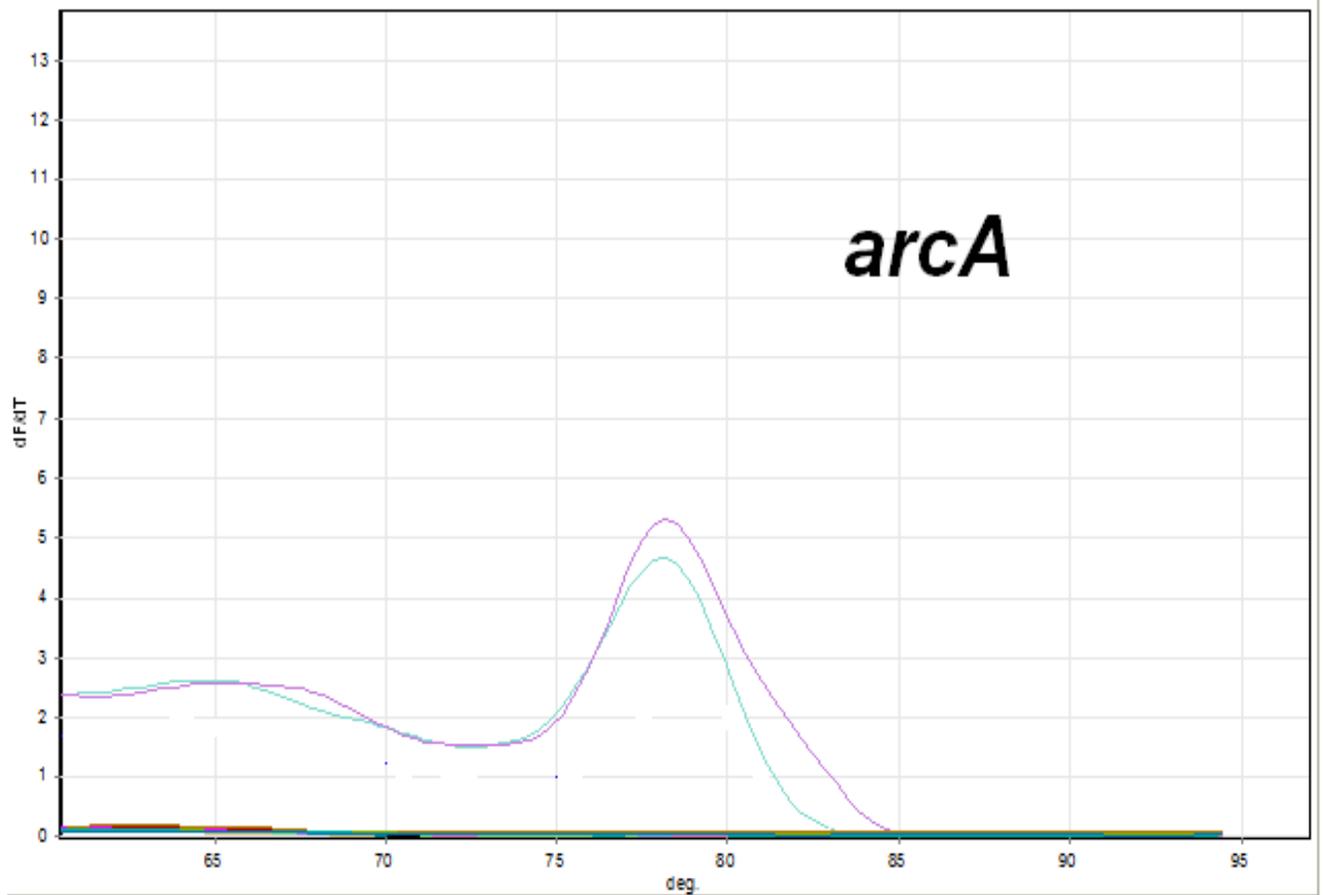


Figura 17. Curva de fusión (Melting point) de la corrida del gen *arcA*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.



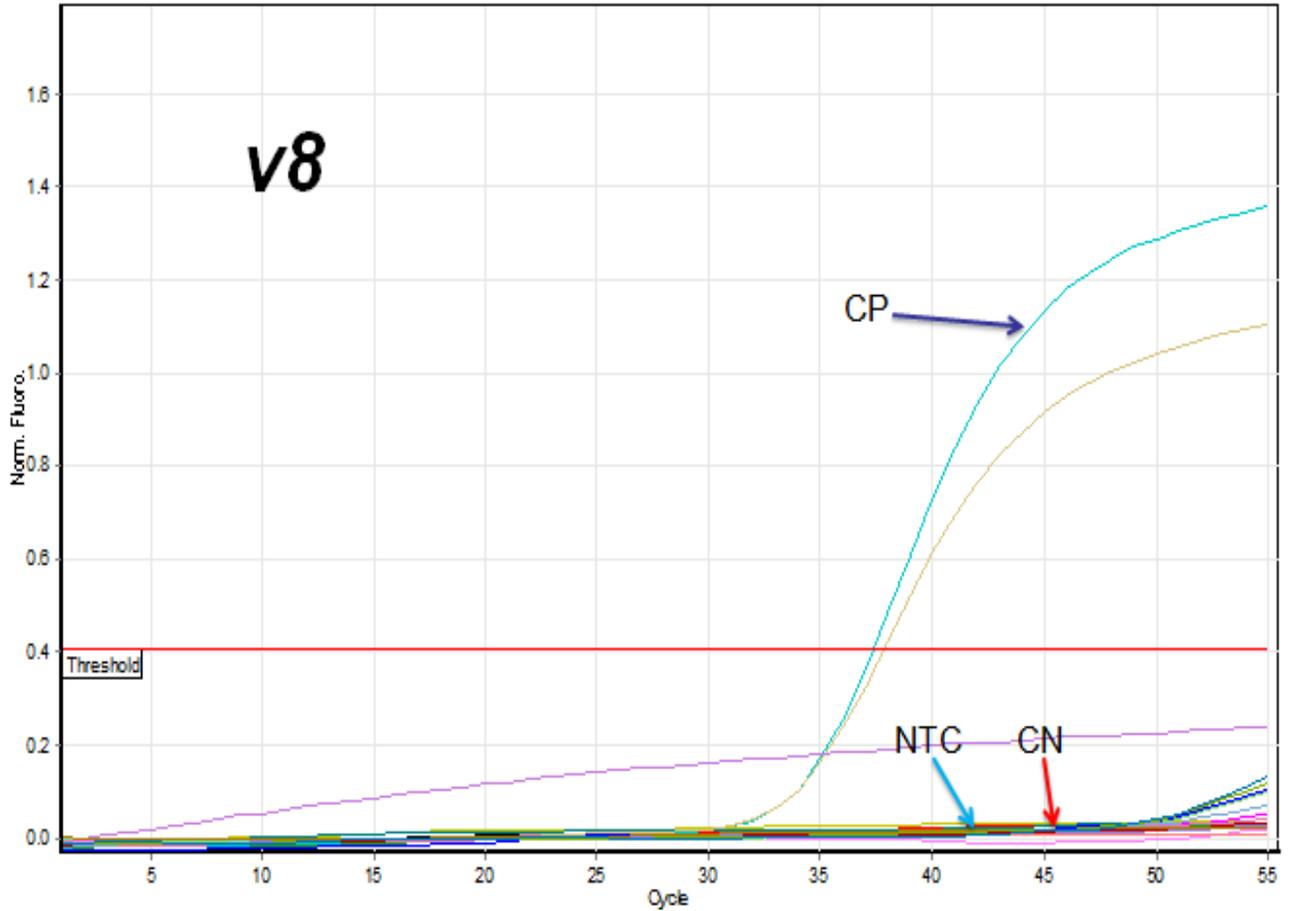


Figura 18. Detección de la expresión del gen *v8* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBER® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado; Control Positivo = *S. aureus* ATCC 25923, Control Negativo = *S. epidermidis* ATCC 35984.

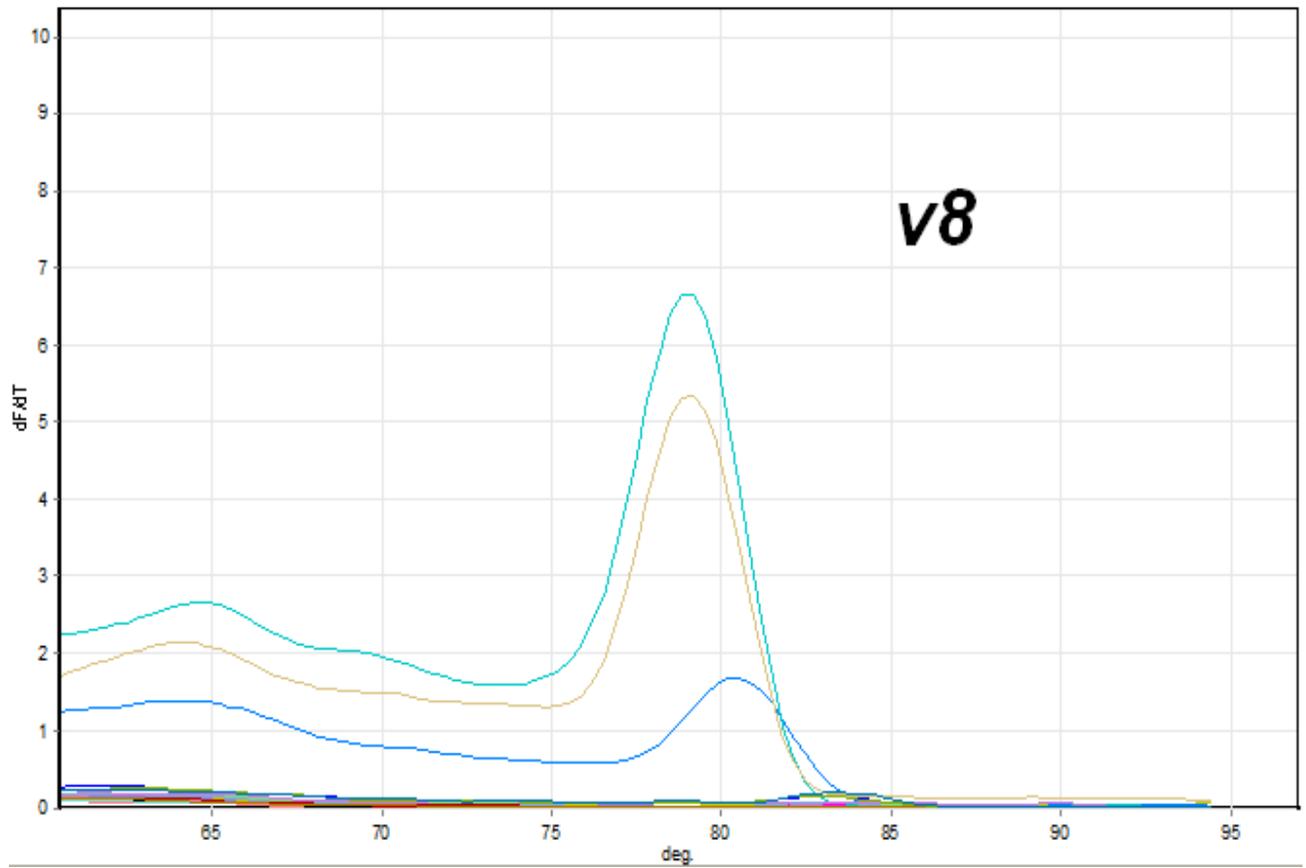


Figura 19. Curva de fusión (Melting point) de la corrida del gen v8. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

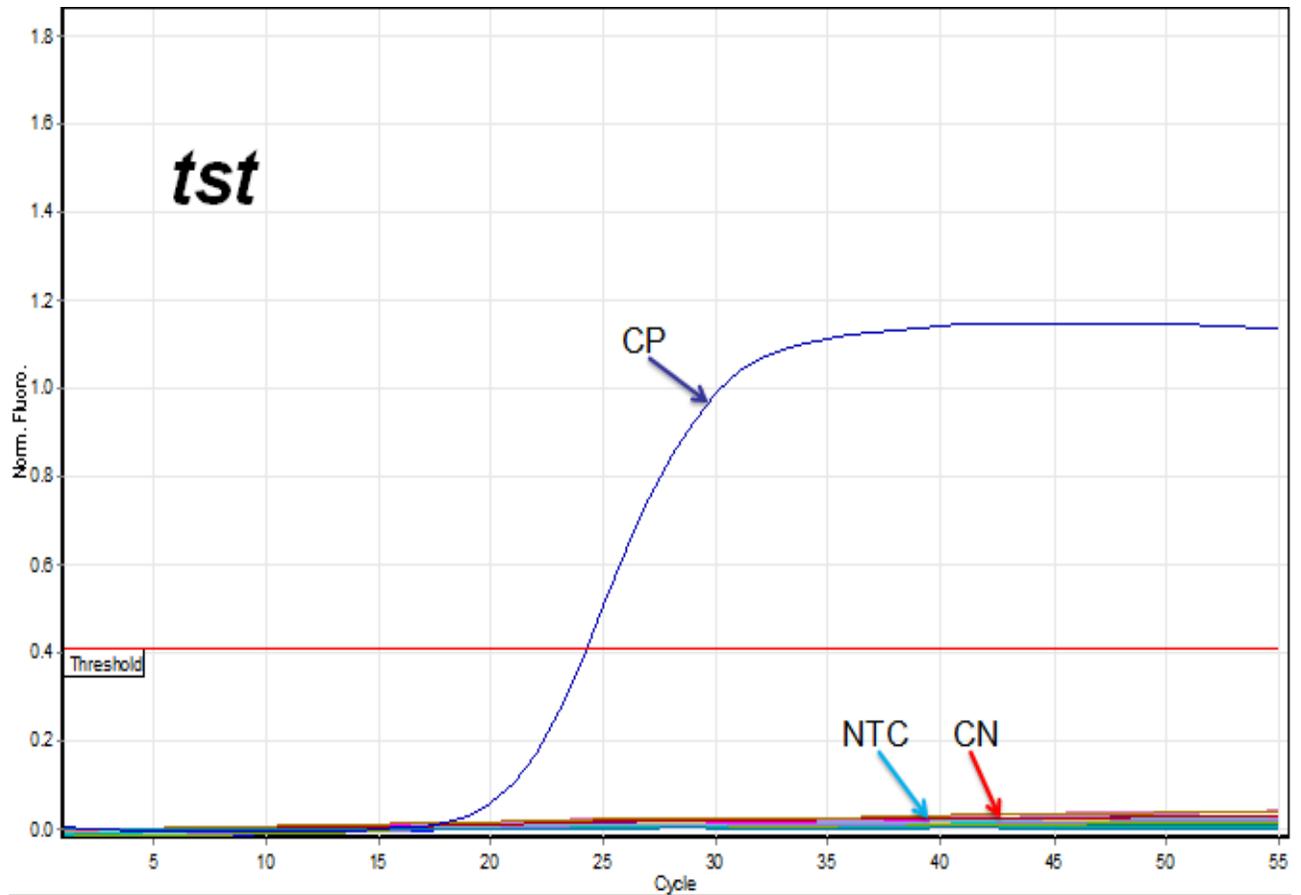


Figura 20. Detección de la expresión del gen *tst* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBER® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado; Control Positivo = *S. aureus* ATCC 25923, Control Negativo = *S. epidermidis* ATCC 35984.

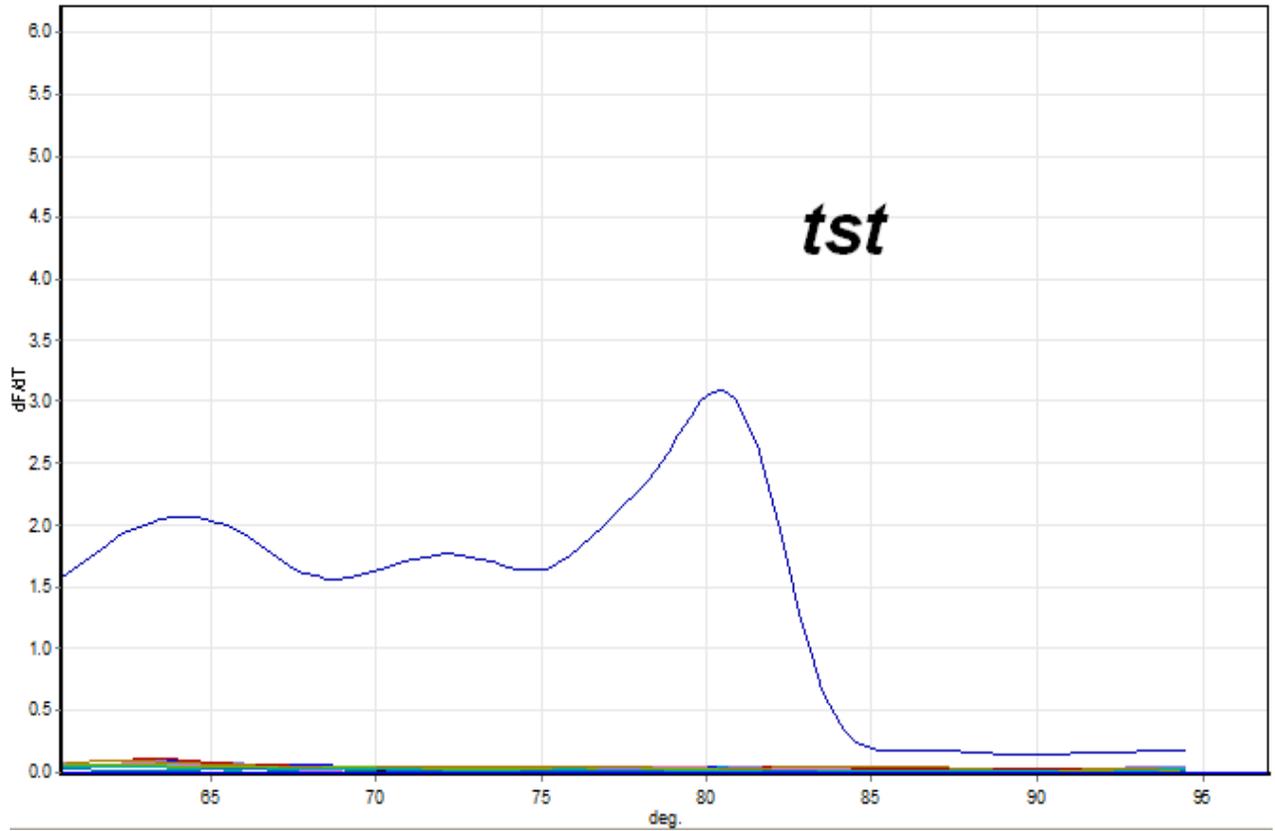


Figura 21. Curva de fusión (Melting point) de la corrida del gen *tst*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

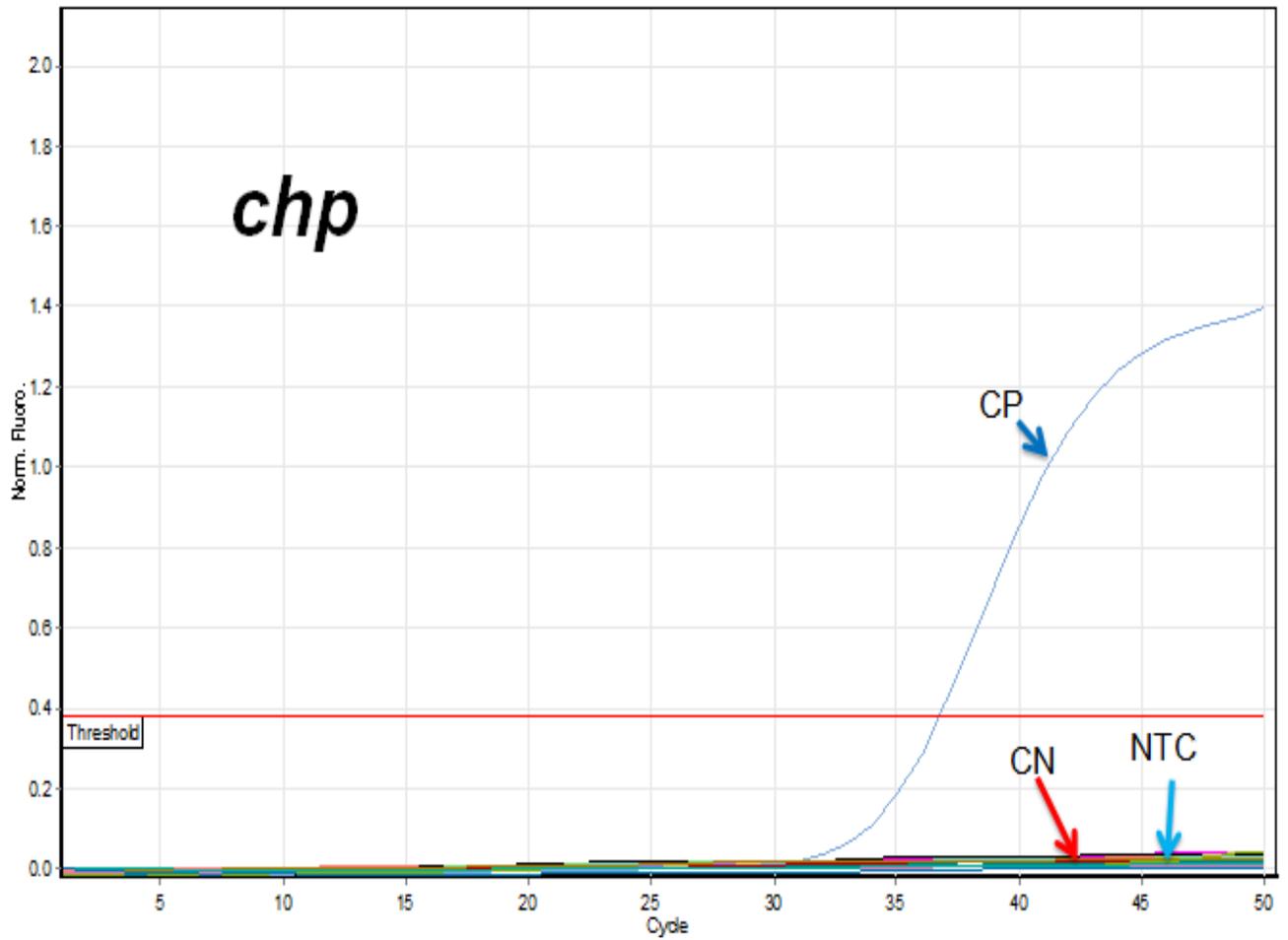


Figura 22. Detección de la expresión del gen *chp* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBER® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado; Control Positivo = *S. aureus* ATCC 25923, Control Negativo = *S. epidermidis* ATCC 35984.

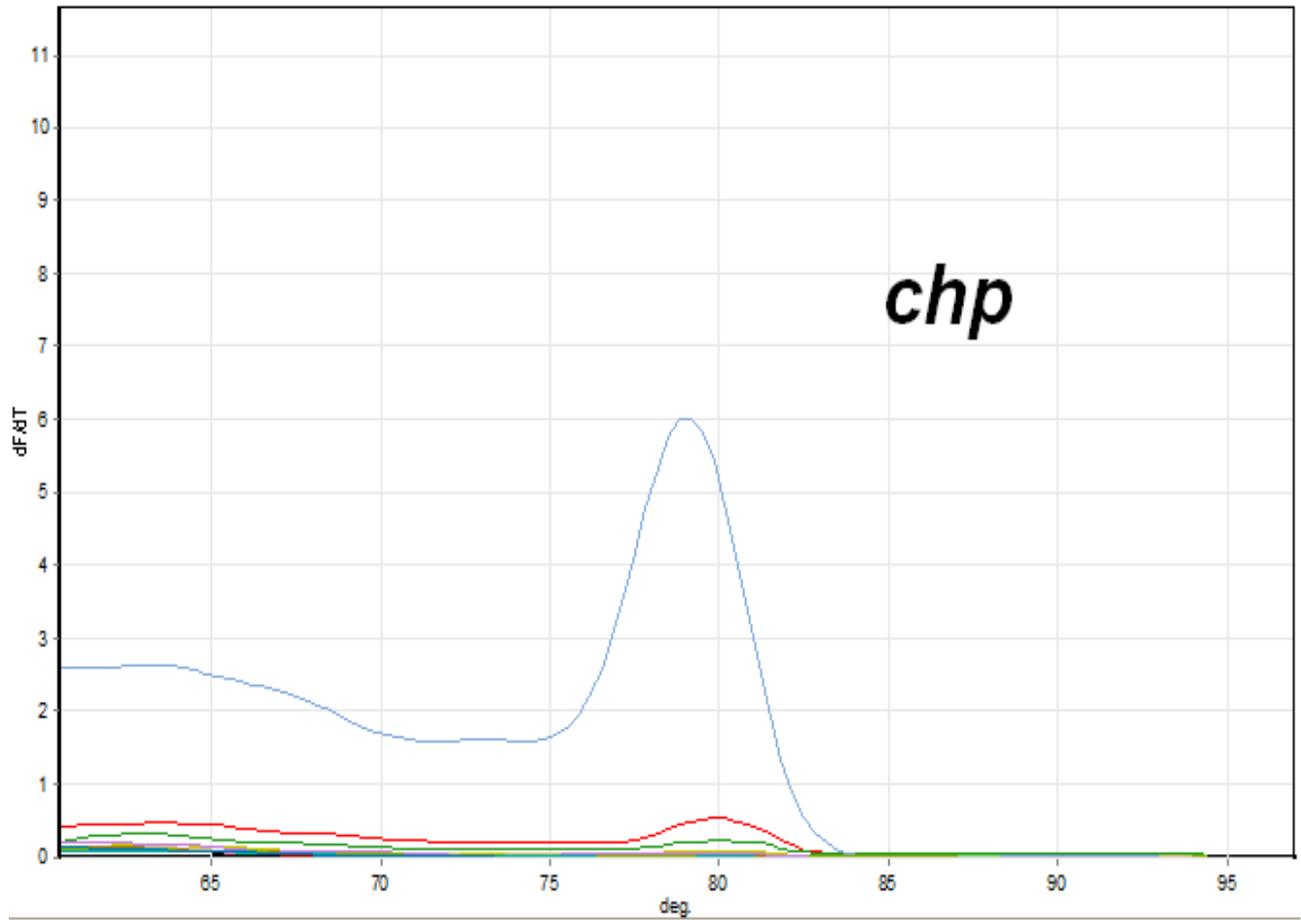


Figura 23. Curva de fusión (Melting point) de la corrida del gen *chp*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta que los productos inespecíficos.

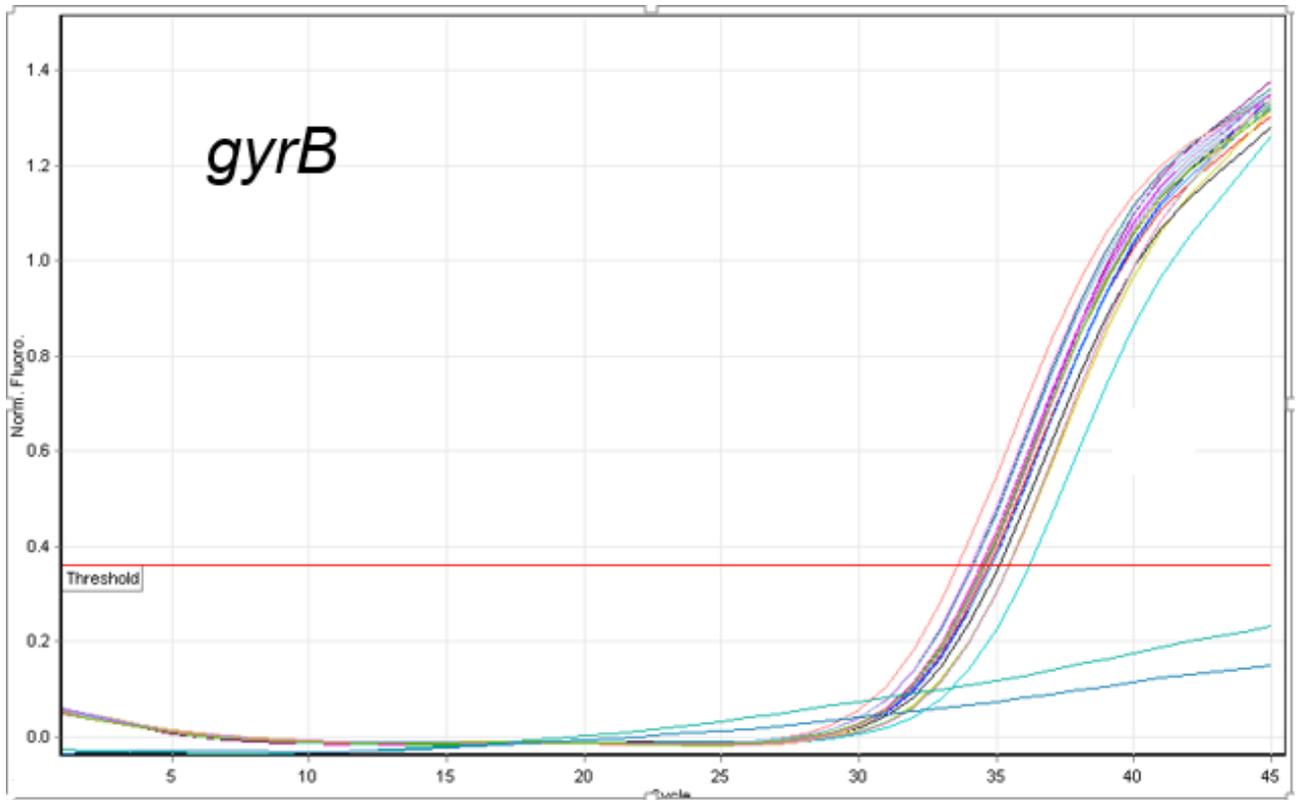


Figura 24. Detección de la expresión del gen *gyrB* en las cepas de *S. aureus* por PCR en Tiempo Real, utilizando SYBER® Green I. La lectura se realizó en el canal verde. NTC = No Control Templado; Control Positivo = *S. aureus* ATCC 25923, Control Negativo = *S.epidermidis* ATCC 35984

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

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

La asociación de los perfiles de expresión de los genes que codifican toxinas entre las cepas de *S. aureus* idénticas (PFGE), demostró la ausencia de expresión del gen *arcA* en dos pares de las cepas idénticas (Cuadro 9), mientras que el gen *chp* no se expresó en ninguno de los tres pares de las cepas de *Staphylococcus aureus*, (cuadro 9).



| # Cepa | Genes | | | | | | | | | | | | | | | | PFGE | | |
|--------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|---------------------------|----|
| | sea | seb | sec | sed | see | seg | seh | sei | sej | tst | eta | Etb | efb | hlg | chp | arcA | | | V8 |
| 22 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | Idénticas | |
| 32 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | | |
| 66 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | | |
| 59 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | Idénticas | |
| 77 | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | | |
| 79 | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | + | - | | |
| 82 | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | Cercanamente Relacionadas | |
| 11 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | | |
| 112 | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | | |
| 16 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - | - | - | Posiblemente Relacionadas | |
| 19 | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | | |
| 12 | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | | |
| 52 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | No Relacionadas | |
| 58 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | | |
| 73 | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | | |
| 75 | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | | |
| 76 | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | + | | |
| 93 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | | |
| 103 | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | | |
| 109 | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | | |
| 111 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | | |

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

Combinaciones de expresión de los genes que codifican toxinas en las cepas de *S. aureus*

En este estudio se encontraron 6 patrones (combinaciones) distintos de expresión de genes de toxinas en las 21 cepas de *S. aureus* estudiadas (cuadro 10), dentro de las cuales los patrones No. 1 conformado por 7 genes (*sea, seg, seh, sei, etb, efb, hlg*) se encontraron en el 39.13% (n=9) de las cepas y No. 2 conformados por seis genes (*seg, seh, sei, etb, efb, hlg*) se encontraron en el 38.09% (n= 8) de las cepas (Cuadro 10). También se encontraron otros patrones (patrón No. 3 y No. 4) con dos cepas distintas, en cada caso. Es importante mencionar que los genes *seg, seh, sei, etb, efb, hlg* se expresaron en todas las cepas de *S. aureus* estudiadas.

| N° Patron | Combinación de genes | N° | % |
|-----------|------------------------------------------------|----|-------|
| 1 | <i>sea, seg, seh, sei, etb, efb, hlg</i> | 9 | 39.13 |
| 2 | <i>seg, seh, sei, etb, efb, hlg</i> | 8 | 38.09 |
| 3 | <i>sea, seg, seh, sei, etb, efb, hlg, arcA</i> | 1 | 4.76 |
| 4 | <i>sea, seg, seh, sei, etb, efb, hlg, V8</i> | 1 | 4.76 |
| 5 | <i>seg, seh, sei, tst, etb, efb, hlg</i> | 1 | 4.76 |
| 6 | <i>seg, seh, sei, efb, hlg</i> | 1 | 4.76 |

Cuadro 10. Diferentes patrones de expresión de genes de toxinas en las cepas de *S. aureus*.



DISCUSIÓN

Análisis de Pacientes con Insuficiencia Renal Crónica

En este estudio se analizaron un total de 21 cepas previamente aisladas de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica (IRC) con infección en el sitio de inserción del catéter de hemodiálisis tipo mahurkar, en donde el 62% (n= 13) fueron hombres y el 38% (n=8) mujeres (Gráfica 1), las edades de los pacientes oscilaron entre los 17 y 72 años de edad, la frecuencia más alta de edad se encontró dentro del intervalo 17 a 28 años (Gráfica 2) con un 33.33% (n=7), Ornelas en el 2013 realizó un estudio donde analizó 112 cepas de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica reportando una alta incidencia de infección por *S. aureus* en hombres en el sitio de inserción, además de reportar que el intervalo entre las edades de 20 a 29 años fue una de las más elevadas, así mismo existen reportes en Japón en donde dos tercios del total de los pacientes con IRC se encuentran por encima de los 60 años, la mitad de estos poseen 65 años (Kurokawa *et al.*, 2002). En los Estados Unidos 24 millones de personas padecen Diabetes Mellitus y más de 180 mil de estos pacientes poseen IRC (United States Renal Data System), a diferencia de México, en donde la tasa de pacientes con Diabetes Mellitus es desconocida, sin embargo existe una estimación de incidencia de los pacientes con IRC, la cual se reporta en 377 casos por Millón (Mendez *et al.*, 2010) demostrando que la IRC ocurre a cualquier edad. Las enfermedades Renales como la IRC son de alta importancia a nivel mundial, y la región latinoamericana no está exenta de ello, los altos valores y la prevalencia de este tipo de enfermedad renal se deben a patologías que se encargan de la pérdida lenta e irreversible del filtrado glomerular (Obrador *et al.*, 2012), tal es el caso de la Diabetes Mellitus (DM). Esta patología según la OMS muestra que aproximadamente 150 millones de personas en el mundo padecen DM, estimando que para el 2025 esta cifra pueda duplicarse (Wilde, 2004). Se ha descrito que la DM es la responsable del 50% de los casos de IRC (Fundación Mexicana del Riñón 2013); sin embargo pese a que la literatura muestra que la DM es la responsable de la mayoría de casos de IRC, en este trabajo la causa de la IRC del 19.04% de los pacientes analizados fue la DM. Se ha descrito



que la Hipertensión Arterial (HTA) y la Glomérulonefritis (GN) son las segundas patologías responsables de la IRC (Fundación Mexicana del Riñón 2013). En este trabajo la HTA fue la responsable del 9.52% del origen de la IRC en estos pacientes, y la GN del 28.57%, sin embargo el origen de la IRC en el 42.85% de los pacientes no se logró determinar. Existen reportes de que el 8.8% de la etiología de la IRC no ha sido determinada (Kjellstrand *et al.*, 1992).

Los elevados índices de IRC en el mundo muestran un costo elevado para mantener la vida del paciente estable, por ejemplo Estados Unidos en el 2005 gastó cerca de 32 millones de dólares en la atención de pacientes con IRC al someterlos a diálisis, hemodiálisis o trasplantes renales (United States Renal Data System 2007). En México la IRC ocupa el décimo lugar de mortalidad entre los mexicanos con una incidencia de 100 a 400 casos por millón de habitantes, además de que se estima que el uso de diálisis y hemodiálisis consume el 7% del presupuesto total destinado a la atención médica del año 2012 (Seguro de Enfermedades y Maternidad 2013).

Contaminación de los Catéteres de Hemodiálisis por *S. aureus*

El empleo del catéter de hemodiálisis como un sustituto de la función filtradora del riñón son de alta utilidad clínica ya que facilita un rápido acceso al torrente sanguíneo, sin embargo debido a que *Staphylococcus aureus* es una bacteria que forma parte de la flora nasal del hombre (Vaden, 1999), los pacientes con catéter de hemodiálisis corren un elevado riesgo de adquirir una infección o autoinfección. (Bernardo *et al.*, 2004). Karneni y Hedayati en el 2007 reportaron que la incidencia bacteriana responsable de infecciones en catéteres de hemodiálisis se debe principalmente a bacterias Gram positivas, principalmente por *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativo. En este trabajo se realizó la identificación de *S. aureus* mediante el empleo de los marcadores cromosómicos *rRNA* (Fotografía 1) y *spa* (Fotografía 2). Se ha descrito que el gen *spa* es el responsable de la formación de la proteína A, que forma parte de la cápsula de esta bacteria, mientras que el gen *rRNA* codifica la proteína ribosomal (McCarthy *et al.*, 2010; Nashev *et al.*, 2004). En este trabajo la identificación de *rRNA* y *spa* fue del 100% para todas las cepas de *Staphylococcus aureus*.



Determinación de la expresión de los genes que codifican toxinas por PCR en tiempo Real (PCR-RT) en las cepas de *S. aureus*

Con el propósito de establecer la expresión de los genes que codifican toxinas, en este estudio se implementó un modelo de infección *in vitro* en epitelio reconstituido humano (RHE) en 21 cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones asociadas a los catéteres de pacientes de hemodiálisis.

Se obtuvo una alta variabilidad ya que no todas las toxinas de las cepas de *S. aureus* estudiadas fueron expresadas, sin embargo estas toxinas ya habían sido previamente identificadas en estudios anteriores. Dentro de la familia de las Enterotoxinas los genes expresados con mayor frecuencia fueron *seg* (Figura 2 y 3), *seh* (Figura 4 y 5) y *sei* (Figura 6 y 7) con el 100% (n= 21) (Cuadro 8), seguido de *sea* con el 52% (n=11) (Cuadro 8). Campbell y colaboradores en el 2008 realizaron un estudio en 56 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infecciones en piel en 11 centros de Estados Unidos y en 34 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes de África; Estos autores describieron los siguientes porcentajes de detección de los genes para las cepas obtenidas de 11 centros en Estados Unidos: *seg* (45%, n=25), *seh* (46%, n=26), *sei* (86%, n=46) y el gen *sea* (61%, n=34), mientras que las cepas colectadas de 7 centros distintos en Sur África mostraron las siguientes frecuencias; *seg* (82%, n=28), *seh* (62%, n=21), *sei* (100%, n=34) y *sea* (85%, n=29). Estos resultados sugieren que la frecuencia de los genes que codifican toxinas varía con respecto a la región; por lo que la frecuencia de la expresión de estos genes debería ser diferente. Al expresarse estos genes en el humano provocan el peristaltismo intestinal además de afectar el Sistema Nervioso Central y causar gastroenteritis (Gouloumes 1996; Dinges *et al.*, 2000).

El gen *hlg* se expresó en este estudio en un 100% de las cepas aisladas (n=21, Cuadro 8), mientras que Peacock y colaboradores en el 2002 encontraron que la frecuencia de el gen *hlg* fue del 100% en cepas aisladas de portadores sanos y un 99% (n=153) en cepas aisladas de pacientes con enfermedades invasivas. De la



misma manera Campbell y colaboradores en el 2008 encontraron una frecuencia del 100% en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infecciones en la piel provenientes de África y Estados Unidos. Este gen al ser expresado codifica para una proteína conocida como α toxina, que al ser secretada lisa los eritrocitos, linfocitos y plaquetas, además de provocar una vasoconstricción debido a la producción de tromboxano y prostaciclina, comprometiendo la vida del paciente finalizando con un edema pulmonar (Dinges *et al*, 2000).

En este estudio el gen *efb* se expresó también en el 100% de las cepas aisladas (n=21, Cuadro 8). Campbell y Colaboradores en el 2008 identificaron el gen *efb* en el 100% de las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infecciones en la piel provenientes de África y Estados Unidos, Peacock y colaboradores en el 2002 encontraron la presencia de este gen en un 60% de las cepas de pacientes sanos y un 68 % en cepas aisladas de pacientes con infecciones invasivas. Ornelas en el 2013 identificó *efb* en el 92.7% de las cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres y en el 100% de las cepas aisladas de narinas. El gen *efb* de *S. aureus* transcribe la proteína extracelular de unión al fibrinógeno que está en la superficie de las plaquetas, al unirse interfiere con la respuesta inflamatoria temprana, retrasando la cicatrización (Lee *et al.*, 2004; Shannon and Flock. 2004). Sin embargo se ha demostrado que los humanos producen anticuerpos para esta proteína (Olander, 2008).

El gen *etb* se expresó en el 95% de las cepas (n=20) aisladas de catéter de hemodiálisis. Campbell y colaboradores en el 2008 identificaron la presencia de *etb* en el 12% (n=3) y 47% (n=34) de las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infecciones en la piel provenientes de Estados Unidos y África, respectivamente. Mientras que Peacock y colaboradores en el 2002 identificaron solamente el 3% de las cepas (n=6) provenientes de portadores sanos, mientras que en las cepas aisladas de pacientes con infecciones invasivas el gen no fue detectado. El gen *etb* genera la formación de la toxina exfoliativa B, causante del síndrome Estafilocócico de la Piel Escaldada, provocando una dermatitis exfoliativa, la cual se caracteriza



por la formación de grandes ampollas. (Bailey *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1987; O' Toole *et al.*, 1987).

En este estudio el gen *arcA* se expresó en el 5% de las cepas (n=1) aisladas de catéteres de pacientes de hemodiálisis (Cuadro 8). Ornelas en el 2013 reportó la presencia de *arcA* en el 90.9% de cepas aisladas de catéter y en el 68.4% de las cepas aisladas de narinas. *arcA* es codificado por dos grupos de genes “*arc* y *app-3*”, el primero de estos activa la vía de la arginina diseminasa, la cual realiza una conversión de la L-arginina en CO₂, ATP y amoníaco que son importantes para la supervivencia en pH bajo y también para la inhibición de la respuesta inmune contra infecciones bacterianas; Todas las cepas de *Staphylococcus aureus* tienen un operón *arc* nativo que codifica para la ruta de la arginina diseminasa (Degnan *et al.*, 2000; Moncada & Higgs 1993; Pi *et al.*, 2009).

El gen *v8se* expresó en el 5% (n=1) de las cepas aisladas de catéter de los pacientes (Cuadro 8). Campbell y colaboradores en el 2008 identificaron la el gen *v8en* en el 75% y 85% de las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infecciones en la piel provenientes de Estados Unidos y África, respectivamente. En Reino Unido Peacock y colaboradores en el 2002 identificaron la presencia de *v8en* en el 94% de las cepas correspondientes a portadores sanos y en el 96% de cepas aisladas de pacientes con infecciones invasivas. Mc Gavin y cols. En 1997 reportaron que la V8 proteasa modifica la unión de fibronectina a *S. aureus*, por lo tanto, estas proteasas secretadas son de elevada importancia en la regulación post traduccional de la actividad de exoproteínas de *S. aureus*, además de modificar las proteínas del huésped en beneficio de las bacterias como la inactivación de los péptidos antimicrobianos (Chan *et al.*, 1998; Cheung *et al.*, 1994; Recsei *et al.*, 1985; Goguen *et al.*, 1995)



El gen *chp* no se expresó en las cepas aisladas de catéter de pacientes de hemodiálisis (Cuadro 8). Campbell y colaboradores en el 2008 identificaron este gen en el 100% de cepas provenientes tanto de Estados Unidos (n=56) como de África (n=34). El gen *chp* codifica para una proteína llamada CHIPS (Proteína inhibidora de la quimiotaxis de *Staphylococcus aureus*), la cual se encarga de la inhibición del quimiotaxismo de los neutrofilos (Hass *et al* 2004).

El gen *tst* no se expresó en las cepas de *S. aureus*. Peacock y colaboradores en el 2002 identificaron la presencia de *tst* en el 25% de las cepas de *S. aureus* provenientes de pacientes sanos y en el 30% en pacientes con infecciones invasivas. Mientras que Campbell y colaboradores en el 2008 identificaron la presencia de este gen en el 33% de cepas provenientes de Estados Unidos y en el 50% de cepas provenientes del Sur de África. El gen *tst* codifica la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1), suprime la quimiotaxis de los neutrofilos, induce la función supresora de los linfocitos T y bloquea el sistema retículo endotelial. Al actuar como súper antígeno estimula la liberación de citocinas, prostaglandinas y leucotrienos los cuales son los causantes de la sintomatología (Dinges *et al.*, 2000; Herzer 2001). El síndrome del shock tóxico se caracteriza por causar fiebre alta, dolor de cabeza, vómito, diarrea, mialgias, meningitis, faringitis, conjuntivitis, vaginitis, edema, entre otros; Cuando la toxina TSST-1 es expresada en adultos puede ocasionar dificultad para respirar, coagulación intravascular y falla renal.



Combinaciones de expresión de los genes que codifican toxinas en las cepas de *S. aureus* y asociación con los patrones de restricción del ADN cromosómico por PFGE

En este estudio se encontraron 6 patrones (combinaciones) distintos de expresión de genes de toxinas en las 21 cepas de *S. aureus* estudiadas (cuadro 10), dentro de las cuales los patrones No. 1 conformado por 7 genes (*sea*, *seg*, *seh*, *sei*, *etb*, *efb*, *hlg*) y No. 2 conformados por seis genes (*seg*, *seh*, *sei*, *etb*, *efb*, *hlg*) se encontraron en el 38.09% (n= 8) de las cepas (Cuadro 10). Estos resultados reflejan que durante el modelo de infección *in vitro* del epitelio reconstituido humano las cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres de pacientes de hemodiálisis presentaron diferentes perfiles de expresión de los genes de toxinas, por lo que suponemos que durante la patogénesis de la enfermedad las bacterias requieren de la expresión de diferentes tipos de toxinas, y más aún considerar que el 100% de las cepas expresó al mismo tiempo los genes *seg*, *seh*, *sei*, *etb*, *efb* y *hlg* (Cuadro 10).

Por otro lado el análisis de los patrones de restricción del ADN cromosómico de las cepas de *S. aureus* por PFGE demostró la existencia de dos pares de cepas idénticas entre sí (cepa 22 y 32 y cepa 59 y 79; Cuadro 9), además de otras tres cepas también iguales entre sí (cepas 77, 79 y 82; Cuadro 9). Estos resultados demuestran que probablemente la contaminación de los catéteres de estos pacientes por estas cepas pudo ser debida por el personal médico que manipula los equipos de hemodiálisis durante su asistencia a este servicio, por lo que se recomienda incrementar las medidas higiénicas y de desinfección, tanto del personal, como de las máquinas.



CONCLUSIONES

- En este estudio se demostró que durante la infección *in vitro* del epitelio reconstituido humano las cepas de *S. aureus* fueron capaces de expresar diez genes que codifican toxinas.
- Las cepas de *S. aureus* presentaron diez distintos patrones de expresión de genes de toxinas durante el modelo de infección, dentro de los cuales los genes *seg*, *seh*, *sei*, *etb*, *efb* y *hlg* se expresaron al mismo tiempo en todas las cepas estudiadas.
- Del análisis del DNA cromosómico por PFGE demostró la existencia de cepas que provenían de la misma clona, lo que probablemente se debió a contaminación por el personal médico que manipula las máquinas de hemodiálisis durante su asistencia al servicio.



LITERATURA CITADA

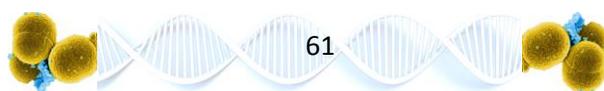
1. Aguinaga A, del Pozo JL. 2011. Infección asociada a catéter en hemodiálisis: diagnóstico, tratamiento y prevención. *NefroPlus* 1-10.
2. Allon M. 2004. Dialysis catheter-related bacteremia: Treatment and Propylaxis. *Am J Kidney Dis* 5:779-791.
3. Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1818-1824.
4. Archer GL, Climo MW. 1994. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 38:2231-2237.
5. Bailey CJ, Deazavedo J, and Arbuthnott JP. 1980. A comparative study of two serotypes of epidermolytic toxins from *Staphylococcus aureus*. *Biochim. Biophys Acta* 624:111–120
6. Balaban N, Goldkorn T, Gov Y, Hirshberg MN, Koyfman H, Matthews R, Nhan RT, Singh B and Uziel O. 2001. Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNAIII-activating protein (TRAP). *J Biol Chem* 276:2658–2667
7. Bannerman, TL 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. A: *Manual of Clinical Microbiology*. 8 Ed. Editor. P.R. Murray. ASM Press, Washington D.C. (EE.UU)
8. Bernardo D, Juan J, Soto T, Lazzeri S, Portillo S. 2004. El *Staphylococcus aureus* en la hemodiálisis albergue y travesía. Universidad Nacional del Noroeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Unidad Renal Corrientes-Gambro Healthcare.
9. Brosnahan AJ, Merriman JA, Salgado-Pabón W, Ford B, Schlievert PM. 2013. *Enterococcus faecalis* Inhibits Superantigen Toxic Shock Syndrome Toxin-1-Induced Interleukin-8 from Human Vaginal Epithelial Cells through Tetramic Acids. *PLoS ONE* 10.1371, journal:0061255



10. Bustos JM, Hamdam AP, Gutiérrez MC. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Biomed* 17:287-305.
11. Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson SL, Bae I, Stryjewski ME, Federspiel JJ, Tonthat GT, Rude TH, Barriere SL, Corey R, and Fowler VG. 2008. Genotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a Multinational Trial of Complicated Skin and Skin Structure Infections. *J Clin Microbiol* 46:678–684
12. Centro Nacional de Trasplantes. México 2013. Disponible en: http://www.cenatra.salud.gob.mx/interior/trasplante_estadisticas.html
13. Chan PF, and Foster SJ. 1998. Role of SarA in virulence determinant production and environmental signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriology*. 180:6232–6241
14. Cheung, AL, and Projan SJ. 1994. Cloning and sequencing of *sarA* of *Staphylococcus aureus*, a gene required for the expression of *agr*. *J Bacteriol* 176:4168–4172.
15. Degnan, BA, Fontaine MC., Doebereiner AH, Lee JJ, Mastroeni P, Dougan G, Goodacre JA & Kehoe MA. 2000. Characterization of an isogenic mutant of *Streptococcus pyogenes* Manfredo lacking the ability to make streptococcal acid glycoprotein. *Infect Immun* 68:2441–2448.
16. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M. 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus species*: frequency of occurrence and anti-microbial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, the Western Pacific region for the SENTRY antimicrobial surveillance program 1997-1999. *Clin Infect Dis* 32: S114-S132.
17. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA & other authors 2006. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 36:7731–7739.
18. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13:16-34.



19. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 13:16-34.
20. Donland, RM. 2001. Biofilm formation: A clinical relevant microbiologic process. Clin Infect Dis 33:1387-1392.
21. Fasola EL, Fasching CF & Peterson L.R. 1995. Molecular correlation between in vitro and in vivo activity of beta-lactam and beta-lactamase inhibitor combinations against methicillin-resistant in *Staphylococcus aureus* J Lam Clin Med 125:200-211.
22. Fundación Mexicana del Riñón. 2013. Disponible en: www.funderenal.org.mx
23. Goguen, JD, Hoe NP, and Subrahmanyam YV. 1995. Proteases and bacterial virulence: a view from the trenches. Infect. Agents Dis.4:47-54
24. Gouloumes C, Bes M, Renand F, Lina B, Reverdy ME, Brun, Y, Fleurette J. 1996. Phenotypic and genotypic (pulsed-field gel electrophoresis) characteristics of enterotoxin A-producing *S. aureus* strains. Res Microbiol 147: 263-271
25. Guerra J, Sánchez I. 1997. *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina en el Hospital Carrión. Boletín de la Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales- SPEIT 6:40.
26. Hartman BJ & Tomas A. 1984. Low-affinity penicillin binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 158:513-516.
27. Hass JC, Veldkamp KE, Peschel A, Weerkamp F, Willem JB, Wamel V, Heezius JM, Poppelier JG, Kok PM, Kessel V, Strijp AG. 2004. Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus*, a Bacterial Antiinflammatory Agent. JEM 199: 687- 695.
28. Herzer CM. 2001. Toxic shock syndrome: broadening the differential diagnosis. J Am Board Fam Pract 14:131-6.
29. Hoen B, Kressler M, Hestin D, Mayeux D. 1995. Risk factors for bacterial infections in chronic hemodialysis adults patients: a multicenter prospective survey. Nephrol Dial Transplant 10: 377-381.
30. IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social). 2011. Disponible en: <http://www.imss.gob.mx/estadisticas/dis/Pages/default.aspx>



31. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Prevalence estimates of diabetes mellitus (DM), 2030. Disponible en <http://diabetesatlas.org/content/prevalence-estimates-diabetes-mellitus-dm-2030>
32. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR and Rozee KR. 1991. Detection Genes for Enterotoxins, Exfoliative Toxins, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase Chain Reaction. J Clin Microbiol 29:426-430.
33. Kanafani ZA, Fowler VG. 2006. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. Enferm Infecc Microbiol Clin 24:182-93.
34. Kaplowitz LG, Comstock JA, Landwehr DM, Dalton HP, Mayhall CG. 1988. Prospective study of microbial colonization of the nose and skin and infection of the vascular access site in hemodialysis patients. J Clin Microbiol 26:1257-1262.
35. Katneni R, Hedayati SS. 2007. Central venous catheter-related bacteremia in chronic hemodialysis patients: epidemiology and evidence-based management. Nat Clin Pract Nephrol 3:256-66.
36. Kjellstrand C, Madrenas J, Solez K. 1992. Pronóstico y tratamiento de la insuficiencia renal aguda. Nefrología 12: 249-266.
37. Kurokawa K, Nangaku M, Saito A, 2002. Current issues and future perspectives of chronic renal failure. J Am Soc Nephrol 13: 53-56.
38. Lee CY, Schmidt JJ, Johnson-Winegar AD, Spero L, and Landolo JJ. 1987. Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol 169:3904–3909
39. Lee LY, Liang X, Höök M, Brown EL. 2004. Identification and characterization of the C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen- binding protein (Efb). J Biol Chem 279:50710-6.
40. Marrack P and Kappler J. 1990. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. Science 248:705–711.
41. Marschall J. 2008. Catheter-associated bloodstream infections: Looking outside of the ICU. Am J Infect Control 36:S172;5-8.



42. McCarthy A, Lindsay JA. 2010. Research article Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. BMC Microbiol 10:173.
43. McGavin MJ, Zahradka C, Rice K, and Scott JE. 1997. Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. Infect Immun 65:2621–2628.
44. Miranda N. 2011. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. Bol Med Hop InfantMex 68:1665
45. Moncada S & Higgs A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med 329:2002–2012.
46. O'Toole PW and Foster TJ. 1987. Nucleotide sequence of the epidermolytic toxin A gene of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 169:3910–3915.
47. Obrador VG, Bourlón DM, Gómez SM, Laris GA, Contreras ED, Guías Latinoamericanas de Práctica Clínica sobre la Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de los Estadios I – 5 de la Enfermedad Renal Crónica
48. Ogston A. Micrococcus poisoning. 1883. J Anat Physiol 17: 24-58.
49. Olander F. 2008. The extracellular fibrinogen-binding protein (Efb) from *S. aureus* binds divalently to fibrinogen and gives rise to a specific antibody response. Malarfalen University.
50. Pi B, Yu M, Chen Y, Yu Y, Li L. 2009. Distribution of the ACME-*arcA* gene among methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and identification of a novel *ccr* allotype in ACME-*arcA*-positive isolates. J Med Microbiol 58:731-736.
51. Plata K, Rosato AE, Grzegorz W. 2009. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biochim Pol 56: 597-612.
52. Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly, Schlievert M, Gruss A and Novick RP. 1985. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. Mol Gen Genet 202:58–61



53. Redadan D, Klassen P, Frankenfield DL. 2002, National profile of practice patterns for hemodialysis vascular access in the United States. *J AM Soc Nephrol* 13: 2117-2124.
54. Reed SB, Wesson CA, Liou LE, Trumble WR, Schlievert PM, Bohach GA, Bayles KW. 2001. Molecular Characterization of Novel *Staphylococcus aureus* Serine Protease Operon. *Infect Immun* 69: 1521-1527.
55. Salazar HH, Mireles HMC, Moreno DMR, Martinez BLE. 2002. Infecciones nosocomiales en un hospital del Segundo nivel. *Rev Med IMSS*. 40: 43-51.
56. Sanchez AD. 2013. Patrones de asociación de los genes que codifican adhesinas en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Biología.
57. Schito GC. 2006. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 12: 3-8.
58. Shannon O and Flock JL. 2004. Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* binds to platelets and inhibits platelet aggregation. *Thromb Haemost* 91:779-89.
59. Siguas A & Salazar N; 1997. Susceptibilidad del *Staphylococcus* en un servicio de medicina. *Boletín de la Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales- SPEIT* 6:41.
60. Tanriover B, Carlton D, Saddekni S. 2000. Bacteremia associated with tunneled dialysis catheters: Comparison of two treatment strategies *Kidney Int* 57: 2151-2155.
61. Taylor GD, McKenzie M, Buchanan-Chell M, Caballo L, Chui L, Kowalewska-Grochowska K. 1998. Central venous catheters as a source of hemodialysis-related bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 19:643-646.
62. Tokars JL, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. 2004 National surveillance of dialysis-associated diseases in the United States. *Sem Dial* 17: 310-319.
63. United States Renal Data System 2007. *USRDS 2007 Annual Data Report*. Bethesda, MD: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services.



64. Vanden MF, Yzerman EP, van Belkum A, Boelens HA, Sijmons M, Verbrugh HA. 1999. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. J Clin Microbiol 37:3133-3140.
65. Velazquez-Meza M.E. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. Salud Pública Mex 47:381-387.
66. Vicenot F, Saleh M, Prévost G. 2008. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. Université Louis-Pasteur, Strasbourg.
67. Von Eiff C, Heilmann C and Peters G. 1999. New aspects in the molecular of polymer associated infections due to staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 18:843- 846.
68. Wilde C. 2004. Diabetic nephropathy –who-cares? EDTNA ERCA J 30: 63-165.
69. Winslow W, Rothberg Ei & Parsons.1919. Notes on the classification of the white and orange staphylococci. Department of Public Health, American Museum of Natural History. New York.
70. Withworth, JM. 1990. Enfermedades Renales. Editorial El manual Moderno p. 688.
71. Zeina AK. & Fowler VG Jr. 2006. *Staphylococcus aureus* Infections: New Challenges from an Old Pathogen. Enferm Infecc Microbiol Clin 24:182-193.
72. Ziebuht W, Heilmann C, Gotz F, Meyer P. 1997. Detection of the intercellular Adhesion Gene Cluster (*ica*) and Phase Variation in *Staphylococcus epidermidis* Blood Culture Strains and Mucosal Isolates. Infect Immun. 65: 890-896.

