



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Detección de profagos en cepas
clínicas de *Staphylococcus aureus*
obtenidas de los catéteres de pacientes
de diálisis peritoneal.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

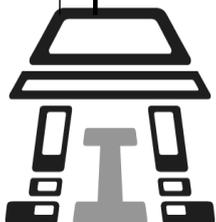
TANIA HERNÁNDEZ JAIMES

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. SERGIO VACA PACHECO

FINANCIADO POR UNAM-DGAPA-PAPIME-PE203714

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX. 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

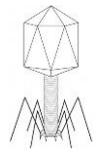


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

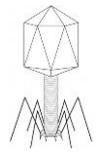
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.



**“Nunca pinto sueños
o pesadillas, pinto
mi propia realidad.”**

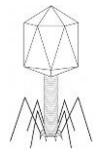
❁ Frida Kahlo ❁



A los habitantes de la casa azul.

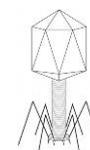
Financiado por:

UNAM-DGAPA-PAPIME-PE203714



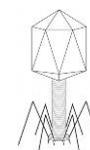
Agradecimientos

- A la UNAM, sobre todo a la FESI por haber sido mi segundo hogar y haberme formado como bióloga y como un ser humano capaz de alcanzar sus sueños y enfrentar sus pesadillas.
- Al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, Iztacala y a todo su personal por haberme recibido con los brazos abiertos, pero sobre todo a la Dra. Gloria Luz Paniagua y al Dr. Eric Monroy por brindarme siempre su apoyo.
- A mi director de tesis, el Dr. Sergio Vaca por su paciencia y sabiduría, pero sobre todo por el cariño que siempre me brindó y por ser un gran dibujante de sonrisas.
- A todos los del laboratorio de genética de la UMF, el Dr. Erasmo, la profesora Alina y los tesisistas que siempre estuvieron dispuestos escuchar y a ayudarme cuando las cosas se tornaban oscuras, les agradezco infinitamente.
- A los bellos habitantes de la casa azul que me han apoyado siempre, les amo y siempre les voy a estar agradecida por todo.
- A mi superhéroe, que desde que llegó a mi vida siempre ha estado ahí cuando más lo necesito.
- Y especialmente a mí.

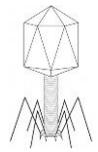


❁ INDICE ❁

Resumen	6
Introducción	7
1. Insuficiencia renal crónica y diálisis peritoneal	7
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.1 Descripción y características generales	8
2.2 Características bioquímicas y fisiológicas	8
2.3 Estructura	9
2.3.1 Pared celular	9
2.3.2 Membrana citoplasmática	9
2.3.3 Cápsula	10
2.4 Patogenia de las infecciones producidas por <i>S. aureus</i>	10
2.5 Factores de virulencia	11
2.5.1 Factores de adhesión	13
2.5.1.1 Formación de biofilm	13
2.5.2 Producción de toxinas	14
2.5.3 Resistencia a antibióticos	15
2.5.3.1 Resistencia a penicilina	18
2.5.3.2 Resistencia a metilina	18
2.5.3.3 Resistencia a quinolonas	19
2.5.3.4 Resistencia a vancomicina	19
2.5.4 Evasión de la respuesta inmune y persistencia intracelular	20
3. Bacteriófagos	21
3.1 Familias morfológicas	21
3.2 Características genómicas de los fagos de <i>S. aureus</i>	22
3.3 Bacteriófagos y su papel en la patogenicidad de <i>S. aureus</i>	25
3.3.1 Fagos codificantes de factores de virulencia	26
Justificación	28

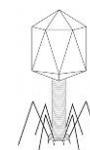


Objetivos	28
Metodología	29
1. Obtención de las muestras	29
2. Siembra de las muestras	29
3. Extracción del DNA bacteriano	29
4. PCR	29
4.1 Preparación de la mezcla de reacción	29
4.2 Confirmación por PCR de <i>S. aureus</i>	29
4.3 Detección de grupos de profagos	30
4.4 Detección de genes de toxinas	31
5. Detección fenotípica de resistencia a oxacilina	33
6. Detección de β -lactamasas	33
7. Identificación de fenotipos de resistencia a antibióticos	33
Resultados	34
Discusión	43
1. Pacientes	43
2. Profagos	43
3. Genes que codifican toxinas	44
4. Acción de los antibióticos asociada a factores de virulencia	46
Referencias	49



Resumen

S. aureus es una de las principales causas de infecciones bacterianas en humanos debido a que posee una gran cantidad de genes que codifican para numerosos factores de virulencia. Algunos genes que codifican factores de virulencia pueden ser transferidos entre cepas por bacteriófagos mediante transducción o por conversión lisogénica. El objetivo de este trabajo fue detectar por PCR genes de profagos y de factores de virulencia en cepas de *S. aureus* aisladas de catéteres peritoneales de pacientes de insuficiencia renal. Se encontraron 5 diferentes grupos de profagos en el 80% (n=28) de las cepas, siendo el grupo 77F el más abundante con una frecuencia del 71.4%, los grupos 187L y TwortD no se encontraron en ninguna de las cepas. Se detectaron 12 genes que codifican toxinas en el 68.6% (n=24) de las cepas estudiadas, siendo el gen *tst* el más abundante con 45.7% (n=16) de frecuencia, los genes *PVL* y *seh* no se encontraron en ninguna de las cepas. Se detectó resistencia a oxacilina en 94.3% (n=33) de las cepas, y 80% (n=28) de las cepas produjeron β -lactamasas. El 100% (n=35) de las cepas presentó resistencia a penicilina, ampicilina, dicloxacilina, eritromicina y ceftazidima, y al antibiótico que se presentó una mayor sensibilidad fue la cefalotina, con un 51.4% (n=18) de cepas sensibles.



Introducción

1. Insuficiencia renal crónica y diálisis peritoneal

La insuficiencia renal es un problema de salud que está en aumento, y por consiguiente demanda de múltiples intervenciones. Es una de las principales causas de muerte y discapacidad. Se distingue por un comienzo insidioso, con periodos donde se exacerba la sintomatología que alterna con periodos de latencia, que se complican posteriormente y hacen que los pacientes requieran tratamiento complejo durante toda la vida (Rodríguez y Rodríguez, 2004).

La enfermedad renal crónica se define como una pérdida irreversible del filtrado glomerular, la cual es asintomática hasta que hay una reducción del 25% del filtrado glomerular normal, y una reducción progresiva e irreversible del número y funcionamiento de nefronas (Soriano, 2004).

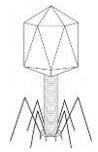
La primera causa de enfermedad renal crónica es la diabetes mellitus tipo II, que constituye más del 50% de los casos que inician algún tratamiento dialítico (Martínez, 2004). En algunos hospitales de segundo nivel se reporta hasta un 60%. Otras de las causas de enfermedad renal crónica son nefroesclerosis debida a la hipertensión arterial y la glomerulonefritis crónica (Hernaldo, 1997).

La diálisis peritoneal es el tratamiento cuyo fin es sustituir la función de los riñones dañados, usando al peritoneo como membrana de recambio. Durante la diálisis se eliminan de la sangre los desechos y el exceso de líquidos al pasar por el peritoneo y, para ello, se introduce una solución dializante en la cavidad peritoneal (Choi, 2003).

Al paciente con diálisis peritoneal se le coloca en la cavidad abdominal un catéter blando hecho de silicón con dos cojinetes de dacrón. Este se coloca mediante un procedimiento quirúrgico de mínima invasión. Este se mantiene de forma permanente en la cavidad abdominal, y solo en caso de que sufra disfunción por migración u obstrucción (por fibrina, coágulos o epiplón) se debe retirar y volver a implantar (Choi, 2003).

Además del catéter, se usa una línea de transferencia para conectar el catéter con las bolsas de diálisis, a través de un conector.

Los pacientes que sufren insuficiencia renal crónica y que son sometidos a diálisis peritoneal son especialmente susceptibles a las infecciones por *S. aureus* (Paniagua-Contreras *et al.*, 2012) debido a la formación de biopelícula bacteriana en la zona de inserción del catéter (Cruz *et al.*, 1994; Sellarés *et al.*, 1998).



2. *Staphylococcus aureus*

2.1 Descripción y características generales

El género *Staphylococcus* está incluido en la familia Staphylococceae, dentro del orden *Bacillales*, e incluye actualmente 42 especies diferentes (De Cueto y Pascual, 2009), siendo *Staphylococcus aureus* una de las principales causas de infecciones bacterianas en humanos (Bamberger y Boyd, 2005).

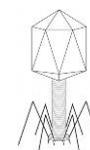
S. aureus es una bacteria con forma de coco (esférica) Gram positiva, de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, que se agrupa de forma irregular, característica que le da el nombre al género, que procede del griego *staphylé*, que significa “en racimo de uvas”. Este nombre fue propuesto por el cirujano escocés Alexander Ogdson en 1880 (De Cueto y Pascual, 2009).

2.2 Características bioquímicas y fisiológicas

S. aureus es una bacteria anaerobia facultativa, no móvil, que no forma esporas (Bustos-Martínez *et al.*, 2006).

Es productora de dos enzimas características, la catalasa (catalasa positiva), que le permite desdoblar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en H_2O y oxígeno libre y la coagulasa (coagulasa positiva), que le permite coagular el plasma (Martín-López *et al* 2002; Heikens *et al.*, 2005; Peacock, 2005; Bannerman, 2007).

S. aureus se desarrolla en medio S-110 a una temperatura que oscila entre 18°C y 40°C, tras 24 horas de incubación se forman colonias de 1 a 3 mm de diámetro, lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros (Murray *et al.*, 2006). Típicamente las colonias presentan una consistencia cremosa, con una coloración amarillenta o dorada, debida a la producción de un pigmento carotenoide (Bustos-Martínez *et al.*, 2006). En medios de cultivo con sangre las cepas producen un halo de β - hemólisis o de hemólisis completa alrededor de la colonia (De Cueto y Pascual, 2009).



2.3 Estructura

2.3.1 Pared celular

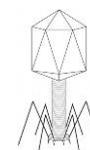
Los componentes fundamentales de la pared celular son el peptidoglicano y los ácidos teicoicos (Gram positivos). El peptidoglicano representa la mitad del peso de la pared celular y proporciona forma y estabilidad al microorganismo; además, tiene actividad de tipo endotoxina, por lo que interviene de forma importante en la patogenia de la infección. El marcador cromosómico *femB* participa en la síntesis de este, por lo que se puede identificar a la bacteria por PCR (Martín-López *et al* 2002). Los ácidos teicoicos representan el 40% del peso de la pared. Son polímeros compuestos por ribitol y N-acetil-glucosamina (polisacárido A) y son específicos de la especie; están unidos covalentemente al peptidoglicano de la pared o ligados a los lípidos de la membrana celular. Los ácidos teicoicos permiten la unión de *S. aureus* a las superficies mucosas mediante uniones específicas a la fibronectina (Murray *et al.*, 2006).

Las cepas de *S. aureus* están cubiertas uniformemente por una proteína, denominada proteína A, la cual se utiliza para una prueba específica de aglutinación con anticuerpos monoclonales (Murray *et al.*, 2006; Bannerman, 2007).

Otra proteína asociada a la pared celular es la coagulasa, que puede encontrarse ligada a la célula (coagulasa ligada o *clumping factor*) y que es capaz de convertir directamente, sin intervención de factores plasmáticos, el fibrinógeno en fibrina produciendo la coagulación del plasma (Kaplan y Tenebaum, 1982; Peacock, 2005; Murray *et al.*, 2006; Bannerman, 2007).

2.3.2 Membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática está formada por un complejo de proteínas, lípidos y carbohidratos y sirve de barrera osmótica para la célula (Murray *et al.*, 2006; De Cueto y Pascual, 2009).



2.3.3 Cápsula

Algunas cepas de *S. aureus* están recubiertas por una capa de polisacáridos externos, denominada cápsula mucoide o *slime*, que confiere, en ciertas condiciones, una mayor capacidad de adherencia, así como un aumento del efecto antifagocítico (Rodríguez-Luzón y Rodríguez-Baño, 2005).

2.4 Patogenia de las infecciones producidas por *S. aureus*

Aproximadamente un 20% de la población humana es portadora permanente de *S. aureus* en las fosas nasales y un 30% lo es de manera intermitente, por lo que esta bacteria puede comportarse como un organismo comensal y como un agente patógeno. Los pacientes con infecciones por esta bacteria suelen infectarse por la misma cepa que coloniza sus fosas nasales (Wertheim *et al.*, 2005; De Cueto y Pascual, 2009). Un grupo de pacientes especialmente susceptibles a las infecciones por *S. aureus* es el formado por aquellos que sufren insuficiencia renal crónica y por ello se someten a diálisis peritoneal (Lindsay y Holden, 2004; Paniagua-Contreras *et al.*, 2012).

Para una adecuada supervivencia e invasión del huésped, *S. aureus* posee un sistema complejo de factores de virulencia que está coordinado por un sistema de comunicación célula-célula conocido con el nombre de *quorum sensing* (QS) (Yarwood y Schlievert, 2003; Kong *et al.*, 2006). El QS está mediado por pequeñas proteínas producidas por las bacterias que se denominan autoinductores y que, dependiendo de los factores ambientales, pueden activar un gran número de genes incluyendo algunos que codifican factores de virulencia (Tabla1) (De Cueto y Pascual, 2009).

S. aureus puede difundir a nivel local o tener acceso al torrente sanguíneo. Una vez en la sangre puede propagarse a sitios periféricos en órganos distantes. Como resultado de esta diseminación se pueden presentar diversas infecciones. Finalmente, incluso si el microorganismo no invade, es posible que los pacientes presenten síndromes específicos provocados por el efecto de toxinas de acción local o sistémica (Archer, 1998). Incluso, el empleo de ciertos antibióticos favorece la síntesis de toxinas estafilocócicas (Dancer, 2008).

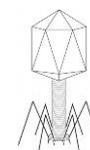


Tabla 1. Fases de la patogenia de las infecciones por *S. aureus* y factores de virulencia involucrados (De Cueto y Pascual, 2009).

Fase	Factores de virulencia	Infecciones asociadas
Adherencia bacteriana	Factores de agregación (<i>clumping factor</i>), proteínas de unión al fibrinógeno, fibronectina y sialoproteína ósea.	Endocarditis, infecciones asociadas a prótesis y catéteres intravasculares, osteomielitis, artritis.
Persistencia bacteriana	Formación de biopelículas (polisacárido de adhesión intracelular) y persistencia intracelular.	Infecciones recurrentes, fibrosis quística y todas las anteriores.
Evasión de los mecanismos de defensa del huésped	Cápsula polisacárida, proteína A, proteína inhibidora de la quimiotaxis (CHIP), proteína de adherencia extracelular (Eap), citotoxinas (leucocidina de Panton Valentine y α -toxina).	Infecciones cutáneas invasivas, neumonía necrotizante, abscesos.
Penetración e invasión tisular	Proteasas, lipasas, nucleasas, hialuronidasas, fosfolipasa C y elastasas.	Destrucción tisular e infecciones metastásicas.
Shock séptico y cuadros tóxicos	Enterotoxinas, toxina del síndrome del shock tóxico 1, toxinas exfoliativas A y B, α -toxina, peptidoglicano y ácidos teicoicos.	Toxiinfecciones alimentarias, síndrome del shock tóxico, síndrome de la piel escaldada, impétigo bulloso y sepsis.

Los síntomas y la gravedad de la enfermedad dependen de la vía de infección y de la expresión de los genes que codifican sus numerosos factores de virulencia, como enzimas y toxinas que agreden al hospedero, y de la resistencia a los antibióticos que muestre la cepa infectante (Marple *et al.* 1989).

2.5 Factores de virulencia

S. aureus produce más de 25 diferentes proteínas extracelulares, muchas de las cuales son contadas como factores de virulencia (Arvidson, 1983). Gracias a este extraordinario repertorio de factores de virulencia (Tabla 2) puede sobrevivir en condiciones extremas en el hospedero humano (Castañón-Sánchez, 2012).

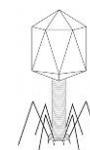
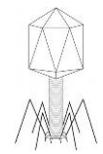


Tabla 2. Factores de virulencia producidos por *S. aureus* (Bustos-Martínez *et al.*, 2006)

Estructurales	
<ul style="list-style-type: none"> • Peptidoglicano • Proteína A • Adhesinas • Ácidos teicoicos • Polisacaridos capsulares 	
Enzimas	
<i>Enzima</i>	<i>Efecto</i>
<u>Catalasa</u>	Neutraliza la formación de radicales libres producidos por los polimorfonucleares.
<u>Coagulasa</u>	Forma una capa de fibrina alrededor del absceso, protegiéndolo contra la fagocitosis. Activa el complemento.
<u>Hialuronidasa</u>	Hidroliza los enlaces glucosídicos del ácido hialurónico facilitando la diseminación.
<u>Leucocidina</u>	Daña los leucocitos y genera granulocitopenia.
<u>Hemolisina α</u>	Citotóxica para leucocitos, plaquetas y hepatocitos. Dermonecrótica letal.
<u>Hemolisina β</u> (esfingomielinasa C)	Citotóxica para eritrocitos, leucocitos, macrófagos y fibroblastos.
<u>Hemolisina δ</u>	Citotóxica para eritrocitos, leucocitos, células de mamíferos en cultivo y protoplastos bacterianos.
<u>Hemolisina γ</u>	Citotóxica para eritrocitos.
<u>Lipasas</u>	Hidrolizan la membrana celular, favorecen la invasión de tejido cutáneo y subcutáneo.
<u>DNAsa</u>	Favorece la diseminación de la bacteria.
<u>β-lactamasas</u>	Confieren resistencia a antibióticos β -lactámicos.
Toxinas	
<i>Toxina</i>	<i>Efecto</i>
<u>Exfoliativa</u>	Provoca división de los puentes intercelulares en la capa granulosa de la epidermis, originando la descamación generalizada de la piel. Piel escaldada.
<u>Toxina 1</u> (enterotoxina F)	Fiebre, descamación, erupción cutánea, hipotensión. Afecta varios sistemas. Síndrome del choque tóxico.
<u>Enterotoxinas</u>	Provocan un cuadro emético, afectando al SNC. Generan un cuadro de gastroenteritis con vómito.



2.5.1 Factores de adhesión

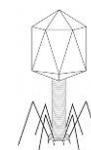
S. aureus posee diversas proteínas en su superficie, las cuales se denominan MSCRAMMs (por sus siglas en inglés: microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) que median la adherencia a los tejidos del hospedero e inician la colonización, la cual podrá conducir al establecimiento de una infección (Gordon y Lowy, 2008).

Ejemplo de ello son las proteínas A y B de unión a fibronectina (FnbpA y FnbpB), cuya función es favorecer la unión de la bacteria a los componentes de la matriz extracelular como la fibronectina. La proteína Cna es la responsable de la adhesión de la bacteria a la colágena de la matriz extracelular (Patti *et al.*, 1994). Por otro lado, las proteínas ClfA y ClfB (factor aglutinante A y B) se encargan de aglutinar y adherir a las bacterias al fibrinógeno. Estudios realizados con cepas de *S. aureus* con mutaciones en el gen *clfA* mostraron que las mutantes son menos virulentas que las cepas silvestres isogénicas (Foster y Hook, 1998).

2.5.1.1 Formación de biofilm

Un biofilm puede definirse como una comunidad sétil derivada de microorganismos, formado por células que están adheridas a un sustrato, interfase o unidas unas con otras, embebidas en una sustancia polimérica de matriz extracelular y que exhibe fenotipos alterados respecto al crecimiento, expresión de genes y producción de proteínas (Archer *et al.*, 2011).

Algunas cepas de *S. aureus* utilizan un polímero de N-acetil glucosamina para formar biofilms (Castañón-Sánchez, 2012). El operón *ica* codifica para la maquinaria que sintetiza este polímero (Fluckiger *et al.*, 2005); sin embargo, no todas las cepas poseen dicho elemento genético. Es importante resaltar que deleciones en el operón *ica* no impiden que la bacteria forme un biofilm, ya que existe una vía independiente de este. En esta vía la bacteria expresa una variedad de adhesinas que le permiten unirse y colonizar un gran número de superficies diferentes (O'Gara, 2007). Se ha descrito un grupo de proteínas denominadas Bap que participan en este proceso. Estas proteínas se



encuentran ancladas a la pared celular de *S. aureus* y favorecen la unión de la bacteria al biofilm.

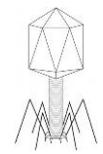
Además de los exopolisacáridos y las proteínas, los biofilms poseen DNA extracelular, y se ha establecido que su presencia proporciona estabilidad estructural al biofilm. Los mecanismos mediante los cuales el eDNA se incorpora a la estructura del biofilm incluyen la lisis celular, la participación de hidrolasas de mureína, autolisinas y genes de fagos que permiten el paso de una etapa lisogénica a una lítica. Se ha demostrado que el tratamiento de los biofilms con DNasa I afecta su estabilidad, resaltando la importancia de la presencia de este eDNA en la arquitectura del biofilm (Archer *et al.*, 2011).

Diversos trabajos indican que los biofilms de *S. aureus*, una vez establecidos, son recalcitrantes a tratamientos antimicrobianos y a los mecanismos innatos del hospedero para eliminar al microorganismo. Es por esto que se consideran los responsables de muchas infecciones recurrentes y resistentes a la respuesta inmune del hospedero (Jones *et al.*, 2001), por ejemplo en las infecciones de catéteres de pacientes que se someten a hemodiálisis o diálisis peritoneal (Martín-López *et al.*, 2004).

2.5.2 Producción de toxinas

Una de las características importantes de *S. aureus* es su capacidad para secretar toxinas que dañan las membranas de las células del hospedero. Las toxinas citolíticas forman poros β -barril en las membranas citoplasmáticas, provocando la liberación del contenido y la muerte de la célula (Foster, 2005). *S. aureus* secreta diversas toxinas formadoras de poros, entre las que se encuentran la α -hemolisina, β -hemolisina, γ -hemolisina, leucocidina y leucocidina PVL (Panton-Valentine) (Kaneko y Kamio, 2004).

La α -hemolisina se encuentra codificada por el gen *hla* y, una vez liberada al medio, se asocia con su célula blanco, ya sea por un mecanismo dependiente de receptores específicos o favorecidos por la presencia de colesterol. La proteína monomérica asociada a las células eucariotas oligomeriza en un β -barril que forma un poro, el cual es responsable de la lisis celular. La α -



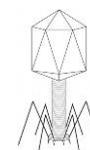
hemolisina es particularmente citotóxica para una gran variedad de células eucariotas, en particular las células del sistema inmune y es considerada por ello un importante factor de virulencia (Aman *et al.*, 2010; Kubica *et al.*, 2008).

La leucocidina PVL es clasificada como una citolisina de dos componentes, debido a que depende de que dos proteínas sean secretadas por *S. aureus*. Las proteínas LukF-PV y LukS-PV se liberan como monómeros y se insertan en la membrana plasmática del hospedero en una porción estequiométrica 1:1, lo que conduce a la formación de un poro. La presencia de este poro tiene como consecuencia la liberación de iones y finalmente la muerte de la célula (Kaneko y Kamian, 2004; Aman *et al.*, 2010). PVL exhibe una alta actividad contra leucocitos y se encuentra comúnmente asociada a *S. aureus* resistente a meticilina adquirido de la comunidad (Prince *et al.*, 2012).

S. aureus genera un grupo potente de proteínas inmunoestimuladoras implicadas en el síndrome del shock tóxico y la gastroenteritis. Estas proteínas son resistentes a la desnaturalización por calor y al efecto de proteasas. Otra característica es su capacidad para reaccionar con moléculas MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) clase II en las células presentadoras de antígenos con las células T, formando un complejo trimolecular. La formación del complejo induce intensa proliferación de células T independiente del antígeno, lo que resulta en la producción y liberación masiva de citosinas que favorecen el daño epitelial. Se considera que la función primaria de los superantígenos se enfoca en debilitar el sistema inmune del hospedero lo suficiente para que el patógeno pueda propagarse y conducir a la progresión de la enfermedad. Ejemplo de ello son las enterotoxinas A, B, C, D, E, G, Q y la proteína TSST-1, responsable del síndrome del shock tóxico (Baker y Acharya, 2004).

2.5.3 Resistencia a antibióticos

Staphylococcus aureus constituye un magnífico ejemplo de patógeno en constante evolución. Desde que se conoce su papel como agente causal de patología infecciosa, este microorganismo ha demostrado una eficaz adaptación a las condiciones cambiantes del medio circundante, y tanto desde



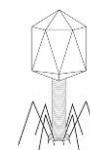
el punto de vista de su patogenicidad como desde el de la resistencia a los antimicrobianos, puede considerársele el paradigma de la progresión evolutiva (Enright *et al.*, 2002).

La aparición de resistencia se produce por dos factores fundamentales: a) la existencia de genes que codifican los componentes de un mecanismo de resistencia que pueden ser transferidos de una bacteria a otra, ya sea de la misma cepa o de cepas diferentes, convirtiendo la resistencia en un fenómeno transferible, y b) por el amplio uso de antibióticos que ejercen presión de selección que favorece la supervivencia de cepas que portan y expresan genes determinantes de resistencia (Sanabria, 2008). En consecuencia la resistencia puede originarse por mutaciones al azar de genes localizados en los cromosomas o bien en elementos extracromosómicos como los plásmidos, es decir, como un fenómeno primario no relacionado con el uso previo de un antibiótico, o bien como consecuencia del uso repetitivo y extendido de un determinado compuesto (Crowe *et al.*, 1998).

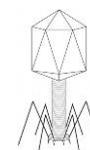
Muchas bacterias adquieren resistencia a antibióticos por transferencia genética horizontal (transformación, transducción, conjugación) (Douthwaite, 1992; Brezzo *et al.*, 2006). Sin embargo, la transferencia horizontal involucra meramente la transferencia de genes de resistencia que ya existen en las bacterias (Tabla 3).

Tabla 3. Mecanismos de resistencia a antibióticos de *S.aureus* (Bustos-Martínez, 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
B-lactámicos	<i>mecA</i>	PBP2a	Afinidad reducida al antibiótico	Cromosoma SSC-mec; Tn4291
Aminoglucósidos	<i>aacA-apdD</i>	Acetiltransferasa, Fosfotransferasa	Modificación por acetilación o fosforilación	Cromosoma: plásmidos; Tn4001, Tn5404, Tn5405
Macrólidos,	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> ,	Metilasa	Metilación de rRNA 23S	Plásmidos; Tn554



lincosamidas	<i>ermC</i>			
Macrólidos, estreptograminas	<i>msrA, vha, vat, vatB</i>	Acarreadores ABC, Acetiltransferasa	Bomba de expulsión. Modificación por acetilación	Plásmidos
Tetraciclinas	<i>tetK, tetL, tetM</i>	Sistemas de clase K, L, y M	Bombas de expulsión. Protección ribosomal	Plásmidos; Tn916
Rifampicina	<i>rif</i>	RNA polimerasa	Mutación en la subunidad β de la RNA polimerasa	Cromosoma
Ácido fusídico	<i>fusA, fusB</i>	Factor de elongación G	Alteración del factor de elongación G	Plásmidos
Quinolonas	<i>par</i>	Componente ParC de la topoisomerasa IV	Mutación en la subunidad A de la girasa y topoisomerasa IV	Cromosoma
	<i>gyrA</i> ó <i>gyrB</i>	Componentes GyrA ó GyrB de la girasa		
Mupirocina	<i>mupA</i>	Isoleucil tRNA sintetasa	Producción de una Isoleucil tRNA sintetasa modificada	Plásmidos
Trimetoprim-sulfametoxazol	<i>dfrA</i>	Dihidrofolato reductasa (DHFR)	Afinidad reducida de la DHFR	Cromosoma
	<i>sulA</i>	Dehidropteroato sintasa	Sobreproducción de ácido <i>p</i> -aminobenzoico	Cromosoma; Tn4003
Glicopéptidos	<i>van</i>	Peptidoglicano alterado D-Ala-D-Ala	Se atrapa la vancomicina en la pared celular. Síntesis de un dipéptido que reduce la afinidad de la vancomicina	Cromosoma; plásmidos; Tn 1546
Oxazolidinonas	<i>rrn</i>	rRNA 23S	Mutación en el dominio V del rRNA 23S, interfiere con la unión ribosomal	Cromosoma
Quinupristina-dalfopristina	Q: <i>ermA, ermB, ermC</i>	Metilasa Ribosomal	Reduce la afinidad a la subunidad ribosomal 23S	Cromosoma; plásmidos



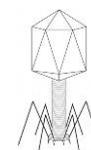
(Q-D)	<i>D: vat, vatB</i>	Acetiltransferasa	Modificación enzimática de la dalfopristina	Plásmidos
Cloramfenicol	<i>cat</i>	rRNA 50S	Modificación por acetiltransferasa	Plásmidos
Fosfomicina	<i>fosB</i>	Glutación-S-Transferasa	Modificación en la síntesis de N-acetil murámico	Plásmidos

2.5.3.1 Resistencia a penicilina

La resistencia a penicilina en *Staphylococcus* está mediada por el gen *blaZ*, el cual codifica para β -lactamasas. Esta enzima extracelular es sintetizada cuando la bacteria es expuesta a antibióticos β -lactámicos, y actúa hidrolizando el anillo β -lactámico. *blaZ* está bajo el control de dos genes reguladores adyacentes, el represor *blaR1* y el represor *blaI* (Kernodle, 2000). Estudios recientes han demostrado que la ruta de señalización responsable de la síntesis de β -lactamasas requiere la escisión secuencial de las proteínas reguladoras BlaR1 y BlaI. Después de la exposición a β -lactámicos, BlaR1, que es un sensor-traductor transmembranal, se rompe así mismo (Gregory *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001).

2.5.3.2 Resistencia a meticilina

La resistencia a meticilina requiere la presencia del gen *mecA* (Chambers, 1997; Kernodle, 2000), el cual es responsable de la síntesis de una proteína de 78 kDa llamada PBP2a (Hartman y Tomasz, 1984; Utsui y Yokota, 1985; Song *et al.*, 1987). Las PBPs son enzimas de unión de la membrana, las cuales catalizan la reacción de transpeptidación que es necesaria para la unión de las cadenas de peptidoglicano (Ghuysen, 1994). PBP2a sustituye a las PBPs y, por la baja afinidad de los antibióticos β -lactámicos a ella, *S. aureus* puede sobrevivir aún si se expone a altas concentraciones de estos compuestos. De este modo la resistencia a meticilina confiere resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, incluyendo a las cefalosporinas (Lowy, 2003).



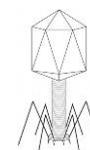
La expresión de resistencia en algunas cepas de MRSA está regulada por los homólogos de los genes reguladores para *bla_Z*. Estos genes, *mecl* y *mecR1*, regulan la respuesta de *mecA* a β -lactámicos (Archer y Bosilevac, 2001). Se ha encontrado que tanto *mecl* como *blaI* deben ser funcionales en todas las cepas de MRSA, y se sugiere que esto podría ser un mecanismo de protección que previene la sobreproducción de una proteína tóxica (Rosato *et al.*, 2003). Una serie adicional de genes, los genes *fem* (factor essential for methicillin resistance), juega un papel importante en la unión de las bandas de peptidoglicano y contribuye a la heterogeneidad de la expresión de resistencia a meticilina (Berger-Bachi, 1994).

2.5.3.3 Resistencia a quinolonas

La resistencia a quinolonas es el resultado de la adquisición de mutaciones cromosómicas. La alta densidad de bacterias, la existencia de subpoblaciones resistentes y algunas veces las limitadas concentraciones de quinolonas logran crear un ambiente que promueve la selección de mutantes resistentes (Hooper, 2002). Las quinolonas actúan sobre la DNA girasa y la topoisomerasa IV. Un cambio en el complejo DNA-enzima reduce la afinidad de las quinolonas por sus dos moléculas blanco. Los genes que codifican la subunidad GrlA de la topoisomerasa y la subunidad GyrA de la girasa son los sitios más comunes de las mutaciones que confieren resistencia; las mutaciones que afectan a la topoisomerasa IV son las más críticas, ya que esta es el principal blanco de las quinolonas (Ng *et al.*, 1996; Hooper, 2002). Las mutaciones puntuales que afectan un solo aminoácido algunas veces son suficientes para conferir resistencia clínica (Lowy, 2003).

2.5.3.4 Resistencia a vancomicina

Se han identificado dos formas de *S. aureus* resistentes a vancomicina (Walsh y Howe, 2002). Una ha sido identificada en las bandas *VISA*, las cuales tienen MICs de vancomicina de 8-16 $\mu\text{g/ml}$, aunque existe una fase de resistencia pre-*VISA*, la cual es heterogéneamente resistente (Hiramatsu *et al.* 1997). La reducida susceptibilidad a vancomicina aparece como resultado de cambios en la síntesis del peptidoglicano. Las cepas con el gen *VISA* son identificables por



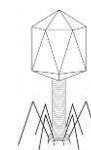
las cantidades adicionales de peptidoglicano que provocan una forma irregular y más gruesa de la pared celular. También se reduce el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicano, que conduce a la exposición de más residuos de D-Ala-D-Ala (Hanaki *et al.*, 1998). Las alteraciones de entrecruzamiento resultado de cantidades reducidas de L-glutamina que están disponibles por la amidación de D-glutamato en el puente de pentapéptido (Walsh y Howe, 2002). Como resultado de esto hay más residuos de D-Ala-D-Ala disponibles para anclar y atrapar vancomicina. La vancomicina ligada actúa entonces como un impedimento más para que otras moléculas de antibiótico lleguen a su destino en la membrana citoplasmática (Sieradzki *et al.*, 1999).

La segunda forma de resistencia a la vancomicina es el resultado de la transferencia del operón *vanA*, que confiere esta habilidad (Showsh *et al.*, 2001)

2.5.4 Evasión de la respuesta inmune y persistencia intracelular

Muchos patógenos tienen una larga historia de interacción con el sistema inmune de los humanos. Por lo tanto, no es de sorprender que *S. aureus* cuente con un amplio repertorio de mecanismos que han evolucionado para permitirle evadir la respuesta inmune. Estos mecanismos incluyen desde la modificación de su superficie bacteriana para evitar su reconocimiento, hasta la liberación de toxinas que inducen la muerte de células del sistema inmune (Otto, 2010). La α -toxina es capaz de destruir células epiteliales, eritrocitos, fibroblastos, monocitos, macrófagos, linfocitos y eosinófilos, además se considera uno de los principales factores de virulencia (Bhakdi y Trasnum-Jensen, 1991; Valeva *et al.*, 1997). La producción de exopolímeros, que forman cápsulas, dificultan la fagocitosis y la presencia de polisacáridos de adhesión intercelular forman parte de los biofilms (O'Riordan y Lee, 2004). Adicionalmente, la bacteria cuenta con la proteína A que disminuye la opsonización y, por lo tanto, limita el proceso de fagocitosis (Rigby y DeLeo, 2012).

S. aureus no sólo penetra, sino también sobrevive dentro de diversos tipos de células del hospedero, incluyendo fagocitos y células no fagocíticas. Esta



capacidad de persistir en el interior de las células juega un papel importante en la patogénesis de las infecciones producidas por este microorganismo y dicta la necesidad del empleo de antibióticos con actividad intracelular eficiente (Almeida *et al.*, 1996; Seral *et al.*, 2005).

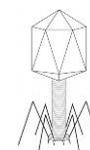
La evolución de *S. aureus* de un organismo oportunista, sensible a antibióticos y a menudo adquirido en hospitales a un organismo virulento, resistente a antibióticos, y adquirido en la comunidad ocurrió en los últimos 60 años (Moskowitz y Wiener-Kronish, 2010). Los genes responsables de la virulencia y de la resistencia a los antibióticos se encuentran en el cromosoma, pero pueden adquirirse mediante elementos extracromosómicos (Hurtado, 2002). Se conoce la secuencia de los genomas de 30 cepas de *S. aureus* (Kuroda *et al.*, 2001; Holden *et al.*, 2004; Baba *et al.*, 2008), lo cual ha permitido detectar que las cepas tienen aproximadamente 80% de su genoma en común, presentando una variabilidad del 20% (Holden *et al.*, 2004). Dentro de esta variabilidad se encuentra la posesión de distintos DNAs de bacteriófagos integrados en el genoma, por lo que se denominan profagos, los cuales pueden contribuir a la virulencia de la bacteria (Baba *et al.*, 2008).

3. Bacteriófagos

Los bacteriófagos han tenido un gran impacto en la diversidad y evolución de los estafilococos (Malachowa y DeLeo, 2010; Deghorain y Van Melderren, 2012), ya que la gran mayoría contiene fagos, ya sea integrados en el cromosoma o como elementos extracromosómicos. Estos bacteriófagos contribuyen a generar una gran variabilidad genética, puesto que constituyen el mayor vehículo de transferencia horizontal de genes (Brussow, *et al.*, 2004; Lindsay, 2010).

3.1 Familias morfológicas

Como la gran mayoría de los fagos, los de *S. aureus* conocidos hasta el momento poseen una doble cadena de DNA, y pertenecen al orden de los *Caudovirales* (Canchaya, *et al.*, 2003; Brussow, *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2008). En general son fagos temperados, detectados como profagos insertados en el

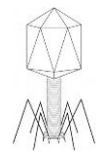


cromosoma, pero algunos de ellos son líticos debido a mutaciones en las funciones de lisogenia (García *et al.*, 2009; Kim y Myung, 2012). La mayor parte de los fagos encontrados pertenecen a la familia *Siphoviridae*, y un pequeño número a las familias *Podoviridae* y *Myoviridae*. De acuerdo a la clasificación morfológica propuesta por Ackermann (Ackermann, 1998), los fagos de la familia *Siphoviridae* están formados por una cápside icosaédrica y una cola no contráctil que termina con una estructura en forma de plato. Las cápsides pueden adoptar formas elongadas o icosaédricas, y la longitud de la cola varía de corta (130nm) a larga (400 nm) (Deghorain y Van Melderren, 2012). Los fagos de la familia *Podoviridae* están compuestos por una pequeña cápside icosaédrica y una cola corta no flexible ni retráctil (Son *et al.*, 2010). Los fagos de la familia *Myoviridae* están caracterizados por poseer una cápside icosaédrica y una cola larga y contráctil (O'Flaherty *et al.*, 2004).

Los fagos están clasificados en tres grupos de acuerdo al comportamiento de su ciclo de replicación en líticos, temperados y crónicos. Los fagos líticos son miembros de la familia *Myoviridae*, y han sido usados para fagoterapia, ya que la progenie de los bacteriófagos lisa a la bacteria al salir al medio extracelular. Las bacterias infectadas con los fagos crónicos lanzan su progenie al ambiente extracelular sin ser muertas, y ello permite que estas sigan creciendo y dividiéndose. Los fagos temperados pertenecen a la familia *Siphoviridae*, y forman el grupo más numeroso entre los fagos. Estos tienen la habilidad de lisar la bacteria después de la infección, pero en la mayoría de los casos el fago establece una relación duradera con la célula hospedera, en la que se reprime la transcripción de los genes fágicos estructurales y de lisis y el DNA viral se integra al genoma del estafilococo; el genoma viral reprimido e integrado al cromosoma bacteriano se denomina profago (Mann, 2008; Goerke *et al.*, 2009).

3.2 Características genómicas de los fagos de *S. aureus*

Estudios comparativos de genomas de fagos de *S. aureus* han revelado diversas características genómicas clave que se aplican globalmente a los fagos estafilocócicos descritos hasta el momento (Kwan *et al.*, 2005).



El tamaño del genoma se extiende desde menos de 20 kb a más de 125 kb, y con base en el tamaño se han establecido tres categorías para los fagos de *S. aureus*: clase I: < 20 kb; clase II: \approx 40 kb; clase III: >125 kb (Kwan *et al.*, 2005), las cuales coinciden con la clasificación morfológica: *Podoviridae* tiene el genoma más pequeño (clase I), *Myoviridae* tiene el genoma más grande (clase III) y *Siphoviridae* tiene el tamaño intermedio (clase II) (Deghorain y Van Melderen, 2012).

Las regiones codificantes están fuertemente empaquetadas con regiones intergénicas escasas y muy pequeñas, y con una alta densidad de genes (1.67 genes/kb en promedio). Su porcentaje de GC es similar al del hospedero (Kwan *et al.*, 2005).

El genoma de *Siphoviridae* de *S. aureus* presenta la estructura típica de esta familia (figura 1) (Canchaya *et al.*, 2003; Brussow *et al.*, 2004; Hatfull, 2008); cinco módulos funcionales que se distribuyen de la siguiente manera: lisogenia, metabolismo del DNA, el cual puede dividirse en funciones de replicación y regulación, empaquetamiento del DNA y morfogénesis de la cápside, morfogénesis de la cola y lisis del hospedero. Cuando existen factores de virulencia generalmente están codificados río abajo (downstream) en el módulo de lisis (Canchaya *et al.*, 2003; Brussow *et al.*, 2004), y en algunos casos están insertados entre los módulos de lisogenia y metabolismo del DNA (Hatfull, 2008). Los genes generalmente se transcriben a partir de la misma cadena, excepto los grupos pequeños, tales como los genes involucrados en la integración al genoma del hospedero (Canchaya *et al.*, 2003; Kwan *et al.*, 2005).



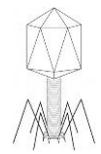


Figura 1. Genoma de los fagos de la familia *Siphoviridae*. Los fragmentos de colores representan los cinco módulos funcionales que se encuentran en el genoma de esta familia (tomado de Deghorain y Van Melderren, 2012).

La organización del genoma de *Podoviridae* es diferente, la mayor distinción reside en que el número y tamaño de los marcos de lectura abierta es menor (de 20 a 32 marcos de lectura abierta) (figura 2). Los módulos funcionales que codifican para el empaquetamiento de DNA y la morfogénesis de la cápside, la morfogénesis de la cola y la lisis han sido identificados en adición a genes de función desconocida. En contraste con la familia *Siphoviridae* los módulos no están bien definidos, y los genes de lisis y de la cola están solapados. En adición, el módulo de lisogenia está ausente, como se espera para fagos líticos (Vybiral *et al.*, 2003; Kwan *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2010).

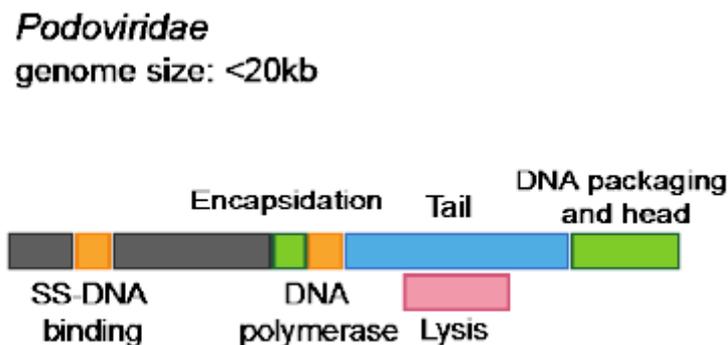
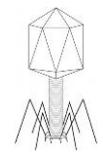


Figura 2. Genoma de los fagos de la familia *Podoviridae*. Los fragmentos de colores representan los cinco módulos funcionales que se encuentran en el genoma de esta familia, los fragmentos de color gris representan genes de función desconocida (tomado de Deghorain y Van Melderren, 2012).

La organización genómica de los fagos de la familia *Myoviridae* estafilocócica es similar a la del fago T4 de *E. coli* (Krisch y Comeau, 2008). El genoma está organizado en módulos funcionales de genes conservados (replicación, elementos estructurales) interrumpidos por regiones plásticas de gran tamaño que codifican para numerosos genes de función desconocida (figura 3). Los módulos estructurales encontrados en los fagos estafilocócicos de la familia



Myoviridae están más cercanamente relacionados, en términos de organización y contenido de genes, a módulos encontrados en fagos estafilocócicos de la familia *Siphoviridae* que a módulos de fagos de la familia *Myoviridae* encontrados en diferentes especies de bacterias (O'Flaherty *et al.*, 2004; Kwan *et al.*, 2005; Lobočka *et al.*, 2012).

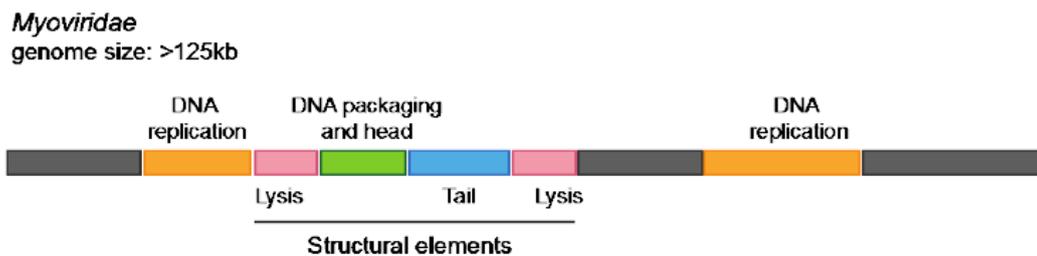
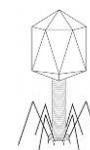


Figura 3. Genoma de los fagos de la familia *Myoviridae* (fago Twort). Los fragmentos de colores representan los cinco módulos funcionales que se encuentran en el genoma de esta familia, los fragmentos de color gris representan genes de función desconocida (tomado de Deghorain y Van Melderen, 2012).

3.3 Bacteriófagos y su papel en la patogenicidad de *S. aureus*

El genoma de *S. aureus* está mayormente compuesto por un conjunto de genes que constituyen el llamado “núcleo del genoma”, y son los que le brindan secuencia y sintenia (Holden *et al.*, 2004; Lindsay y Holden, 2004). Por otra parte, el “genoma accesorio” es variable, y está constituido por la integración de elementos genéticos móviles como los bacteriófagos (Deghorain y Van Melderen, 2012). Este “genoma accesorio” representa hasta el 25% del genoma de *S. aureus* y contribuye en gran manera a la alta plasticidad genética y fenotípica del patógeno (Holden *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2008; Lindsay, 2010; Malachowa y DeLeo, 2010; Suzuki *et al.*, 2012). Ciertamente una de las principales características de *S. aureus* es su habilidad para adaptarse a diversos y hostiles ambientes, y los fagos juegan un rol esencial en este fenómeno (Holden *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2008; Lindsay, 2010; Malachowa y DeLeo, 2010; Suzuki *et al.*, 2012).

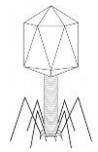


3.3.1 Fagos codificantes de factores de virulencia

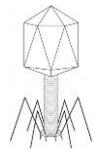
Los fagos codifican una gran cantidad de factores de virulencia y le proporcionan patogenicidad a *S. aureus* con una gran cantidad de toxinas que le permiten escapar del sistema inmune del hospedero (Feng *et al.*, 2008; Lindsay, 2010; Malachowa y DeLeo, 2010). Muchos de estos factores ya han sido descritos y caracterizados, como proteínas moduladas autoinmunes, como estafilocinasas (*sak*), responsable de la destrucción tisular del hospedero, la proteína inhibidora de quimiotaxis CHIP (*chp*), el inhibidor del complemento estafilocócico SCIN (*scn*) (Coleman *et al.*, 1989; Van Wamel *et al.*, 2006) y un gran número de superantígenos (*sea*, *seg*, *sek*, *sek2*, *sep*, *seq*), estos superantígenos son enterotoxinas, que provocan envenenamiento alimenticio, síndrome del shock tóxico y fascitis necrotizante. En adición la leucocidina Pantón-Valentine (PVL, codificada por *lukF-PV*, *lukS-PV*) y leucocidinas relacionadas que forman poros en los leucocitos y producen lesiones necróticas (Szmigielski *et al.*, 1999). Finalmente, la toxina exfoliativa A (*eta*) está involucrada en una gran cantidad de infecciones de la piel (Deghorain y Van Melderen, 2012).

En general, la mayoría de los fagos porta solo un gen de virulencia; sin embargo, se han reportado algunas excepciones. Por ejemplo, los fagos phiSa3 y sus parientes, como phiN315, pueden codificar para más de cinco factores de virulencia, los cuales forman un complejo de escape inmune (Goerke *et al.*, 2009; Malachowa y DeLeo, 2010).

Los profagos pueden trabajar en conjunto con otros elementos genéticos móviles en los estafilococos, por ejemplo, estos crean movilidad para algunas islas de patogenicidad. El ejemplo más común es la habilidad del fago auxiliar 80 α para mediar la escisión y transferencia de SaPI1 a otros estafilococos (Fitzgerald *et al.*, 2001; Novick y Subedi, 2007). Algunos fagos incluso tienen la habilidad de transferir resistencia a antibióticos, como ocurre con los plásmidos pS194 (confiere resistencia a cloranfenicol) y pI258 (confiere resistencia a eritromicina), que son transferidos por los fagos ϕ 11 y ϕ 11de respectivamente (Jensen y Lyon, 2009).



Durante los últimos años la secuenciación de los genomas de *Staphylococcus* y los extensos análisis de comparación de genomas han incrementado significativamente el número de fagos identificados en este género, llegando a conocer hasta ahora más de 68 secuencias de fagos y profagos encontrados en estafilococos (Deghorain y Van Melderren, 2012).



Justificación

Debido a la importancia de los bacteriófagos en la adquisición de factores de virulencia mediante la transferencia horizontal de genes en *Staphylococcus aureus* y la gran importancia de este como patógeno nos parece relevante explorar la posesión de fagos en cepas aisladas de infecciones relacionadas al catéter de pacientes con insuficiencia renal crónica sujetos a diálisis peritoneal.

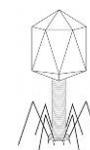
Objetivos

Objetivo general

- ◆ Identificar por PCR la presencia de profagos y de genes que codifican toxinas así como los fenotipos de resistencia a antibióticos en cepas de *S. aureus* aisladas de los catéteres de pacientes con diálisis peritoneal.

Objetivos particulares

- ◆ Identificar los genes que codifican para enterotoxinas, toxinas exfoliativas A y B, α -toxina, toxina del síndrome del shock tóxico y leucocidina Pantón-Valentine.
- ◆ Determinar resistencia fenotípica a oxacilina.
- ◆ Determinar la producción de β -lactamasas por hidrólisis del β -lactámico cromogénico nitrocefín.
- ◆ Determinar los fenotipos de resistencia a antibióticos por el método de Kirby-Bauer.



Metodología

Obtención de las muestras: Las cepas de *S. aureus* que se utilizaron en este estudio fueron donadas por el cepario del laboratorio Clínico de la CUSI-I. Estas cepas fueron previamente aisladas de los catéteres de pacientes de diálisis peritoneal.

Siembra de las muestras: Las cepas fueron sembradas por el método de estría cruzada en los medios de cultivo: agar sangre y S-110 y fueron incubadas a 37°C por 24 horas.

Extacción del DNA bacteriano. Para la realización de PCR se extrajo el DNA de las cepas por el método de ebullición. De cada sepa se tomó una muestra con una asa estéril y se depositó en un tubo de rosca de 16 x 150 con 2 ml de agua desionizada estéril. La muestra se mezcló en un vortex por 20 segundos y se hirvió por 20 minutos. Después de ser hervida se colocó en hielo por 10 minutos y se centrifugó en un tubo eppendorff a 14000 rpm durante 10 minutos. Al terminar se rescató solo el sobrenadante, que contenía el DNA templado y se almacenó a -20°C.

Preparación de la mezcla de reacción para PCR. El volumen final para cada mezcla de reacción fue de 23 µl, para lo cual se tomó 1 µl de cada uno los oligonucleótidos, más agua libre de nucleasa hasta llegar a 23 µl. Posteriormente los 23 µl de la mezcla reactiva se adicionaron a tubos puretaq que contenían 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de Ampli Taq polimerasa y 100 mmol de dNTPs. Finalmente se agregaron 2 µl de DNA blanco.

PCR. La amplificación del DNA se realizó en un Termociclador modelo CGI-96.

Confirmación por PCR de S. aureus. Se realizó un PCR para confirmar que las cepas fueran de *S. aureus* mediante la identificación de la subunidad 23S del RNA ribosomal utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 4 bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 37 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 40 seg, alineación a 64°C por 1 min, y extensión a 72°C por 75 seg), terminando con una extensión final a 72°C por 7 min.

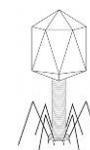


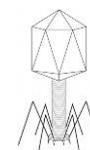
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en la detección de la subunidad 23S de rRNA por PCR en *S. aureus* (Nashev *et al.*, 2004).

Gen	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
23S rRNA	ACGGAGTTACAAAGGACGAC	1250
	AGCTCAGCCTTAACGAGTAC	

Detección de grupos de profagos. Los grupos de profagos se detectaron por PCR multiplex utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 5, bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 1 min, alineación a 58°C por 1 min 30 seg, y extensión a 70°C por 1 min 30 seg), terminando con una extensión final a 72°C por 7 min.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en la detección de grupos de profagos por PCR en *S. aureus* (Pantucek *et al.*, 2004).

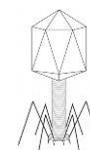
Grupo de profagos	Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
3A	SGA1	TATCAGGCGAGAATTAAGGG	744
	SGA2	CTTTGACATGACATCCGCTTGAC	
11B	SGB1	ACTTATCCAGGTGGYGTTATTG	405
	SGB2	TGTATTTAATTTCCGCCGTTAGTG	
77F	SGF1	CGATGGACGGCTACACAGA	155
	SGF2	TTGTTCAGAACTTCCCAACCTG	
subgrupo Fa	SGFa1	TACGGGAAAATATTCGGAAG	548
	SGFa2	ATAATCCGCACCTCATTCT	
subgrupo Fb	SGFb1	AGACACATTAAGTCGCACGATAG	147
	SGFb2	TCTTCTCTGGCACGGTCTCTT	
187L	SGL1	GCTTAAACAGTAACGGTGACAGTG	648
	SGL2	TGCTACATCATCAAGAACACCTGG	
TwortD	SGD1	TGGGCTTCATTCTACGGTGA	331
	SGD2	GTAATTTAATGAATCCACGAGAT	



Detección de genes de toxinas. Se detectaron los genes que codifican para enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* y *sej*), toxinas exfoliativas A y B (*eta* y *etb*), α -toxina (*hlg*), toxina del síndrome del shock tóxico (*tst*) y leucocidina Pantón-Valentine (*PVL*) mediante PCR multiplex usando dos grupos de oligonucleótidos, los descritos por Campbell *et al.* en 2008 (tabla 6), bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, seguida de 32 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 1 min, alineación a 60°C por 1 min 30 seg, y extensión a 72°C por 1 min), terminando con una extensión final a 72°C por 10 min; y los descritos por Mehrotra *et al.* en 2000 (tabla 7), bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 2 min, alineación a 57°C por 2 min, y extensión a 72°C por 1 min), terminando con una extensión final a 72°C por 7 min.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en la detección de genes que codifican toxinas por PCR en *S. aureus* (Campbell *et al.*, 2008).

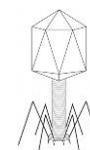
Gen	Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
eta	Forward	CGCTGCGGACATTCCTACATGG	676
	Reverse	TACATGCCCCGCCACTTGCTTGT	
etb	Forward	GAAGCAGCCAAAAACCCATCGAA	419
	Reverse	TGTTGTCCGCCTTTACCACTGTGAA	
hlg	Forward	TTGGCTGGGGAGTTGAAGCACA	306
	Reverse	CGCCTGCCCAGTAGAAGCCATT	
pvl	Forward	TGCCAGACAATGAATTACCCCCATT	894
	Reverse	TCTGCCATATGGTCCCCAACCA	
sea	Forward	TTGCAGGGAACAGCTTTAGGCAATC	252
	Reverse	TGGTGTACCACCCGCACATTGA	
seb	Forward	GACATGATGCCTGCACCAGGAGA	355
	Reverse	AACAAATCGTTAAAAACGGCGACACAG	
sec	Forward	CCCTACGCCAGATGAGTTGCACA	602
	Reverse	CGCCTGGTGCAGGCATCATATC	



sed	Forward	GAAAGTGAGCAAGTTGGATAGATTGCGGCTAG	830
	Reverse	CCGCGCTGTATTTTTCTCCGAGAG	
see	Forward	TGCCCTAACGTTGACAACAAGTCCA	532
	Reverse	TCCGTGTAATAATGCCTTGCCTGAA	
seg	Forward	TGCTCAACCCGATCCTAAATTAGACGA	117
	Reverse	CCTCTTCCTTCAACAGGTGGAGACG	
seh	Forward	CATTCACATCATATGCGAAAGCAGAAG	358
	Reverse	GCACCAATCACCTTTCTGTGC	
sei	Forward	TGGAGGGGCCACTTTATCAGGA	220
	Reverse	TCCATATTCTTTGCCTTTACCAGTG	
sej	Forward	CTCCCTGACGTTAACTACTAATAACCC	432
	Reverse	TATGGTGGAGTAACACTGCATCAAAA	
tst	Forward	AGCCCTGCTTTTACAAAAGGGGAAAA	306
	Reverse	CCAATAACCACCCGTTTTATCGCTTG	

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en la detección de genes que codifican toxinas por PCR en *S. aureus* (Mehrotra *et al.*, 2000).

Gen	Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
sea	GSEAR-1	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	102
	GSEAR-2	CGGCACTTTTTCTCTTCGG	
seb	GSEBR-1	GTATGGTGGTGTAACTGAGC	164
	GSEBR-2	CCAATAGTGACGAGTTAGG	
sec	GSECR-1	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	451
	GSECR-2	CACACTTTTAGAATCAACCG	
sed	GSEDR-1	CCAATAATAAGGAGAAAATAAAAG	278
	GSEDR-2	ATTGGTATTTTTTTTCGTTT	
see	GSEER-1	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC	209
	GSEER-2	CTTTTTTTCTTCGGTCAATC	
eta	GETAR-1	GCAGGTGTTGATTTAGCATT	93
	GETAR-2	AGATGTCCCTATTTTTGCTG	
etb	GETBR-1	ACAAGCAAAAAGAATACAGCG	226
	GETBR-2	GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG	
tst	GTSSTR-1	ACCCCTGTTCCCTTATCATC	326



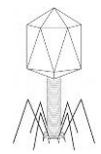
	GTSTR-2	TTTCAGTATTTGTAACGCC	
--	---------	---------------------	--

Analisis de los amplicones. Después de la amplificación del ADN, 5 μ l de cada muestra fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliampers por 90 minutos. Los geles fueron teñidos con Midori Green y se fotografiaron bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK).

Detección fenotípica de resistencia a oxacilina: Se sembraron las cepas por método de estría en agar MH, y se les colocó un disco de oxacilina, se incubaron a 37°C por 24 horas, posteriormente se observó si hubo formación de halo de inhibición y se midió.

Detección de β -lactamasas. La detección de β -lactamasas se realizó colocando con una asa estéril una colonia bacteriana en un disco impregnado con el compuesto cromogénico nitrocefín, el cual produce un compuesto de color rojo cuando es hidrolizado por la β -lactamasa.

Identificación de fenotipos de resistencia a antibióticos. La identificación de los fenotipos de resistencia a antibióticos en las cepas de *S. aureus* se realizó sembrando de manera uniforme con un hisopo estéril las bacterias en medio MH por el método de Kirby-Bauer.



Resultados

Pacientes

Las distribuciones por sexo (figura 4) y por edad (gráfica 1) de los pacientes de los cuales se obtuvieron las cepas son las siguientes:

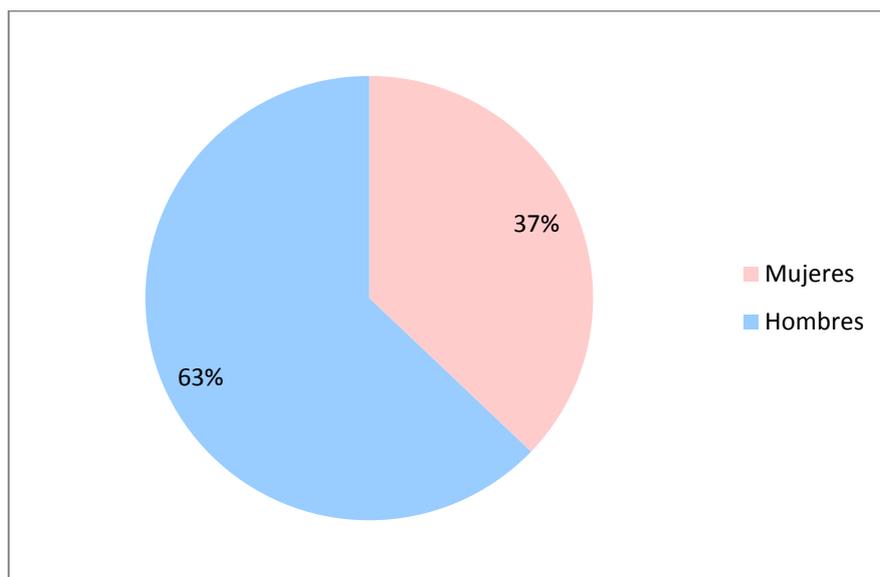
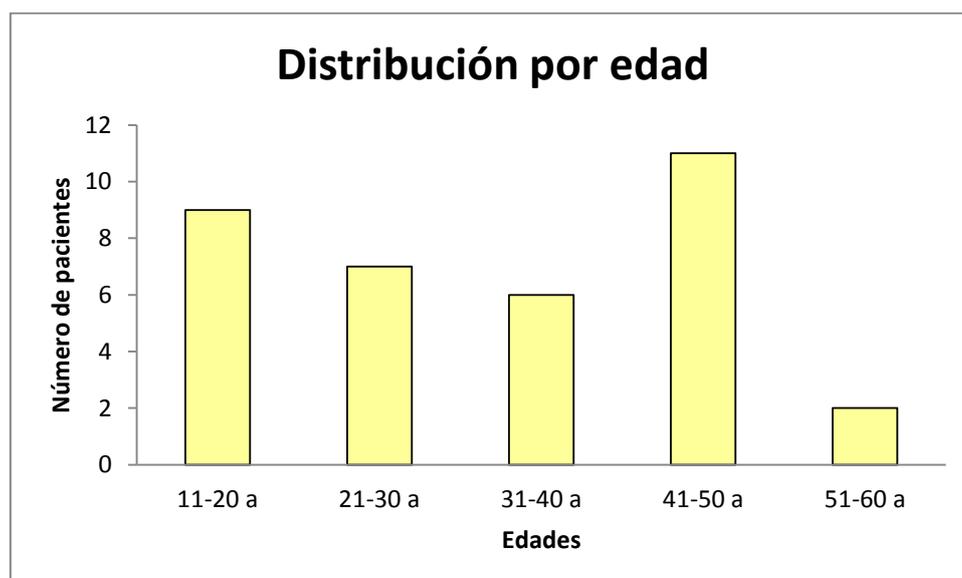
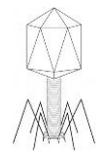


Figura 4. Distribución de los pacientes por sexo.



Gráfica 1. Distribución de los pacientes por edad.



Como se observa el rango de edad con mayor número de pacientes es el de 41 a 50 años, con un 31.4% (n=11), y el rango con menos número de pacientes es el de 51 a 60 años con el 5.7% (n=2).

Confirmación por PCR de S. aureus

El 100% (n=35) de las cepas resultaron positivas al buscar el gen codificante del rRNA 23S de *S. aureus* mediante PCR (figura 5), por lo que se confirmaron como *S. aureus*.

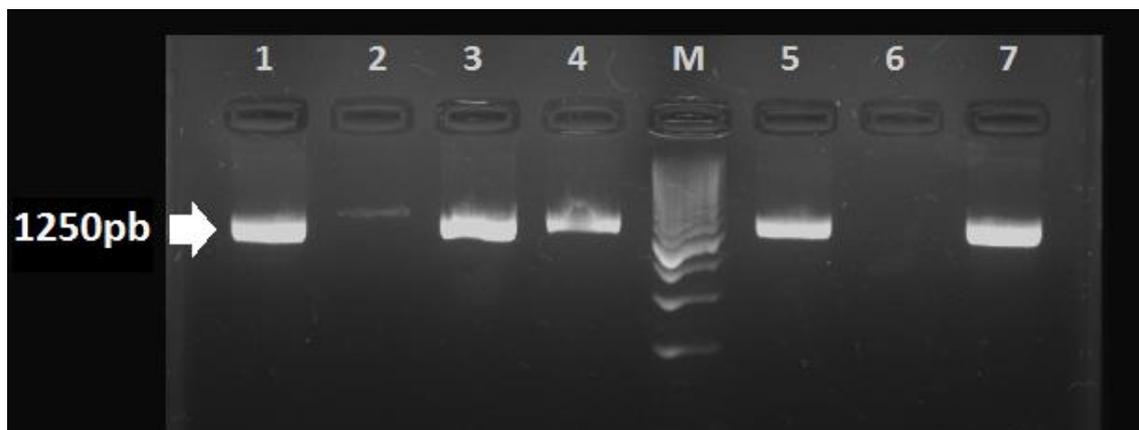


Figura 5. Amplicones del gen que codifica el rRNA 23S en *S. aureus*. Carril M: marcador (Escala de 200 pb), carril 6 control negativo (sin DNA), carril 7 control positivo (*S. aureus* ATCC 33592), carriles 1-5 cepas de *S. aureus*.

Profagos

Se encontró que el 80% (n=28) de las cepas contenían profagos (Tabla 8).

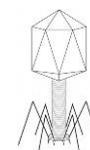


Tabla 8. Distribución de los grupos de profagos encontrados en las cepas de *S. aureus*.

Grupo de fagos	No.	%
3A	5	14.3
11B	4	11.4
77F	25	71.4
77F subg. Fa	5	14.3
77F subg. Fb	12	34.3
187L	0	0
TwortD	0	0

Como puede observarse el profago 77F fue el más abundante con una frecuencia del 71.4% (n=25), mientras que el de menor frecuencia fue el 11B con 11.4% (n=4). Los profagos 187L y TwortD no se encontraron en ninguna de las cepas.

En las figuras 6, 7 y 8 se muestran geles con los amplicones de los diferentes grupos de fagos.

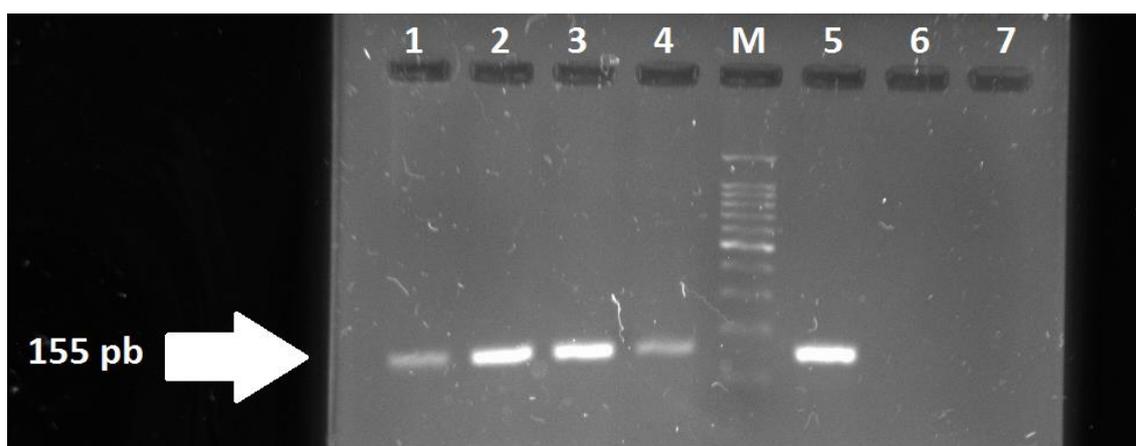


Figura 6. Amplicones de profagos del grupo 77F en *S. aureus*. Carril M: marcador (Escala de 100 pb), carril 7 control negativo (sin DNA), carril 6 cepa que no presenta el profago, carriles 1-5 cepas de *S. aureus* que presentan el grupo 77F.

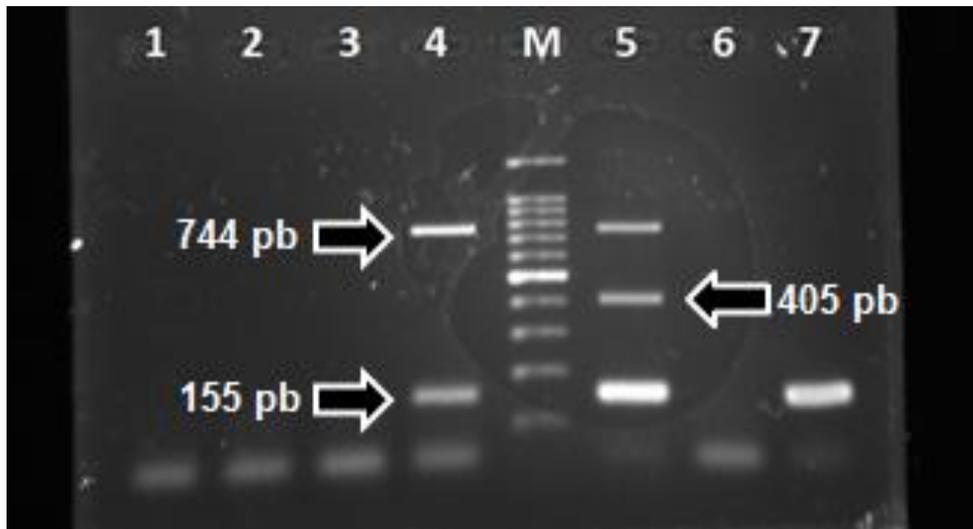
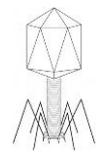


Figura 7. Amplicones de profagos en *S. aureus*. Carril M: marcador (Escalera de 100 pb), carril 4 cepa de *S. aureus* con dos grupos de fagos: 77F (155 pb) y 3A (744 pb), carril 5 cepa con tres grupos de fagos: 77F (155pb), 11B (405 pb) y 3A (744 pb), carril 7 cepa con un grupo de fago: 77F (155 pb), los carriles 1, 2, 3 y 6 son de cepas de *S. aureus* que no presentan ningún grupo de fagos.

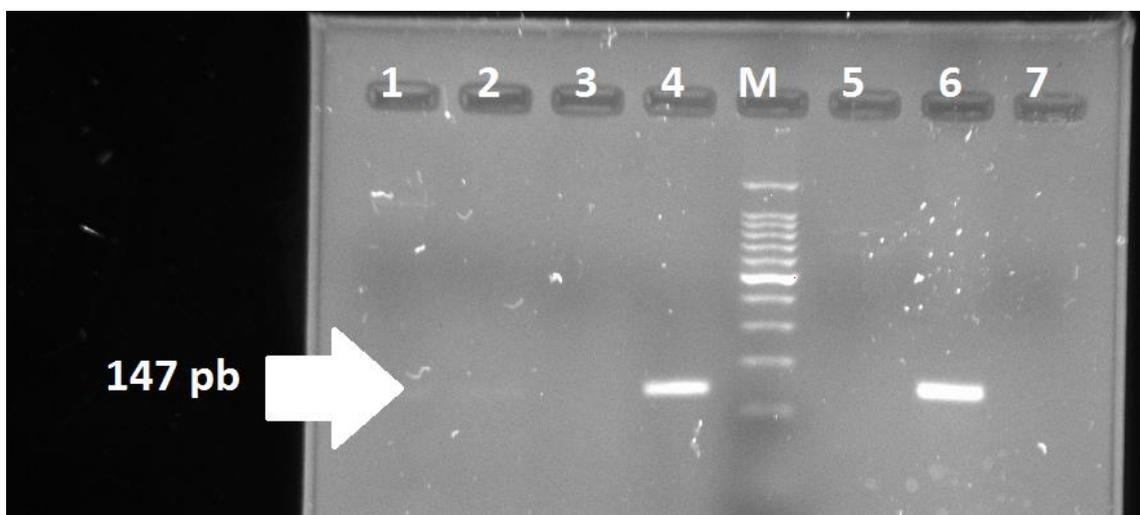


Figura 8. Amplicones de profagos del grupo 77F subg. Fb en *S. aureus*. Carril M: marcador (Escalera de 100 pb), carriles 4 y 6 cepas de *S. aureus* que presentan fagos del grupo 77F subg. Fb, carriles 1, 2, 3, 5 y 7 cepas de *S. aureus* que no presentan fagos de este grupo.

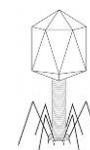


Tabla 9. Fagos de cada grupo que se detectan con los oligonucleótidos usados. (Tomada de Pantucek, *et al.*, 2004).

Phage type	Sero-group	Phage type-specific conserved sequence	Phage and prophage genomes harbouring the phage type-specific sequence	Sequence identity (%)	Phages detected by multiplex PCR
3A-like phages	A	AF513855	ϕ SLT ϕ 12 ϕ Sa2mw prophage COL ϕ 252A ϕ Sa4ms (ϕ 476A)	96%	ϕ 3A, ϕ 3C, ϕ 6, ϕ 12*, ϕ 14*, ϕ 41E, ϕ 47, ϕ 49*, ϕ 54, ϕ L54b ^{b,*} , ϕ 62*, ϕ 75, ϕ 81 and ϕ 94
11-like phages	B	AF13856	ϕ ETA ϕ Mu50B ϕ 11	81%	ϕ 11*, ϕ 29, ϕ 52, ϕ 52A, ϕ L54b ^{b,*} , ϕ 80, ϕ 80 α *, ϕ 83A, ϕ 85, ϕ 95 and ϕ 96
77-like phages	F	AY158000	ϕ PVL ϕ PV83 ϕ N315 ϕ Mu50A ϕ 13 ϕ Sa3mw ϕ 252B ϕ Sa3ms (ϕ 476B)	92%	ϕ 77, ϕ 13*, ϕ 42D* and ϕ 84
	subgroup Fa	AF513857	ϕ N315, ϕ Mu50A, ϕ 252B	99%	ϕ 77, ϕ 42D* and ϕ 84
	subgroup Fb	ORF 31 from AF424783	ϕ PVL, ϕ PV83, ϕ 13, ϕ Sa3mw, ϕ Sa3ms	99%	ϕ 13*
187-like phages	L	AF515457	none	the sole phage strain	ϕ 187*
Twort-like phages	D	AY362039	none	81%	Twort*, ϕ 131*, ϕ 812*, ϕ SK311* and U16*

Genes que codifican toxinas

Se encontraron 12 diferentes tipos de genes de toxinas distribuidos en 24 de las 35 cepas de *S. aureus* (Tabla 10).

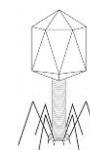


Tabla 10. Distribución de los genes que codifican toxinas encontrados en las cepas de *S. aureus*.

Genes que codifican toxinas	No.	%
<i>sea</i>	5	14.3
<i>seb</i>	7	20
<i>sec</i>	2	5.7
<i>sed</i>	4	11.4
<i>see</i>	9	25.7
<i>seg</i>	2	5.7
<i>seh</i>	0	0
<i>sei</i>	2	5.7
<i>sej</i>	3	8.6
<i>eta</i>	2	5.7
<i>etb</i>	8	22.8
<i>hlg</i>	11	31.4
<i>tst</i>	16	45.7
<i>PVL</i>	0	0

Como se puede observar el gen más frecuente fue *tst* con 45.7% (n=16) de abundancia, mientras que los genes con menor frecuencia fueron *eta*, *sec*, *seg* y *sei* con un 5.7% (n=2) cada uno. Los genes *PVL* y *seh* no se detectaron en ninguna cepa.

Las combinaciones de los genes de toxinas se muestran en la tabla 11.

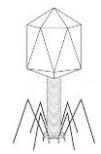
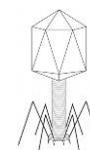


Tabla 11. Combinaciones de genes que codifican toxinas encontradas en este estudio.

Combinaciones	Combinaciones	Combinaciones
<i>eta + etb + tst + see</i>	<i>etb + hlg + sed + sei</i>	<i>hlg + sea + seb + see</i>
<i>tst + hlg + sea + seb + see</i>	<i>etb + tst + see</i>	<i>etb + tst + hlg + seg + sei</i>
<i>eta + sec + sed + see</i>	<i>tst + hlg + seb</i>	<i>tst + hlg + see + sej</i>
<i>tst + hlg</i>	<i>etb + tst + hlg + sea + seb + see</i>	<i>etb + tst + seb + sed + sej</i>
<i>tst + sea + seb + seg</i>	<i>tst + sea + sej</i>	<i>etb + tst + see</i>
<i>etb + hlg + sed + sei</i>	<i>etb + tst + hlg + see</i>	<i>etb + tst + hlg + seg + sei</i>



Distribución de genes que codifican toxinas en cepas que contienen grupos de fagos

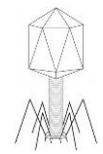
FAGOS TOXINAS	3A	11B	77F	77F sg. Fa	77F sg. Fb	187L	TwortD
<i>eta</i>	0	0	1	0	1	0	0
<i>etb</i>	1	1	7	1	4	0	0
<i>tst</i>	2	3	14	4	6	0	0
<i>hlg</i>	3	3	11	3	3	0	0
<i>PVL</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>sea</i>	0	1	4	0	3	0	0
<i>seb</i>	0	1	6	1	3	0	0
<i>sec</i>	0	0	1	0	1	0	0
<i>sed</i>	1	0	2	0	3	0	0
<i>see</i>	0	1	8	2	3	0	0
<i>seg</i>	0	0	2	0	1	0	0
<i>seh</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>sei</i>	1	1	2	0	2	0	0
<i>sej</i>	0	2	2	1	2	0	0

Resistencia fenotípica a oxacilina

Se detectó resistencia a oxacilina en 94.3% (n=33) de las cepas.

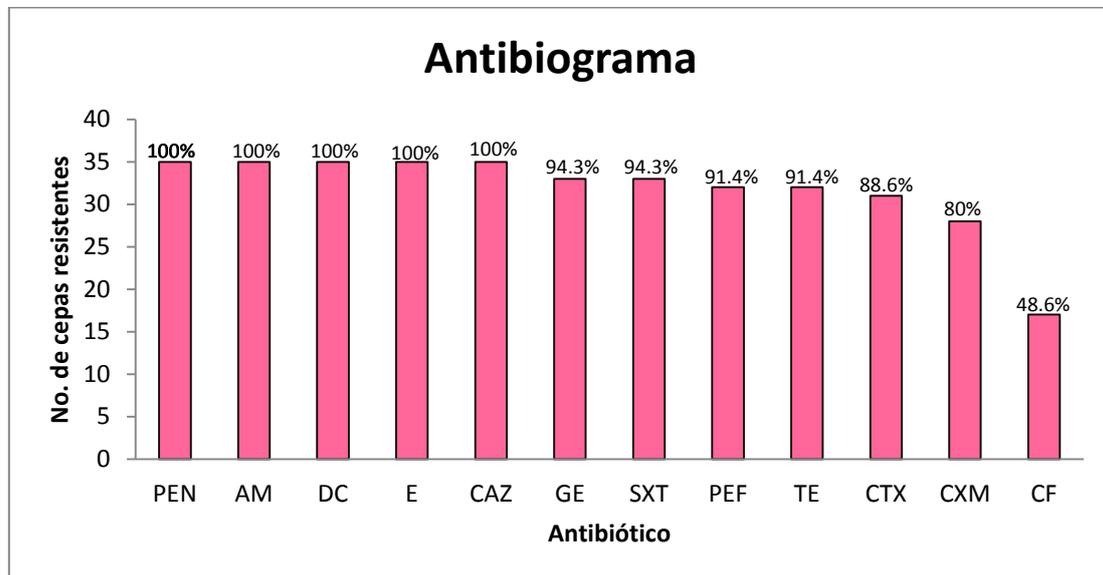
B-lactamasas

Se detectó la producción de β -lactamasas en 80% (n=28) de las cepas.



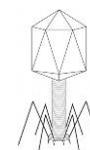
Kirby-Bauer

Los resultados de la prueba Kirby-Bauer se muestran en la gráfica 2.



Gráfica 2. PEN= Penicilina, AM= Ampicilina, DC= Dicloxacilina, E= Eritromicina, CAZ= Ceftazidima, GE= Gentamicina, SXT= Sulfametoxazol-Trimetoprim, PEF=Pefloxacina, TE= Tetraciclina, CTX= Cefotaxima, CXM= Cefuroxima, CF= Cefalotina.

Como puede observarse, prácticamente todas las cepas fueron resistentes a todos los antibióticos probados.



Discusión

Pacientes

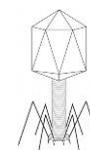
Las cepas usadas en este estudio fueron aisladas de infecciones en el sitio de inserción del catéter de pacientes sometidos a diálisis peritoneal. La enfermedad renal crónica es resultante de diversas enfermedades crónico-degenerativas, y las técnicas más utilizadas en el tratamiento de esta enfermedad son la hemodiálisis y la diálisis peritoneal. En México se estima una incidencia de 377 casos de pacientes con insuficiencia renal crónica por cada millón de habitantes (Amato *et al.*, 2005; Paniagua *et al.*, 2007).

Como se puede observar en la gráfica 1, el rango de edad de los pacientes de insuficiencia renal crónica, sometidos a diálisis peritoneal, que estudiamos es muy amplio; sin embargo el intervalo con mayor frecuencia (41-50 años) corresponde con lo reportado por Méndez-Durán y colaboradores, quienes en el 2010 analizaron los aspectos epidemiológicos de 10,921 pacientes de 127 hospitales generales de 21 estados de la República Mexicana, encontrando que la mayoría de los pacientes tenía edades entre los 40 a 50 años, y eran hombres (53%), lo que también corresponde a los resultados obtenidos en el presente estudio. En cuanto a microorganismos encontrados en los catéteres *S. aureus* se localizó en 31% de los casos (Méndez-Durán *et al.*, 2010).

Profagos

La presencia de profagos en las cepas es un factor de riesgo para el paciente, ya que debido al constante intercambio de información genética de manera horizontal entre bacterias, por transducción o por conversión lisogénica, los fagos podrían acarrear genes que codifiquen para factores de virulencia como toxinas, o bien conferirles resistencia a antibióticos a las cepas (Malachowa y DeLeo, 2010).

Por ejemplo, el gen *sea*, que codifica la enterotoxina A y es muy común entre las cepas de *S. aureus* implicadas en intoxicaciones alimenticias (Balaban y

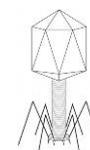


Rasooly, 2002) es llevado por una familia polimórfica de bacteriófagos lisogénicos. El fago portador del gen de la toxina se inserta en el cromosoma bacteriano y queda como un profago. Sin embargo bajo condiciones de estrés ambiental el profago puede ser inducido a la vía lítica para replicarse y liberar nuevos bacteriófagos (Schelin *et al.*, 2011), contribuyendo a la diseminación del gen *sea* cuando estos fagos infectan y lisogenizan a otras cepas de *S. aureus*. Los profagos pueden actuar en conjunto con otros elementos genéticos móviles en los estafilococos; por ejemplo, causando la movilidad de algunas islas de patogenicidad. El ejemplo más común de este fenómeno es la capacidad del fago auxiliar 80 α para mediar la escisión y transferencia de la isla de patogenicidad SaP11 a otros estafilococos (Fitzgerald *et al.*, 2001; Novick y Subedi, 2007). Detectamos a este fago en las cepas que estudiamos (grupo 11B, Tabla 8). Algunos fagos incluso pueden transferir resistencia a antibióticos, al movilizar a los plásmidos pS194 (que confiere resistencia a cloranfenicol) y pI258 (que confiere resistencia a eritromicina) los cuales son transferidos por los fagos ϕ 11, (grupo 11B, Tabla 8), y ϕ 11de, respectivamente (Jensen y Lyon, 2009).

En 2013 Vazharandal y colaboradores analizaron la relación de ciertos grupos de fagos estafilocócicos con la resistencia a antibióticos, estudiaron tres grupos: el grupo I contenía los fagos 29, 52, 52A, 79 y 80, el grupo II los fagos 3A, 3C, 55 y 71, y el grupo III que contenía los fagos 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84 y 85. Encontraron que en los tres grupos el 100% confería resistencia a penicilina; sin embargo, solo el grupo I transfirió también una resistencia del 100% a oxacilina. Los fagos 29, 52, 52A y 80 también fueron encontrados en nuestras cepas (grupo 11B, Tabla 8). Los fagos 3A y 3C también estuvieron presentes en nuestras cepas (grupo 3A, Tabla 8). En el grupo III están contenidos fagos de los grupos 3A, 11B, 77F y subgrupo Fa.

Genes que codifican toxinas

Del mismo modo la presencia de genes que codifican toxinas constituye un riesgo mayor para la salud del paciente, por ejemplo, los genes *seg* y *sei* (junto



con otros genes) están asociados al operón *egc*, que codifica para la formación de una enterotoxina (Sauer, *et al.*, 2008), que le confiere mayor virulencia a las cepas.

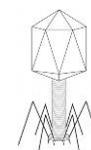
La toxina TSST-1 (síndrome de shock tóxico 1) es codificada por el gen *tst*. Esta toxina constituye un superantígeno y es una proteína altamente tóxica para el ser humano (Durand *et al.*, 2006). Este gen fue el que encontramos con mayor frecuencia en las cepas que estudiamos (Tabla 10), resultado que coincide con lo reportado por Campbell y colaboradores quienes en el 2008 reportaron una frecuencia del 73% en una colección de *S. aureus* aislados de pacientes. 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).

El gen que codifica la gama hemolisina *hlg* fue el segundo más frecuente entre las cepas que estudiamos (tabla 10). 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 de mamíferos. Su mecanismo de acción en el humano es la invasión de células huésped y penetración en los tejidos (Kaneko y Kamio, 2004).

Detectamos al gen *see* en el 25.7% de las cepas. Este resultado es de gran importancia desde el punto de vista clínico ya que la enterotoxina E posee un dominio de cisteínas potencialmente tóxico para el plasma sanguíneo y el estómago (Baker y Acharya, 2004).

La toxina exfoliativa B es codificada por el gen *etb*, el cual está situado en un plásmido; esta toxina tiene la capacidad de activar los linfocitos T y puede causar severos problemas a su hospedero. (Sahin *et al.*, 2012). Campbell y colaboradores en el 2008 reportaron la presencia de este gen en una colección de *S. aureus* aisladas de pacientes y obtuvieron una frecuencia de 39%.

La enterotoxina B es codificada por el gen *seb* y tiene la capacidad de activar los linfocitos T (DeGrasse, 2012). El gen *seb* se encontró en el 20% de las



cepas estudiadas en este trabajo. Kamarehei y colaboradores en el 2013, reportaron la prevalencia de los genes *sea* (61.3%) y *seb* (58.8%) en 95 cepas MRSA obtenidas de pacientes de la ciudad de Gorgan Irán.

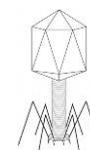
El gen *sea* codifica a la enterotoxina A y es muy común entre las cepas implicadas en la intoxicación alimenticia por *S. aureus* (Balaban y Rasooly., 2002). Detectamos al gen *sea* en este estudio en 14.3% de las cepas. Varios autores reportan que un porcentaje intermedio de las cepas portan al gen *sea* a pesar de que la toxina que codifica es la más común en las infecciones alimentarias. Por ejemplo, Nashev y colaboradores en el 2004 reportan que el gen *sea* se encontró en el 20.23% (n=20) de 87 aislamientos de *S. aureus*. Sin embargo otros autores, como Manfredi y colaboradores (2010) detectaron frecuencias bajas, (9 de 61 cepas; 14.8%) en *S. aureus* asociado a intoxicaciones alimentarias provenientes de diferentes provincias de Argentina. La enterotoxina D está codificada por el gen *sed*, y junto con la enterotoxina E comparten un 90 % de aminoácidos con la enterotoxina A (Baker y Acharya, 2004).

En este estudio encontramos una baja frecuencia del gen *sec*. Este resultado concuerda con el obtenido por Yan y colaboradores (2012), quienes analizaron 52 cepas de *S. aureus* y detectaron que solo el 7.7% portaba al gen *sec*. El gen *sec* codifica la enterotoxina C, la cual se considera como el principal superantígeno que promueve las células o linfocitos T, siendo uno de los precursores del shock tóxico (Salgado *et al.*, 2013).

El gen *sei* codifica a la enterotoxina I y el gen *seg* codifica la enterotoxina G (Balaban y Rasooly., 2002). Nashev y colaboradores en el 2007, reportaron que los genes *sei* y *seg* estuvieron presentes en un alto porcentaje 63.1% (n=55) de las cepas de *S. aureus* que se analizaron, en contraste con las otras 8 enterotoxinas analizadas.

Acción de los antibióticos asociada a factores de virulencia

Cuando un microorganismo prolifera, los signos y síntomas de la infección se vuelven más evidentes. Se propone que este proceso se debe a la gran cantidad de bacterias que provoca la habitual reacción inflamatoria (Castañón-Sánchez, 2012). No obstante, existe evidencia que sugiere que un antibiótico

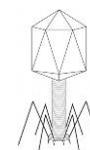


inadecuado favorece o acelera la virulencia de un organismo *in vivo*, incluyendo a las cepas que pueden ser solo consideradas como comensales (Lindsay y Holden, 2004).

En 1995 se demostró que la presencia del antibiótico nafcilina en cultivos de *S. aureus*, incrementa la expresión de la α -toxina y la letalidad de filtrados de cultivos administrados a ratas aumenta (Kernodle *et al.*, 1995). Estos hallazgos llevaron a la especulación de que la terapia a base de β -lactámicos podría aumentar la virulencia de algunas cepas de *S. aureus* y a su vez empeorar los síntomas de la infección severa. Otros antibióticos han sido probados para determinar su efecto en la expresión de *hla* en diferentes cepas de *S. aureus* (Ohlsen *et al.*, 1998). Se observó una fuerte inducción en la expresión de *hla* empleando concentraciones subinhibitorias de varios β -lactámicos, incluyendo a las cefalosporinas y el imipenem. Las fluoroquinolonas estimularon ligeramente la expresión de la α -toxina, los antibióticos glicopéptidos no tuvieron efecto alguno y con el empleo de eritromicina y aminoglicósidos se observó que se redujo la expresión de la toxina. Por otra parte aparentemente la expresión de *hla* inducida por metilicina puede ser un fenómeno común de cepas productoras de α -toxina, tanto en organismos sensibles como resistentes a metilicina. Algunas cepas de MRSA produjeron hasta 30 veces más toxina en presencia de 10mg/mL de metilicina comparado con el control (Ohlsen *et al.*, 1998; Essmann *et al.*, 2003).

La toxina PVL se ha establecido como un factor de virulencia asociado a cepas CA-MRSA (Boyle-Vavra y Daum, 2007). Cepas productoras de PVL expuestas a concentraciones subinhibitorias de antibióticos mostraron resultados similares a los descritos para la α -toxina. Clindamicina, linezolid y ácido fusídico inhibieron la producción de PVL, no así la vancomicina. Sin embargo, el uso de concentraciones subinhibitorias de oxacilina incrementó la liberación de la toxina PVL (Dumitrescu *et al.*, 2007).

Otra toxina asociada al síndrome del shock tóxico es la proteína TSST-1, la cual fue originalmente descrita en mujeres que utilizaban tampones. Solo existe un reporte de dos casos pediátricos, los cuales recibieron tratamiento previo

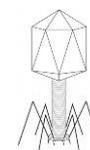


con cefalosporinas antes de observar un rápido deterioro que obligó a cambiar a una terapia más efectiva, sospechando de un efecto estimulador en la producción de la toxina TSST-1 debido al antibiótico empleado (Taylor *et al.*, 2006). Se ha reportado que el uso previo de antibióticos puede favorecer el síndrome del shock tóxico no menstrual, así como episodios recurrentes (Kain *et al.*, 1993; Andrews *et al.*, 2001).

Ciertos antibióticos tienen la capacidad de inducir la liberación de exotoxinas que incrementan los síndromes tóxicos relacionados con *S. aureus*. Sin embargo, diversos trabajos describen el uso efectivo de agentes que inhiben la producción de toxinas y, por lo tanto, atenúan los efectos virulentos del microorganismo (Bernardo *et al.*, 2004; Koszczol *et al.*, 2006). Además estos agentes tienen un efecto negativo en la regulación de la respuesta proinflamatoria del hospedero. Los antibióticos estreptogramina, quinupristina/dalfopristina, oxazolidinona y linezolidina reducen la inducción de la liberación del factor de necrosis tumoral activado por *S. aureus* (Bernardo *et al.*, 2004).

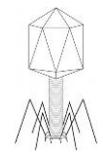
También se ha demostrado que el uso de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina en *S. aureus* resistente a fluoroquinolonas incrementa de manera significativa la expresión de adhesinas de unión a fibronectina. Esto conduce a un aumento en la adherencia de las células bacterianas a fibronectina inmovilizada en un modelo *in vitro* (Bsognano *et al.*, 1997; Otto, 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la importancia de los genes de bacteriófagos en las cepas clínicas de *S. aureus* causantes de infecciones asociadas a los catéteres en pacientes mexicanos.

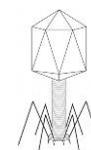


Referencias

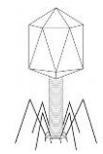
- Ackermann H.W. 1998. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. *Adv Virus Res* 51:135-201.
- Almeida R.A., K.R. Matthews, E. Cifrian. 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 79:1021-1026.
- Aman M.J., H. Karauzum, M.G. Bowden, T.L. Nguyen. 2010. Structural model of the pre-pore ring-like structure of panton-valentine leukocidin: providing dimensionality to biophysical and mutational data. *J Biomol Struc Dynam* 28:1-12.
- Amato D., C. Alvarez-Aguilar, R. Castañeda-Limones, E. Rodriguez, M. Avila-Diaz, F. Arreola, A. Gomez, H. Ballesteros, R. Becerril, R. Paniagua. 2005. Prevalence of chronic kidney disease in an urban Mexican population. *Kidn Int* 68:S11-7.
- Andrews M.M., E.M. Parent, M. Barry. 2001. Recurrent nonmenstrual toxic shock syndrome: clinical manifestation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis* 32:1471-1579.
- Archer G.L. 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis* 26:1179-1181.
- Archer G.L., J.M. Bosilevac. 2001. Microbiology. Signaling antibiotic resistance in staphylococci. *Science* 291:1915-1916.
- Archer N.K., M.J. Mazaitis, J.W. Costerton, J.G. Leid, M.E. Powers, M.E. Shirtliff. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms. *Virulence* 5:445-459.
- Baba T., T. Bae, O. Schneewind, F. Takeuchi, K. Hiramatsu. 2008. *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of Staphylococcal genomes: polymorphisms and evolution of two major pathogenicity islands. *J Bacteriol* 190:300-310.
- Baker M.D., K.R. Acharya. 2004. Superantigens: structure-function relationships. *Int J Med Microbiol* 293:529-537.
- Balaban N., Rasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 61(2000): 1–10.
- Bamberger D.M. y S.E. Boyd. 2005. Management of *Staphylococcus aureus* infections. *AmFamPhys* 72:2474–2481.



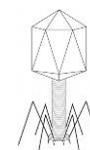
- Bannerman T.L., S.J. Peacock. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase positive cocci. En Murray P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, M.A. Pfaller (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC 2007; 9:390-411.
- Berger-Bachi B. 1994. Expression of resistance to methicillin. *Trends Microbiol* 2:389-393.
- Bernardo K., N. Pakulat, S. Fler. 2004. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother* 48:546-555.
- Bhakdi S., J. Tranum-Jensen. 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* 4:733-751.
- Boyle-Vavra S., R.S. Daum. 2007. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The role of Pantone-Valentine leukocidin. *Lab Invest* 87:3-9.
- 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). *J Biol Chem*. 287: 32578-32587.
- Brezzo C., D. Cecchini, F. Biscione, T. Orduna, N. Costa, M. Quinteros. 2006. Enfermedad invasora por *Staphylococcus aureus* metilino resistente adquirida en la comunidad. *Med* 66:443-446.
- Brussow H., C. Canchaya, W.D. Hardt. 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: From genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:560-602.
- Bsognano C., P.E. Vaudaux, D.P. Lew. 1997. Increased expression of fibronectin-binding proteins by fluoroquinolone-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 41:906-913.
- Bustos-Martínez J.A., A. Hamdan-Partida y M. Gutiérrez-Cárdenas. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomedica* 17:287-305.



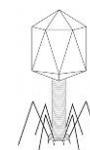
- Campbell S.J., H.S. Deshmukh, C.L. Nelson, I. Bae, M.E. Stryjewski, J.J. Federspiel, G.T. Tonthat, T.H. Rude, S.L. Barriere, R. Corey, V.G. Fowler Jr. 2008. Genotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from a Multinational Trial of Complicated Skin and Skin Structure Infections. *J Clin Microbiol* 46:678-684.
- Canchaya C., C. Proux, G. Fournous, A. Bruttin, H. Brussow. 2003. Prophage Genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:238-276.
- Castañón-Sánchez C.A. 2012. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Evid Med Inves Salud* 5(3):79-84.
- Chambers H.F. 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 10:781-791.
- Choi P. 2003. Peritoneal Dialysis. *Medicine* 31(6): 70-73.
- Coleman D.C., D.J. Sullivan, R.J. Russell, J.P. Arbutnott, B.F. Carey, H.M. Pomeroy. 1989. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J Gen Microbiol* 135:1679-1697.
- Crowe M., P. Ispahani, H. Humphreys, T. Kelley, R. Winter. 1998. Bacteremia in the adult intensive care unit of a teaching hospital in Nottingham UK, 1985-1996. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17:377-384.
- Cruz C., J. Montenegro, M.J. Olivares. 1994. Diálisis peritoneal. *Editorial Trillas, México*. 590p
- Dancer S.J. 2008. The effect of antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chem* 61:246-253.
- De Cueto M., Á. Pascual. Microbiología y patogenia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. En Pahissa A. (ed). Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. ICG Marge, Barcelona, España 2009; 1:15-31.
- Deghorain M., L. Van Melderen. 2012. The Staphylococci Phages Family: An Overview. *Viruses* 4:3316-3335.



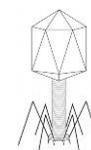
- DeGrasse J. A. 2012. A single stranded that selectively binds to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Plos one*. 7(3): e33410.
- Douthwaite S. 1992. Functional intecartions within 23S rRNA involving the peptidyltransferase center. *J Bacteriol* 174:1333-1338.
- Dumitrescu O. S. Boisset, C. Badiou. Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* production of Panton-Valentine leukocidin. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1515-1519.
- 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. *J Clin Microbiol*. 44(3):847-853.
- Enright M.C., D.A. Robinson, G. Randle, E.J. Feil, H. Grundmann, B.G. Spratt. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7687-7692.
- Essmann F., H. Bantel, G. Totzke, H. Engels, B. Sinha, K. Schulze-Osthoff, R.U. Jänicke. 2003. *Staphylococcus aureus* α -toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cel Death Differ* 10:1260-1272.
- Feng Y., C.J. Chen, L.H. Su, S. Hu, J. Yu, C.H. Chiu. 2008. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* 32:23-37.
- Fitzgerald J.R., S.R. Monday, T.J. Foster, G.A. Bohach, P.J. Hartigan, W.J. Meaney, C.J. Smyth. 2001. Characterization of putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J Bacteriol* 183:63-70.
- Fluckiger U., M. Ulrich, A. Steinhuter, G. Döring, D. Mack, R. Landmann, C. Goerke, C. Wolz. 2005. Biofilm Formation. *IcaADBC* Transcription and Polysaccharide Intercellular Adhesins Synthesis by Staphylococci in a Device-Related Infection Model. *Ame Soc Microbio* 73(3):1811-1819.



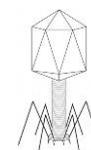
- Foster T.J. 2005. Immune evasion by *Staphylococci*. *Nat Rev Microbiol* 3:948-958.
- Foster T.J., M. Hook. 1998. Surface protein adhesions of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 6:484-488.
- García P., B. Martínez, J.M. Obeso, R. Lavigne, R. Lurz, A. Rodríguez. 2009. Functional genomic analysis of two *Staphylococcus aureus* phages isolated from the dairy environment. *Environ Microbiol* 75:7663-7673.
- Ghuysen J.M. 1994. Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol* 2:372-380.
- Goerke C., R. Pantucek, S. Holtfreter, B. Schulte, M. Zink, D. Grumann, B.M. Broker, J. Doskar, C. Wolz. 2009. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *J Bacteriol* 191:3462-3468.
- Gordon R.J., F.D. Lowy. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 46:S350-S359.
- Gregory P.D., R.A. Lewis, S.P. Curnock, K.G. Dyke. 1997. Studies of the repressor (Blal) of beta-lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 24:1025-1037.
- Haddad L.E., S. Moineau. 2013. Characterization of a Novel Pantone-Valentine Leukocidin (PVL)-Encoding Staphylococcal Phage and Its Naturally PVL-Lacking Variant. *App Env Microbiol* 79(8):2828-2832.
- Hanaki H., H. Labischinski, Y. Inaba, N. Kondo, H. Murakami, K. Hiramatsu. 1998. Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother* 42:315-320.
- Hartman B.J., A. Tomasz. 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 158:513-516.
- Hatfull G.F. 2008. Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol* 11:447-453.



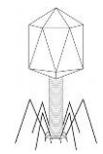
- Heikens E., A. Fleer, A. Paauw, A. Florijn, A.C. Fluit. 2005. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococci*. *J Clin Microbiol* 43:2286-2290.
- Hernaldo L. *Nefrología clínica*. 2a ed. Editorial Panamericana, Madrid, 1997. 954p.
- Hiramatsu K., N. Aritaka, H. Hanaki, S. Kawasaki, Y. Hosoda, S. Hori, Y. Fukuchi, I. Kobayashi. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 40:135-136.
- Holden M.T., E.J. Feil, J.A. Lindsay, S.J. Peacock, N.P. Day, M.C. Enright, T.J. Foster, C.E. Moore, L. Hurst, R. Atkin, A. Barron, N. Bason, S.D. Bentley, C. Chillingworth, T. Chillingworth, C. Churcher, L. Clarck, C. Corton, A. Cronin, J. Doggett, L. Dowd, T. Feltwell, Z. Hance, B. Harris, H. Hauser, S. Holroyd, K. Mungall, D. Ormond, M.A. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, M. Sanders, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, S. Whitehead, B.G. Barrell, B.G. Spratt, J. Parkhill. 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9786-9791.
- Hooper D.C. 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis* 2:530-538.
- Hurtado M.P. 2002. *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Rev Soc Ven Microbiol* 22(2):1-13.
- Jensen S.O., B.R. Lyon. 2009. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol* 4:565-582.
- Jones S.M., M. Morgan, T.J. Humphrey, S.H. Lappin. 2011. Effect of vancomycin and rifampin on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet* 357:40-41.



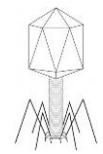
- Kain K.C., M. Schulzer, A.W. Chow. 1993. Clinical spectrum of nonmenstrual toxic shock syndrome (TSS) comparison with menstrual TSS by multivariate discriminant analyses. *Clin Infect Dis* 16:100-106.
- Kamarehei F., Ghaemis D. A. & Dadgar T. 2013. Prevalence of enterotoxin A and B in *Staphylococcus aureus* isolates from clinical samples and healthy carriers in Gorgan city, north of Iran. *Indian J Path Microbiol* 56(3):265-268.
- Kaneko J., Y. Kamio. 2004. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures pore-forming mechanism organization of genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:981-1003.
- Kaplan M.H., M.J. Tenenbaum. 1982. *Staphylococcus aureus*: cellular biology and clinical application. *Ame J Med* 12:248.
- Kernodle D.S., P.A. McGraw, N.L. Barg. 1995. Growth of *Staphylococcus aureus* with nafcillin *in vitro* induces a-toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model. *J Infect Dis* 172:410-419.
- Kernodle D.S. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. En *Gram-positive pathogens*. Fischetti V.A., R.P. Novick, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy, J.I. Rood (eds.) American Society for Microbiology, Washington DC, USA 2000; 2006p.
- Kim M.S., H. Myung. 2012. Complete Genome of *Staphylococcus aureus* Phage SA11. *J Virol* 86:10232.
- Kong K., C. Vuong, M. Otto. 2006. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol* 296:133-139.
- Koszczol C., K. Bernardo, M. Kronke. 2006. Subinhibitory quinupristin/dalfopristin attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 58:564-574.
- Krisch H.M., A.M. Comeau. 2008. The immense journey of bacteriophage T4-from d'Herelle to Delbruck and then to Darwin and beyond. *Res Microbiol* 159:314-324.



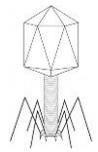
- Kubica M., K. Guzik, J. Koziel, M. Zarebski, W. Richter. 2008. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* 1:e1409.
- Kuroda M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357:1225-1240.
- Kwan T., J. Liu, M. DuBow, P. Gros, J. Pelletier. 2005. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5174-5179.
- Lindsay J.A. 2010. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 300:98-103.
- Lindsay J.A., M.T. Holden. 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug super genome? *Trends Microbiol* 12:378-385.
- Lobočka M., M.S. Hejnowicz, K. Dabrowski, A. Gozdek, J. Kosakowski, M. Witkowska, M.I. Ulatowska, B. Weber-Dabrowska, M. Kwiatek, S. Parasion, J. Gawor, H. Kosowska, A. Glowacka. 2012. Genomics of staphylococcal Twort-like phages-potential therapeutics of the post-antibiotic era. *Adv Virus Res* 83:143-216.
- Lowy F.D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111:1265-1273.
- Lugo G. 1998. Bacteriología Médica. *Editorial Cuellar*, Guadalajara, Jalisco. 630p.
- Malachowa N., F.R. DeLeo. 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci* 67:3057-3071.
- 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 Microbiol* 42(3):212-215.



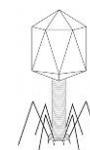
- Mann N.H. 2008. The potential of phages to prevent MRSA infections. *Res Microbiol* 159:400-405.
- Marple P.A.C., J.M.T. Hamilton-Miller, W. Brumfitt. 1989. World-wide antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* i:537-540.
- Martín-López J.V., Díez-Gil O., Morales M., Bautista N., Villar J., Claverie-Martín F., Méndez-Álvarez S. 2004. Simultaneous PCR detection of *ica* cluster and methicillin and mupirocin resistance genes in catheter-isolated *Staphylococcus*. *Int Microbiol* 7:63-66.
- Martín-López J.V, Perez-Roth E., Claverie-Martin F., Diez-Gil O., Batista N., Morales N.M, Mendez-Alvarez S. 2002. Detection of *Staphylococcus aureus* clinical isolates harboring the *ica* gene cluster needed for biofilm establishment. *J Clin Microbiol* 40:1569–1570.
- Martínez J. 2004. Enfermedad renal crónica: Indicaciones para remitir pacientes desde el nivel de atención primaria al nivel de especialista en nefrología. Ventajas del envío precoz. Estrategias para en seguimiento conjunto. *Nefrología* 24(6).
- Mehrotra M., G. Wong, W.M. Johnson. 2000. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. *J Clin Microbiol* 38(3):1032-1035.
- Méndez-Durán A., J.F. Méndez-Bueno, T. Tapia-Yáñez, A.M. Montes, L. Aguilar-Sánchez. 2010. Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Dial Trasp* 31(1):7-11.
- Moskowitz S.M., P.W. Wiener-Kronish. 2010. Mechanism of bacterial virulence in pulmonary infections. *Curr Opin Crit Care* 16:8-12.
- Murray P.R., K.S. Rosenthal, G.S. Kobayashi, M.A. Pfaller (eds.). 2006. *Microbiología médica*, 4ª edición. Ed. Elsevier, Madrid, España. 810p.
- Nashev D., K. Toshkova, S.I.O. Salasia, A.A. Hassan, C. Lammler, M. Zschock. 2004. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol Lett* 233:45-52.



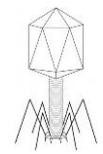
- Ng E.Y., M. Trucksis, D.C. Hooper. 1996. Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: relationship to the flqA locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1881-1888.
- Novick R., A. Subedi. 2007. The SaPIs: mobile pathogenicity islands of staphylococcus. *Chem Immunol Allergy* 93:42-57.
- O'Flaherty S., A. Coffey, R. Edwards, W. Meaney, G.F. Fitzgerald, R.P. Ross. 2004. Genome of Staphylococcal Phage K: a New Lineage of Myoviridae Infecting Gram-Positive Bacteria with a Low G+C Content. *J Bacteriol* 186:2862-2871.
- O'Gara J.P. 2007. Ica and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 207:179-188.
- O'Riordan K., J.C. Lee. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol* 17:218-234.
- Ohlsen K., W. Ziebuhr, K.P. Koller. 1998. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on α -toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2817-2823.
- Otto M. 2010. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* 64:143-162.
- Paniagua R., A. Ramos, R. Fabian, J. Lagunas, D. Amato. 2007. Peritoneal dialysis in Latin America, chronic kidney disease and dialysis in Mexico. *Perit Dial Internat* 27:405-409.
- Paniagua-Contreras G., Sáinz-Espuñez T., Monroy-Pérez E., Rodríguez-Moctezuma J.R., Vaca S. 2012. Virulence markers in *Staphylococcus aureus* strains isolated from hemodialysis catheters of Mexican patients. *Adv Microbiol* 2:476-487.
- Pantucek R., J. Doskar, V. Ruzicková, P. Kaspárek, E. Oráčová, V. Kvardová, S. Rosypal. 2004. Identification of bacteriophage types and their carriage in *Staphylococcus aureus*. *Arch Virol* 149:1689-1703.



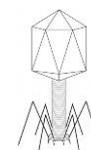
- Patti J.M., T. Bremel, D. Krajewska-Pietrasik, A. Abdelnour, A. Tarkowski, C. Ryden, M. Hook. 1994. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesión is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun* 62:152-162.
- Peacock S.J. *Staphilococcus*. En Borriello S.P., P.R. Murray, G. Funke (eds.). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial infection. Hodder Arnold, London 2005; 10:771-832.
- Prabhakara S., S. Khedkar, S.M. Shambat, R. Srinivasan, A. Basu, A. Norrby-Teglund, A.S.N. Seshasayee, G. Arakere. 2013. Genome Sequencing Unveils a Novel Sea Enterotoxin-Carrying PVL Phage in *Staphylococcus aureus* ST772 from India. *Plos ONE* 8(3):e60013.
- Prevost G., Couppie P., Prevost P., Gayet S., Petiau P., Cribier B. & Monteil H. 1995. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol* 42:237-245.
- Prince L.R., K.J. Graham, J. Connolly, S. Anwar, R. Ridley. 2012. *Staphylococcus aureus* induced eosinophil cell death mediated by a hemolysin. *PloS ONE* 2:e31506.
- Rigby K.M., F.R. DeLeo. 2012. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Semin Immunopathol* 34:237-259.
- Rodríguez-Luzón M.A., J. Rodríguez-Baño. Infecciones por estafilococos. En Ausina-Ruiz V., S. Moreno-Guillen (eds.). Tratado de SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Panamericana, Madrid 2005; 253-282.
- Rodríguez G., I. Rodríguez. 2004. Disfunción familiar en pacientes con insuficiencia renal crónica. *Rev Med IMSS* 42(2):97-102.
- Rosato A.E., B.N. Kreiswirth, W.A. Craig, w. Eisner, M.W. Climo, G.L. Archer. 2003. *mecA-blaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1460-1463.



- 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 J Microbiol* 59(4):260-265.
- 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.
- Sanabria G. 2008. Evolución de la resistencia en *Staphylococcus aureus*. *Rev Inst Med Trop* 3(2):27-39.
- Sauer P., J. Síla, T. Šosová, R. Večeřová, P. Hejnar, I. Vágnerová, M. Kolář, V. Raclavský, J. Petrželová, Y. Lovečková, D. Koukalová. 2008. Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the University Hospital, Olomouc, Czech Republic. *J Med Microbiol* 57:403-410.
- 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. *Land bioscience*. 2(6):580-592.
- Sellarés V.L., R.A. Torres, M.D. Hernández, J.C. Ayus. 1998. Manual de nefrología clínica, diálisis y trasplante renal. *Editorial Harcourt Brace*, España. 1095p.
- Seral C., M. Barcia-Macay, M.P. Migeot-Leclercq. 2005. Comparative activity of quinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin and garenoxacin) against extracellular and intracellular infection by *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in J774 macrophages. *J Antimicrob Chemother* 55:511-517.
- Showsh S.A., E.H. De Boever, D.B. Clewell. 2001. Vancomycin resistance plasmid in *Enterococcus faecalis* that encodes sensitivity to a sex pheromone also produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2177-2178.



- Shukla S.K., M. Pantrangi, B. Stahl, A.M. Briska, M.E. Stemper, T.K. Wagner, E.B. Zentz, S.M. Callister, S.D. Lovrich, J.K. Henkhaus, C.W. Dykes. 2012. Comparative Whole-Genome Mapping To Determine *Staphylococcus aureus* Genome Size, Virulence Motifs, and Clonality. *J Clin Microbiol* 50(11):3526-3533.
- Sieradzki K., R.B. Roberts, S.W. Haber, A. Tomasz. 1999. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med* 340:517-523.
- Son J.S., S.J. Lee, S.Y. Jun, S.J. Yoon, S.H. Kang, H.R. Paik, J.O. Kang, Y.J. Choi. 2010. Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1439-1449.
- Song M.D., M. Wachi, M. Doi, F. Ishino, M. Matsushashi. 1987. Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett* 221:167-171.
- Soriano S. 2004. Definición y clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica. Claves para el diagnóstico precoz. Factores de riesgo de enfermedad renal crónica. *Nefrología* 24(S6):27-34.
- Struthers K.J., P.R. Westran. 2005. Bacteriología clínica. Masson, Barcelona 192p.
- Suzuki H., T. Lefebure, P.P. Bitar, M.J. Stanhope. 2012. Comparative genomic analysis of the genus *Staphylococcus* including *Staphylococcus aureus* and its newly described sister species *Staphylococcus simiae*. *BMC Genom* 13:38.
- Szmigielski S., G. Prevost, H. Monteil, D.A. Colin, J. Jeljaszewicz. 1999. Leukocidal toxins of staphylococci. *Zentralbl Bakteriol* 289:185-201.
- Taylor C.M., F.A. Riordan, C. Graham. 2006. New football boots and toxic shock syndrome. *BMJ* 332:1376-1378.
- Utsui Y., T. Yokota. 1985. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 28:397-403.



- Valeva A., I. Walev, M. Pinkernell, B. Walker, H. Bayley, M. Palmer, S. Bhakdi. 1997. Transmembrane beta-barrel of staphylococcal alpha-toxin forms in sensitive but not resistant cells. *Proc Natl Acad Sci* 94:11607-11611.
- Van Wamel W., S. Rooijackers, M. Ruyken, K. Van Kessel, J. Van Strijp. 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol* 188:1310-1315.
- Vazhavandal G., B.G.B. Vallab, A. Uma, P.R. Chitra, P.K.S. Thirumalai. 2013. *Staphylococcus aureus* phage groups and their relation to antibiotic resistance pattern in a tertiary care hospital, south Tamil Nadu. *J Evol Med Dent Sciences* 2(29):5366-5374.
- Vybiral D., M. Takac, M. Loessner, A. Witte, U. von Ahsen, U. Blasi. 2003. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of two lytic *Staphylococcus aureus* phages: 44AHJD and P68. *FEMS Microbiol Lett* 219:275-283.
- Walsh T.R., R.A. Howe. 2002. The prevalence and mechanisms of mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* 56:567-675.
- Wertheim H.F., D.C. Melles, M.C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H.A. Verbrugh, J.L. Nouwen. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5:751-762.
- 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. *App Env Microbiol* 78(18):6637-6642.
- Yarwood J.M., P.M. Schlievert. 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest* 112:1620-1625.
- Zhang H.Z., C.J. Hackbarth, K.M. Chansky, H.F. Chambers. 2001. A proteolytic transmembrane signalling pathway and resistance to betalactams in staphylococci. *Science* 291:1962-1965.