



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

TESIS PROFESIONAL

**“Asociación de profagos con marcadores de virulencia
en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

ESTEPHANIA ORTEGA SAUCEDO

Director de Tesis

Dr. Sergio Vaca Pacheco

Financiado por UNAM-DGAPA PE203714

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Estado de México

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por la oportunidad de formarme como una gran universitaria y bióloga en la mejor universidad del país.

Al PAPIME por el financiamiento para llevar a cabo el presente proyecto.

Al laboratorio de análisis clínicos de la CUSI Iztacala.

A los profesores Eric Monroy Pérez, Susana Esther Gonzales Almazán y Alina Uribe García, por su paciencia, sus enseñanzas y grandes aportaciones al proyecto y a mi formación profesional.

A los doctores Gloria Paniagua Contreras y Sergio Vaca Pacheco por la aceptación y la calidez brindada, así como por la ocurrencia y gracia con la que les otorgaron sabios consejos.

A toda mi familia por la felicidad y los logros compartidos.

A mis padres por enseñarme a tomar cada una de las adversidades como experiencias de vida para seguir adelante; por los cimientos y grandes pilares que dieron a mi carácter y educación, por hacerme independiente y responsable, pero, sobre todo por estar a mi lado siempre apoyando mis decisiones y compartiendo cada una de las metas logradas como el buen equipo que hemos sido desde siempre.

A mi hermana por aguantar el mal carácter, mi estrés académico, mis desveladas y el poco tiempo de convivencia, además, de ser mi principal apoyo en las noches de estudio, memorizando cada uno de los nombres científicos.

A Don Pepe por las mejores etapas de mi vida, la compañía y por la complicidad bajo cualquier circunstancia; por las buenas y malas experiencias por enseñarme a luchar por lo que quiero y a nunca dejar de soñar, simplemente por siempre creer en mí, por siempre estar conmigo.

A Aldair por la compañía durante esta travesía, por la comprensión, las ganas y el entusiasmo que daba a mi persona, por siempre darme ánimos y saber exactamente cuando necesitaba un abrazo y una palabra de aliento.

A mis amigos y profesores.

ÍNDICE

Introducción.....	5
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	
1.2 Factores de virulencia	
1.3 Patologías causadas por <i>S. Aureus</i>	
1.4 Resistencia a los antibióticos	
1.5 Recombinación genética	
1.6 Bacteriofagos	
Objetivos.....	19
Metodología.....	20
3.1 Extracción de DNA	
3.2 Detección profagos	
3.3 Identificación de las cepas	
3.4 Identificación de genes que codifican para toxinas	
3.5 Antibiograma	
3.6 Detección del gen <i>mecA</i>	
3.7 Análisis de los amplicones	
3.8 Producción de β lactamasas	
3.9 Resistencia a oxacilina	
Resultados.....	24
4.1 Detección de profagos	
4.2 Genes codificantes para toxinas	
4.3 Resistencia a antibióticos	
4.4 Detección de <i>mecA</i>	
Discusión.....	30
6.1 Detección de profagos	
6.2 Genes codificantes para toxinas	

6.3 Resistencia a atibióticos

6.4 Producción de β lactamasas

6.5 Detección del gen *mecA* y resistencia a oxacilina

Literatura citada..... 36

1. Introducción

1.1 *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo de 0.8 a 1µm de diámetro y no produce esporas. Es aerobio y anaerobio facultativo, hemolítico, no móvil, produce catalasa pero no oxidasa (Roch. 1962). Estas bacterias pueden crecer en medios con NaCl al 10% a una temperatura que fluctúa entre 18°C y 40°C (Murray *et al.*, 2006). Su principal característica es la coloración dorada de sus colonias debido a la producción de carotenoides. Sus células se agrupan como racimos de uvas (Walker, 1999; Struthers y Westran, 2005).

S. aureus crece formando colonias lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, que presentan una consistencia cremosa. Casi todas las cepas tienen un halo de media hemólisis o hemólisis completa alrededor de la colonia, cuando crecen en medios de cultivo con sangre.

El genoma *S. aureus* está constituido por un cromosoma circular de aproximadamente 2.8×10^6 pb, además de profagos, plásmidos y transposones. Los genes responsables de la virulencia y de la resistencia a antimicrobianos se hallan en el cromosoma y en los elementos extra cromosómicos (Hurtado, 2002).

1.2 Factores de virulencia

Un factor de virulencia es una cualidad que le otorga a la bacteria cierto grado de patogenicidad, permitiéndole así la sobrevivencia y permanencia en su hospedero. *S. aureus* posee factores de virulencia que suelen ser de distintos tipos: estructurales, toxinas, enzimas, entre otros. (Tabla 1.)

Entre los factores estructurales más importantes se encuentran las adhesinas, que son proteínas de adhesión a la matriz extracelular (MSCRAMMS). Estas moléculas permiten la adherencia de las bacterias a materiales sintéticos, tales como los de un catéter o un implante, debido a la formación de una biopelícula.

Además de las proteínas de adhesión, la estructuración de una biopelícula requiere de un polímero llamado N-acetil glucosamina, el cual, está codificado por el operón *ica*, que poseen algunas cepas de *S. aureus*, sin embargo, cepas que no poseen dicho operón han formado biopelícula, lo que sugiere que cuentan con una vía alterna para realizarlo (Castañón-Sánchez, 2012).

Otro de los factores estructurales importantes es la proteína A, la cual es una proteína de superficie que tiene propiedades antifagocíticas, basadas en la unión a la porción Fc de las inmunoglobulinas (Hurtado *et al.*, 2002), logrando de esta manera impedir la función opsonizante.

S. aureus produce una gran cantidad de toxinas que pueden clasificarse, de acuerdo a su función, en citotoxinas, superantígeno de la toxina pirogénica y toxinas exfoliativas (Hurtado *et al.*, 2002).

Tabla 1. Principales factores de virulencia de *S. aureus*. Martínez-Bustos, 2006.

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

Uno de los grupos importantes es el formado por las toxinas pirogénicas superantígenos (PTSAgs), esta familia incluye a la toxina *TST-1*, y a la mayoría de las enterotoxinas staphylocócicas (*SEA*, *SEB*, *Secn*, *SED*, *SEE* y *SEH*).

La ingestión de alimentos contaminados con *S. aureus* ha sido largamente relacionada con gastroenteritis, manifestada clínicamente como vómito con o sin diarrea. Esta condición se llama intoxicación alimenticia staphylocócica (SFP) y se debe a la acción de una o más enterotoxinas preformadas en alimentos que han sido contaminados por *S. aureus*. La SFP es una enfermedad auto limitada que termina de 24 a 48 hrs después de su inicio.

Dentro de las enterotoxinas se encuentra la toxina A, que tiene como función inhibir la respuesta inicial del hospedero, siendo la más toxica de todas y la responsable del 80% de las intoxicaciones alimentarias (Siqueiros—Cendón *et al.*, 2007).

Todas las enterotoxinas se caracterizan por tener actividad inmunoreguladora de los superantígenos. Estudios moleculares han permitido saber que la superantigenicidad y la capacidad de causar SFP se determinan por partes

separadas de la proteína. Las enterotoxinas se pueden separar en dos grupos; *SEB* y *SEC* son conocidas como la causa no menstrual del síndrome del shock tóxico.

S. aureus produce moléculas citotóxicas que pueden dividirse en cuatro tipos, debido al grado de hemólisis que estas causan, hemólisin (alfa, beta, gama) y la Pantón Valentine leucocidina.

Alfa hemolisina. Es la más examinada de las exotoxinas de *S. aureus*. Un alto porcentaje de cepas la producen y es tóxica para un amplio rango de células de mamífero; se ha reportado que 1 µg inyectado a un conejo por vía intravenosa puede ser letal.

Es una proteína que en su forma madura tiene un peso molecular de 33,000 Da, no contiene cisteínas y en su forma secundaria se compone de β-plegamientos en un 65% y α hélices, en un 10%. Esta proteína está codificada por el gen *hla*, el cual se encuentra bajo el control de un gen accesorio regulador que es el *agr* (Dinges *et al.*, 2000).

La principal característica que distingue a la alfa hemolisina es la capacidad de lisar los eritrocitos; esto se debe a que una vez que el heptámetro cilíndrico se une a la membrana celular se forma un poro de 1 a 2 nm, lo cual permite el transporte desmedido de diversos iones. Se ha observado que la unión de esta proteína a la membrana puede ser de dos formas distintas, cuando la toxina se encuentra en bajas concentraciones, se une de manera específica a un receptor cuya identidad se desconoce; en cambio, cuando la toxina se encuentra en altas concentraciones se une de manera inespecífica (Dinges *et al.*, 2000).

La actividad que presenta la alfa hemolisina sobre diversos organismos es de tipo neurotóxico y dermonecrótico, por lo que se considera a esta toxina como parte importante de las infecciones por *S. aureus*; sin embargo, la participación de la toxina en enfermedades humanas no ha sido irrefutablemente establecida (Dinges *et al.*, 2000).

Beta hemolisina. La primera beta hemolisina fue identificada en 1931 por Glenny y Stevens, quienes encontraron que la actividad hemolítica se ve mejorada a 10°C después de un tratamiento a 37°C, debido a esto se le llamó hemolisina “frío – caliente”.

La beta hemolisina es una exotoxina con un peso molecular de 35,000 Da, fue clonada por Pojan, está codificada por el gen *hly*; es secretada en gran cantidad por un gran número de cepas, sobre todo por las aisladas de animales. En 1963 se descubrió que presenta actividad de fosforilasa en presencia de Mg y es limitada específicamente con esfingomielina y

fosfatodilcolina; su afinidad por los eritrocitos se mide en función de la cantidad de esfingomielina que estos tienen.

Gama hemolisina y PVL leucocidina. Estas toxinas no se secretan de manera asociada, afectan neutrófilos y macrófagos. Adicionalmente, la gama hemolisina es capaz de lisar los eritrocitos de algunos animales.

Los marcos de lectura que se han reconocido como genes de gama hemolisina son *hlgA*, *hlgC* y *hlgB*, los dos últimos se transcriben en un mismo ARNm y *hlgA* se transcribe en un ARNm expresado por separado. Los genes que codifican para PVL fueron clonados y secuenciados por Prevost y son *lucS-PVL* y *luckF-PVL* (Dinges, *et al.*, 2000).

La toxina TSST-1 es la causante del síndrome del shock tóxico, el cual es una enfermedad aguda caracterizada por fiebre, erupción, hipotensión, disfunción del sistema multiorgánico, y descamación. El desarrollo de este síndrome requiere colonización vaginal o la infección por una cepa productora de la toxina de *S. aureus* en ausencia de anticuerpo positivo contra la toxina (Parsonnet, *et al.*, 2008).

A principios de la década de 1980 se produjo una epidemia de TST entre las mujeres y jóvenes en los Estados Unidos. Casi todos estos casos fueron relacionados con la menstruación y el uso de tampones (particularmente los de mayor absorción), así como con la colonización cervical o vaginal. TSST-1 es el único PTSAg conocido capaz de causar el síndrome de shock tóxico de fuentes intravaginales, lo que es probablemente debido a la capacidad de atravesar superficies mucosas.

La TSST fue la primera toxina marcadora para el síndrome del shock tóxico y actualmente se acepta como el 100% de la causa de este síndrome asociado a la menstruación (Dinges, *et al.*, 2000).

Entre las enzimas que son factores de virulencia se encuentra la coagulasa. Esta proteína se une a la protrombina, transformándola en trombina y ésta última actúa sobre el fibrinógeno transformándolo en fibrina, lo que provoca la aglutinación de *S. aureus*. La importancia en la patogenia radica en que esta enzima causa la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso que interviene con la fagocitosis (Martínez-Bustos, 2006).

1.3 Patologías causadas por *S. aureus*

S. aureus es una bacteria oportunista, que puede comportarse como un agente comensal o como un agente patógeno, se ha detectado que aproximadamente el 20 o 30% de la población humana lo tiene de manera comensal.

La mucosa nasal es el sitio principal que coloniza *S. aureus* en el ser humano y se considera que posteriormente a dicha colonización continúa la infección, ya

que esta mucosa actúa como reservorio de la misma cepa. La bacteria puede difundir a nivel local o tener acceso al torrente sanguíneo. Una vez en la sangre, *S. aureus* puede propagarse a sitios periféricos en órganos distantes. Como resultado de esta diseminación, se pueden presentar diversas infecciones (Castañon-Sanchez, 2012).

S. aureus puede ser responsable de bacteriemia asociada a catéter venoso central y neumonía asociada a ventilación mecánica (Castañon-Sanchez, 2012). De la misma manera es una de las principales causas de infecciones que pueden llegar a endocarditis, intoxicaciones alimenticias y neumonía necrotizante fatal (Bamberger y Boyd, 2005).

La capacidad de *S. aureus* para causar infecciones, se debe en parte a la asociación de sus proteínas de matriz extracelular llamadas MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) (Corrigan *et. al.* 2007) con superficies bióticas, o abióticas, como los catéteres que se utilizan en los pacientes que padecen insuficiencia renal crónica.

1.4 insuficiencia renal (IRC)

La insuficiencia renal es un síndrome que se caracteriza por la disminución del volumen y la calidad del filtrado glomerular. En 2002 la National Kidney Foundation definió esta patología como “la presencia de daño renal con una duración igual o mayor a tres meses, caracterizado por anormalidades estructurales o funcionales con o sin descenso de la tasa de filtración glomerular (TFG) a menos de 60ml/min/1.73m²”.

Generalmente la insuficiencia renal crónica se presenta como complicación de patologías alternas, las cuales pueden agruparse en enfermedades vasculares, glomerulares, túbulo intersticiales y uropatías obstructivas.

Actualmente en nuestro país la etiología más frecuente es la diabetes mellitus, responsable del 50% de los casos de enfermedad renal (Estrada, *et al.*, 2010).

De acuerdo con la National Kidney Foundation la clasificación de la insuficiencia renal crónica, puede hacerse con base en la gravedad, diagnóstico, tratamiento y pronóstico; sin embargo, la que se usa de manera más general es la clasificación por gravedad (Tabla 2), la cual se divide con base en la tasa de filtrado glomerular.

Tabla 2. Estadios de la insuficiencia renal con relación a la TFG. K/DOQI, 2002.

	ESTADIO	TFG (ml/min/1.73m²)	PLAN DE ACCIÓN
1	Riesgo aumentado	> 90 con factores de riesgo para IRC	Pruebas de tamizaje, disminuir riesgo de IRC
2	Daño renal con TFG normal o aumentada	≥ 90	Diagnosticar y tratar causa, retrasar la progresión, evaluar el riesgo de enfermedad cardiovascular
3	Daño renal con disminución leve de la TFG	60-89	Estimar la progresión
4	Disminución moderada de la TFG	30-59	Evaluar y tratar las complicaciones
5	Disminución severa de la TFG	15-29	Preparar para TRR
6	Falla renal	< 15	Iniciar TRR

Cuando la insuficiencia renal se encuentra en un estado terminal, se requiere de una terapia de reemplazo renal (TRR), con la finalidad de sustituir la función renal; las opciones de TRR que existen son el trasplante renal hemodiálisis y la diálisis peritoneal.

Diálisis Peritoneal. El sistema de diálisis peritoneal consta de una bolsa que contiene el líquido de diálisis, conectada a un catéter a través del cual se introduce el líquido a la cavidad abdominal. Dentro del abdomen se lleva a cabo la diálisis en la membrana peritoneal y posteriormente el líquido con los desechos drena a una bolsa de salida. Existen diferentes modalidades de diálisis peritoneal, siendo la diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA) y la diálisis peritoneal automatizada o ciclada (DPA) las mayormente utilizadas (Estrada, *et al.*, 2010).

En México, la diálisis peritoneal es la primera elección como terapia de reemplazo renal y representa más del 90% de los tratamientos de este tipo en el país, lo que coloca a México como la nación que más la realiza (Afrashtehfah *et al.*, 2013).

Los principales inconvenientes que puede presentar esta terapia son el incremento de la permeabilidad de la membrana peritoneal, la pérdida de ultrafiltración y el desarrollo de fibrosis peritoneal (Locatelli *et al.*, 2004). Además, debido a que el catéter conecta al peritoneo con el exterior existe un

riesgo más: que se produzca peritonitis, la cual es una de las principales causas de hospitalización y de mortalidad de los pacientes con diálisis peritoneal.

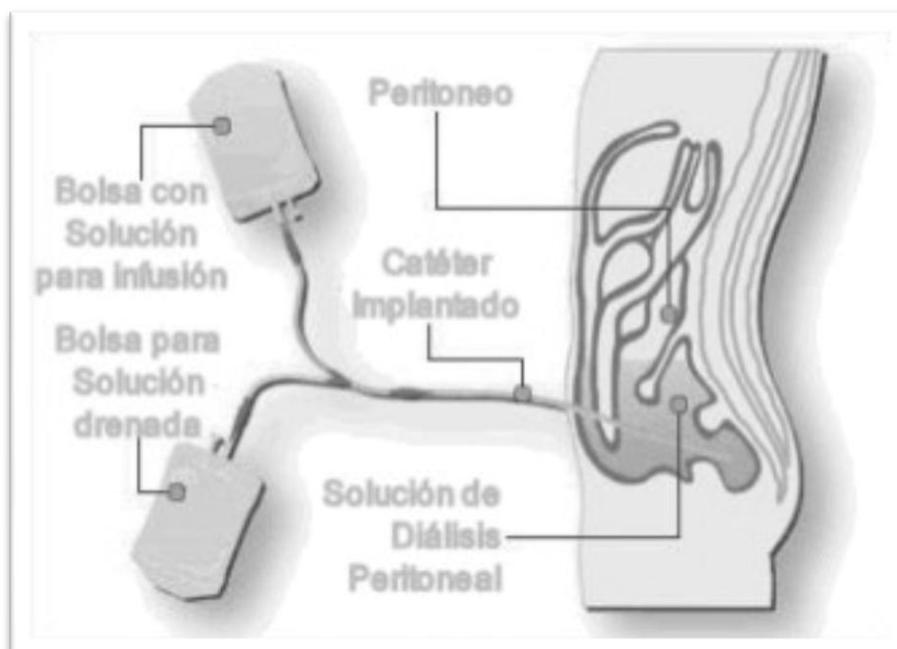


Figura 1. Proceso de diálisis peritoneal ambulatoria. Rivas y Sánchez, 2014.

Los factores que conducen a una peritonitis son muy diversos, algunos de los que se consideran factores de riesgo son el estatus socioeconómico, factores nutricionales, diabetes mellitus, la modalidad de DP y la presencia de infección en el túnel o en el sitio de salida del catéter (Karagulle *et al.*, 2013).

Debido a que *S. aureus* coagulasa positivo es el patógeno más comúnmente aislado en todo el mundo en los casos de peritonitis asociados con diálisis peritoneal, se cree que los portadores de *S. aureus* coagulasa positivos en la nariz o en el sitio de salida del catéter tienen mayor riesgo de peritonitis (Miranda-Navales *et al.*, 2008). Así por ejemplo se ha reportado que 71% de pacientes mexicanos adultos sujetos a DPCA tenían el sitio de salida del catéter colonizado por la misma cepa de *S. aureus* que ocasionó un episodio de peritonitis, en tanto que el 36% presentó la misma cepa en la nariz (Miranda-Navales 2008).

1.4 Resistencia a antibióticos

Debido a las crecientes infecciones de seres humanos causadas por *S. aureus*, a principios de los años 40 del siglo pasado se comenzó a usar la penicilina para combatir a esta bacteria; sin embargo, poco tiempo después se encontraron cepas resistentes a este antibiótico, y en 1960 el 80% de las cepas que eran aisladas en distintos hospitales presentaba resistencia a la penicilina

(Lowy, 2003). En 1961 se introdujo la meticilina, que fue la primera penicilina semi sintética; sin embargo, no pasó mucho tiempo para que se encontraran cepas resistentes a la meticilina.

La resistencia a los β -lactámicos, como la penicilina, está mediada por dos mecanismos diferentes que son la producción de β -lactamasas y la modificación de las PBPs (penicilin-binding-proteins) (Tabla 2).

- Producción de β -lactamasas. Este mecanismo de resistencia se genera cuando la bacteria es capaz de producir penicilinasas, la cual hidroliza el anillo β lactámico inactivando de esta manera el antibiótico. La resistencia está mediada por el gen *blaZ*, que codifica para la betalactamasa. Esta enzima extracelular es producida cuando el estafilococo está expuesto a betalactámicos. El gen *blaZ* está bajo el control de dos genes adyacentes controladores, el antirepresor *blaR1* y el represor *blaI* (Lowy 2003).

Modificación de las PBPs. Este mecanismo consiste en que al generar una mutación que causa la modificación de las proteínas de unión a la penicilina, se dificulta la unión del antibiótico lo que impide su actividad. Este es el principal mecanismo de resistencia a la meticilina de *S. aureus* (Suarez y Gudiol 2009).

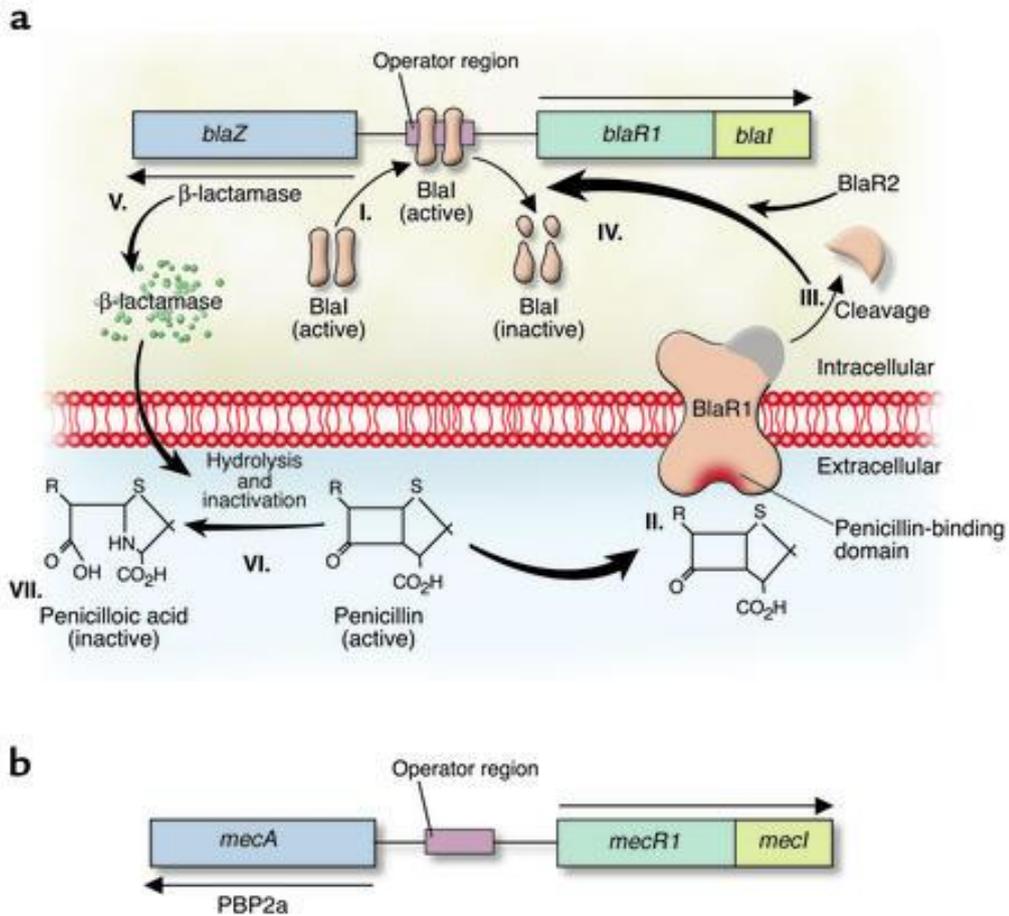


Figura 2. (a) Inducción de la síntesis de β -lactamasa en *S. aureus* en presencia del antibiótico β -lactámico penicilina. I. La proteína BlaI se une al operador, lo que reprime la transcripción de *blaZ* y de *blaR1-blaI*. En ausencia de penicilina la β -lactamasa se expresa a bajo nivel. II. La unión de la penicilina al sensor-transductor BlaR1 membranar estimula la activación autocatalítica de BlaR1. III–IV. BlaR1 activo ya sea directa o indirectamente (vía una segunda proteína BlaR2) hidroliza BlaI, lo que permite la transcripción de *blaZ* y de *blaR1-blaI*. V–VII. β -lactamasa, la enzima extracelular codificada por *blaZ* (V), hidroliza el anillo β -lactámico de la penicilina (VI), produciendo ácido peniciloico inactivo (VII). (b) Mecanismo de resistencia a meticilina de *S. aureus*. La síntesis de PBP2a ocurre de un modo similar a la descrita para la β -lactamasa. La exposición de Mecr1 a un antibiótico β -lactámico induce la síntesis de Mecr1. Mecr1 inactiva MecI, lo que permite la síntesis de PBP2a. MecI y BlaI tienen efectos co-regulatorios sobre la expresión de PBP2a y de β -lactamasa. (Lowy 2003).

Actualmente la gran mayoría de las cepas de *S. aureus* son resistentes a la meticilina; dicha resistencia tiene como mecanismo inicial la modificación de las proteínas de unión a la penicilina, generando las llamadas PBP2a (Figura 1), estas son codificadas por un gen cromosómico denominado *mecA* (Cáceres *et al.* 2011). El gen *mecA* es parte de un elemento genético móvil encontrado en *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) y forma parte del casete cromosómico staphylocócico (SCCmec), siendo así el responsable de dicha resistencia (Lowy, 2003).

Se ha detectado que se puede presentar otro tipo de mecanismo de resistencia a la meticilina que es la hiperproducción de β -lactamasas. Esta resistencia se encuentra mediada por plásmidos y se debe a que la bacteria presenta una hiperproducción de penicilinas normal, de esta manera antibióticos como la oxacilina y la meticilina, que inicialmente resistían la actividad hidrolítica de esta enzima, presentan una lenta pero evidente afectación por β -lactamasas (Gil 2000).

Tabla 3. Mecanismos de resistencia a antibióticos de *S. aureus*. Lowy, 2014.

Antibiótico	Gen de resistencia	Producto	Mecanismo de resistencia	Localización
β-Lactámicos	1) <i>blaZ</i>	1) β -Lactamasa	1)Hidrólisis enzimática del anillo β -lactámico	1)PI:Tn
Glicopéptidos	1) <i>mecA</i> 2)	2)PBP2a 2)D-Ala-D-Lac	2)Reduce la afinidad para las PBPs 2)Síntesis de un dipeptido para reducir la afinidad por la vancomicina	2)C:SCC <i>mec</i> 2)PI:Tn
Quinolonas	1) <i>parC</i> 2) <i>gyrA</i> o <i>gyrB</i>	1)componente ParC o GrlA de la topoisomerasa IV 2) componentes GyrA o GyrB de la girasa	1,2)Mutaciones en el sitio QRDR reduciendo la afinidad del complejo DNA-enzima para las quinolonas	1)C 2)C
Aminoglucósidos Trimetoprim- sulfametoxazol	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos 1)Sulfonamidas: <i>sulA</i>	Acetiltransferasa y fosfotransferasa 1)Dihidropterato sintasa	Acetilación y/o fosforilación de enzimas que modifican los aminoglucósidos 1)Sobreproducción de ácido <i>p</i> -aminobenzoico	PI,PI:Tn 1)C
Oxacilina	2)TMP: <i>dfrB</i>	2)Dihidrofolato reductasa (DHFR) 23S rRNA	2)Reduce afinidad por DHFR Mutación en el dominio V del componente 23S rRNA del ribosoma 50S	2)C C
Quinupristina- dalfopristina (Q- D)	1)Q: <i>ermA</i> , <i>emB</i> , <i>ermC</i> 2)D: <i>vat</i> , <i>vatB</i>	1)Metilasas ribosomales 2)Acetiltransferasa	1)Reduce el bandeo para la subunidad ribosomal 23S 2)Modificación enzimática de la Dalfopristina	1)PI, C PI

1.5 Recombinación genética

Muchos de los factores de virulencia y de los genes de resistencia se adquieren gracias a la recombinación genética que existe entre bacterias. Dicha recombinación genética se puede clasificar en dos tipos: la homóloga, que es aquella en la que el DNA donador y el receptor son similares, de tal manera que lo único que se modifica es la posición de los genes; y la heteróloga, que se refiere a la introducción de genes nuevos al DNA receptor.

Los mecanismos que permiten la transferencia de información genética en bacterias, que conducen a la recombinación son tres: transformación, conjugación y transducción.

Transformación. Fue descubierta en 1944, cuando Avery, McLeod y McCarty demostraron que el DNA es el material genético mediante el elegante experimento de transformación del pneumococo. (Avery *et al.*, 1944). La transformación es la captación de DNA desnudo por una bacteria. El DNA que capta de bacterias muertas en el medio recombina con su propio DNA y le confiere nuevas características fenotípicas hereditarias.

Conjugación. La conjugación es uno de los mecanismos de transferencia de genes más importante de los procariontes, se ha demostrado que representa un papel importante en la difusión de genes de resistencia a los antibióticos (Quesada, 2011). El proceso de la conjugación se da principalmente entre bacterias Gram negativas y consiste en la transferencia de plásmidos por medio de una estructura llamada pili, de tal manera que este tipo de transferencia requiere del contacto célula a célula.

Transducción. En el caso de la transducción se requiere de un intermediario que lleve a cabo la transferencia genética, este intermediario es un virus de bacterias, es decir, un bacteriófago.

1.6 Bacteriófagos

Los bacteriófagos pueden ser líticos o temperados. Los primeros son aquéllos que lisan a toda bacteria que infectan, produciendo progenie viral, en tanto que los segundos pueden ser líticos o lisogénicos, dependiendo de las proporciones relativas fago-bacteria y de las condiciones ambientales. En el ciclo de vida lisogénico, después de la inyección del DNA viral éste se integra al cromosoma bacteriano, reprime la expresión de los genes estructurales y de lisis y se replica como parte del cromosoma de la bacteria, heredándose a las bacterias hijas. El genoma viral reprimido se denomina profago, la bacteria que lo porta lisógena y el proceso que conduce a la formación de ésta se llama lisogenización (González *et al.*, 2006).

Los bacteriófagos son capaces de transferir información genética entre las bacterias mediante el proceso de transducción. La transducción puede ser generalizada o especializada. Los fagos transductores generalizados (p. ej. P1 de *E. coli*) al lisar a una población bacteriana producen, a baja frecuencia, viriones que no poseen DNA propio, sino que han encapsidado al azar un fragmento de DNA de la bacteria lisada. Cuando un fago de estos infecta a otra bacteria le inyecta el DNA bacteriano que porta y de esta manera contribuye a la transferencia de información entre bacterias. El DNA introducido se incorpora al genoma bacteriano por recombinación homóloga (Vaca, 1999).

La transducción especializada se produce cuando un profago se escinde de manera anómala del cromosoma bacteriano llevándose segmentos adyacentes de DNA de la bacteria unidos a su genoma; de esta manera, cuando lisogeniza a otra bacteria le transduce específicamente el segmento de DNA de la otra. Por esta razón se dice que es transducción especializada, ese fago se “especializa” en transducir ese segmento particular (Vaca, 1999).

1.6.1 Bacteriófagos de *S. aureus*

Durante la década pasada se secuenció el genoma de *S. aureus* y el análisis genómico, incrementó el número de bacteriófagos identificados, de los cuales la gran mayoría pertenece a la familia *Siphoviridae* del orden *Caudovirales*.

Los Caudovirales bacteriófagos con cola, de los cuales se conocen al menos 4,950 y de acuerdo con su morfología se considera que presentan simetría bilateral. Esta estructura de cabeza - cola y muchas otras propiedades morfológicas y fisiológicas indican que este es un grupo monofilético; al mismo tiempo, estos fagos son muy variados en el contenido de ADN, composición de bases, dimensiones y estructura. Por ejemplo los tamaños del ADN varían entre 17 y 500 kpb y las longitudes de la cola van de 10 a 800 nm, siendo así también el grupo más diversificado dentro de los grupos de los virus.

Los viriones se constituyen típicamente de proteínas y de ADN, los lípidos están generalmente ausentes, las cabezas son icosaédricas y algunas alargadas donde los capsómeros son poco visibles. Las colas son de tipo helicoidal o consisten en discos apilados y poseen, en la mayoría de los casos, estructuras de fijación, tales como placas basales o fibras terminales. Cada una de las partes de estos virus se sintetiza por vías separadas y las subestructuras son ensambladas posteriormente.

La respuesta del virion a los agentes inactivantes es muy variable y no se puede generalizar; sin embargo, a pesar de su carencia de lípidos, alrededor de una tercera parte de los bacteriófagos de cola son sensibles al cloroformo.

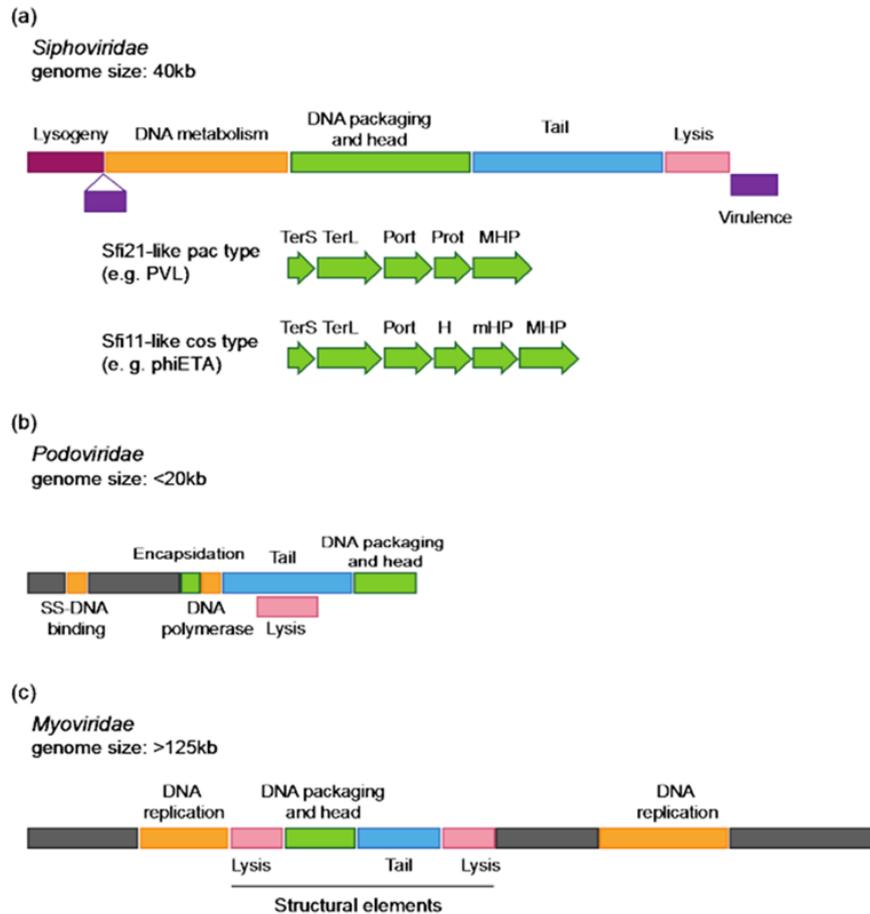


Figura 3. Organización modular del genoma de fagos staphylococcico. A) *Siphoviridae*. Rojo: lisogenia, amarillo: metabolismo del DNA, verde: empaquetamiento del DNA y morfogénesis de la cápside, azul: morfogénesis del tallo, rosa: lisis del huésped. Los genes de virulencia (purpura), generalmente, se encuentran debajo del módulo de lisis. B) *Podoviridae*. Rosa: módulo de lisis, azul: morfogénesis del tallo; estos se sobrepone. Verde: genes del metabolismo de DNA, están localizados de genes, cuya función se desconoce (gris), sobre el módulo del tallo. C) *Myoviridae*. Como ejemplo se presenta el genoma del fago Twort. Gris: genes de función desconocida, amarillo: genes de metabolismo de DNA, rosa: genes de lisis, verde: empaquetamiento de DNA y cápside, azul: el módulo de tallo.

El material genético es una doble cadena, de tipo lineal y su composición de bases generalmente similar a la de la bacteria huésped; sin embargo, algunos pueden contener bases inusuales, como 5-hidroximetilcitosina o 5-hidroximetiluracilo (Hans-W. Ackermann).

Como ya se mencionó la familia más abundante que infecta a *S. aureus* es la familia *Siphoviridae*. Estos virus presentan una estructura sin envoltura, la cabeza es de aproximadamente 60 nm de diámetro y la cola es larga no contráctil y presenta 6 fibras; la cápside es de tipo icosaédrico con una simetría $T = 7$ (viralzone, 2014).

Otras familias que se encuentra con menor frecuencia son *Podoviridae* y *Myoviridae*. Estos fagos se componen de una pequeña cápside icosaédrica y en el primer caso de una cola corta, no flexible, no contráctil; a diferencia de

dicha familia, la familia *Myoviridae* se caracteriza por presentar una cola larga contráctil (Deghorain, 2012). Su genoma es de alrededor de 33 – 244 kpb y codifica para 40 – 415 proteínas; en algunas especies el genoma puede cambiar y ser circular (viralzone, 2014).

En cuanto a sus características genómicas; la familia *Siphoviridae* presenta en su genoma cinco módulos funcionales que se disponen de la siguiente manera: lisogenia, metabolismo del ADN, empaquetamiento de ADN y morfogénesis de la cápside, morfogénesis de la cola y lisis del huésped. Cuando el módulo de metabolismo de ADN está presente, los factores de virulencia están generalmente codificados en el módulo de lisis. En general los genes se transcriben en la misma cadena, a excepción de pequeños grupos, tales como los genes implicados en la integración al genoma del huésped.

A diferencia de estos, los fagos de la familia *Podoviridae* presentan un genoma diferente, con un menor número de ORFs, lo que indica su tamaño pequeño. Sus módulos funcionales codifican para empaquetamiento de ADN y morfogénesis de la cápside, morfogénesis del tallo y lisis; y genes con una función desconocida. En esta familia, los módulos no están bien definidos y los genes de la cola y de lisis se superponen; como se esperaba en un fago lítico, el módulo de lisogenia está ausente.

La organización del genoma de *Myoviridae* es similar al fago T4 de *E. coli*. Este se encuentra organizado en módulos funcionales de genes conservados, interrumpidos por grandes regiones plásticas que codifican para genes de función desconocida, estos módulos se relacionan de manera más estrecha con los módulos de fagos *Siphoviridae* encontrados en *S. aureus* que con los módulos de *Myoviridae* encontrados en diferentes especies bacterianas (Deghorain, 2012).

Dichos bacteriófagos se utilizan ampliamente para fagotipificar cepas de *S. aureus*. Estos se encuentran catalogados en cuatro grupos, como el conjunto básico de bacteriófagos para fagotipificación, donde los grupos se componen de la siguiente manera, grupo I: 29, 52, 52A, 79, 80; grupo II: 3A, 3C, 55, 71; grupo III: 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85, y por último los fagos 81, 94, 95, 96 (Pereira de Araujo, 1998).

Debido a la importancia de los bacteriófagos como mediadores del intercambio de información genética en bacterias, en este trabajo nos propusimos identificar, por PCR multiplex, a los profagos presentes en un grupo de cepas de *S. aureus* aisladas de las narinas de pacientes de diálisis peritoneal.

2. Objetivos

General

- Determinar la presencia de profagos en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*

Particulares

- Confirmar la identificación de las cepas por PCR.
- Identificar genes que codifican toxinas en las cepas.
- Evaluar la resistencia a los antibióticos en las cepas.
- Registrar la producción de β lactamasas en las cepas.

3. METODOLOGIA

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Genética de la Unidad de Morfología y Función de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Se analizó un total de 44 cepas de *S. aureus*, las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de Salud Integral (CUSI) de la FES Iztacala. Las cepas fueron previamente aisladas de las narinas de pacientes bajo tratamiento de diálisis peritoneal, así como también de algunos familiares de los mismos pacientes.

3.1 Extracción de ADN

El crecimiento de las cepas se llevó a cabo en agar S-110 por el método de estría cruzada y por incubación a 37°C durante 24 horas.

La extracción de DNA fue realizada por el método de ebullición, el cual consistió en colocar una asada del cultivo en un tubo de ensaye que contenía 2 ml de agua estéril y ponerlo a ebullición en baño maría durante 20 min para posteriormente colocarlo en un recipiente con hielo en el que se dejó reposar durante 10 min. Las muestras se colocaron en tubos eppendorf para ser centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos; se recuperó el sobrenadante y se conservó en congelación a -20°C.

3.2 Detección de profagos.

La detección de los profagos se llevó a cabo por PCR multiplex. Los oligonucleótidos que fueron usados se muestran en la Tabla 4. Con el fin de evitar confusión en el peso de los amplicones, se ajustaron las combinaciones de los oligos en dos diferentes mezclas de reacción.

La composición de la mezcla de reacción está dada por el primer forward, el primer reverse y agua libre de nucleasas, el volumen final de esta debe ser de 22 µl, para después añadir 3 µl de DNA de la muestra a analizar, obteniendo un volumen final de 25 µl, que fue depositado en tubos con perlas PuRetag™Ready-To-Go™ PCR.

3.3 Identificación de las cepas

Con el fin de verificar la identificación de las cepas de *S. aureus* se detectaron los marcadores cromosómicos spa y rRNA (Nashev *et al.*, 2004) por PCR convencional. Los oligonucleótidos usados fueron: spa1 (CACCAGGTTTAACGACAT), spa2 (CACCAGGTTTAACGACAT) Y rRNA 1

(ACGGAGTTACAAAGGACGAC), rRNA 2 (AGCTCAGCCTTAACGAGTAC). Se utilizaron perlas PuRetaq™Ready-To-Go™ PCR.

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos usados. Las condiciones consisten en 30 ciclos: 94°C por 1 minuto (desnaturalización), 58°C por 1 minuto 30 segundos (alineación) y 70°C por 1 minuto 30 segundos (extensión). Pantůček, 2004.

Bacteriófago	Oligonucleótido
3A-like	SGA1 TATCAGGCGAGAATTAAGGG SGA2 CTTTGACATGACATCCGCTTGAC
11-like	SGB1 ACTTATCCAGGTGGYGTTATTG SGB2 TGTATTTAATTTGCGCCGTTAGTG
77-like F	SGF1 CGATGGACGGCTACACAGA SGF2 TTGTTTCAGAACTTCCCAACCTG
subgrupo Fa	SGFa1 TACGGGAAAATATTCGGAAG SGFa2 ATAATCCGCACCTCATTCTT
Subgrupo Fb	SGFb1 AGACACATTAAGTCGCACGATAG SGFb2 TCTTCTCTGGCACGGTCTCTT
187-like	SGL1 GCTTAAAACAGTAACGGTGACAGTG SGL2 TGCTACATCATCAAGAACACCTGG
Twort- D	SGD1 TGGGCTTCATTCTACGGTGA SGD2 GTAATTTAATGAATCCACGAGAT

3.4 Identificación de genes que codifican toxinas.

Al igual que la detección de bacteriófagos, la detección de genes codificantes para toxinas se llevó a cabo mediante la técnica de PCR multiplex usando PuRetaq™Ready-To-Go™ PCR y tomando como base los oligonucleótidos establecidos por Campbell y colaboradores en 2008, (Tabla 5) así como las condiciones de corrimiento de PCR

Tabla 5. Oligonucleótidos usados para la detección de toxinas. Las condiciones para PCR multiplex son las siguientes: 95°C por 15 minutos; 95°C por 1 minuto (32 ciclos), 60°C por 1.3 minutos, y 72°C por 1 minuto; 72°C por 10 minutos y finalmente se mantiene en 4°C (Campbell *et al.*, 2008).

Toxina	Primer	Secuencia del Primer	Amplicón (pb)
<i>eta</i>	Forward	5'-CGCTGCGGACATTCCTACATGG-3'	676
	Reverse	5'-TACATGCCCGCCACTTGCTTGT-3'	
<i>etb</i>	Forward	5'-GAAGCAGCCAAAAACCCATCGAA-3'	419
	Reverse	5'-TGTTGTCCGCCTTACCCTGTGAA-3'	
<i>hlg</i>	Forward	5'-TTGGCTGGGGAGTTGAAGCACA-3'	306
	Reverse	5'-CGCCTGCCAGTAGAAGCCATT-3'	
<i>PVL</i>	Forward	5'-TGCCAGACAATGAATTACCCCAT-3'	894

	Reverse	5'-TCTGCCATATGGTCCCCAACCA-3'	
<i>sea</i>	Forward	5'-TTGCAGGGAACAGCTTTAGGCAATC-3'	252
	Reverse	5'-TGGTGTACCACCCGCACATTGA-3'	
<i>seb</i>	Forward	5'-GACATGATGCCTGCACCAGGAGA-3'	355
	Reverse	5'-AACAAATCGTTAAAAACGGCGACACAG-3'	
<i>sec</i>	Forward	5'-CCCTACGCCAGATGAGTTGCACA-3'	602
	Reverse	5'-CGCCTGGTGCAGGCATCATATC-3'	
<i>sed</i>	Forward	5'-GAAAGTGAGCAAGTTGGATAGATTGCGGCTAG-3'	830
	Reverse	5'-CCGCGCTGTATTTTTCTCCGAGAG-3'	
<i>see</i>	Forward	5'-TGCCCTAACGTTGACAACAAGTCCA-3'	532
	Reverse	5'-TCCGTGTAAATAATGCCTTGCCTGAA-3'	
<i>seg</i>	Forward	5'-TGCTCAACCCGATCCTAAATTAGACGA-3'	117
	Reverse	5'-CCTCTTCCTTCAACAGGTGGAGACG-3'	
<i>seh</i>	Forward	5'-CATTACATCATATGCGAAAGCAGAAG-3'	358
	Reverse	5'-GCACCAATCACCTTTCTGTGC-3'	
<i>sei</i>	Forward	5'-TGGAGGGGCCACTTTATCAGGA-3'	220
	Reverse	5'-TCCATATTCTTTGCCTTACCAGTG-3'	
<i>sej</i>	Forward	5'-CTCCCTGACGTTAACTACTAATAACCC-3'	432
	Reverse	5'-TATGGTGGAGTAACTGCATCAAAA-3'	
<i>tst</i>	Forward	5'-AGCCCTGCTTTTACAAAAGGGGAAAA-3'	306
	Reverse	5'-CCAATAACCACCCGTTTTATCGCTTG-3'	

3.5 Antibiograma.

La prueba de resistencia a los antibióticos se realizó por el método de Kirby-Bauer; para lo cual se hizo un sembrado de las cepas en forma de tapiz sobre agar Mueller Hinton (MH), posteriormente se colocó el antibiograma (Bio Rad), para bacterias Gram positivas, el cual consiste en una serie de sensidiscos cada uno de los cuales está impregnado con uno de los siguientes antibióticos: AMPICILINA, CEFALOTINA, CEFOTAXIMA, LEVOFLOXACINA, CEFUROXIMA, DICLOXACILINA, ERITROMICINA, GENTAMICINA,

CEFEPRIIME, PENICILINA, TETRACICLINA, TRIMETOPRIM-SULFAMETOXASOL.

Las cajas se incubaron durante 24 h a 37°C, para proceder a evaluar la medición de los halos de inhibición, tomando como referencia los intervalos establecidos por el fabricante del antibiograma.

3.6 Detección de *mecA*.

La detección del gen *mecA* se realizó por el método de PCR convencional usando los oligonucleótidos y condiciones propuestos por Martín-López y colaboradores en 2004 (5'GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3'; 5'CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA3').

3.7 Análisis de los amplicones.

El análisis de los amplicones se llevó a cabo por el método de electroforesis en geles de agarosa al 1% y 2%. De acuerdo con el tamaño de los amplicones a evaluar, se usó un marcador de 100 pb-ladder y de 200 pb-ladder en el caso de los amplicones de RNA. Las bandas de ácido nucleico fueron teñidas con midori Green, el cual se agrega directamente al preparar la agarosa. Los geles se fotografiaron utilizando el sistema de foto documentación GEL LOGIC 100 (KODAK).

3.8 Producción de β lactamasa.

La producción de β lactamasas se evaluó mediante una reacción de color; se usaron discos impregnados con el betalactámico cromogénico nitrocefín, el cual es amarillo y produce un color rojo cuando es hidrolizado por la β lactamasa. Los discos fueron hidratados y posteriormente se colocó sobre cada uno de ellos una asada de una colonia, crecida en MH, de la cepa por analizar. Si la cepa en cuestión produjo β lactamasa, el disco viró de amarillo a rojo.

3.9 Resistencia a oxacilina.

Para determinar la susceptibilidad de las cepas a oxacilina se realizaron cultivos en agar Mueller Hinton y se colocaron discos impregnados con el antibiótico, las cajas se incubaron durante 24 horas y se midieron los halos de inhibición.

4. RESULTADOS

Se obtuvieron del laboratorio de análisis clínicos de la CUSI un total de 44 cepas, sin embargo, una de las cepas (Número de identificación 99) se descartó del estudio, debido a que resultó negativa en la amplificación de los genes *spa* y *rRNA* (Fig. 2).

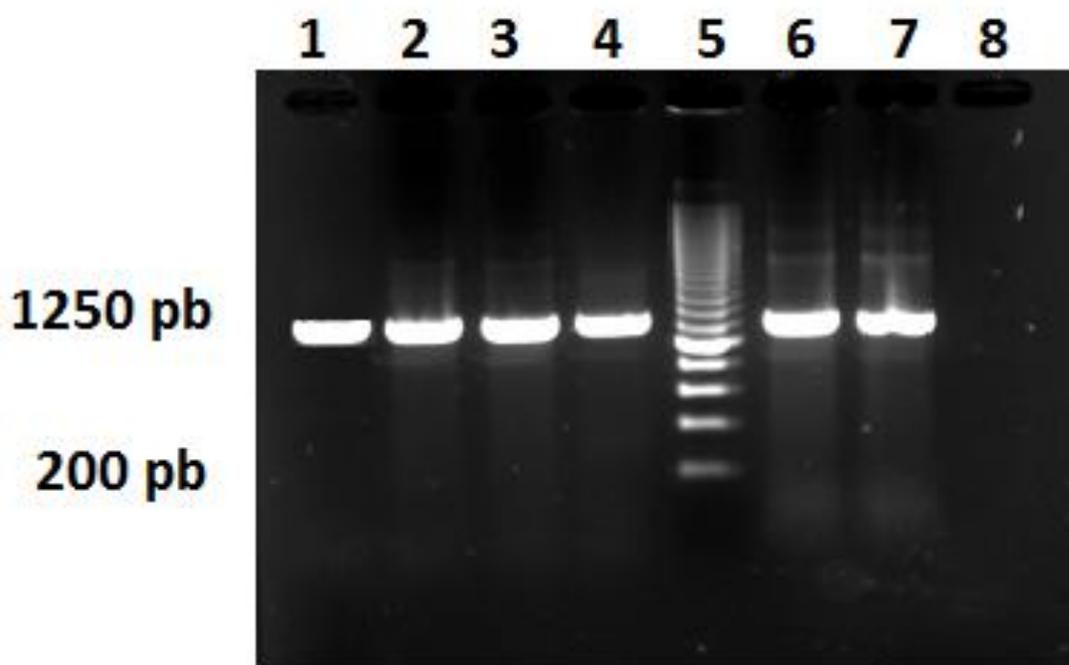


Figura 4. Identificación por PCR convencional del gen rRNA. Carriles 1, 2, 3, 4, 6, 7, amplicones de rRNA en cepas de *S. aureus*, carril, 5 marcador de peso molecular 200 pb-ladder y carril 8 control negativo (sin DNA).

4.1 Detección de prófagos

Para la detección de bacteriófagos fue necesario realizar la amplificación por PCR en dos partes, ya que, a causa de la similitud del tamaño de los amplicones del grupo 77 like F y el subgrupo Fb, los resultados se mostraban confusos.

Se detectó la presencia de bacteriófagos en el 86.36% (n= 38) de las cepas, en las cuales el grupo que se mostró con la frecuencia más alta fue el subgrupo Fb 65.1% (n=28) y el grupo con la frecuencia más baja fue el grupo 3A con el

6.9% (n=3), el único grupo que no se encontró presente fue el Twort-like, (Fig. 5). El número de bacteriófagos en cada cepa fue variado, 16 de éstas sólo contenían un tipo de profago; 15 dos tipos; 5 presentaron tres tipos y únicamente 2 cepas presentaron cuatro tipos de profago.

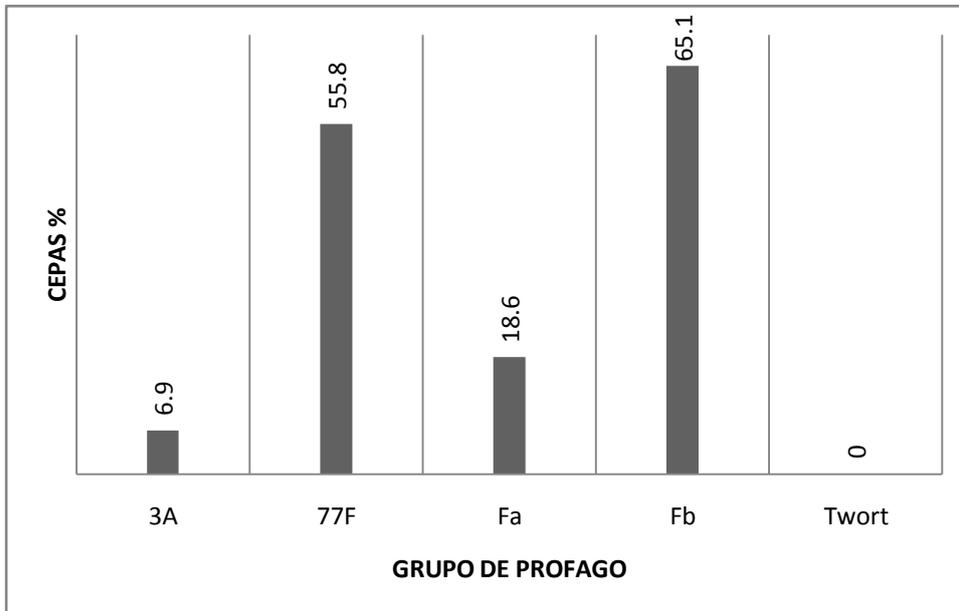
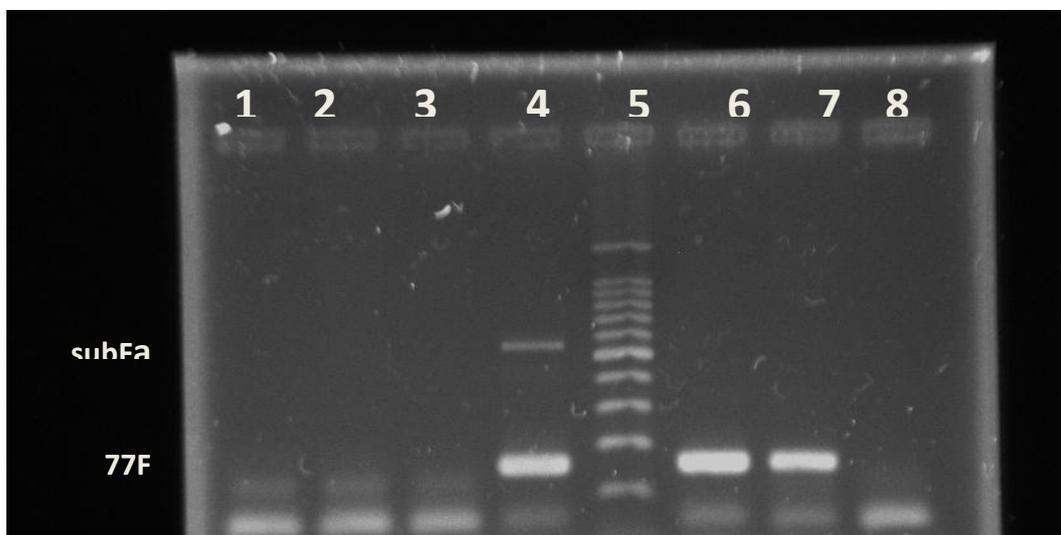


Figura 5. Frecuencia de bacteriófagos. En esta grafica se muestra la frecuencia con la que se encontró cada grupo de bacteriófagos en cada una de las cepas.

Las figuras 6, 7, y 8 muestran geles representativos en los que se amplificaron los profagos subFa, 77F, 3A y subFb.

Figura 6. Detección de bacteriófagos. En el carril 4 se observa el subFa (548pb), en los carriles 4y 6 se presentó el fagogrupo 77F (155pb), el carril 7 es el control positivo y el carril 8 es el control negativo.



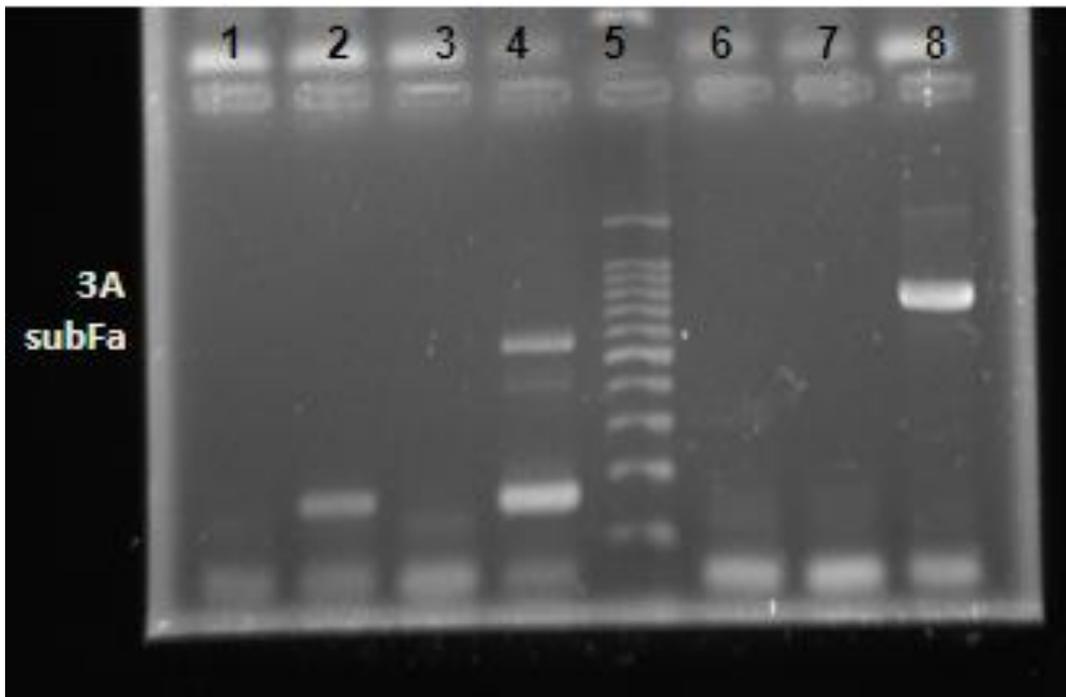


Figura 7. Detección de bacteriófagos. En el carril 4 se observa el fagogrupo subFa (548pb) y en el carril 8 el 3A (744pb).

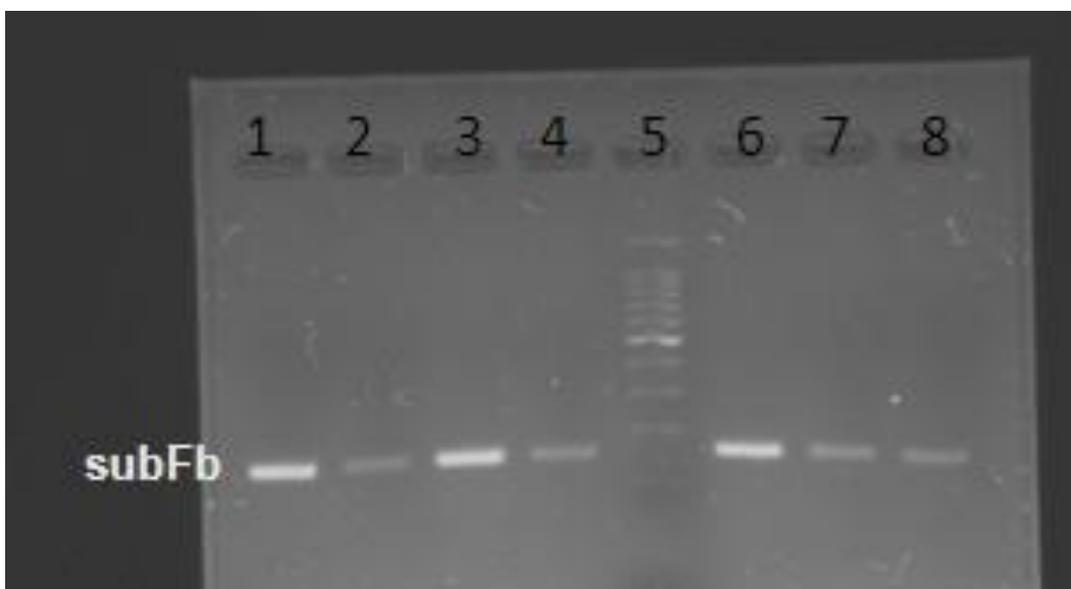


Figura 8. Detección de bacteriófagos. En todos los carriles se observa el fagogrupo subFb (147pb).

4.2 Genes codificantes para toxinas

En este estudio se identificaron un total de 13 genes codificantes para toxinas en cepas de *S. aureus*, la frecuencia que estas presentaron se observa en la figura 4, el gen que fue detectado en la mayoría de las cepas fue *tst* con el 40% (n=18) y el gen de menor frecuencia fue *sec* con 2.2% (n=1), *sej* fue la única que no se encontró en ninguna de las cepas analizadas.

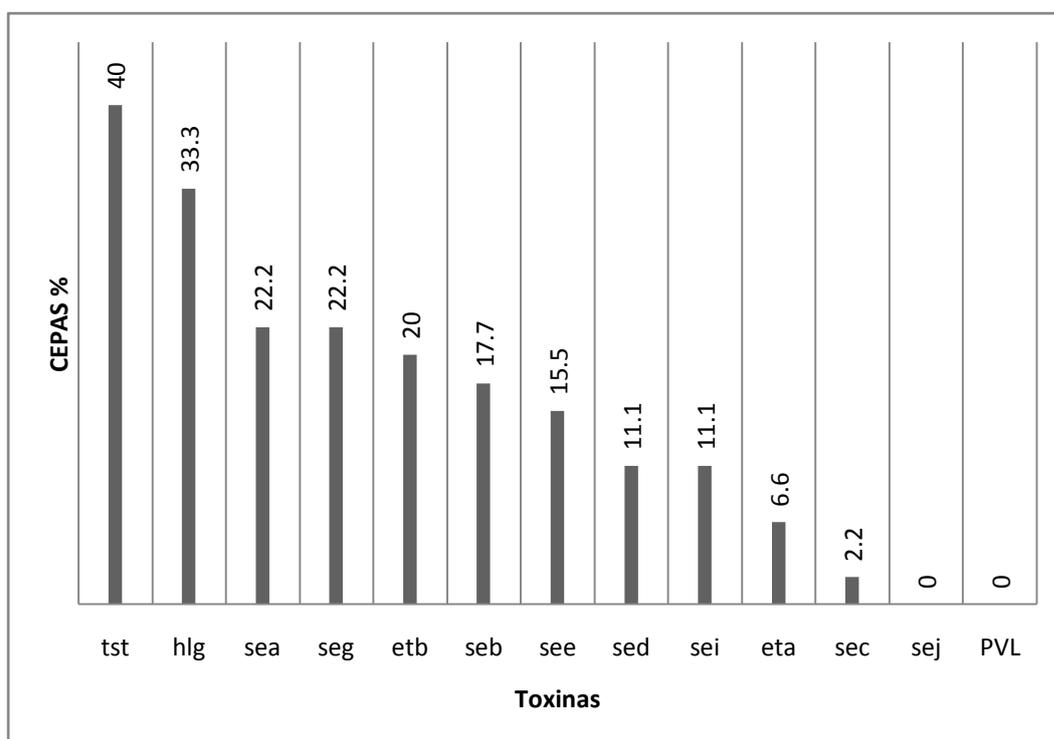


Figura 9. Frecuencia de los genes codificantes para toxinas. Se muestra la frecuencia, expresada en porcentaje, con la que se identificó cada uno de los genes en las cepas de *S. aureus*.

Las figuras 10, 11 y 12 representan la amplificación de algunos de los genes de toxinas (*see*, *seb*, *sea*, *tst*, *etb*, *hlg* y *seg*).

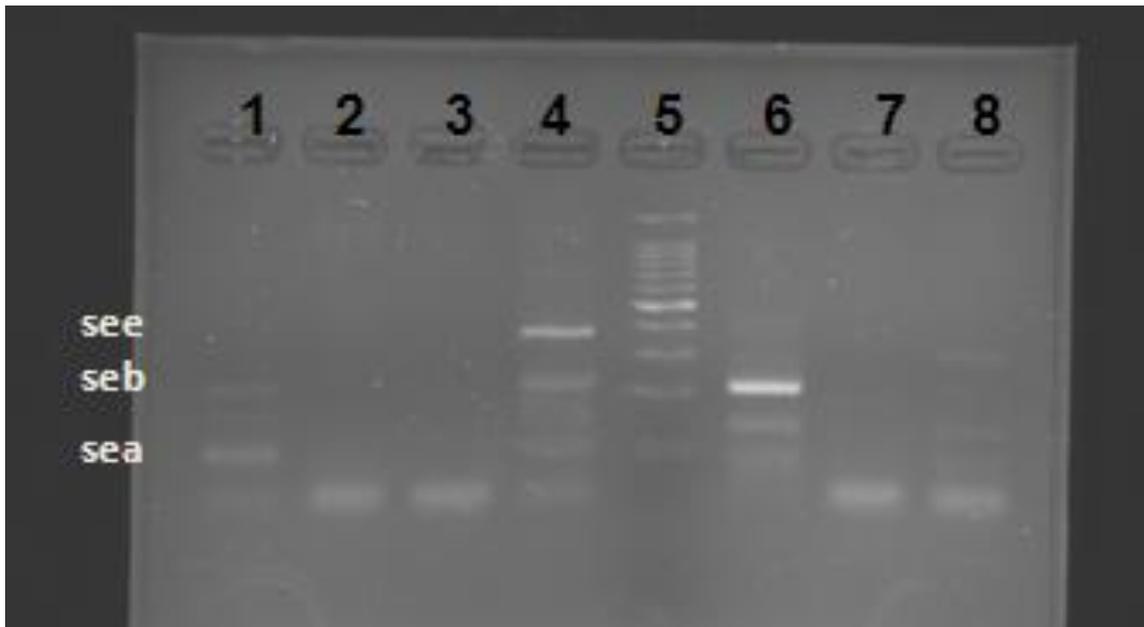


Figura 10. Detección de toxinas. El gen *see* (532pb) se observa en el carril 4, *seb* (355pb) se presenta en los carriles 1, 4 y 6, el gen *sea* (252pb) solo se presento en el carril 1.

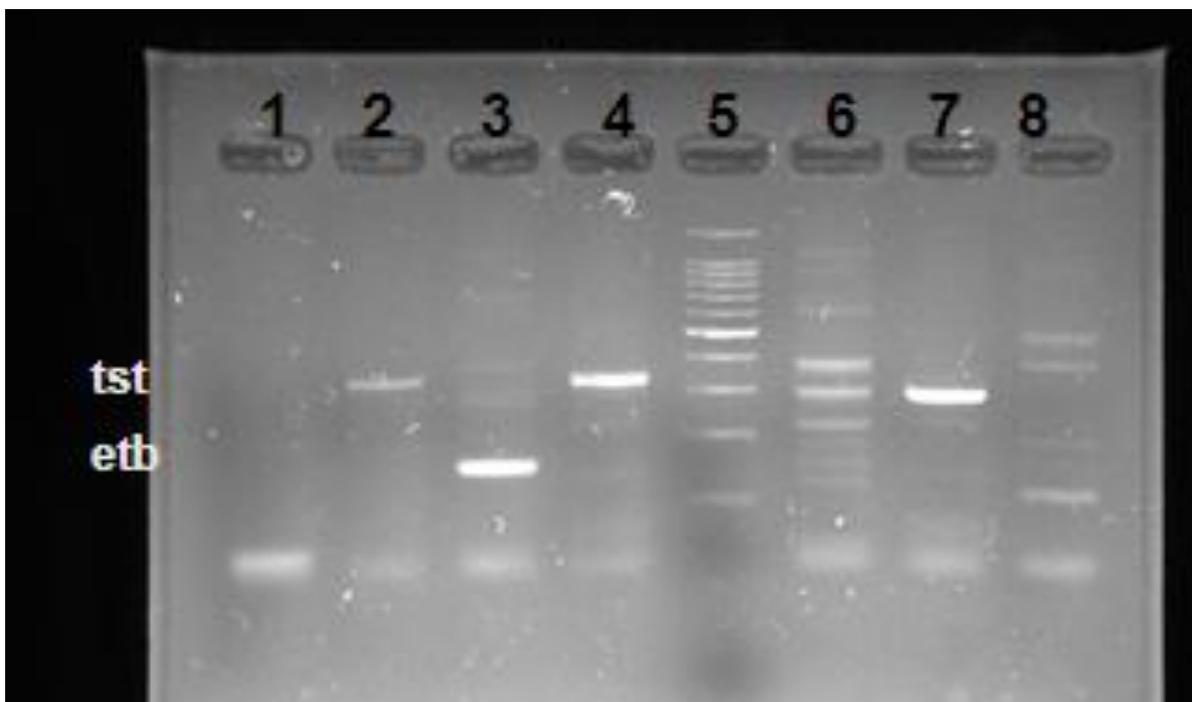


Figura 11. Detección de toxinas el gen *tst* (306pb) se presentó en los carriles 2, 4 y 8; el gen *etb* (419pb) se observa en el carril 3.

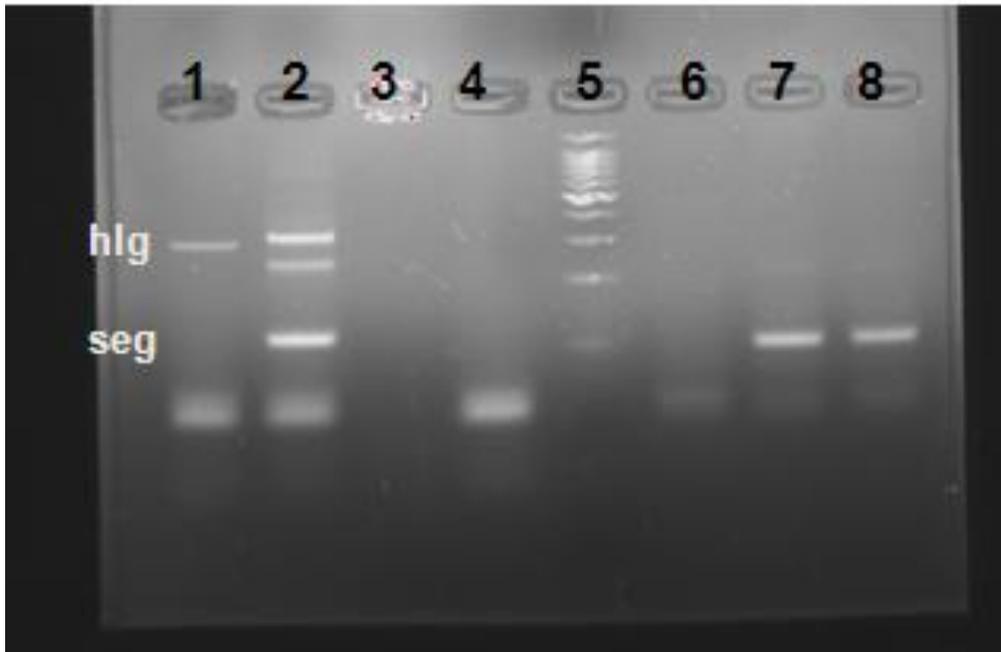


Figura 12. Detección de toxinas. El gen *hlg* (306pb) se presentó en el carril 1, el gen *seg* (117pb) se muestra en los carriles 2,7 y 8.

4.3 Resistencia a antibióticos

El antibiograma se realizó con un total de 12 antibióticos diferentes (Fig. 13), de los cuales se encontró la mayor resistencia para tres de ellos (cefalotaxima, cefepime y penicilina) con una resistencia del 100% (n=43) y el que se encontró con menor resistencia fue cefalotonina con un 43.2% (n= 19)

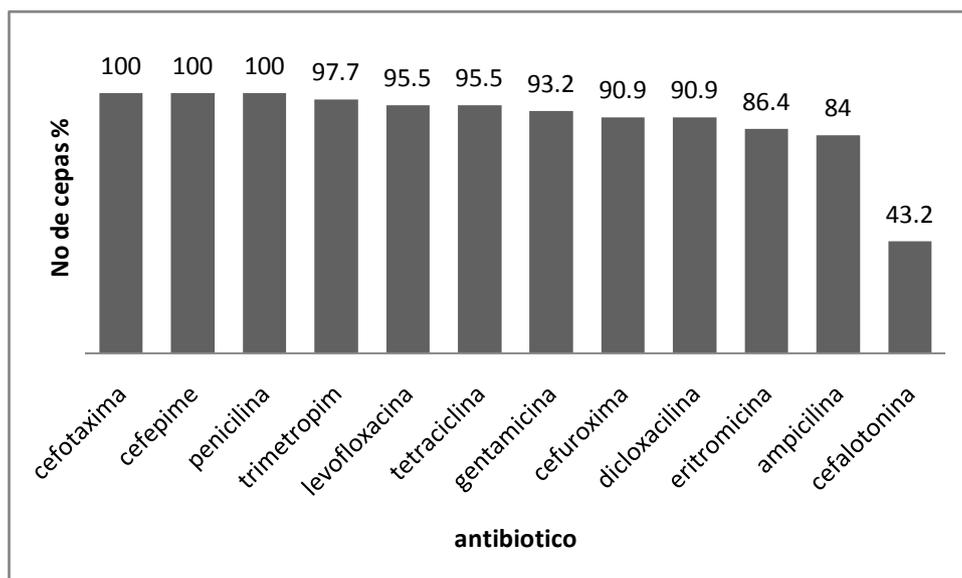


Figura 13. Frecuencia de la resistencia a antibióticos. Se muestra el número de cepas que son resistentes a cada antibiótico.

4.4 Detección de *mecA*

La detección del gen *mecA* en las cepas de *S. aureus* dio como resultado 61.3% (n=28) de cepas negativas y un 36.3% (n= 16) de cepas positivas para el gen.

4.5 Producción de β -lactamasas

La producción se detectó por hidrólisis de nitrocefín. El número de cepas productoras de β -lactamasas fue de 31 (70%) y el resto fueron no productoras (13; 30%).

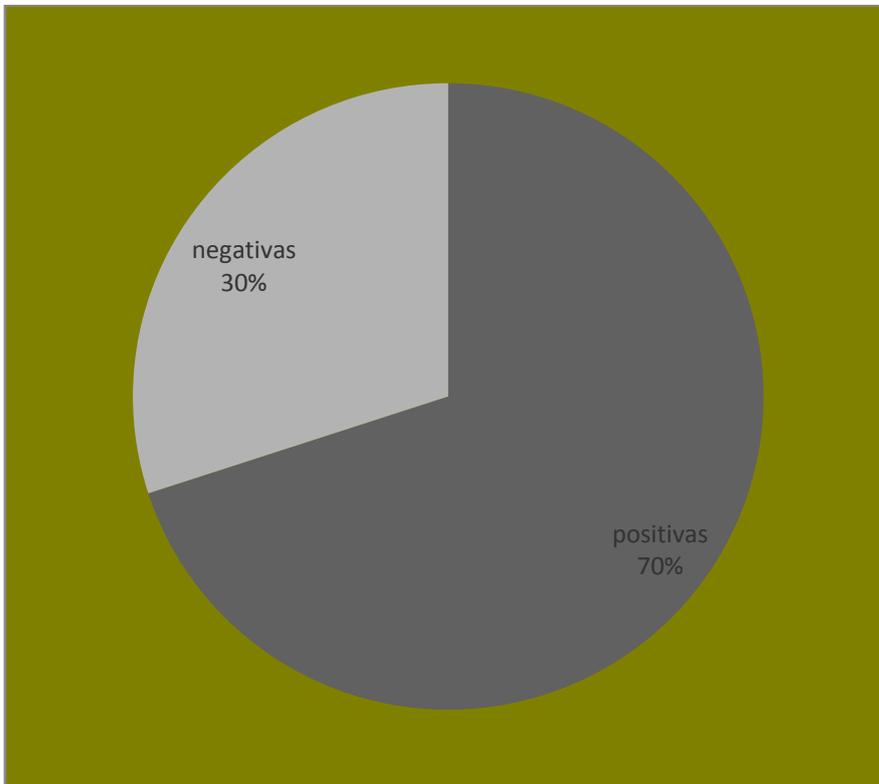


Figura 14. Porcentaje de cepas productoras de β -lactamasas.

5. Discusión

Entre la población humana el número de portadores sanos de *S. aureus* ha ido en aumento y es por eso que esta situación se considera un problema de salud. Los resultados que presentamos en este estudio muestran que la identidad de 43 de 44 cepas aisladas de las narinas de pacientes de diálisis peritoneal, identificadas como *S. aureus* por métodos microbiológicos, se

confirmó por métodos de biología molecular. La portación nasal de una cepa de *S. aureus* por estos pacientes representa un gran riesgo de autocontaminación del catéter al ser manipulado por los propios pacientes. Esta autocontaminación puede llevar a complicaciones mayores, como a peritonitis causada por *S. aureus*, ya que se ha demostrado que este padecimiento se genera con mayor facilidad en pacientes que presentan o presentaron infecciones de *S. aureus* en la nariz, en la piel o en el sitio de salida del catéter (Szeto *et. al.* 2007).

Sin embargo, en la literatura los reportes son contradictorios, ya que en 2008 Miranda – Novales y colaboradores realizaron un trabajo con el propósito de determinar si la cepa que se encontró colonizando las narinas, era la misma cepa que causa la infección del catéter, e incluso el episodio de peritonitis; ellos finalmente reportan que el riesgo relativo de desarrollar peritonitis por cepas provenientes de las narinas (idénticas) es bajo (0.525), en comparación con el riesgo de desarrollarla debido a las cepas presentes en el sitio de salida del catéter (0.948). Por otro lado, Luzar y colaboradores en 1990, reportan que la incidencia de la infección de catéter por *S. aureus* fue más alta en el grupo de los portadores nasales que en el grupo de los no portadores.

No obstante, los casos de peritonitis causados por bacterias Gram positivas son una de las principales complicaciones de la diálisis peritoneal y la causada por *S. aureus* implica, como parte de su tratamiento y como mejor opción, la remoción del catéter.

A pesar del aumento anual de pacientes que desarrollan diabetes en México y de que esta enfermedad es la primera causa de mortalidad en el país (Federación Mexicana de Diabetes), Cyrus y colaboradores reportan que la diálisis peritoneal es el tratamiento de primera elección, representando más del 90% de los tratamientos de reemplazo renal, lo que nos convierte en la nación que más lo implementa; no obstante que la hemodiálisis representa menos riesgos de infección para los pacientes diabéticos.

5.1 Detección de prófagos

El método de detección por PCR que utilizamos en este trabajo permite identificar profagos de *S. aureus* representativos de 5 serogrupos fágicos **A** (fago 3A), **B** (Fago 11B) **F** (fagos 77F, Fa y Fb), **L** (fago 187L) y **D** (fagoTwortD). Los resultados obtenidos muestran que el serogrupo **F** fue el más abundante en la población de bacterias estudiadas ya que el fago Fb fue el predominante (65.1%), precedido por los fagos 77F (55.8%) y Fa (18.6%) que presentan porcentajes menores.

No obstante que se han reportado profagos que codifican la toxina PVL (Kaneko *et al.*, 1997; 1998), en ninguna de las cepas que analizamos en este trabajo se obtuvo el amplicón para correspondiente al gen de esta toxina.

Aunque en este trabajo no aislamos a los bacteriófagos ni analizamos si son transductores, un aspecto muy relevante de la posesión de profagos por cepas clínicas de *S. aureus* es que éstos pueden contribuir enormemente a la diseminación de los genes que codifican factores de virulencia y de los que codifican para resistencia a antibióticos. Por esta razón nos parece muy relevante que se continúe con el análisis de este grupo de profagos a fin de determinar si son transductores. Quizá para ello será necesario inducirlos a la vía lítica tratando a su lisógena con mitomicina C o con luz ultravioleta.

Se ha demostrado que algunos fagos de *S. aureus* son capaces de transducir plásmidos completos que, portan genes de resistencia a antibióticos betalactámicos y tetraciclina, a frecuencias muy altas (10^{-5} - 10^{-6} unidades formadoras de colonia por unidades formadoras de placa: ufc/ufp) (Varga *et al.*, 2012). La proporción de fagos transductores a fagos infectivos fue aproximadamente de 1: 1700 (Varga *et al.*, 2012)

La transducción es el mecanismo más importante de transferencia genética horizontal en *S. aureus*; hay poca evidencia de que ocurra transformación in vivo y los plásmidos conjugativos aparentemente no están ampliamente distribuidos en las cepas clínicas (Lindsay, 2008). Por lo anteriormente expuesto, sería necesario y muy interesante determinar si entre los profagos detectados existe(n) alguno(os) tranductor(es), toda vez que se encuentran presentes en cepas que contienen genes que codifican para factores de virulencia y para resistencia a antibióticos, los cuales podrían diseminarse a otras cepas con facilidad por transducción.

El 43.18% de las cepas presentaron únicamente un tipo de bacteriófago, pero, un 34.09% presentaron dos tipos de profagos, 6.81% presenta tres tipos y el 4.5% presentó los cuatro tipos de fagos identificados en este estudio. Dentro de las combinaciones de fagos que se presentaron, la combinación más frecuente fue la del 77F y el Fb, los grupos que no fueron identificados son 11B, 187L y TwortD, este último pertenece a la familia *Myoviridae* y los reportes de esta familia en cepas de *S. aureus* son muy bajos.

5.2 Detección de genes que codifican toxinas

Se analizó un total de trece genes que codifican para toxinas, de los cuales, el que se identificó con mayor frecuencia (40%) fue *tst*, que codifica para la toxina del síndrome de shock tóxico.

El gen *hlg* se obtuvo con un porcentaje de 33.3%, este gen codifica para la gama hemolisina. Este porcentaje de cepas *hlg* positivas es mucho menor que el reportado por Lim *et al.*, (año) en un grupo de 188 cepas de *S. aureus* aisladas de muestras respiratorias en Malasia, que fue de 59%.

Los genes que preceden con menores porcentajes pertenecen al grupo de las enterotoxinas (*sea*, *seg*, *seb*, *see*, *sed*, *sei*) y las toxinas exfoliativas (*eta* y *etb*). En contraste con el gen *tst*, el gen que se identificó con menor frecuencia fue *sec* que pertenece al grupo de las enterotoxinas. Este grupo de enterotoxinas está implicado en el envenenamiento alimenticio, en alergias severas y en enfermedades autoinmunes, Campbell y colaboradores (2008) analizaron 90 cepas provenientes de pacientes que presentaran algún tipo de infección por *S. aureus* y dentro de sus resultados se observa que el gen *sec* está entre los que se presentaron con menor frecuencia siendo identificada en el 13% de las cepas.

Dos de los genes no se identificaron en ninguna cepa: *PVL* y *sej*. El primero codifica para una exotoxina que es producida por algunas cepas de *S. aureus* que infectan la piel; esta toxina lisa principalmente a las células polimorfonucleares y a los monocitos (G. Omuse *et al.* 2013), creándoles poros en la membrana. El gen *sej* codifica para una enterotoxina.

5.3 Resistencia a antibióticos

La mayoría de las cepas estudiadas fueron resistentes a los antibióticos betalactámicos, tales como la penicilina, la cual comenzó a emplearse con el fin de combatir las bacteremias causadas por *S. aureus* a principios de los años cuarenta; sin embargo, poco tiempo después, en 1942 fueron identificadas las primeras cepas resistentes a la penicilina en hospitales y posteriormente en la comunidad, y ya en 1960 más del 80% de las cepas eran resistentes (Franklin D. Lowy 2003), por lo que, evidentemente los betalactámicos fueron sustituidos por otros antibióticos que se generaron, para competir contra los mecanismos de resistencia usados por las bacterias.

Uno de los mecanismos que poseen las bacterias para resistir a los antibióticos betalactámicos es la producción de β lactamasas (Gil, 2000), las cuales hidrolizan el anillo betalactámico inactivándolos de esta manera. Por esta razón se desarrollaron antibióticos insensibles a estas enzimas, entre los que se encuentran las cefalosporinas.

Las cefalosporinas son antibióticos beta-lactámicos muy parecidos a las penicilinas, que también inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana. En la actualidad siguen siendo una gran herramienta para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram positivas y Gram negativas, sobre todo si son productoras de beta-lactamasas, ya que estos antibióticos han mostrado tener una buena resistencia a estas enzimas (KB Rivas *et. al.* 2002).

Sin embargo, las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia también a las cefalosporinas, tales como la modificación de PBPs y la síntesis de betalactamasas de espectro más amplio capaces de hidrolizar el anillo betalactámico de las cefalosporinas.

En este trabajo reportamos que la mayoría de las cepas fueron resistentes a dos cefalosporinas de tercera y cuarta generación, al igual que a la penicilina, mientras que fueron sensibles a una cefalosporina de primera generación.

5.4 Producción de β -lactamasas

Abarca y Herrera reportan en 2001 que debido al uso desmedido de las penicilinas, se seleccionaron cepas resistentes de *S. aureus*. Los resultados muestran que el 68.8% de las cepas que reportamos en este trabajo produjeron β lactamasas, lo que concuerda claramente con su alta resistencia a los antibióticos betalactámicos y con los resultados de Opara y Edwari (2012), quienes estudiaron 98 cepas, de las cuales 90.9% fueron productoras de β - lactamasas.

De acuerdo con su posición genómica dentro de los microorganismos, las β lactamasas pueden ser cromosómicas o plasmídicas. Una importante proporción de las β lactamasas descritas hasta este momento es codificada por genes de ubicación plasmídica, es decir en material genómico bacteriano fácilmente transmisible. En los bacilos Gram negativos, las β lactamasas de los grupos TEM (especialmente en *Escherichia coli*) y SHV (especialmente en *Klebsiella pneumoniae*) son las más representativas de este tipo. Las enzimas originales que han dado origen a ambos grupos corresponden a las β lactamasas TEM-1, TEM-2 (grupo TEM) y SHV-1 (grupo SHV). Estos tres tipos de β lactamasas pueden hidrolizar bencilpenicilina, aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina y ticarcilina) y ureido penicilinas (entre ellas, piperacilina), pero no manifiestan acción hidrolítica de relevancia sobre cefalosporinas. Incluso pueden, en sobreproducción, provocar resistencia a la metilicina.

5.5 Detección del gen *mecA* y resistencia a oxacilina.

El gen *mecA* es parte de un gran elemento genético móvil, *SCCmec*, y la resistencia se origina cuando este elemento se introduce a cepas sensibles a metilicina. Hasta el momento se conocen siete tipos de *SCCmec*, los tipos I, II y III causan resistencia a diferentes antibióticos y los tipos IV, V, VI y VII solo confieren resistencia a los betalactámicos. El gen *mecA* codifica para proteínas de unión a la penicilina (PBP2 y PBP2a) las cuales al modificar el sitio de unión de los antibióticos inhiben su efecto (Carvalho *et. al.* 2010).

Sólo en 36.3% se amplificó el gen *mecA* por PCR y en el 63.6% restante la amplificación fue negativa. Asghar (2014) confirma, mediante la amplificación

del gen *mecA*, la resistencia a meticilina en 100 de 114 cepas analizadas; Namvar y colaboradores (2013) realizan un trabajo similar con cuarenta cepas de las cuales el 100% resultó positiva para *mecA*; sin embargo, Dash y colaboradores (2014) reportan que al analizar 187 cepas MRSA solo el 30% fue positivo para *mecA*.

A diferencia de lo resultante para el gen *mecA*, el porcentaje de cepas que mostró resistencia a oxacilina fue considerablemente alto (84.4%), lo cual resulta contradictorio, dado que las cepas resistentes a oxacilina son MRSA y los resultados anteriores, no reflejan esto con claridad.

Gil reporta que existen cepas llamadas *Staphylococcus aureus* – BORSA y menciona que es probable que las cepas hiperproductoras de β lactamasas pertenezcan casi exclusivamente al fagogrupo 94/96. *Staphylococcus aureus* BORSA fue descrita por primera vez por McDougal y Thornsberry en 1986, ellos afirman que estas cepas que presentaron resistencia lo hicieron mediante la producción de grandes cantidades de betalactamasa normal, lo que provocó la hidrólisis e oxacilina y su inactivación.

Dentro de los reportes que hay con referencia a estas cepas, Maalej y colaboradores (2012), trabajan con un total de 1895 cepas de las cuales un 21.9% resultaron MRSA y tan solo el 1.2% disminuyó la susceptibilidad a oxacilina, por lo que no descartan dicho mecanismo pero concluyen que la incidencia de estas cepas es poco común; Skinner y colaboradores (2008) identifican cepas MRSA y con ellas realizan detección del gen *mecA* por medio del método de aglutinación y por PCR y llevan a cabo test de producción de β lactamasas, ellos obtienen resultados negativos para la detección del gen *mecA*, por lo tanto, ellos afirman que la resistencia se debe a la hiperproducción de betalactamasas.

Literatura citada

- Abarca G., Herrera M. 2001. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Revista Medica del Hospital Nacional de los Niños*. vol.36 n.1-2.
- Ackerman H-W. 2006. Classification of Bacteriophages. "THE BACTERIOPHAGES". Chapter 2: Oxford University Press.
- Afrashtehfar CD, Mastache-Gutiérrez A, Afrashtehfar KI, Díaz-Casales LA, Solís-Bazaldúa M. 2014. Manifestaciones clínicas y bacteriológicas de la peritonitis asociada con la diálisis peritoneal. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 52(1):84-9.
- Asghar AH. 2014 Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from tertiary care hospitals. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 30(4):698-702.
- Avery OT, Macleod, McCarty M. 1944. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES: INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *Molecular Medicine*. 1(4):344-65.
- Bamberger DM, Boyd SE. 2005. Management of *Staphylococcus aureus* infections. *American Family Physician*. 72(12):2474-81.
- Cáceres M. 2011. Frecuencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en personal de salud de hospitales de Nicaragua. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 30(6):610-4.
- Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, Bae IG, Stryjewski ME, Federspiel JJ, Tonthat GT, Rude TH, Barriere SL, Corey R, Fowler VG Jr. 2008. Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from a Multinational Trial of Complicated Skin and Skin Structure Infections. *American Society for Microbiology*. 46(2):678-84.
- Carvalho KS, Mamizuka EM, Gontijo Filho PP. 2010. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 14(1):71-6.
- Castañón—Sánchez CA. 2012. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Evidencia Médica e Investigación en Salud*. 5 (3): 79-84.
- Corrigan RM, Rigby D, Handley P, Foster TJ. 2007. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology*. 153:2435–46.
- Dash N, Panigrahi D, Al Zarouni M, Yassin F, Al-Shamsi M. 2014. Incidence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine leucocidin gene at a referral hospital in United Arab Emirates. *Acta Patologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 2014; 122: 341–346.

- Deghorain M, Van Melderen L. 2012. The Staphylococci Phages Family: An Overview. *Viruses*. 4(12):3316-35.
- Dinges MM, Orwin PM, Schljever PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 13(1):16-34.
- Estrada-Venado A, López-Moreno JA, Alvarado-Rodríguez M, Cervantes-López M. 2010. Insuficiencia Renal Crónica. Unidad de proyectos especiales Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gil M. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Revista Chilena de Infectología*. 145-152.
- González-Moreno S, Perales-V H, Salcedo-A MO, Vaca-P S. 2006. *Biología Celular y Bioquímica: Proyectos cortos, experimentos y métodos*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- Hurtado MP, de la Parte MA, Brito A. 2002. *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Sociedad Venezolana de Microbiología*. v.22
- Kaneko J, Kimura T, Kawakami Y, Tomita T, Kamjo Y. 1998. Panton-Valentine leukocidin genes in phage-like particle isolated from mitomycin C-treated *Staphylococcus aureus*. *Gene*. 61 (1997), pp. 1960-1962.
- Karagulle IV, Kaynar K, Ulusoy S, Ozkan G, Cansiz M. 2013. Risk factors for peritonitis related to peritoneal dialysis. *Bratislavské lekárske listy - Bratislava Medical Journal*. 114(9):531-3.
- Kareivienė V, Pavilonis A, Sinkutė G, Liegeūte S, Gailienė G. 2006. *Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics and spread of phage types. *Medicina*. 42(4):332-9.
- Lim, K.T. Hanifah, Y.A. Mohd Yusof, M.Y. Thong, K.L. 2012. Investigation of toxin genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. *Tropical Biomedicine* 29(2): 212–219.
- Locatelli F, Pozzoni P, Del Vecchio L. 2004. Replacement Therapy in Patients with Diabetes and End-Stage Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1:S25-9.
- Lowy FD. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*. 111:1265–1273.
- Luzar MA, Coles GA, Faller B, Slingeneyer A, Dah-Dah G, Briat C, Wone C, Knefati Y, Kessler M, Peluso F. 1990. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *The New England Journal of Medicine*. 322(8):505-9.
- Maalej SM, Rhimi FM, Fines M, Minif B, Leclercq R, Hammami A. 2012. Analysis of Borderline Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

- (BORSA) Strains Isolated in Tunisia. *Journal of Clinical Microbiology*. 3345–3348.
- Martín-López J, Díez-Gil O, Morales M, Batista 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*. *International Microbiology*. 63-66.
 - McDougal LK, Thomsberry C. 2006. The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillin and cephalosporin. *Journal Clinical Microbiology*. 23:832-9.
 - Miranda-Navales G, Aburto-Huesca R, Leaños-Miranda B, Mendoza-Guevara L, Paniagua R, Amato D. 2008. Colonización por *Staphylococcus aureus* y riesgo de desarrollar episodio de peritonitis causado por cepa idéntica en pacientes pediátricos en diálisis peritoneal continua ambulatoria. *Gacaceta Médica Mexicana*. 144(4):297-302.
 - Namvar AE, Afshar M, Asghari B, Rastegar Lari A. 2013. Characterisation of SCCmec elements in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from burn patients. *Burns*. 708 – 712.
 - Nashev D, Toshkova K, Salasia SI, Hassan AA, Lämmler C, Zschöck M. 2004. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *Federation of European Microbiological Societies Letters*. 233(1):45-52.
 - Opara Morrison I, Egwari Louis O. 2012. Antibiotic susceptibility patterns and penicillinase activity of *Staphylococci* spp from wound specimens in Lagos. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(2), pp. 3403-3408.
 - Pantůucěk R, Doškař J, Růžicková V, Kašpárek P, Oráčová E, Kvardová V, Rosypal S. 2004. Identification of bacteriophage types and their carriage in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Young Investigators*.
 - Parsonnet J, Goering RV, Hansmann MA, Jones MB, Ohtagaki K, Davis CC, Totsuka K. 2008. Prevalence of toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1)-producing strains of *Staphylococcus aureus* and antibody to TSST-1 among healthy Japanese women. *Journal Clinical Microbiology*.
 - Wanderley Pereira de Araújo 1998. Phage typing strains of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics, isolated from milk. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. n. 4, p. 161-165.
 - Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Reza Pourshafie M. 2013. Prophage Typing of Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from a Tertiary Care Hospital in Tehran, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 80-85.
 - Rivas KB, Rivas Ma, El Dávila, Rodríguez M. 2002. CEFALOSPORINAS. DE LA PRIMERA A LA CUARTA GENERACIÓN. *Revista de la Facultad de Medicina de Caracas*. v.25 n.2

- Rivas Martín Rocio, Sánchez Martín María Inmaculada. 2014. <http://www.eccpn.aibarra.org/temario/seccion9/capitulo143/capitulo143.htm>
- Sharma Devender K., Sharma P. C. 2013. Bacteriophage typing of methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) strains recovered from human clinical cases in Himachal Pradesh and their *in vitro* susceptibility to different antibiotics. Indian Journal of Basic and Applied Medical Research. 296-302.
- Siqueiros-Cendón Tania, Ballinas-Casarrubias Lourdes, Gonzáles-Horta Carmen, Infante Ramírez Rocío, Rascón-Cruz Quintin, Erosa de la Vega Gilberto. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR; CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN DE LA TOXINA A DE CEPAS SILVESTRES DE *Staphylococcus aureus*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Skinner S, Murray M, Walus TA, Karlowsky JA. 2008. Failure of Cloxacillin in Treatment of a Patient with Borderline Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Endocarditis. Journal of Clinical Microbiology. 47(3):859.
- Suárez C, Gudiol F. 2009 Beta-lactam antibiotics. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 116-29.
- Szeto Cheuk-Chun, Chow Kai-Ming, Kwan Bonnie Ching, Ha, Law Man, Ching, Chung Kwo-Yi, Yu Samuel, Leung Chi-Bon, L Philip Kam-Tao. 2007. *Staphylococcus aureus* Peritonitis Complicates Peritoneal Dialysis: Review of 245 Consecutive Cases. *Clin J Am Soc Nephrol* 2: 245–251.
- Vaca S. 1999. Incremento de la adhesión y de la resistencia al suero humano normal en *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* mediado por los fagos lambda y FIZ15. Tesis doctoral, FES-Cuautitlán, UNAM.
- Workman Michael. 2006. Identification of Prophages in Hawaiian Coastal Water Isolates of *Staphylococcus aureus*. Journal of Young Investigators.
- Workman M, Nigro O, D, Steward G, F. 2006. Identification of Prophages in Coastal Waters Isolates of *Staphylococcus aureus*. Journal of Young Investigators.