



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Detección molecular por PCR de genes *icaA* e *icaD* y su
relación con la producción de biofilm en cepas de
Staphylococcus aureus de origen nosocomial resistentes a
antibióticos**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

JOHANA DANIELA OVANDO RUIZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2020



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Alejandro Camacho Cruz

VOCAL: Profesor: Genaro Jiménez Reyes

SECRETARIO: Profesor: Roberto Cabrera Contreras

1er. SUPLENTE: Profesor: Francisco Javier Díaz García

2° SUPLENTE: Profesora: Tanya Plett Torres

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE PATOGENICIDAD BACTERIANA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Roberto Cabrera Contreras

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en B Enrique Meléndez Herrada

SUSTENTANTE (S):

Johana Daniela Ovando Ruiz

LISTADO DE ABREVIATURAS

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
IRDM	Infecciones relacionadas a dispositivos médicos
INCICH	Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"
OPS	Organización Panamericana de la Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
RHOVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica
ECN	Estafilococos coagulasa negativa
SARM/MRSA	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina
SASM/MSSA	<i>S. aureus</i> sensible a meticilina
MSCRAMM'S	Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión de matriz
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
PIA	Polisacárido de adhesión intercelular
PNAG	β -1,6 de poli N-acetil-glucosaminoglicano
EUA	Estados Unidos de América
PBP	Proteínas fijadoras de penicilina
SCCMEC	Cromosoma <i>mec</i> de cassette estafilocócico
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
BHI	Infusión Cerebro Corazón (Agar)
SARV	<i>S. aureus</i> resistente a vancomicina
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
BLAST	Programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local
H₂O GBM	Agua grado biología molecular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
PD	<i>S. aureus</i> productor débil de biofilm
PF	<i>S. aureus</i> productor fuerte de biofilm
NP	<i>S. aureus</i> no productor biofilm
TMP-SMX	Trimetoprim con sulfametoxazol
HVN	Hospital "20 de Noviembre"
CDMX	Ciudad de México
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica

ÍNDICE

	pág
1. Introducción.....	6
1.1. Planteamiento del problema.....	6
1.2. Objetivos.....	7
1.2.1. Objetivo General.....	7
1.2.2. Objetivos Particulares.....	7
1.3. Hipótesis.....	8
2. Antecedentes.....	9
2.1. Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS).....	9
2.2. <i>Staphylococcus sp.</i>	11
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.3. Biofilm en estafilococos.....	15
2.4. Resistencia a antibióticos en <i>S. aureus</i>	21
2.5. Métodos de laboratorio para la identificación de biofilm en cepas nosocomiales de <i>S. aureus</i>	24
2.5.1. Fenotípicos.....	24
2.5.2. Moleculares.....	27
2.5.3. Genómicos.....	28
2.6. Medidas de bioseguridad en el laboratorio de microbiología que manipula <i>S. aureus</i> asociados a IAAS.....	29
3. Procedimiento experimental.....	31
3.1. Identificación de <i>S. aureus</i> mediante pruebas fenotípicas.....	31
3.1.1. Tinción de Gram.....	32
3.1.2. Prueba de Catalasa.....	33
3.1.3. Fermentación de Manitol.....	33
3.2. Conservación de <i>S. aureus</i> en leche descremada.....	34

3.3.	PCR para la identificación de los genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> en <i>S. aureus</i>	34
3.3.1.	Diseño de oligonucleótidos.....	35
3.3.2.	Extracción y purificación de DNA.....	38
3.3.3.	Estandarización de la técnica de PCR en el termociclador.....	39
3.3.4.	PCR en cepas problema del INCICH.....	42
3.3.5.	Electroforesis en gel de agarosa.....	42
3.3.5.1.	Preparación del gel de Agarosa al 1%.....	42
3.3.5.2.	Electroforesis de las muestras.....	43
3.3.5.3.	Visualización de amplicones en gel.....	43
3.4.	Detección fenotípica de Biofilm por ensayo cualitativo en tubo.....	44
4.	Resultados.....	45
5.	Discusión.....	61
6.	Conclusiones.....	67
7.	Bibliografía.....	68
8.	Anexos.....	74
8.1.	Identificación bioinformática de los genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> en genomas de <i>S. aureus</i> de origen nosocomial.....	74

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

Actualmente las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), representan la segunda causa de mortalidad en el mundo (14.9 millones de muertes), después de las enfermedades cardiovasculares (16.9 millones de muertes) y han superado, por mucho, el número de muertes provocadas por el cáncer en sus diferentes modalidades (7.1 millones de muertes). (1)

Las bacterias causantes de IAAS pueden presentar resistencia a la mayoría de los antibióticos usados en la terapéutica médica y no pueden prevenirse mediante un esquema de vacunación. Una de las modalidades de IAAS más frecuentes en el ámbito nosocomial son las infecciones relacionadas a dispositivos médicos (IRDM) causadas por *Staphylococcus aureus*, que tiene la propiedad de crecer adherido en comunidades a las que se les ha denominado "biofilms" o "biopelículas". (2,3)

La presencia de biofilm, constituye un problema para el éxito del tratamiento de las IRDM, porque las bacterias que infectan al paciente y forman biofilm, se hacen más resistentes a los antibióticos, que las mismas bacterias en estado libre. (3) Situación que implica incremento en los tiempos de hospitalización; ocasionando aumento tanto en los costos del tratamiento como de las cifras de morbi-mortalidad.

Considerando lo expuesto anteriormente, es necesario establecer en el laboratorio, metodologías que permitan identificar en *S. aureus* los genes que codifican la producción del biofilm. Y así mismo establecer si la producción de biofilm le confiere al *S. aureus* una mayor capacidad de desarrollar resistencia a los antibióticos.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Determinar la producción de biofilm mediante la identificación por PCR estándar de los genes *icaA* e *icaD*, y fenotípicamente por el ensayo cualitativo en tubo de Christensen, en cepas clínicas de *S. aureus* aisladas de pacientes con diversas enfermedades cardiovasculares del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (INCICH) de la Ciudad de México.

1.2.2. Objetivos Particulares

1.2.2.1. Diseñar mediante herramientas bioinformáticas, un par de oligonucleótidos específicos para la identificación de los genes *icaA* e *icaD* mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

1.2.2.2. Determinar si la presencia de los genes *icaA* e *icaD* en *S. aureus* garantiza la producción de biofilm.

1.2.2.3. Realizar el ensayo cualitativo en tubo de Christensen para la producción fenotípica de biofilm en cepas clínicas de *S. aureus*.

1.2.2.4. Identificar bioinformáticamente los genes *icaA* e *icaD* en genomas de *S. aureus* nosocomiales que ya han sido secuenciados.

1.2.2.5. Determinar si el perfil de resistencia a los antibióticos se ve modificado por la producción de biofilm en *S. aureus*.

1.2.2.6. Definir que metodología de laboratorio es la más adecuada para determinar la capacidad productora de biofilm en cepas de *S. aureus* del INCICH.

1.3. Hipótesis

Sí las cepas clínicas de *S. aureus* resistentes a antibióticos son aisladas de pacientes que utilizan dispositivos médicos, entonces la presencia de los genes *icaA* e *icaD* determinaran un fenotipo biofilm positivo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS)

Una *infección* se define como la presencia de un microorganismo en el tejido del huésped, donde vive, crece, se multiplica e induce una respuesta inmune del hospedero, que genera signos y síntomas. (4)

Para que ocurra una infección, existen una serie de factores que contribuyen la transmisión de un microorganismo infeccioso a un huésped susceptible. Las infecciones pueden originarse en la comunidad o en instituciones de atención sanitaria.

Las IAAS, se originan en instituciones de salud y pueden afectar a los pacientes, así como al personal de salud durante sus actividades cotidianas en un hospital. Este tipo de infección, ocurre cuando un microorganismo deja su hábitat natural (reservorio), para infectar mediante la expresión de factores de virulencia, a un sujeto susceptible de adquirir la infección, después de esta acción el sujeto (hospedero) desarrollará la enfermedad. (4).

Una IAAS, también se define como “la condición localizada, resultante de la reacción adversa a la presencia de un agente infeccioso, que no estaba presente, en el momento de ingreso del paciente a la unidad de atención a la salud y que puede manifestarse incluso después de su egreso”. (5)

Las IAAS representan un problema de salud pública grave a nivel mundial, debido a la frecuencia con la que se producen, la morbilidad y mortalidad que provocan y el riesgo que presentan ante los pacientes, el personal sanitario y a los sistemas de salud.

Con base en encuestas nacionales de prevalencia de IAAS y los datos de programas de bacteriemia hospitalaria, se estima que en el Continente

Americano se contraen unas 220,000 IAAS anuales, que dan lugar a 8,000 muertes relacionadas con esta causa. Las estadísticas aumentan cuando las IAAS son causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos. (6)

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) afirma que las complicaciones, morbilidad y mortalidad de una tercera parte de las IAAS en el continente americano, se pueden prevenir al instaurar un programa eficaz de prevención y control de infecciones en los hospitales. (6)

Con relación a lo anterior, en México desde el año 1997, se cuenta con un sistema de vigilancia a nivel nacional de IAAS, y se conoce como la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), la cual, mediante la NOM-045-SSA-2005 Para la vigilancia, prevención y control de Infecciones Nosocomiales y el manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica, genera información de uso clínico, epidemiológico, estadístico y de salud pública. (5)

Un ejemplo sobresaliente de IAAS, son las que están asociadas a dispositivos médicos (IRDM) como son las que causan infección del torrente sanguíneo asociada a catéter, infección de las vías urinarias asociada a sonda Foley o bien la infección de herida quirúrgica, así como infecciones del Sistema Cardiovascular (del sitio de inserción de catéter, mediastinitis y endocarditis). (5) Las infecciones asociadas a catéteres centrales tienen una tasa de incidencia de 1.8 a 5.2 casos por cada 1,000 días de uso en unidades de cuidados intensivos, presentando una mortalidad del 18% en pacientes tan sólo en Estados Unidos. Mientras que la infección asociada a sonda vesical tiene una incidencia del 40%, con una tasa de 3 a 6.7 casos por cada 1,000 días de uso. (7)

En este sentido, el análisis bacteriológico de los implantes y tejidos afectados por estas infecciones, muestra que en la mayoría de los casos,

la bacteria responsable de la infección, crece adherida sobre el tejido y/o implante, formando comunidades de bacterias a las que se les ha denominado biopelículas o "biofilms". (3)

2.2. *Staphylococcus sp.*

Los estafilococos pertenecen al grupo de las bacterias con morfología de cocos Grampositivos y catalasa positivas, que al microscopio se agrupan semejando un racimo de uva, tienen un diámetro de entre 0.5 y 1µm, son anaerobios facultativos, inmóviles, no presentan esporas, pueden crecer en medios de cultivo con elevada concentración de sal y se desarrollan en un intervalo de temperatura de 18-40°C.

El género de los estafilococos, comprende 40 especies y 24 subespecies, muchas de las cuales pertenecen a la microbiota comensal del ser humano. Con base en el resultado de la prueba de coagulasa, los estafilococos se dividen en *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y Estafilococos Coagulasa Negativa (ECN), siendo *Staphylococcus epidermidis* el principal ECN de importancia médica.

Todas las personas portan ECN en la piel, y es frecuente la colonización transitoria de los pliegues cutáneos húmedos con *S. aureus*. En los bebés, se observa con frecuencia la colonización de *S. aureus* en el ombligo, la piel y la región perianal. Mientras que *S. aureus* y ECN se encuentran en la bucofarínge, el aparato digestivo y el sistema genitourinario.

Además, los estafilococos también pertenecen a un importante grupo de patógenos en el ser humano que son capaces de originar infecciones de la piel, los tejidos blandos, los huesos, el aparato genitourinario, que pueden poner en peligro la vida o bien producir enfermedades oportunistas en pacientes inmunocomprometidos.

La expresión de factores de virulencia en estafilococos, se halla bajo el complejo de sistemas reguladores, y el más importante es el *agr* (regulador del gen accesorio). Este sistema que funciona mediante "quorum sensing", permite la expresión de proteínas de adhesión y promueve la colonización tisular cuando la densidad bacteriana es baja, y de enzimas hidrolíticas y toxinas cuando la densidad es alta. (8,9)

2.2.1. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Es el miembro más virulento y mejor conocido del género. Las colonias de *S. aureus* en medios de cultivo sólidos, son de aspecto dorado, como consecuencia de los pigmentos carotenoides que se forman durante el desarrollo bacteriano y que hacen alusión a su nombre (*aureus*=dorado). Es la única especie de importancia médica que produce la enzima coagulasa.

S. aureus es parte de la microbiota habitual de la piel y de las superficies mucosas. Tiene la capacidad de sobrevivir en las superficies secas, durante largos períodos de tiempo. Por lo tanto, su permanencia en instituciones de salud representa un serio riesgo. Su transmisión se lleva a cabo de persona a persona, a través de contacto directo o de la exposición a fómites contaminados. Entre los factores de riesgo que existen para desarrollar una infección por esta bacteria, se encuentran las cirugías previas del paciente, uso irracional de antibióticos y la colocación de dispositivos médicos como prótesis, válvulas o catéteres. (8)

S. aureus causa enfermedades mediante la producción de toxinas o a través de la invasión directa y la destrucción del tejido. Las manifestaciones clínicas de estas, se deben casi exclusivamente a la actividad de sus toxinas, mientras que otras afecciones son consecuencia directa de la proliferación del microorganismo, la cual da lugar a la

formación de abscesos y la destrucción tisular, como por ejemplo en casos de endocarditis. La infección que se produce en los dispositivos médicos requiere un número menor de estafilococos. (8)

El *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM), se considera un patógeno importante en salud pública, ya que produce infecciones graves en pacientes hospitalizados y también de forma extrahospitalaria, en niños y adultos previamente sanos.

Las cepas SARM suelen ser resistentes a muchos antibióticos, entre ellos penicilinas y cefalosporinas, y a veces son sensibles sólo a vancomicina y teicoplanina, reduciendo así las opciones terapéuticas. Por lo que SARM, es considerado uno de los principales agentes de infecciones causantes de IAAS. (10)

La patología de las infecciones producidas por *S. aureus*, depende de la producción de proteínas de superficie, que intervienen en la adhesión de las bacterias a los tejidos del organismo y la fabricación de proteínas extracelulares, como toxinas específicas y enzimas hidrolíticas (Tabla 1).

Las proteínas de adhesión a la superficie, se unen de forma covalente con el peptidoglucano de la pared celular del estafilococo y se han llamado MSCRAMM's (componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz).

Más del 50% de los casos de bacteriemia por *S. aureus* se adquieren en el hospital después de una intervención quirúrgica, debido a que la entrada de los microorganismos al corazón es hematógena. La presencia de catéteres y dispositivos médicos presenta un riesgo aproximadamente del 5% al 10% de desarrollar endocarditis infecciosa. (11, 12)

Tabla 1. Factores de Virulencia en *S. aureus* (8, 13)

Factores de Virulencia	Efecto biológico
Componentes estructurales	Cápsula Inhibe la opsonización y fagocitosis.
	Polisacáridos extracelulares Facilita la adherencia a cuerpos extraños.
	Peptidoglucano Atrae a los leucocitos y activa el complemento e inhibe la fagocitosis.
	Ácido teicoico Se une a la fibronectina.
	Proteína A Inhibe la opsonización y la fagocitosis.
Toxinas	Citotoxinas Dañan las membranas de diversas células.
	Toxinas Exfoliativas ETA, ETAB Proteasas de serina que rompen los puentes intercelulares del estrato granuloso de la epidermis.
	Enterotoxinas Estimulan el peristaltismo intestinal e induce náuseas y vómitos.
	Toxina 1 del Síndrome del shock tóxico Activa una gran cantidad de linfocitos con una producción masiva de citocinas.
Enzimas	Coagulasa Convierten el fibrinógeno en fibrina. Evitando la fagocitosis.
	β-lactamasa Hidroliza el anillo β-lactámico en antibióticos de este grupo.
	Hialuronidasa Induce la diseminación de los estafilococos por el tejido.
	Fibrinolisisina Disuelve coágulos de fibrina.
	Lipasas Hidrolizan lípidos.
	Nucleasas Hidrolizan DNA.

S. aureus es considerado uno de los patógenos más importantes que producen endocarditis infecciosa (85% de los casos), constituye una enfermedad grave con tasa de mortalidad de aproximadamente el 50%. La endocarditis se define como una infección del corazón localizada en las válvulas, defectos septales o endocardio, es una infección intracardíaca activa, cuya lesión más característica son las vegetaciones. (14, 11) *S. aureus* utiliza adhesinas que median su unión a la vegetación. (10)

El pronóstico del paciente es desfavorable a no ser que se instaure un tratamiento médico y quirúrgico adecuado de forma inmediata. Generalmente se logra la curación clínica de la endocarditis, pero pueden existir complicaciones como consecuencia de la diseminación secundaria de la infección a otros órganos. (8)

2.3. Biofilm en estafilococos

Los *biofilms*, se definen como comunidades de microorganismos, que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. (2)

La formación de los biofilms está determinada por el tipo de microorganismo, la disponibilidad de nutrientes y las características del substrato al cual se adhieren. (18) Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta el 97% del contenido total. Además del agua y los microorganismos, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos y en menor cantidad por otras moléculas como proteínas y DNA. (3)

Los biofilms asociados a implantes y dispositivos médicos, causan infección en el paciente e interrumpen el correcto funcionamiento del dispositivo al que se adhieren. Según el Centro para el control y

prevención de enfermedades (CDC), la probabilidad de que ocurra una infección a partir de biofilm es del 65 al 80%, siendo el tracto urinario, el tracto respiratorio, el torrente sanguíneo y los sitios de herida quirúrgica, los principales sitios de infección. El 87% de las infecciones del torrente sanguíneo están asociadas con dispositivos extravasculares, incluyendo marcapasos e injertos vasculares protésicos, como las válvulas cardíacas. (16)

Dentro del biofilm, las bacterias se protegen de la acción del sistema inmunológico, del ataque de las células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos, volviéndolas así bacterias resistentes a los antibióticos. Esto se debe a que las bacterias del biofilm, pueden ser hasta 1.000 veces más resistentes a los antibióticos, que esas mismas bacterias crecidas en medio de cultivo líquido, por ello las IAAS representan situaciones difíciles de tratar en su terapéutica. (3)

La etapa inicial del proceso de formación del biofilm, es la adherencia del *S. aureus* a la superficie o tejido. Una vez que la bacteria se ha adherido, comienza a dividirse y las células de la progenie se extienden alrededor del sitio de unión, llevando a cabo la etapa de acumulación. Después, el *S. aureus* comienza a secretar un exopolisacárido, que constituye la matriz del biofilm, proceso conocido como maduración, y se empieza a formar una estructura similar a setas vegetales. Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo, para poder colonizar nuevas superficies (células plantónicas), cerrando así el proceso de desarrollo de biofilm (Figura 1). (3)

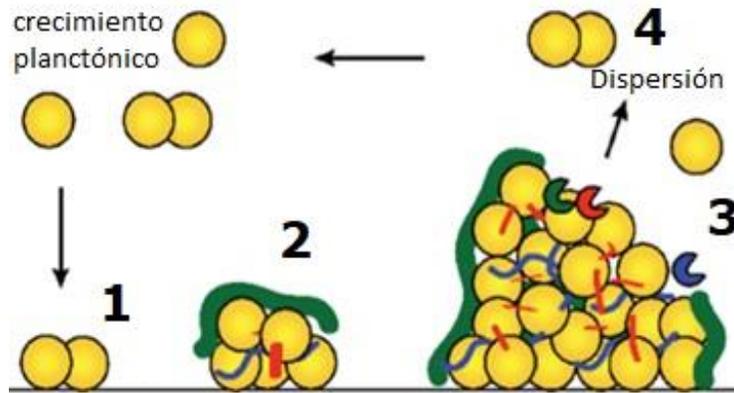


Figura 1. Proceso de formación de biofilm en *S. aureus*. 1) Adhesión a la superficie. 2) Acumulación y división celular. 3) Maduración mediante la secreción del exopolisacárido. 4) Dispersión celular. (1)

Significativamente, la mayoría de las infecciones relacionadas con la producción de biofilm en los dispositivos médicos, son causadas por *S. epidermidis* o *S. aureus*. (Figura 2). (17) Siendo *S. aureus*, el microorganismo aislado más frecuente de catéteres intravasculares, tubos endotraqueales, catéter de diálisis peritoneal, heridas quirúrgicas y válvulas cardíacas. (18)

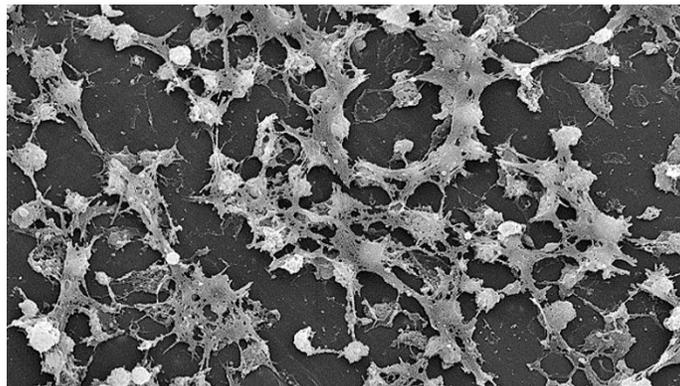


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido. Superficie luminal de un catéter venoso invadido por *S. aureus* formando biofilm. (19)

S. aureus puede expresar una variedad de componentes de la superficie microbiana, que reconocen moléculas adhesivas (MSCRAMMs), los cuáles pueden interactuar con los ligandos extracelulares del hospedero, que pueden ser la proteína de unión a elastina (*ebpS*), proteína de unión a

colágeno (*cna*), proteínas de unión a fibronectina A y B (*finbA*, *finbB*), la proteína de unión a fibrinógeno (*fib*) y los factores de agrupamiento A y B (*clfA*, *clfB*) (Figura 3).

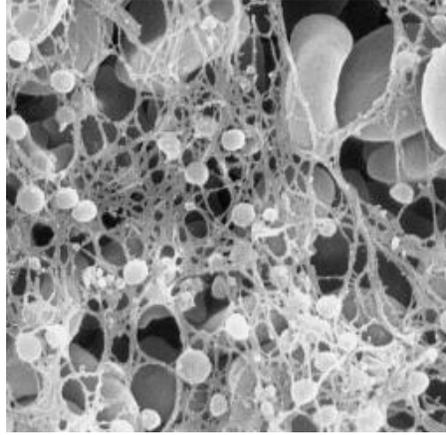


Figura 3. Micrografía electrónica de barrido de endocarditis experimental en ratas. Asociación entre *S. aureus* y los hilos de fibrina, los eritrocitos se pueden ver atrapados en la malla. (20)

Algunos estudios moleculares han demostrado que, durante las últimas fases de adherencia, los organismos primero se adhieren entre sí y luego elaboran el biofilm. Esta etapa está mediada por dos componentes del biofilm: la adhesión intercelular de los polisacáridos, llevada a cabo por polisacárido de adhesión intercelular (PIA/PNAG); y la adhesión intracelular A, D, B y C, mediada por el operón *icaADBC*. (21) El PIA, está compuesto por glucosaminoglicanos lineales β -1,6 (PNAG) principalmente en *S. epidermidis*, pero también presentes en *S. aureus*. Además, se identificó al locus de adhesión intercelular *icaADBC* como mediador en la adhesión célula-célula y en la producción de PIA (Figura 4). (18)

El producto del gen *icaA*, es una proteína transmembranal con homología a N-acetil-glucosamiltransferasa, que requiere del producto del gen *icaD*, para una actividad óptima. Los oligómeros de N-acetilglucosamina producidos por *icaAD* alcanzan una longitud máxima de 20 residuos y es sólo cuando *icaAD* se coexpresa con *icaC*, que codifica una proteína de

membrana putativa, cuándo se sintetizan cadenas de oligómeros más largas. *icaC* también está involucrado en la translocación del polisacárido en crecimiento a la superficie celular. La proteína de unión a superficie *icaB* es la responsable de la desacetilación de la molécula de poli-M-acetilglucosamina. (17)

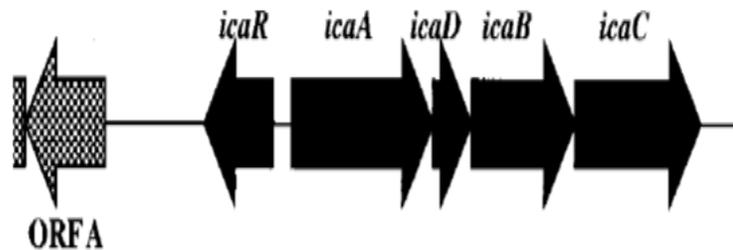


Figura 4. Organización genómica del operón *ica*. (18)

En *S. aureus* se ha descrito un proceso de variación de fase, producido por la inserción reversible del elemento IS256, en el interior del operón *icaADBC*. El proceso de inserción del elemento, puede ocurrir aleatoriamente en la población, con una frecuencia de 10^{-6} veces, y produce bacterias deficientes en la síntesis del exopolisacárido y por lo tanto, deficiente de la formación de biofilm. (3)

Estudios recientes han demostrado la formación de biofilm, mediante un mecanismo *ica*-independiente, mecanismo que no es sorprendente en el caso de *S. aureus* ya que cuenta con diversas adhesinas de superficie, las cuáles usa para unirse a la matriz extracelular del huésped. Entre los mecanismos *ica*-independientes para la formación de biofilm, se encuentra la proteína asociada a biofilm (*Bap*), que es esencial para la adherencia y la acumulación intercelular durante el desarrollo del biofilm. Una mutación del locus *ica* en este tipo de aislamientos no tiene impacto sobre el fenotipo del biofilm. Sin embargo, *SarA* actúa como un activador transcripcional del gen *bap* y además es un regulador positivo del desarrollo del biofilm mediante *Bap*.

El grupo de investigación de M. Smeltzer, demostró que la eliminación del locus *ica* en el aislamiento humano UAMS-1 del *S. aureus* biofilm positivo no tuvo impacto en el desarrollo del biofilm. En contraste, la mutación del gen *sarA* en la misma cepa, resultó en una capacidad dañada de formación del biofilm. (22, 17)

Fritzpatric & O'neill, encontraron una relación entre la formación del biofilm y las cepas de *S. aureus* que son resistentes a Meticilina. En cepas SARM, el operón *ica* se expresa, sin embargo, no existe una actividad transcripcional del operón por lo que no se expresa PIA y por lo tanto, no hay formación de biofilm. (23, 24)

Las cepas de *S. aureus* sensibles a la meticilina (SASM), producen comúnmente un biofilm dependiente del PIA. Por el contrario, la liberación de ADN extracelular (eDNA) y la expresión en la superficie celular de una serie de proteínas ancladas y la autolisina mayor, se han implicado en el fenotipo de biofilm de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (Figura 5). (25)

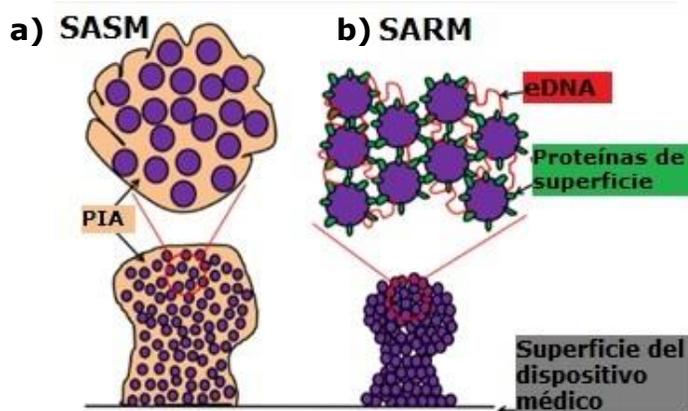


Figura 5. A) Cepa SASM en la que el biofilm se expresa mediante un mecanismo *ica*-dependiente con la producción de PIA. B) Cepa SARM en la que el biofilm se expresa mediante un mecanismo *ica*-independiente, en el que se necesitan proteínas de unión a superficie como la proteína de unión a fibronectina, mediador de lisis celular *Atl* y DNAe para la colonización de superficie y producción de biofilm. (25)

2.4. Resistencia a antibióticos en *S. aureus*

La adquisición de determinantes de resistencia antibiótica, han hecho de *S. aureus* un residente habitual del hábitat hospitalario, donde es el causante de problemas de multirresistencia importantes. (26) La aparición de cepas SARM, ha creado un gran problema para el manejo de las enfermedades infecciosas, y el tratamiento farmacológico constituye un reto mundial. (27,28)

De acuerdo al CDC, de las 2 millones de IAAS adquiridas en EUA, cerca de 94,360 casos son infecciones por SARM y aproximadamente 18,650 muertes son reportados anualmente. (29)

Al menos tres mecanismos bioquímicos están implicados en la resistencia de *S. aureus* a los agentes β -lactámicos: 1) producción de β -lactamasas, 2) fenómenos de tolerancia a los antibióticos y 3) resistencia por proteínas fijadoras de penicilina (PBP) modificadas. Una cepa SARM es un estafilococo dorado que ha adquirido uno de los casetes cromosomales que codifican la resistencia a la meticilina (SCCmec). (29) El mecanismo de resistencia a meticilina de *S. aureus* se asocia a la síntesis de la proteína PBP2a con baja afinidad por la meticilina y al resto de los agentes β -lactámicos. El determinante genético de esta proteína se encuentra en el gen *mec*. El gen *mec* contiene el locus *mecA*, que es el que codifica para la PBP2a y el *mecR* que funciona como regulador. Por lo tanto, las cepas SARM con resistencia intrínseca a meticilina, poseen los marcadores del gen *mecA* y, de la PBP2a. (26)

Se han descrito también, otras modalidades de resistencia en las que no se demuestra la presencia del gen *mecA*, ni de la PBP2a, como son la resistencia *boderline*, con niveles bajos de resistencia por hiperproducción de β -lactamasas, y la resistencia modificada (mod-SA), por alteración de las PBPs 1, 3 y 4. (26)

La resistencia a meticilina, incluye resistencia a derivados β -lactámicos. Las cepas SARM, también desarrollan resistencia a múltiples grupos de antibióticos incluyendo cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, lincosaminas, aminoglucósidos e incluso quinolonas, dejando así cepas SARM sensibles sólo a gluco péptidos. (26)

La resistencia a vancomicina y gluco péptidos en cepas SARM, aún es considerada poco frecuente, siendo en muchos casos el último recurso terapéutico en casos de multirresistencia. El tratamiento con vancomicina puede fallar, debido a que durante un tratamiento prolongado, las cepas pueden adquirir múltiples mutaciones en los genes cromosómicos (30, 31) Es decir, la resistencia a vancomicina se debe a dos mecanismos principales: 1) resistencia de bajo nivel en cepas de *S. aureus* con una pared celular más gruesa y desorganizada, y 2) la resistencia de alto nivel codificada por el operón del gen *vanA* procedente de enterococos resistentes a vancomicina. (8)

S. aureus es una de las bacterias, que tienen una extraordinaria capacidad de desarrollar resistencia a toda clase de antibióticos, a los cuales ha sido expuesto. Primero por su capacidad de adquirir la enzima β -lactamasa y después por la capacidad de adquirir los elementos *SCCmec* en cepas SARM, en el caso de la resistencia a otro tipo de antibióticos, es debido a la adquisición de elementos genéticos por transferencia horizontal de genes. (31)

Entre otros mecanismos que favorecen la resistencia a los antibióticos en *S. aureus*, se encuentra la formación de biofilm. Al estar embebido dentro del biofilm, las condiciones ambientales en las que se encuentra, favorecen la transferencia horizontal de genes, incluyendo marcadores de resistencia a antibióticos.

Una estrategia para erradicar las infecciones de *S. aureus* en implantes, consiste en tratamientos prolongados con altas dosis de antibióticos que actúen en diferentes dianas de la bacteria. Sí el tratamiento antibiótico no es exitoso, la última opción consiste en retirar el dispositivo infectado y cambiarlo por uno nuevo, lo cual no siempre es factible, pues muchos de los implantes médicos actúan como soporte vital de los pacientes.

Una de las estrategias utilizadas para combatir la formación de biofilm en dispositivos médicos, consiste en cubrir con antibióticos la superficie del mismo, lo que representa un enfoque potencialmente peligroso, debido al riesgo de selección de bacterias resistentes a los medicamentos, como es el caso del *S. aureus* resistente a meticilina. (32)

No existe un método universal para la detección de todos los tipos de resistencia a los antibióticos. La técnica fenotípica que se utiliza, es la establecida por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) conocida como la técnica de difusión en disco de Kirby Bauer. Esta técnica consiste en realizar una suspensión de la bacteria, equivalente a 0.5 McFarland y sembrarla de forma masiva en una placa de agar Mueller-Hinton, sobre la cual se colocan los discos de antibióticos y que se incuba a 35°C, durante 24h. Para que después del tiempo de incubación, se lea y mida el halo de inhibición bacteriano, que se formó alrededor del disco de antibiótico y se interprete de forma correcta bajo los estándares del CLSI. (26, 27)

Para la detección de cepas SARM se utiliza un disco de cefoxitina de concentración de 30µg, que actúa como inductor más fuerte que la oxacilina, sobre la producción de PBP2a en cepas *S. aureus* que poseen el gen *mecA* o bien se puede amplificar el gen *mecA* mediante PCR estándar.(33)

2.5. Métodos de laboratorio para la identificación de biofilm

Actualmente existen diversas metodologías para detectar la producción del biofilm, inicialmente fueron diseñadas para *S. epidermidis*, sin embargo, con el aumento de infecciones de dispositivos médicos asociadas a biofilm por *S. aureus*, estas técnicas se empezaron a experimentar para ambas especies.

Dependiendo del objetivo que se quiera alcanzar, las técnicas que existen para detectar biofilm van desde las más rudimentarias, como los métodos fenotípicos, hasta los más novedosos como los genómicos, que involucran la secuenciación del genoma de cada especie.

2.5.1. Métodos fenotípicos

Estas metodologías consisten en determinar la producción cualitativa o cuantitativa del biofilm y establecen una correlación entre el fenotipo positivo del biofilm y la expresión de PIA.

Los métodos se dividen en el ensayo cualitativo en tubo y el ensayo cuantitativo en placa de cultivo que fueron establecidos por primera vez por Christensen y colaboradores. Como segundo método fenotípico se encuentra la producción del biofilm en placas de agar rojo Congo desarrollado por Freeman y colaboradores, que a lo largo de la historia se ha modificado por varios investigadores. (25)

El *ensayo cualitativo en tubo* de Christensen, consiste en inocular la cepa de interés en Caldo Soya Trypticaseína contenido en tubos cónicos de poliestireno o tubos de vidrio de borosilicato que se incuban a 48h a temperatura de 35°C, después del tiempo de incubación, el medio de cultivo se retira utilizando una pipeta Pasteur, evitando tocar las paredes del tubo y éste se tiñe con un colorante, frecuentemente es la safranina

o el cristal violeta. Se considera una prueba positiva, si se forma una película en la pared de los tubos y una prueba negativa, si no se observa una película uniforme en las paredes del tubo o bien se observa la formación de un anillo en la interfaz líquido-aire. El resultado de esta prueba se interpreta como positivo fuerte, positivo débil y negativo (Figura 6). Esta metodología es la más sencilla de realizar y económica en su costo, sin embargo, también tiene algunas desventajas, como son que los resultados están sujetos al criterio de cada observador, la concentración de fuente de carbono en el medio, el material de los tubos, y que puede resultar en falsos positivos, si los tubos se agitan durante el procedimiento. (34)

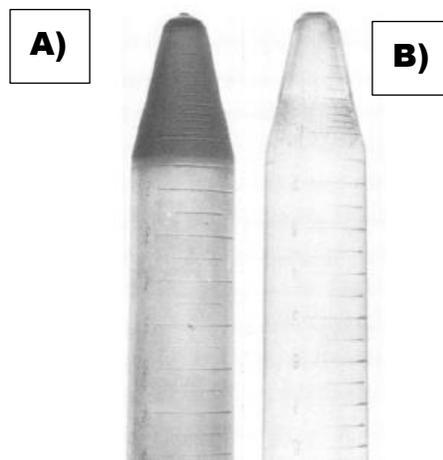


Figura 6. Ensayo cualitativo en tubos de poliestireno establecida por Christensen y asociados. A) Biofilm positivo fuerte. B) Biofilm positivo débil. (35)

El *ensayo cuantitativo en placa de cultivo*, tiene el mismo fundamento que la prueba cualitativa en tubo, para realizarla, se utilizan placas de cultivo de poliestireno con 96 pozos y se mide la densidad óptica de la película formada en la placa, a una longitud de onda de 570nm. (35) La ventaja de esta técnica es que se pueden establecer rangos de densidad óptica para clasificar la producción del biofilm, ya sea fuerte, moderada, débil o sin producción; así los resultados no dependen del criterio del experimentador (Figura 7). (36)

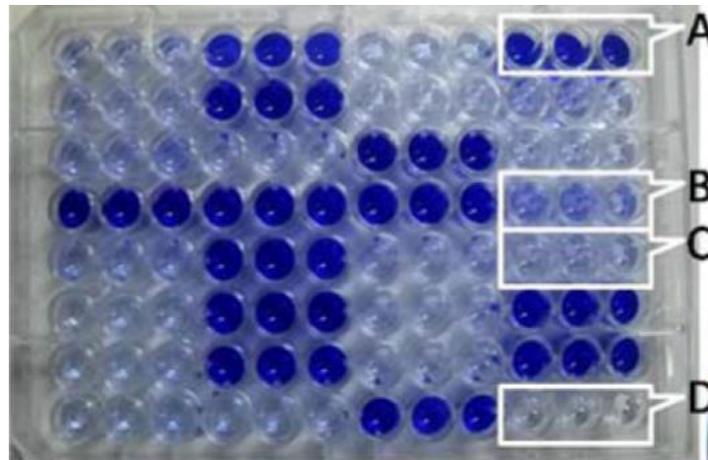


Figura 7. Ensayo cuantitativo en placa de cultivo para la determinación de biofilm. A) Alta. B) Moderada. C) Débil. D) Sin producción. (36)

La *producción de biofilm en placas de agar rojo Congo* consiste en inocular a la bacteria de interés en un medio de cultivo especial, que contiene agar infusión cerebro corazón (BHI), colorante rojo Congo y una fuente de carbono que, para *S. aureus* se necesita una combinación de glucosa y sacarosa al 2%. Las cepas se inoculan en el medio y se incuban durante 24h a 37°C, después de la incubación se realiza una primera observación de las colonias desarrolladas y se dejan incubando 24h más a temperatura ambiente para realizar una segunda lectura. Se considera una cepa productora de biofilm, cuando la colonia se desarrolla en tonalidades color negro y una cepa no productora, se registra cuando la colonia es de color rojo. (37, 13, 34, 38, 39) Al igual que para el ensayo cualitativo en tubo de Christensen, esta prueba depende del criterio del observador y puede existir una gama de resultados, como se ilustra en la figura 8.

Además de ser una técnica laboriosa, debido a la compleja preparación del medio, el colorante rojo Congo es considerado un mutágeno, por lo cual se recomienda precauciones estrictas de bioseguridad en el ensayo.

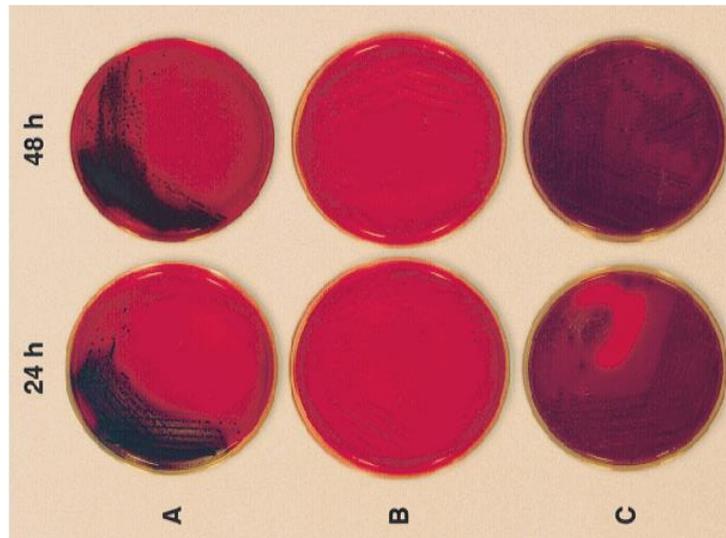


Figura 8. Producción de biofilm en Agar rojo Congo. A) Coloración negra, se considera cepa productora de biofilm. B) Coloración roja, se considera cepa no productora de biofilm. C) Variante de borde negro, se considera una cepa débilmente productora de biofilm. (40)

2.5.2. Métodos Moleculares

Esta metodología consiste en identificar a los genes asociados a la producción de biofilm, mediante el ensayo de PCR, ya sea en formato estándar o multiplex. En todos los casos, los genes de interés principal, están contenidos en el operón *ica*, y también los genes que llevan a cabo la producción de biofilm por el mecanismo *ica*-independiente, el cual ya se describió anteriormente. (34, 18)

Cramton en 1999, encontró que la función del operón *ica* es conservada entre *S. epidermidis* y *S. aureus*. Con base en esto, varios autores se han enfocado principalmente en identificar por PCR los genes *icaA* e *icaD*, debido de que *icaA* es el encargado de producir el PIA e *icaD* hacer esta producción más eficiente (Figura 9). Adicionalmente, otros autores han amplificado otros genes como *cnA*, *fnA* y *clfA* con el fin de diferenciar las cepas productoras de biofilm *ica*-dependiente de las cepas *ica*-independientes. (41, 42, 39)

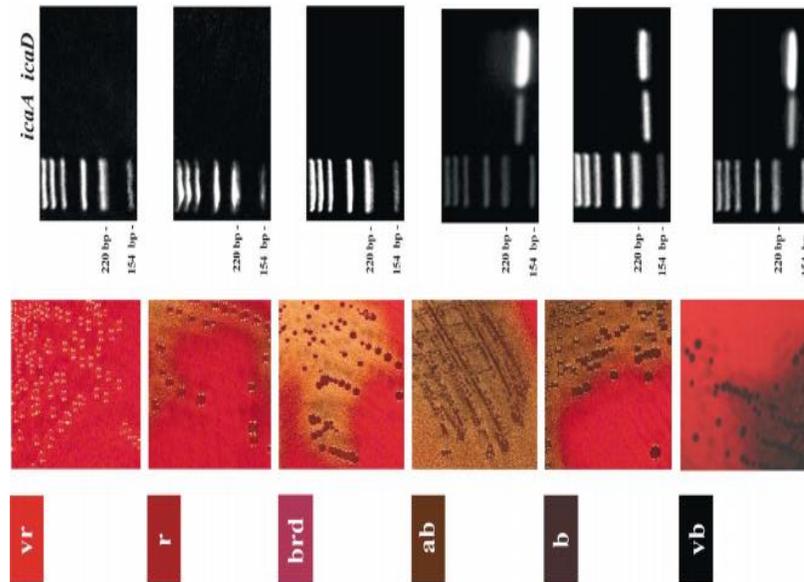


Figura 9. Identificación molecular de los genes *icaA* e *icaD* en *S. aureus* y su relación con las variantes fenotípicas productoras de biofilm en Agar Rojo Congo. Las variantes rojas representan una ausencia de los genes *icaA* e *icaD* mientras que las variantes negras, indican la presencia de ambos genes. A 103pb y 198pb se observan las bandas de amplificación de *icaA* e *icaD* respectivamente. vr= muy roja. r= roja. brd= borde rojo. ab= casi negra. b= negra. vb= muy negra. (39)

2.5.3. Métodos Genómicos

Actualmente la secuenciación de genomas, es un método poderoso para la rápida identificación de genes, provee de un conjunto virtual de todas las proteínas, que son codificadas por un organismo y sirve como una herramienta para posteriores análisis funcionales de genes de interés presentes en la bacteria. (43)

Esta metodología, consiste en localizar por análisis bioinformático los resultados de la anotación de genomas realizada, por ejemplo, con Prokka (disponible en <http://vicbioinformatics.com/software.prokka.shtml>), un software de acceso libre, que sirve para identificar la totalidad de los genes bacterianos. Es de utilidad para localizar los genes del operón *ica* presente en cepas de *S. aureus* y comparar con genomas secuenciados disponibles en GenBank, de esta forma, si los genes buscados se

encuentran presentes, existe una alta probabilidad de que puedan ser identificados por PCR y, por lo tanto que el fenotipo se exprese en las cepas de origen clínico a estudiar.

2.6. Medidas de bioseguridad en el laboratorio de microbiología que manipula *S. aureus* asociados a IAAS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 1983 reconoce que la seguridad en el laboratorio, principalmente la seguridad biológica, es de interés mundial. (44,45)

Los laboratorios de microbiología constituyen un ambiente de trabajo especial, que pueden presentar riesgos de adquirir enfermedades infecciosas, para las personas que se encuentren laborando en ellos. (46)

La piedra angular de la bioseguridad es la evaluación del riesgo en las actividades que se desarrollan, ya que el componente más importante para su valoración, es el juicio y experiencia del profesional, así como su entrenamiento. Una de las herramientas más útiles para llevar a cabo la evaluación del riesgo microbiológico, es la asignación de los agentes microbiológicos a uno de los grupos de riesgo existentes. Además de otros aspectos como son la patogenicidad del agente y la dosis infectiva, el resultado potencial de la exposición, la vía natural de infección, la estabilidad del agente en el ambiente y principalmente los aspectos de manipulación previstos en el laboratorio. (47, 45)

La OMS clasifica a los agentes biológicos en cuatro grupos de riesgo. *S. aureus* pertenece al grupo de riesgo número dos, y por lo tanto, debe manipularse en un laboratorio de bioseguridad nivel dos, ya que representa un riesgo moderado a la salud, puede causar enfermedades a humanos, y que pueden ser tratadas con tratamientos eficaces. (49)

La hoja de bioseguridad de *S. aureus* establece que la dosis infectiva es de al menos 100, 000 unidades en los humanos, y no existe un esquema de vacunación actual. Y que estas bacterias sobreviven durante semanas en los cadáveres, en los tejidos y órganos de los animales; y durante días, en la piel, en el suelo y en la superficie de los objetos metálicos y de vidrio. Sin presentar formas de resistencia.

En el ámbito laboral, la transmisión de *S. aureus* se lleva a cabo por contacto con personas, animales o elementos contaminados y es responsable de muchos casos de IAAS. El principal riesgo en el laboratorio es la inoculación percutánea con material cortante contaminado, la exposición a heridas abiertas, el contacto de la piel o mucosas y la proyección o salpicaduras a las mucosas. Se desconocen sus efectos cancerígenos y en la maternidad.

Para la desinfección y el control se puede utilizar hipoclorito de sodio al 1%, glutaraldehído al 2%, clorhexidina, etanol al 70% y formaldehído. *S. aureus* se puede inactivar por calor seco de (160-170)°C durante al menos una hora. Las enterotoxinas son resistentes al calor y estables a la temperatura de ebullición.

S. aureus es sensible a aminoglucósidos y cefalosporinas, pero la mayoría de las cepas son multirresistentes por lo que para cada cepa debe determinarse la sensibilidad a antimicrobianos de forma personalizada. En los hospitales, es frecuente el desarrollo de cepas resistentes a antibióticos como meticilina (SARM) o vancomicina (SARV). Por lo que el tratamiento con Vancomicina intravenosa es utilizado contra cepas SARM. (47, 48, 49, 50)

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El material biológico utilizado para realizar la fase experimental de esta tesis, consistió de 72 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con diversas enfermedades cardiovasculares del INCICH en la Ciudad de México. El período de recolección de estas cepas, abarca desde el 2016 hasta el 2018, y el origen del aislamiento de las muestras biológicas, fue principalmente de hemocultivos (Tabla 2).

Tabla 2. Origen del aislamiento de las cepas de *S. aureus* del INCICH.

Origen del Aislamiento	Número de cepas de <i>S. aureus</i>
Hemocultivo	48
Secreción Bronquial	8
Secreción de Herida	6
Líquido Diálisis	5
Otro*	5

*Biopsia, lavado bronquioalveolar, líquido peritoneal, punta de catéter y de válvula tricúspide.

3.1. Identificación bacteriana

El primoaislamiento y la identificación de las cepas bacterianas seleccionadas para este trabajo, se realizó en el INCICH, utilizando el Sistema Automatizado de Becton Dickinson Phoenix™ 1000. Las cepas clínicas fueron recuperadas en placas de medio de cultivo BHI (marca Oxoid) y transportadas al laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Facultad de Medicina (UNAM).

Para confirmar la identidad de las cepas clínicas, se estudió su morfología macroscópica mediante su crecimiento en el medio de cultivo BHI, y microscópica por tinción de Gram; además de pruebas bioquímicas rutinarias como la producción de la enzima catalasa y la fermentación del

manitol. Una vez que la identificación de los *S. aureus* fue confirmada, las cepas se conservaron en leche descremada al 20% hasta su posterior uso para la PCR.

3.1.1. Tinción de Gram

En un portaobjetos limpio y seco, se colocó una gota de agua estéril, a continuación se homogenizó una asada de la bacteria. Se realizó la extensión de la suspensión sobre el portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente, una vez secó, se fijó el frotis al calor, pasando un par de veces el portaobjetos sobre la flama de un mechero Bunsen.

Para realizar la tinción de Gram, se utilizó el kit comercial de la marca Hycel. Primero se cubrió el frotis con unas gotas de solución de Cristal violeta, se dejó actuar durante un minuto y se retiró el exceso del colorante al chorro de agua, después se cubrió con unas gotas de Lugol, se dejó actuar durante un minuto y se enjuagó con agua, se agregaron unas gotas de alcohol-acetona hasta decolorar y se eliminó el exceso con agua, por último se agregaron unas gotas de safranina, se dejó actuar un minuto y se enjuagó el exceso con agua. Se dejó secar el frotis a la intemperie y se observó al microscopio Carl Zeiss, con el objetivo de inmersión (Tabla 3).

Tabla 3. Controles bacterianos utilizados en la Tinción de Gram.

Cepas bacterianas de referencia	Gram	Morfología y afinidad al Gram
<i>S. aureus</i> ATCC 700699 (Mu50)	Positivo. Coloración morada	Cocos Gram positivos
<i>E. coli</i> ATCC 35218	Negativo. Coloración roja	Bacilos Gram negativos

3.1.2. Producción de la enzima Catalasa

En una zona de asepsia, con un asa estéril se tomó una colonia de un cultivo puro de *S. aureus* y se colocó sobre un portaobjetos limpio. Se agregó una gota de solución de peróxido de Hidrógeno al 3.34% marca Zuum, sobre la colonia en el portaobjetos y se observó si ocurría desprendimiento de oxígeno, lo cual se pone de manifiesto por la producción de burbujas, lo que se considera como un resultado positivo (Tabla 4).

Tabla 4. Controles bacterianos utilizados en la producción de la enzima Catalasa.

Cepas bacterianas de referencia	Resultado	Observaciones
<i>S. aureus</i> ATCC 700699 (Mu50)	Positivo	Producción de burbujas.
<i>E. faecalis</i>	Negativo	Sin producción de burbujas.

3.1.3. Prueba de fermentación de Manitol

El medio de cultivo agar Manitol y Sal, se preparó según las indicaciones del fabricante Oxoid y se vació en cajas de Petri con 3 divisiones. Con un asa bacteriológica se sembraron las cepas de *S. aureus* en cada cuadrante de las cajas, y estas se incubaron en una estufa bacteriológica marca Riossa modelo E-51 a 37°C durante 24h. Al terminar el período de incubación, se observaron las colonias desarrolladas y los resultados se interpretaron como lo refiere la tabla 5.

Tabla 5. Controles bacterianos utilizados en la Fermentación del manitol.

Cepas bacterianas de referencia	Resultado	Observaciones
<i>S. aureus</i> ATCC 700699 (Mu50)	Fermentador/Positivo	Vire del rojo fenol en el medio de cultivo a color amarillo

<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	No Fermentador/Negativo	Sin cambio de color en el medio de cultivo.
---	----------------------------	--

3.2. Método para la conservación de *S. aureus* en Leche Descremada al 20%

Una vez que la identidad de las cepas fue confirmada con las pruebas de laboratorio, se procedió a realizar su conservación en leche descremada hasta su uso en biología molecular.

Primero se realizó una siembra de forma masiva de la bacteria en medio de cultivo agar BHI, las placas se incubaron en estufa bacteriológica a 37°C durante 24h, después del periodo de incubación, a cada placa se le agregaron 5mL de Leche descremada estéril, una vez cubierto todo el desarrollo bacteriano con leche, éste se desprendió de la superficie del agar con ayuda de una varilla en ángulo recto de plástico estéril y mediante una pipeta serológica de 5mL estéril, la suspensión bacteriana se transfirió a crioviales de conservación. Los tubos se mantuvieron en congelación a -80°C hasta su uso posterior.

3.3. PCR para la identificación de los genes *icaA* e *icaD* en *S. aureus*.

Para realizar esta parte experimental, primero se hizo el diseño bioinformático de oligonucleótidos específicos, para los genes codificadores de biofilm *icaA* e *icaD*, después se realizó una estandarización del PCR, en cepas de *S. aureus* a las que previamente ya se les había identificado el gen *icaA*. Una vez estandarizado el programa para la PCR, se trabajaron las cepas nosocomiales de interés.

3.3.1. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Facultad de Medicina (UNAM), utilizando las secuencias de nucleótidos de los genes de interés, obtenidos del genoma de la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* NCTC 8325. Esta secuencia se obtuvo de la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), cuenta con el número de acceso AF086783 y corresponde al locus de adhesión intercelular (*ica*) del genoma antes mencionado.

Para el diseño de oligonucleótidos se utilizó el programa Primer3, disponible en <http://primer3.ut.ee/>. Este programa gratuito, es un algoritmo matemático y tiene entre sus funciones, la opción de sugerir pares de oligonucleótidos óptimos para la PCR, presentando los siguientes parámetros: temperatura de alineamiento, tamaño del producto de amplificación (amplicon) y el porcentaje de las bases nitrogenadas guanina-citosina.

Enseguida, se seleccionaron un par de oligonucleótidos para cada gen y posteriormente se realizó un análisis bioinformático, utilizando el programa BLAST (Basic local alignment tool), disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Este programa compara la secuencia de oligonucleótidos que se ingresa, contra las secuencias completas de genomas bacterianos (por ejemplo *S. aureus*), que se encuentran en bases de datos de libre acceso. Además BLAST proporciona información estadística para evaluar la significancia del alineamiento.

Se utilizó el programa BLAST, para analizar las secuencias de nucleótidos de los amplicones de cada gen seleccionado, después se revisaron los resultados obtenidos y así se aseguró que la secuencia fuera específica

para *S. aureus*. Posteriormente, se solicitó la síntesis de oligonucleótidos a una casa comercial y se procedió a estandarizar la PCR en el laboratorio.

- Diseño de los oligonucleótidos para *icaA*

Gen *icaA* (1239pb) número de acceso a GenBank AF086783.

TTGCAATTTTTAACTTTTTGCTTTTTATCCTGTATTTATGTCTATTTACTGGATTG
 TCGGTTCAATTTATTTCTATTTACCCAGAGAAATTAGATATTCATTGAACAAGAAG
 CCTGACATAAATGTGGATGAATTAGAAGGCATTACATTTTTACTTGCCTGTTATAA
 CGAAAGTGAAACGATTGAAGATACGTTGTCTAATGTTCTTGCCTCAAATACGAG
 AAGAAAGAAATTATTATCATTAAATGATGGAAGTTCAGATAATACAGCAGAACTCAT
 CTATAAAATCAAAGAAAATAATGACTTTATTTTCGTCGATTTACAAGAAAACAGAG
 GTAAAGCCAACGCACTCAATCAAGGCATTAAACAGGCTTCATATGATTATGTAATG
 TGCTTGGATGCAGATACTATCGTTGATCAAGATGCACCATATTATATGATTGAGAA
 TTTCAAACATGATCCAAAACCTTGGTGCAGGTTACAGGTAATCCTAGAATTCGAAATA
 AGAGTTCTATTTTAGGTAAAATCAAACGATAGAATATGCAAGTTTAATTGGCTGT
 ATTAAGCGAAGTCAGACACTTGCTGGCGCAGTCAATACTATTTCCGGGTGTCTTCA
CTCTATTTAAAAAAGTGCAGTGTGTCGACGTTGGCTACTGGGATACTGATA
TGATTACCGAAGATATTGCAGTTTCTTGGAATTGCATTTACGTGGATATC
GATTAAGTATGAACCGCTTGCCATGTGTTGGATGTTGGTTCCAGAAACAT
TGGGAGGTCTTTGGAAGCAACGCGTGAGATGGGCTCAAGGGGGACACGAA
GTATTACTACGAGACTTTTTTAGCACAATGAAAACGAAAAGGTTTCCTTTA
TATATTTTGATGTTTGAGCAAATCATCTCGATTTTATGGGTATATATAGTGC
TTCTATATTTAGGCTATTTGTTTATAACAGCAAACCTTCTTAGACTATACATT
TATGACATATAGTTTTTCAATATTTCTACTATCATCATTTACTATGACTTTTA
TAAACGTTATTCAATTTACAGTCGCACTCTTTATTGATAGTCGCTACGAGAA
AAAGAATATGGCTGGACTCATATTTGTAAGTTGGTATCCGACAGTATACTG
GATTATTAACGCAGCAGTAGTTCTTGTGCGCATTTCAAAAGCATTAAAACG
TAAGAGAGGTGGTTACGCAACATGGTCAAGCCAGACAGAGGGGAATACCC
AACGCTAA

En negritas se señala el amplicón *icaA* con tamaño de 616pb, que contiene los oligonucleótidos obtenidos por Primer3 que se señalan subrayados (Tabla 6).

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *icaA*.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Temperatura de fusión (Tm)
<i>icaA-F</i>	CTCTATTTAAAAAAGTGCAGT	22nt	56°C
<i>icaA-R</i>	TGGGTATTCCTCTGTCTGG	20nt	62°C

Tabla 7. Análisis bioinformático realizado con el programa BLAST.

Microorganismo	% Identidad para amplicón <i>icaA</i>
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> NCTC 8325	100%
<i>S. aureus</i> ATCC 700699 (Mu50)	99%

El producto de amplificación de *icaA*, obtenido por los oligonucleótidos diseñados en el laboratorio, se validó bioinformáticamente mediante los programas BLAST y Justbio de acceso libre, este último disponible en (<http://www.justbio.com/index.php?page=aligner>), dando un alto porcentaje de identidad de nucleótidos (99-100%), con la cepa utilizada como control positivo *S. aureus* 700699 (Tabla 7).

- Diseño de oligonucleótidos para *icaD*

Gen *icaD* (306pb) número de acceso GenBank AF086783.

ATGGTCAAGCCCAGACAGAGGGGAATACCCAACGCTAAAATCATCGCTAAATATTGTAAGAGAAACAGCACTTATCGCTATATCTTGTGTCTTTTGGATATATGTTTTAGTTGTTCTACTCGTTTATATTGGTACTATATTTGAAATTCATGACGAAAGTATCAATACAATACGTGTTGCTTTAAACATTGAAAATACTGAAATTTAGATATATTTGAAACTATGGGCATTTTCGCGATTATCATTTTTGTATTTTTTACAATTAGCATATTGATTCAAAAATGGCAGAGAGGGAGAGAATCGTGA

En negritas se señala el amplicón *icaD* con tamaño de 296pb, que contiene los oligonucleótidos obtenidos por Primer3, que se señalan subrayados (Tabla 8).

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *icaD*.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Temperatura de fusión (Tm)
<i>icaD-F</i>	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	20nt	62°C
<i>icaD-R</i>	CTCCCTCTCTGCCATTTTTG	20nt	60°C

Tabla 9. Análisis bioinformático realizado en el programa BLAST.

Microorganismo	% Identidad para amplicon <i>icaD</i>
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> NCTC 8325	100%
<i>S. aureus</i> MS4	99%
<i>S. aureus</i> ATCC 700699 (Mu50)	99%

El producto de amplificación de *icaD* obtenido por los oligonucleótidos diseñados en el laboratorio, se validó bioinformáticamente, dando un alto porcentaje de identidad con la cepa control *S. aureus* 700699.

Una vez que se validó la especificidad de los oligonucleótidos diseñados, se procedió a estandarizar el programa de PCR en el termociclador Thermal Cycler C1000™ (BioRad) del laboratorio, para amplificar los genes *icaA* e *icaD*, haciendo uso de cepas de *S. aureus* nosocomiales biofilm positivas.

Para poder llevar a cabo la estandarización del programa y el análisis por PCR de las cepas de *S. aureus* del INCICH, primeramente, se extrajo y se purificó el DNA de las cepas a ensayar.

3.3.2. Extracción y purificación del DNA

La extracción realizada fue de tipo enzimático, trabajando con una combinación de lisozima y lisostafina, la cual se realizó de la siguiente manera:

Las cepas de *S. aureus* se sembraron por estría cruzada en placas con medio de cultivo agar BHI y se incubaron a 37°C durante 24h. Después del tiempo de incubación, se tomaron 10 colonias aisladas y se añadieron en 245µL de solución de lisis completa (H₂O GBM, Tris HCl, EDTA, Lisozima y Lisostafina), contenida en un tubo Eppendorf de 1.5mL. Los tubos se

incubaron en un equipo de bloque metálico (Torrey Pines Scientific Echotherm™) a 37°C durante 90min. A continuación, los tubos se calentaron dentro de un vaso de precipitados con agua hirviendo a 95°C, durante 10 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, después se centrifugaron a 10,000rpm durante 10min. Por último, dentro del gabinete de seguridad biológica clase II (Nuair NU-425-400), se recuperó la fase acuosa en un tubo Eppendorf estéril de 0.6mL. Se añadieron 300µL de isopropanol a -20°C, la mezcla se homogenizó y los tubos se mantuvieron a -20°C durante la noche.

Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 10,000rpm durante 30 min, se retiró el isopropanol por decantación y se añadieron 100µL de etanol al 70%. Los tubos se coloraron en hielo durante 15 min, después, el etanol se retiró mediante decantación. El DNA extraído se dejó secar durante una hora en el interior del gabinete de seguridad biológica clase II. Después se agregaron 50µL de buffer TE 1X y se homogenizó con el DNA. Por último, los tubos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3.3.3. Estandarización de la técnica de PCR en el termociclador

Inicialmente se realizó una PCR en gradiente de temperaturas con la cepa *S. aureus* HGC240. La selección del rango de temperaturas de alineamiento, se hizo con base en lo reportado de la literatura y en Primer3, empezando por 55.5°C hasta 57.5°C, las temperaturas intermedias del gradiente fueron calculadas por el termociclador (Tabla 11). El cóctel de la PCR para cada uno de los genes de estudio, se preparó con base en lo establecido en otros trabajos realizados en el laboratorio (Tabla 10).

Tabla 10. Coctel de PCR para realizar el gradiente de temperaturas con la cepa de *S. aureus* HGC240 en el programa DICAGRSA.

	1x (µL)
H₂O GBM	13.55
Buffer MgCl₂	3.0
dNTP´s	3.75
Oligo <i>icaA</i>-F	3.6
Oligo <i>icaA</i>-R	3.6
DNA	2.0
Taq Pol	0.5
Volumen total	30

Tabla 11. Gradiente de temperaturas ensayadas. Programa de PCR DICAGRSA.

Temperaturas de alineamiento (°C)
57.5
57.4
57.2
56.8
56.3
55.8
55.6
55.5

Los reactivos se mantuvieron a 4°C, mientras se preparaba la mezcla de reacción dentro del gabinete de seguridad biológica, utilizando micropipetas con puntas estériles, para depositar los reactivos en un tubo Eppendorf de 1.5mL. Se homogeneizó la mezcla y posteriormente se distribuyeron 30µL en tubos de 200µL para PCR. Los tubos que contenían las muestras del gradiente se acomodaron dentro del termociclador y se seleccionó el ciclo de PCR que realizaría el gradiente (Tabla 12).

Tabla 12. Condiciones de PCR DICAGRSA, utilizado para realizar el gradiente de temperaturas.

Temperatura (°C)	Tiempo (s)
94	240
94	30
55.5-57.5	30
72	30
72	600
4	siempre

Una vez determinada la temperatura óptima de alineamiento (56.8°C), se realizó la estandarización del programa de PCR que realizaría la amplificación de los genes *icaA* e *icaD* en cepas del INCICH. Para realizar esta parte se utilizaron 20 cepas de origen nosocomial biofilm positivo, que ya se les había identificado el gen *icaA* en trabajos anteriores, además de un control negativo y *S. aureus* mu50 como control positivo. Las reacciones de la PCR de estandarización se realizaron en bloques de 10 muestras y los cocteles de PCR se prepararon como se señala la tabla 10, se creó un nuevo programa de PCR con la temperatura de alineamiento experimentalmente seleccionada del gradiente para ambos genes (Tabla 13).

Tabla 13. Programa ICAADSA diseñado para estandarizar la PCR de cepas del INCICH.

Temperatura (°C)	Tiempo (s)
94	240
94	30
56.8	30
72	30
72	600
4	siempre

3.3.4. PCR en cepas de *S. aureus* del INCICH

Una vez que se estandarizó la PCR en la que trabajaron óptimamente los oligonucleótidos diseñados, se realizaron las PCR correspondientes a las cepas de *S. aureus* del INCICH y los genes *icaA* e *icaD* se amplificaron por separado. También, se ajustó la cantidad de DNA que se utilizó en el cóctel de PCR. Se trabajó en bloques de 10 muestras problema, más un control negativo y *S. aureus* Mu50 como control positivo. La amplificación de los genes se realizó en el programa de PCR de la tabla 14.

Tabla 14. Coctel de PCR para las cepas de *S. aureus* del INCICH

	1x (µL)
H₂O GBM	14.55
Buffer MgCl₂	3.0
dNTP´s	3.75
Oligo <i>icaA</i>-F	3.6
Oligo <i>icaA</i>-R	3.6
DNA	1.0
Taq Pol	0.5
Volumen total	30

3.3.5. Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar los productos de amplificación, obtenidos por PCR del gradiente de temperatura de la estandarización y de las muestras de *S. aureus* del INCICH, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para todos los ensayos, como se describe a continuación.

3.3.5.1. Preparación del gel de agarosa al 1%

En una balanza analítica, se pesaron 0.45g de agarosa pura y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125mL y se le agregaron 45mL de Buffer TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), el matraz se tapó para evitar la evaporación

y se calentó en un mechero Fisher hasta disolución completa. El matraz se dejó reposar dentro del gabinete de seguridad II, y una vez que se alcanzó una temperatura de aproximadamente 45°C, se añadió 1µL de Bromuro de etidio y se mezcló suavemente. El contenido del matraz se vació a una cámara de electroforesis previamente armada, evitando la formación de burbujas. Se dejó solidificar, y a su término se retiraron los peines y se acomodó el gel, para después añadirle Buffer de TAE 1X hasta la línea marcada como límite en la cámara de electroforesis marca Owl.

3.3.5.2. Electroforesis de las muestras

Se mezclaron 4µL de agua grado biología molecular, más 4µL de buffer de carga (BlueJuice Gel Loading Buffer 2X), más 5µL del producto de amplificación de cada muestra y con la punta de una micropipeta se colocaron las muestras, en cada uno de los pozos del gel de electroforesis, considerando los controles correspondientes.

Para preparar el marcador molecular, se mezclaron 3µL de agua grado biología molecular, más 5µL de buffer de carga con 5µL de marcador molecular, y se cargó de la misma forma que las muestras problema.

Una vez llenados todos los pozos, se cerró la cámara y se conectó a una fuente de poder marca Amersham Pharmacia Biotech EPS 301 para realizar el corrimiento de las muestras a 95V y 65mA durante 50 min.

3.3.5.3. Revelado del gel

Transcurrido el tiempo, se apagó la fuente de poder y se sacó el gel de agarosa de la cámara de electroforesis. Se escurrió el exceso de buffer TAE 1X y se colocó sobre un transiluminador UV (UVP marca Benchtop), para observar si había presencia o ausencia de bandas de amplificación de DNA.

3.4. Detección fenotípica de la formación de biofilm mediante el ensayo cualitativo en tubo de Christensen

Se preparó el medio de cultivo Caldo Soya Trypticaseína según las indicaciones del fabricante BD Bacto™, y se distribuyeron 5mL en tubos de vidrio de 13x100mm con tapón de rosca, recién esterilizados en autoclave a 121°C durante 15min.

Se inocularon colonias aisladas de las cepas de *S. aureus* de 24h de incubación, en cada uno de los tubos con medio de cultivo hasta alcanzar una turbidez del tubo 0.5 McFarland. Los tubos se incubaron a 35°C durante 48h. Después del tiempo de incubación, el sobrenadante se retiró con una pipeta estéril, sin tocar las paredes del tubo. Se añadieron 2 gotas de safranina (al 0.5%) al tubo, se tapó y se ejerció rotación sobre sí mismo para que el colorante tocara toda la superficie. Por último, se invirtió el tubo y se dejaron transcurrir 10 min para visualizar la producción de biofilm.

Para observar los resultados, es necesario observar los tubos a la altura de los ojos contra un fondo blanco y con iluminación de luz blanca. Para una mejor visualización de la producción de biopelícula, se deben dejar los tubos 24h hasta llegar la sequedad del colorante. Los resultados se interpretan como lo señala la tabla 15.

Tabla 15. Interpretación de resultados para la formación de biofilm mediante el ensayo cualitativo en tubo de Christensen.

Resultados	Características
Positivo débil	Se observa una capa teñida de color rojo, en las paredes del tubo.
Positivo fuerte	Se observa una capa gruesa y uniforme, teñida de color rojo en las paredes del tubo.
Negativo	La formación de un anillo o la ausencia de una capa visible en las paredes del tubo.

4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de esta tesis experimental se presentan a continuación.

1. Identificación bacteriana

Las 72 cepas de *S. aureus* del INCICH se observaron en el medio de cultivo BHI, como colonias redondas, convexas, de bordes regulares, de consistencia butirácea y de color blanco a dorado (Figura 10). Al microscopio óptico, se identificaron cocos Grampositivos agrupados semejando racimos de uvas.

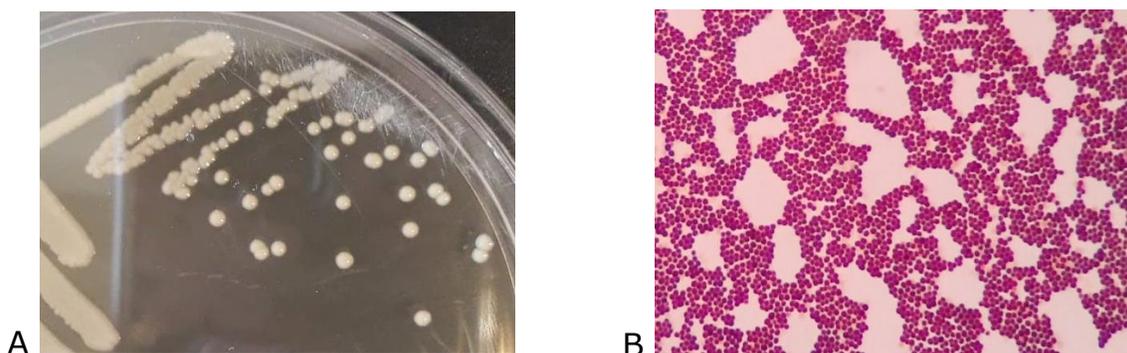


Figura 10. *Staphylococcus aureus*. (A) Desarrollo en placas con medio de cultivo de Agar BHI. (B) Cocos Grampositivos agrupados en racimos observados al microscopio óptico con objetivo 100X. Fotos tomadas por Daniela Ovando.

Mediante las pruebas bioquímicas, las cepas pusieron de manifiesto, la producción de la enzima catalasa y la fermentación del manitol (Figura 11 y Figura 12).

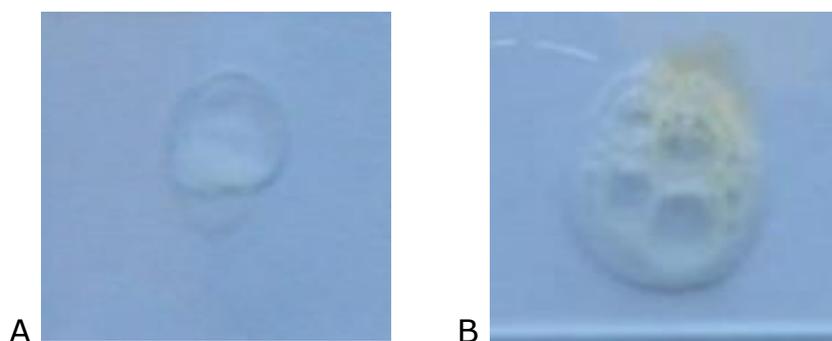


Figura 11. Prueba de la detección de la enzima Catalasa. (A) Resultado de una prueba negativa. (B) Resultado positivo de la producción de la enzima catalasa.

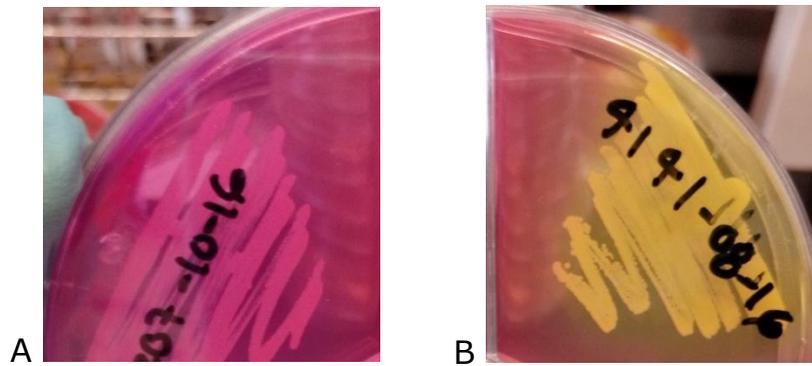


Figura 12. Prueba de fermentación del Manitol. (A) Resultado negativo, no hay fermentación del manitol. (B) Prueba positiva, la fermentación del manitol por *S. aureus* hace que vire el medio de cultivo a color amarillo. Fotos tomadas por Daniela Ovando.

2. Detección molecular

Los resultados de la estandarización de la PCR en las cepas control de *S. aureus* y las PCR realizadas en las cepas clínicas de *S. aureus* a ensayar, se muestran a continuación.

En la PCR realizada para determinar la temperatura de alineamiento ideal de los oligonucleótidos de *icaA* en la cepa control *S. aureus* HGC240, no se observó banda de amplificación a 616pb en las temperaturas de 57.5°C, ni a 57.4°C (Figura 13).

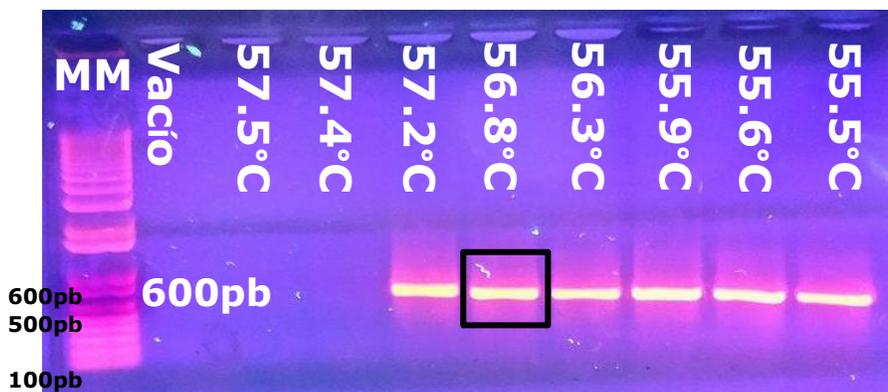


Figura 13. PCR en gradiente de temperaturas para el gen *icaA* en la cepa *S. aureus* HGC240. Foto tomada por Daniela Ovando.

En la PCR del gradiente de temperaturas para el gen *icaD* en la cepa control *S. aureus* HGC240, no se observó banda de amplificación a 296pb a una temperatura de 55.5°C (Figura 14).

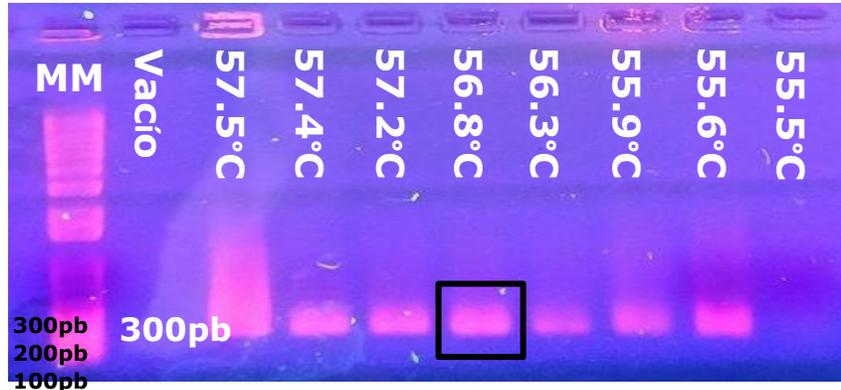


Figura 14. PCR en gradiente de temperaturas para el gen *icaD* en la cepa *S. aureus* HGC240. Fotos tomadas por Daniela Ovando.

Se determinó la temperatura de 56.8°C como la ideal, para el alineamiento en las PCR para identificar los genes *icaA* e *icaD*.

Todas las cepas de *S. aureus* del HGC utilizadas para estandarizar el programa de PCR denominado ICAADSA, amplificaron una banda que se observó a aproximadamente 616pb, que corresponde al tamaño del amplicón del gen *icaA* (Figura 15).

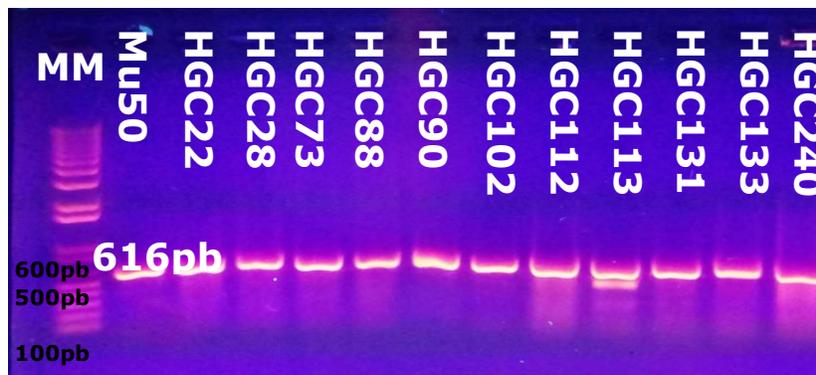


Figura 15. Gel de electroforesis de la estandarización del programa de PCR para el gen *icaA* en cepas de *S. aureus* del HGC. Foto tomada por Daniela Ovando.

Solo en las cepas de *S. aureus* HGC22, HGC28, HGC73, HGC102 y HGC112 no se observó banda de amplificación a 296pb que corresponde al tamaño del amplicón del gen *icaD* (Figura 16).

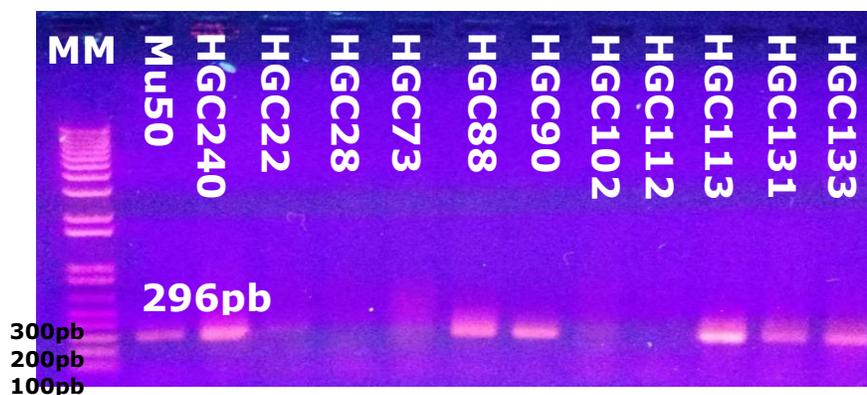


Figura 16. Gel de electroforesis para la estandarización del programa de PCR para el gen *icaD* en cepas de *S. aureus* del HGC. Foto tomada por Daniela Ovando.

La siguiente tabla, resume los resultados obtenidos de la estandarización del programa de PCR, respecto a la identificación de los genes *icaA* e *icaD* (Tabla 16).

Tabla 16. Detección por PCR de los genes *icaA* e *icaD* mediante el programa de PCR ICAADSA, y la producción de biofilm mediante Agar Rojo Congo en cepas de *S. aureus* del HGC.

Cepa	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	Cepa	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
HGC22	+	-	HGC151	+	+
HGC28	+	-	HGC158	+	+
HGC73	+	-	HGC160	+	+
HGC88	+	+	HGC183	+	+
HGC90	+	+	HGC192	+	+
HGC102	+	-	HGC204	+	+
HGC112	+	-	HGC205	+	+
HGC113	+	+	HGC208	+	+
HGC131	+	+	HGC209	+	+
HGC133	+	+	HGC240	+	+

Las 72 cepas de *S. aureus* donadas del INCICH, fueron aisladas principalmente de hemocultivos y en menor proporción de lavado bronquioalveolar, biopsia, líquido peritoneal, punta de catéter y válvula

triscúpide, sumando un total de cinco cepas agrupadas en la categoría de otras, como se muestra en la figura 17.

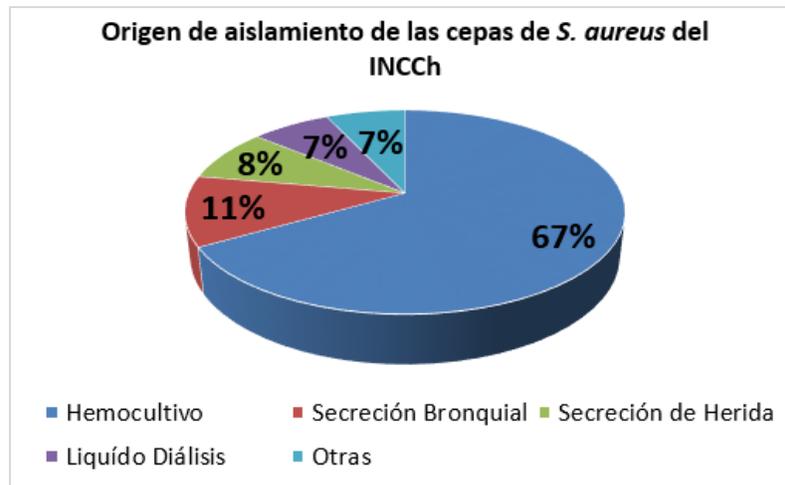


Figura 17. Distribución de las muestras clínicas de *S. aureus* del INCICH según su origen de aislamiento.

Con los oligonucleótidos diseñados inicialmente en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana para el gen *icaA*, sólo se logró amplificar el gen a 616pb, en las cepas clínicas INC01, INC11 e INC73 (Figura 18).

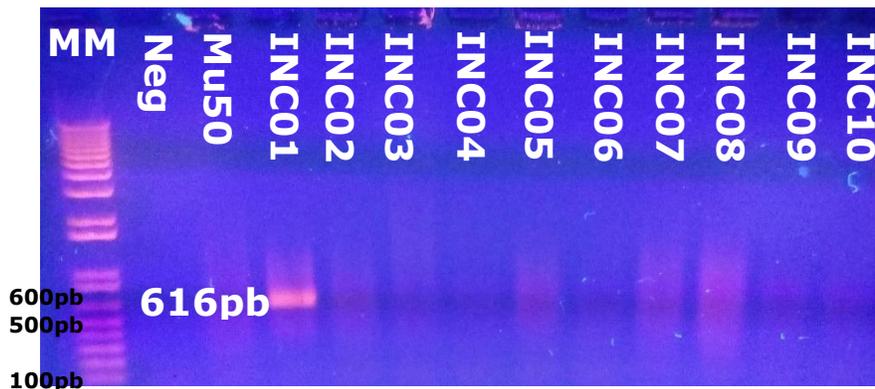


Figura 18. Gel de electroforesis del gen *icaA* en las cepas clínicas INC01-INC10. Solo se observa banda de amplificación a 616pb en la cepa INC01. Foto tomada por Daniela Ovando.

Se utilizó un par de oligonucleótidos diseñados para otro trabajo de tesis (13) con el fin de amplificar el gen *icaA* en la totalidad de las cepas clínicas de *S. aureus* (Tabla 17).

Tabla 17. Oligonucleótidos utilizados para amplificar *icaA* con tamaño de amplicon a 125pb

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Temperatura de fusión (Tm)
<i>icaA-F</i>	TCATATTTGTAAGTTGGTATCC	22 nt	52°C
<i>icaA-R</i>	TCTGTCTGGGCTTGACCAT	19 nt	55°C

El nuevo par de oligonucleótidos de *icaA* tenía una temperatura óptima de alineamiento de 58.2°C, y el producto de amplificación obtenido se observó a 125pb. En la figura 19, se observa un ejemplo del gel de electroforesis de la PCR para *icaA*.

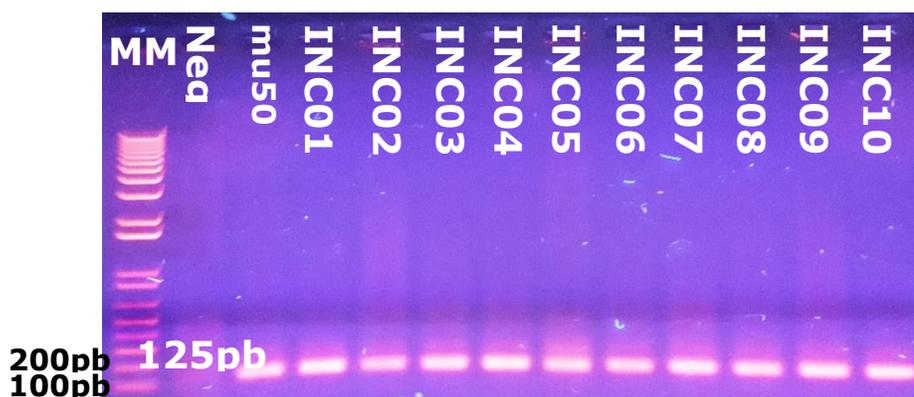


Figura 19. Gel de electroforesis del gen *icaA* en las cepas clínicas INC01-INC10, se observan bandas de amplificación a 125pb. Foto tomada por Daniela Ovando.

Con el nuevo diseño de oligonucleótidos, se identificó *icaA* en las 72 cepas de *S. aureus* del INCICH. Además se realizó un análisis genómico de los oligonucleótidos de *icaA* diseñados para este trabajo de tesis, con el fin de corroborar que su diseño y utilidad fue correcta, ver Anexo 1. En el caso del gen *icaD*, se utilizó el diseño original de oligonucleótidos y se obtuvo que sólo en la cepa INC005 no se observó banda de amplificación a 296pb que corresponde al tamaño del amplicón de *icaD*. En la figura 20, se observa la detección del gen *icaD* a 296pb en las cepas clínicas INC21-INC30.

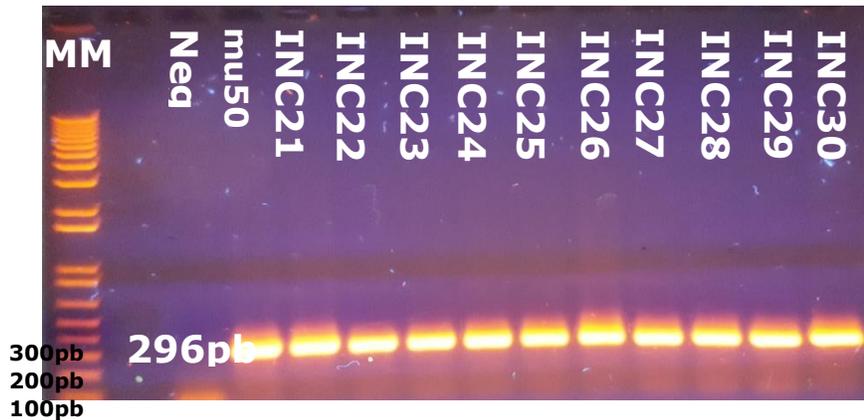


Figura 20. Gel de electroforesis del gen *icaD* en las cepas clínicas INC21-INC30, se observan bandas a aproximadamente 296pb. Foto tomada por Daniela Ovando.

3. Detección fenotípica de la formación de biofilm mediante el ensayo cualitativo en tubo de Christensen

La diferencia en la tonalidad del color observado en la producción de biofilm de las cepas clínicas de *S. aureus* del INCICH, clasificaba a la cepa como productora débil (PD), productora fuerte (PF) y no productora (NP). La producción de biofilm de las cepas utilizadas como controles en el ensayo cualitativo en tubo de Christensen se observan en la figura 21.



Figura 21. Ensayo cualitativo en tubo de Christensen. (A) *S. aureus* HGC240 utilizado como control interno productor fuerte. (B) *S. aureus* mu50 utilizado

como control productor débil. (C) *S. epidermidis* 12228 utilizado como control no productor. Foto tomada por Daniela Ovando.

Las cepas clínicas de *S. aureus* del INCICH pusieron de manifiesto una variación en la producción de biofilm, como se observa en la figura 22.



Figura 22. Ensayo cualitativo en tubo de Christensen en cepas clínicas del INCICH. Las cepas de *S. aureus* INC08, INC10 e INC13 son cepas no productoras de biofilm. Foto tomada por Daniela Ovando.

Del ensayo cualitativo en tubo en tubo de Christensen se obtuvo que: 51 cepas de *S. aureus* del INCICH fueron fuertemente productoras, 14 cepas débilmente productoras y sólo 7 cepas no son productoras de biofilm (Figura 23).

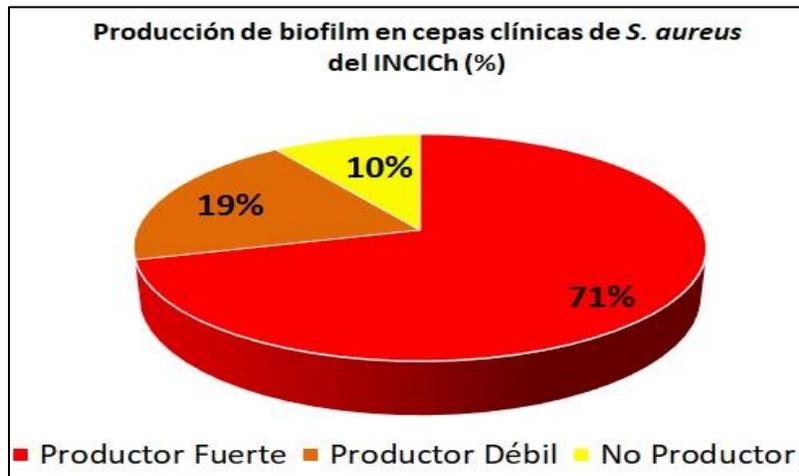


Figura 23. Resultados obtenidos de la producción de biofilm en cepas de *S. aureus* del INCICH mediante el ensayo cualitativo en tubo.

La producción de biofilm en las cepas de *S. aureus* de INCICH, se relacionó con la detección de los genes *icaA* e *icaD*, mediante la amplificación por

PCR. De las 72 cepas de *S. aureus* del INCICH, 71 cepas amplificaron *icaA* e *icaD* y solo la cepa INC005 amplificó únicamente el gen *icaA*.

De las 71 cepas de *S. aureus* que resultaron con el genotipo *icaA+/icaD+*, 51 cepas fueron fuertemente productoras, 14 cepas fueron débilmente productoras y sólo 6 cepas no fueron productoras. La cepa INC005 con el único genotipo *icaA+/icaD-* resultó ser no productora de biofilm (Figura 24).

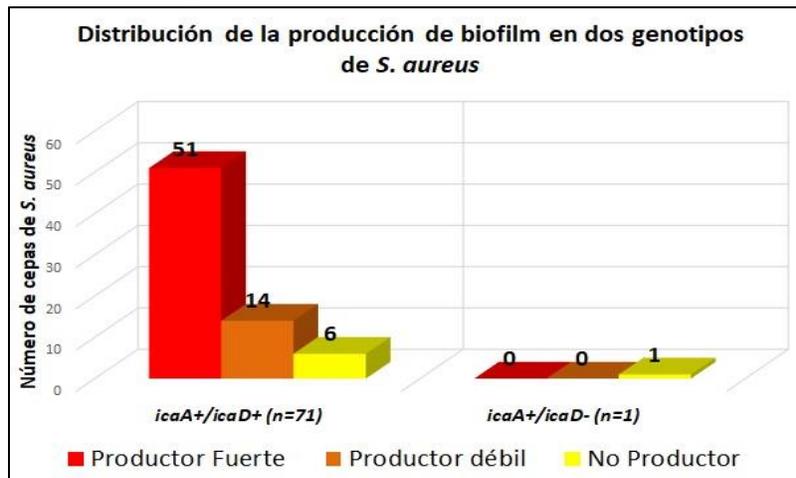


Figura 24. Distribución de la producción de biofilm según los genotipos *icaA+/icaD+* e *icaA+/icaD-* obtenidos para las cepas clínicas de *S. aureus* del INCICH.

De las 51 cepas de *S. aureus* *icaA+/icaD+* que son fuertemente productoras de biofilm, 33 cepas fueron aisladas de hemocultivos, 20 cepas fueron aisladas de secreciones bronquiales y de herida, y 8 cepas fueron aisladas de líquidos de diálisis, y de otros sitios de infección como lavado bronquioalveolar, biopsia, punta de catéter y válvula tricúspide. De las 14 cepas de *S. aureus* *icaA+/icaD+* que son débilmente productoras de biofilm, 10 cepas fueron aisladas de hemocultivos, 2 cepas fueron aisladas de secreción bronquial y 2 cepas fueron aisladas de líquido de diálisis y de líquido peritoneal. De las 6 cepas de *S. aureus* *icaA+/icaD+* que no son productoras de biofilm, 5 cepas fueron aisladas de hemocultivos y 2 cepas fueron aisladas de secreción bronquial y de herida.

La cepa INC005 con el genotipo *icaA+*/*icaD-* no productora de biofilm, fue aislada de hemocultivo (Figura 25).

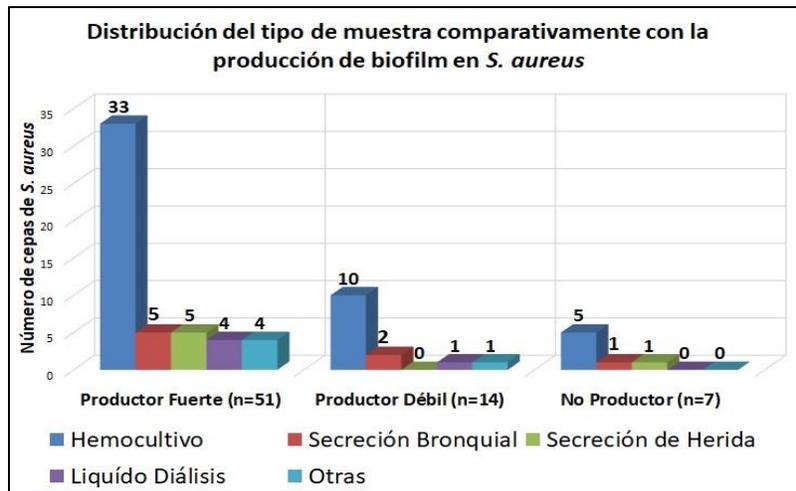


Figura 25. Comparación del origen de aislamiento de las cepas de *S. aureus* del INCICH y la producción de biofilm.

4. Resistencia y susceptibilidad a antibióticos

Las cepas clínicas de *S. aureus* del INCICH presentan resistencia con mayor frecuencia al grupo de los antibióticos β -lactámicos como la penicilina y ampicilina, seguido de macrólidos, lincosaminas, quinolonas y aminoglucósidos, mientras que la resistencia a daptomicina, linezolid, minociclina, tigeciclina y vancomicina no fue detectada. Sin embargo, 16 cepas demostraron ser resistentes a oxacilina, un β -lactámico de importancia epidemiológica (Figura 26).

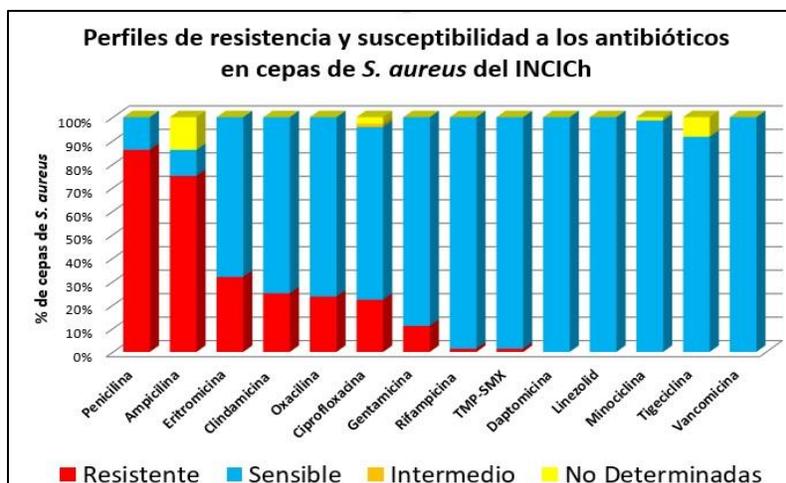


Figura 26. Perfiles de resistencia y susceptibilidad a los diferentes grupos de antibióticos de las cepas clínicas de *S. aureus* del INCICH.

La relación entre el genotipo *icaA+*/*icaD+* y la capacidad de las cepas de *S. aureus* del INCICH de desarrollar resistencia a los antibióticos, se observa en la figura 27. Se observa que, en más del 50% de las cepas con este genotipo, presentaron resistencia al grupo de los antibióticos β -lactámicos como la penicilina y la ampicilina, y en menor grado a los macrólidos quinolonas, lincosaminas y aminoglucósidos.

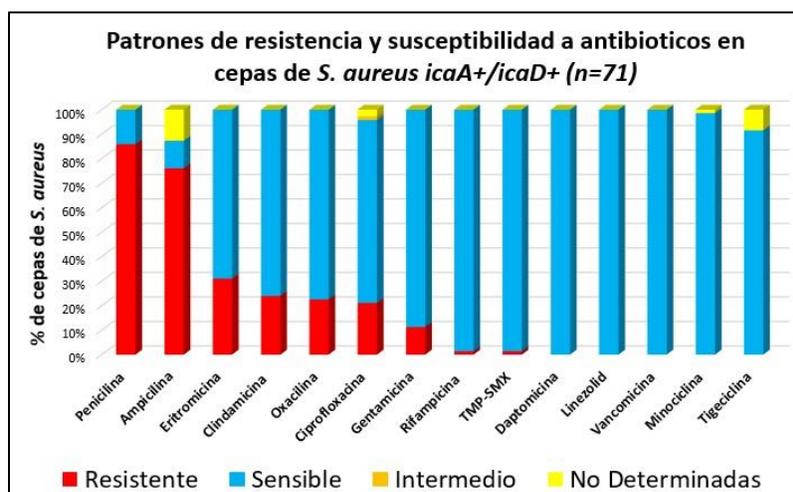


Figura 27. Patrones de sensibilidad y resistencia a los antibióticos en cepas clínicas de *S. aureus* con el genotipo *icaA+*/*icaD+* del INCICH.

La cepa clínica de *S. aureus* INC005 con el genotipo *icaA+*/*icaD-* sólo presentó resistencia cinco de los catorce antibióticos ensayados, los

cuales son: ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, oxacilina y penicilina.

Más del 50% de las cepas clínicas de *S. aureus* fuertemente productoras de biofilm, demostraron resistencia a los β -lactámicos como penicilina y ampicilina; y en menor frecuencia demostraron resistencia a macrólidos, lincosaminas, quinolonas y aminoglucósidos (Figura 28). 14 cepas de *S. aureus* fuertemente productoras de biofilm se identificaron como SARM.

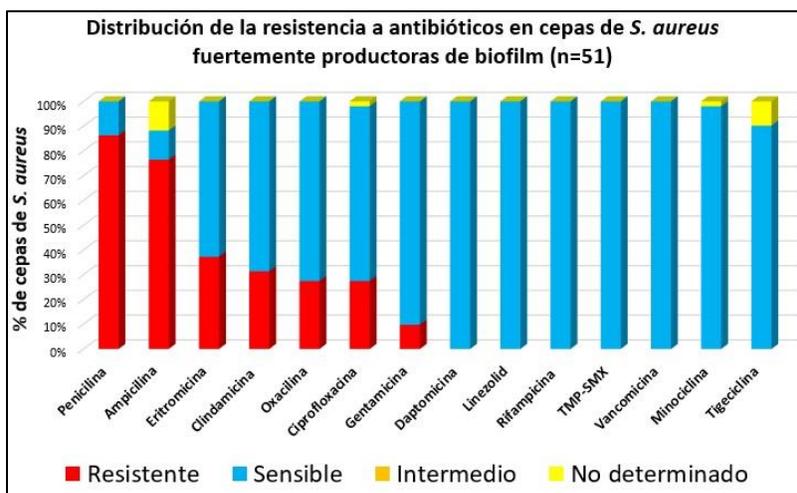


Figura 28. Perfiles de resistencia y susceptibilidad a antibióticos en cepas de *S. aureus* del INCICH fuertemente productoras de biofilm.

De igual manera, más del 50% de las cepas de *S. aureus* del INCICH débilmente productoras de biofilm, presentaron resistencia a los antibióticos β -lactámicos como penicilina y ampicilina; la resistencia a macrólidos, lincosaminas, aminoglucósidos y quinolonas se mantuvo debajo del 50% de las cepas, sin embargo, en menor frecuencia también se agregó la resistencia rifampicina y TMP-SMX (Figura 29). Una cepa de *S. aureus* débilmente productora de biofilm se identificó como SARM.

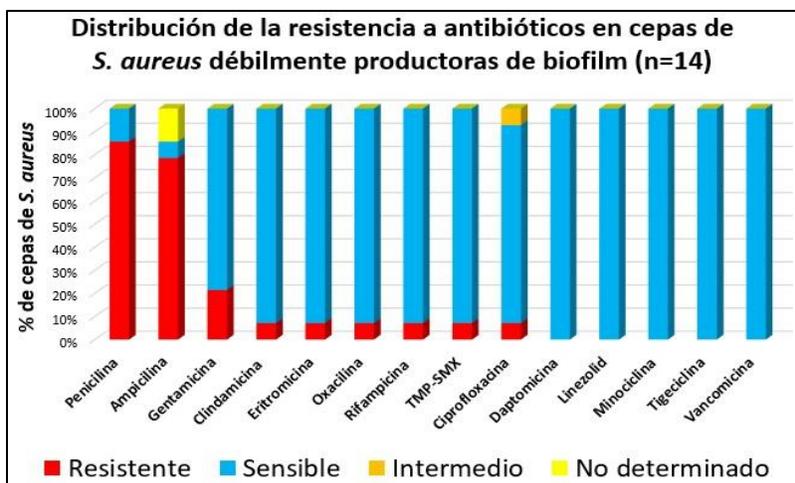


Figura 29. Perfiles de resistencia y susceptibilidad a antibióticos en cepas de *S. aureus* del INCICH débilmente productoras de biofilm.

De las 7 cepas de *S. aureus* no productoras de biofilm, más del 50% presentó resistencia al grupo de los antibióticos β -lactámicos como penicilina y ampicilina; en menos del 50% de las cepas se presentó la resistencia a macrólidos, lincosaminas y quinolonas; y la resistencia a aminoglucósidos desapareció (Figura 30). Dos cepas de *S. aureus* no productoras de biofilm, se identificaron como SARM.

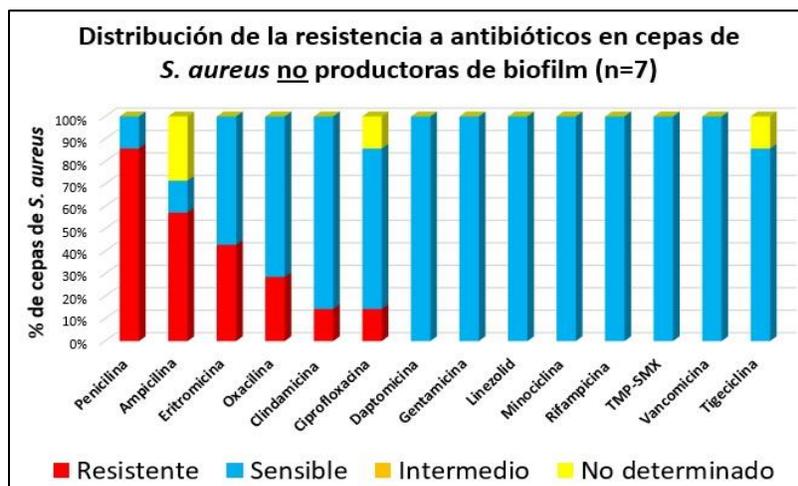


Figura 30. Perfiles de resistencia y susceptibilidad a antibióticos en cepas de *S. aureus* del INCICH débilmente productoras de biofilm.

De las 72 cepas clínicas de *S. aureus* del INCICH, se identificaron 17 cepas resistentes (SARM) y 55 cepas susceptibles a meticilina (Figura 31).

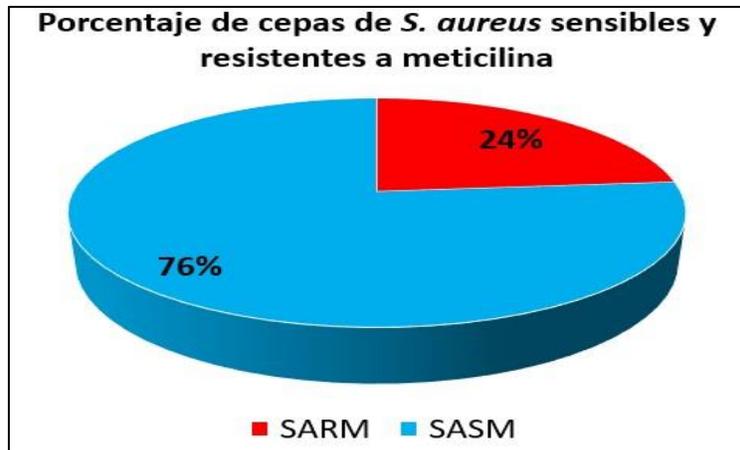


Figura 31. Cepas de *S. aureus* del INCICH resistentes y susceptibles a meticilina. Resultados obtenidos mediante la prueba de difusión de disco de Cefoxitin.

De las cepas 17 cepas SARM, 15 cepas fueron productoras y sólo dos no produjeron biofilm. Mientras que de las 55 cepas SASM, 50 cepas fueron productoras y 5 resultaron no productoras de biofilm. La mayoría de las cepas productoras y no productoras de biofilm pertenecen al grupo de las cepas sensibles a meticilina (Figura 32).

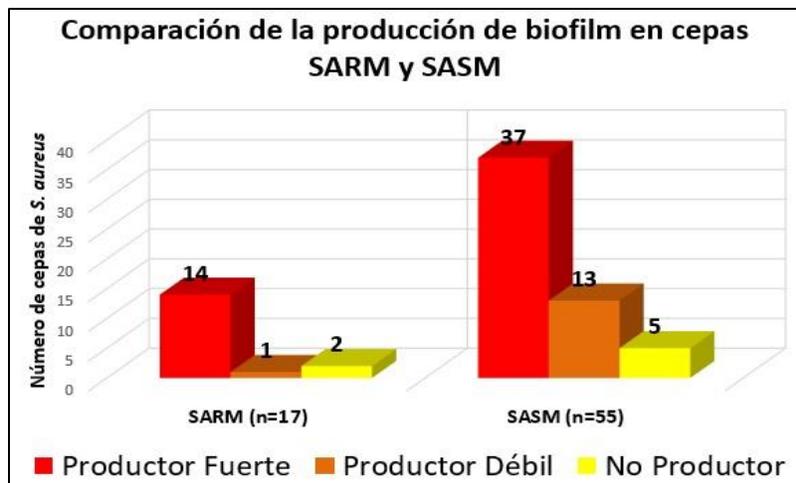


Figura 32. Resistencia a meticilina en cepas clínicas de *S. aureus* del INCICH y su relación con la producción de biofilm.

De las 15 cepas SARM y productoras de biofilm, más del 50% de las cepas presentó resistencia al grupo de los antibióticos β -lactámicos, quinolonas,

macrólidos y lincosaminas, y en menor proporción a la rifamicinas y aminoglucósidos (Figura 33).

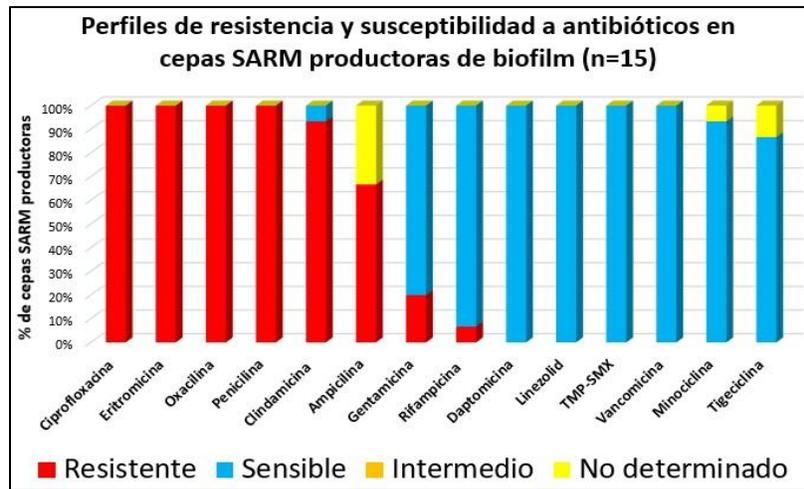


Figura 33. Comparación entre los perfiles de resistencia y susceptibilidad a los antibióticos en cepas SARM productoras de biofilm.

De las 2 cepas MRSA y no productoras de biofilm, el 100% de las cepas presentó resistencia a oxacilina y penicilina del grupo de los β -lactámicos. El 50% de las cepas además presentó resistencia a lincosaminas, macrólidos y quinolonas (Figura 34).

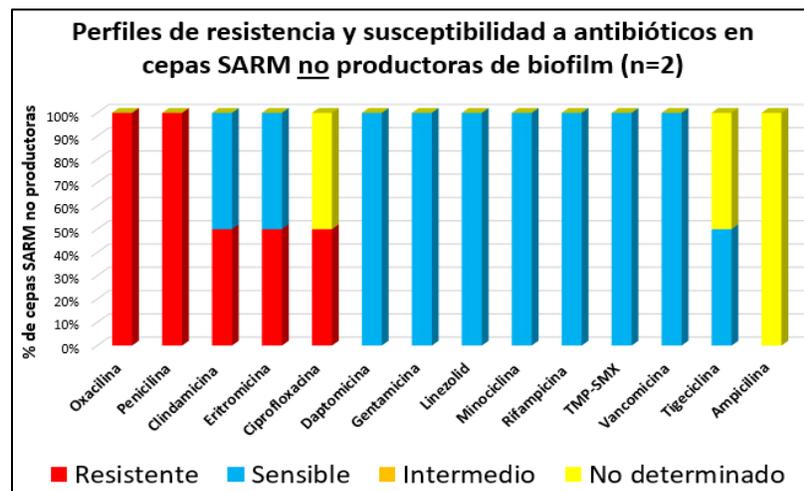


Figura 34. Comparación entre los perfiles de resistencia y susceptibilidad a los antibióticos en cepas SARM que no producen biofilm.

Las cepas SASM productoras de biofilm fueron resistentes a los antibióticos β -lactámicos ampicilina y penicilina en más del 50% de las cepas; la resistencia a macrólidos, aminoglucósidos, lincosaminas y TMP-SMX se presentó en menos del 10% de las cepas de *S. aureus* (Figura 35).

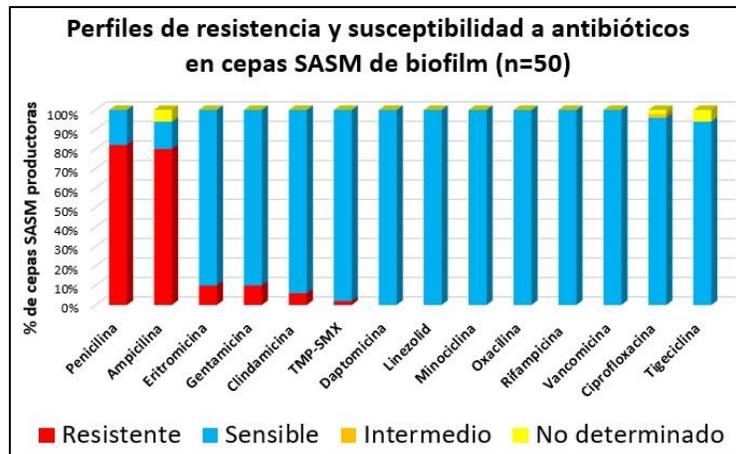


Figura 35. Comparación de los perfiles de resistencia y susceptibilidad a los antibióticos en cepas SASM productoras de biofilm.

Más del 50% de las cepas SASM no productoras de biofilm, demostraron resistencia a los antibióticos β -lactámicos como ampicilina y penicilina, solo en el 40% de las cepas se presentó resistencia a macrólidos (Figura 36).

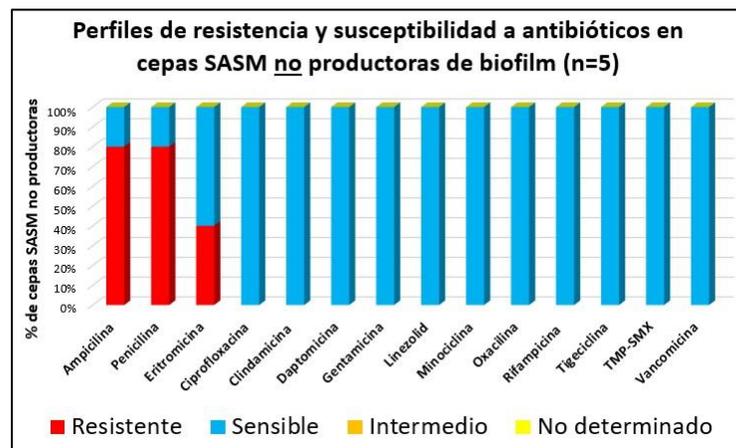


Figura 36. Comparación de los perfiles de resistencia y susceptibilidad a los antibióticos en cepas SASM no productoras de biofilm.

5. DISCUSIÓN

Las 72 cepas bacterianas que se utilizaron para realizar este trabajo, se identificaron como *S. aureus* mediante el sistema de identificación Phoenix™ 1000 y pruebas bioquímicas tradicionales, además, al microscopio óptico se observaron cocos Gram positivos agrupados en racimos de uvas, característica única de este género.

La identificación de los genes *icaA* e *icaD* implicados en la producción de biofilm en *S. aureus*, se realizó mediante la amplificación por PCR, utilizando oligonucleótidos diseñados en el laboratorio (Tabla 6 y 8). Con estos, se llevó a cabo la estandarización de las condiciones del programa de PCR en cepas de *S. aureus*, a las cuales ya se les había realizado anteriormente la prueba de Rojo Congo y la identificación del gen *icaA* con un par de oligonucleótidos de diseño diferente (Tabla 16). (13)

Debido a que el gen *icaA* es el responsable de codificar a la N-acetilglucosamina transferasa que produce la UDP-N-acetilglucosamina, la cual es el principal componente del PIA. Se esperaba que las 72 cepas de *S. aureus* del INCICH amplificaran el gen *icaA*, lo cual no fue posible, pues solo se identificó en 3 cepas (Figura 18). Esta parte experimental, se realizó por duplicado para corroborar la presencia del gen *icaA*, sin embargo, el resultado fue el mismo, lo cual crea dudas en los resultados obtenidos por PCR. (52)

Por esta razón, se realizaron los mismos ensayos de PCR pero, con el par de oligonucleótidos de *icaA* previamente diseñados y utilizados en otro trabajo de tesis (13). Con estos oligonucleótidos, se logró identificar el gen *icaA* en las 72 cepas de *S. aureus* del INCICH (Tabla 17 y Figura 19), lo que corrobora que el gen *icaA* está presente en las cepas de *S. aureus* del INCICH. La razón de esto, quizá fue el diseño inicial de los oligonucleótidos, ya que la secuencia de nucleótidos pudo haber estado

en una región variable del gen de *icaA*, y no pudo identificarse inicialmente en las 72 cepas de *S. aureus*.

El gen *icaD* se logró identificar en 71 cepas de *S. aureus* del INCICH, y se tomó como punto de partida para determinar si el gen *icaD* es necesario para producir el biofilm (17). Algunos autores mencionan que la coexpresión del gen *icaD* incrementa significativamente la actividad de *icaA*, y por lo tanto la producción del PIA, lo que conlleva a la producción de biofilm. (55)

En esta tesis, la producción de biofilm se realizó, *in vitro*, mediante el ensayo cualitativo descrito por Christensen y colaboradores en 1982 (32), el 71% de las cepas de *S. aureus* del INCICH fueron fuertemente productoras, el 19% débilmente productoras y el 10% no produjeron biofilm. Tal variación resulto totalmente novedosa en las cepas del INCICH, algo que no se había descrito antes.

Se esperaba que aquellas cepas de *S. aureus* a las que se les identifico ambos genes (*icaA* e *icaD*) fueran productoras de biofilm en su totalidad, sin embargo, no fue así. El 8% de las cepas de *S. aureus* con genotipo *icaA+*/*icaD+* fueron no productoras y el 92% de los *S. aureus* con el mismo genotipo fueron productoras. Lo que confirma, que la presencia de los genes *icaA* e *icaD* no garantiza la producción de biofilm en cepas de *S. aureus* e incluso, aun teniendo ambos genes del operón, dicha producción puede manifestarse en el ensayo de Christensen de forma fuerte o débil (Figura 24). En este trabajo, se identificó una cepa que no amplificó el gen *icaD* y que tampoco produjo biofilm mediante el ensayo cualitativo en tubo, lo que conlleva a pensar que la deficiencia del gen *icaD* si modifica la actividad de *icaA* y por lo tanto afecta la producción del PIA. Por lo cual en las cepas de *S. aureus* se encontró variación en la relación del genotipo y fenotipo.

Lo anterior se relaciona con lo que menciona Arciola y colaboradores basados en las investigaciones de Gerke, en relación a que la expresión única del gen *icaA* induce una baja actividad enzimática que conlleva a no producir el componente necesario para el biofilm. (38, 39, 53).

Por otra parte Zmantar y colaboradores, menciona que las diferencias entre la producción de biofilm y la presencia de los genes *icaA* e *icaD*, podrían deberse al hecho de que la expresión del operón *icaADBC* está sujeta a condiciones ambientales, refiere, que la alta osmolaridad, un ambiente anaerobio y altas temperaturas son factores que mejoran la transcripción del operón y la producción del biofilm (40). Archer, también menciona que la concentración de glucosa en el medio, la presencia de etanol y los antibióticos pueden regular la expresión del operón *ica*. Se ha observado en algunas cepas de *S. aureus*, que la regulación de *ica* puede ocurrir a través de la inactivación reversible por la variación de fase de la secuencia de inserción (IS256), la cual, conlleva a que no haya producción de PIA. (54) Incluso existen cepas de *S. aureus* que contienen el conjunto completo de genes *ica*, pero solo pocas cepas expresan el operón y son productoras de biofilm en los ensayos *in vitro*. (18, 40, 53) Posiblemente estos eventos sucedieron en las cepas de *S. aureus* del INCICH.

A pesar de la importancia del operón *icaADBC* para el desarrollo de biofilm, otros investigadores han descrito que la producción de este mismo puede ocurrir de una forma independiente del operón *ica*. (17, 54, 51) Este mecanismo está regulado por una serie de moléculas de la superficie celular, que utiliza *S. aureus* en la unión a la matriz extracelular del huésped (17). Se menciona en diversas publicaciones que, aunque las cepas de *S. aureus* tengan el operón *icaADBC*, este mecanismo independiente podría activarse como respuesta a estímulos externos por el sistema inmune o el tratamiento con antibióticos. (51) Según O’Gara la formación de biofilm independiente de *ica*, es un mecanismo que se lleva

a cabo principalmente en las cepas de SARM. (51, 24) Lo cual significa otra explicación a lo obtenido en las cepas de *S. aureus* del INCICH.

La relación entre la producción de biofilm y la susceptibilidad a los antibióticos β -láctamicos, se investigó primero en *S. epidermidis*, y debido a la alta homología entre el operón *ica* entre ambas especies, los investigadores concluyeron que la producción del PIA es esencial para la formación de biofilm en cepas SASM pero no en cepas SARM. (24,56)

De forma general, más del 90% de las cepas de *S. aureus* aquí estudiadas, presentaron resistencia al grupo de los antibióticos β -láctamicos como la penicilina y ampicilina. Las cepas con el genotipo *icaA+/icaD+*, conservaron el perfil de resistencia antes mencionado, y discreparon de la cepa que no amplificó el gen *icaD*, ya que esta última resultó sensible a la ampicilina (Figura 27). La cepa que no amplificó el gen *icaD*, pertenece al grupo de las cepas de SARM por lo cual, se infiere que es resistente al grupo de los β -láctamicos.

Las cepas de *S. aureus* productoras y no productoras de biofilm, también demostraron resistencia al grupo de los β -láctamicos. Sin embargo, la resistencia a los demás antibióticos se modificó dependiendo el grado de producción de biofilm. Las cepas fuertemente productoras mantuvieron la resistencia a la eritromicina, clindamicina, oxacilina, ciprofloxacino y gentamicina. Mientras que en las cepas débilmente productoras se agregó la resistencia a rifampicina y TMP-SMX. Y en las cepas no productoras de biofilm, la resistencia a gentamicina no se presentó (Figuras 28, 29, 30).

De las 72 cepas de *S. aureus* del INCICH, 17 se identificaron como resistentes a meticilina (SARM). De las cuales, 15 cepas fueron productoras de biofilm y dos no productoras de biofilm (Figura 32). Las cepas SARM productoras de biofilm resultaron ser resistentes a β -láctamicos, quinolonas, macrólidos, y lincosaminas (Figura 33). Las cepas

SARM no productoras de biofilm, demostraron resistencia a la oxacilina y penicilina, pero no a las lincosaminas, macrólidos y quinolonas (Figura 34).

Solo a una cepa SARM no se le identifico el gen *icaD* y resulto no productora de biofilm, sugiriendo la posibilidad de ser una cepa productora de biofilm, quizás por un mecanismo *ica*-independiente. A la otra cepa SARM no productora de biofilm se le identificaron los genes *icaA* e *icaD*, lo que sugiere, que la transcripción del operón *ica*, no se llevó a cabo. Mientras que las 15 cepas SARM productoras de biofilm con ambos genes del operón, llevaron una producción dependiente de *ica*, contradiciendo esto a algunos autores del tema, sobre que la producción de biofilm por el mecanismo *ica*-independiente, es un proceso casi exclusivo de las cepas de SARM. (51,24) Lo cual sugiere utilizar métodos de confirmación en condiciones más estrictas de evaluación.

Todas las cepas de *S. aureus* del INCICH demostraron ser resistentes al grupo de los β -lactámicos, independientemente de si tienen los genes *icaA* e *icaD*, si producen o no biofilm, o bien, si son cepas SARM o SASM. Esta resistencia común, quizás se debe a que fueron los antibióticos de mayor uso en INCICH.

S. aureus se caracteriza por su resistencia a la meticilina, lo que le confiere resistencia a varios antibióticos β -lactámicos, por lo cual realizar una identificación exacta de resistencia de este microorganismo es esencialmente obligatorio en el INCICH, como mecanismo de vigilancia epidemiológica (57).

La producción de biofilm es un factor de virulencia propio de *S. aureus*, el cual no le confiere marcadores de resistencia a la bacteria, sin embargo, la estructura del mismo, provoca que el tratamiento con antibióticos y la respuesta inmune sea deficiente en casos de IAAS, por lo cual es

importante implementar una metodología, que sea de utilidad para predecir la producción de biofilm que pueda desencadenar una infección relacionada a dispositivos médicos.

En este trabajo, se realizaron a grandes rasgos tres metodologías para la identificación de biofilm en cepas de *S. aureus*, las cuales serán útiles según las necesidades de la institución. En el INCICH, la metodología sugerida a utilizar, es la identificación de los genes por PCR, ya que al identificar los genes de *ica*, se puede predecir la capacidad productora de biofilm de cada cepa. Si se corre el riesgo potencial de una infección en un dispositivo médico que compromete la salud de un paciente, lo mejor será acompañar la PCR con el ensayo cualitativo en tubo de Christensen, el cual ayudará a identificar una cepa productora de biofilm y así implementar de forma inmediata el tratamiento ideal y oportuno al paciente, al conocer por este trabajo la resistencia a antibióticos que guardan las cepas de *S. aureus* que circulan en el INCICH.

6. CONCLUSIONES

Los genes *icaA* e *icaD* se identificaron por PCR en 71 cepas clínicas de *S. aureus* del INCICH.

Los oligonucleótidos de *icaA* e *icaD* diseñados mediante herramientas bioinformáticas, resultaron específicos para las cepas de *S. aureus* estudiadas.

La presencia de los genes *icaA* e *icaD* no determina la producción fenotípica de biofilm en *S. aureus*.

El ensayo cualitativo en tubo de Christensen es práctico y sencillo de realizar para determinar la producción de biofilm en *S. aureus* en comparación con otras metodologías.

Las cepas de *S. aureus* del INCICH fueron 71% productoras fuertes, 19% productoras débiles y el 10% no productoras de biofilm.

En este estudio, se observó que la producción de biofilm y la presencia de los genes *icaA* e *icaD*, no modifican el perfil de resistencia a los antibióticos en los *S. aureus* del INCICH.

Mediante el análisis bioinformático por alineamiento de genomas de *S. aureus*, es posible llevar a cabo una rápida, segura y confiable identificación de genes de interés como, *icaA* e *icaD*.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Lister, J. y Horswill, A. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol*, 4(178):1-9.
2. Lasa, I. (2005). Biofilms bacterianos. *SEM*, 37:14-18.
3. Lasa, I., del Pozo, J. et al. (2005) Biofilms bacterianos e infección. *An Sist Sanit Navar*, 28(2):163-175.
4. *Prevención y control de infecciones asociadas a la atención de la salud. Recomendaciones Básicas*. (2017). Washington, DC. Organización Panamericana de la Salud. Pág. 19-21.
5. *Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica hospitalaria*. (2016). México. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. Pág. 8-29
6. *Vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención de la salud. Módulo III: información para gerentes y personal directivo*. (2012). Washington, DC. Organización Panamericana de la Salud. Pág. 7-10.
7. Fonseca-Ruiz, N., Restrepo, S., et al. (2014). Infecciones asociadas a dispositivos en unidades de cuidado intensivo académicas vs no académicas. ¿Hay diferencia?. *Rev CES Med*, 28(2):221-232.
8. Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2014). *Microbiología médica 7ª Edición*. España. Elsevier. Pág. 173-185.
9. Madigan, M., Martinko, J., et al. (2009). *Brock Biología de los microorganismos 12ª Edición*. UK. Pearson Education.
10. *Prevención de las infecciones nosocomiales guía práctica 2ª Edición*. (2003). Malta. Organización Mundial de la Salud. Pág. 1-5, 56, 57.
11. *Guía Práctica Clínica Diagnóstica y Tratamiento de la Endocarditis Infecciosa*, México: Secretaria de Salud, 2010.

12. Heriot, G., Cronin, K., Tong, S., et al. (2017). Criteria for identifying patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia who are at low risk of endocarditis: A systematic review. *Open Forum Infect Dis*, 4(4): 1-7.
13. Morales, N. (2013). *Staphylococcus aureus: Caracterización fenotípica y detección molecular por PCR de producción de coagulasa (coa), de biofilm (icaA) y resistencia a antibióticos (mecA) en cepas aisladas de pacientes con infección nosocomial*. (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México
14. Santaularia, M., Vega., y Pérez D. (2014). Endocarditis infecciosa. *Evid Med Invest Salud*, 7(2):76-83.
15. Casabé, J. (2008). Endocarditis Infecciosa: Una enfermedad cambiante. *MEDICINA*, 68: 164-174.
16. Nandakumar, V., Chittaranjan, S., et al. (2013). Characteristics of bacterial biofilm associated with implant material in clinical practice. *Polym. J.*, 45: 137-152.
17. O'Gara, JP. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, 270(2): 179-188.
18. Cramton, S., Gerke, C., et al. (1999). The intercellular adhesión (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun*, 67(10): 5427-5433.
19. Haney, J. (2005). *Staphylococcus aureus* biofilm. PHIL #7488. [figura]. Recuperada de <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=7488>
20. Flock JI. (1999). Extracellular-matrix-binding proteins as targets for the prevention of *Staphylococcus aureus* infections. *Mol Med Today*, 5: 532-537.
21. Sahab, S., Nor, M., et al. (2012). Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Biotechnol*, 2012:1-10.

22. Beenken, K., Dunman, P., et al. (2004). Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol*, 186(14): 4665-4684.
23. Fitzpatrick, F., Humphreys, H. and O' Gara, J. (2005). Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 43(4): 1973-1976.
24. McCarthy, H., Rudkin, J., et al. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*, 5:1-9.
25. Knobloch, J., Horstkotte, M., et al. (2002). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol*, 191(2): 101-106.
26. Camarena, J. y Sanchez, R. (s/f). Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *SEIMC*.
27. Belbase, A., Dutt, N., et al. (2017). Antibiotic resistance and biofilm production among the strains of *Staphylococcus aureus* isolated pus/wound swab samples in a tertiary care hospital in Nepal. *Ann Clin Microbial Antimicrob*, 16:15.
28. Sebnem, E. y Aslantas, Ö. (2017). Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates. *Asian Pac J Trop Med*, 10(11): 1059-1064.
29. Kumar, S., Alasthimannahalli, T., et al. (2016). Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus*: A multi center study from India. (2016). *Microb Pathog*, 98: 167-170.
30. Lindsay, J. (2013). Hospital-associated MRSA and antibiotic resistance- What have we learned from genomics?. *Int J Med Microbiol*, 303: 318-323.
31. Foster, T. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *Microbiol Rev*, 41(3): 430-449.

32. Oliveira, W., Silva, P., et al. (2018). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. *J Hos Infect*, 98: 111-117.
33. Batista, N., Gutiérrez, I., et al. (2008). Evaluación del método de difusión en disco de 30µg de cefoxitina en la detección de resistencia a meticilina en aislamientos seleccionados de *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Quimioter*, 21(4): 213-216.
34. Christensen, G., Simpson, A., et al. (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun*, 37(1): 318-326.
35. Christensen, G., Simpson, A., et al. (1985). Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *J Clin Microbiol*, 22(6): 996-1006.
36. Peña, J. y Uffo, O. (2013). Producción de biofilme en genotipos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en Cuba. *Rev Salud Anim*, 35(3): 189-196.
37. Freeman, D., Falkiner, F., and Keane, C. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*, 42(28): 872-874.
38. Arciola, C., Campoccia, D., et al. (2002). Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotype for *ica* locus. *Biomaterials*, 23(21): 4233-4239.
39. Arciola, C., Baldassarri, L., y Montanaro, L. (2001). In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (*ica*) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. *J Biomed Mater Res*, 59(3): 557-562.

40. Zmantar, T., Chaieb, K., et al. (2008). Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus*. *J Basic Microbiol*, 48(4): 308-314.
41. Jong-Hyun, K., Kim, C., et al. (2008). Molecular characterization of regulatory genes associated with biofilm variation in a *Staphylococcus aureus* strain. *J Microbiol, Biotechnol*, 18(1): 28-34.
42. Aguilar, L. y Falquet, L. (2015). Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. *Rev Salud Anim*, 37(2): 125-132.
43. Galarce, N. (2011). *Detección de tres genes de resistencia a antimicrobianos en cepas de estafilococos coagulasa positivas aisladas desde gatos*. (tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
44. *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio Tercera Edición*. (2005). Ginebra. Organización Mundial de la Salud. Pág. viii-8.
45. Richmond J., McKinney, R., et al. (s.f.). *Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina 4º Edición*. CDC/NIH. Pág. 1-12, 58-60.
46. Alados, J., Gómez, E., Leiva, J., et al. (2014). *Procedimientos en microbiología: Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Pág. 15-17.
47. *Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo*. (1997). España. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. Pág. 3-5.
48. *Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo*. (1997). España. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. Anexo III y IV.

49. *Manual de Bioseguridad en el laboratorio Tercera Edición*. 2005 Suiza. Organización Mundial de la Salud.
50. *Ficha de agentes biológicos Staphylococcus aureus*. (2012). España. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Pág. 1-3.
51. Arciola, C., Campoccia, D., et al. (2015). Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol*, 5(7): 1-10.
52. E Salazar, M. y Crispin, V. (2018). Biopelículas y genes *icaA* e *icaD* en estafilococos coagulasa negativos aislados de catéter endovenoso central en Unidad de Cuidados Intensivos de un Hospital Nivel III en Lima, Perú. *Horiz Med*, 18(3): 19-24.
53. Arciola, C., Baldassarri, L. and Montanaro, L. (2001). Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections. *J Clin Microbiol*, 39: 2151-2156.
54. K. Archer, N., J. Mazaitis, M., et al. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence*, 2(5): 445-459.
55. Gerke, C., Kraft, A., et al. (1998). Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem*, 273(29): 18586-18593.
56. O'Neill, E., Pozzi, C., et al. (2007). Association between Methicillin Susceptibility and Biofilm Regulation in *Staphylococcus aureus* Isolates from Device-Related Infection. *J Clin Microbiol*, 45(5): 1379-1388.
57. Cabrera, R., Morelos, R. y Meléndez, E. (2016). Evaluation of three phenotypic tests vs. Dúplex (*coa* & *mecA*) PCR for detection of Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patients with nosocomial infections (NI) in a Mexican Hospital. *BMR*, 12(3): 1-7.

8. ANEXO

Identificación bioinformática de los genes icaA e icaD en genomas de S. aureus de origen nosocomial.

Como metodología adicional para la identificación y comprobación de los genes que codifican a la producción de biofilm en *S. aureus*, se hizo uso de la secuenciación de genomas. En 7 cepas de *S. aureus* del Hospital 20 de Noviembre (HVN) de la CDMX con sus genomas secuenciados, se identificaron a los genes *icaA* a *icaD* y poder establecer su relación con la identificación molecular y fenotípica.

Los genomas mencionados fueron secuenciados previamente en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Una vez que se ensamblaron y anotaron con el programa de libre acceso PATRIC (<https://www.patricbrc.org/>), se determinó la presencia de los genes *icaA* e *icaD* en su genoma completo, como a continuación se describe.

Mediante el programa CLUSTALW disponible en el sitio web <http://www.peddb.org/scripts/clustalw.php>, se alinearon sobre el genoma bacteriano de cada cepa de *S. aureus* del HVN, los oligonucleótidos y los amplicones de los genes *icaA* e *icaD* diseñados con anterioridad en el laboratorio de Patogenicidad bacteriana, mediante el programa Primer3.

El procedimiento realizado en el laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Facultad de Medicina para el alineamiento de los genomas, se ejemplifica con la cepa de *S. aureus* HVN1 con tamaño de genoma de 2,810,813bp.

En la figura 37, se observa el alineamiento de nucleótidos del oligo F del gen *icaA* sobre el genoma de la cepa de *S. aureus* HVN01, en el cual se observó un alineamiento del 100%, es decir, los 22nt del oligo F de *icaA* se alinearon completamente sobre el genoma de la cepa estudiada.

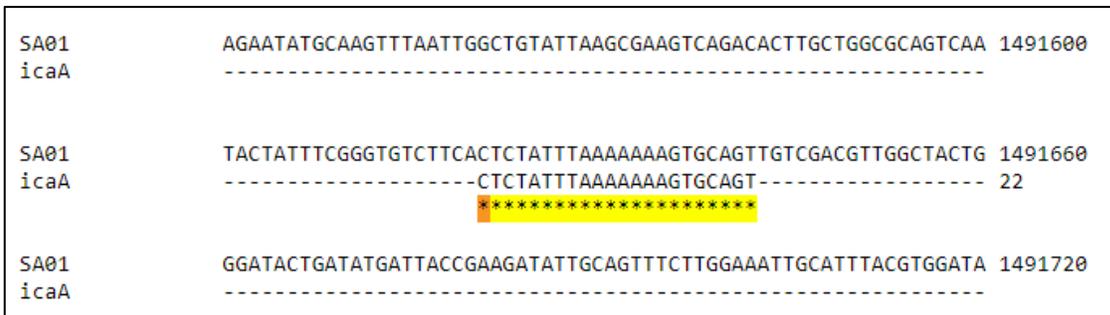


Figura 37. Alineamiento del oligo F de *icaA* en un segmento del genoma de *S. aureus* HVN01.

En la figura 38, se observa un alineamiento del 100% del oligo R del gen *icaA* sobre el genoma de la cepa de *S. aureus* HVN01 (20/20nt alineados).

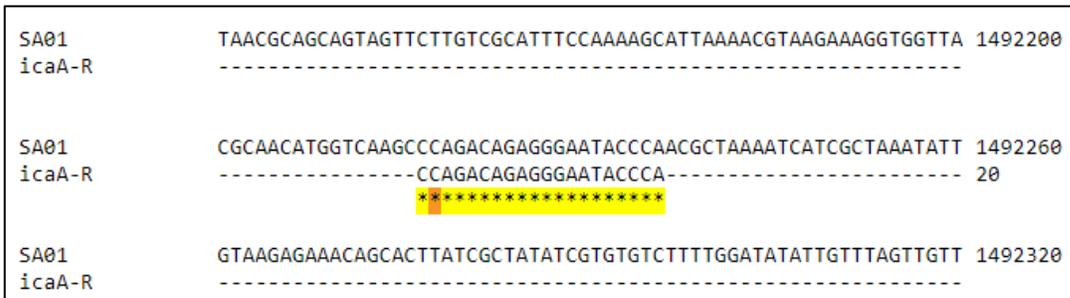


Figura 38. Alineamiento del oligo R de *icaA* en un segmento del genoma de *S. aureus* HVN01.

En la figura 39, se observa el alineamiento del amplicón del gen *icaA* sobre el genoma de la cepa de *S. aureus* HVN01, que fue del 99.6% de identidad, lo cual demuestra la especificidad de la PCR a *icaA*.

SA01 icaA	TACTATTTCTGGGTGCTCTTCACTCTATTTAAAAAAGTGCAGTTGTCTGACGTTGGCTACTG -----CTCTATTTAAAAAAGTGCAGTTGTCTGACGTTGGCTACTG	1491660 40
SA01 icaA	GGATACTGATATGATTACCGAAGATATTGCAGTTTCTTGAAATTGCATTACGTGGATA GGATACTGATATGATTACCGAAGATATTGCAGTTTCTTGAAATTGCATTACGTGGATA	1491720 100
SA01 icaA	TCGTATTAAGTATGAACCGCTTGCCATGTGTTGGATGTTGGTTCCAGAAACATTGGGAGG TCGTATTAAGTATGAACCGCTTGCCATGTGTTGGATGTTGGTTCCAGAAACATTGGGAGG	1491780 160
SA01 icaA	TCTTTGGAAGCAACGCGTGAGATGGGCTCAAGGGGGACACGAAGTATTACTACGAGACTT TCTTTGGAAGCAACGCGTGAGATGGGCTCAAGGGGGACACGAAGTATTACTACGAGACTT	1491840 220
SA01 icaA	TTTTAGCACAAATGAAAACGAAAAGGTTTCCTTTATATATTTTGATGTTTGAGCAAAATCAT TTTTAGCACAAATGAAAACGAAAAGGTTTCCTTTATATATTTTGATGTTTGAGCAAAATCAT	1491900 280
SA01 icaA	CTCAATTTTATGGGTATATATAGTGCTTCTATATTTAGGCTATTTGTTTCATAACAGCAAA CTCGATTTTATGGGTATATATAGTGCTTCTATATTTAGGCTATTTGTTTCATAACAGCAAA	1491960 340
SA01 icaA	CTTCTTAGACTATACATTTATGACATATAGTTTTTCAATATTTCTACTATCATCATTTAC CTTCTTAGACTATACATTTATGACATATAGTTTTTCAATATTTCTACTATCATCATTTAC	1492020 400
SA01 icaA	TATGACTTTTATAAACGTTATTCAATTTACAGTCGCACCTCTTTATTGATAGTCGCTACGA TATGACTTTTATAAACGTTATTCAATTTACAGTCGCACCTCTTTATTGATAGTCGCTACGA	1492080 460
SA01 icaA	GAAAAAGAATATGGCTGGACTCATATTTGTAAGTTGGTATCCGACAGTATACTGGATTAT GAAAAAGAATATGGCTGGACTCATATTTGTAAGTTGGTATCCGACAGTATACTGGATTAT	1492140 520
SA01 icaA	TAACGCAGCAGTAGTTCTTGTGCGCATTTCCAAAAGCATTAAAAACGTAAGAAAGGTGGTTA TAACGCAGCAGTAGTTCTTGTGCGCATTTCCAAAAGCATTAAAAACGTAAGAGAGGTGGTTA	1492200 580
SA01 icaA	CGCAACATGGTCAAGCCAGACAGAGGGAATACCCAACGCTAAAATCATCGCTAAATATT CGCAACATGGTCAAGCCAGACAGAGGGAATACCCA-----CATCGCTAAATATT	1492260 616

Figura 39. Alineamiento del producto de amplificación *icaA* (616pb) en *S. aureus* HVN01.

En la figura 40, se observa un alineamiento del 100% de los nucleótidos del oligo F del gen *icaD* sobre el genoma de la cepa de *S. aureus* HVN01.

SA01 icaD-F	TAACGCAGCAGTAGTTCTTGTGCGCATTTCCAAAAGCATTAAAAACGTAAGAAAGGTGGTTA -----	1492200
SA01 icaD-F	CGCAACATGGTCAAGCCAGACAGAGGGAATACCCAACGCTAAAATCATCGCTAAATATT -----ATGGTCAAGCCAGACAGAG-----	1492260 20
SA01 icaD-F	GTAAGAGAAACAGCACTTATCGCTATATCGTGTGCTTTTGGATATATTGTTTAGTTGTT -----	1492320

Figura 40. Alineamiento del oligo F de *icaD* en un segmento del genoma de *S. aureus* HVN01.

En la figura 41, se observa un alineamiento del 95% de identidad del oligo R del gen *icaD* sobre el genoma de la cepa de *S. aureus* HVN01, un nucleótido no se alinea sobre el genoma.

SA01	GCGATTATCATTTTTGTATTTTTTACAATTAGCATATTGATTCAAAAATGGCAGAGAGGA	1492500
icaD-R	-----CAAAAATGGCAGAGAGGG	18

SA01	AGAGAATCGTGAAGTATAGAAAATTAATAATTTTAGTGTGAGTATCTTGATCATATTGC	1492560
icaD-R	AG-----	20
	**	
SA01	CTGTAAGCACACTGGATGGTCATCATATTGCAAATGCAGATGACGATTCACCTAAAAAAC	1492620
icaD-R	-----	

Figura 41. Alineamiento del oligo F de *icaD* en un segmento del genoma de *S. aureus* HVN01.

En la figura 42 se observa el alineamiento del amplicon del gen *icaD* sobre el genoma de la cepa de *S. aureus* HVN01, el cual tuvo un porcentaje de identidad del 99.3%.

SA01	CGCAACATGGTCAAGCCCAGACAGAGGGAATACCCAACGCTAAAATCATCGCTAAATATT	1492260
icaD	-----ATGGTCAAGCCCAGACAGAGGGAATACCCAACGCTAAAATCATCGCTAAATATT	54

SA01	GTAAGAGAAAACAGCACTTATCGCTATATCGTGTGCTTTTGGATATATTGTTTAGTTGTT	1492320
icaD	GTAAGAGAAAACAGCACTTATCGCTATATCTTGTGCTTTTGGATATATTGTTTAGTTGTT	114

SA01	CTACTCGTTTATATTGGTACTATATTTGAAATTCATGACGAAAGTATCAATACAATACGT	1492380
icaD	CTACTCGTTTATATTGGTACTATATTTGAAATTCATGACGAAAGTATCAATACAATACGT	174

SA01	GTTGCTTTAAACATTGAAAATACTGAAATTTAGATATATTTGAAACTATGGGCATTTTC	1492440
icaD	GTTGCTTTAAACATTGAAAATACTGAAATTTAGATATATTTGAAACTATGGGCATTTTC	234

SA01	GCGATTATCATTTTTGTATTTTTTACAATTAGCATATTGATTCAAAAATGGCAGAGAGGA	1492500
icaD	GCGATTATCATTTTTGTATTTTTTACAATTAGCATATTGATTCAAAAATGGCAGAGAGGG	294

SA01	AGAGAATCGTGAAGTATAGAAAATTAATAATTTTAGTGTGAGTATCTTGATCATATTGC	1492560
icaD	AG-----	296
	**	

Figura 42. Alineamiento del producto de amplificación de *icaD* (296pb) sobre el genoma de *S. aureus* HVN01.

En la tabla 18 se observa el porcentaje de identidad de los genes *icaA* e *icaD* sobre los genomas de las 7 cepas de *S. aureus* del HVN.

Tabla 18. Porcentaje de alineamiento de los oligonucleótidos y productos de amplificación de los genes *icaA* e *icaD* en cepas de *S. aureus* del HVN.

Cepa <i>S. aureus</i>	<i>icaA</i>			<i>icaD</i>		
	oligo F	oligo R	amplicón	oligo F	oligo R	amplicon
HVN01	100%	100%	99.6%	100%	95%	99.3%
HVN02	100%	100%	99.6%	100%	95%	99.3%
HVN03	100%	100%	99.6%	100%	95%	99.3%
HVN08	100%	100%	99.6%	100%	95%	99.3%
HVN09	100%	100%	99.6%	100%	95%	99.3%
HVN10	100%	100%	99.6%	100%	95%	99.3%
HVN21	100%	100%	99.6%	100%	95%	99.3%

Se comparó que mediante el análisis bioinformático de las 7 cepas del HVN secuenciadas, se identificó a la totalidad de los genes del operón *ica*, entre ellos *icaA* e *icaD*, que son de interés en esta tesis. Los cuales también, fueron amplificados experimentalmente mediante el ensayo de la PCR estándar; y la producción de biofilm se puso de manifiesto en el ensayo cualitativo en tubo de Christensen, al ser cepas productoras fuertes de biofilm (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis de correlación de resultados por tres métodos de identificación de los genes *icaA* e *icaD*.

Cepa <i>S. aureus</i>	Análisis genómico					Identificación molecular por PCR		Biofilm por Christensen
	Secuenciación completa de genes <i>ica</i>					<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	
	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaR</i>			
HVN01	+	+	+	+	+	+	+	PF
HVN02	+	+	+	+	+	+	+	PF

HVN03	+	+	+	+	+	+	+	PF
HVN08	+	+	+	+	+	+	+	PF
HVN09	+	+	+	+	+	+	+	PF
HVN10	+	+	+	+	+	+	+	PF
HVN21	+	+	+	+	+	+	+	PF

Se demuestra que el alineamiento genómico y la identificación molecular, pueden ser utilizados en la vigilancia epidemiológica hospitalaria para identificar cepas de *S. aureus* productoras de biofilm originarias de México, como opción a los métodos fenotípicos ya conocidos.