UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

FACTORES DE VIRULENCIA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AISLADOS DE ENCÍAS SANAS EN ALUMNOS DE LA FESI.

TESIS

PROFESIONAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

AIDÉE PÉREZ GALINDO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ALINA URIBE GARCÍA

Cd. Mx. 2024

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Dedicatorias

Con dedicación especial para mi hijo Gael, por ser mi mayor motivo e inspiración. Por acompañarme y aguantar los tiempos de universidad a mi lado, te amo con todo mi ser!

A mis padres, que siempre creyeron en mí. Por darme la educación y herramientas necesarias para llegar hasta donde estoy. Les amo y dedico todos mis logros.

Para todos aquellos amigos y compañeros que se quedaron en el camino y por causas del destino no pudieron llegar hasta aquí, esto va por ustedes.

Agradecimientos

A mi profesor y parte fundamental de este proyecto, el Dr. Sergio Vaca Pacheco, por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de genética y conocer personas increíbles, jamás olvidaré sus consejos.

Mi más sincera gratitud a la Dra. Alina Uribe García, por el apoyo en el laboratorio, su conocimiento aplicado en mi formación y la paciencia que me brindó en todo momento. Gracias por ser tutora y amiga siempre que lo necesite.

A todo mi comité de jurado para la revisión de esta tesis, por tomarse el tiempo y darme sus consejos.

A la Biología, por darme la satisfacción de conocer y aprender del mundo que nos rodea, no pude haber elegido mejor carrera.

A mi hermana Jimena, por su apoyo y participación en esta etapa que sin ella no hubiera logrado avanzar y llegar hasta aquí.

A todos mis amigos y compañeros, por hacer amenas las clases y hacer de mi paso por la universidad algo inolvidable (Miriam, Paloma, grupo 54, siempre los recordaré con cariño).

Índice

Resumen..... 5
Introducción 6
Staphylococcus aureus 12
Generalidades de *Staphylococcus aureus* 13
Identificación de Staphylococcus *aureus* 14
Factores de virulencia 15
Adhesinas de *Staphylococcus aureus* 17
Biopelícula 26
Resistencia antibiótica 29
Staphylococcus aureus meticilino resistente 31
Antecedentes..... 34
Objetivo general..... 35
Objetivo particular..... 35
Metodología..... 36
Toma de muestras 36
Identificación de cepas de *Staphylococcus aureus* 37
Extracción de DNA de *Staphylococcus aureu*s 38
Identificación por amplificación del gen RNAr23s en PCR 39
Identificación de adhesinas en PCR 40
Electroforesis de campos pulsados..... 40
Prueba de susceptibilidad a antibióticos por Kirby Bauer 41
Formación de biopelícula en agar Rojo Congo 42
Cuantificación de biopelícula por Cristal violeta 42
Resultados..... 43
Discusión..... 50
Conclusiones 57
Bibliografía 58

Resumen

S*taphylococcus aureus* se encuentra entre los organismos más estudiados por su presencia en nasofaringe y enfermedades periodontales, así como su presencia en prótesis y equipo quirúrgico del área médica. La importancia de estudiar este organismo tiene dos vertientes: su papel como comensal y la conversión a patógeno oportunista. Gracias a la carga de virulencia genética que posee, le confieren la capacidad de infectar, adherirse y propagarse en el huésped rápidamente. El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar factores de virulencia de S. *aureus* en encías sanas de estudiantes de la FESI. Las cepas de *S. aureus* fueron identificadas por pruebas bioquímicas y moleculares; se amplificaron los genes *Spax* y *RNAr23S*, así como genes de adhesinas del grupo MSCRAMM (proteínas de la superficie) por PCR. Se determinó la resistencia a 12 antibióticos por la prueba Kirby-Bauer, en la cual se mostró resistencia a todos los antibióticos aplicados, confirmando la capacidad de virulencia y defensa que se ha desarrollado frente a los medicamentos. Se evaluó la formación de biopelícula con la técnica de Rojo Congo y se cuantificó por absorbancia en placas de microtitulación y tinción azul violeta. *Staphylococcus aureus* se identificó en tan solo el 9.6% de la población muestreada (10/96), todas las cepas (10/10) fueron positivas para *RNA23S* y *Spax*, al igual los genes de adhesinas *ClfA*, *ClfB*, *EbpS* y *SdrD* se presentaron en el 100% (n=10); *FnbA* y *Cna* con el 70% (n=7); *SdrC* 60% (n=6); *SdrE* 40% (n=4); *FnbB* y *Map/eap* 40% (n=4) respectivamente. Se concluyó que la presencia de *S. aureus* en personas sanas o asintomáticas es significativamente importante ya que compromete la vulnerabilidad del hospedero si se encontrara en algún proceso de enfermedad o infección bacteriana.

Introducción

El microbioma humano se define como el contenido genómico completo de los microorganismos que habitan en un sitio particular del cuerpo humano. Joshua Lederberg acuñó por primera vez el término "microbioma" como una comunidad de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que interactúan entre sí. Aunque "microbiota" y "microbioma" a menudo son intercambiables, existen ciertas diferencias entre ambos términos, siendo microbiota la comunidad de microorganismos que ocupa un hábitat específico, mientras que el microbioma se refiere al conjunto de genes de la microbiota y su función dentro de dicho entorno (Moreno del Castillo, et al. 2018).

La diversidad de la microbiota humana y su potencial metabólico le ofrecen al hospedero la capacidad de supervivencia y funcionalidad de sus procesos, influyendo de manera directa sobre la salud del hospedero. La microbiota varía desde el nacimiento hasta la vejez del individuo, con características que dependen del sitio corporal, del estilo de vida y del estado de salud del hospedero (Botero, et. al, 2016). Se han descrito que existen diferentes microbiomas en cada uno de los nichos ecológicos humanos, reportando y estudiando por ejemplo: la cavidad oral, la superficie de la piel, el tracto intestinal, el esófago, los pulmones y la vagina. La microbiota que comprende estos nichos incluyen bacterias, arqueas, virus, fagos y hongos. Las bacterias tienden a ser la microbiota más diversa, particularmente en términos de especies (Manos, J. 2022).

Muchos de estos estudios surgieron con base al proyecto del microbioma humano, siendo este último parte de una iniciativa de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos en 2008, en el cual se estudió al microbioma humano en condiciones de salud para compararlo posteriormente con individuos bajo

condiciones de enfermedad o trastornos metabólicos; todo esto con el objetivo de mejorar la salud humana. Entre los resultados de esa investigación conocemos que la microbiota del tracto gastrointestinal es la más diversa por sus características y siendo objeto de estudio por sus asociaciones y alteraciones con diversas enfermedades. Seguido de ello se encuentra la microbiota oral ocupando el segundo lugar como la región más diversa del cuerpo humano y se ha definido por las comunidades bacterianas presentes en la boca (cavidad oral) (Verma D., et.al 2018).

- Microbioma oral

El estudio de la microbiota se considera que se inició con Leeuwenhoek en 1863, quien fue pionero en mostrar y estudiar el mundo de organismos minúsculos de la cavidad oral. Durante mucho tiempo y hasta finales del siglo XIX, el cultivo, las tinciones y la microscopía han sido las herramientas fundamentales de este campo de estudio. Trabajos como el de Woese y colegas, fueron pioneros en la identificación genómica y el análisis de comunidades microbianas, con lo cual establecen un marco para la filogenética de la microbiota. Pace y colaboradores en 1985 desarrollaron un método para complementar los enfoques basados en cultivos para la identificación de bacterias, basándose en el aislamiento de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) de genes de ARNr a partir de ADN extraído de una muestra ambiental y usando el gen 16S RNA ribosomal para la caracterización de bacterias.

A pesar de los avances , entender el microbioma oral ha sido una tarea compleja debido a las características de cada microhábitats y las variables dentro de la cavidad oral como son: las concentraciones de oxígeno, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la exposición a factores inmunológicos, las características anatómicas, así como los tipos de superficies: mucosa y superficies sólidas como son los dientes (Zaura, et. al, 2009).

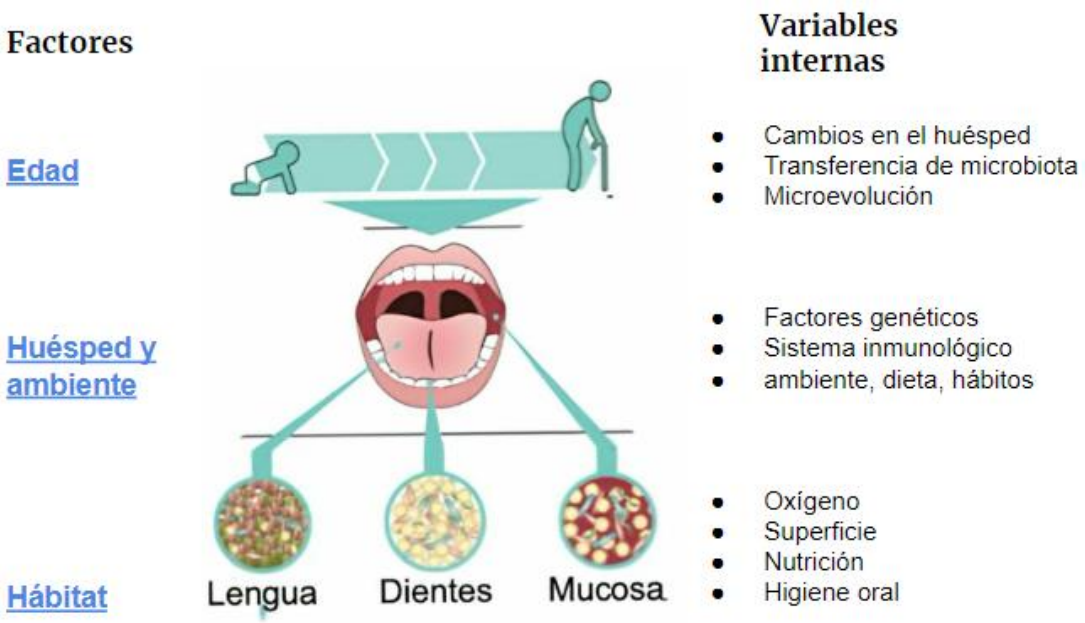

Figura 1. Factores y variables que intervienen en los microhábitats (lengua, dientes y mucosa) dentro del área bucal. Fuente: https://elrincondelcalmecac.wordpress.com/2019/05/04/hablemos-de-microbios-la-microbiota-oral-humana/

Con trabajos de investigación como el que Aas y su equipo nos presentaron en 2005, podemos entender la diversidad y características propias de cada nicho en el área bucal. Los resultados de dicho estudio detectaron varias especies, como *S. mitis y G. adiacens,* en la mayoría de todos los sitios orales, por otro lado *R. dentocariosa* , *Actinomyces spp., S. sanguinis , S. gordonii y A. defectiva* colonizaron el área de los dientes, mientras que *S. salivarius* se encontró en el dorso de la lengua y *S. sanguinis* en tejido blando. *S. australis* no se halló principalmente en el área de los dientes pero no en el surco subgingival. *S. intermedius* colonizó la placa subgingival en la mayoría de los sujetos, sin mostrar presencia en los demás sitios, lo contrario para *Neisseria* spp. que se presentó en todos los sitios, menos en la placa subgingival. *Simonsiella muelleri* colonizó solo el paladar duro y varias especies *del* género *Prevotella también* se hicieron presentes.

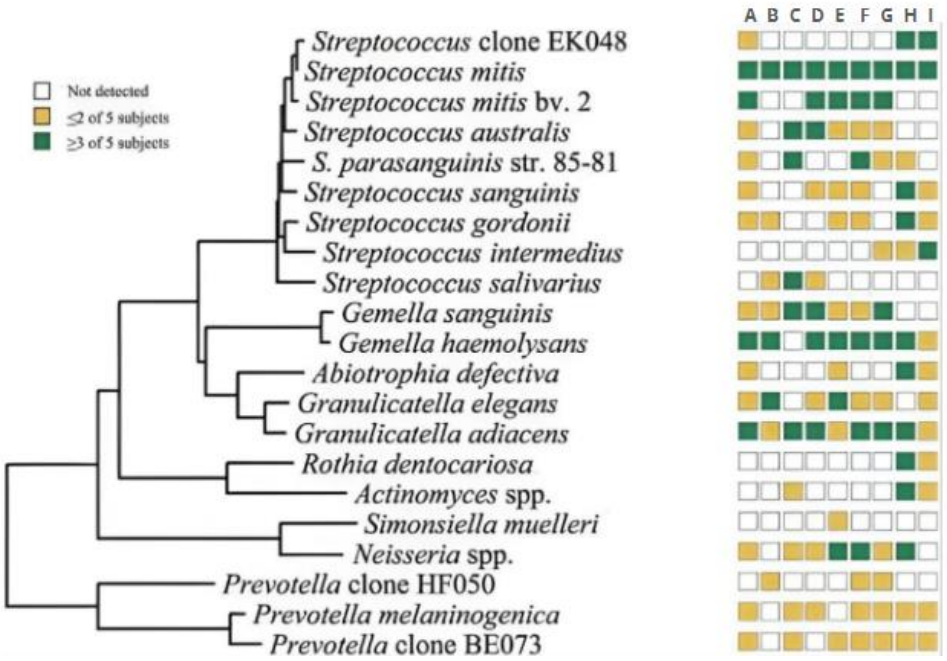

Figura 2. Comparación de resultados de perfiles bacterianos presentes en 9 nichos bucales de personas sanas. A. pliegue bucal, B. vestíbulo maxilar, C. dorso de la lengua, D. laterales de la lengua, E. paladar duro, F. paladar blando, G. amígdalas , H. placas supragingivales e I. subgingivales dentales. Fuente: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/ articles/PMC1287824/

Para el año 2007, surge el Proyecto del Microbioma Humano iniciado por el National Institutes of Health de Estados Unidos (NIH), que da el mayor auge para más investigaciones y estudios moleculares de las comunidades microbianas del cuerpo humano. Para 2012 se publica en la revista Nature el primer estudio de este proyecto a gran escala, detallando los taxas bacterianos asociados a diferentes hábitats corporales. Como resultado para la cavidad oral y sus respectivos nichos, nos señala con mayor abundancia la presencia de los géneros: *Estreptococos*, *Prevotella*, *Veillonella* y *Bacteroides*. De manera paralela en un apartado este estudio nos señala también a los géneros identificados como patógenos encontrando a *Staphylococcus* entre la lista (figura 3).

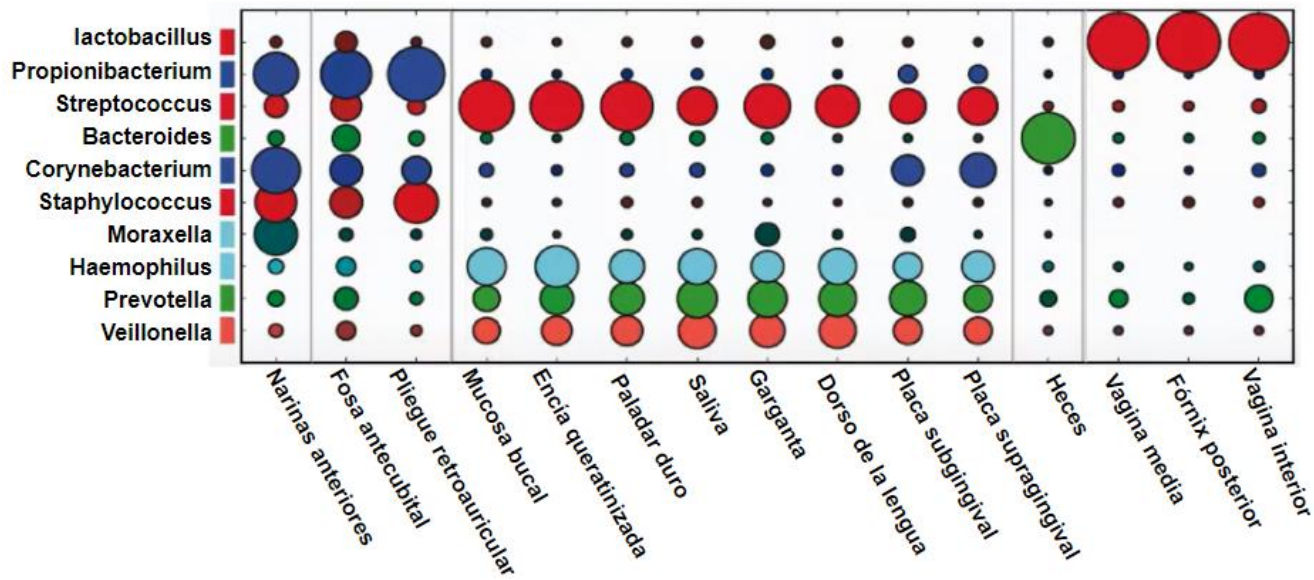

Figura 3. Diez géneros identificados con la secuencia 16S en 15 diferentes nichos de la cavidad oral de un microbioma humano sano. Fuente: https://doi.org/10.1038/nature 11234F

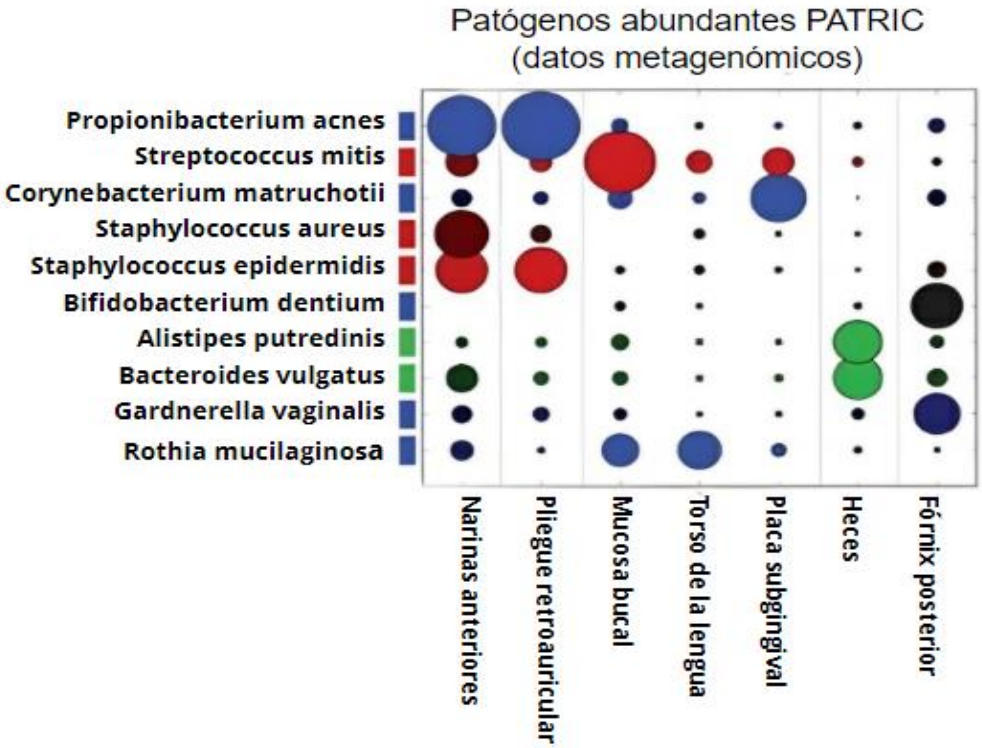

Figura 4. Diez especies identificadas por la secuencia 16S, como patógenos en diferentes microbiotas del cuerpo humano de un microbioma humano sano. Fuente: https://doi.org/10.1038/nature11234

Actualmente la variedad de especies que se encuentran en la cavidad oral está reportada en la expanded Human Oral Microbiome Database, donde incluyen 775 especies microbianas, de ellas 57% fueron nombradas, 13% sin nombre pero fueron cultivables y 30% quedaron como filotipos no cultivables, así como un total de 2074 genomas oral-nasales, que representan a 529 taxones (95% de los cultivables) de los cuales las phyla *Actinobacterias, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacterium*, *Proteobacterias, Spirochaetes* y *Sinergistetes* son las comunidades bacterianas más representativas de la cavidad oral (Gómez García et. al 2023).

Trabajos como el de Serrano-Coll en 2015, destacan la presencia de los phylums: Firmicutes, Proteobacteria, Bacteriodes, Actinobacteria y Fusobacterium. También señalan los géneros bacterianos presentes como: *Streptococcus, Selenomonas, Actinomyces, Veillonella, Fusobacterium, Porphyromonas, Prevotella, Treponema, Neisseria, Eikenella, Haemophilus, Eubacterias, Lactobacterium, Capnocytophaga, Leptotrichia, Peptostreptococcus, Propionibacterium.* Siendo los más frecuentes *Prevotella, Selenomonas* y *Streptococcus .*

Todos estos estudios y hallazgos han logrado que se reconozca e identifique la mayoría de las especies presentes en la microbiota bucal, su papel en la salud y la importancia de las bacterias en el desarrollo de las enfermedades bucales, aunque todavía queda una brecha para identificar de manera definitiva la presencia de especies transitorias y con características cambiantes (llamados patógenos oportunistas) entre los que destacan los géneros: *Corynebacterium, Actinobacillus actinomycetemcomitans y Staphylococcus*, siendo esta última nuestra especie a estudiar.

- *Staphylococcus Aureus*

Trabajos como el de Jackson y su equipo reportaron en 1999, la presencia de *S. aureus* señalando que esta especie puede ser aislada frecuentemente de la cavidad oral de niños y adultos, tanto en pacientes saludables como en los enfermos. Otros trabajos como los de Smith y Jackson en 2001 así como el de Vieira-Colombo en 2016, nos hablan de la interacción de *S. aureus* y su papel en conjunto con otros organismos presentes en el nicho, la forma en que se ve favorecido por la variedad de determinantes ecológicos (salud del hospedero, edad y características fisiológicas) en el ecosistema bucal y como estas variantes le proporcionan las condiciones óptimas para su establecimiento y desarrollo, aunque no se considere residente natural de la microbiota oral normal.

Es importante también, señalar que siendo portador asintomático de *S. aureus*, el hospedero puede estar comprometido en padecer una infección por este microorganismo y que combinando los factores de virulencia de la bacteria y los factores propios del hospedador (estado inmunitario, exposición, hábitos higiénicos, tratamientos con antimicrobianos, etc.) podrían desencadenar un proceso clínico; demostrado así que los aislados de *S. aureus* detectados en portadores "sanos" son los mismos que los aislados encontrados en personas sintomáticas clínicas (Porrero, 2014).

Pese a los años e información obtenida, el seguir estudiando a S. *aureus* se ha mantenido en la línea de los investigadores ya que debe ser visto como un microorganismo de gran importancia médica, abriendo paso a dos importantes temas de investigación: la cavidad oral como un medio potencial de propagación, así como la colonización de *este* organismo y el cambio de rol entre comensal y patógeno oportunista que tiene dentro del huésped.

- *Generalidades*

*S. aureu*s es un microorganismo que forma parte de la familia Microccocaceae, del género *Staphylococcus*, el cual contiene más de 30 especies diferentes y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel, mucosas y otros órganos en el humano. El nombre de estafilococos fue designado por Sir Alexander Ogston después de utilizar la expresión griega staphyle "racimo de uvas" (Götz, et al., 2006). Después, en 1884, el cirujano alemán Anton J. Rosenbach, identificó dos cepas de *Staphylococcus* y las nombró de acuerdo a las pigmentaciones que producían: *Staphylococcus aureus*, del latín "aurum" para el pigmento color oro, y *Staphylococcus albus* (actualmente conocido como *Staphylococcus epidermidis*), del latín "albus" para el pigmento blanco (Orenstein, 2006).

S. aureus un coco Gram-positivo, no móvil, no forma esporas, puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. El microorganismo produce catalasa y coagulasa positiva. En medios no selectivos, *S. aureus* presenta colonias de 1 a 3 mm de diámetro, lisas y un poco elevadas, de bordes enteros, levemente convexas y generalmente pigmentadas con un color que puede ir desde el crema al amarillo. La producción de pigmento se ve favorecida si se incuban los cultivos por 24 a 48 horas adicionales a temperatura ambiente. Cuando esta especie crece en agar sangre bovina se puede observar una zona de β-hemólisis alrededor de las colonias (Cervantes-García, et al., 2014), además, esta bacteria es considerada como oportunista, debido a que ocasiona enfermedades en el humano, infectado y colonizando al huésped, principalmente cuando este atraviesa lapsos de vulnerabilidad que disminuyen la competencia de su sistema inmunológico. Bajo tales condiciones, el microorganismo es capaz de provocar afecciones en casi cualquier región anatómica, lo cual refleja su amplio espectro en

cuanto a genes de virulencia que lo habilitan para establecerse, reproducirse, sobrevivir y diseminarse en diversas clases de tejidos (Massey, 2000).

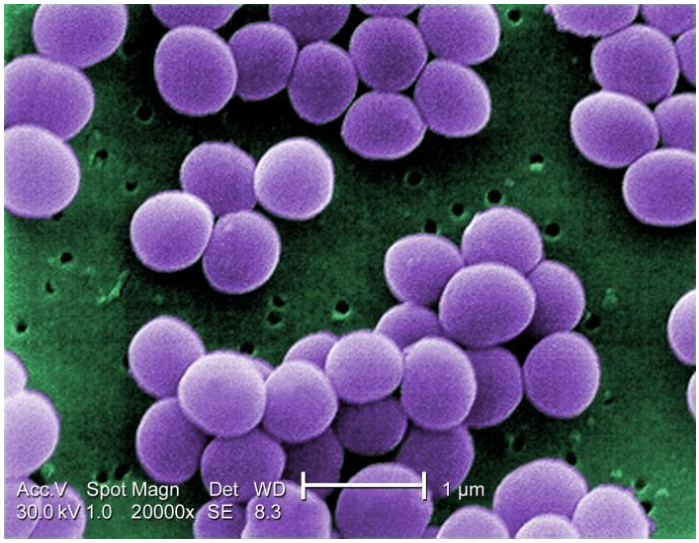

Figura 5. Fotografía de S. *aureus* aislados y teñidos de color violeta por tinción de Gram. Se aprecia su forma de cocos y la agrupación en racimos característica de esta especie. Fuente: http://microbitosblog.com/ 2011/08/03/staphylococcus-aureus-epidermidis-saprophyticus y CDC Public Health Image Library (PHIL).

- *Identificación de S. aureus*

Los estafilococos crecen en medios químicamente definidos, los cuales pueden contener glucosa, sales, aminoácidos, tiamina, ácido nicotínico, etc. En medios suplementados, los estafilococos crecen en condiciones de pH 4.8 - 9.4 y a temperaturas de 25 a 43 C° (Velázquez-Meza, 2005). Este microorganismo se puede aislar e identificar por pruebas bioquímicas como manitol, tinción de Gram, pruebas para la producción de catalasa y coagulasa. Otra prueba muy útil es la producción de desoxirribonucleasa termoestable, así como la presencia de aglutinación con inmunoglobulina G y fibrinógeno (Foster, 1996). Actualmente y con el apoyo de la pruebas moleculares, la identificación de cepas de *S. aureus* se puede realizar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y por consiguiente detectar genes como spa, *nucA*, *coa*A, *femA* o *fem*B . Por otra parte, tenemos la identificación por

genes housekeeping, estos son genes llamados de mantenimiento o constitutivos y se expresan de manera constante en todas las células de un organismo, algunos de los genes de mantenimiento de la tipificación de secuencias multilocus (MLST) para *S. aureus* son:

- arcC (carbamato quinasa)
- aroE (shikimato deshidrogenasa)
- glpF (glicerol quinasa)
- gmk (guanilato quinasa)
- pta (fosfato acetiltransferasa)
- tpi (triosafosfato isomerasa)
- yqi (acetil coenzima A acetil transferasa)

❖ *Factores de virulencia*

Por otro lado, tenemos que otros patógenos bacterianos que a menudo dependen de una o unas pocas toxinas para promover la enfermedad, *S. aureus* produce una asombrosa variedad de factores de virulencia incluyendo una plétora de toxinas y factores de evasión inmune (Cheung, et al., 2021) así como proteínas asociadas a la acumulación (Aap), proteína de unión a superficie A (Spa), proteína de unión a fibrinógeno FnB A y B, proteína de unión a matriz extracelular Embp, fibras amiloides y proteína de unión a la superficie (SasG) (Idress et al., 2021) dándole la oportunidad de colonizar e infectar al huésped.

El éxito de la colonización desencadena las enfermedades por *S. aureus* y esto se debe en gran medida a la expresión de factores de virulencia que participan en adhesión, adquisición de nutrientes y evasión de la respuesta inmune del huésped. Los factores de virulencia se clasifican en tres categorías:

- factores involucrados en la adherencia de la célula huésped o matriz extracelular (proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa).
- factores involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas (SEs), SEA-SEE, SEG-J, SEK, SEL, SEP, SEM y SEO;
- la toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST), proteína A, lipasas y polisacáridos capsulares.
- factores involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos (enterotoxina, alfa, β, γ, δ hemolisina).

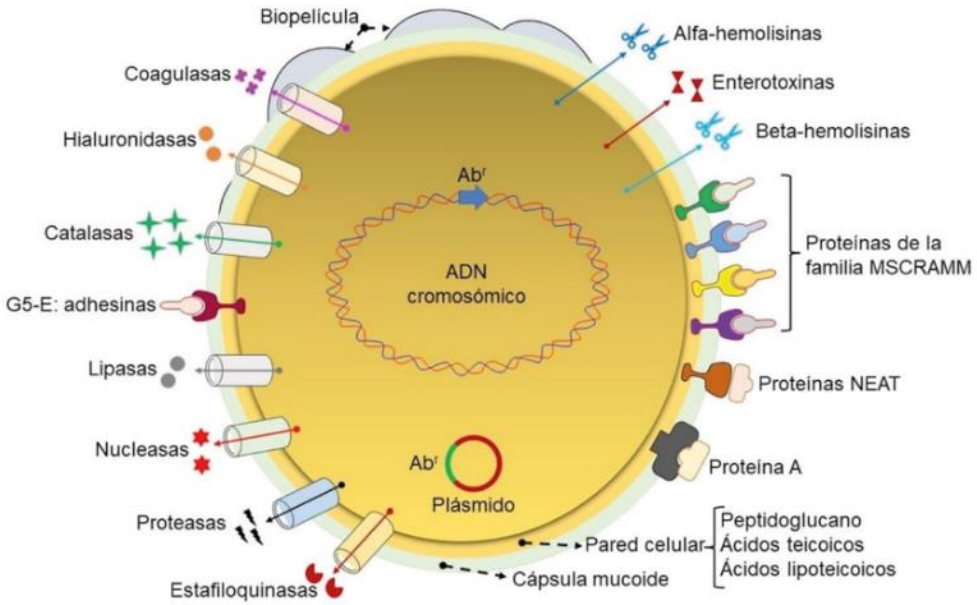

Figura 6. Esquema general de los factores de virulencia escritos de *Staphylococcus aureus*. Fuente: https://sabermas.umich.mx/secciones/articulos/1332-tacticas-ofensivas-y-defensivas-de staphylococcus -aureus

❖ Toxinas

Staphylococcus aureus produce estos componentes superficiales que son capaces de provocar severas intoxicaciones alimentarias dependiendo de la cantidad ingerida de alimento (Martínez-Pulgarín, 2005). Estudios clínicos han relacionado a *S. aureus* con la secreción de proteínas que actúan como toxinas, en cuadros digestivos es responsable de la producción de enterotoxinas, el síndrome de piel escaldada por la producción de

toxinas exfoliativas (ETA-ETD) o el síndrome del shock tóxico producido por la toxina del mismo nombre (toxic shock syndrome toxin o TSST). Otras exotoxinas son las hemolisinas (α, β, γ y δ) y la leucocidina de Panton-Valentine (Panton-Valentine leukocidin o PVL), que son toxinas citolíticas. La toxina PVL ha sido relacionada con casos de neumonía necrotizante y forunculosis (De Leo, et al. 2009).

- MSCRAMM

Son componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de la matriz adhesiva. Este grupo de proteínas media la adherencia de las bacterias a los componentes de la matriz extracelular del huésped. Las proteínas que componen esta familia tienen una estructura general, en la cual hay un dominio A en el extremo amino terminal y una región R. En el dominio A se encuentran tres subdominios (N1, N2, N3) (Pasachova, et al., 2019). Esta familia incluye: la proteína A (Staphylococcal protein A), *FnbA y FnbB* (fibronectin-binding protein A and B), *clfA y clfB* (clumping factor A y B), *cna* (collagen adhesion), *bbp* (sialoprotein-binding protein), *ebpS* (elastin-binding protein *Staphylococcus aureus*), *map/eap* (extracellular adhesion protein) y *sdrC*, *sdrD*, *sdrE* (serine aspartate repeat proteins C, D Y E) .

- Adhesinas

Staphylococcus aureus posee muchas proteínas de superficie con características comunes. Éstas incluyen una secuencia de señal secretoria en el extremo amino terminal, con aminoácidos de carga positiva, los cuales se extienden hasta el citoplasma; un extremo hidrofóbico que se extiende hasta la membrana y una región de anclaje a la pared celular, todos ubicados en el extremo carboxílico. Un dominio de adherencia en el amino-terminal, que está expuesto en la superficie de la célula bacteriana, permitiendo que algunas de estas proteínas actúen como adhesinas (Foster

y McDevitt,1994). Navarre y Schneewind en 1999 describen la producción de dos tipos de adhesinas, las primeras son aquellas proteínas que se anclan a la superficie de la célula estafilocócica y se denominados moléculas MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) y el segundo conjunto lo conforman aquellos que están anclados de forma no covalente a la superficie celular. Actualmente Jan-Roblero y colaboradores en 2016, clasificaron a las proteínas de superficie en cuatro familias según un análisis estructura-función y sus diferentes motivos: la familia MSCRAMM, la familia de motivos NEAT, la familia de tres hélices y la familia de repeticiones G5-E (tabla 1).

Tabla 1. Listado de las adhesinas agrupadas por su actividad y componentes.

Familias	Motivos estructurales y dominios	Proteínas	Función durante la infección
MSCRAMM Clf Sdr	Región N-terminal A(comprende los subdominios N1, N2 y N3) BSDR repetido en (SdrC, SdrD y SdrE); Región R (conocida como SD, contiene repeticiones de serina-aspartato).	*ClfA* *ClfB* *SdrC* *SrdD*	Adhesión al fibrinógeno, degradación de C3b, evasión inmune. Adhesión al Fibrinógeno, queratina y loricrina. Colonización nasal por adhesión a células epiteliales descamadas. Unión a β-neurexina, adhesión a células epiteliales nasales descamadas. Adhesión a células epiteliales nasales descamadas.
FnBp	Una región (subdominios N1,N2,N3); Región R (repeticiones de unión a fibronectina).	*FnBpA* *FnBpB*	Fibrinógeno, fibronectina y elastina. Adhesión a matriz extracelular, invasión del huésped celular. Unión a fibronectina. Adhesión a la matriz extracelular e invasión del huésped celular.
Cna	Una región subdominios N1,N2,N3.	*Cna*	Unión a colágeno, adhesión a matriz extracelular.
NEAT	Cerca del motivo de transportador de hierro: estiramiento hidrofílico terminal C (en IsdA).	I*sdA* *IsdB* *IsdH*	Unión al grupo Hemo, fibrinógeno, fibronectina, citoqueratina y loricrina. Captura de hemo y absorción de hierro, coloniza la zona nasal. Unión al grupo Hemo, hemoglobina y unión a integrinas 3β, captura de hemo y absorción de hierro. Invade células no fagocíticas. Unión Hemo y hemoglobina, captura de hemo y adquisición de hierro, evasión inmune por degradación de C3b.
Tres paquetes helicoidales	Dominios de paquetes de triple hélice unidos en tándem (EABCD); región Xr que contiene repetición, región Xc no repetitiva.	Proteína A	Unión de IgG, IgM y TNRF1. Evasión de inmunidad, aumento de la inflamación durante neumonía e infección en la piel.
G5-E	Una región, rep. alternas de dominios G5 y E.	*SasG*	Adhesión a células epiteliales descamadas, así como formación de biopelícula.

- La proteína A es una proteína de superficie multifuncional que es ubicua en *S. aureus* y se usa a menudo en la tipificación de cepas sobre la base de la variación en la región codificante de la secuencia de ADN Xr. En el extremo N, la proteína A contiene cinco módulos homólogos (conocidos como EABCD), cada uno de los cuales consta de haces de tres hélices individuales plegados por separado que pueden unirse a varios ligandos distintos (Foster et al., 2017).

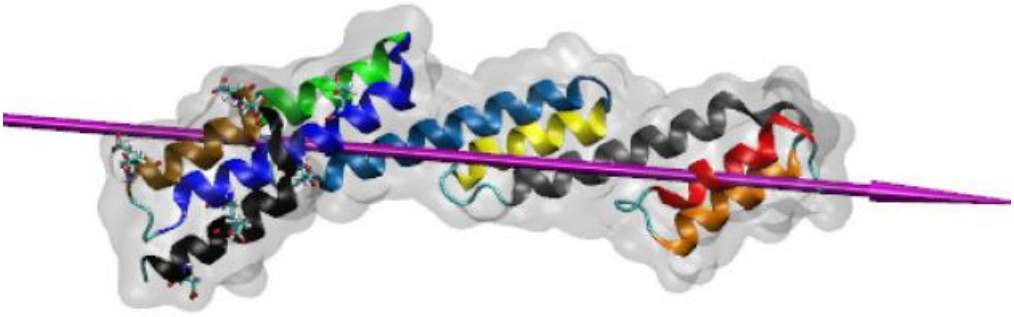

Imagen 7. Estructura de SpA ilustrada con VMD 1.9.1. La proteína se indica como una superficie fantasma y las hélices α estructurales secundarias: Hélice 1: cintas rojas (cerca del extremo N), hélice 2: naranja, hélice 3: gris, hélice 4: amarillo, hélice 5: azul claro, hélice 6: verde, hélice 7: azul oscuro, hélice 8: marrón, hélice 9: negra (cerca del extremo C) Fuente: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9103475/

- *FnbA* y *FnbB*: son dos proteínas homólogas a la proteína de unión a fibronectina (Fn). Forman parte relevante de la internalización de *S. aureus* a las células del hospedero. Son proteínas codificadas por genes estrechamente vinculados, ya que poseen una alta homología en su secuencia (Hauk & Ohlsen, 2006). Trabajan juntas para el establecimiento de la infección y son indispensables en la adhesión inicial de *S. aureus* al epitelio. Estas proteínas tienen la capacidad de unirse al fibrinógeno y a la elastina gracias al dominio N-terminal que poseen; seguido por una región que contiene 11 repeticiones de aminoácidos en el caso de la *FnbA* y 10 repeticiones para la FnbB dando la unión con la fibronectina, permitiendo así la invasión de células endoteliales por parte del *Staphylococcus aureus.*

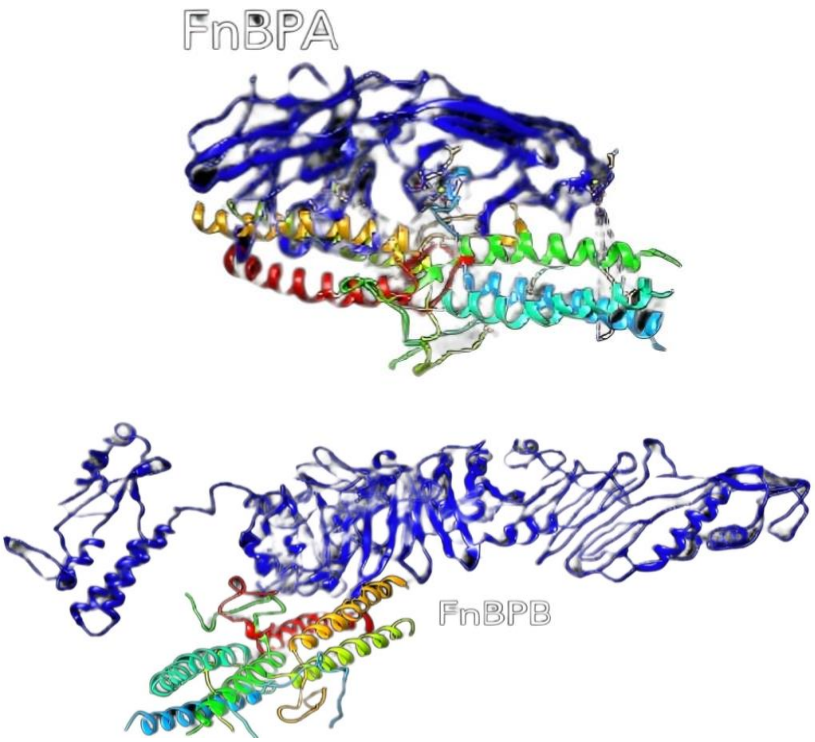

Figura 8. Estructuras obtenidas Docking molecular de los modelos tridimensionales de cada proteína con el PDB 1JY3. Fuente: https://www.researchgate.net/cpublication/351891214_Caracterizacion_antigénica_silico_de_ las_proteinas_de_union_a_la_fibronectina_A_y_B_y_del_factor_de_aglutinacion_A_de_*staphylococcus_aureus*_como_candidatos_vacunales_para_la_prevencion_de_mastisis_

- *ClfA y ClfB:* Proteínas encargadas de aglutinar y adherir a las bacterias al fibrinógeno. Específicamente el factor Clumping o de aglutinación A, fue el primer MSCRAMM identificado, es el más conservado entre especies y facilita la unión del patógeno a el C-terminal de la cadena gamma del fibrinógeno presente en el plasma sanguíneo del huésped y a su vez este ha demostrado promover la evasión bacteriana de la defensa del huésped, en parte por la inhibición del proceso de fagocitosis realizado por neutrófilos y macrófagos a través de mecanismos dependientes e independientes al fibrinógeno. El factor Clumping o de aglutinación B (*ClfB*) es una adhesina bifuncional que se expresa únicamente en la superficie celular durante la fase exponencial de crecimiento y es capaz de unirse a las cadenas alfa del fibrinógeno, así como a la citoqueratina diez (CK10), una proteína estructural de las células epiteliales escamosa (Pinilla, et al. 201

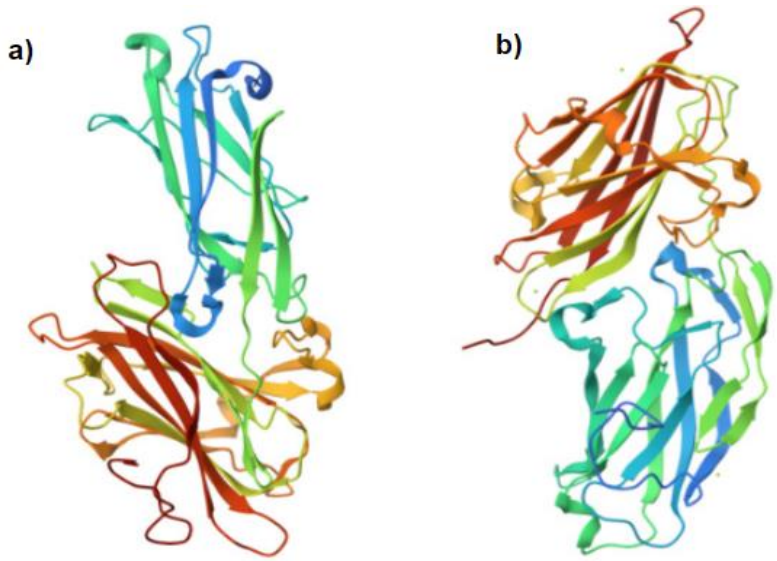

Figura 9. Estructura molecular de la proteína clfA (a) y clfB (b). Fuente: https://www.rcsb.org/structure/1n67 y www.rcsb.org/structure/4F24.

- *Cna*: es un factor de virulencia crítico de *S. aureus* en modelos experimentales de artritis séptica y osteomielitis y esta función depende de su capacidad para unirse al colágeno. Estas proteínas se dirigen al colágeno para mejorar la adhesión de las bacterias a los tejidos del huésped en las etapas tempranas y posteriores de la infección (Zong, et al. 2006). El cna se compone de una región llamada A y un número variable de repeticiones B según la cepa. En el extremo C-terminal de *Cna* se requieren características para la orientación a la superficie y el anclaje covalente al peptidoglicano. La actividad de unión al colágeno se localiza en la región A (Pati *et al*.,1994).

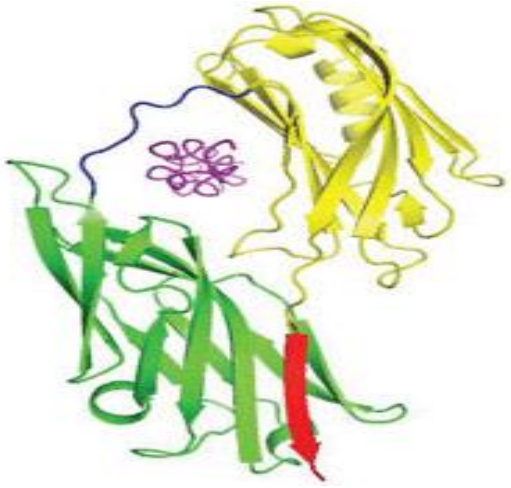

Figura 10. Diagrama de cinta de la proteína Cna en complejo con la triple hélice de colágeno. El subdominio N1 (verde) y el subdominio N2 (amarillo) están separados por una región larga desplegada (azul) que forma el bloqueo alrededor del colágeno (púrpura). Fuente: https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.gpp3-0046-2018

- *Bbp*: La sialoproteína ósea (gen: *Ibsp*) es una proteína de matriz extracelular multifuncional presente en el hueso, el cemento y la dentina. La evidencia acumulada respalda a *Bpb* como un regulador clave de la formación de tejido mineralizado a través de dominios funcionales conservados evolutivamente (Nagasaki et al. 2022). Es una variante alélica de *SdrE* , que tiene su diana de unión de *Bbp*, en una fosfoproteína de MEC altamente glicosilada y sulfatada que se encuentra casi exclusivamente en los tejidos conectivos mineralizados, donde representa el 10% de las proteínas no colágenas de la matriz, siendo mayoritariamente sintetizada en el tejido óseo (Campoccia et al. 2009).

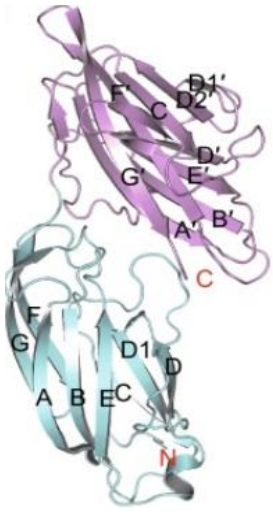

Figura 11. Representación de la estructura Bbp 273-598 con sus extremos N y C indicados. Los dominios N2 y N3 se muestran en cian y violeta, respectivamente. Fuente: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PM C4598324/

- *Sdr*: repeticiones de serina-aspartato que contiene la proteína C (SdrC, SdrD y SdrE). Comparten una organización estructural similar que consiste en un péptido señal secretora N-terminal, seguido de un dominio A, repetición B y región R que contiene repeticiones de serina-aspartato. El terminal C consiste en un motivo de anclaje a la pared celular LPXTG, una región hidrofóbica que abarca la membrana y una cola citoplasmática cargada. La proteína de superficie *SdrC* de *S. aureus* induce la formación de biopelículas bacterianas a través de una interacción hemofílica intermolecular de sus dominios N2. Por otro lado *SdrD* aumenta la adherencia bacteriana a las células nasales descamadas, promueve la adhesión de *S. aureus* a los queratinocitos a través de su interacción con Dsg1 y recientemente se demostró que la proteína también promueve la supervivencia bacteriana y la virulencia durante la infección sistémica (Ajayi, et al. 2018; Yishuang, et al. 2020).

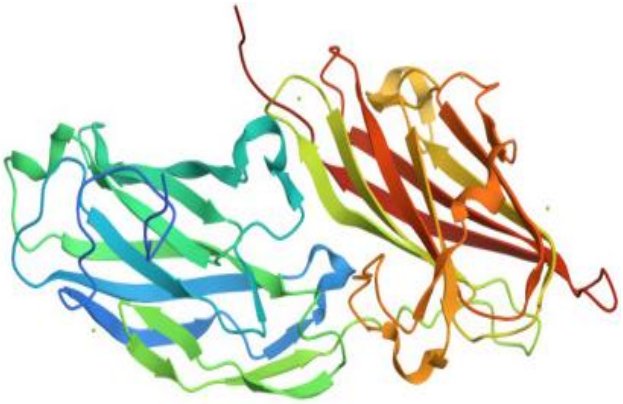

Figura 12. Estructura obtenida por Docking molecular del modelo molecular de la proteína SdrE tridimensional y sus dominios. Fuente: https://www.rcsb.org/structure/5IHW

- *map*: proteína de adherencia extracelular, también conocida como *Eap o p70,* muestra una alta afinidad por la fibronectina, el fibrinógeno y la trombospondina, se debe agregar que la proteína *eap* tiene fuertes propiedades antiinflamatorias (Scriba et al, 2008). Jonsson *et al*. (1995) reveló que la proteína constaba de 689 aminoácidos, incluida la secuencia del péptido señal. La característica más llamativa fue un dominio de 110 aminoácidos que se repite seis veces. Dentro de cada dominio hay un subdominio que consta de 31 residuos que se encontró que era altamente homólogo a la cadena *β* N-terminal de muchas moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Esta similitud entre dichas moléculas sugiere la posibilidad de que map pueda tener la capacidad de afectar la función de las células T (Lee, et al. 2002).

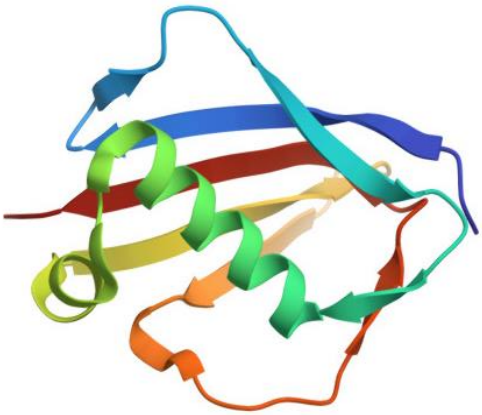

Figura 13. Estructura molecular de la proteína Eap, se muestra su hélice α de cuatro vueltas colocada diagonalmente a través de una cara de una hoja β mixta de cinco hebras y se asemejan a una mano abierta que sostiene un rollo de moneda. Fuente: https://www.rcsb.org/structure/ 1YN5

- *ebpS*: Promueve la unión de péptidos de elastina solubles y tropoelastina a las células de *S. aureus,* aunque no es capaz de promover la adherencia bacteriana a la elastina inmovilizada y, por lo tanto, no es una molécula de matriz adhesiva que reconoce componentes de superficie microbiana (MSCRAMM). Es el medio por el cuál *S. aureus* se une a la tropoelastina soluble a través de su 25- asociado a la superficie celular. *ebpS* se une a la región N-terminal de 30 kDa de elastina, que no contiene el reconocimiento del hexapéptido VGVAPG (motivo para el

receptor de elastina de mamífero). El sitio de unión de la elastina también es diferente del C-terminal cargado a la región final de la elastina donde se asocian los componentes microfibrilares para el ensamblaje de fibras elásticas. Estos hallazgos sugieren que el sitio de unión de *ebpS* en la elastina está disponible para la unión de *S. aureus* y que esta interacción puede promover la colonización bacteriana para facilitar la patogenia (Downer et al. 2002).

❖ Biopelícula

Una biopelícula, es la comunidad sésil derivada de microorganismos, formada por células que están adheridas a un sustrato, interfase o unidas unas con otras, embebidas en una sustancia polimérica de matriz extracelular y que exhibe fenotipos alterados respecto al crecimiento, expresión de genes y producción de proteínas. Cuando las bacterias crecen en la biopelícula, en forma sésil, manifiestan un fenotipo diferente respecto del que manifiestan cuando crecen en forma planctónica (Archer, et al. 2011).

★ Formación, desarrollo y papel de la biopelícula como factor de virulencia.

La biopelícula está compuesta por bacterias, que representan un 15%- 20% del volumen, y una matriz o glicocálix, que representaría el 75% - 80%. Esta matriz está compuesta por una mezcla de exopolisacáridos, proteínas, sales minerales y material celular (Socransky, et al. 2003). Los exopolisacáridos representan el componente fundamental de la matriz y son producidos por las propias bacterias de la biopelícula, son fundamentales en el desarrollo, pues mantienen la integridad del todo y pueden tener carga neutra o carga polianiónica (carga negativa). Los propios exopolisacáridos producidos por una bacteria pueden actuar como fuente de nutrientes para otras bacterias. La composición química y la estructura terciaria de los exopolisacáridos determinan la capacidad de adhesión de estos lo que a su vez favorece la adhesión de

las bacterias a las superficies. Tienen la función de protección de las bacterias, evitando su desecación e inhibiendo los antimicrobianos. La pérdida o alteración de un determinado polisacárido puede alterar, o incluso puede producir la desaparición del mismo (Baehni, 2003 y Landa, 2004).

★ Fases y procesos en la formación de biopelícula.

La formación de la biopelícula es un proceso dinámico y complejo, su desarrollo puede dar lugar a la patogenia central en una infección. Artículos como el de Sarduy y Gonzáles en 2016, nos presentan 3 fases dentro de este proceso:

➢ Adhesión: En esta primera fase, el sustrato tiene que ser adecuado para la absorción reversible y, finalmente, la adhesión irreversible de la bacteria a la superficie. Una vez percibida una superficie, proceden a formar una unión activa a través de apéndices, como fimbrias, flagelos o pili, que le confieren una gran movilidad, lo que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie en las etapas iniciales de la adhesión; en el caso de las grampositivas, se ha descrito la participación de proteínas de superficie. La adhesión de bacterias a una superficie ocurrirá más fácilmente en aquellas más ásperas, más hidrofóbicas y recubiertas por «películas condicionantes», como es el caso de la película adquirida.

➢ Crecimiento: Durante la segunda fase o de crecimiento, la bacteria, una vez adherida, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia. A medida que las células se dividen y colonizan la superficie, comienzan a elaborar un exopolisacáridos que constituye la matriz de la biopelícula, y este comienza a desplegarse en una formación tridimensional.

➢ Separación o desprendimiento: En la tercera etapa, luego que la biopelícula ha alcanzado la madurez, algunas células, en forma aislada o en conglomerados, se liberan de la matriz para poder colonizar nuevas superficies, con lo cual se cierra

el proceso de formación y desarrollo. Los conglomerados desprendidos conservan ciertas características de este, como la resistencia antimicrobiana. En cambio, las bacterias liberadas aisladamente podrían volver a su fenotipo planctónico.

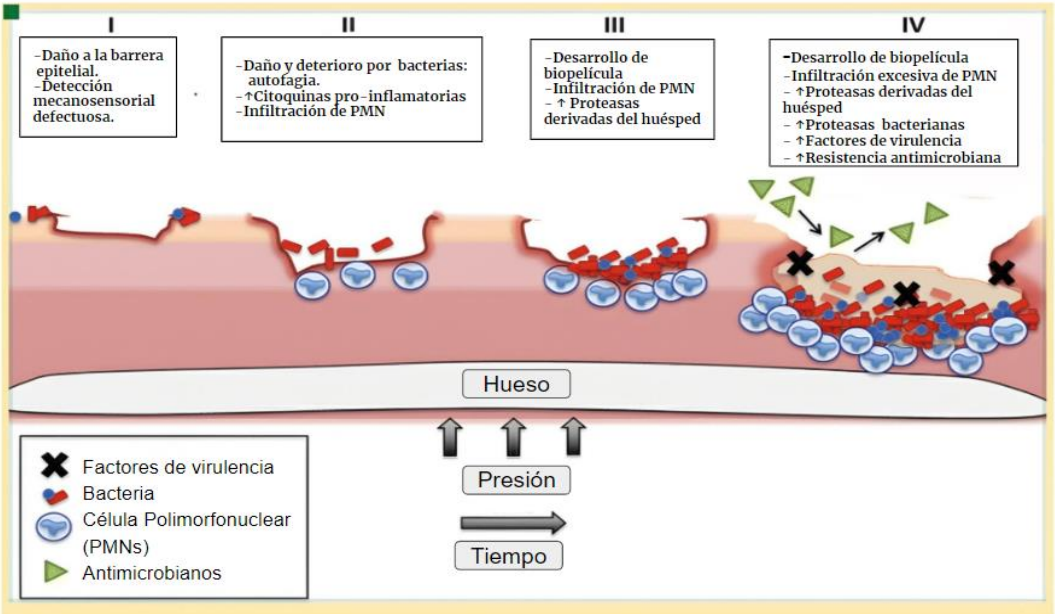

Figura 14. Formación y desarrollo de biopelículas con factores asociados. Fuente: tomada y editada de https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-09782-4_3

★ Señalización dentro de la biopelícula

Dentro de las biopelículas, las bacterias tienen capacidad para comunicarse entre ellas, ya sea por medio de señales químicas o incluso mediante transferencia de material genético a través de mecanismos tales como la conjugación, la transformación, la transferencia de plásmidos y la transferencia de transposones. Dentro de dicha capacidad comunicativa mediante señales químicas es importante el fenómeno de «Quorum Sensing», es decir, la regulación de la expresión de ciertos genes a través de la acumulación de compuestos de señalización. Esta acumulación de señales químicas depende de la densidad bacteriana. El «Quorum Sensing» puede proporcionar a la

biopelícula algunas de sus propiedades características y mayor resistencia. Por ejemplo, puede promover la expresión de genes codificantes para la resistencia a un determinado antibiótico a partir de cierta densidad celular, tiene la capacidad para influir en la estructura del biofilm, así como estimular el crecimiento de especies beneficiosas e inhibiendo el crecimiento de las especies competidoras.

La formación de biopelícula en *S. aureus* se inicia con una etapa de adhesión de algunas células bacterianas a una superficie, la cual es mediada por propiedades físico-químicas de la superficie celular y por factores específicos que median la adherencia a los componentes de la matriz extracelular derivada del hospedador (fibronectina, fibrinógeno, entre otros). Posteriormente, las bacterias se agrupan en multicapas embebidas en una matriz extracelular que ellas mismas producen. En esta etapa de maduración de la biopelícula, la mayoría de las bacterias no tienen contacto directo con la superficie por lo que las interacciones entre células llegan a ser esenciales para el desarrollo y mantenimiento de la biopelícula. Las bacterias dentro de la biopelícula despliegan niveles variables de actividad metabólica debido a la difusión heterogénea de agua y nutrientes. La matriz extracelular que encierra a la comunidad bacteriana está constituida por el PIA o poli-N-acetilglucosamina (PNAG), producido por las enzimas codificadas por el operón icaADBC (Dotto, 2017).

- *Resistencia antibiótica*

Actualmente y gracias a todos los mecanismos de virulencia, *S. aureus* ha formado un amplio rango de resistencia a los antibióticos, encontrando cepas resistentes y multirresistentes. Si bien el surgimiento de cepas de *S. aureus* multirresistentes es el resultado de una presión selectiva que ha formado el organismo bajo las diferentes terapias antimicrobianas utilizadas, por otro lado, se ha observado que la acumulación y la diseminación de resistencia en *S. aureus* es producto del intercambio de determinantes de resistencia preexistentes cargados por elementos genéticos móviles

como plásmidos, transposones y secuencias de inserción que le han dado mayor poder de resistencia a *Staphylococcus aureus* ante su hospedero y tratamiento (Bustos-Martínez, et al. 2006).

Llamamos antibióticos a las sustancias que inhiben el crecimiento bacteriano, de manera que se produce resistencia cuando una bacteria no se reprime en presencia de la sustancia. La resistencia a antimicrobianos puede producirse por adquisición de transferencia genética horizontal o por mutaciones (Rolain, et al. 2012; Grundmann, et al. 2006). En este proceso es relevante la presencia de los elementos genéticos móviles (EGM) que se encargan de la transferencia genética a la bacteria, dándole una mejor resistencia antimicrobiana, nuevas características y flujo de factores de virulencia (Colsa-Ranero, 2011).

A principios de los años 40 la penicilina entró como tratamiento en las infecciones causadas por *S. aureus* abatiendo de manera importante las infecciones ocasionadas por este microorganismo. Sin embargo, para 1946 se observó que aproximadamente 60% de los aislamientos fueron resistentes a penicilina, y para mediados de 1950, los aislamientos de *S. aureus* mostraron niveles elevados de resistencia de hasta el 80-90% en los pacientes hospitalarios (Castellano, et al. 2010).

Tabla 2. Principales antibióticos a los que *S. aureus* muestra resistencia fuente: tomada y editada de https://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view

Antibiótico	Genes de resistencia	Producto del gen	Mecanismo de resistencia	Localización
Penicilina	blaZ	β-lactamasa	Hidrólisis enzimática del núcleo β-lactámico	Plásmidos; Tn552
Betalactámicos	mecA	PBP2a	Afinidad renuncia al antibiótico	Cromosoma SSc-mec; Tn4291
Aminoglucósidos	aacA-aphD	Acetiltransferasa, Fosfotransferasa	Modificación por acetilación o fosforilación	Cromosoma: plásmidos; Tn4001, Tn5404, Tn5405
Macrólidos, lincosamidas	ermA. ermB, ermC	Metilasa	Metilación del rRNA 23S	Plásmidos; Tn554
Macrólidos, estreptogramina	msrA, vha, vat, vatB	Acarreadores ABC, Acetiltransferasa	Bomba de expulsión. Modificación por acetilación	Plásmidos
Tetraciclinas	tetK. tetL, tetM	Sistema clase K,L yM	Bombas de expulsión. Protección ribosomal	Plásmidos, Tn916
Rifampicina	rif	RNA polimerasa	Mutación en la subunidad β de la RNA polimerasa	Cromosoma
Ácido fusidico	fusA, fusB	Factor de elongación G	Alteración del factor de elongación G	Plásmidos
Quinolonas	par gvrA gvrB	Componente ParC de la topoisomerasa lV. Componentes GyrA o GyrB de girasa,	Mutación subunidad A de la girasa y topoisomerasa lV	Cromosoma
Mupirocina	mupA	Isoleucil tRNA sintetasa	Producción de una Isoleucil tRNA sintetasa modificada	Plásmidos

- *Staphylococcus aureus meticilino resistente*

La sustitución de la penicilina por penicilinas semisintéticas resistentes a la penicilinasa (como oxacilina y meticilina) amplió de nuevo las opciones terapéuticas, esto hasta la aparición de MRSA (*Staphylococcus aureus* metilo resistente). La diseminación de clones con resistencia a meticilina supuso un gran impacto en el tratamiento de las infecciones por *S. aureus*, ya que la resistencia a meticilina limita el uso de β-lactámicos en general, siendo los β-lactámicos el tratamiento de elección de infecciones por este patógeno (Chatterjee, 2013). Existen cepas de *Staphylococcus aureus* provocan más daño que otras, como es el caso de S. *aureus* meticilino-resistente. MRSA está presente en 30-50% de los aislados intrahospitalarios alrededor del mundo; es la causa de brotes nosocomiales, sobre todo en adultos y salas de cuidados intensivos (Velázquez-Guadarrama, 2010). También se sabe que la resistencia de esta cepa está generada por la producción de proteínas de unión a penicilina tipo 2a (PBP2a), que presentan baja afinidad para unirse a aquellos betalactámicos con actividad frente a los estafilococos, en condiciones normales. Dichos betalactámicos se unen a las PBP (proteínas de unión a la penicilina) nativa, que se encuentran en la pared estafilocócica, inhibiendo así la biosíntesis contra peptidoglicano. Pero, lo que realmente determina la resistencia a la meticilina es la adquisición del gen mecA, el cual codifica la PBP2a (Zendejas-Manzo et al. 2014).

Hasta la fecha, las investigaciones y estudios de los microorganismos que forman parte del nicho bucal han avanzado en gran medida, ampliando el conocimiento y panorama que tenemos acerca de la interacción de las especies que habitan ahí. Si bien se ha logrado identificar a una gran cantidad de especies nativas y patógenas con las técnicas moleculares independientes del cultivo; queda ampliar más el campo para el conocimiento de la diversidad bacteriana en la cavidad bucal humana sana, incluidas

especies transitorias y oportunistas que llegan a ser determinantes como precursoras de fuertes infecciones al humano, como lo es *Staphylococcus aureus.* Es importante definir completamente la presencia de *S. aureus* en la microbiota humano de la cavidad

bucal sana, identificarlo, entender sus estadísticas y su prevalencia en una población fuera del área médica y así poder comprender el papel de estas bacterias con la cavidad oral y el humano en general.

Antecedentes

Aparna (2008) Realizó una revisión de las etapas en la formación de la biopelícula, sus mecanismos patogénicos, el efecto de los agentes antimicrobianos, la detección y erradicación de las biopelículas.

Lozano et al. (2010) estudiaron a personas sanas de diferentes grupos sociales para aislar y analizar cepas de *Staphylococcus aureus*. Los aislados fueron identificados por pruebas convencionales microbiológicas y se determinó la susceptibilidad antimicrobiana para los diferentes antibióticos a través de MicroScan.

McCormack y colaboradores (2015) sugieren y concluyen en su trabajo que la presencia de S. aureus es frecuente en la población y su aislamiento de la cavidad bucal, por ello debe considerarse la zona oral como una fuente se diseminación e infección de esta especie a otras partes del cuerpo.

Arciola et al. (2015) Describieron una serie de genes que codifican para diferentes MSCRAM-Ms; por ejemplo los genes ClfA, ClfB y fib que codifican para proteínas de unión al fibrinógeno y las proteínas de unión a la fibronectina, codificadas por los genes fnbA y fnbB, proteínas denominadas de igual forma que sus genes codificantes.

Cruz-Martínez et al. (2016) Compararon la distribución de genes que codifican para proteínas de adhesión asociadas con la formación de biofilm en cepas resistentes. Mediante la PCR se buscó la presencia de nueve genes de adhesinas coa, ebps, fnbA, fnbB, fib, clfA, clfB, bbp, y cna.

Uribe-García et al. (2019) caracterizaron las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de lesiones periodontales y determinaron la expresión de genes involucrados en la adhesión celular tras su infección en las células epiteliales humanas usando un modelo in vitro, su formación de biopelículas y su resistencia a antibióticos.

Objetivos

- General:

Aislar y caracterizar cepas de *Staphylococcus aureus* de encías sanas

- Particulares:

-Caracterizar por PCR de punto final cepas de *S. aureus*

-Determinar frecuencia de los genes de virulencia en cepas de *S. aureus* (RNAr 1*6s, spaX, cna, coa, fnbA, fnbB, clfA. clfB, sdrC'D'E, ebps, map/eap*)

-Determinar la resistencia antibiótica de las cepas por método Kirby-Bauer.

-Determinar la formación de biopelícula en las cepas de *S. aureus*.

-Analizar cualitativamente y cuantitativamente la formación de biopelícula por el método de Rojo Congo y el método de tinción por Cristal violeta respectivamente.

Metodología

- Toma de muestras.

Se tomaron 100 muestras provenientes de alumnos de la FES Iztacala, este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de Genética en la UMF. Los alumnos seleccionados se presentaron sin limpieza previa de la boca, esto para no afectar la microbiota natural, con encías sanas y sin problemas periodontales (sin hinchazón, enrojecimiento, sangrado, etc.), mismas características que fueron evaluadas por la odontóloga Laura Arredondo especialista en el tema. Se tomaron muestras de la encía de cada uno de los alumnos con ayuda de hisopos estériles y posteriormente se colocaron dentro de tubos de ensayo con caldo de cultivo Brain Heart Infusión (BHI, Bioxon) y se incubaron por 24 horas a 37°C.

Figura 15. Toma y manejo de muestras en el laboratorio de Genética en la UMF.

- Identificación de cepas *Staphylococcus aureus*.

Se realizó la siembra (técnica estriado cruzado) de cada una de las muestras obtenidas de los estudiantes en medio selectivo de agar sólido S-110 especial para S. *aureus*, incubando por 24 horas a 37°C. Las colonias que crecieron en dicho medio fueron evaluadas e identificadas morfológicamente (color amarillo-dorado y forma circular para cada uno de los grupos coloniales) como *S. aureus.*

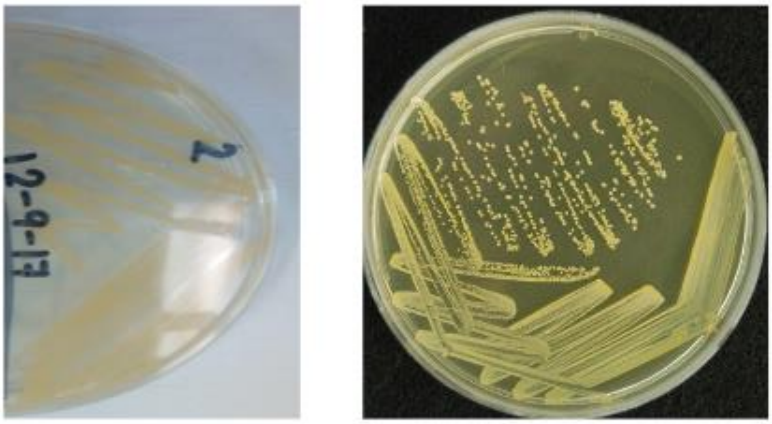

Figura 16. Fotografía de una caja de cultivo con la muestra #2 (izquierda), Imagen de una caja en laboratorio con estriado y colonias circulares visibles de *S. aureus.*

➢ Pruebas bioquímicas

Manitol: Se sembraron cada una de las muestras obtenidas, con una asa de punta se tomó una colonia de cada cepa para introducirla de manera vertical en el tubo de ensayo que contenía manitol. Se dejó en incubadora de 24 horas para obtener los resultados.

Coagulasa: Esta prueba se realizó sobre un portaobjeto, donde se colocó una colonia de cada cepa bacteriana y se diluyó con 50 mL de plasma de sangre humana. El resultado de la prueba se obtuvo por medio de la observación y presencia de aglutinación de la bacteria y se clasificó como positiva o negativa.

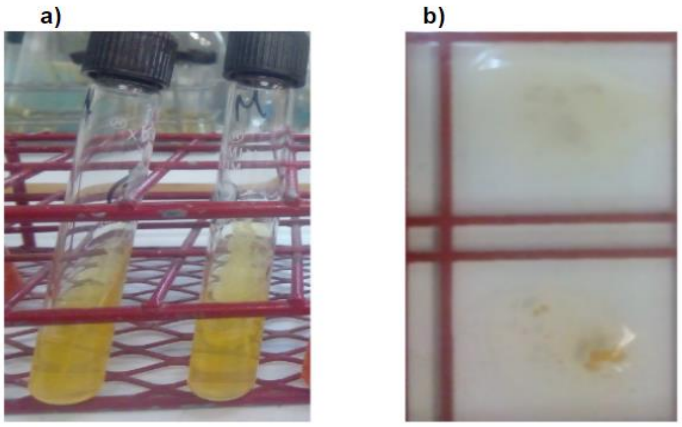

Figura 17. Prueba de manitol realizada a muestras recolectadas en tubos de ensayo (a). Prueba de coagulasa positiva realizada a las muestras (b).

➢ Extracción de DNA

Se obtuvo DNA genómico por el método de ebullición, en este procedimiento se realizó con apoyo de una asa estéril, con esta se tomó muestra de cada una de las cepas identificadas como *S. aureus* en tubos de ensayo estériles con rosca y 2 mL de agua desionizada libre de nucleasas estéril, cada tubo fue sometido a agitación en vortex y posteriormente se llevaron a hervir durante 20 minutos (100°C), seguido de este paso , se colocaron los tubos en hielo por el mismo tiempo. Se recuperó el sobrenadante en tubos eppendorf nuevos y estériles. Estas muestras se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos, se desechó la pastilla y el sobrenadante se recuperó nuevamente en tubos eppendorf nuevos y estériles para ser almacenados a -20°C para futuras pruebas.

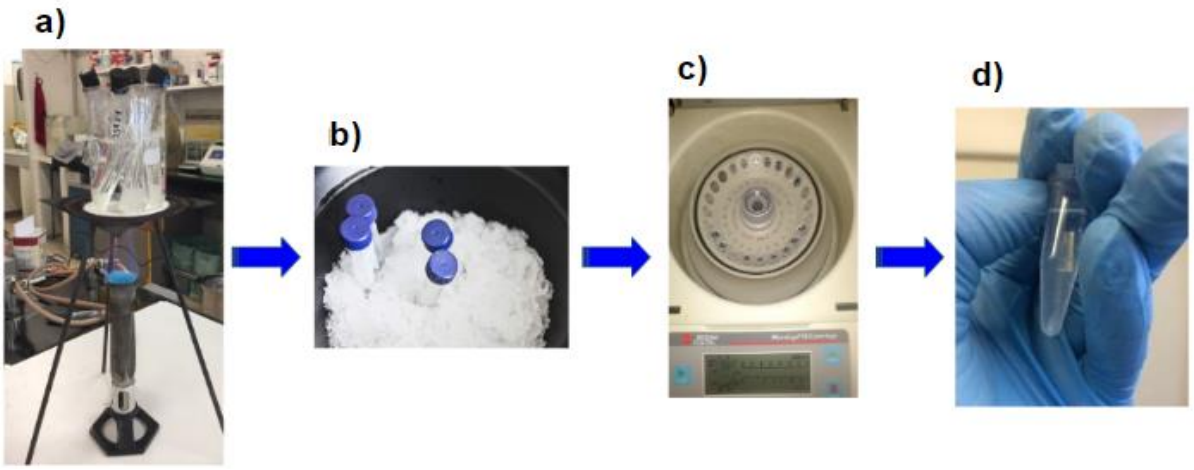

Figura 18. Metodología para la extracción de ADN bacteriano. a) punto de ebullición; b) enfriamiento en hielo de las muestras; c) máquina de centrifugado para muestras; d)recolección de sobrenadante de las muestras.

➢ Identificación por amplificación de genes

Las cepas aisladas como *Staphylococcus aureus* se sometieron a identificación de marcadores cromosómicos: *spaX* y RNA23S; utilizando para esto la técnica de PCR de punto final. Se preparó una mezcla de reacción (MIX), que contenía un volumen de 10µL TAQ polimerasa, 1µL primer F, 1µL primer R, 5µL agua libre de nucleasas, 3µL de

DNA de cada muestra, dando un total de 20µL por tubo. Cada una de las muestras preparadas se colocó en el termociclador en los programas y tiempos como lo indica Nashev y colaboradores en 2004.

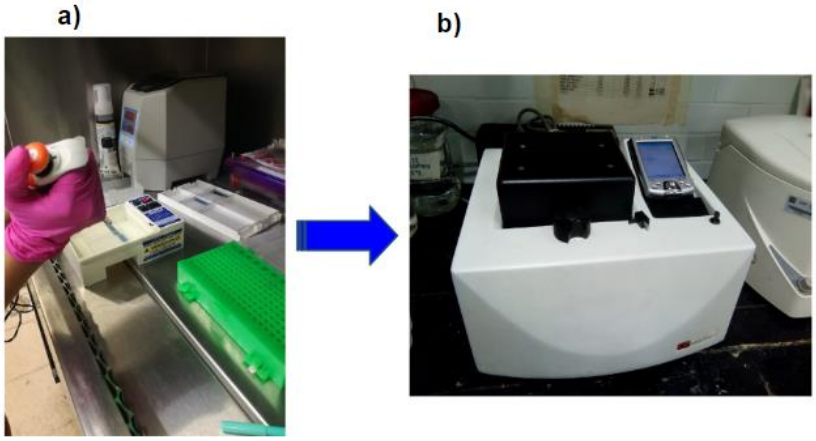

Figura 19. Preparación del Mix de las muestras (a) y posteriormente programación en Termociclador con tiempos señalados para PCR (b).

➢ Identificación de adhesinas como factores de virulencia

Para la identificación del grupo de adhesinas presentes en especies de *S. aureus*, se sometieron nuevamente por el mismo proceso de amplificación de genes en PCR de punto final. Las condiciones y programas se obtuvieron de Nashev y colaboradores en 2004 (Tabla 3). El proceso siguió en el mismo orden, preparando el mix que contenía un volumen total de 20µL (10µL TAQ polimerasa, 1µL primer F, 1µL primer R, 5µL agua libre de nucleasas, 3µL de DNA de cada muestra).

Tabla 3. Condiciones para PCR de cada una de las adhesinas.

Gen	Tamaño	Programa	Autor
spa X	polimórfico	95 °C durante 5 min; 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min; 72 °C durante 3 min; y una retención final a 4 °C por 2 min.	Nashev, D. et al. (2004)
23S rRNA	1250 pb	95 °C durante 5 min; 37 ciclos de 94 °C por 40 seg, 64°C por 1 min y 72 °C por 75 seg; 72 °C durante 3 min; y una retención final a 4 °C por 2 min.	
fnb A	1279 pb	95 °C durante 5 min; 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min; 72 °C durante 8 min; y una retención final a 4 °C por 2 min.	Campbell, S.J. et al. (2008)
fnb B	812 pb		
clf A	polimórfico	95°C durante 5 min; 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 57°C por 1 min y 72 °C por 1 min; 72 °C durante 8 min; y una retención final a 4°C por 2 min.	
clf B	404 pb	95 ° C durante 15 min; 32 ciclos de 95 ° C por 1 min, 60 ° C por 1.3 min y 72 ° C por 1 min; 72 ° C durante 10 min; y una retención final a 4 ° C.	
cna	452 pb		
bbp	500 pb		
epbS	550 pb		
map/eap	655 pb		
sdr C	731 pb		
sdr D	467 pb		
sdr E	894 pb		

➢ Análisis de los amplicones en geles de agarosa

Una vez obtenidos los productos de la PCR se procedió a correr una electroforesis de geles de agarosa al 0.8 y 2% según el tamaño de cada uno. Para la preparación de agarosa se utilizó 100 mL de TBE (tris base, ácido bórico y EDTA a ph 8.0) y 0.2µL de Midori Green (BIORAD) para la tinción del DNA. Las condiciones para la corrida fueron de 100 voltios y en dirección de negativo a positivo dada la naturaleza de las moléculas. Los geles se visualizaron en el equipo, utilizando el software Kodak Digital Science y luz UV para observar y comparar el tamaño de los amplicones, usando un marcador de 200 pb y uno de 100 pb respectivamente para los genes correspondientes a 23rRNA y SpaX así como para las adhesinas.

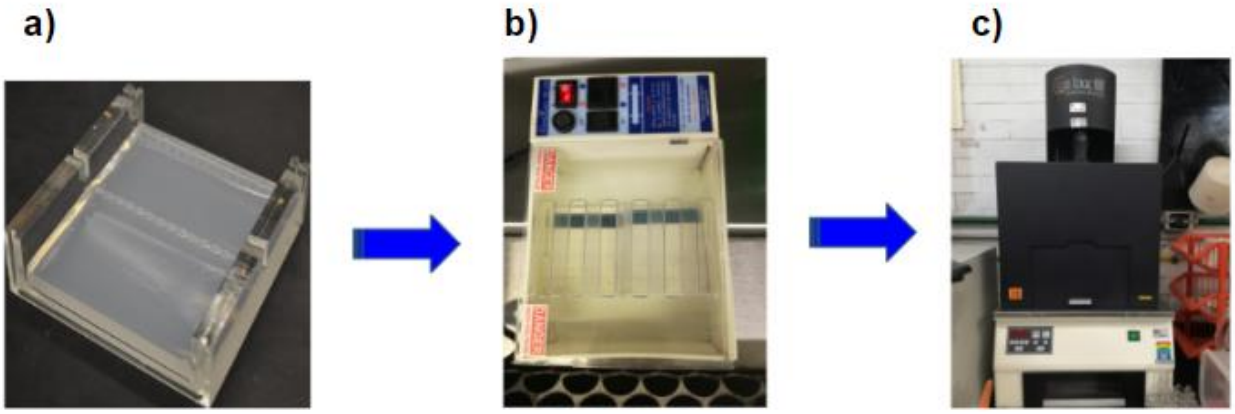

Figura 20. Carga de muestras en gel solidificado de agarosa(a) para correr en caja de electroforesis (b) y posteriormente observar amplicones en el equipo de cámara, utilizando el software Kodak Digital Science y luz UV (c).

- Prueba de antibióticos por técnica Kirby-Bauer

Se evaluó la resistencia a antibióticos realizando la prueba del antibiograma a cada una de las cepas identificadas. Se utilizó la técnica de Kirby-Bauer y posteriormente se inoculó en agar de Mueller-Hinton. Se introdujo la punta de un hisopo estéril al tubo que contenía el inóculo, deslizando por toda el área procurando hacer un tapiz sobre toda la caja petri, se prosiguió a tomar un sensidisco de la marca "Sanofi, diagnostic Pasteur" (imagen 18 "a") que porta los 12 antibióticos (imagen 18 "b") y con el apoyo de una pinza estéril se colocó sobre el tapizado que se hizo previamente en la placa de agar de Mueller-Hinton. Nuevamente se incubó durante 24 horas a 37°C. Se pudieron clasificar las cepas como sensibles o resistentes conforme al halo formado por el antibiótico, tomando en cuenta los datos y medidas que señala la propia marca. Una vez realizadas y terminadas las pruebas bioquímicas se guardaron las cepas en viales para conservarlas. Se les agregó glicerol y se guardaron en refrigeración.

a)

Clave	antibiótico
AM	Ampicilina
CF	Cefalotina
CFX	Cefotaxima
DC	Dicloxacilina
CPF	Ciprofloxacina
GE	Gentamicina
CL	Cloranfenicol
E	Eritromicina
SXT	Sulfametoxazol trimetropim
PE	Penicilina
VA	Vancomicina
TE	Tetraciclina

b)

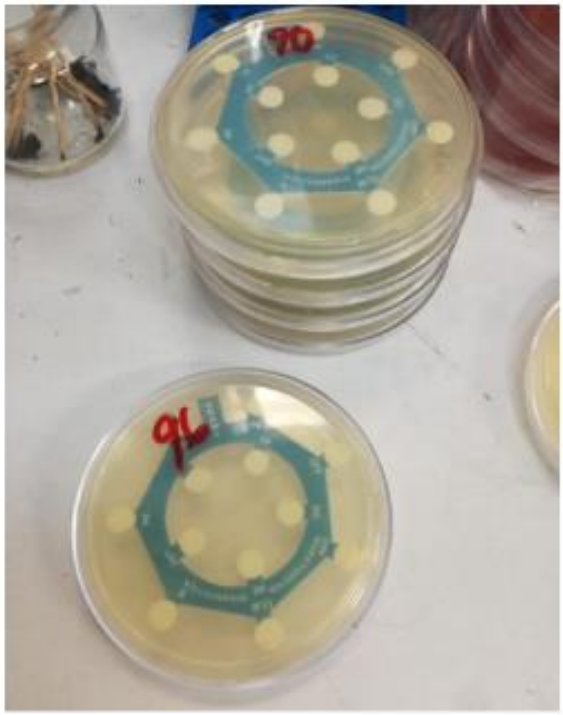

Figura 21. Lista de los 12 antibióticos contenidos en el sensidisco de la marca "Sanofi, diagnostic Pasteur" probados en cada cepa aislada de *S. aureus.*

- Evaluación por formación de biopelícula.

Para la evaluación de biopelícula en las cepas, se optó por dos métodos:

Evaluación cualitativa: Las cepas fueron sembradas en placas de Agar Rojo Congo (3 g de Caldo de Soya y Tripticasa "TSB", 2 g de glucosa y 2 g de NaCl por cada 100 mL) basado en el medio preparado por Freeman et al. (1989). Las cepas se incubaron por 24 horas a 37°C. Como referencia para la obtención de datos se utilizaron las cepas ATCC35984 y ATCC12228. Se interpreta como cepas productoras de biopelícula aquellas que tengan un color oscuro con tintes negros a rojos quemados muy oscuros, mientras que las cepas con tintes rojos/rosas son descartadas como formadoras de biopelícula.

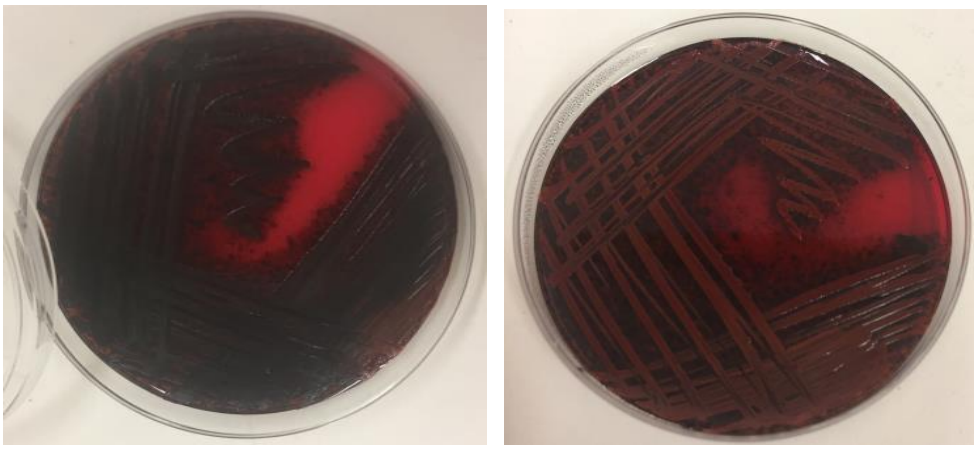

Figura 22. Crecimiento de colonias bacterianas sembradas en placas de agar Rojo Congo.

Evaluación cuantitativa: Para determinar la capacidad de formación de biopelícula se usaron placas de micro título de poliestireno. Se realizaron diluciones de las muestras 1:100 en BHI con 2% de glucosa y 2% de NaCl, se tomaron alícuotas de 200µL de esta suspensión y se colocó en cada uno de los pozos de la placa (180µL de BHI y 20µL del preparado BHI+bacteria) , únicamente en el blanco de la prueba se colocó 200µL de BHI para posteriormente incubar por 24 horas a 37°C según indica Mortero et al. Pasado el tiempo indicado se midió la absorbancia a 630 nm. De manera consecutiva se procedió al lavado de la placa con 200µL de agua peptonada (agua salina con 0.1% de peptona) por 3 veces y así remover bacterias no adheridas. Para la fijación se colocó en cada uno de los pozos 200µL de metanol por 15 min. Posteriormente se removió todo el metanol y se agregó 200µL de colorante azul violeta por 15 min más, después de ese lapso se agregó ácido acético al 30%, siguiendo con los 200 µL por pozo. Posteriormente, llegada la parte de las diluciones, se tomó una placa de 96 pozos, en donde se colocaron 180µL de a. acético puro y 20µL del a. acético fijado de cada pozo de la primera placa trabajada. Finalmente la lectura y cuantificación de la biopelícula se realizó por medición de absorbancia a 492 nanómetros.

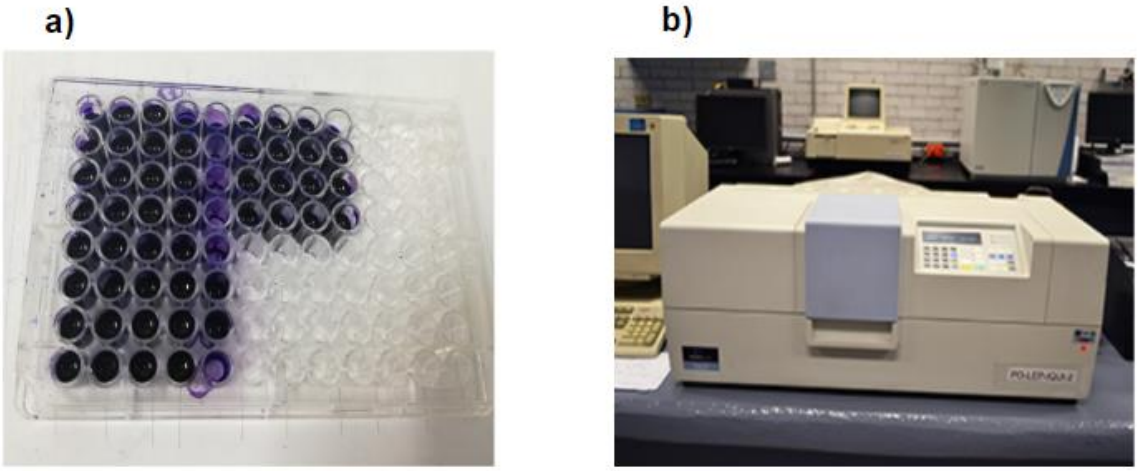

Figura 23. (a) Carga de muestras en placa de microtitulación; (b) Equipo de espectrofotometría para lectura de absorbancia.

Resultados

- Población analizada

Se analizaron un total de 96 estudiantes de la FESI, con salud bucal sana en su totalidad (n=96). De estos 35% pertenecen al sexo masculino (34 muestras) y el restante a mujeres 64% (62 muestras).

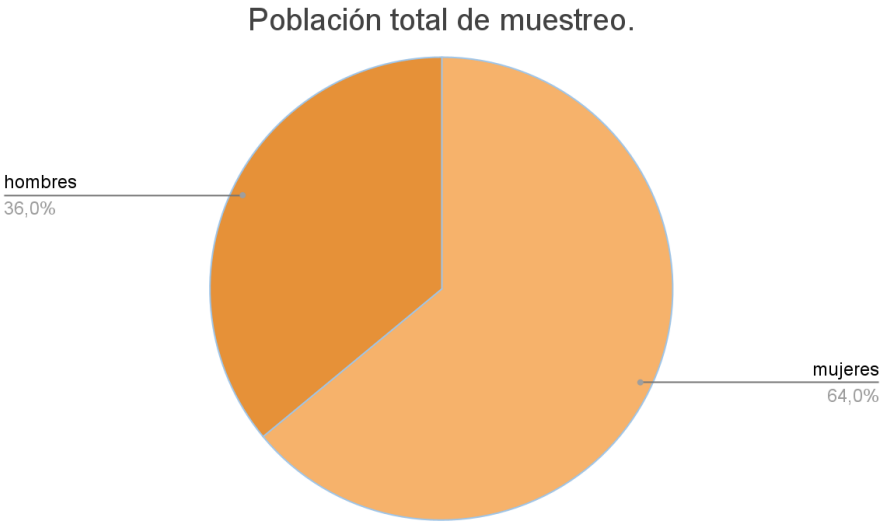

Gráfico 1. Porcentaje del total de hombres y mujeres que participaron en el estudio.

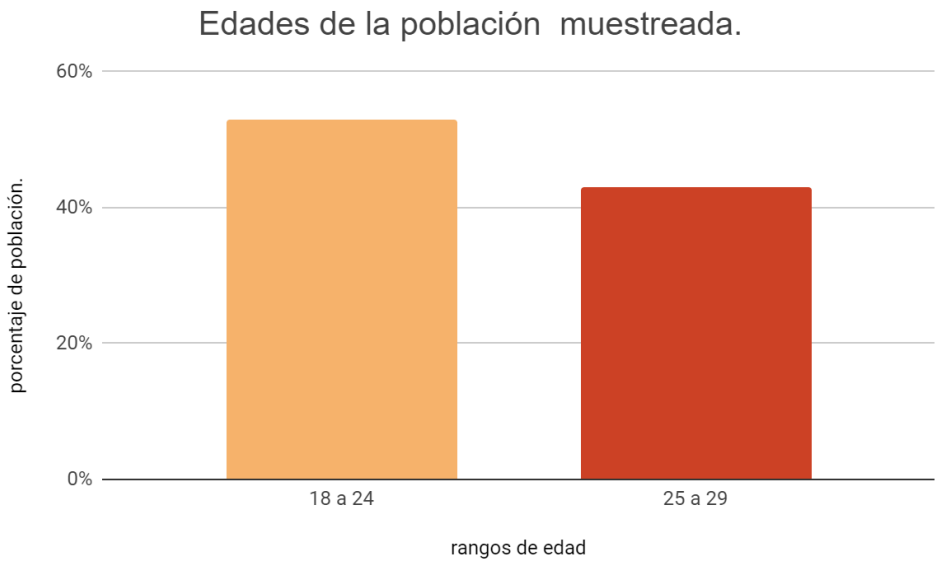

Gráfico 2. Porcentaje del total de población divididas en rangos de edad.

- Identificación bioquímica de muestras.

A partir de las 96 muestras recabadas para el estudio, se identificaron 19 cepas (18%) que lograron crecer en el medio selectivo S-110, postulándose como candidatas a *S. aureus* y caracterizadas por su morfología colonial. A estas 19 cepas se les aplicó la prueba de manitol dando como resultado positivo el 100% de ellas (n=19). Por otro lado, en la prueba de coagulasa positiva se obtuvieron un total de 84% (n=16) como positivas para corroborarse como *S. aureus.*

- Identificación molecular de muestras.

Se tomaron como referencia las 19 cepas que resultaron positivas en las pruebas morfológicas y bioquímicas anteriormente mencionadas para poder identificar por pruebas moleculares. Se realizó la amplificación de los genes *23rRNA (*1250 pb*)* y *SpaX* (tamaño polimórfico) para reconocer su presencia en las 19 cepas, dando como

resultado que solo 10 cepas (9.6%) presentaron dichos genes e identificarse como de *Staphylococcus aureus.*

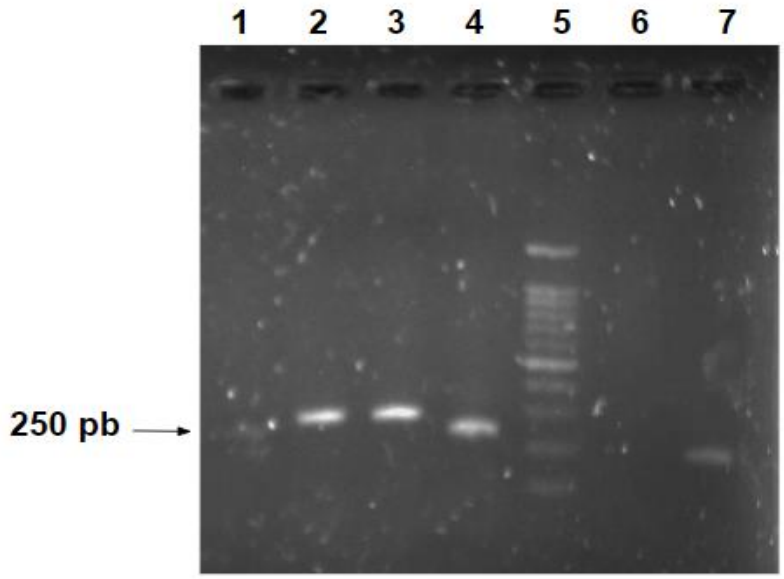

Figura 24. Identificación por PCR de punto final del gen *Spa*: Carril 1 a 3 (amplicón de 1000 bp) en cepas de *S. aure*us aisladas de estudiantes sanos; Carril 9-Marcador de peso molecular 100pb; Carril 10-Control negativo (*S. epidermidis*); Carril 11-Control positivo (*S. aureus*).

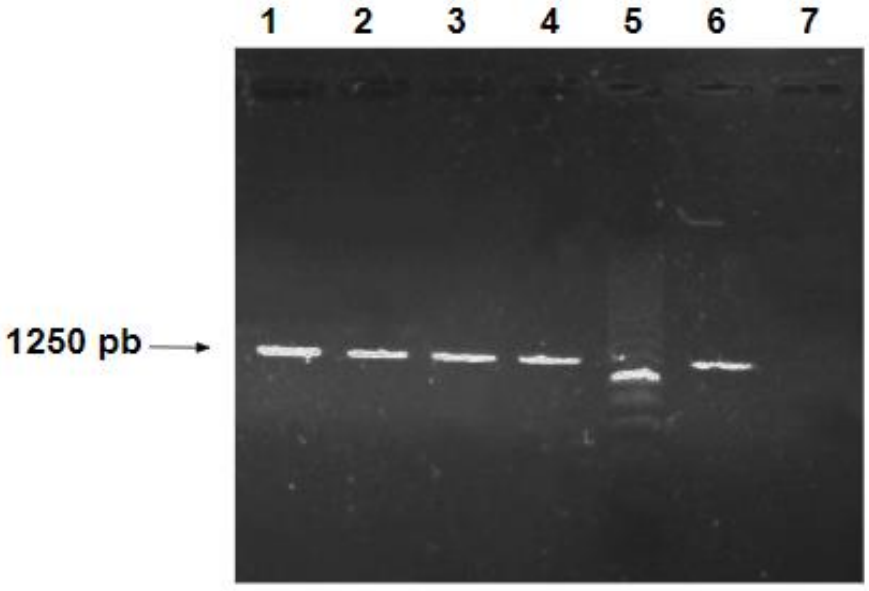

Figura 25. Identificación por PCR de punto final del gen *rRNA* en *S. aureus*: Carril 1 a 8 (amplicón de 1250 bp) en cepas de S. aureus aisladas de estudiantes sanos; Carril 9-Marcador de peso molecular 200pb; Carril 10-Control negativo(*S. epidermidis*); Carril 11-Control positivo (*S. aureus*).

❖ Identificación de adhesinas

Nuevamente, mediante PCR de punto final se identificaron los genes de adhesinas presentes en cada una de las 10 cepas que resultaron positivas para Spax y rRNA. Las frecuencias obtenidas fueron las siguientes: el 100% (n=10) de las cepas seleccionadas presentaron los genes clfA, clfB, ebpS y sdrD; los genes fnbA y cna con el 70% (n=7); sdrC con el 60% (n=6); sdrE con 40% (n=4); FnbB y map/eap con el 40% (n=30) y por último el gen bbp que no se expresó en ninguna de las cepas aisladas de encías sanas.

Tabla 3. Frecuencias obtenidas en la identificación de genes presentes en cada muestra.

Adhesinas	Frecuencia	
	n=10	%
fnbA	7	70%
fnbB	3	30%
clfA	10	100%
clfB	10	100%
cna	7	70%
map/eap	3	30%
ebpS	10	100%
sdrC	6	60%
sdrD	10	100%
sdrE	4	40%
bbp	0	0%
spa	10	100%

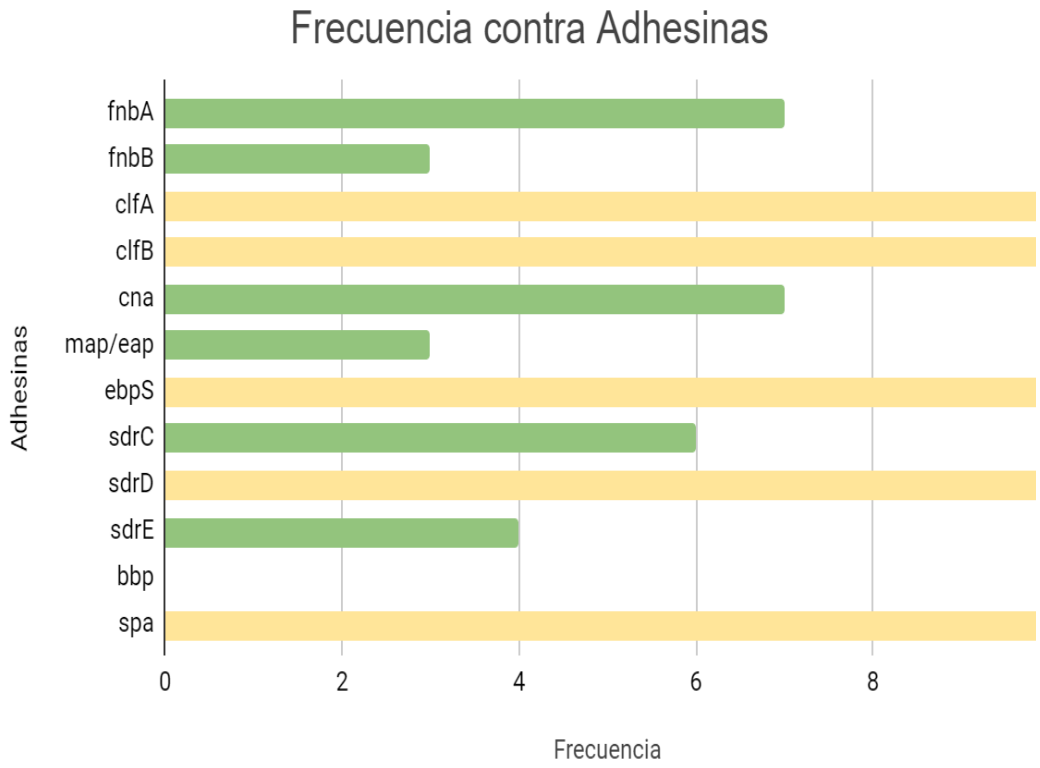

Gráfico 3. Frecuencia obtenidas en la identificación de adhesinas presentes en las muestras de S. *aureus* (n=10) .

- Prueba de antibióticos

En esta prueba de antibiograma se observó de manera general que el 100% de las cepas (n=10) mostraron resistencia a los 12 antibióticos presentes en el sensidisco cargado de antibióticos.

- Evaluación en la formación de biopelícula.

Se obtuvo un 70% (n=7) de cepas formadoras de biopelícula por el método cualitativo (agar Rojo Congo), mientras que en el método cuantitativo (cristal violeta) se obtuvo que 80% (n=8) de las cepas fueron formadoras de biopelícula, en ellas se pueden reconocer tres niveles de formación: formadoras moderadas, medias formadoras y altas formadoras (Gráfica 4).

Tabla 4. Frecuencias obtenidas para la formación de biopelícula en cada una de las técnicas evaluadas.

	ROJO CONGO					CRISTAL VIOLETA				
Diagnóstico	Formadoras de biopelícula		No formadoras de biopelícula		Total (n=10)	Formadoras de biopelícula		No formadoras de biopelícula		Total (n=10)
	No.	(%)	No.	(%)	No. (%)	No.	(%)	No.	(%)	No. (%)
ENCIAS DE INDIVIDUOS SANOS	7	70%	3	30%	100%	8	80%	2	20%	100%

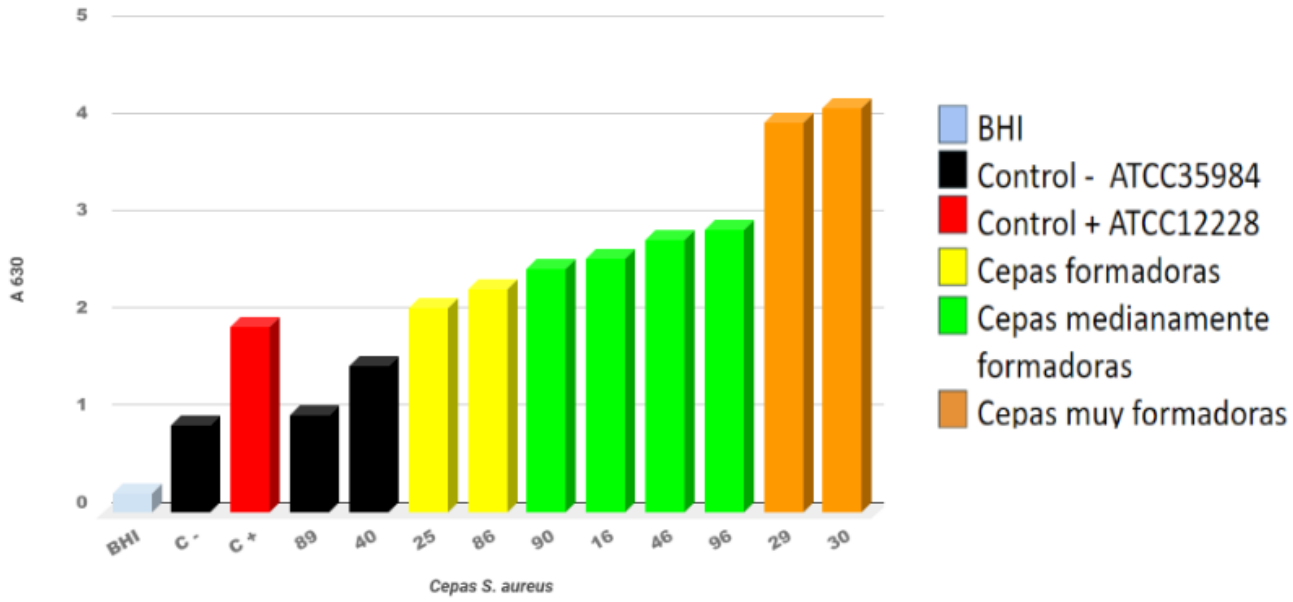

Gráfico 4. Evaluación de la formación de biopelículas según su absorbancia, en los aislados de *S. aureus* (Amarillas: formadoras, Verde: medianamente formadoras y Naranjas: muy formadoras).

Discusión

- ✧ Población estudiada.

En este estudio se analizaron 96 estudiantes que fueron evaluados como bucalmente sanos (sin presencia de síntomas de infección periodontal) que acudieron a la toma de muestras en el laboratorio de genética de la Unidad de Morfología y Función de la FES Iztacala. En cuanto a los porcentajes por sexo, 63% fueron mujeres y 37% hombres, el hecho de que el sexo femenino sea predominante en el muestreo puede deberse a que las mujeres muestran mayor interés por el cuidado de su salud bucal y su aspecto en general, la mayoría de los hombres no suelen buscar atención dental preventiva y son más propensos a descuidar su salud bucal. Información dada por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, señalan que los hombres en promedio suelen consultar menos a un dentista y que en promedio son más propenso a contraer alguna enfermedad de las encías (11% de los hombres contra 6% de las mujeres) según el Instituto Nacional de Investigación Dental y Craneofacial. En Cuanto a la edad poblacional de la cohorte muestreada el rango de edad en promedio fue de 18-24 años con el 53% , seguido de las edades entre 25-30 años con el 44%, mismos datos pueden encontrarse relacionados con la matrícula e ingreso de estudiantes a la facultad donde señala mayor población de mujeres y en general edades entre 20-25 años. (Memorias, UNAM. 2020).

En la actualidad el reporte y estudios realizados con *Staphylococcus aureus* presentes en poblaciones sanas y limitadas a comunidad estudiantil es muy bajo. Entre la literatura encontrada, trabajos como el de Ohara-Nemoto y su equipo en 2008, examinaron la presencia de estafilococos en la cavidad oral de personas sanas, delimitado su estudio a muestras salivales y de la placa supragingival de 47 personas sanas. El rango de edad en su estudio poblacional fue entre 22 y 43 años de edad, ellos confirmaron la

presencia de *Staphylococcus aureus* siendo la especie más frecuente con 46.4% en saliva y quedando en segundo lugar en la placa con presencia de 33.9%, esto debido a que la especie *S. epidermidis* fue más dominante en ese nicho bucal (60.7 %). Para 2010 otro trabajo que encontramos relacionado fue el de Hamdan-Partida y su equipo que estudiaron la presencia de *S. aureus*, tomando muestras de la garganta y fosas nasales como origen de estudio. Ellos reportaron como población de muestreo a 1243 voluntarios sanos de una comunidad mexicana, los rangos de edad fueron de 1 a 96 años, con una media de 21 años, 54% fueron mujeres y 46% eran hombres, en sus resultados el porcentaje de portadores de *S. aureus* fue del 59.8% general, mientras que la colonización específica en garganta fue de 46.5% y fosas nasales del 37.1%. Por último y siendo uno de los estudios más recientes, Hamdan y Gonzales en 2020 estudiaron la incidencia en adultos jóvenes portadores de *S. aureus*. Su cohorte fue de 16 estudiantes de décimo trimestre de la carrera de QFB de la Universidad Autónoma de México, unidad Xochimilco y su edad estaba entre los 21 a 32 años; ellos reportaron que 11 de los 16 estudiantes salieron positivo en la presencia de la *S. aureus* (68%) mientras que solo 5 estudiantes (31%) salieron negativos para la presencia de dicho patógeno. En sus resultados resaltan que la mayor prevalencia de *S. aureus* se encuentra en la faringe con 28% en promedio seguido del área nasal con 25% promedio y esto nos permite relacionar la colonización y movimiento de este oportunista para otros nichos de la cavidad oral , como puede ser el área de las encías.

Nuestro trabajo llega como una aportación más en el área de estudio para el reconocimiento y portación de *S. aureus* en el área bucal, limitándose al área de las encías sanas. Siendo realizado en 2019, nuestro muestreo fue formado por una cohorte de 96 estudiantes con encías sanas, en los cuales se confirmó la presencia de *S. aureus* en 9 personas (9.6%). Se infiere que el bajo porcentaje obtenido se deba a que la cohorte tomada de la población de estudiantes es pequeña en relación con la comunidad general y que los datos puedan ser exponenciales si creciera la población

muestreada. Otra variable que puede influir notablemente en el porcentaje de presencia de *S. aureus* es que las muestras fueron tomadas de una comunidad estudiantil aislada del área de salud y no tienen relación directa con la manipulación o acercamiento a este patógeno oportunista a diferencia del área médica y que tiene relación directa con personas contagiadas, es por ello que se puede ver más comprometida la portación de *S. aureus* y su frecuencia en estas poblaciones. Por último y resaltando como aporte, nuestro trabajo comprende el origen de las muestras como su nicho específico en encías, ya que la mayoría de los estudios se concentran en narinas y garganta siendo las áreas más estudiadas por la comunidad médica dejando abierta la línea de investigación para otros nichos de la cavidad oral.

- ✧ Identificación de *Staphylococcus aureus* por pruebas bioquímicas y moleculares

Las cepas obtenidas y aisladas en el presente estudio, fueron postuladas como *S. aureus* por su crecimiento en agar S110, medio selectivo especialmente para la especie como lo refiere Zendejas-Manzano y colaboradores (2014) en su artículo "Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación". Estas mismas se sometieron a pruebas de Manitol y coagulasa +. Comprobamos la presencia de *S. aureus* en 10 muestras gracias a la amplificación de genes como *23rRNA* y el gen *spaX,* siendo genes específicos como lo señalan Nashev y colaboradores en 2004, usando estos amplicones como regiones específicas de *S. aureus* y su relación con factores de virulencia. En este estudio la frecuencia obtenida de aislados de *S. aureus* fue del 9.6% de portadores clínicamente sanos aproximándose al mismo porcentaje que obtuvieron del estudio de Márquez-Oviedo, et. al. en 2021, donde incluyeron 64 individuos a quienes se tomaron muestras de mucosa oral, mucosa nasal y de manos y obtuvieron una frecuencia de presencia de *S. aureus* del 7.8%, 15.6% y 50.0% respectivamente. En comparación con nuestros resultados, los porcentajes que obtuvimos en portadores de *S. aureus* en encías sanas (9.6%) entra en los rangos de porcentajes reportados por

Márquez en el área de mucosa oral y nasal. Por otro lado, la diferencia que se ve en comparación con el 50% reportado en manos se debe a la naturaleza de la muestra, ya que son las manos quienes tienen el mayor contacto con el exterior y las áreas físicas donde el individuo puede moverse e interactuar con más microorganismos existentes.

- ✧ Identificación de Adhesinas y sus genes de virulencia

En este trabajo se identificó la expresión de genes que corresponden a las adhesinas en cada una de las cepas identificadas por PCR (n=10). Los genes tipificados fueron: *clfA, clfB, fnbA ,fnbB, cna, sdrC, sdrD, sdrE, ebpS, bbp* y *map/eap*. La presencia de estas adhesinas son un indicador característico del *S. aureus* y su importancia radica en la unión a las proteínas de la matriz extracelular del huésped o a los componentes del suero. A las adhesinas asociadas a la superficie de la bacteria se les denomina MSCRAMM (componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva) , mientras que los SERAM son moléculas adhesivas de repertorio secretables y son liberadas en el sobrenadante o exterior de la bacteria. Ambos grupos de proteínas son importantes para la colonización de *S. aureus* en el hospedero y la evasión del sistema inmune (Hauck y Ohlsen,2006).

Las frecuencias obtenidas en el presente estudio fueron las siguientes: 100% (n=10) presentaron los genes *clfA, clfB, ebpS y sdrD*; los genes *fnbA* y *cna* con el 70% (n=7); *sdrC* con el 60% (n=6); *sdrE* con 40% (n=4); *FnbB* y *map/eap* con el 40% (n=30) mientras que el gen *bbp* no se logró reconocer en ninguna de las cepas aisladas de encías sanas. El poder identificar la presencia de estas proteínas es esencial ya que discrimina a *S. aureus* de las demás especies. En 2016 se realizó un trabajo por Cruz-Martínez en donde analizaron la presencia de estas proteínas de adhesión (Eno, Ebps, FnbA, FnbB, ClfA, ClfB, Bbp, y Cna) coincidiendo con nuestros resultados en un 100% con los genes: *ebps,*

clfA, clfB; por otro lado, los genes *fnbA, fnbB, fib,* y *bbp* tuvieron una distribución variable en sus muestras, caso que coincide en este estudio y los porcentajes obtenidos, mientras que para nuestras cepas no se reportó en ninguna de las cepas la proteína Bbp.

- ✧ Resistencia antibiótica

Comparando los resultados de la prueba de resistencia a antibióticos, estudios previos como el de Navarro-Navarro y colaboradores en 2008 reportaron la resistencia ante algunos antibióticos como: ampicilina con (91.2%), lincomicina (54.1%) y eritromicina (43.5%) y con menor porcentaje de resistencia lo presentó la meticilina (1.1%) y la vancomicina con 0%. Por otro lado, encontramos un trabajo más: Arteaga-Delgado y colaboradores en 2015 reportaron en su estudio una resistencia de *S. aureus* a la ampicilina con el (76.2 %), cefalexina (68.3%), ciprofloxacina (17.5%), eritromicina (55.6%) , tetraciclina (31.7%) y gentamicina (28.65%). Para años más cercanos, en 2021 se realizó un estudio en muestras de jóvenes sanos en Perú. Realizado por Márquez-Oviedo y su equipo, ellos reportaron una prevalencia de sensibilidad menor a la eritromicina (40%) y a la penicilina (11%). Comparando con nuestro trabajo y los tres anteriores mencionados, se sigue confirmando la capacidad de resistencia de *S. aureus* ante la ampicilina con los porcentajes más altos, seguido de la Eritromicina. En contraste con la bibliografía consultada, el presente estudio obtuvo el 100% de resistencia a todos los antibióticos aplicados en las 10 cepas, parte de esta respuesta se puede deber a que *Staphylococcus aureus* y varias especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa se caracterizan por ser resistentes a la meticilina, lo que a su vez, les confiere resistencia a varios antibióticos β-lactámicos y dificulta enormemente su erradicación. En la actualidad las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes y multirresistentes, estas cepas se muestran como respuesta a una presión selectiva

formada por la terapia antimicrobiana así como el proceso evolutivo que han adquirido como especie y en el cual han adaptado características que provienen de una acumulación e intercambio de elementos genéticos móviles como son plásmidos y transposones (Velázquez, 2005). Otra posible respuesta a la resistencia que muestra *S. aureus* a los antibióticos puede estar relacionada a la tasa de crecimiento, pues estudios como el de Anwar y colaboradores en 1992 nos explican cómo es que las bacterias asociadas a una biopelícula madura tienden a tener un crecimiento más lento dando como resultado una absorción más lenta del tratamiento antibiótico para finalmente ser rechazado y resultar en una terapia fallida. En general, podemos decir que la resistencia a los antibióticos sometidos se debe a la mala penetración de estos fármacos a través de la barrera física de la biopelícula o la creación de zonas ácidas y anóxicas por la actividad metabólica bacteriana, ayudando a la degradación de las moléculas de antibiótico (McConoughey SJ, et al. 2014). Por otro lado debemos considerar las adquisiciones en un contexto social, pues en México el control y compra de medicamentos con receta es bajo, como resultado la población ha abusado del consumo de antibióticos y la autoprescripción se ha convertido en una práctica común aún no medida entre la población, contribuyendo al aumento de las tasas de resistencia. Todo ello junto a otros factores como la calidad de vida y características genéticas de cada habitante en las ciudades superpobladas crean entornos idóneos para seleccionar, intercambiar y mantener rasgos de resistencia haciendo más fuerte a especies como *S. aureus* (Amaible, C. 2010).

- ✧ Evaluación de la formación de biopelícula.

En este trabajo utilizamos la prueba en agar Rojo Congo para determinar la formación de biopelícula (método cualitativo) obteniendo el 70% positivo para cepas formadoras. Posteriormente se aplicó la prueba por método cuantitativo (adhesión a placas de micro título de poliestireno) en donde se obtuvo que el 80% de las cepas fueron formadoras de biopelícula. Estos Resultados son muy cercanos a lo que reportó Cetina-

Cordero en su Tesis del 2011, abordando los mismos métodos de evaluación y con una cohorte de 55 muestras , obteniendo un 71% de cepas (n=39) formadoras de biopelícula en agar rojo y un 73% (n=40) en la prueba de adhesión a la placa de microtitulación. Estos porcentajes los encontramos significativamente altos y dan una relación estrecha con los resultados obtenidos en la prueba de antibióticos (100% resistentes) ya que al presentar esta formación de biopelícula nuestra bacteria adquiere esta protección y resistencia a los tratamientos antimicrobianos y finalmente alojando posibles infecciones persistentes y dando resultados negativos para los tratamientos , con ello confirmamos la carga de virulencia que tienen las bacterias aún provengan de portadores sanos o asintomáticos, dando lugar a *S. aureus* para que logre el proceso infeccioso o simplemente colonizar al hospedero, todo ello jugando en su papel de comensal/ patógeno oportunista esperando cualquier vulnerabilidad del hospedero para ser activado y predisponer en presencia de algún proceso infeccioso que se presente.

En datos dados por Institutos Nacionales de Salud, se tiene que aproximadamente el 80% de las infecciones bacterianas humanas son producidas por microorganismos asociados a biopelículas (Römling y Balsalobre, 2012). Las bacterias formadoras de biopelícula, tienen gran interés clínico porque responden escasamente a los tratamientos con antibióticos y pueden derivar en enfermedades infecciosas crónicas. La caries, la gingivitis y la periodontitis son enfermedades bucales que mantienen una asociación directa con las bacterias formadoras de biopelículas y los principales microorganismos relacionados con estas infecciones son *Staphylococcus epidermidis*, cocos gram positivos, bacterias anaerobias gram negativas, algunas especies de hongos del género *Candida y Aspergillus* y por su puesto *Staphylococcus aureus* (Lasa I. et al. 2005)

Conclusiones

- En el presente estudio se logró identificar a *Staphylococcus aureus* en muestras de estudiantes sanos y asintomáticos.

- Se identificó a *S. aureus* por amplificación de los genes spaX y 23rRNA en el 9.6% (n=10) de las encías de estudiantes sanos muestreados.

- Se demostró la presencia en el 100% de las cepas (n=10) de los genes de virulencia clfA, clfB, ebpS y sdrD.

- Todas las cepas presentaron resistencia a la prueba de antibióticos demostrando su potencial reservorio como patógeno infeccioso.

- Se confirma la capacidad de *S. aureus* para producir biopelícula como factor de virulencia actuando como protección y diseminación dentro del hospedero.

- No se encontraron estudios en poblaciones estudiantiles sanas delimitados al área de encías, quedando como nuevo aporte el presente estudio en Cdmx y Edo. de México.

Bibliografía

1. Aas J. A., Paster B. J., Stokes L. N., Olsen I., Dewhirst F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiol. 43(11): 5721-32.

2. Ajayi C., Alberg E., Askarian F., Sollid, J., Johannessen M., Hanssen A. (2018). Genetic variability in the *sdrD* gene in *Staphylococcus aureus* from healthy nasal carriers. BMC Microbiology. 18:34.

3. Amabile-Cuevas C. (2010). Resistencia a los antibióticos en México: una breve reseña del estado actual y sus causas. *La revista de infección en los países en desarrollo*. *4(*03): 126–131.

4. Anwar H., Correa J. L., Costerton J. W. (1992). Susceptibilidad de las células de biopelícula de Pseudomonas aeruginosa a las acciones bactericidas de la sangre total y el suero. *Microbiol FEMS. 71:* 235–241.

5. Aparna M. S. y Yadav, S. (2008). Biofilms: microbes and disease. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, *12*(6): 526–530.

6. Archer N. K., Mazaitis M. J., Costerton J. W., Leid J. G., Powers M. E., Shirtliff M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms. Virulence 5: 445-459.

7. Arciola C. R., Campoccia D., Ravaioli S. y Montanaro L. (2015). Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. *5(*7).

8. Arteaga-Delgado L. C., Espinosa-López Y., Chávez-Vivas M. (2015). Prevalencia de Staphylococcus aureus que coloniza el personal de salud de un hospital de la ciudad de Cali. Revista Ciencias de la Salud. 14 (1).

9. Baehni P. C. (2003). Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. Oral Diseases. 9:23-9.

10. Botero L. E., Delgado-Serrano L., Cepeda M. L., Del Portillo-Obando P. y Zambrano M. (2016). La microbiota humana: el papel de las comunidades microbianas en la salud y enfermedad. acta biológica colombiana. *21* (1), 5-15.

11. Bustos-Martínez J. A., Hamdan-Partida A., Gutiérrez-Cárdenas M. (2006). Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed. 17:287-305.

12. Campoccia D., Speziale P., Ravaioli S. (2009). The presence of both bone sialoprotein-binding protein gene and collagen adhesin gene as a typical virulence trait of the major epidemic cluster in isolates from orthopedic implant infections. Biomaterials. 30: 6621–6628.

13. Castellano González M. J. y Perozo-Mena A. J. (2010). Mecanismos de resistencia a antibióticos β-lactámicos en Staphylococcus aureus. *Kasmera*. *38*(1): 18-35.

14. Cervantes-García E., García-González R., Salazar-Schettino P. M. (2014). Características generales de Staphylococcus aureus. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio. 61(1): 28-40.

15. Chatterjee S. S., Otto M. (2013). Improved understanding of factors driving methicillin-resistant Staphylococcus aureus epidemic waves. Clin Epidemiol. 5:205-217.

16. Cheung G. Y. C., Bae J. S. y Otto M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*.*12*(1): 547–569.

17. Colsa-Ranero A. (2011). Staphylococcus aureus: De la genómica a la clínica. Rev Enf Infec Pediatr. 24(95): 91-94. REVISAR EL AÑO

18. Cruz-Martínez S., Tapia-Pastrana G., Castañón-Sánchez C. A. (2016). Distribución de genes de adhesión y regulación de biofilm en Staphylococcus aureus. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. *50*(4): 713-720.

19. DeLeo F. R., Chambers H. F. (2009). Reemergence of antibiotic-resistant Staphylococcus aureus in the genomics era. J Clin Invest. 119 :2464-2474.

20. Dotto C. M. (2017). Adaptabilidad de Staphylococcus aureus frente a señales microambientales. Impacto sobre la formación de biopelícula. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

21. Downer R., Roche F., Park P. W., Mecham R. P. y Foster T. J. (2002). The elastin-binding protein of Staphylococcus aureus (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *The Journal of biological chemistry*. *277*(1). 243–250.

22. Foster T. (1996). Staphylococcus. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology*. (4th ed.). University of Texas Medical Branch at Galveston.

23. Foster T., McDevitt D. (1994). Surface-associated proteins of Staphylococcus aureus: their possible roles in virulence. FEMS Microbiol Lett. 118: 199-205.

24. Foster T. (2017). Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects. FEMS Microbiology Reviews, 41(3), 430-449.

25. Gómez-García A., López-Vidal, Y. y Aguirre-García, M. (2022). Microbioma oral: variabilidad entre regiones y poblaciones. Revista de la Facultad de Medicina (México), 65(5), 8-19. Epub 20 de enero de 2023

26. Götz F., Bannerman T. y Schleifer K. H. (2006). The generation Staphylococcus and Macrococcus In The Prokaryotes. pp. 5–75.

27. Grundmann H., Aires-de-Sousa M., Boyce J. y Tiemersma E. (2006). Emergence and resurgence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat. Lancet 368: 874-885.

28. Hamdan-Partida A., González-García S. (2020). Proyecto de servicio social: detección de adultos jóvenes portadores de Staphylococcus aureus. División de ciencias biológicas y de la salud lic. química farmacéutica biológica.

29. Hamdan-Partida A., Sainz-Espuñes T. y Bustos-Martínez J. (2010). Characterization and persistence of Staphylococcus aureus strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. J Clin Microbiol. 48(5): 1701-5.

30. Hauck C. R., Ohlsen K. (2006). Conexión adhesiva: reconocimiento de proteínas de la matriz extracelular e invasión celular mediada por integrinas por Staphylococcus aureus. Microbio 9: 5–11.

31. Idrees M., Sawant S. , Karodia N. y Rahman A. (2021). *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *International journal of environmental research and public health*. *18*(14): 7602.

32. Jackson M. S., Bagg J. , Gupta M. N. y Sturrock R. D. (1999). Oral carriage of staphylococci in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatol. 38: 572-5.

33. Jan-Roblero J., García-Gómez E., Rodriguez-Martinez S., Cancino-Diaz M.E. y Cancino-Diaz, J.C. (2016). Surface Proteins of Staphylococcus aureus. En Enany, S. & Crootty, L.E. (eds). The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus.

34. Jonsson K., McDevitt D., McGavin M. H., Patti J. M. y Hook M. (1995). *Staphylococcus aureus* expresa un análogo de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad. J. Biol Chem. 270: 21457–21460.

35. Landa A. S. (2004). Detachment of linking film bacteria from enamel surfaces by rinses and penetration of sodium lauryl sulfate through an artificial oral biofilm. Adv Dent Res. 11: 528-38.

36. Lasa I., Pozo J. L., Penadés J. R. y Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, *28*(2), 163-175

37. Lee L. Y., Miyamoto Y. J., McIntyre B. W., Höök, M., McCrea K. W., McDevitt D. y Brown L. (2002). The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell–mediated responses. The American Society for Clinical Investigation. 110(10) :1461-1471.

38. Lozano D., Díaz L., Echeverry M., Pineda S. y Máttar S. (2010). Staphylococcus aureus resistentes a meticilina (SARM) positivos para PVL aislados en individuos sanos de Montería-Córdoba. Universitas. SCIENTIARUM. 15(2): 159-165.

39. McCormack M. G, Smith A. J., Akram A. N., Jackson M., Robertson D. y Edwards E. (2015). Staphylococcus aureus and the oral cavity: An overlooked source of carriage and infection. American Journal Infection Control. 43 (1): 35-37.

40. Manos J. (2022). The human microbiome in disease and pathology. APMIS. 130(12): 690-705.

41. Márquez-Oviedo A., Romero-Coasaca A. C., Requena-Mendizábal M. F., Martínez-Cadillo E., Mongrut-Villegas U., Ayón-Haro E. R. y Guardia-Huamaní A. S. (2021). Resistencia de cepas de Staphylococcus aureus Aisladas de la Mucosa Oral de una Población Joven Peruana. *International journal of odontostomatology*. *15*(3): 634-638.

42. Martínez-Pulgarín S. (2005). Influencia de la catalasa y de la β-toxina en la patogénesis de Staphylococcus aureus. Memoria de Doctorado. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

43. Massey R. C., Horsburgh M. J., Lina G., Höök M. y Recker M. (2000). The evolution and maintenance of virulence in Staphylococcus aureus: a role for host-to-host transmission. Nature Reviews Microbiology. 4: 953-958.

44. McConaughey S. J., Howlin R., Granger J. F., Manring M. M., Calhoun J. H y Shirtlif M. (2014). Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. Future Microbiol. 9(8): 987-1007.

45. Memoria UNAM, Fes Iztacala 2020. Fuente: https://www.planeacion.unam.mx/Memoria/2020/PDF/4.11-FESI.pdf

46. Moreno del Castillo M. C., Valladares-García J. y Halabe-Cherem J. (2018). Microbioma humano. *Revista de la Facultad de Medicina*. *61*(6): 7-19.

47. Nashev D., Toshkova K., Isrina S., Hassan A. y Lämmler C. (2004). Distribution of virulence genes of Staphylococcus aureus isolated from stable nasal carriers. FEMS Microbiology Letters. 233: 45–52.

48. Nagasaki K., Chávez M. B., Nagasaki A., Taylor J. M., Tan M. H., Ma M., Ralston E., Thew M. E., Kim D. G., Somerman M. J. y Foster B. L. (2022). El dominio RGD de la sialoproteína ósea modula y mantiene el desarrollo periodontal. Revista de Investigación Dental.

49. Navarre W.W. y Schneewind O. (1994). Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 174-229.

50. Navarro-Navarro M., Moreno-Ibarra G. M., Castillón-Campaña L. G., Sánchez-Maríñez R. I., Rodríguez-Pesqueira F. E. y Sánchez-Padilla A. (2008). Baja Prevalencia de Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina en Cepas Aisladas en el Laboratorio Clínico del Hospital Infantil del Estado de Sonora. Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora. 25 (1).

51. Ohara-Nemoto Y., Haraga H., Kimura S., Nemoto T. K. (2008). Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal–oral trafficking of the bacteria. Journal of medical microbiology. 57(1).

52. Orenstein A. (2006). The discovery and naming of *Staphylococcus aureus*.
Fuente: www.antimicrobe.org

53. Pace B., Lane D. J., Olsen G. J., Stahlt D. A., Sogint M. L., Pace N. R. (1985). Evolution Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses.Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 6955-6959.

54. Pasachova-Garzon J., Ramirez-Martinez S. y Muñoz-Molina L. (2019). Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. NOVA. 17 (32): 25-38.

55. Pati J. M., Bremel T., Krajewska-Pietrasik D., Abdelnour A., Tarkowski A., Ryden C. y Hook M. (1994) The Staphylococcus aureus collagen adhesion is a virulence determinant in experimental septic arthritis. Infect Immun. 62: 152-162.

56. Pinilla G., Bautista A., Cruz C., Chavarro B., Navarrete J., Muñoz l. y Gutiérrez J. (2017). Determinación de factores de adhesión asociados a la formación de biopelícula en aislamientos clínicos de Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis. NOVA. 15(27): 67-75.

57. Porrero-Calonge C. (2014). Detección y caracterización de Staphylococcus aureus procedentes de animales y aguas. (Tesis Doctoral). UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, Madrid.

58. Rolain J. M., Cantón R., Cornaglia G. (2012). Emergence of antibiotic resistance: need for a new paradigm. Clin Microbiol Infec. 18:615-616.

59. Römling U. y Balsalobre C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of internal medicine*. *272*(6): 541–561.

60. Sarduy Bermúdez L. y González Díaz M. E. (2016). La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Medicentro Electrónica*. *20*(3). 167-175.

61. Scriba T. J., Sierro S., Brown E. L., Phillips R. E., Sewell A. K. y Massey R. C. (2008). The Staphyloccous aureus Eap protein activates expression of proinflammatory cytokines. *Infection and immunity*. *76*(5), 2164–2168.

62. Serrano-Coll H. A., Sánchez-Jiménez M., Cardona-Castro N. (2015). Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. Rev. CES Odontológica. 28(2): 112-118.

63. Smith A. J., Jackson M. S. y Bagg J. (20001). The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. Journal Medical Microbiology. 50: 940-6946

64. Socransky S.S. y Haffajee A.D. (2003). Biofilms dentales: objetivos terapéuticos difíciles. Periodontol 3:12-55.

65. Uribe-García A., Paniagua-Contreras G. L., Monroy-Pérez E., Bustos-Martínez J., Hamdan-Partida A., Garzón J., Alanís J., Quezada R., Vaca-Paniagua F. y Vaca S. (2021). Frequency and expression of genes involved in adhesion and biofilm formation in Staphylococcus aureus strains isolated from periodontal lesions. *Journal of microbiology, immunology, and infection. 54:*(2), 267–275.

66. Velázquez-Guadarrama N., Vigueras-Galindo J. C., Escalona-Venegas G., Arellano-Galindo J., Giono Cerezo S. y Nava-Frías, M. (2010). Resistencia a linezolid en Staphylococcus aureus resistente a meticilina y enterococos con elevada resistencia a aminoglucósidos en un hospital pediátrico de tercer nivel. Bol Med Hosp Infant Mex. 67(1): 19-26.

67. Velázquez-Mesa M. (2005). Surgimiento y diseminación de Staphylococcus aureus meticilino resistente [Staphylococcus aureus methicillin-resistant: emergence and dissemination]. Salud Publica Mex. 47(5): 381-7.

68. Verma D., Garg P. K. y Dubey A. K. (2018). Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol* 200. 525–540.

69. Vieira-Colombo A. P., Bichara-Magalhães C., Resende-Hartenbach, F., Martins do Souto R., Silva-Boghossian C. M. (2016). Periodontal -disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. Microbial Pathogenesis. 94: 27-3

70. Yishuang P., Weizhong C. y Quanjiang J. (2020). Structural Basis of *Staphylococcus aureus* Surface Protein SdrC. *Biochemistry.* 59(15): 1465-1469.

71. Zaura E., Keijser B. J. y Huse S. M. (2009). Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 9: 259.

72. Zendejas-Manzo G. S., Avalos-Flores H., Soto-Padilla M. Y. (2014). Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Rev Biomed. 25:129-143.

73. Zong Y., Xu Y., Liang X., Keene D. R., Höök A., Gurusiddappa S., Höök M. y Narayanas S. V. L. (2006). A 'Collagen Hug' model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. EMBO J. 25(4): 921.