



Estudio de expresión génica de factores de virulencia de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* causantes de bacteremia.

Noboa Carrasco, Kirsty Ximena

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Grijalva Silva, Rodrigo Marcelo M. D. PhD.

02 de septiembre del 2020

URKUND

Document Information

Analyzed document TESIS NOBOA KIRSTY.docx (D78096541)
Submitted 8/24/2020 3:19:00 AM
Submitted by
Submitter email rmgrijalva@espe.edu.ec
Similarity 4%
Analysis address rmgrijalva.espe@analysis.orkund.com

Sources included in the report

SA	Proyecto de Titulación_Álvarez Meythaler José Gabriel.docx Document Proyecto de Titulación_Álvarez Meythaler José Gabriel.docx (D21858130)	6
W	URL: https://docplayer.es/46457034-Ingenieria-en-biotecnologia.html Fetched: 12/18/2019 5:43:46 PM	1
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / TESIS VALENTINA AREVALO-U.docx Document TESIS VALENTINA AREVALO-U.docx (D36573281) Submitted by: jvarevalo@espe.edu.ec Receiver: apjimenez.espe@analysis.orkund.com	6
SA	TESIS ANDREA RODRIGUEZ.docx Document TESIS ANDREA RODRIGUEZ.docx (D29306551)	1
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / PROYECTO DE INVESTIGACIÓN NAYARA GÓMEZ.docx Document PROYECTO DE INVESTIGACIÓN NAYARA GÓMEZ.docx (D36574312) Submitted by: nmgomez@espe.edu.ec Receiver: rmgrijalva.espe@analysis.orkund.com	4
W	URL: https://docplayer.es/87345610-Departamento-de-ciencias-de-la-vida-y-de-la-agricult ... Fetched: 8/5/2020 8:13:03 PM	1
W	URL: https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/793/1/T-ESPE-026697.pdf Fetched: 10/24/2019 8:15:33 PM	1



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “Estudio de expresión génica de factores de virulencia de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* causantes de bacteremia” fue realizado por la señorita Noboa Carrasco, Kirsty Ximena el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 24 de agosto de 2020

Firma:

Dr. Grijalva Silva, Rodrigo Marcelo M.D., PhD.

C. C. 1706590641



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Noboa Carrasco, Kirsty Ximena**, con cédula de ciudadanía n°0603997743, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Estudio de expresión génica de factores de virulencia de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* causantes de bacteremia** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 24 de agosto del 2020

Firma

Noboa Carrasco, Kirsty Ximena

C.C.: 0603997743



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Noboa Carrasco, Kirsty Ximena**, con cédula de ciudadanía n° 0603997743, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Estudio de expresión génica de factores de virulencia de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* causantes de bacteremia** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 24 de agosto del 2020

Firma

Noboa Carrasco, Kirsty Ximena

C.C.: 0603997743

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres, Ximena y Marco, por inculcarnos sus valores y principios. Por sus consejos y confianza.

A mis hermanos Maycol y Samy, así como a la May por su paciencia, comprensión y apoyo durante esta etapa de mi vida.

A mis pequeños perritos, Leo y Milú, por llenar de dulzura y alegría mis días, por a pesar de todo siempre recibirme con sus juegos y cariños.

A David, por motivarme a seguir adelante, por su apoyo incondicional, y sobre todo por su paciencia.

Kirsty Ximena Noboa Carrasco

Agradecimientos

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, y al cuerpo de docentes por ser partícipes y guías durante el proceso de desarrollo profesional. Y por ser la base de mi vida en investigación.

A los docentes del laboratorio de Biotecnología Humana, Dr. Marcelo Grijalva, y Dra. Patricia Jiménez, por permitirme desarrollar habilidades necesarias para la investigación y contribución para mi formación profesional.

A las técnicas de laboratorio, Lizeth Salazar y Andrea Rodríguez, por sus consejos, guías y tutorías. A mis compañeros y amigos de laboratorio, por su apoyo y colaboración.

Kirsty Ximena Noboa Carrasco

Tabla de contenidos

Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Tabla de contenidos.....	8
Listado de tablas	12
Listado de figuras	14
Listado de abreviaturas	19
Capítulo I: Introducción.....	23
Antecedentes	23
Justificación.....	25
Objetivos del trabajo de titulación	26
Objetivo general.....	26
Objetivo específico.....	27
Capítulo II: Revisión bibliográfica	28
Generalidades de <i>Staphylococcus</i>	28
Taxonomía	29
Estructura y morfología de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
Epidemiología de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Microbiología	31

	9
Medios de cultivo.....	32
Tinción Gram.....	34
Molecular	35
Patogenicidad	36
Resistencia a antibióticos.....	38
Mecanismos de resistencia	39
Adquisición de mecanismos de resistencia	41
Factores de virulencia	42
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	44
Reacción de cadena de la polimerasa múltiple (PCR multiplex).....	45
Reacción de cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	45
Química SYBR	46
Curva de amplificación.....	47
Cuantificación relativa.....	48
Método Pfaffl	48
Capítulo III: Metodología	50
Zona de estudio	50
Participantes	50
Periodo de investigación	50
Procedimientos	50

	10
Recuperación de los aislados clínicos.....	50
Identificación molecular de <i>Staphylococcus aureus</i> sensible y resistente.....	51
Preparación de la muestra	52
Extracción de DNA.....	52
Primers de caracterización de susceptibilidad	53
Caracterización de aislados sensibles y resistentes mediante PCR multiplex.....	54
Electroforesis en gel de agarosa.....	57
Expresión de factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	57
Diseño de primers para el panel de factores de virulencia	57
Extracción de RNA.....	59
Purificación de RNA.....	60
Síntesis de cDNA	60
Establecimiento de temperaturas de alineamiento por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (rt PCR).	61
Sensibilidad analítica y curva de calibración de los factores de virulencia por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	63
Caracterización de la expresión de los factores de virulencia por qPCR	65
Capítulo IV: Resultados	68
Recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> provenientes de aislados clínicos	68
Identificación molecular de susceptibilidad <i>Staphylococcus aureus</i>	71

Caracterización de expresión de factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	79
Establecimiento de temperaturas de alineamiento por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (rt-PCR).....	79
Sensibilidad analítica y curva de calibración de los factores de virulencia por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	81
Expresión de factores de virulencia mediante qPCR	90
Capítulo V: Discusión	103
Capítulo VI: Conclusiones.....	118
Capítulo VII: Recomendaciones.....	120
Bibliografía.....	121
Anexo	136

Listado de tablas

Tabla 1. Medio de cultivo selectivos empleados en la identificación de <i>S. aureus</i>	33
Tabla 2. Factores de patogénesis en <i>S. aureus</i>	37
Tabla 3. Resumen de mecanismos de resistencia a antibióticos por <i>S. aureus</i>	39
Tabla 4. Factores de virulencia expresados por <i>S. aureus</i>	43
Tabla 5. Primers de caracterización de susceptibilidad para <i>S. aureus</i>	53
Tabla 6. Concentración de los componentes para una reacción de PCR multiplex por kit Magnitaq Multiplex PCR Master Mix (Affymetrix).....	54
Tabla 7. Programa del termociclador para amplificación de genes de caracterización de <i>S. aureus</i> por kit Magnitaq Multiplex PCR Master Mix (Affymetrix).....	55
Tabla 8. Componentes de PCR multiplex por kit Phusion U Multiplex PCR Master Mix (ThermoFisher).....	55
Tabla 9. Programa PCR multiplex por kit Phusion U Multiplex PCR Master Mix (ThermoFisher).	56
Tabla 10. Primers del panel de factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	58
Tabla 11. Componentes para síntesis de cDNA	60
Tabla 12. Programa de síntesis de cDNA.....	61
Tabla 13. Componente de rt PCR.....	62
Tabla 14. Programa de rt PCR	62
Tabla 15. Componentes de ensayo de qPCR. a) 16S, nuc. b) hla, fhuD, fnbA, gyr, sstD	64
Tabla 16. Programa de qPCR. Temperatura de alineamiento para primers de genes a) fhuD, fnbA, hla, sstD, gyr, b) nuc, c) 16S	65
Tabla 17. Resumen de resultados de recuperación de aislados clínicos por hospital de procedencia.	69

Tabla 18. <i>Clasificación de susceptibilidad a antibióticos de S. aureus según base de datos del laboratorio</i>	70
Tabla 19. <i>Valores de concentración final de cDNA y Cp, promedios del gen gyr</i>	82
Tabla 20. <i>Valores de concentración final de cDNA y Cp, promedios del gen sstD</i>	83
Tabla 21. <i>Valores de concentración final de cDNA y Cp, promedios del gen hla</i>	84
Tabla 22. <i>Valores de concentración final de cDNA y Ct, promedios del gen fnbA</i>	85
Tabla 23. <i>Valores de concentración final de cDNA y Cp, promedios del gen fhuD</i>	86
Tabla 24. <i>Valores de concentración final de cDNA y Cp, promedios del gen nuc</i>	87
Tabla 25. <i>Valores de concentración final de cDNA y Cp, promedios del gen 16S</i>	88
Tabla 26. <i>Resumen de resultados de curva estándar de genes de expresión de factores de virulencia</i>	89
Tabla 27. <i>Estadística descriptiva por gen y coeficiente de variación</i>	90
Tabla 28. <i>Coeficientes de variación de la media de muestras por gen</i>	92
Tabla 29. <i>Intervalo de confianza de la dispersión de Cp por gen</i>	96
Tabla 30. <i>Ranking de los genes de referencia definidos en RefFinder</i>	97

Listado de figuras

Figura 1. <i>Línea del tiempo de la resistencia a antibióticos de Staphylococcus aureus</i>	24
Figura 2. <i>Clasificación taxonómica de S. aureus</i>	29
Figura 3. <i>Superficie y estructura de S. aureus</i>	30
Figura 4. <i>Diferenciación entre S. aureus como colonias doradas y S. epidermidis, como colonias blancas</i>	32
Figura 5. <i>Staphylococcus aureus, A) agar nutritivo, B) agar sangre</i>	34
Figura 6. <i>Cocos Gram positivos de S. aureus</i>	35
Figura 7. <i>Desarrollo de patogenicidad de S. aureus</i>	38
Figura 8. <i>Inactivación enzimática de penicilina por β-lactamasa</i>	40
Figura 9. <i>Reemplazo del sitio de unión</i>	40
Figura 10. <i>Permeabilidad reducida y bomba de eflujo</i>	41
Figura 11. <i>Esquematización de la PCR</i>	45
Figura 12. <i>RT-qPCR de un paso y dos pasos</i>	46
Figura 13. <i>Mecanismo de SYBR Green I</i>	47
Figura 14. <i>Curvas de amplificación de qPCR</i>	48
Figura 15. <i>Esquematización del proceso de recuperación y conservación de aislados clínicos</i>	51
Figura 16. <i>Diluciones seriadas de cDNA</i>	64
Figura 17. <i>Muestra con cocos Gram – positivos, observado a 100X con aceite de inmersión en microscopio óptico (CX31, Olympus)</i>	68
Figura 18. <i>Frecuencias de recuperación de S. aureus provenientes de aislados clínicos</i>	69
Figura 19. <i>Porcentajes de susceptibilidad de aislados recuperados según base de datos</i>	71

- Figura 20.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); A, B, C: sensibles; C-: Control negativo 72
- Figura 21.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); D, E, F: resistentes; C-: Control negativo..... 72
- Figura 22.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); G, H, I, J, L: sensibles; K: resistente; C-: Control negativo..... 72
- Figura 23.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); Q, O: bacteria no *S. aureus*; N: sensible; P: resistente; C-: Control negativo 73
- Figura 24.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); R: no concluyente; S,T: sensibles; U: resistente 73
- Figura 25.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); V, W, X, Y, Z, AA: sensibles..... 73
- Figura 26.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); AB, AC: bacteria no *S. aureus*; AD, AE, AF: sensibles; C-: Control negativo74
- Figura 27.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); AJ: sensible; AG, AH, AI: resistente; C-: Control negativo 74
- Figura 28.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); AM, AN: bacteria no *S. aureus*; AK, AL, AO, AP: resistentes; C-: Control negativo..... 74
- Figura 29.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); AQ, AR, AS, AU, AW, AX: bacteria no *S. aureus*; AT, AV, AY: sensibles; C-: Control negativo 75

- Figura 30.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); AZ, BC: bacteria no *S. aureus*; BA, BB: sensibles; C-: Control negativo..... 75
- Figura 31.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); BD: sin amplificación; BE, BF: sensibles; BG, BH, BI: no concluyente; C-: Control negativo 75
- Figura 32.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); BJ, BL, BN: sensibles; BK, BM: resistentes; BO: bacteria no *S. aureus*; C-: Control negativo 76
- Figura 33.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); BP, BS: no concluyente; BQ, BT: bacteria no *S.aureus*; BR: resistente; C-: Control negativo 76
- Figura 34.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); AW, AX, BC, BO: bacteria no *S. aureus*; BP, BQ: no concluyente; C-: Control negativo..... 77
- Figura 35.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); BS: bacteria no *S. aureus*; BT: sensible; C-: Control negativo..... 77
- Figura 36.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); O, AM, AN: bacteria no *S. aureus*; R, AB: sensible; C-: Control negativo... 77
- Figura 37.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); AQ, AR, AS, BD, BG, BH, BI: bacteria no *S. aureus*; AU, AZ: sensible; C-: Control negativo 78
- Figura 38.** PCR multiplex en gel de agarosa 2%. Como marcador esta la muestra M resistente. AW, BP, BQ, BS: bacteria no *S. aureus*; BT, R, AB, AU, AZ: sensible 78

Figura 39. Resumen PCR multiplex de identificación molecular de <i>S. aureus</i>	79
Figura 40. PCR en gradiente de temperatura de genes de referencia y genes factores de virulencia en gel de agarosa 2%. Para los primers de los genes A) <i>sdrC</i> , B) <i>fhuD</i> , C) <i>hla</i> , D) <i>fnbA</i> , D) <i>sstD</i> , E) 16S, F) <i>gyr</i>	80
Figura 41. Sensibilidad analítica de <i>gyr</i> . A) Curva de amplificación, B) Temperaturas de melting, C) Curva estándar.....	82
Figura 42. Sensibilidad analítica de <i>sstD</i> . A) Curva de amplificación, B) Temperaturas de melting, C) Curva estándar	83
Figura 43. Sensibilidad analítica de <i>hla</i> . A) Curva de amplificación, B) Temperaturas de melting, C) Curva estándar.....	84
Figura 44. Sensibilidad analítica de <i>fnbA</i> . A) Curva de amplificación, B) Temperaturas de melting, C) Curva estándar	85
Figura 45. Sensibilidad analítica de <i>fhuD</i> . A) Curva de amplificación, B) Temperaturas de melting, C) Curva estándar	86
Figura 46. Sensibilidad analítica de <i>nuc</i> . A) Curva de amplificación, B) Temperaturas de melting, C) Curva estándar.....	87
Figura 47. Sensibilidad analítica de 16S. A) Curva de amplificación, B) Temperaturas de melting, C) Curva estándar	88
Figura 48. Diagrama de caja para las muestras respecto al gen 16S	93
Figura 49. Diagrama de caja para las muestras respecto al gen <i>fhuD</i>	93
Figura 50. Diagrama de caja para las muestras respecto al gen <i>gyr</i>	94
Figura 51. Diagrama de caja para las muestras respecto al gen <i>fnbA</i>	94
Figura 52. Diagrama de caja para las muestras respecto al gen <i>hla</i>	95

Figura 53. <i>Diagrama de caja para las muestras respecto al gen nuc</i>	95
Figura 54. <i>Diagrama de dispersión de Cp de las muestras para cada gen</i>	96
Figura 55. <i>Gráfica de estabilidad de los genes de referencia</i>	98
Figura 56. <i>Logaritmo en base dos de los ratios de amplificación calculados por Pfaffl. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza respecto a la media 95%</i>	98
Figura 57. <i>Resumen de expresión o inhibición comparando las muestras con AA</i>	100
Figura 58. <i>Susceptibilidad de Log ratio. Las barras de error corresponden a los intervalos de confianza de la media al 95%</i>	101
Figura 59. <i>Susceptibilidad de DeltaCp. Las barras de error corresponden a los intervalos de confianza de la media al 95%</i>	102

Listado de abreviaturas

16S	Gen del componente de la subunidad menor del ribosoma bacteriano
BHI	Caldo de infusión cerebro corazón (siglas en inglés)
bp	Par de bases (siglas en inglés)
Ct	Threshold cycle (ciclo umbral)
Cp	Crossing point
Cq	Quantification cycle
DNA	Ácido desoxirribonucleico (siglas en inglés)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>fnbA</i>	Gen de la proteína de unión a fibronectina A
<i>fhuD</i>	Gen de la proteína de unión a hidroxamato
HCAM	Hospital Carlos Andrade Marín
HEE	Hospital Eugenio Espejo
<i>hla</i>	Gen de α - hemolisina
MIQE	Información mínima para publicación de experimentes de PCR en tiempo real (siglas en inglés)
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina (siglas en inglés)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (siglas en inglés)
PBP2a	Proteína de unión a penicilina (siglas en inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (siglas en inglés)
RNA	Ácido ribonucleico (siglas en inglés)
rt PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (siglas en inglés)

SAB	Bacteremia causada por <i>Staphylococcus aureus</i> (siglas en inglés)
SAU	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCCmec	Casete cromosómico estafilocócico mec (siglas en inglés)
SDS	Dodecilsulfato sódico
<i>sdrC</i>	Gen de la proteína de serina-aspartato C repetida
<i>sstD</i>	Gen de la proteína de unión al sustrato transportadora de hierro
TBE	Buffer de Tris base, borato y EDTA
TEM	Microscopio electrónico de transmisión (siglas en inglés)
TSA	Agar de soya triptona (siglas en inglés)

Resumen

Staphylococcus aureus es una bacteria que se encuentra en la flora normal de la piel, pero existen casos en los que ha pasado de ser un huésped a un patógeno desarrollando incluso bacteremias (SAB). Las SAB son un problema persistente en los hospitales en especial cuando la bacteria es resistente a los antibióticos, ya que complica su tratamiento. Los factores de virulencia son genes que se activan e inducen la patogénesis. Es necesario establecer técnicas que identifiquen los factores de virulencia en bacteremias tempranas. En este proyecto se estudian en aislados clínicos provenientes de hospitales de Quito, cuatro factores de virulencia *fhuD*, *fnbA*, *hla*, *sstD* descritos en modelos in vitro y animales, junto con un gen asociado a la resistencia a fluoroquinolonas, *gyr*. Conjuntamente, se desarrolló el programa de PCR en tiempo real, normalizando los factores de virulencia al gen de referencia *16S* que demostró tener mayor estabilidad. Se encontraron muestras que sobreexpresan los genes propuestos. Las proteínas asociadas a la expresión de *fhuD*, *sstD* y *fnbA*, se asocian a estadios tempranos de bacteremia mientras que *hla* a cuadros con complicaciones tromboembólicas. Además, se reconoció diferencias en la expresión de los factores de virulencia entre muestras sensibles y resistentes a antibióticos. Sin embargo, es necesario aumentar la cantidad de muestras resistentes para mayor robustez de los datos.

Palabras clave:

- **STAPHYLOCOCCUS AUREUS**
- **FACTORES DE VIRULENCIA**
- **GENES DE REFERENCIA**
- **PCR EN TIEMPO REAL**
- **SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS**

Abstract

Staphylococcus aureus is found in the normal flora of the human skin, but there are cases in which it has gone from being a host to a pathogen developing bacteremia (SAB). SABs are a persistent problem in hospitals, especially when the bacteria are resistant to antibiotics, as it complicates their treatment. Virulence factors are genes that are activated during pathogenesis. Techniques that recognize virulence factors in early bacteremia need to be established. The project studies four virulence factors *fhuD*, *fnbA*, *hla*, *sstD* described in *in vitro* and in animal models, together with a gene associated with resistance to fluoroquinolones, *gyr*, in clinical isolates from hospitals in Quito. Together, a real-time PCR program was developed, normalizing the virulence factors to the *16S* reference gene, which showed greater stability. Samples were found with consistent upregulation of the proposed genes. The proteins associated with the expression of *fhuD*, *sstD* and *fnbA*, are associated with early stages of bacteremia, whereas *hla* with thromboembolic complications. Furthermore, differences in the expression of virulence factors between antibiotic-resistant and susceptible isolates were recognized. However, it is necessary to increase the number of resistant isolates for greater robustness of the data.

Key words:

- **STAPHYLOCOCCUS AUREUS**
- **VIRULENCE FACTORS**
- **REFERENCE GENES**
- **REAL TIME PCR**
- **ANTIBIOTICS SUSCEPTIBILITY**

Capítulo I: Introducción

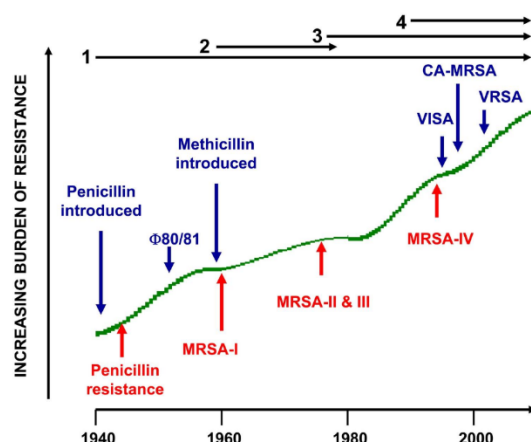
Antecedentes

Staphylococcus aureus es un microorganismo presente en el ambiente y en la flora humana de personas sanas, localizado en la piel y las membranas mucosas de la zona nasal (T. A. Taylor & Unakal, 2019). El 50% al 60% de la población presenta colonización nasal asintomática de *S. aureus* (Kobayashi, Malachowa, & DeLeo, 2015).

S. aureus es naturalmente susceptible a antibióticos. A través de los años ha desarrollado resistencia hacia los antibióticos empleados en el tratamiento de infecciones (Figura 1). A partir del descubrimiento de la penicilina y la dosificación inadecuada para el tratamiento de infecciones microbianas, algunas cepas han desarrollado resistencia a un amplio espectro de medicamentos. A mediados de la década de 1940 se encontraron los primeros casos de resistencia de *S. aureus* a penicilina en hospitales (Chambers & Deleo, 2009). Seguido de la introducción de la metilina en 1960, surge *S. aureus* resistente a metilina (MRSA). Posteriormente, a inicios del 2000, generan resistencia a antibióticos de última generación como vancomicina (Thomer, Schneewind, & Missiakas, 2016).

Figura 1

Línea del tiempo de la resistencia a antibióticos de *Staphylococcus aureus*.



Nota. Adaptado de “Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era” (p. 630), por H. Chambers & F. Deleo, 2009, Nature Reviews Microbiology, 7 (9).

Normalmente, las cepas de *S. aureus* no causan infección, pero se ha determinado que al entrar al torrente sanguíneo o a diferentes tejidos puede pasar de microorganismo inocuo a patógeno (T. A. Taylor & Unakal, 2019). Las infecciones de *S. aureus* en el torrente sanguíneo pueden causar bacteremia (*Staphylococcus aureus* bacteremia – SAB). La incidencia de SAB es de alrededor de 38 por cada 100,000 habitantes (Jokinen et al., 2018). La tasa mortalidad es de 20 al 40 por ciento, y es mayor cuando se identifica infección por MRSA (Fowler & Holland, 2019).

Los antibióticos actúan impidiendo procesos metabólicos esenciales (Kohanski, Dwyer, & Collins, 2010). Sin embargo, *S. aureus* se ha adaptado para reducir el requerimiento de estos procesos para sobrevivir a los tratamientos de SAB (Lechner, Lewis, & Bertram, 2012).

La patogenicidad de la bacteria requiere de la activación de factores de virulencia. Los cuales, le permiten diseminarse dentro del huésped y evadir las defensas (Cross, 2008). Se ha encontrado una amplia variedad de proteínas de adhesión o invasión, toxinas, formadoras de biofilm, evasión del sistema inmune y proteínas de adquisidor de hierro, que se llegan a activar (Jenkins et al., 2015).

El enfoque clínico en el caso de bacteremia consiste en la revisión de la historia clínica del paciente y un examen físico (Fowler & Holland, 2019). El diagnóstico de infecciones en los hospitales se realiza por cultivo, y antibiogramas. Debido que, *S. aureus* se encuentra normalmente en los humanos, la presencia del microorganismo no indica que sea la causa de la infección.

Justificación

Las infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos son un problema en el sistema de salud pública. En el Ecuador la prevalencia de MRSA en el personal de salud es del 5 al 12% (Bustos Cabrera & Salame Ortíz, 2015; Vaca, 2016). Mientras que, la tasa de incidencia de MRSA por cada 1,000 pacientes es de 32 en caso de cirugía vascular, 7 por cirugía plástica y 7 en medicina interna (Trujillo & Herrera, 2015). Siendo más propensos las personas de la tercera edad.

En el Ecuador se carece de información disponible sobre la ocurrencia de SAB. A nivel internacional, la incidencia de SAB varía de entre 10 a 30 personas por cada 100,000 en un año (Laupland et al., 2013). La severidad de la infección depende la interacción entre huésped y patógeno (Laabei et al., 2015; Powers & Bubeck Wardenburg, 2014).

La expresión de proteínas tóxicas o de evasión de respuesta inmune, permiten al patógeno persistir con la infección. En el torrente sanguíneo, los factores de virulencia de *S.*

aureus, alteran la coagulación (Powers & Bubeck Wardenburg, 2014). La regulación constante de los genes *sdrC*, *fnbA*, *fhuD*, *sstD* y *hla*, desde la fase de colonización nasal hasta la bacteremia, sugieren que están relacionados con la patogenicidad de *S. aureus* (Jenkins et al., 2015). De forma general, los genes mencionados participan en el escape de la bacteria desde la nariz hasta el torrente sanguíneo, captura de hierro de la sangre para emplearlo como cofactor de su metabolismo, y la modulación de la respuesta inmune del huésped.

Existen estudios de expresión de los genes de factores de virulencia, identificados en modelos de infección como zebrafish y murino. Existen pocas investigaciones referentes a aislados clínicos con SAB.

Por lo tanto, la investigación se basa en el estudio de expresión génica cuantitativa de los factores de virulencia candidatos descritos en modelos de infección, presentes en aislados clínicos adquiridos de los hospitales Eugenio Espejo y Carlos Andrade Marín. Además, de identificar la expresión de los genes entre los aislados de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes (MRSA) a antibióticos.

La información proporcionada por este estudio permitirá establecer un protocolo de identificación de los factores de virulencia causantes de bacteremias. Por ende, establecer un método de diagnóstico que permita diferenciar de infecciones *S. aureus* con respecto a otros patógenos.

Objetivos del trabajo de titulación

Objetivo general

- Estudiar la expresión génica de factores de virulencia de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* causantes de bacteremia.

Objetivo específico

- Recuperar e identificar fenotípicamente aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* provenientes de los Hospitales Carlos Andrade Marín y Eugenio Espejo
- Identificar genotípicamente *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a antibióticos utilizando reacción en cadena de la polimerasa múltiple para detectar genes *16S*, *nuc* y *mecA*.
- Estudiar los patrones de expresión del panel de genes relacionados con potenciales factores de virulencia (*fnbA*, *fhuD*, *sstD*, *hla* y *gyr*) de los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* causantes de bacteremia.

Capítulo II: Revisión bibliográfica

Generalidades de *Staphylococcus*

Los estafilococos son un grupo de bacterias Gram-positivas, caracterizadas por su morfología redonda. Se lo denominó estafilococo dorado (*aureus*), debido al color característico en agar nutritivo. Es un organismo facultativo, crece en condiciones aerobias o anaerobias, y a temperaturas de 18 °C a 40°C (T. A. Taylor & Unakal, 2019). Tiene diámetro de 0.5 – 1.5 µm, con actividad coagulasa y envoltura de 40 nm de grosor (Harris et al., 2002), que lo distingue entre otros de su género.

Hasta la actualidad se han identificado 32 subespecies del género *Staphylococcus* (Harris et al., 2002). Entre las cuales *S. aureus* es la más reconocida por su actividad coagulasa, y al ser la principal causa de bacteremias (SAB). Generalmente, la bacteria se encuentra en la piel y mucosas humanas. No obstante, tiene la capacidad de pasar de un estado inocuo en su huésped a patógeno. La SAB se complica cuando se trata de un *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA). Debido que, existen cepas tolerantes a antibióticos, complicando el tratamiento.

La identificación molecular de *S. aureus* se realiza mediante el reconocimiento de la secuencia del gen *nuc*, que se traduce a una enzima con actividad termonucleasa (Brakstad, Aasbakk, & Maeland, 1992). Las cepas MRSA tienen el gen *mec* en el genoma bacteriano. El cual, codifica la proteína de unión de penicilina 2a, que cataliza la producción de peptidoglucano y tiene baja afinidad de unión a beta-lactámicos (derivados de la penicilina) (T. A. Taylor & Unakal, 2019). De esta forma, tiene resistencia a la mayoría de los antibióticos disponibles comercialmente.

Para evadir la respuesta inmune se ha encontrado que la bacteria produce una cápsula antifagocítica, secuestra anticuerpos del huésped, oculta sus antígenos con la proteína A, o forma biopelículas y bloquea la quimiotaxis (T. A. Taylor & Unakal, 2019).

Taxonomía

En la Figura 2 se detalla la taxonomía de *S. aureus* según el sitio web del Sistema Integrado de Información Taxonómica (Integrated Taxonomic Information System):

Figura 2

Clasificación taxonómica de *S. aureus*.

Reino:	•Bacteria (Cavalier-Smith, 2002)
Subreino:	•Posibacterias (Cavalier-Smith, 2002)
Filo:	•Firmicutes (Gibbons y Murray, 1978)
Clase:	•Bacilli (Ludwig et al., 2010)
Orden:	•Bacillales (Prévot, 1953)
Familia:	•Staphylococcaceae (Schleifer y Bell, 2010)
Género:	• <i>Staphylococcus</i> (Rosenbach, 1884)
Especies:	• <i>Staphylococcus aureus</i> (Rosenbach, 1884)

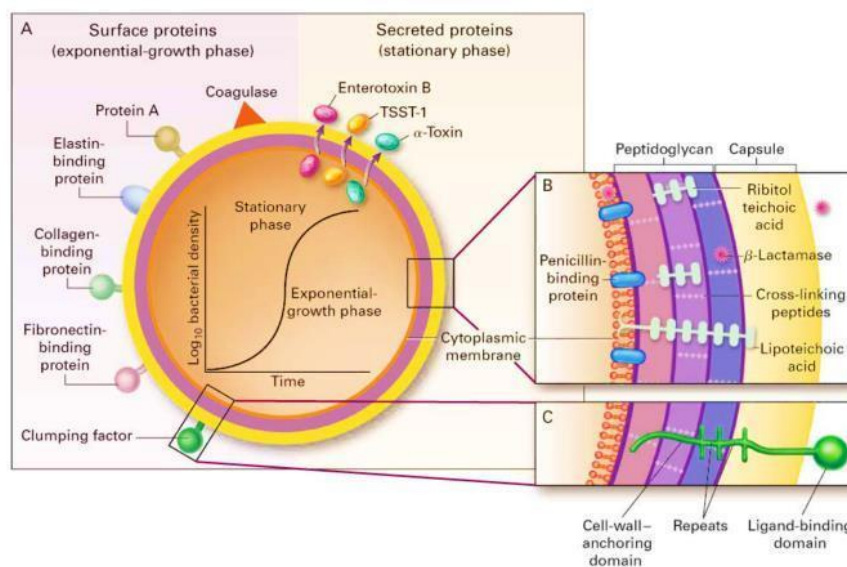
Nota. Adaptado de ITIS Standard Report Page: *Staphylococcus aureus*. ITIS (https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=369#null)

Estructura y morfología de *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un coco Gram-positivo, es decir, tiene una pared celular gruesa compuesta por peptidoglucano, ácidos teicoicos y proteínas (Figura 3). Los peptidoglucanos son la capa gruesa de la pared celular que corresponden al 70% del peso de la bacteria, y los ácidos teicoicos están unidos a esta pared hacia el exterior de la pared celular (Umeda, Ueki, & Amako, 1987).

Figura 3

Superficie y estructura de S. aureus.



Nota. Adaptado de *Pathogenic factors of Staphylococcus aureus with structural and secreted products both playing roles as virulence factors* [Figura], por Massachusetts Medical Society, 1998, ResearchGate (https://www.researchgate.net/figure/Pathogenic-factors-of-Staphylococcus-aureus-with-structural-and-secreted-products-both_fig5_318762255).

Epidemiología de *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria oportunista, que forma parte de la microflora humana y tiene alta adaptabilidad. Por lo cual, el desarrollo de infecciones por este patógeno ha aumentado junto con su espectro de resistencia antimicrobiana. Los sitios de colonización incluyen región nasal, piel, cordón umbilical y tracto gastrointestinal (Cervantes, García, & Paz, 2014). La colonización nasal es la más frecuente, y la que se ha estudiado en modelos de infección para determinar la transición a patógeno (Jenkins et al., 2015).

La transmisión puede ser directa o a través de vehículos como la ropa del hospedero (Cervantes et al., 2014). Las personas más vulnerables a desarrollar una colonización nasal son las personas de la tercera edad, pacientes con hemodiálisis o que presenten heridas abiertas, diabéticos, y pacientes inmunocomprometidos (von Eiff, Becker, Machka, Stammer, & Peters, 2001). Se estima que el 50% de la población mundial es portadora de *S. aureus* en las fosas nasales (Cervantes et al., 2014).

Identificación de *Staphylococcus aureus*

La identificación de *S. aureus* incluye la observación de su morfología celular, ser Gram-positivos, producción de catalasa o coagulasa y la capacidad para producir ácido en medio anaerobio a través del metabolismo de glucosa (Habib et al., 2015).

Microbiología

A nivel hospitalario, se han aplicado métodos de identificación fáciles de ejecutar. Entre los más comunes es el cultivo bacteriano y la capacidad catalasa.

Medios de cultivo

Existe una amplia gama de medios de cultivo para *S. aureus*. La bacteria puede crecer en medios generales como el agar nutritivo, donde presentar morfología redonda y el característico color dorado (Figura 4).

Figura 4

Diferenciación entre S. aureus como colonias doradas y S. epidermidis, como colonias blancas.



Nota. Adaptado de Staphylococcus epidermidis and S.aureus cultivated on TSA (tryptic soy agar), por Microbiology in Pictures, 2019, (<https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/staphylococcus-epidermidis-photos/staph-epidermidis-tsa.html>)

En la actualidad se disponen de varios medios selectivos para la identificación sobre otros microorganismos (Tabla 1). También, se requieren de pruebas de producción de catalasa y coagulasa, que permiten distinguir entre *S. aureus* y *Streptococcus*.

Tabla 1

Medio de cultivo selectivos empleados en la identificación de S. aureus

Medio cultivo	de Componentes	Características fenotípicas	Fuente
Agar Baird-Parker	Piruvato sódico, telurito, cloruro de litio y glicina	Colonias negras, con halo transparente	(Zendejas, Avalos, & Soto, 2014)
Agar Salado Manitol	Peptona Z, triptona, extracto de levadura, extracto de carne, peptona de sangre, cloruro de sodio, manitol, rojo fenol	Colonias con áreas amarillas debido a la reacción con el indicador	(Duran, Zhurbenko, & Viera, 2004)
Agar estafilococos N°110	Cloruro de sodio, manitol, peptona, extracto de levadura, lactosa	Al adicionar bromotimol al cultivo, se observan halos amarillos alrededor de las colonias	(Zendejas et al., 2014)
Agar sangre	Sangre (5 al 8%), infusión de musculo de corazón, peptona, cloruro de sodio	Colonias redondas, lisas, elevadas, brillantes de color gris a amarillo. Por lo general con una zona de β hemólisis	(Duquesne Amilcar, Castro, Monzote, & Paredes, 2015)

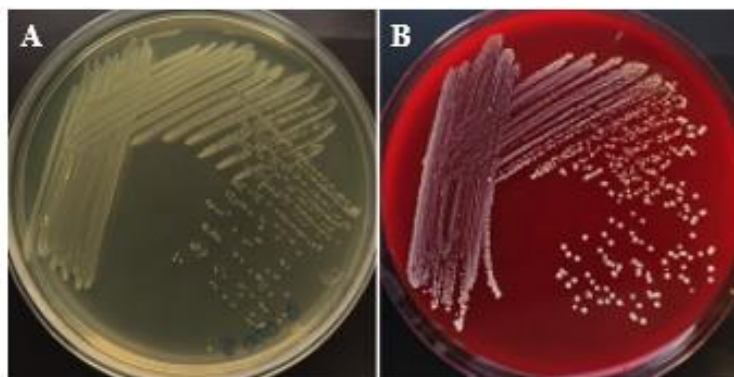
Además, *S. aureus* se diferencia de otras bacterias al producir coagulasa, resistir al calor y poder crecer en medios ligeramente salados con cloruro de sodio al 7.5% (NaCl) (Cervantes et al., 2014).

El empleo de agar sangre para el reconocimiento de β hemólisis (Figura 5), consiste una prueba ampliamente empleada en la identificación de la bacteria. No obstante, se requieren de más pruebas que permitan identificar con mayor seguridad a la especie.

Los medios de cultivos requieren un tiempo para poder observar el crecimiento y las características de las colonias.

Figura 5

Staphylococcus aureus, A) agar nutritivo, B) agar sangre.



Nota. Adaptado de “Identification of *Staphylococcus aureus* Factors Required for Pathogenicity and Growth in Human Blood” (p. 10), J. Connolly, E. Boldock, L. Prince, S. Renshaw, M. Whyte & S. Foster, 2017. *Infection and Immunity*, 85 (11).

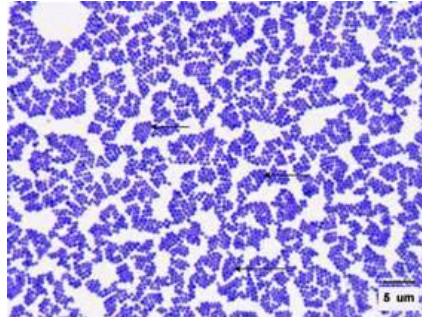
Tinción Gram

S. aureus presenta coloración Gram – positiva (Figura 6), ya que el colorante queda retenido en la pared de peptidoglicano. Además, ha aumento de 100x en microscopio óptico se

reconoce la forma de coco. Esta prueba resulta sencilla, pero debe complementarse con otras pruebas para ser de mayor fiabilidad en el reconocimiento de especies.

Figura 6

Cocos Gram positivos de S. aureus.



Nota. Adaptado de *Gram stain of Staphylococcus aureus* [Fotografía], por S. Jones, 2019, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470553/figure/article-22388.image.f1/>)

Molecular

La identificación molecular permite, evitar largos tiempos de espera de crecimiento de cultivo. La secuenciación se ha aplicado para identificar bacterias que no han sido reconocidos por sistemas convencionales (Poonawala & Peaper, 2017). Además, secuenciar permite alinear y comparar individualmente nucleótidos de genes de varias muestras, a través de programas bioinformáticas. La capacidad de detección de bacterias y comparación de genomas depende de la información disponible en las bases de datos (Barghouthi, 2011).

Otra técnica aplicada en la identificación molecular es la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) que reconoce la presencia de genes en los genomas de los microorganismos. Las pruebas moleculares tienen la ventaja frente a métodos convencionales de cultivo que no

necesitan tiempos de incubación y además puede detectar bacterias en pacientes que reciben tratamiento con antibióticos (Budding, Hoogewerf, Vandenbroucke-Grauls, & Savelkoul, 2016).

La identificación de alguna sección del gen de RNA ribosomal 16S (16S rRNA), determina la presencia de organismos procariotas. Ya que codifica al componente de la subunidad menor de los ribosomas procariotas (Johnson et al., 2016). A través del avance de la genética, se han registrado genes que permiten reconocer a *S. aureus*. Entre los más reconocido se encuentran *nuc* y *mecA*.

- Gen *nuc*

En *S. aureus* a partir del gen *nuc* se expresa una term nucleasa de 17000 Da, con actividad endonucleasa que degrada DNA y RNA (Tucker, Hazen, & Cotton, 1978). Sin embargo, el uso de la identificación de *S. aureus* por *nuc*, debe ser complementado con otras técnicas. Debido a que se ha comprobado que otras especies como *S. intermediu*, *S. hyicus* y *S. Schleiferi*, también expresan la enzima (Brakstad et al., 1992).

- Gen *mecA*

El gen *mecA* se encuentra en el genoma de bacterias resistentes a antibióticos betalactámicos, como metilina y penicilina (Bignardi, Woodford, Chapman, Johnson, & Speller, 1996). Las bacterias que producen penicilinas, hidrolizan a betalactámicos junto con la proteína de unión a penicilina (PBP2a) (F.-J. Chen, Wang, Chen, Hsu, & Wang, 2014)

Patogenicidad

La patogenicidad de las infecciones por *S. aureus* se relaciona a los componentes de la superficie, como son los peptidoglucanos, ácidos teicoicos y proteína A (Zendejas et al., 2014). Así mismo, se ve influenciada por los factores de virulencia que llegan a expresarse (Tabla 2).

Tabla 2*Factores de patogénesis en S. aureus*

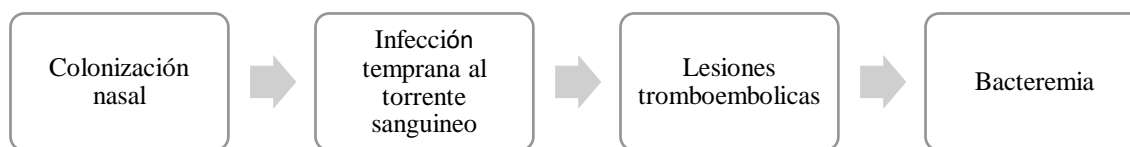
Componente superficial	Descripción	Toxinas y enzimas extracelulares
Polisacárido capsular	Con actividad sobre membranas.	Hemolisinas α y β .
Polisacárido extracelular	Toxinas con actividad de super antígenos.	Toxina del síndrome de choque toxico 1 (TSST-1)
Proteínas superficiales	Proteínas de unión, y enzimas con actividad coagulasa, lipasa, proteasa, termonucleasa, catalasa	Proteínas de unión a fibrinógeno, ClfA y ClfB

Nota: Adaptado de “Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación”, por G. Zendejas, H. Avalos, & Y. Soto, 2014, *Revista Biomed.*

El desarrollo de la bacteremia, generalmente parte de la colonización nasal, seguido por la activación de genes que interactúan en el paso de la infección al torrente sanguíneo, produciendo lesiones tromboembólicas (Figura 7).

Figura 7

Desarrollo de patogenicidad de S. aureus.



Nota. Adaptado de “Differential Expression and Roles of Staphylococcus aureus Virulence Determinants during Colonization and Disease”, por A. Jenkins, A. Diep, T. Mai, N. Vo, P. Warrenner, J. Suzich, R. Sellman, 2015, *MBio*, 6 (1).

Resistencia a antibióticos

S. aureus tiene una gran capacidad de adaptación, implementado adquisición de genes por transferencia horizontal, o a través de mutaciones en su genoma (Zendejas et al., 2014). Por ejemplo, la resistencia a vancomicina requiere de seis mutaciones, que remodelan la envoltura celular y reducen la permeabilidad del fármaco hacia el interior de la bacteria (Foster, 2017). La detección de los mecanismos de resistencia que desarrollan las bacterias contribuyen a la formulación de técnicas de vigilancia de susceptibilidad de antibióticos (Pantosti, Sanchini, & Monaco, 2007). Importantes para la planificación de tratamientos en el área médica y al desarrollo de nuevos medicamentos. En la Tabla 3, se describen mecanismos por los cuales las infecciones por *S. aureus* se han generado a pesar de tener tratamiento con antibióticos.

Tabla 3

Resumen de mecanismos de resistencia a antibióticos por S. aureus

Antibiótico	Resistencia
Penicilina, meticilina	Inactivación del antibiótico por la generación de proteínas que lo hidrolizan.
Vancomicina, daptomicina	Atrapamiento del antibiótico, por mutaciones en proteínas de la pared celular
Fluoroquinolonas, tetraciclina	Bombas de salida o eflujo
Tigeciclina	Cambio conformacional del sitio de unión
Aminoglucósidos	Producción de acetiltransferasa-fosfotransferasa bifuncional. Alteración del sitio de unión.

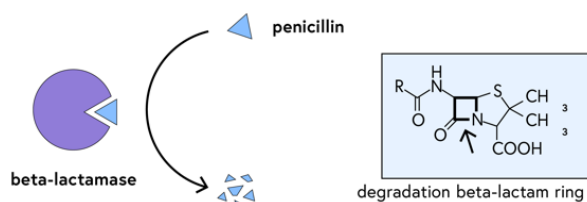
Nota: Adaptado de "Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus", por TFoster, 2017, FEMS Microbiology Reviews, 41 (3).

Mecanismos de resistencia

Inactivación enzimática: Para el caso de la penicilina las cepas resistentes de *S. aureus* han adquirido la síntesis de la enzima β -lactamasa mediada por el gen *blaZ* (Lowy, 2003). La enzima digiere el anillo β -lactámico de los antibióticos de este tipo (Figura 8).

Figura 8

Inactivación enzimática de penicilina por β -lactamasa.

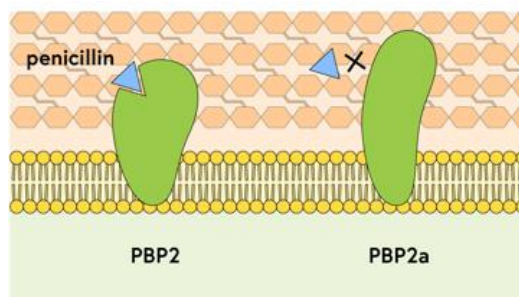


Nota. Adaptado de *Bacterial Genomes: Antimicrobial Resistance in Bacterial Pathogens* [Figura], por Wellcome Genome Campus Advanced Courses and Scientific Conferences, 2020, Future Learn (<https://www.futurelearn.com/courses/antimicrobial-resistance/1/steps/660070>)

Reemplazo del sitio de unión: El gen *mecA* sintetiza la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a), la cual cumple con la función de unir las cadenas de peptidoglicanos para que formen redes tridimensionales al igual que las proteínas PBP (Lowy, 2003). PBP2a cuenta con la diferencia que su sitio activo es de baja afinidad de los β -lactámicos (Figura 9).

Figura 9

Reemplazo del sitio de unión.

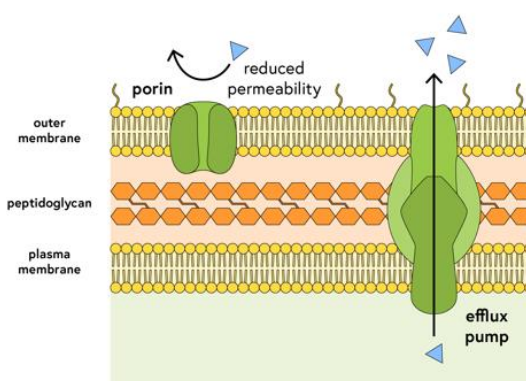


Nota. Adaptado de *Bacterial Genomes: Antimicrobial Resistance in Bacterial Pathogens* [Figura], por Wellcome Genome Campus Advanced Courses and Scientific Conferences, 2020, Future Learn (<https://www.futurelearn.com/courses/antimicrobial-resistance/1/steps/660070>)

Eflujo y permeabilidad reducida: La resistencia a las quinolonas se debe a la sobreexpresión de bombas de eflujo sintetizadas por el gen *norA* (Pantosti et al., 2007). Como se describe en la Figura 10.

Figura 10

Permeabilidad reducida y bomba de eflujo.



Nota. Adaptado de *Bacterial Genomes: Antimicrobial Resistance in Bacterial Pathogens* [Figura], por Wellcome Genome Campus Advanced Courses and Scientific Conferences, 2020, Future Learn (<https://www.futurelearn.com/courses/antimicrobial-resistance/1/steps/660070>)

Adquisición de mecanismos de resistencia

Mutación: la resistencia a las fluoroquinolonas es un mecanismo adquirido por mutaciones espontáneas. Las fluoroquinolonas son antibióticos dirigidos a la inhibición de la topoisomerasa II que actúa aliviando la tensión del superenrollamiento del DNA. Por este motivo, *S. aureus* se ha adecuado al insertar mutaciones que cambian los aminoácidos en las secuencias de los genes *parC* o *gyrA* que sintetizan DNA topoisomerasa IV y topoisomerasa II, respectivamente (Pantosti et al., 2007).

Plásmidos: *S. aureus* contiene plásmidos de 1 a 60 kpb, los cuales movilizan genes de resistencia para penicilinas y aminoglucósidos (Haaber, Penadés, & Ingmer, 2017). Por ejemplo, los plásmidos pSAS, pPI258 y pMW2 sintetizan β -lactamasa.

Transposones: son elementos conjugativos integrativos que están en el cromosoma del huésped y contienen genes que les permite integrarse y eliminarse del cromosoma. Se propagan durante la replicación y división celular (Haaber et al., 2017). Por ejemplo, en *S. aureus* se han encontrado Tn916 responsable de la resistencia a tetraciclina, Tn1546 de resistencia a vancomicina y Tn552 de resistencia a penicilina (Haaber et al., 2017; Pantosti et al., 2007).

Mecanismos mixtos: las cepas de MRSA contienen un elemento genético móvil llamado casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCCmec). SCCmec contiene el gen *mecA* protegido por un transposón y a su vez se puede insertar en el cromosoma (Lowy, 2003). Lo que le permite transmitirse verticalmente y en algunos casos presentar resistencias adicionales.

Factores de virulencia

Los factores de virulencia son moléculas que se producen durante un proceso infeccioso, que permiten al patógeno colonizar y evadir la respuesta inmune (Cross, 2008). Entre estos se encuentran mecanismos de adhesión a células, transporte de cofactores, efectos citotóxicos, evasión del sistema inmune y síntesis de bases nitrogenadas (Connolly et al., 2017; Jenkins et al., 2015).

Los superantígenos, son factores de virulencia de evasión del sistema inmune. El más conocido es el TSST-1 encontrado durante episodios de síndrome de shock tóxico, sepsis y endocarditis infecciosa (T. A. Taylor & Unakal, 2019).

Tabla 4

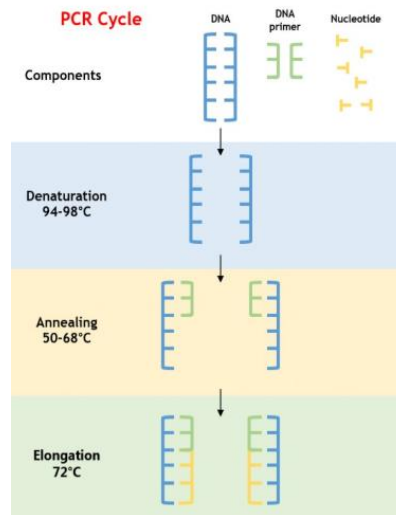
Factores de virulencia expresados por S. aureus.

Nombre del gen	Función	Fuente
Gen de la proteína de repetición de serina-aspartato subunidad C (<i>sdrC</i>)	Permite la interacción con componentes extracelulares de los eucariotas	(H. Liu et al., 2015)
Gen de la proteína A de unión a la fibronectina (<i>fnbA</i>)	Reconoce fibrinógeno y elastina, confiriendo a la bacteria la capacidad de invadir células endoteliales	(Feizabadi et al., 2012).
Gen de la proteína del receptor de hidroxamato férrico II (<i>fhuD</i>)	Sideróforo de hidroxamato	(Sebulsky & Heinrichs, 2001).
Gen de la lipoproteína de <i>sstD</i> (<i>sstD</i>)	Sideróforo, transportador de hierro	(Morrissey, Cockayne, Hill, & Williams, 2000).
Gen de alfa-hemolisina (<i>hla</i>)	Efecto citotóxico en células epiteliales, y endoteliales. Además, de que actúa en la evasión de la respuesta inmune contra células T, monocitos y macrófagos	(Tavares et al., 2014).

En el desarrollo de la patogenicidad durante una infección por *S. aureus*, se han identificado *in vitro* los siguientes genes como factores de virulencia *clfA*, *icaB*, *sasA*, *tagO*, *tark*, *sdrC*, *efb*, *sasG*, *isdH*, *isdB*, *isdA*, *sbi*, *pvfF*, *fnbA*, *fhuD*, *sstD* y *hla* (Jenkins et al., 2015). Los genes descritos en la Tabla 4 a continuación se encontraron expresados durante todo el proceso infeccioso por los cuales fueron seleccionados dentro de un panel de candidatos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa fue desarrollada por Kary Mullis en 1986, y se ha optimizado al nivel que se aplica en diagnóstico de enfermedades, ciencias forenses, identificación de patrones genéticos, entre otros (Rahman, Uddin, Sultana, Moue, & Setu, 2013). Según lo describe (Garibyan & Avashia, 2013), el proceso general de la PCR incluye la desnaturalización del ácido desoxirribonucleico (DNA) a temperaturas de alrededor de 95°C, seguido el templado de los primers o cebadores, que son secuencias específicas que se adjuntan a su contraparte del DNA a 55°C. Posteriormente, la extensión por la polimerasa de DNA, que completa la secuencia y la duplica. El proceso se resume en la Figura 11, se observa que se debe realizar por algunos ciclos para aumentar la concentración del gen de interés.

Figura 11*Esquematización de la PCR*

Nota. Adaptado de *Conventional PCR* [Figura], por Generon, 2020, Generon (<https://www.generon.co.uk/buy/cat-conventional-pcr-3473.html>).

Reacción de cadena de la polimerasa múltiple (PCR multiplex)

La PCR multiplex es similar a la PCR convencional, son la única diferencia que se aplican dos o más genes a amplificar. Esta técnica requiere de un proceso de estandarización, en el cual se determina las temperaturas de denaturalización, templado y extensión, en las cuales se amplifiquen los genes diana (Rajalakshmi, 2017).

Reacción de cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

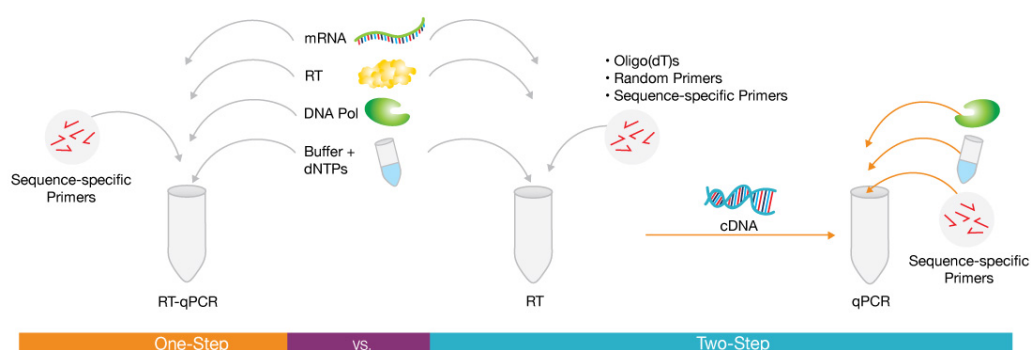
Este método emplea fluorescencia en cada ciclo de amplificación, el cual es detectado para dar valores de cuantitativos de la amplificación de genes. (Rahman et al., 2013). Se puede realizar a partir de DNA, ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA), y ácido ribonucleico

(RNA). Se pueden emplear sondas fluorescentes o fluorocromos de unión inespecífica a DNA como SYBR Green.

Cuando se inicia de cDNA, se denomina PCR de transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR). En la cual, se pueden medir y comparar los niveles de expresión de varios genes (ThermoFisher Scientific, n.d.). Existen dos tipos, de un paso cuando se insertan todos los componentes y se inicia de RNA para obtener cDNA, o de dos pasos, donde la transcripción inversa se realiza primero y después la amplificación de los genes (Figura 12).

Figura 12

RT-qPCR de un paso y dos pasos



Nota. Adaptado de *Basic Principles of RT-qPCR – EC* [Figura], por ThermoFisher Scientific.

(<https://www.thermofisher.com/ec/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>)

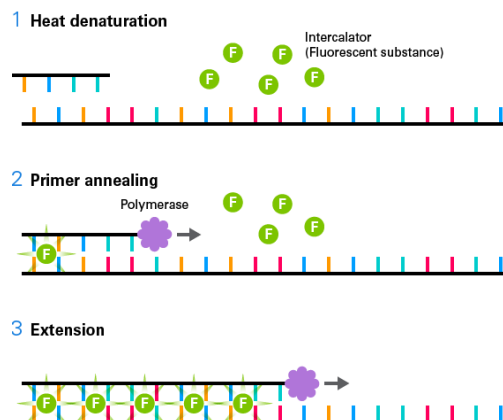
Química SYBR

SYBR Green I es un tinte fluorescente que se une al DNA de doble cadena durante la fase de alineamiento (ThermoFisherScientific, 2015). Al unirse la intensidad de la fluorescencia

incrementa, logrando así cuantificar la cantidad de DNA especificado por los primers, que se está amplificando por cada ciclo (Figura 13).

Figura 13

Mecanismo de SYBR Green I.



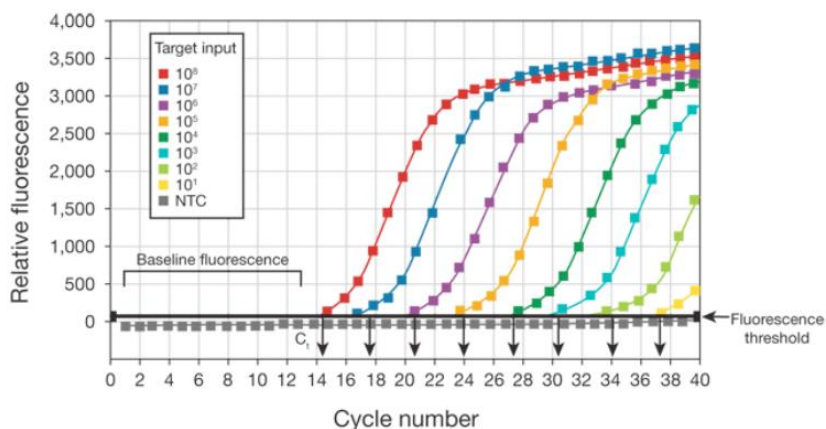
Nota. Adaptado de *TB Green-based qPCR kits* [Figura], por Takara Bio Inc, 2020, (<https://www.takarabio.com/learning-centers/real-time-pcr/overview/tb-green-based-qpcr-kits>)

Curva de amplificación

La detección de la fluorescencia por el equipo de tiempo real se demuestra por la curva de amplificación (Figura 14). En la curva se visualiza la línea base (baseline) que se define como los ciclos en los cuales hay poca intensidad de fluorescencia. El umbral o threshold, es el nivel que refleja estadísticamente aumento significativo de la fluorescencia. El threshold cycle (Ct) es el número de ciclo en el cual la señal fluorescente es mayor al umbral. Al Ct también se lo denomina crossing point (Cp) o quantification cycle (Cq).

Figura 14

Curvas de amplificación de qPCR.



Nota. Adaptado de *Realtime PCR handbook* [Figura], por ThermoFisherScientific, 2015, (<https://doi.org/10.1006/excr.2001.5278>)

Cuantificación relativa

La cuantificación relativa es un experimento en el cual se compara la expresión de un gen de interés en una muestra en relación con la de un control o gen de referencia (Arya et al., 2005). Los resultados se analizan en razón de aumento o disminución de expresión frente al gen de mantenimiento endógeno (ThermoFisherScientific, 2015).

Método Pfaffl

Es un modelo matemático que permite analizar de forma cuantitativa los resultados de la qPCR. A través de método Pfaffl se estima la relación de cuantificación relativa de la expresión de un gen diana con respecto a la expresión de un gen de referencia (Pfaffl, 2001). Se usa para determinar cuantitativamente si el gen diana se está expresando, comparándolo con la expresión de un gen de referencia, cuyo nivel de expresión es conocido. La relación se estima

como ratio de la ecuación 1, donde E, equivale a la eficiencia y ΔC_p la diferencia de la muestra a analizar frente al control (Pfaffl, 2001).

$$ratio = \frac{(E_{gen\ diana})^{\Delta C_{p\ diana\ (control-muestra)}}}{(E_{gen\ referencia})^{\Delta C_{p\ referencia\ (control-muestra)}}} \quad (1)$$

$E_{gen\ diana}$ y $E_{gen\ referencia}$ corresponden a la eficacia de la qPCR del gen objetivo, y del gen de referencia, respectivamente. El gen de referencia debe ser un gen el cual se transcriba de forma estable y segura (Pfaffl, 2001). Las eficiencias de la qPCR se calculan por la ecuación 2. La pendiente se calcula a través de la recta resultante en la gráfica de curva estándar. Tomando en cuenta concentraciones conocidas del ácido nucleico plantilla y los C_p de cada concentración.

$$E = 10^{[-1/pendiente]} \quad (2)$$

Capítulo III: Metodología

Zona de estudio

La experimentación se ejecutó en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, en el Laboratorio Biotecnología Humana de Nanomedicina y Nanobiología, ubicado en la Avenida General Rumiñahui, de la parroquia de Sangolquí, del Cantón Rumiñahui de la provincia de Pichincha, localizado en Latitud: 0°18'52.329, Longitud: 78°26'37.29, Altura elipsoidal: 2497 m.

Participantes

El trabajo de titulación se realizó bajo la dirección del jefe del laboratorio de Biotecnología Humana Dr. Marcelo Grijalva, M.D., PhD. Además, de tutorías a cargo de Ing. Lizeth Salazar e Ing. Andrea Rodríguez.

Periodo de investigación

La experimentación y posterior redacción del trabajo de titulación se inició el mes de agosto del 2019 hasta agosto 2020.

Procedimientos

Recuperación de los aislados clínicos

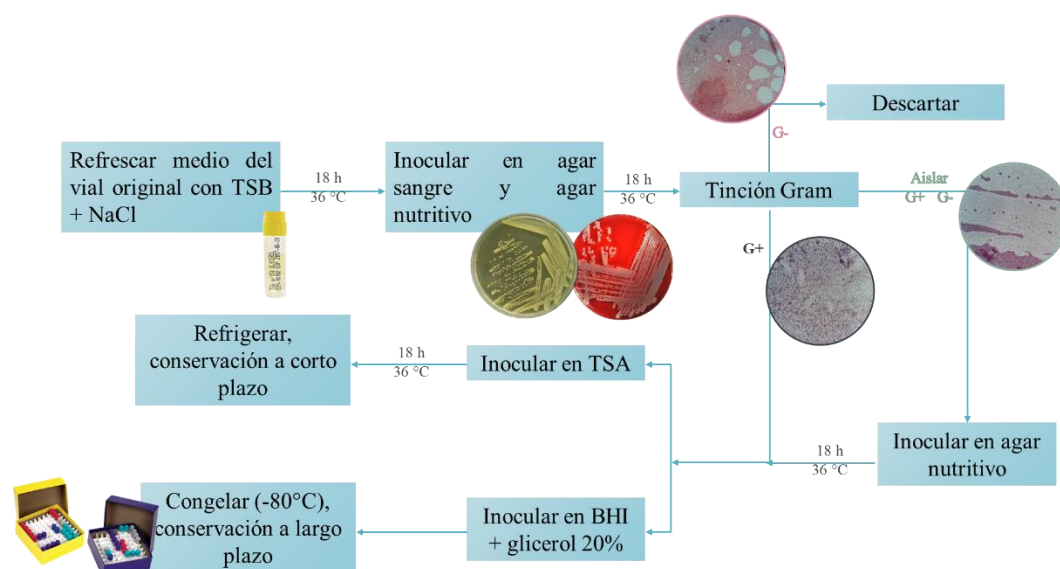
Se realizó la recuperación de los aislados clínicos provenientes de los hospitales Eugenio Espejo (HEE) Carlos Andrade Marín (HCAM), preservados por el laboratorio de Biotecnología Humana, durante el período entre 2015 a 2017.

Se seleccionó viales de aislados clínicos preservados en agar de soya triptona (TSA) almacenados a 4 °C. Se ambientó los viales a temperatura ambiente por una hora, y se colocó en la incubadora a 36 °C por una hora. Al vial original se agregó 100 µl de caldo nutriente y se mantuvo a 36 °C por 18 horas. Se tomó del vial original humectado empleando asas de metal

estéril y se inoculó por estrías en cajas Petri de agar nutritivo y agar sangre. Se incubó a 36°C por 18 horas, y se revisó el crecimiento. En muestras que no se observó crecimiento se dejó incubar hasta 96 horas revisando el crecimiento cada 18 horas. Por medio de tinción Gram y en el microscopio óptico (CX31, Olympus) se verificó la presencia de cocos Gram-positivos. Las muestras que demostraron crecimiento y pureza se almacenaron en viales con TSA (Becton Dickinson) a 4°C, hasta que se inició el paso de selección para el estudio molecular. Para almacenar a largo plazo se conservó a -80°C en viales con caldo de BHI (Becton Dickinson) suplementado con glicerol 20% (Figura 15).

Figura 15

Esquematación del proceso de recuperación y conservación de aislados clínicos.



Identificación molecular de *Staphylococcus aureus* sensible y resistente

El propósito de la identificación molecular fue la caracterización de genes relacionados a *S. aureus* y la verificación de la presencia de mecanismos de resistencia a antibióticos en el genoma.

Preparación de la muestra

En la primera parte del proceso se empleó el protocolo establecido por el Laboratorio de Biotecnología Humana, donde se inoculó los aislados recuperados en caldo nutritivo (Merck) a 36°C por 18 horas. Se recolectó 1.5 mL de cultivo en un microtubo de 2 mL. Seguido, se centrifugó a 14000 rpm por 10 min (Minispin Plus, Eppendorf). Se desechó el sobrenadante y se continuó con la extracción de DNA con el pellet.

La segunda parte consiste en lo estipulado por el kit de extracción de DNA PureLink[®] Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), para bacterias Gram-positivas. Se resuspendió el pellet con 180 µL de buffer de digestión (PureLink Genomic Digestion Buffer) suplementado con lisozima en concentración final de 20 mg/mL, se mezcló por vortex. Se incubó los viales en baño maría seco (Genesis Dry Bath, Cleaver Scientific) a 37°C durante 1 hora. Se adicionó 20 µL de proteinasa K para lisar las bacterias, y se mezcló por vortex. Seguido se añadió 200 µL de buffer de lisis (Pure Link Genomic Lysis/Binding buffer) y se mezcló por vortex hasta obtener una solución homogénea. Se incubó a 55°C por 30 minutos. Se añadió 200 µL de etanol 99%, y se mezcló por vortex durante 5 segundos, hasta que se obtuvo una solución homogénea.

Extracción de DNA

Se colocó la solución anterior en la columna proporcionada por el kit. Se centrifugó la columna a 14100 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el contenido recolectado por el tubo y se ingresó la columna en su tubo colector correspondiente. Se añadió a la columna 500 µL de buffer de lavado 1 (Wash Buffer I), y se centrifugó a 14100 rpm por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se añadió 500 µL de buffer de lavado 2 (Wash Buffer II) y se centrifugó a 14500 rpm por 3 minutos. Se descartó el contenido del tubo y se colocó la columna en un nuevo tubo colector. Se añadió 50 µL de buffer de elución (Genomic Elution

Buffer) y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Seguido se centrifugó la columna a temperatura ambiente durante 1 minuto a 14500 rpm. Se recolectó el contenido del tubo colector en un tubo limpio de 0.6 mL. Se realizó el paso de elución dos veces. Se conservó el DNA a -80°C.

Primers de caracterización de susceptibilidad

Los primers correspondientes a los genes *nuc* y *mecA*, empleados en la determinación de la susceptibilidad fueron los descritos por Louie et al., (2002). Mientras que, el control de la reacción de PCR se llevó a cabo con la observación de amplicones de *16s*, usando primers disponibles en el laboratorio de Biotecnología Humana. La verificación de los tamaños de los amplicones se realizó mediante la herramienta virtual de Primer Blast del Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Los resultados obtenidos por el programa se resumen en la Tabla 5, y se encuentran en el Anexo A.

Tabla 5

Primers de caracterización de susceptibilidad para S. aureus.

Gen	Secuencia (5' → 3')	Tamaño
<i>16S</i>	F: 5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' R: 5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3'	928 bp
<i>nuc</i>	F: 5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3' R: 5'-AGC CAA GCC TTG AAC GAA CTA AAG C-3'	280 bp
<i>mecA</i>	F: 5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3' R: 5'-AGT TCT GGA GTA CCG GAT TTG C-3'	533 bp

Caracterización de aislados sensibles y resistentes mediante PCR multiplex

La clasificación entre aislados clínicos de *S. aureus* como sensibles y resistentes se realizó por PCR multiplex con los genes *nuc* para identificar especie, *mecA* de caracterización de gen de resistencia y *16S* como control. La PCR multiplex se desarrolló con el kit Magnitaq Multiplex PCR Master Mix (Affymetrix) con volumen final de 20 μL por reacción. Los componentes se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6

Concentración de los componentes para una reacción de PCR multiplex por kit Magnitaq Multiplex PCR Master Mix (Affymetrix).

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Magnitaq multiplex PCR master Mix (2x)	2x	1x	10.00
Primers 16S (c/u)	10 μM	0.2 μM	0.40*
Primers <i>nuc</i> (c/u)	10 μM	0.2 μM	0.40*
Primers <i>mecA</i> (c/u)	10 μM	0.5 μM	1.00*
DNA	50 ng/ μL	2.5 ng/ μL	1.00
Agua	-	-	5.40
Volumen final (μL)			20.00

Nota: Se adiciona el volumen indicado para el primer forward y reverse.

Se siguió el programa sugerido por el proveedor (Tabla 7), en el termociclador (FTC51H2D, Techne) con tiempo promedio de programa de 2 horas 35 minutos.

Tabla 7

Programa del termociclador para amplificación de genes de caracterización de S. aureus por kit Magnitaq Multiplex PCR Master Mix (Affymetrix).

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	95	5 min	1
Denaturación	95	15 s	
Alineamiento	58	60 s	30
Extensión	68	2 min	
Extensión final	68	10 min	1
Conservación	4	-	-

La confirmación de las muestras faltantes y resultados inconcluyentes se comprobó por el kit Phusion U Multiplex PCR Master Mix (ThermoFisher), debido a la falta de disponibilidad del kit usado previamente. Se siguieron las instrucciones indicadas por el proveedor y se pipetearon los componentes de la Tabla 8.

Tabla 8

Componentes de PCR multiplex por kit Phusion U Multiplex PCR Master Mix (ThermoFisher).

Componente	Concentración	Concentración	Volumen
	inicial	final	(μL)
Phusion U Green Multiplex PCR			
Master Mix	2x	1x	10.00

Componente	Concentración		Volumen (μL)
	inicial	final	
Primers 16S (c/u)	10 μM	0.2 μM	0.40*
Primers <i>nuc</i> (c/u)	10 μM	0.2 μM	0.40*
Primers <i>mecA</i> (c/u)	10 μM	0.5 μM	1.00*
DNA	50 ng/ μL	2.5 ng/ μL	1.00
Agua	-	-	5.40
Volumen final (μL)			20.00

Nota: Se adiciona el volumen indicado para el primer forward y reverse.

El programa se modificó de acuerdo con los requerimientos de la enzima provista en el kit (Tabla 9).

Tabla 9

Programa PCR multiplex por kit Phusion U Multiplex PCR Master Mix (ThermoFisher).

Proceso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	98	30 s	1
Denaturación	98	10 s	
Alineamiento	58	30 s	30
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	30 s	1
Conservación	4	-	-

Electroforesis en gel de agarosa

Los resultados de la amplificación de PCR multiplex de la caracterización de susceptibilidad de *S. aureus*, se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa. El gel se preparó al 2% (v/w) con agarosa (Invitrogen) diluida en buffer TBE 1X.

Para cargar las muestras en el gel, se diluyeron 5 μ L de solución de amplicon de PCR con 2 μ L del buffer de carga (Blue/Orange Loading Buffer Dye 10X; Promega). Se homogenizó la solución por pipeteo y se cargó 7 μ L por pocillo. Como marcador de peso molecular se mezcló 2 μ L de marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) con 2 μ L de buffer de carga. La corrida se ejecutó a 100 voltios durante 45 minutos en la fuente de poder (EC-300XL, Thermo Scientific). Se visualizó la migración de los fragmentos de 928 bp, 533 bp y 280 bp, correspondientes a *16S*, *mecA* y *nuc*, respectivamente, en el fotodocumentador (Dark Hood 40, Biostep).

Expresión de factores de virulencia de Staphylococcus aureus

Los factores de virulencia son genes que se expresan como respuesta al proceso infeccioso, en el cual confieren al patógeno, mecanismos de proliferación y de evasión del sistema inmune. Al identificar de manera oportuna los factores de virulencia de aislados clínicos provenientes de infecciones diseminadas, se puede establecer un método de identificación temprana.

Diseño de primers para el panel de factores de virulencia

Los genes diana o factores de virulencia se basaron según los ensayos realizados por Jenkins et al., (2015). Por lo cual, se consideración los primers para los genes *fnbA*, *fhuD*, *sstD* y *hla*. Además, del gen *gyr*, que inicialmente se planteó como gen de referencia (Goerke, Bayer, & Wolz, 2001). Sin embargo, se ha visto que *gyr* se sobreexpresa como resistencia a fluoroquinolonas por lo cual se plantea como gen diana. La validez de los primers para varias

cepas de *S. aureus* se verificó mediante la herramienta virtual Primer Blast (Anexo B). El resumen del tamaño de los fragmentos se encuentra en la Tabla 10. Además, se probó con el gen *nuc* empleado en la sección anterior junto *16S*, como genes de referencia.

Tabla 10

Primers del panel de factores de virulencia de S. aureus.

Gen	Secuencia (5' → 3')	Tamaño	Fuente
<i>fnbA</i>	F: GGA GCA TCA GTA TTC TT R: AGT TGC AGT TGT TTG TGT TT	153 bp	(Jenkins et al., 2015)
<i>hla</i>	F: GTG TAT GAC CAA TCG AAA CAT TTG CA R: GGT AAT GTT ACT GGT GAT GAT ACA GGA A	73 bp	(Jenkins et al., 2015)
<i>fhuD</i>	F: CCC AAA CAT CAC GGT CAA CAA T R: AGA AGT TAC AAG AAG ATG CAA CAT GGA	84 bp	(Jenkins et al., 2015)
<i>sstD</i>	F: ACC TAA AGG GGA AGG CGG TA R: TTA CTT CGG GTT TCG CA	128 bp	(Jenkins et al., 2015)
<i>gyr</i>	F: TTA TGG TGC TGG GCA AAT ACA R: CAC CAT GTA AAC CAC CAG ATA	338 bp	(Goerke et al., 2001)
<i>16S</i>	F: GTA GGT GGC AAG CGT TAC C R: CGC ACA TCA GCG TCA G	229 bp	(Jenkins et al., 2015)

Extracción de RNA

Se usó el protocolo descrito por el kit RNA PureLink Mini Kit (Ambion), donde se inoculó los aislados en caldo nutritivo a 36°C durante 18 horas. Seguido se pipeteó 1.5 mL de cultivo en un microtubo de 2 mL y se centrifugó a 7600 rpm por 5 min. Se descarta el sobrenadante.

Se añadió 100 µL de solución de lisozima que contiene 20 mg/mL de lisozima con Tris – HCl 10 mM y 0.1 mM EDTA. Se resuspendió el pellet por vortex. Se adicionó 1 µL de SDS 10%, y se mezcló por vortex. Se incubaron las bacterias por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 350 µL de solución de buffer de lisis (Lysis Buffer) preparado con 2-mercaptoetanol al 1%. Se homogenizó la solución y las bacterias pasando 5 veces a través de una jeringa de 21G. Se centrifugó a 13400 rpm por 2 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo de 1.5 mL. Se adicionó 250 µL de etanol 100% frío y se mezcló por vortex para dispersar cualquier precipitado visible. La solución se trasladó a una columna proporcionada por el kit.

En la columna se centrifugó la solución a 13400 rpm por 15 segundos, se descartó el líquido y se reinsertó la columna en el mismo tubo colector. Se añadió 700 µL de buffer de lavado I (Wash Buffer I) y se centrifugó a 13400 rpm por 15 segundos. Nuevamente, se descartó la solución del tubo colector y se reinsertó la columna. Se agregó 500 µL de buffer de lavado II (Wash Buffer II) y se centrifugó a 13400 rpm por 15 segundos y se desechó el líquido, este paso se realizó por duplicado. Seguido se centrifugó la columna durante 1 minuto para secar la membrana y se ubicó la columna en un nuevo tubo colector. Se adicionó 50 µL de agua libre de RNasa (RNase-Free Water) y se incubó durante 1 minuto, seguido se centrifugó a 13400 rpm por 2 minutos. Se prosiguió a la purificación del líquido recolectado.

Purificación de RNA

El RNA obtenido se purificó mediante el kit TURBO DNA-free™ (Ambion), donde al líquido recolectado se adicionó 5 μ L de buffer (10X TURBO DNase Buffer) y 1 μ L de DNasa (TURBO DNase), se incubó a 37°C por 30 minutos en baño maría seco (2911B, Daigger). Se añadió 5 μ L del reactivo de inactivación (DNase Inactivation Reagent) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente con mezclas ocasionales. Se centrifugó a 12500 rpm por 90 segundos y se transfirió sobrenadante con RNA a un microtubo nuevo.

El RNA purificado se cuantificó en espectrofotómetro (Genova Nano, Jenway) y la identificación cualitativa se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) al 1.2% (v/w) en TBE, visualizando el gel en el fotodocumentador (Dark Hood 40, Biostep).

Síntesis de cDNA

Se empleó el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche). Con el propósito de obtener cDNA a partir del RNA extraído previamente. Se descongelaron los componentes enumerados en la Tabla 11, y se agregó en un tubo libre de nucleasas. El volumen de agua grado PCR depende de la concentración inicial de RNA en la que se encontraba la muestra.

Tabla 11

Componentes para síntesis de cDNA

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Primer aleatorio hexámero	600 μ M	60 μ M	2.00
Buffer	5 X	1 X	4.00
Inhibidor de RNasa	40 U	20 U	0.50
Mezcla de desoxinucleótidos	10 mM	1 mM	2.00

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Transcriptasa reversa	20 U	10 U	0.50
RNA total	-	25 ng/ μL	-
Agua grado PCR	-	-	-
Volumen final (μL)			20.00

Los componentes se mezclaron brevemente por centrifugación y se colocaron los viales en el termociclador (FTC51H2D, Techne) con tiempo promedio de programa de 1 hora 30 minutos (Tabla 12).

Tabla 12

Programa de síntesis de cDNA

Proceso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Ciclos
Síntesis de cDNA	25	10 min	1
	50	60 min	1
Inactivación	85	5 min	1
Conservación	4	-	-

Establecimiento de temperaturas de alineamiento por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (rt PCR).

Se empleó el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen), con el objetivo de determinar las temperaturas de alineamiento correspondientes a cada primer de los genes diana.

Se preparó el máster mix con los componentes descritos en la Tabla 13. Con dos controles negativos, donde el primero se sustituyó el RNA con agua grado PCR; y el segundo control negativo se cambió la enzima con GoTaq para verificar la ausencia de DNA en las muestras de RNA.

Tabla 13

Componente de rt PCR

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Mix de reacción	2 X	1 X	6.25
Primer forward	10 μM	0.5 μM	0.625
Primer reverse	10 μM	0.5 μM	0.625
Super Script III y Platinum Taq	-	-	0.50
Agua grado PCR	-	-	2.00
RNA total	5 ng/ μL	1 ng/ μL	2.50
Volumen final (μL)			12.50

Se ejecuto el programa (Tabla 14) el gradiente de temperatura de 54 °C, 57 °C y 60°C, termociclador (FTC51H2D, Techne).

Tabla 14

Programa de rt PCR

Proceso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Ciclos
Síntesis de cDNA	55	30 min	1

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94	2 min	1
Denaturación	94	30 s	
Alineamiento	54, 57, 60	1 min	35
Extensión	68	30 s	
Extensión final	68	5 min	1
Conservación	4	-	-

Los resultados fueron observados en gel de agarosa al 1.5% en TBE, y visualizados en el fotodocumentador (Dark Hood 40, Biostep).

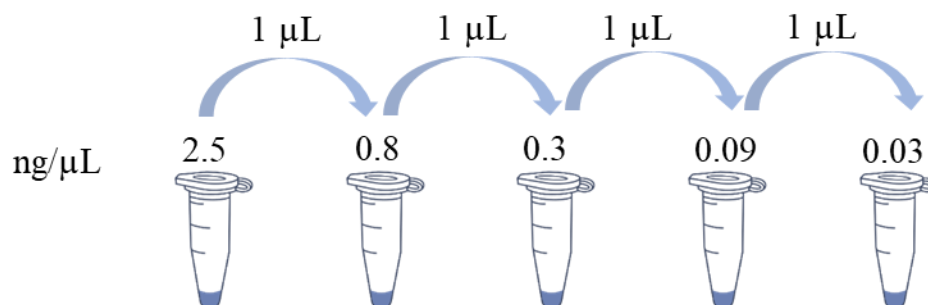
Sensibilidad analítica y curva de calibración de los factores de virulencia por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

En la qPCR se basó en el procedimiento establecido por Jenkins et al., (2015), donde menciona el uso de kit para síntesis de cDNA, seguido por la qPCR de los genes diana *gyr*, *fnbA*, *fhuD*, *sstD* y *hla*.

En la sensibilidad analítica y curva de calibración se usó diluciones de cDNA de la muestra AG y BJ. Mediante ensayos previos se optó por usar la dilución en factor 1 en 3, para los genes *fnbA*, *fhuD*, *sstD* y *hla*. Para las diluciones se tomó 1 µL de cDNA al 2.5 ng/µL y se homogenizó con 2 µL de agua destilada grado biología molecular. Consecutivamente, y hasta completar las cinco diluciones de cDNA se toma 1 µL de la dilución anterior y se mezcla con 2 µL de agua (Figura 16).

Figura 16

Dilución seriadas en rango 1 en 3 de cDNA.

**Tabla 15**

Componentes de ensayo de qPCR. a) 16S, nuc. b) hla, fhuD, fnbA, gyr, sstD.

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Mix de reacción	2 X	1 X	5.00
Primer forward	10 μM	0.2 μM ^a – 0.5 μM ^b	0.2 ^a – 0.5 ^b
Primer reverse	10 μM	0.2 μM ^a – 0.5 μM ^b	0.2 ^a – 0.5 ^b
RNA total	25 ng/μL	2.5 ng/μL	1.00
Agua grado PCR	-	-	3.6 ^a – 3.0 ^b
Volumen final (μL)			10.00

En el caso de *nuc* y *16S* se optó por la dilución 1 en 5, del cDNA de la muestra 61.

Siguiendo el mismo procedimiento antes mencionado, que consiste en 1 μL de cDNA con 4 μL de

agua grado PCR. La qPCR se estandarizó mediante la química de SYBR Green, con el kit FastStart Essential DNA (Roche). Los componentes para una reacción se detallan en la Tabla 15.

La concentración de primers y temperaturas de alineamiento se variaron para obtener mejor amplificación en las curvas. El programa se ejecutó el programa en el equipo LightCycler® 96 System (Roche).

Tabla 16

Programa de qPCR. Temperatura de alineamiento para primers de genes a) fhuD, fnbA, hla, sstD, gyr, b) nuc, c) 16S.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Pre – incubación	95	10 min	1
Denaturación inicial	95	10 s	
Alineamiento	55 ^a , 61 ^b , 64 ^c	15 s	45
Extensión	72	20 s	
	95	10 s	-
Melting	65	60 min	-
	97	1 s	-

Caracterización de la expresión de los factores de virulencia por qPCR

Como genes de referencia se estudió *16S* y *nuc*, y genes diana a *fnbA*, *fhuD*, *sstD*, *hla* y *gyr*. Se usó un total de 31 muestras previamente caracterizadas como *nuc* positivo. Como muestra calibrador se extrajo RNA y se sintetizó cDNA de ATCC 25923 (KwikStik, Microbiologics), Sin embargo, la muestra ATCC no amplificó *hla*, *sstD* y *fnbA*, por lo que se ocupó como

calibrador la muestra AA sensible. Debido a que el gen de referencia y los genes diana trabajan a diferente temperatura, se ensamblaron las muestras en placas de 96 pocillos diferentes. Al finalizar el ensamblaje, se centrifugó la placa a temperatura ambiente a 2400 rpm durante 30 segundos (Centrifuge 5804 R, Eppendorf). Cada placa contenía un control negativo. Se empleó los mismos cálculos enunciados en la Tabla 15 junto con el programa de la Tabla 16, según el gen que correspondía.

En total se usaron 5 puntos por muestra y para cada gen. Se obtuvieron 6 repeticiones y realizó la prueba de Grubb para eliminar valores atípicos en la plataforma RStudio. La prueba de Grubb es un método estandarizado que permite descartar valores atípicos y ha sido empleada en otras investigaciones en tiempo real (Hui & Feng, 2013; Trypsteen et al., 2015). Así se retiró valores negativos o alejados de la media, contando con 5 puntos para el análisis. Se realizó la estadística descriptiva y cálculo de intervalos de confianza de los 5 puntos por gen y diferenciando por muestra en el programa InfoStat. Se estudio la normalidad de los Cp de las muestras por gen por la prueba de Shapiro-Wilk en RStudio.

La determinación del gen de referencia se llevó a cabo por la herramienta web RefFinder de Xie, Xiao, Chen, Xu, & Zhang (2012) (encontrado en <https://www.heartcure.com.au/reffinder/>). La cual recopila algoritmos como Delta CT, BestKeeper y NormFinder, ayudando con la selección del gen de referencia. Se estableció que *16S* era el más estable que *nuc* y se ocupó como gen de referencia para el análisis de expresión.

Se calculó las ratios de expresión por medio de la ecuación 1. Se corrigió la proporcionalidad de los datos al ajustarlos como logaritmo en base 2. Se analizó la inhibición o expresión mediante dos métodos. Primero de manera gráfica se diferenciaron las ratios

corregidos. Posteriormente, se realizó una prueba de T en Infostat, donde se comparó si la expresión individual de cada muestra es significativa frente a la del calibrador AA.

La diferencia de expresión según la susceptibilidad se efectuó con los datos de las ratios y ΔC_p (Ecuación 3). En los dos sets de datos se hizo por medio de la prueba de Mann-Whitney, debido a que se aprobó la hipótesis que los datos no siguen una distribución normal. Las gráficas de ratios de expresión y análisis de diferencias en la susceptibilidad se elaboraron en GraphPad Prism 8.0.1.

$$\Delta C_{t_{Muestra}} = C_{t_{referencia}} - C_{t_{diana}} \quad (3)$$

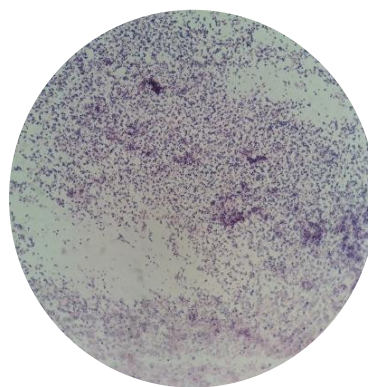
Capítulo IV: Resultados

Recuperación de *Staphylococcus aureus* provenientes de aislados clínicos

Se realizó la recuperación de los aislados clínicos provenientes de los hospitales Eugenio Espejo y Carlos Andrade Marín, previamente almacenados en el Laboratorio de Biotecnología Humana. Por lo tanto, se inocularon los viales originales en agar nutritivo para identificar las colonias redondeadas con bordes lisos de color amarillo y en agar sangre con el propósito de reconocer β - hemolisis. De los cultivos que cumplían las características se realizó tinción Gram para verificar la presencia de cocos Gram – positivos (Figura 17).

Figura 17

Muestra con cocos Gram – positivos, observado a 100X con aceite de inmersión en microscopio óptico (CX31, Olympus).



Se recuperó de un total de 245 aislados conservados en el laboratorio, 118 correspondían al HEE y 127 de HCAM (Tabla 17). De los provenientes de HEE 44 muestras, 26 se encontraron contaminados con bacterias Gram - negativas y 48 no indicaron crecimiento alguno. Mientras que, para HCAM, se logró recuperar 50 aislados, 35 estaban contaminadas y 42 no presentaron crecimiento.

Tabla 17

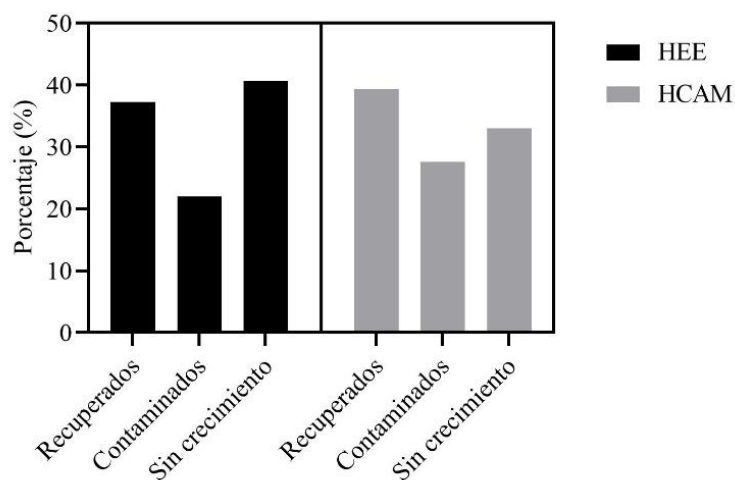
Resumen de resultados de recuperación de aislados clínicos por hospital de procedencia.

Hospital	Recuperados	Contaminados	Sin crecimiento	Total
HEE	44 (37.29 %)	26 (22.03 %)	48 (40.68%)	118 (48.16 %)
HCAM	50 (39.37 %)	35 (27.56 %)	42 (33.07 %)	127 (51.84 %)
Total	94 (38.37 %)	61 (24.90 %)	90 (36.73 %)	245 (100 %)

Como se observa en la Figura 18 entre hospitales no se distingue diferencia significativa entre la cantidad de aislados ($p_{\text{valor}} = 0.580$), de igual forma para cada una de las condiciones descritas (recuperados, contaminados, sin crecimiento ($p_{\text{valor}} = 0.163$), tomando en cuenta un nivel de significancia ($\alpha = 0.05$).

Figura 18

Frecuencias de recuperación de S. aureus provenientes de aislados clínicos.



De las 94 muestras recuperadas se comparó con la base de datos disponible en el laboratorio, para establecer cuales correspondían exclusivamente a *S. aureus* y se diferenciaron de acuerdo con su susceptibilidad a antibióticos como sensibles y resistentes. De lo cual, se determinó que 71 muestras de las recuperadas estaban descritas como *S. aureus*. Obteniendo 30 de HEE, clasificadas en 19 sensibles y 11 resistentes; así como del HCAM 41 en total con 31 sensibles y 10 resistentes (Tabla 18).

Tabla 18

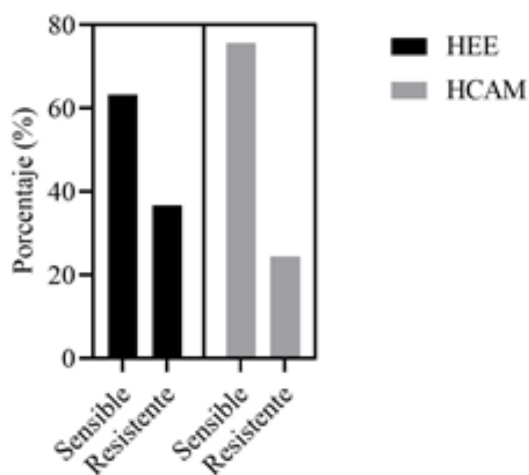
Clasificación de susceptibilidad a antibióticos de S. aureus según base de datos del laboratorio.

Hospital	Sensibles	Resistentes	Total
HEE	19 (63.33%)	11 (36.67 %)	30 (42.25 %)
HCAM	31 (75.61%)	10 (24.39 %)	41 (57.75 %)
Total	50 (70.42 %)	21 (29.58 %)	71 (100 %)

Por lo descrito en la Tabla 18, de igual forma no existe diferencia significativa de los datos con respecto al hospital de proveniencia de los aislados ($p_{\text{valor}} = 0.553$), así como para la susceptibilidad a antibióticos ($p_{\text{valor}} = 0.268$), ($\alpha = 0.05$). Se puede observar que, en tanto a proporciones para ambos hospitales, existe mayor incidencia de *S. aureus* sensibles respecto a los resistentes (Figura 19).

Figura 19

Porcentajes de susceptibilidad de aislados recuperados según base de datos.



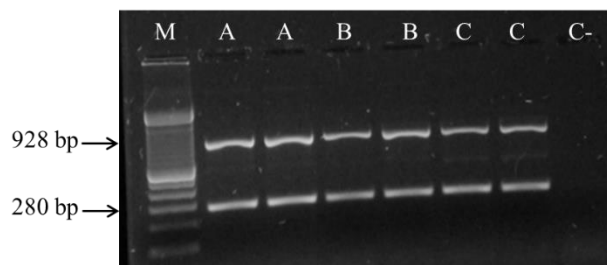
Identificación molecular de susceptibilidad *Staphylococcus aureus*

Las 71 muestras recuperadas supuestas como *S. aureus* se usaron para la identificación molecular por medio de los genes *nuc* para confirmar que son *S. aureus*, *mecA* de resistencia a antibióticos y *16S* como control de amplificación. De la Figura 20 a la Figura 30, son las muestras realizadas con el kit de Magnitaq Multiplex PCR Master Mix (Affymetrix). Mientras que, de la Figura 31 a la Figura 38, son del kit Phusion U Multiplex PCR Master Mix (ThermoFisher).

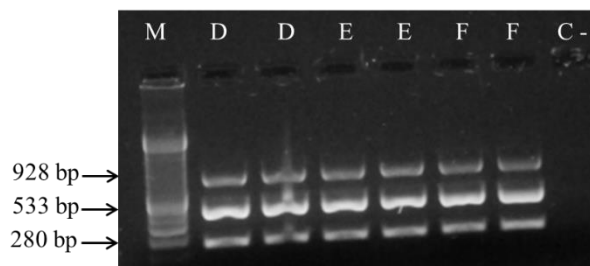
Las muestras fueron establecidas como sensibles si presentaban las bandas de *16S* a 928bp y *nuc* a 280 bp. Las muestras resistentes, además de las dos bandas presentaban la de 533bp correspondientes a *mecA*.

Figura 20

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); A, B, C: sensibles; C-: Control negativo.

**Figura 21**

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); D, E, F: resistentes; C-: Control negativo.

**Figura 22**

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); G, H, I, J, L: sensibles; K: resistente; C-: Control negativo.

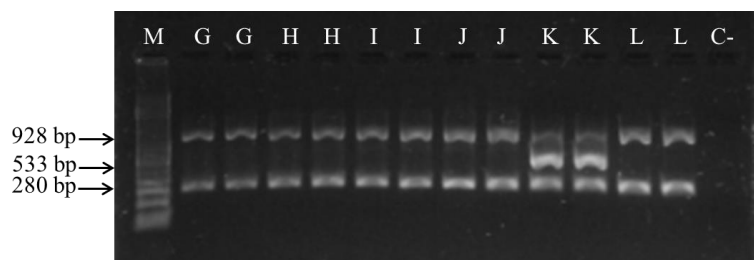
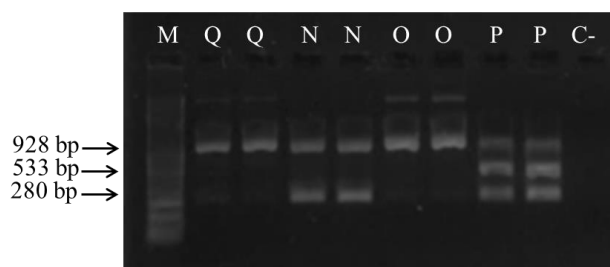
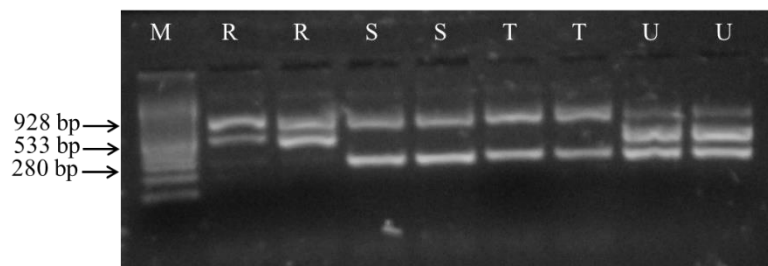


Figura 23

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); Q, O: bacteria no *S. aureus*; N: sensible; P: resistente; C-: Control negativo.

**Figura 24**

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); R: no concluyente; S, T: sensibles; U: resistente.

**Figura 25**

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); V, W, X, Y, Z, AA: sensibles.

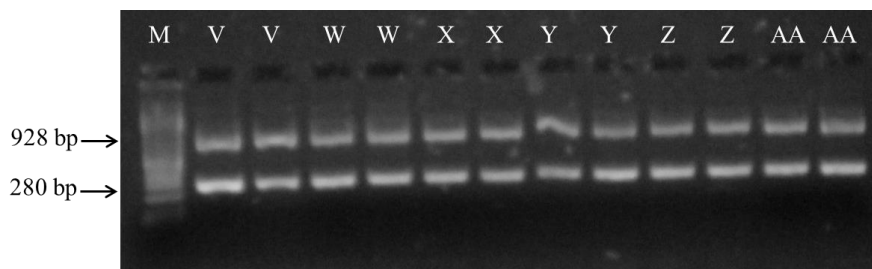
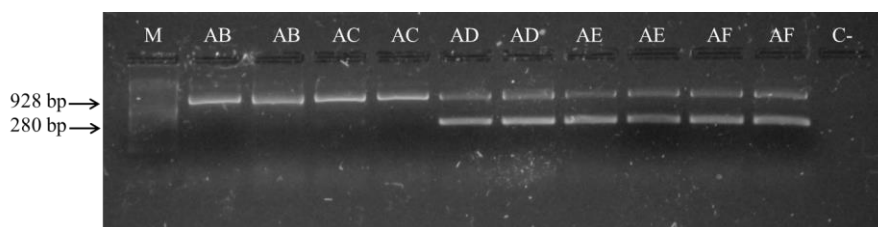
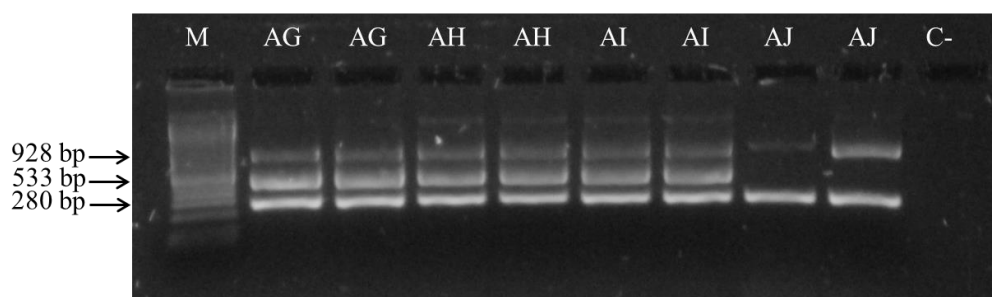


Figura 26

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); AB, AC: bacteria no *S. aureus*; AD, AE, AF: sensibles; C-: Control negativo.

**Figura 27**

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); AJ: sensible; AG, AH, AI: resistente; C-: Control negativo.

**Figura 28**

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); AM, AN: bacteria no *S. aureus*; AK, AL, AO, AP: resistentes; C-: Control negativo.

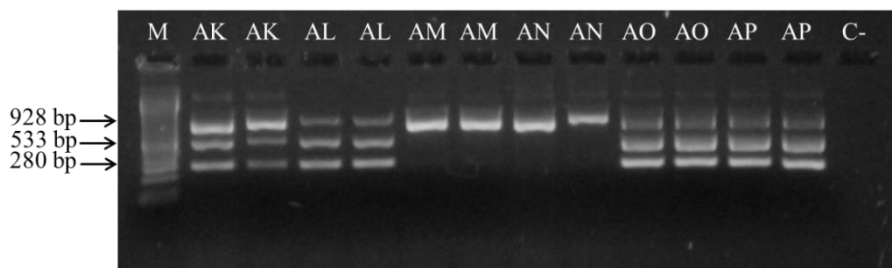
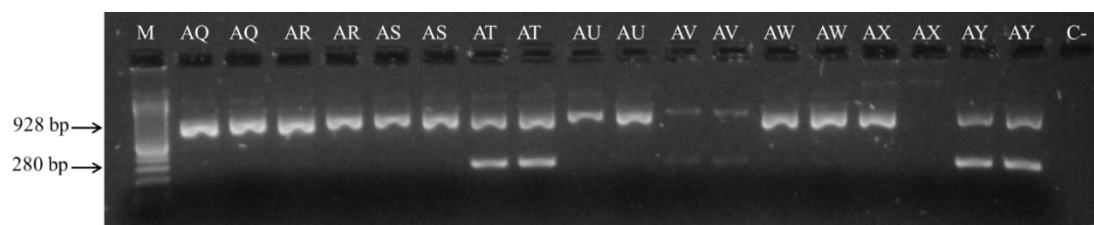
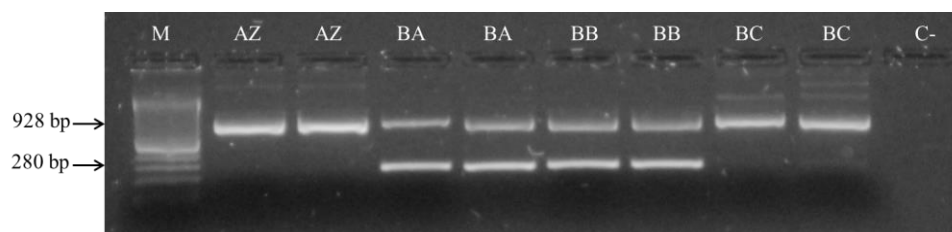


Figura 29

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); AQ, AR, AS, AU, AW, AX: bacteria no *S. aureus*; AT, AV, AY: sensibles; C-: Control negativo.

**Figura 30**

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); AZ, BC: bacteria no *S. aureus*; BA, BB: sensibles; C-: Control negativo.

**Figura 31**

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); BD: sin amplificación; BE, BF: sensibles; BG, BH, BI: no concluyente; C-: Control negativo.

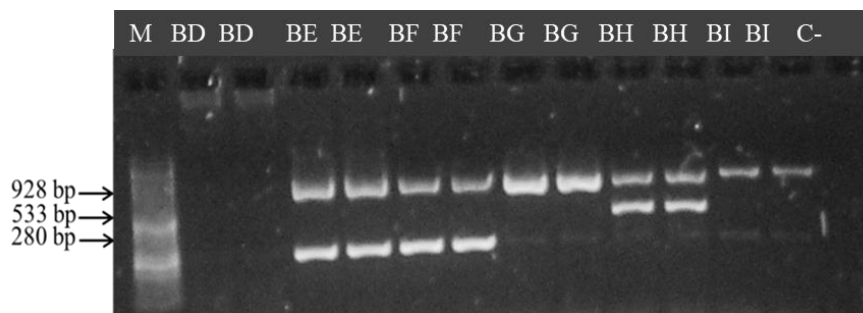
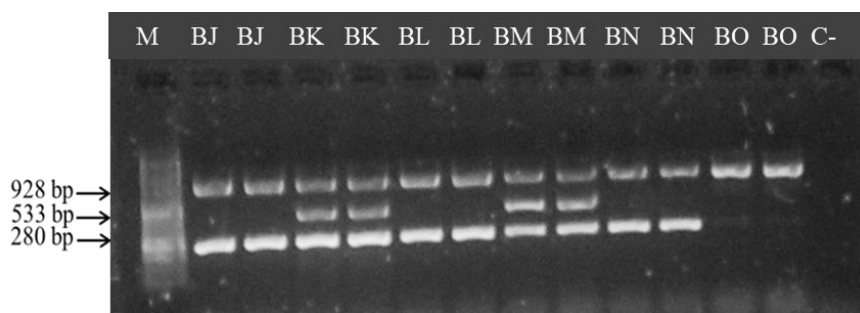
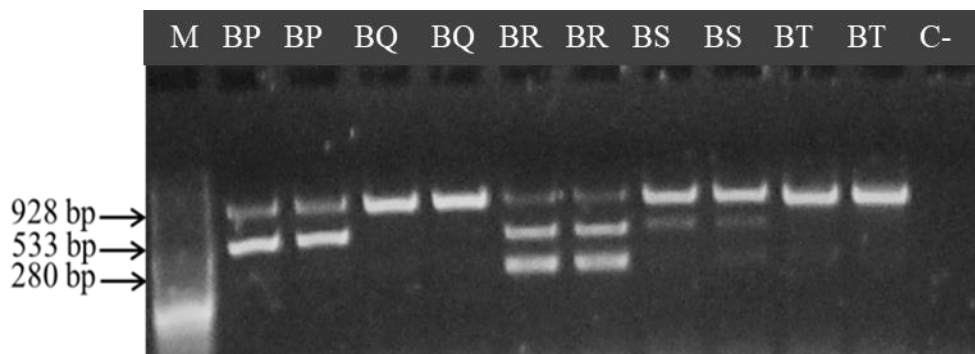


Figura 32

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); BJ, BL, BN: sensibles; BK, BM: resistentes; BO: bacteria no *S. aureus*; C-: Control negativo.

**Figura 33**

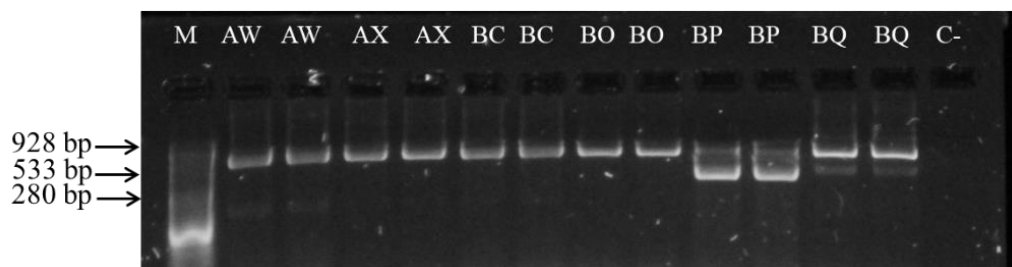
PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); BP, BS: no concluyente; BQ, BT: bacteria no *S.aureus*; BR: resistente; C-: Control negativo.



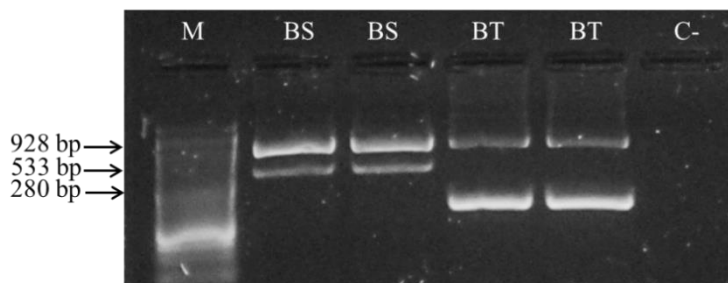
Se realizó nuevamente el aislamiento y la extracción de DNA de las muestras no concluyentes y no *S aureus*, seguido por el ensayo de PCR múltiple.

Figura 34

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); AW, AX, BC, BO: bacteria no *S. aureus*; BP, BQ: no concluyente; C-: Control negativo.

**Figura 35**

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); BS: bacteria no *S. aureus*; BT: sensible; C-: Control negativo.

**Figura 36**

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); O, AM, AN: bacteria no *S. aureus*; R, AB: sensible; C-: Control negativo.

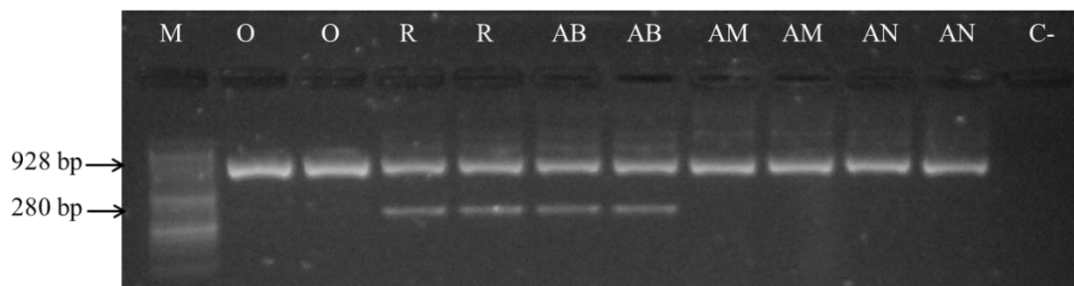
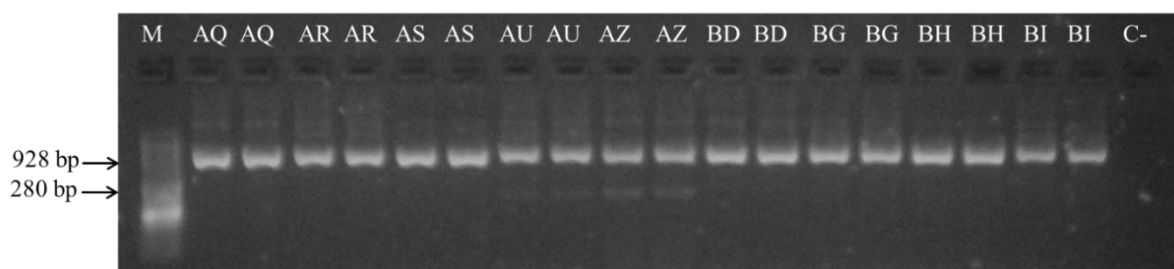
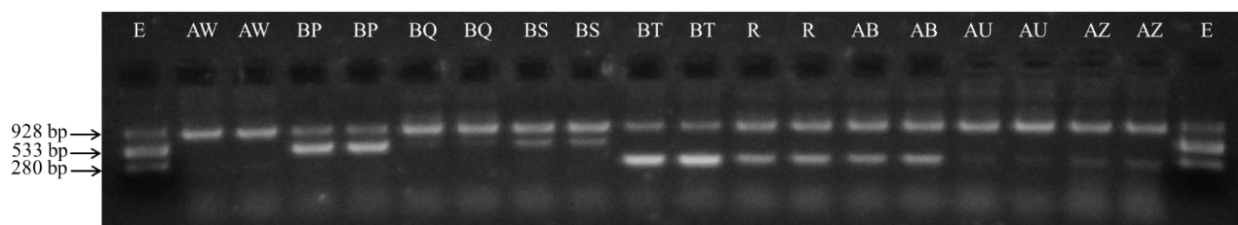


Figura 37

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. M: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen); AQ, AR, AS, BD, BG, BH, BI: bacteria no *S. aureus*; AU, AZ: sensible; C-: Control negativo.

**Figura 38**

PCR multiplex en gel de agarosa 2%. Como marcador esta la muestra M resistente. AW, BP, BQ, BS: bacteria no *S. aureus*; BT, R, AB, AU, AZ: sensible.

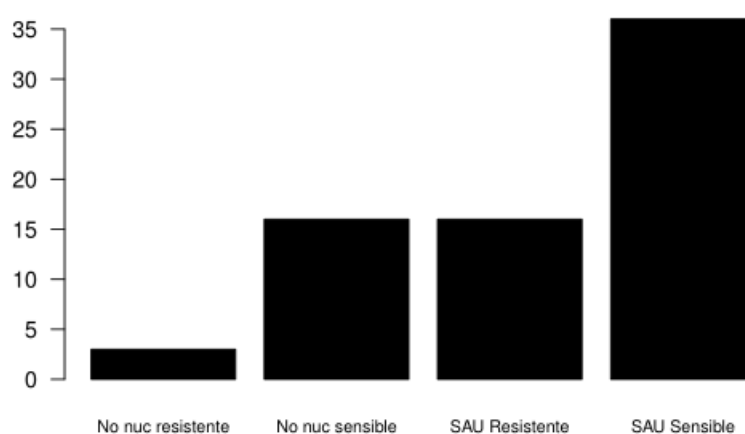


De la PCR multiplex se encontraron 36 (50.70 %) muestras como *S. aureus* sensibles (SAU sensibles), 16 (22.54 %) *S. aureus* resistentes (SAU resistentes), 16 (22.54 %) muestras que correspondían a cocos no *S. aureus* sensibles (No nunc sensibles) y 3 (4.22 %) resistentes (No nuc resistente) (Figura 39). Las 52 muestras entre sensibles y resistentes, corresponden al 73.24% de las 71 recuperadas y presuntas como *S. aureus*. Las cuales, 31 se emplearon en el análisis de expresión por PCR en tiempo real.

De las 52 muestras SAU, 69.23% son sensibles o susceptibles a antibióticos y 30.77% resistentes a metilina.

Figura 39

Resumen PCR multiplex de identificación molecular de S. aureus.



Caracterización de expresión de factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

Establecimiento de temperaturas de alineamiento por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (rt-PCR)

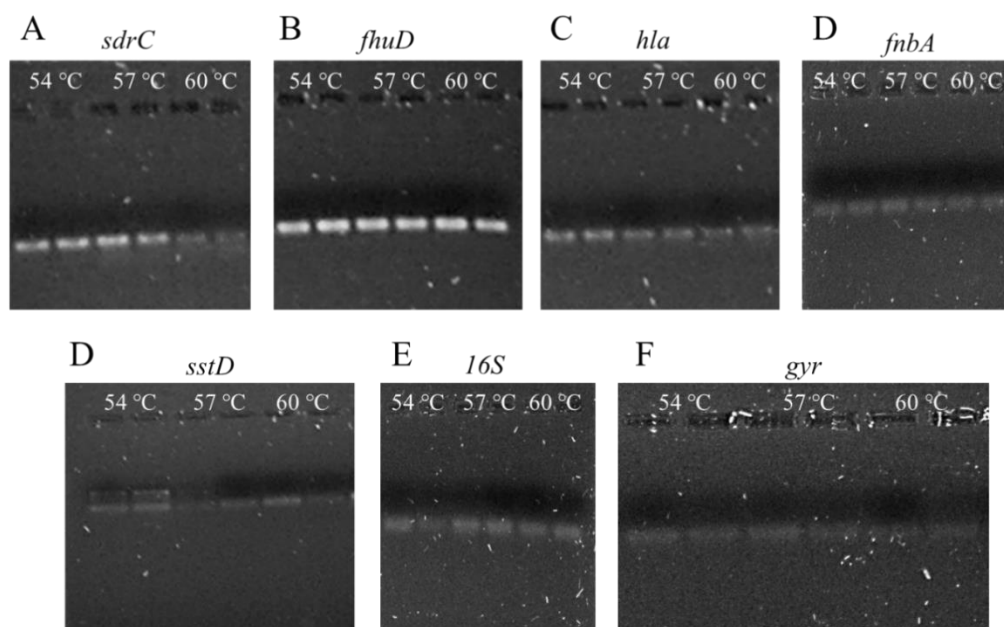
Previo al ensayo en tiempo real, se realizó el análisis de temperatura de alineamiento de los primers, con el propósito de establecer el programa a emplear. El ensayo se ejecutó por medio de PCR convencional usando un gradiente de temperatura durante la fase del alineamiento. La PCR fue de un solo paso, es decir, se inició de RNA y se usó retrotranscriptasa para obtener cDNA el cual se alinea con los primers para cada gen de interés.

En la Figura 40, se observa los resultados del alineamiento para los primers del ensayo de expresión de factores de virulencia. Se probaron las temperaturas de 54 °C, 57°C y 60 °C. En

los primers de los genes *sdrC*, *fhuD*, *hla*, *fnbA* y *16S*, no se observaron diferencias significativas en la intensidad de los fragmentos entre la variación de temperatura. En el gen de *sstD* y *gyr*, las menores temperaturas obtuvieron mayor intensidad en las bandas. Se escogió un valor de 55 °C como medio en las temperaturas que funcionaron mejor para todo el set de primers.

Figura 40.

PCR en gradiente de temperatura de genes de referencia y genes factores de virulencia en gel de agarosa 2%. Para los primers de los genes A) sdrC, B) fhuD, C) hla, D) fnbA, E) sstD, F) gyr.



Para el gen *nuc*, se realizó el gradiente de temperatura en el siguiente ensayo usando el equipo de tiempo real. Donde se determinó que el gen amplifica a las temperaturas de 55°C a 61°C.

Sensibilidad analítica y curva de calibración de los factores de virulencia por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

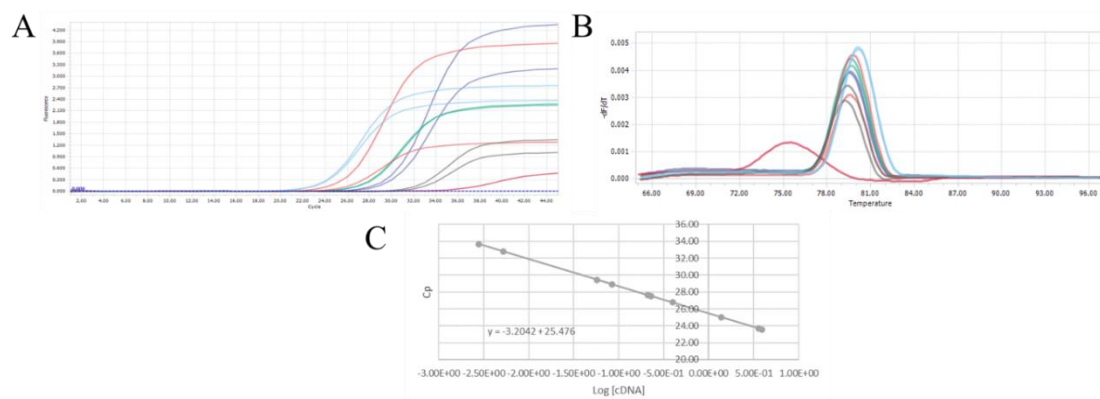
La sensibilidad analítica se efectuó para determinar la concentración mínima que detectan los sistemas. Los factores de virulencia amplificaron hasta el factor de dilución 1 en 3 de la concentración de cDNA final en el mix equivalente a $3.09E-02$ ng/ μ L. Mientras que, los genes de referencia *16S* y *nuc*, amplificaron hasta la dilución 1 en 5, o concentración de cDNA final en el mix de $8.00E-4$ y $4.00E-03$ ng/ μ L, respectivamente. Sin embargo, en las tablas de concentración se muestran valores similares, debido que el cálculo de eficiencia se realiza con las concentraciones detectadas en el equipo junto con las estimadas por el operador. La eficiencia presentada en la Tabla 26 son los datos obtenidos por el equipo.

A partir de la gráfica entre logaritmo en base 10 de la concentración versus C_p , se obtuvieron las curvas estándar. De las cuales se obtiene la pendiente y se aplica para el cálculo de eficiencia de amplificación mediante la ecuación 2.

Los valores de sensibilidad analítica de *gyr*, *sstD*, *hla*, *fnbA*, *fhuD*, *nuc* y *16S* se detallan en las tablas 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 respectivamente. Las observaciones gráficas de las curvas de amplificación, temperatura de melting y curva estándar para cada gen se detallan en las figuras 41, 42, 43, 44, 45, 46 y 47.

Figura 41

Sensibilidad analítica de gyr. A) Curva de amplificación, B) Temperaturas de melting, C) Curva estándar.

**Tabla 19**

Valores de concentración final de cDNA y C_p , promedios del gen gyr.

Concentración cDNA final Promedio (ng/ μ L)	C_p Promedio
3.76E+00	23.64
8.88E-01	25.90
2.20E-01	27.59
7.11E-02	29.18
3.99E-03	33.23

Figura 42

Sensibilidad analítica de *sstD*. A) Curva de amplificación, B) Temperaturas de melting, C) Curva estándar.

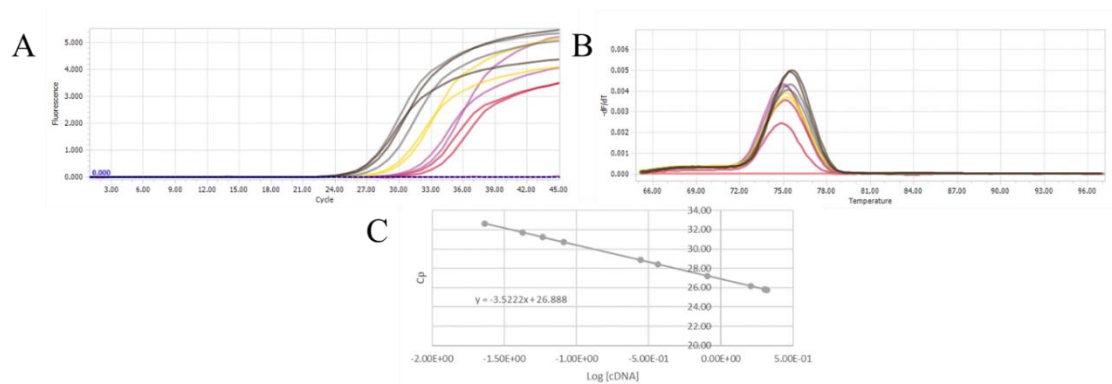


Tabla 20

Valores de concentración final de cDNA y C_p , promedios del gen *sstD*.

Concentración cDNA final Promedio (ng/ μ L)	C_p Promedio
1.82E+00	25.99
1.45E+00	26.49
3.22E-01	28.64
7.01E-02	30.98
3.28E-02	32.19

Figura 43

Sensibilidad analítica de hla. A) Curva de amplificación, B) Temperaturas de melting, C) Curva estándar.

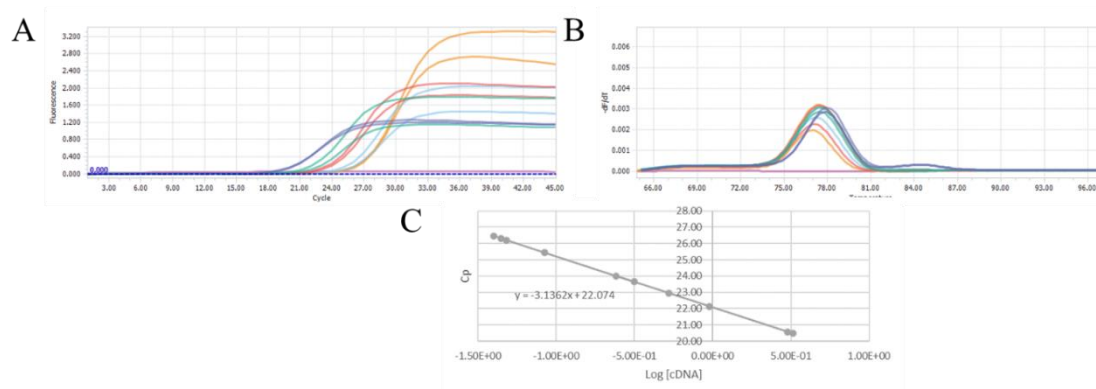


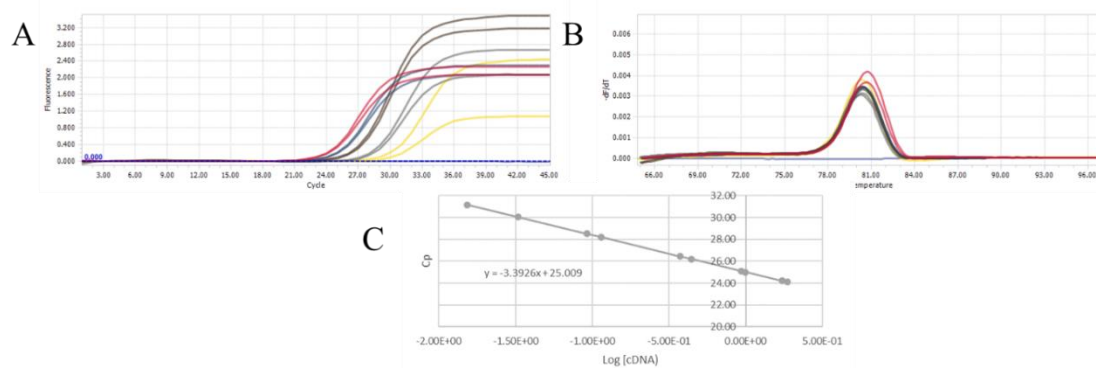
Tabla 21

Valores de concentración final de cDNA y C_p , promedios del gen hla.

Concentración cDNA final Promedio (ng/ μ L)	C_p Promedio
3.13E+00	20.52
7.37E-01	22.55
2.78E-01	23.83
6.62E-02	25.83
4.20E-02	26.40

Figura 44

Sensibilidad analítica de *fnbA*. A) Curva de amplificación, B) Temperaturas de melting, C) Curva estándar.

**Tabla 22**

Valores de concentración final de cDNA y Ct, promedios del gen *fnbA*.

Concentración cDNA final Promedio (ng/ μ L)	Ct Promedio
1.80E+00	24.15
9.66E-01	25.06
4.08E-01	26.34
1.03E-01	28.37
2.41E-02	30.61

Figura 45

Sensibilidad analítica de *fhuD*. A) Curva de amplificación, B) Temperaturas de melting, C) Curva estándar.

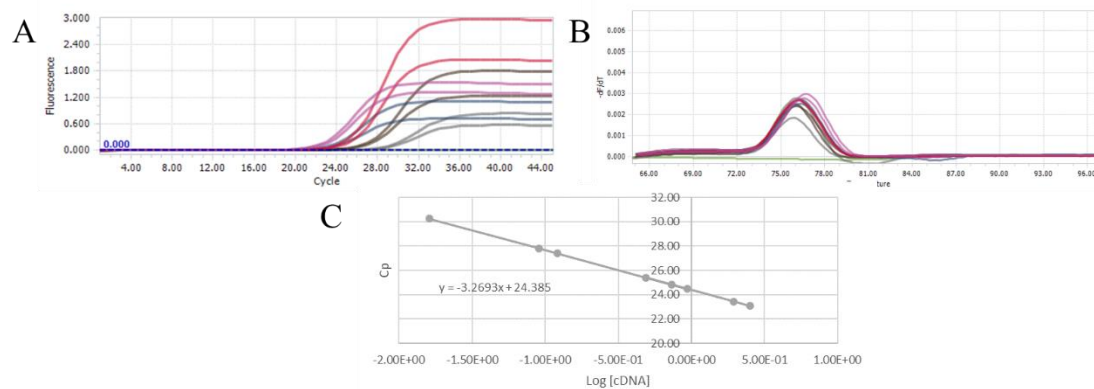


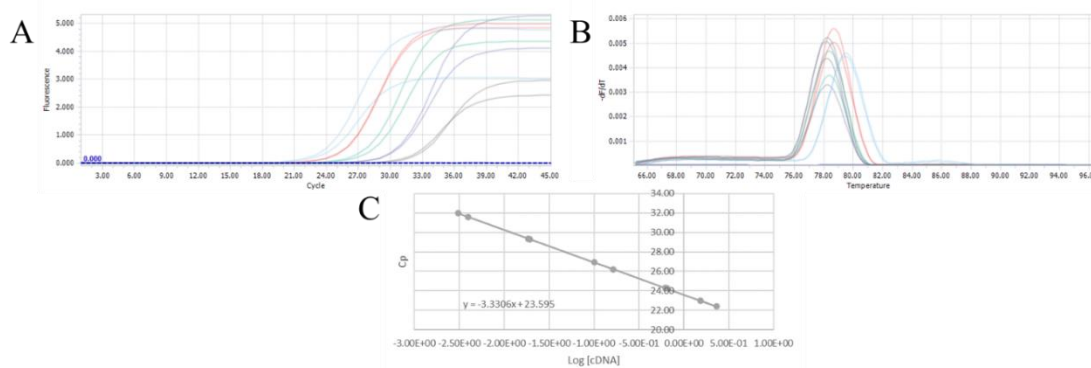
Tabla 23

Valores de concentración final de cDNA y C_p , promedios del gen *fhuD*.

Concentración cDNA final Promedio (ng/ μL)	C_p Promedio
$2.23E+00$	23.26
$6.13E-01$	25.11
$9.36E-01$	24.48
$1.06E-01$	27.59
$1.61E-02$	30.25

Figura 46

Sensibilidad analítica de nuc. A) Curva de amplificación, B) Temperaturas de melting, C) Curva estándar.

**Tabla 24**

Valores de concentración final de cDNA y Cp, promedios del gen nuc.

Concentración cDNA final Promedio (ng/ μ L)	Cp Promedio
1.91E+00	22.69
6.36E-01	24.25
1.32E-01	26.57
1.89E-02	29.34
3.51E-03	31.79

Figura 47

Sensibilidad analítica de 16S. A) Curva de amplificación, B) Temperaturas de melting, C) Curva estándar.

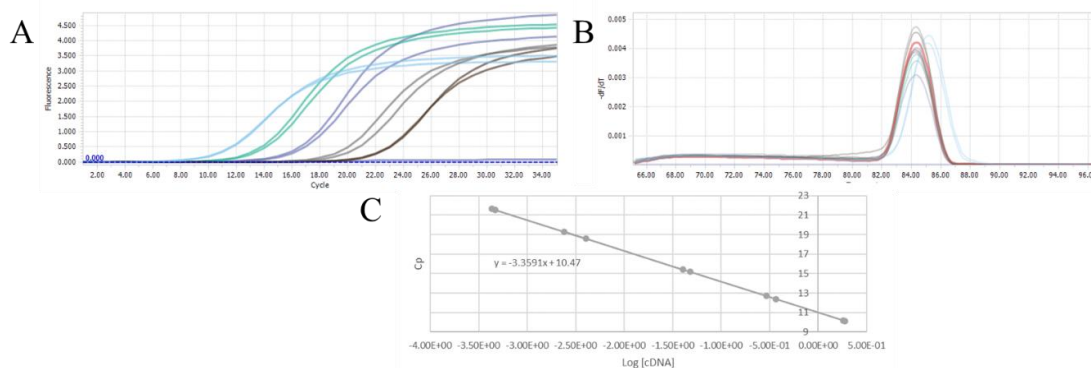


Tabla 25

Valores de concentración final de cDNA y Cp, promedios del gen 16S.

Concentración cDNA final Promedio (ng/ μ L)	Cp Promedio
1.85E+00	10.17
3.30E-01	12.54
4.42E-02	15.30
3.20E-03	18.94
4.51E-04	21.58

Se comprobó la linealidad de la sensibilidad analítica mediante las curvas estándar. Las eficiencias de amplificación se resumen en la Tabla 26, donde se destaca que la eficiencia

mínima corresponde a *sstD* con 92.27 %, seguido de *fnbA* 97.13 %, *16S* 98.47%, *nuc* 99.64%, *fhuD* 102.24%, *gyr* 105.16 % y como máximo *hla* 108.38 %. El rango en el que se encuentran los valores es de 90 a 110%. Los valores más cercanos al 100% indican que en el sistema y durante la extensión, el número de copias de la amplificación del gen diana se duplica por cada ciclo. La concentración de primers en el caso de *nuc* y *16S* se disminuyó debido que a 0.5 μM amplificaron productos inespecíficos. En las temperaturas de melting se observó un ligero desplazamiento, siendo mayor en la mayor concentración. Sin embargo, la variación entre las diluciones no fue significativo.

Tabla 26

Resumen de resultados de curva estándar de genes de expresión de factores de virulencia.

Gen	Pendiente	Error	Eficiencia	E (%)	Dilución	[P] μM	Temperatura de melting (°C)
<i>gyr</i>	-3.2042	0.66	2.05	105.16	1/3	0.5	79.71 \pm 0.32
<i>sstD</i>	-3.5222	0.68	1.92	92.27	1/3	0.5	75.23 \pm 0.21
<i>fnbA</i>	-3.3926	0.52	1.97	97.13	1/3	0.5	80.42 \pm 0.15
<i>hla</i>	-3.1362	0.48	2.08	108.38	1/3	0.5	77.44 \pm 0.32
<i>fhuD</i>	-3.2693	0.84	2.02	102.24	1/3	0.5	76.21 \pm 0.28
<i>nuc</i>	-3.3306	0.43	2.00	99.64	1/5	0.2	78.59 \pm 0.49
<i>16S</i>	-3.3591	1.04	1.98	98.47	1/5	0.2	84.34 \pm 0.27

Expresión de factores de virulencia mediante qPCR

Se realizó las corridas de los genes con el cDNA de las 31 muestras disponibles, de las cuales se descartó los valores atípicos en las repeticiones a través de la prueba de Grubb en R, usando el código insertado en el Anexo C. A los 5 puntos obtenidos por muestra para cada gen se efectuó la estadística descriptiva. En la Tabla 27 se detalla que se obtuvieron un total de 155 observaciones equivalentes a 5 puntos por muestra en los genes *16S*, *fhuD*, *gyr*, y *hla*. No amplificaron en *fnbA* dos muestras, en *nuc* cuatro muestras y *sstD* doce muestras, por lo que el número de observaciones es de 145, 135 y 95, respectivamente. Los coeficientes de variación son superiores del 10% si se analizan todos los Cp por gen. Indicando que existe una alta variabilidad en la amplificación de las distintas muestras, siendo superior en 16S con 20.44%.

Tabla 27

Estadística descriptiva por gen y coeficiente de variación.

Gen	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx
				(%)		
<i>16s</i>	155	15.59	3.18	20.44	9.65	24.75
<i>fhuD</i>	155	27.06	3.19	11.78	16.97	34.08
<i>fnbA</i>	145	29.07	3.40	11.71	15.95	34.52
<i>gyr</i>	155	29.56	3.75	12.67	18.74	40.37
<i>hla</i>	155	28.71	4.55	15.84	17.2	41.22
<i>nuc</i>	135	31.74	4.01	12.63	16.94	38.87
<i>sstD</i>	95	30.87	4.14	13.41	17.61	37.62

Nota: n número de observaciones, D.E. desviación estándar. CV coeficiente de variación.

Para determinar si los Cp por gen siguen una distribución normal se efectuó la prueba de Shapiro – Wilk. Se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la alternativa para *nuc* (p_valor = 1.413E-10), *16S* (p_valor = 2.634E-9), *fhuD* (p_valor = 2.742E-5), *fnbA* (p_valor = 2.592E-11), *gyr* (p_valor = 4.112E-3), *sstD* (p_valor = 9.741E-6) y *hla* (p_valor = 2.467E-4), con nivel de significancia de 0.05 (Anexo C). Por lo cual, las pruebas llevadas sobre los valores de Cp respecto a genes deben ser pruebas no paramétricas.

De igual forma se hizo el análisis de la estadística descriptiva de las muestras respecto a cada gen. En la Tabla 28 se describen los coeficientes de variación por muestra respecto a cada gen, donde se observa de mejor manera que existe menor variabilidad de las repeticiones técnicas de las muestras individualmente examinadas. De *nuc* no amplificaron las muestras AD, L, S y V. de *fnbA* L y V. De *sstD* no se detectó a AE, AF, AJ, AP, AV, I, L, N, T, V, X, Y.

La distribución de los valores respecto a la media se detalla en las Figuras 48 a 53. En todos los genes se destaca la muestra F, que es resistente y Cp de amplificación más tempranas que el resto. Para comprobar que no sea error de la concentración se volvió a cuantificar y se obtuvo el mismo valor de concentración que las demás muestras. Lo que presuntamente indica que los genes de F se pueden estar sobre expresando.

Tabla 28

Coefficientes de variación de la media de muestras por gen.

Gen Muestra	16S	nuc	fhuD	fnbA	gyr	hla	sstD
A	10.95	2.06	0.75	1.65	1.59	1.22	3.03
AA	1.99	1.90	0.67	0.60	2.89	0.49	0.53
AD	2.14	-	1.79	1.02	2.46	1.72	2.22
AE	6.23	1.85	0.40	0.70	1.86	1.24	-
AF	6.83	1.73	0.73	1.86	3.12	0.87	-
AG	3.50	0.79	1.27	0.83	2.14	0.35	3.61
AI	7.33	1.30	0.84	0.91	1.83	0.91	1.99
AJ	1.30	7.77	2.16	1.89	2.73	1.26	-
AK	5.48	2.53	0.82	1.71	1.64	1.90	3.32
AL	2.83	2.23	1.56	3.73	3.81	0.92	2.41
AO	5.45	2.83	0.19	1.98	1.64	1.32	1.50
AP	6.49	1.15	0.41	2.58	1.04	5.17	-
AV	2.35	1.86	0.50	0.85	1.25	1.29	-
B	0.76	1.79	1.69	2.30	3.55	2.18	1.50
BJ	2.23	2.17	0.62	1.14	2.69	3.01	1.29
E	2.51	1.32	0.63	2.18	3.57	1.57	6.36
F	2.43	1.51	1.75	2.12	7.90	1.37	5.68
G	2.90	1.12	0.45	2.26	4.28	1.76	0.70
H	12.56	1.02	0.23	1.95	1.42	0.56	0.67
I	3.58	1.09	1.53	0.86	1.32	2.86	-
J	2.14	1.15	1.38	1.86	3.11	2.08	1.54
L	3.78	-	1.74	-	0.64	3.15	-
N	4.04	4.78	2.60	2.25	1.71	1.77	-
S	3.63	-	0.42	0.99	2.42	0.64	1.24
T	3.55	1.41	0.77	2.77	2.14	1.41	-
U	2.25	0.99	1.25	2.98	5.85	1.22	2.07
V	1.18	-	0.50	-	1.27	1.21	-
W	3.06	0.83	0.90	1.31	1.76	1.64	1.74
X	2.96	0.99	0.42	1.69	2.39	2.63	-
Y	3.73	1.23	1.60	1.23	1.12	1.91	-
Z	1.84	1.58	0.36	1.38	1.99	2.37	4.11

Figura 48

Diagrama de caja para las muestras respecto al gen 16S

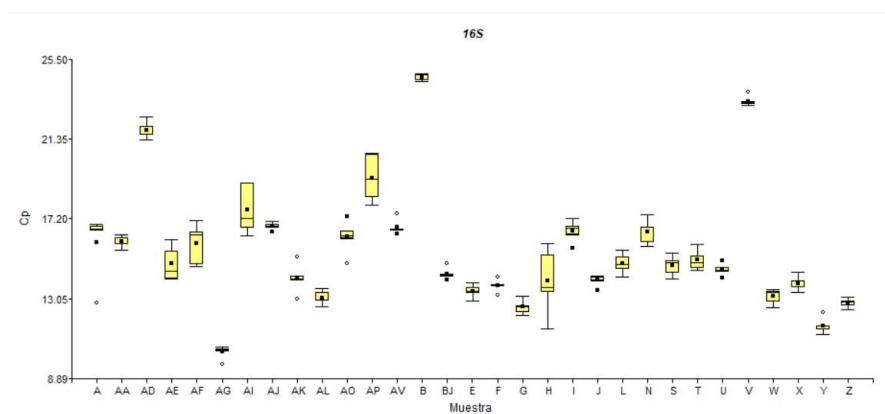
**Figura 49**

Diagrama de caja para las muestras respecto al gen fhuD

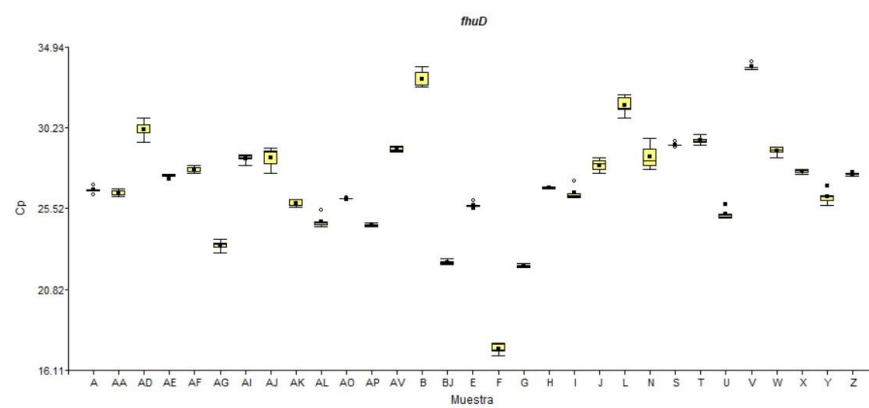


Figura 50

Diagrama de caja para las muestras respecto al gen gyr

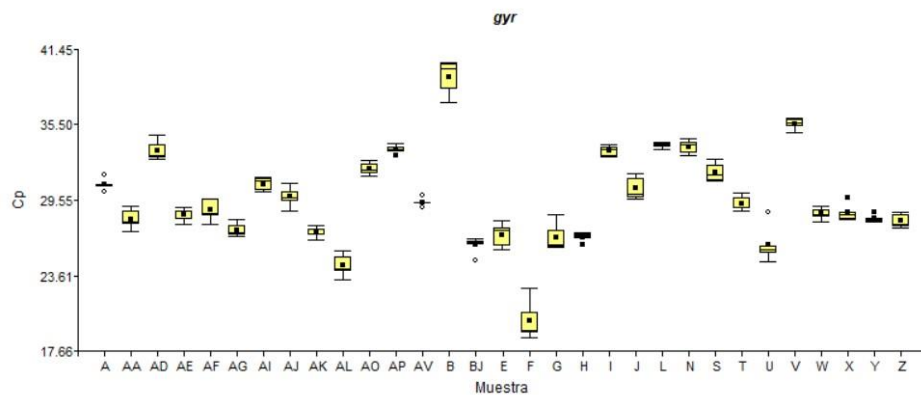


Figura 51

Diagrama de caja para las muestras respecto al gen fnbA

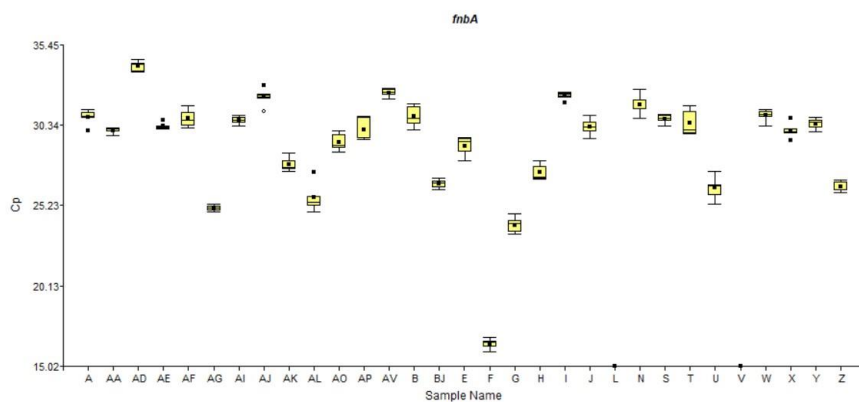


Figura 52

Diagrama de caja para las muestras respecto al gen hla

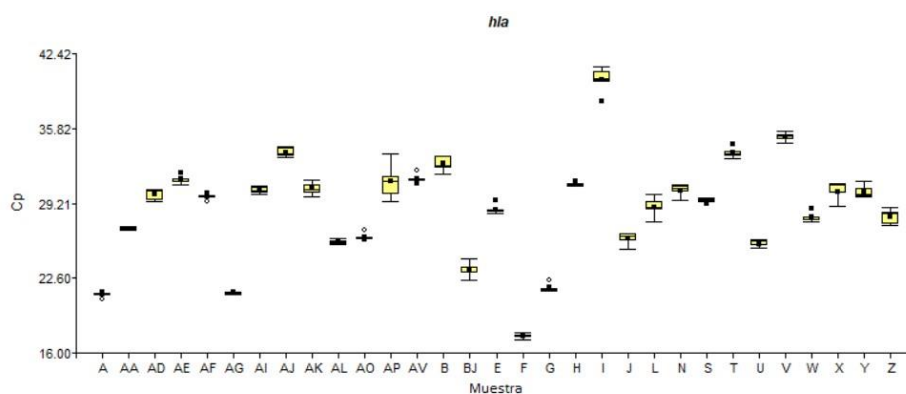
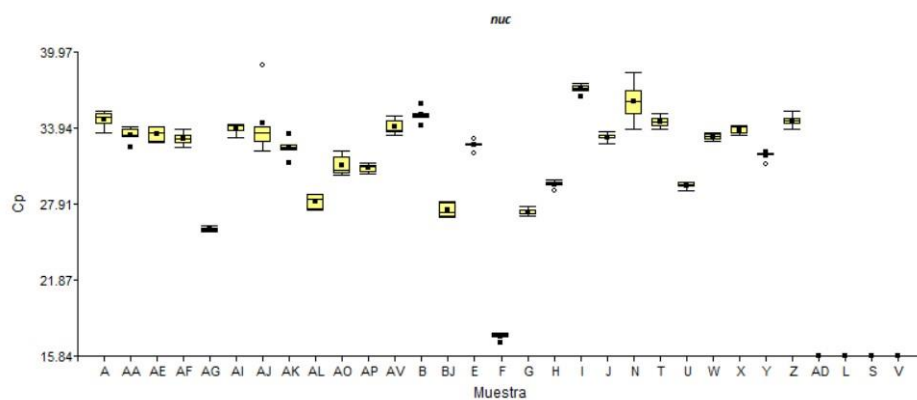
**Figura 53**

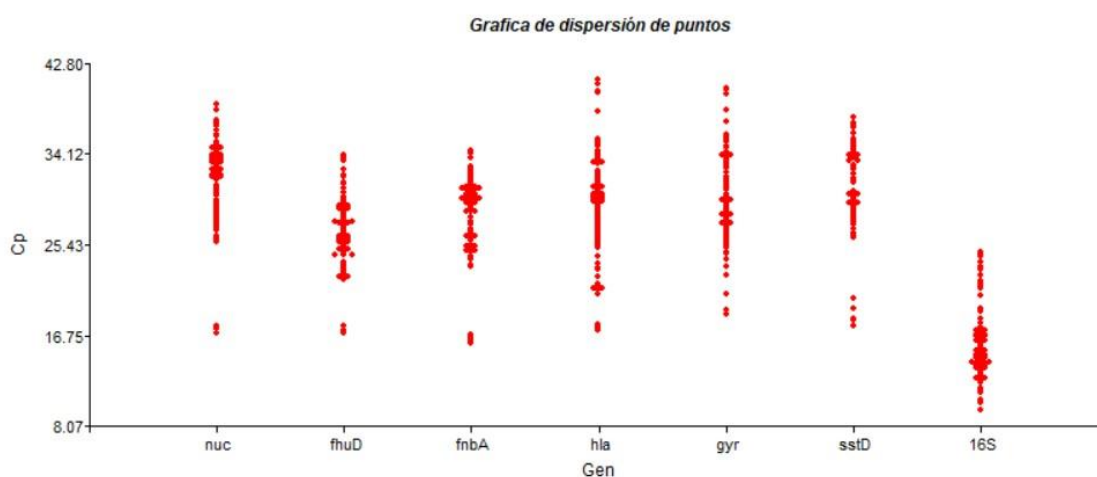
Diagrama de caja para las muestras respecto al gen nuc



La dispersión de los Cp de las muestras para cada gen se visualiza en la Figura 54. El gen *16S* amplifica temprano respecto a los factores de virulencia y la amplificación no excede del ciclo 25.

Figura 54

Diagrama de dispersión de Cp de las muestras para cada gen



Con el 95% de probabilidad se estimó los intervalos de confianza de cada gen. Para *16S* los límites están entre 15.07 al 16.08, y *nuc* entre 31.06 a 32.42. Siento los genes de referencia se debió analizar la estabilidad de los sistemas para determinar el gen de referencia en los ensayos posteriores. Los factores de virulencia empiezan a amplificar desde aproximadamente el ciclo 26 al ciclo 32.

Tabla 29

Intervalo de confianza de la dispersión de Cp por gen.

Gen	Media	E.E.	n	LI (95%)	LS (95%)
<i>16S</i>	15.58	0.26	155	15.07	16.08
<i>fhuD</i>	27.06	0.26	155	26.56	27.57
<i>fnbA</i>	29.07	0.28	145	28.51	29.63
<i>gyr</i>	29.56	0.30	155	28.97	30.16

Gen	Media	E.E.	n	LI (95%)	LS (95%)
<i>hla</i>	28.71	0.37	155	27.99	29.43
<i>nuc</i>	31.74	0.34	135	31.06	32.42
<i>sstD</i>	30.87	0.42	95	30.03	31.72

Nota: LI Límite inferior, LS Limite Superior, E.E. Error estándar, n número de observaciones.

Por la herramienta virtual RefFinder se decretó que el gen mejor calificado para ser referencia es *16S* (Tabla 30). Se consideró conjuntamente *gyr*, ya que NormFinder funciona con más de 3 genes de referencia. Se tomó en cuenta este gen y no otro factor de virulencia, debido que inicialmente era considerado referencial.

Tabla 30

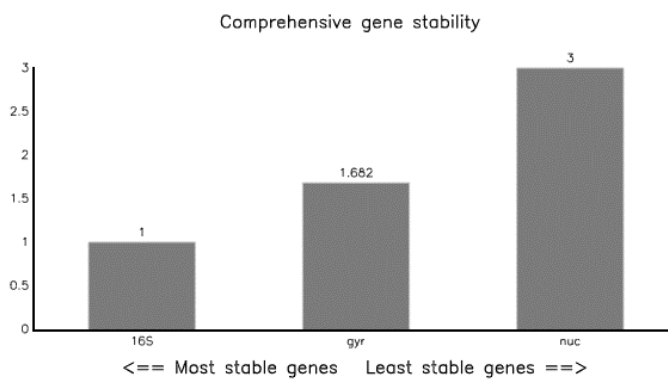
Ranking de los genes de referencia definidos en RefFinder.

Orden de Ranking	Delta CT	BestKeeper	Genorm	NormFinder
1	<i>16S</i>	<i>16S</i>	<i>16S</i>	<i>16S</i>
2	<i>gyr</i>	<i>gyr</i>	<i>gyr</i>	<i>gyr</i>
3	<i>nuc</i>	<i>nuc</i>	<i>nuc</i>	<i>nuc</i>

A pesar de amplificar temprano respecto a los factores de virulencia, se estableció por los algoritmos de los programas Delta CT, BestKeeper, Genorm y NormFinder, que *16S* era el más estable (Figura 55).

Figura 55

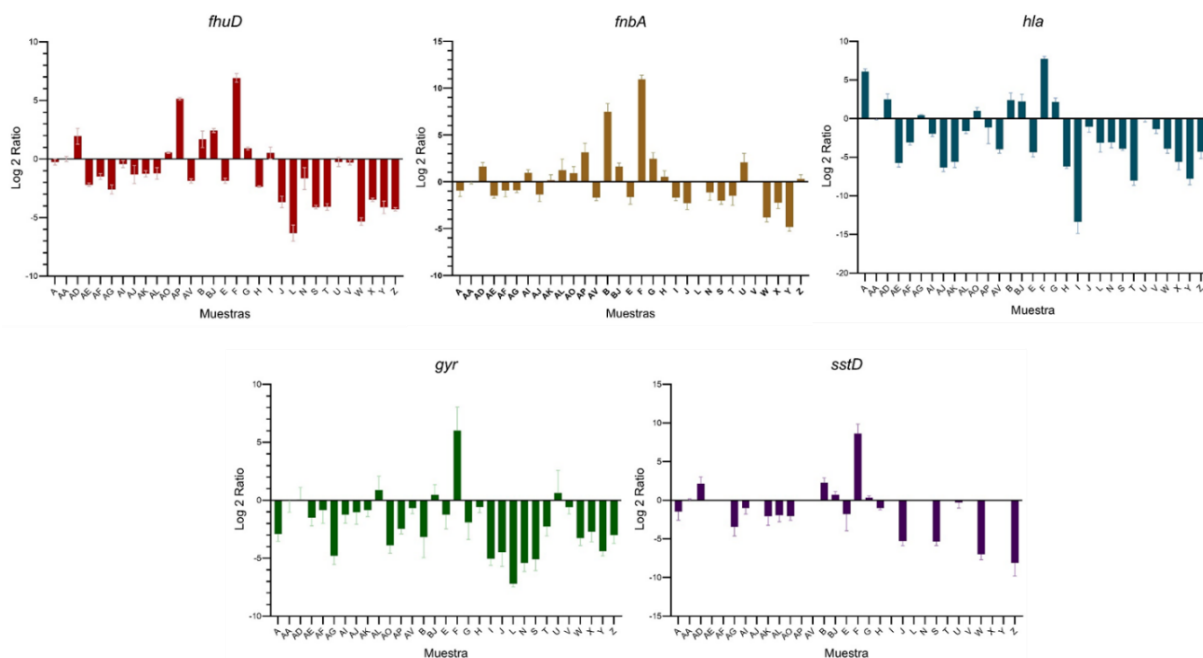
Gráfica de estabilidad de los genes de referencia.



Con los datos sin valores atípicos y con el gen de referencia se calculó por Pfaffl los ratios. Se corrigió la proporción asimétrica de expresados e inhibidos al calcularlos en base logarítmica. En la Figura 56, se observan las barras sobre cero como presuntos expresados y por debajo del límite se encuentran los inhibidos.

Figura 56

Logaritmo en base dos de las ratios de amplificación calculados por Pfaffl. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza respecto a la media 95%.

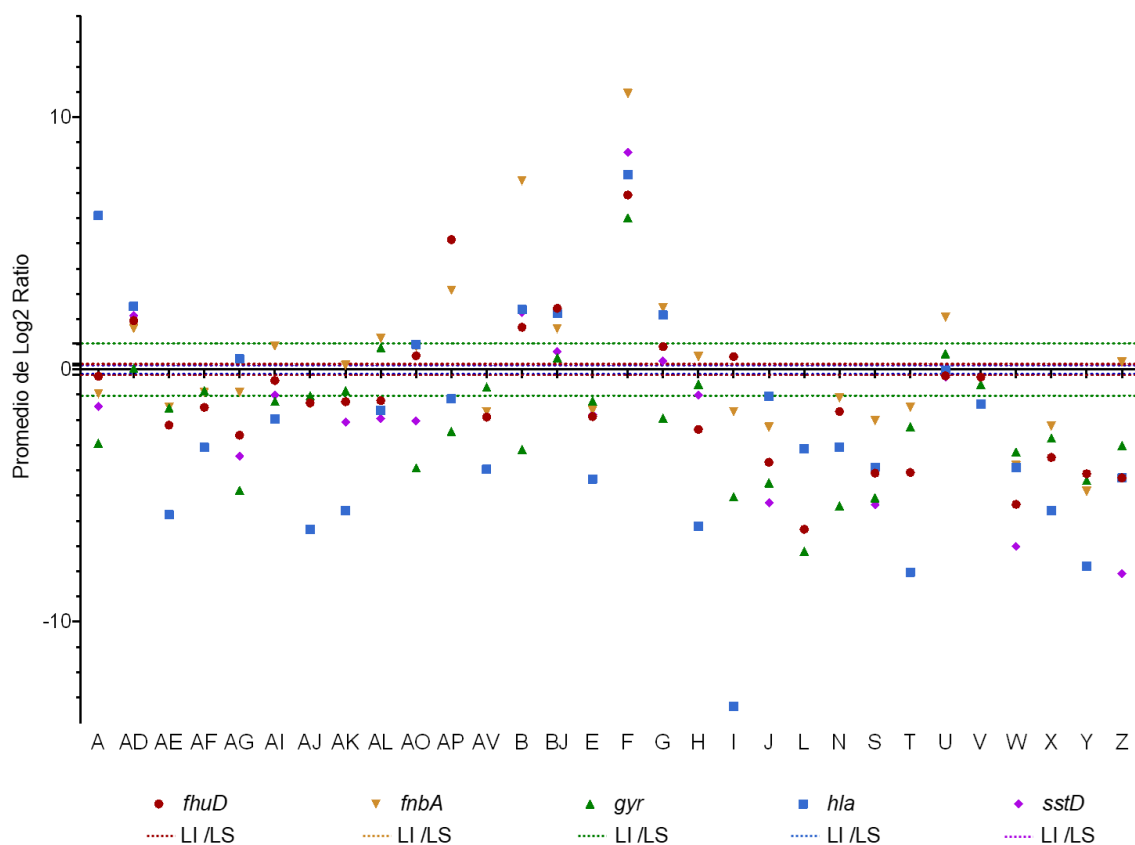


Mediante la prueba de t, se analizó si la expresión de cada muestra es significativa comparada con el calibrador. En la Figura 57, cada viñeta representa un gen, las líneas del mismo color que las viñetas corresponden a los límites inferior y superior de la muestra control (AA), para dicho gen. Los límites de *fhuD*, *fnbA*, *hla* y *sstD* se superponen alrededor de -0.2 a +0.2. El límite de *gyr* se encuentra entre el rango de -1.04 a +1.04.

Las muestras cuya figura esta sobre las líneas son aquellas que expresaron en dicho gen, mientras que, los de debajo de las líneas son muestras con inhibición significativa según la estadística ($p_valor < 0.05$). Las muestras que se encuentra dentro de las líneas son las sin amplificación o las que sus valores no son significativos comparados con AA.

Figura 57

Resumen de expresión o inhibición comparando las muestras con AA. Donde LI y LS corresponden a límite superior e inferior, respectivamente.



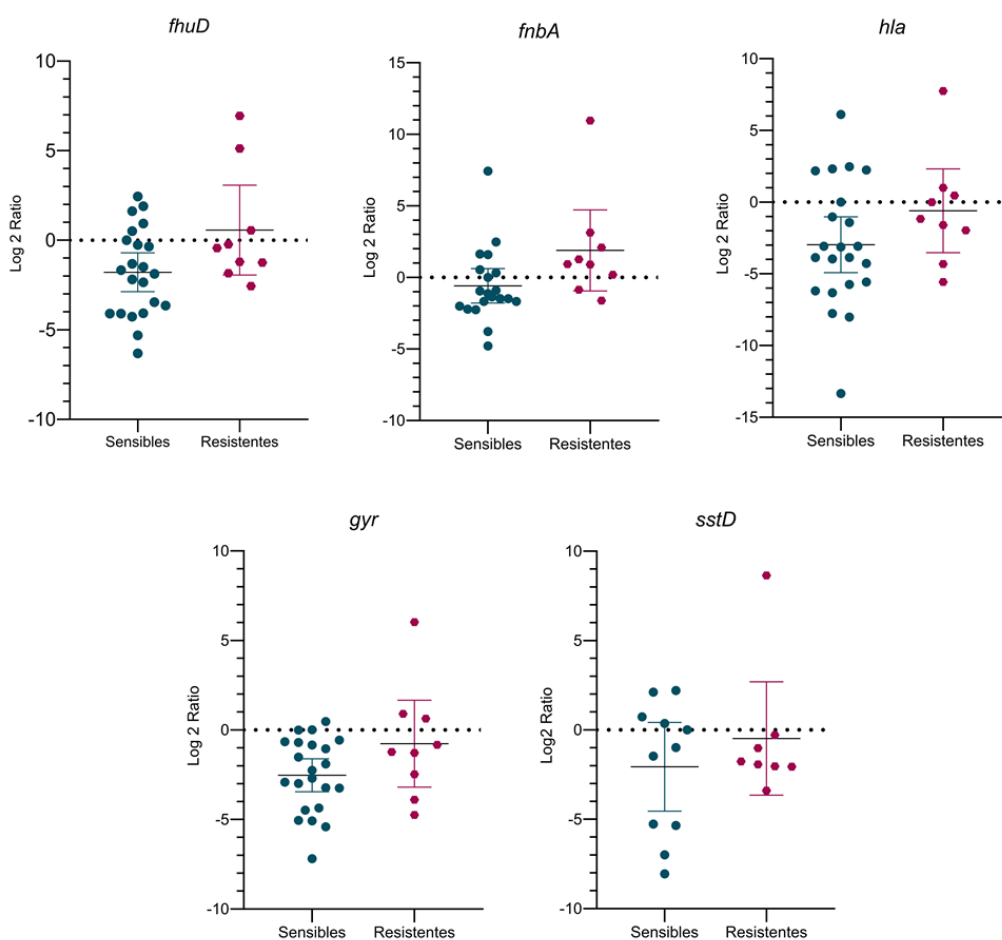
De todas las muestras, F fue la que expresó todos los factores de virulencia. AD, B, BJ, G, amplificaron *fhuD*, *fnbA*, *hla* y *sstD*. Las muestras resistentes AO *fhuD*, *fnbA*, *hla* y AP *fhuD*, *fnbA*. Las que amplificaron solo *fnbA* fueron AI, AL, U. Mientras que, I solo *fhuD* y únicamente *hla* por A y AG.

Se estudió la diferencia en la expresión con los datos de los logaritmos de los ratios. Entre susceptibles y resistentes es significativo para los genes *fhuD* ($p_{\text{valor}}=0.0002$) y *fnbA*

($p_{\text{valor}} < 0.0001$), *gyr* ($p_{\text{valor}} = 0.0026$), *hla* ($p_{\text{valor}} = 0.0027$), Mientras que, no existe variación en *sstD* ($p_{\text{valor}} = 0.9268$) (Figura 58).

Figura 58

Susceptibilidad de Log ratio. Las barras de error corresponden a los intervalos de confianza de la media al 95%.

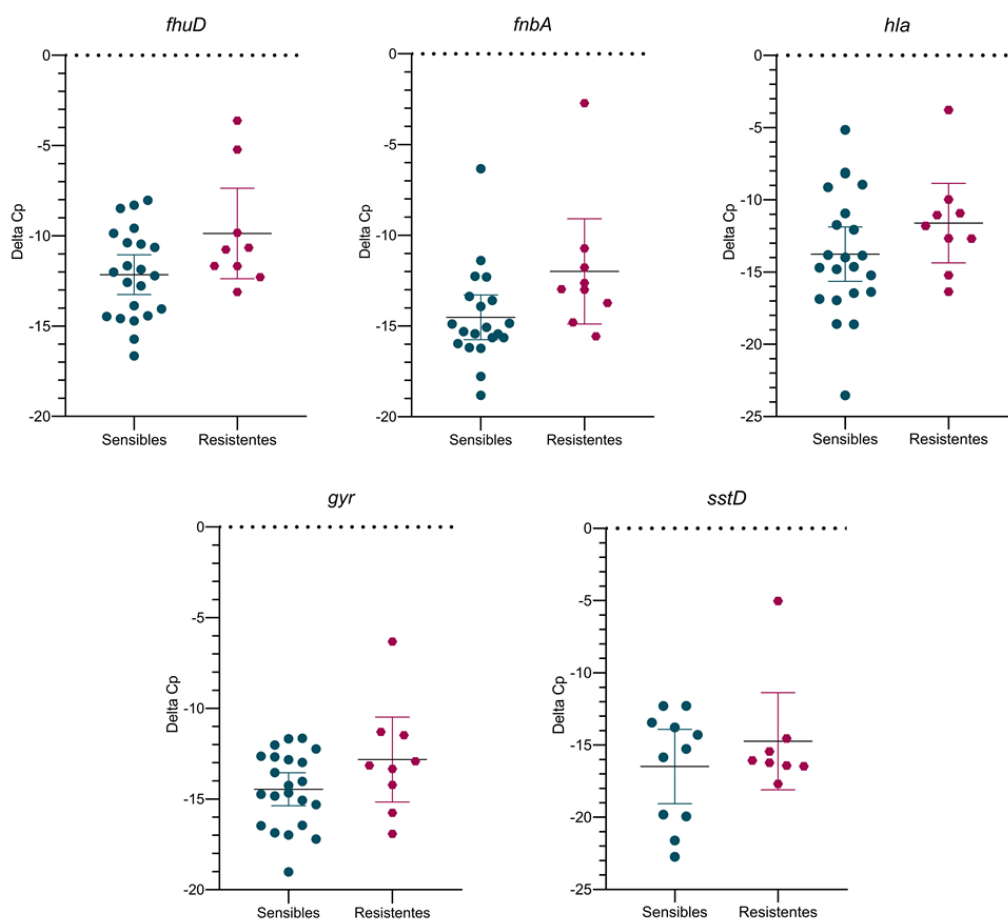


Se examinó la diferencia de susceptibilidad con los datos de ΔC_p , es decir, con el C_p del gen diana normalizado al gen de referencia para cada muestra independientemente. En el análisis se obtuvieron los mismos datos que con los logaritmos de las ratios. Donde, *fhuD* ($p_{\text{valor}} = 0.0003$), *fnbA* ($p_{\text{valor}} < 0.0001$), *gyr* ($p_{\text{valor}} = 0.0038$) y *hla* ($p_{\text{valor}} = 0.0033$) fueron

significativamente diferentes entre sensibles y resistentes. Además, no existió variación en $sstD$ ($p_valor=0.9000$) (Figura 59). Las pruebas de normalidad de los datos de logaritmo de ratios y ΔC_p están en el Anexo C.

Figura 59

Susceptibilidad de DeltaCp. Las barras de error corresponden a los intervalos de confianza de la media al 95%.



Capítulo V: Discusión

En este estudio se recuperó muestras almacenadas de uno a tres años en TSA a 4°C, por lo que 36.73% no lograron crecer y 24.90% se encontraron contaminados. Del 38.37% recuperado correspondían 94 muestras de las cuales 71 eran *S. aureus*. Según la información en la base de datos 50 eran susceptibles y 21 resistentes. Sin embargo, por el largo período de conservación se requirió de la verificación por PCR multiplex. Después de este análisis se concluyó que 52 (73.24%) de 71 muestras presentaban el gen *nuc*, confirmándolas como *S. aureus*. Debido a que no se conocían si los aislados seguían manteniendo sus características de resistencia a antibióticos, todas las muestras fueron tratadas como peligrosas y siguiendo las normas de bioseguridad del laboratorio. También se analizó el gen *mec*, como referencia a resistencia a antibióticos. El 69.23% no amplificó *mec*, el 30.77% fue positivo.

S. aureus es una bacteria mesófila, que se adapta a crecer en un amplio rango de temperatura. Los aislados de esta bacteria se pueden almacenar según su uso sea a corto plazo a 4°C o a largo plazo a -80°C junto con agentes crioprotectores o en viales de criopreservación. No obstante, se recomienda que el almacenamiento a 4°C, no exceda a una semana (Missiakas & Schneewind, 2013). Se ha investigado el impacto de la temperatura de conservación en los aspectos fenotípicos, proteómicos y metabólicos de *S. aureus*.

En la investigación de Onyango, Hugh Dunstan, Roberts, Macdonald, & Gottfries (2013), se cultivó bacterias procedentes de viales conservados a 4°C durante ocho semanas, donde se verificó la reducción en la actividad hemolítica y en la pigmentación. Además, por medio de observaciones en microscopio electrónico de transmisión (TEM) visualizaron que las bacterias adquieren en respuesta a la baja temperatura una pared celular más gruesa.

Alreshidi et al. (2015), después de dos semanas a 4°C, encontró un aumento en la regulación de las proteínas asociadas en la traducción, modificación postraducciona y división celular. En cambio, disminución en las proteínas asociadas a patogenicidad y síntesis de aminoácidos. Se detectó reducción de concentración en 15 de 19 aminoácidos en magnitud de 1.8 a 13, demostrando alteración en la homeóstasis celular.

Por lo que, tras el amplio período de tiempo que atravesaron los aislados conservados, se encontraron dificultades al recuperarlos. Según lo descrito es de esperarse modificaciones fenotípicas, proteómicas y metabólicas.

El sub cultivo de las bacterias en medios de cultivo enriquecidos conducen a la pérdida de las mutaciones que otorgan virulencia o eliminación de elementos genómicos móviles (Missiakas & Schneewind, 2013). Se recomienda la conservación de las bacterias a -80°C en viales y en alícuotas, para evitar la congelación - descongelación y posible daño celular o acumulación de mutaciones (Missiakas & Schneewind, 2013; Vitko & Richardson, 2013). No obstante, se confirma que *S. aureus* se adapta a condiciones hostiles, y se prepara hasta el momento que se encuentre con un medio enriquecido y las condiciones óptimas para subsistir.

De las bacterias recuperadas entre *S. aureus* y otras gran-positivas (38.37%), se concluye que a pesar de los escenarios desfavorables que pasaron los aislados, se lograron mantener y crecer. Pero presentando posibles alteraciones que tuvieron que adquirir para adaptarse. Según Liao & Shollenberger (2003), *S. aureus* es capaz de sobrevivir en PBS por alrededor de 4 semanas, a temperatura ambiente.

Se ha descrito la pérdida del caset *mecA* de MRSA en alrededor del 14.4% de cepas después de 2 años de crioconservación a -80°C, mientras que, el 100% de muestras siguen presentando *nuc* (Van Griethuysen et al., 2005). No obstante, el inconveniente con la

investigación fue que antes de la conservación de -80°C , se caracterizó como muestra resistente por ensayo de antibiogramas y pasado los 2 años se realizó la PCR multiplex. De igual manera, en esta investigación, la información en la base de datos sobre la susceptibilidad se adquirió por medio de esta metodología. Se tiene evidencia de que existe un cambio de sensibles a resistentes, es decir que adquirió el gen *mec*, la muestra AP, y de resistente a sensible, que perdió el gen *mec* las muestras R y AB.

El uso de *nuc* para la identificación de *S. aureus* se ha empleado debido a que el gen transcribe a la termonucleasa que antes se empleaba como test enzimático en la identificación de esta bacteria (Brakstad et al., 1992). La termonucleasa no es única de *S. aureus*. No obstante, la secuencia presente en la bacteria es específica, por lo cual se emplea como estándar para reconocerla mediante PCR (Jayaratne & Rutherford, 1999). Las pruebas bioquímicas o de caracterización morfológica de las colonias en agar, son complejas de reconocer por operadores inexpertos. La PCR multiplex se crea en respuesta a lo complejo que llega a ser sola el reconocimiento de la morfología. Con el propósito de obtener un resultado más confiable y específico. En esta investigación se aplicó el reconocimiento en agar nutritivo de la forma de las colonias, en agar sangre la hemólisis, por tinción gran la forma de las bacterias y complementando la identificación por PCR multiplex.

En la investigación de Jayaratne & Rutherford (1999), registraron que el 20% de las muestras analizadas presentaron la coloración amarilla de las colonias. Sin embargo, por PCR multiplex se reconocieron 276 muestras con amplificación de *nuc*, las cuales se caracterizaron como *S. aureus*. Usando solo la identificación de la morfología reconocieron 264 de los 276. Tomando en referencia el método del cultivo como gold estándar, el autor obtuvo una sensibilidad del 100% y especificidad del 97%. Louie et al. (2002), consiguió 99.2 % de

sensibilidad y 100 % de especificidad. En esta investigación tomando como gold estándar la PCR multiplex se obtiene una sensibilidad del 73.24 %. No se puede establecer el dato de especificidad, ya que no se cuenta con valores falsos negativos ni verdaderos negativos. Ya que se partió de la premisa que las 71 muestras originalmente establecidas eran *S. aureus* según la base de datos. Existen varios factores para que decaiga la sensibilidad, entre esos la variación genotípica durante conservación de los aislados y otro es la pérdida de la viabilidad de las bacterias.

Según la información de la base de datos 16 muestras (22.54 %) de las 71 especificadas como *S. aureus* no amplificaron el gen *nuc* ni *mec*, y 3 (4.22 %) solo amplificaron *mec* sin *nuc*. Barski, Piechowicz, & Galin (1996), reporto que el 3% de las cepas examinadas no amplificó *mec*, y que previamente se habían reportado como resistentes. El autor considera que la situación puede acontecer cuando se emplean primers que corresponde a un fragmento del gen, en este caso los primers son de un fragmento de *mecA*, no de todo el gen. Además, puede ser por muestras sin los genes reguladores de la producción de PBP2, y la resistencia previamente detectada se trate de una adaptación a los medios con antibióticos (Barski et al., 1996). Entonces, las muestras resistentes que pasaron a sensibles deben ser consideradas como resistentes. En el resumen presentado por Y. Liu, Zhang, & Ji (2016), el 100% de muestras que son *S. aureus* amplifica los primers presentados para identificar *nuc*. Por lo cual, se descartan como *S. aureus* las 19 muestras que no amplificaron *nuc*.

Las pruebas moleculares junto con la caracterización morfológica y bioquímica son herramientas complementarias que ayudan a la correcta tipificación de aislados clínicos. Los diferentes tipos de PCR, ya sea convencional, multiplex, retro transcriptasa, tiempo real o

amplificación isotérmica son ensayos con sensibilidades desde 75 % al 100 %, con tiempos de examinación de hasta 48 horas tomando en cuenta el tiempo de cultivo (Y. Liu et al., 2016).

Posteriormente, se analizó la temperatura de alineamiento de los primer de los factores de virulencia y genes de referencia. Considerando que la temperatura de annealing debe ser alrededor de 5°C inferior a la temperatura de melting de los primers (ThermoFisherScientific, 2015), se probó el alineamiento de los primers a 54, 57 y 60 °C. En la retro transcripción por PCR convencional, los factores de virulencia amplificaron a las temperaturas de 54 y 57 °C, por lo que se seleccionó 55°C para los ensayos de tiempo real. Inicialmente se propuso *16S* y *gyr* como genes de referencia, no obstante, durante los ensayos de PCR en tiempo real se observó que *16S* presentaba un Cp temprano, alrededor de 12 y *gyr* se ha identificado como factor de resistencia. Por lo cual, se planteó usar *nuc* con temperatura de alineamiento óptima de 61°C establecida en los ensayos de tiempo real.

La sensibilidad analítica de los sistemas se realizó con el fin de determinar la eficiencia de amplificación. Según Udvardi, Czechowski, & Scheible (2008), previo a esto se deben tomar en cuenta varios factores, considerados a continuación. Proponen usar RNA o cDNA en alícuotas y almacenado a -80°C, y tratar de remover la contaminación por DNA genómico. Lo cual se cumplió, al después de la extracción de RNA usar TURBO DNA-free™ (Ambion). Preparar las reacciones en un ambiente limpio y reducir el número de pipeteos al preparar un máster mix. En la experimentación se trabajó en cabinas de bioseguridad previamente desinfectadas con DNAZap™ (Ambion). También mencionan, que la longitud de los primers debe ir de 18 a 25 bp conteniendo entre 40 al 60 % de GC, y el producto de amplificación debe ser de 60 a 150 bp. Mientras que, Quellhorst & Rulli (2012), menciona que la longitud del amplicón debe estar entre 50 a 210 bp, con porcentaje de GC de 35 a 65 %. Los primers empleados cumplen con las

especificaciones de longitud y porcentaje de GC, el producto de amplificación en el caso de *nuc* y de *gyr* excede las sugerencias. Sin embargo, estos primers son los señalados en otras investigaciones. Además, los primers de los factores de virulencia se basaron en los establecidos en la investigación de Jenkins et al. (2015) sobre expresión *in vitro* y en modelo animal.

Udvardi et al. (2008), sugiere validar los genes de referencia y a través de las curvas de melting establecer que exista un pico único al usar la química de SYBR para descartar que se trate de amplicones no deseados o de contaminación. Durante los ensayos se analizó las curvas de melting y en el caso de *nuc* y *16S* se cambió la concentración de primer de 0.5 a 0.2 μM , con el fin de eliminar alineamientos no deseados en la detección.

Se seleccionó PCR en tiempo real en dos pasos, debido a que presenta ventajas en comparación con los ensayos en un solo paso. ThermoFisher Scientific (n.d.) establece que el cDNA puede ser almacenado por largos periodos de tiempo sin degradarse, y existe mayor sensibilidad ya que las reacciones no están comprometidas por pasos intermedios con reactivos combinados. Como desventaja tiene el exceso de pasos de pipeteo, el consumo de tiempo y posibilidad de contaminación. Ambas técnicas ya sea en uno o en dos pasos, tienen sus ventajas y desventajas, pero se debe considerar la disponibilidad de reactivos y recursos en el centro de investigación, durante la planificación del proyecto. Al hacer el proceso en dos pasos se debe usar alrededor de 1 pg a 100 ng de cDNA obtenido de RNA total (ThermoFisherScientific, 2015). En los ensayos de estandarización de sensibilidad analítica se partió de 2.5 ng de cDNA como concentración final en el mix, con límite máximo de detección de 30.9 pg de los factores de virulencia y 4 pg los genes de referencia. Durante el ensayo de expresión de factores de virulencia se empleó 250 pg de cDNA final en el mix. Los valores se encuentran dentro de lo recomendado.

En el Manual de PCR en tiempo real de ThermoFisherScientific (2015), menciona que la eficiencia debe estar el rango de 90 % al 110 %. Todos los genes cumplen con lo especificado, siendo el valor mínimo de 92.27 % y el máximo alcanzado de 108.38 %. Si la eficiencia es inferior al 100% se debe al diseño de primers o a las condiciones inadecuadas de extensión, en el caso que excede del 100% es por inhibidores provenientes de los procesos de extracción de RNA, errores de pipeteo o alineamiento inespecífico (BioSistemika, n.d.). Quellhorst & Rulli (2012), examinó el perfil de amplificación de 4000 genes, donde la eficiencia promedio fue de 99% y el intervalo de confianza entre el 90 al 110 %. El autor sugiere que la eficiencia debe exceder del 90 % para tener resultados confiables y precisos.

Bogestam, Vondracek, Karlsson, Fang, & Giske (2018), hicieron una comparación entre *nuc* con SYBR usando el set de primers habitual de 280 bp, versus uno nuevo con sonda que amplificaba un fragmento de 69 bp, con temperatura de alineamiento de 60°C. La eficiencia de amplificación que alcanzaron por SYBR fue entre 70 % al 86 %, mientras que, con sonda en las dos muestras que probaron fue de 86%. En esta experimentación la eficiencia de amplificación fue del 99.64 %, y fue la más cercana al 100% es decir a la duplicación del DNA de plantilla por ciclo. De igual forma, Bogestam et al. (2018) menciona que la sensibilidad de la sondas es mayor y su implementación es benéfica en el diagnóstico clínico debido a su bajo costo. Sin embargo, se debe considerar la disposición de recursos, razón por la cual en este trabajo se realizó a partir de SYBR y con primers convencionales.

Para generar la base de datos inicial de los Cp, el valor de tres es el número mínimo de repeticiones para detectar valores atípicos y obtener significancia estadística (Goni, Garcí, & Foissac, 2009). En las metodologías de identificación de valores atípicos se encuentran la visualización de diagrama de caja y la aplicación de la prueba de Grubbs. Los datos del ensayo de

tiempo real se analizaron por los dos métodos, la prueba de Grubb para eliminar valores atípicos y por los gráficos se verificó que no existan valores fuera de los rangos. Según lo describe Burns, Nixon, Foy, & Harris, (2005) la prueba de Grubb está recomendada por la Organización Internacional de Normalización ISO 5725-2, por su simplicidad y precisión. En la normativa se sugiere conservar los datos rezagados, es decir, aquellos que se encuentran entre el 95% del rango de la muestra. El descarte de puntos inconsistentes con la muestra se debe realizar antes de los análisis de qPCR pertinentes, pero se puede mantener los valores atípicos solo cuando sea justificado (Burns et al., 2005). En la investigación se contaba de 6 a más puntos de repeticiones técnicas para cada muestra. En algunos casos los puntos extra se deben a que no amplificaron por lo cual se debían compensar los valores faltantes. En otras muestras, las triplas amplificaron distintas entre sí, y la repetición contribuyó al ajuste de datos. Mediante la estadística de Grubb se logró tener baja variabilidad y muestras robustas. Al final se mantuvieron 5 repeticiones técnicas por muestra para el cálculo de ratios de amplificación.

Después del refinamiento de los datos crudos se calculó el coeficiente de variación entre datos para cada gen y entre datos de las muestras. Cuando se consideran los datos generales de los Cp de los genes, existe alta variación demostrada por Cp entre el 10% al 20%. Esto se debe a que las muestras en cada gen amplifican a diferente Cp. Los coeficientes de variación para las muestras individualmente estimados por sus repeticiones fueron inferiores al 10%, por excepción de dos valores en *16S* que llegaron hasta 12%. Johnson et al. (2016), dice que los coeficientes de variación deben ser inferiores al 20% para ser considerados en los cálculos siguientes y tener resultados consistentes. Los rangos que se detectaron en este ensayo cumplen al ser inferiores al 20%. Los errores más frecuentes durante la qPCR y que incrementan

el coeficiente de variación entre 5 % a 37 % provienen del pipeteo y contaminación de los ácidos nucleicos (S. C. Taylor et al., 2019).

Según los lineamientos de MIQE o Información mínima para la publicación experimentos cuantitativos de PCR en tiempo real de Bustin et al., (2009), es necesario la documentación y estadística precisa de los datos, por lo que la presentación de los C_p o C_q deben contar con un evaluador de varianza como son los intervalos de confianza al 95%. Es por eso, que en las gráficas se fijó este parámetro para los límites superiores e inferiores de la distribución de los datos.

El establecimiento de la normalidad de los datos se debe que de esta consisten las pruebas estadísticas que se realicen a continuación. Si los datos se asemejan a la distribución normal se deben hacer pruebas paramétricas como la prueba de T, mientras que, las no paramétricas no asumen este tipo de distribución, es el caso de la prueba de Kruskal Wallis o la de Mann-Whitney U (Goni et al., 2009). La prueba de Shapiro – Wilk estudia si los datos cumplen con la tendencia de la distribución normal. La mayoría de los datos en esta experimentación cumplieron con la hipótesis alternativa, que no siguen la distribución normal, por lo que se usó la prueba de Mann-Whitney U en el cálculo de diferencia de expresión de susceptibilidad de los logaritmos de las ratios y los ΔC_p . Se hizo la prueba de t en los datos de las muestras individuales, ya que los valores de las repeticiones técnicas cumplen con la normalidad.

La selección del gen de referencia es crucial, debido a que es el control interno con el cual se va a normalizar los datos. La normalización empleando solo un gen de referencia no es aceptable a menos de que se demuestre la invariabilidad y consistencia de la expresión bajo las condiciones de experimentación (Bustin et al., 2009). En el caso de *16S* para *S. aureus*, existen investigaciones en las cuales ya se ha empleado el mismo set de primers que en este ensayo. Se

podría decir que es el estándar para el análisis en bacterias. No se efectuó la normalización frente a varios genes de referencia ya que en este caso para el gen *gyr*, se quería probar si existía variabilidad según la susceptibilidad y *nuc* por su lado no amplificó en 4 muestras. Existen una amplia gama de programas que contribuyen al análisis de la selección del gen de referencia como GeNorm, NormFinder y BestKeeper. La mejor forma de seleccionar el gen de referencia es comparar entre varios programas (Sigma-Aldrich, 2020). Refinder de Xie et al. (2012), permite examinar la clasificación de posibles genes de referencia, resultante de cada algoritmo antes mencionado.

Existieron cuatro muestras que no amplificaron *nuc*, siendo que antes se verificó que contaban con el gen en su genoma al hacer la PCR multiplex. Wang et al., (2014) notifica que en su PCR múltiple en tiempo real *16S* amplificó en el 100% de sus muestras, mientras que, *nuc* lo hizo en el 97.2%, es decir en 35 de 36, siendo 1 negativa. Saraiva et al. (2018), reporta que 9 de 68 muestras no amplificaron *nuc*. La aplicación de *nuc* puede conllevar a falsos negativos, ya que existen diferencias identificadas en el genoma para *nuc* y *spa*, en aislados de muestras clínicas, tanto para ensayos con primers convencionales como con nuevos primers con sonda (Bogestam et al., 2018; Hoegh et al., 2014).

Una vez concluidos los análisis en los datos sin procesar y selección del gen de referencia, se calculó por medio del método de Pfaffl la ratio de expresión o denominado fold. Se usó este método ya que las eficiencias se encontraron entre el rango del 92 al 108 %, por lo cual no se podía asumir que el DNA se duplica por ciclo y se descartó la aplicación de $\Delta\Delta Ct$. El resultado del ratio es asimétrico. La proporción de los valores positivos es decir superiores a 1 y los negativos o inferiores a 1 y mayores de 0, no tiene reciprocidad. Mientras que, los datos transformados a logaritmos reducen problemas asociados a porcentajes de las ratios (Keene,

1995). Además, es recomendado hacer los análisis sobre los datos logarítmicos (Keene, 1995; S. C. Taylor et al., 2019).

En la experimentación se reportó el resultado del ratio en base logarítmica para visualizar la inhibición o expresión individualmente por muestra. Mientras que, la comparación entre sensibles y resistentes se hizo por dos sets de datos: por las ratios logarítmicos y a través la corrección del Cp de la muestra con la diferencia entre Cp del gen target y el de referencia, es decir el cálculo inicial de $\Delta\Delta Ct$. Existen desventajas de ambos métodos. En $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se asume que el DNA se duplica por ciclo independientemente del gen, pero esto en realidad no se cumple en todos los sistemas. En Pfaffl se corrige la eficiencia de amplificación, pero asume que la eficiencia es igual para el control y muestras, lo cual es incorrecto y se ha probado que cada muestra tiene su propia eficiencia de amplificación (Rao, Huang, Zhou, & Lin, 2013). Sin embargo, se ocupó los dos cálculos para analizar las diferencias entre los niveles de susceptibilidad.

En la investigación de Jenkins et al. (2015), se considera que los genes *fhuD*, *fnbA*, *hla*, *sstD* y *sdrC*, tienen un papel en la patogénesis por *S. aureus*. En este ensayo se encontró que una de 30 muestras amplificó cuatro de los cinco factores de virulencia mencionados por el autor. Mientras, otras 10 muestras expresaron de entre uno a tres genes diferentes. Las demás 19 estuvieron inhibidas. Como se mencionó antes, al estar conservados por un largo periodo pudo haber la pérdida de funciones que implicaban la expresión de algunos factores de virulencia.

Según el estudio en modelos animales si se expresan *fhuD*, *fnbA*, y *sstD* corresponde a una bacteremia temprana, si adicionalmente se expresa *hla* la infección es avanzada y se presentan lesiones tromboembólicas (Jenkins et al., 2015). En este caso AD, B, BJ, F, G, AO son considerados como aislados con pacientes de bacteremias que conjuntamente ya han

desarrollado lesiones. AP AI, AL, U, I, serian a pacientes de bacteremias tempranas por la falta de expresión de *hla*. AG y A, amplificaron *hla* sin ningún otro gen.

Durante los primeros días de la infección aumenta *fhuD*, principalmente en los pulmones a diferencia de órganos ricos en hierro como el corazón, esto debido a que el exceso de hierro en las vías respiratorias causa daño celular por especies reactivas de oxígeno (ROS) y el hierro no está disponible sino como ferritina (Bacconi et al., 2017). La mayoría de bacteremias se origina de la flora normal del paciente, en especial en personas con talasemia, que debido a sus tratamientos cuentan con exceso de hierro, el cual es captado por *fhuD* de *S. aureus* (Hammer & Skaar, 2011). El mismo efecto se vio cuando la bacteria es resistente a penicilina (Endicott, Lee, & Wencewicz, n.d.). Independientemente de la susceptibilidad, *S. aureus* aprovechara el exceso de hierro y el incremento de la expresión de este gen se relaciona con el inicio de la infección.

En un estudio de colonización vaginal por MRSA se demuestra que existe un vínculo de la infección con la sobreexpresión de genes que contribuyen a captura de hierro y a la adherencia a la fibronectina (Deng et al., 2019). Igualmente, en este estudio los genes ligados a estas funciones como son *fhuD* y *fnbA*, tuvieron expresión significativa a diferencia de los demás factores de virulencia. Como caso particular, estos dos genes fueron significativamente expresados por los aislados resistentes a diferencia de los MSSA (Figura 58).

La expresión de *fnbA* en el estadio temprano de la infección se debe a la función de la proteína a la adhesión de las células epiteliales, lo cual le permite diseminarse a diferentes órganos. Esto se ha comprobado al ver que muestras con alteraciones en *fnbA* tienen menor capacidad de anclaje al hospedero, y la infección no persiste (Grundmeier et al., 2004). No obstante, cuando *fnbA* no tiene mutaciones, por si sola sin otros genes con función homóloga es

capaz de invadir las células y desembocar en infecciones endovasculares (Josse, Laurent, & Diot, 2017).

La α -hemolisina producida por *hla*, y es el factor de virulencia encargado de la evasión a la respuesta inmune. Es una toxina que genera poros en las células eucariotas induciendo la apoptosis. Cuando *S. aureus* detecta la desgranulación inducida por los mastocitos del hospedero, induce la sobreexpresión de *hla* y *fnbA* (Goldmann, Tuchscher, Rohde, & Medina, 2016). Según explica el autor, la α -hemolisina protege a la bacteria frente a las células inmunes, mientras *fnbA* contribuye con la internalización de la bacteria en los tejidos, ayudando a escapar al patógeno. La α -hemolisina causa daño celular cuando se une con su receptor, la metaloproteasa ADAM10, y resulta en la escisión de la E-cadherina u otras integrinas, que son las responsables en la unión de las células a la matriz de soporte. (Goldmann et al., 2016; Inoshima et al., 2011; Wilke & Wardenburg, 2010). Esto sucede tanto a las células epiteliales alveolares como en los mastocitos. Al romper la unión célula-célula es más sencillo para *S. aureus* entrar e infectar.

Al igual que *fhuD*, la proteína de *sstD* es un sideróforo que está diseñado para capturar hierro para las funciones metabólicas. La diferencia está en que *sstD* captura el hierro ligado a hormonas de estrés como las catecolaminas, que circulan en el torrente sanguíneo hasta concentraciones micromolares (Sheldon & Heinrichs, 2012). Según el mismo autor la baja afinidad de la proteína se compensa con una amplia variedad de sustratos que puede reconocer. Se requiere de un grupo de proteínas que capturen hierro como Hts, Sir y Sst para cumplir con las necesidades nutricionales de *S. aureus* (Beasley, Marolda, Cheung, Buac, & Heinrichs, 2011). Es decir, se necesita de un grupo de genes que contribuyan con la virulencia completa para que la infección subsista. En este ensayo 12 muestras no amplificaron a *sstD*, lo cual se podría

traducir como que el gen no expresó en dichas muestras ya que el sustrato que reconoce no se encontraba en concentraciones detectables.

En la introducción se mencionó sobre la adaptación de *S. aureus* y la resistencia a fluoroquinolonas. Al secuenciar y comparar entre 116 aislados no relacionados geográficamente Schmitz et al., (1998) encontró mutaciones conservadas tanto en MRSA como en MSSA, resistentes a ciprofloxacino. Esto se corroboró al no diferenciar entre muestras sensibles y resistentes en cuanto a la expresión de *gyr*, asumiendo que los aislados estudiados corresponden a MRSA y no a la resistencia a fluoroquinolonas. O que en realidad el efecto a los antibióticos independientemente su tipo, no afectan la expresión de *gyr*. Se cree necesario examinar los perfiles de susceptibilidad de los aislados. En múltiples investigaciones se ha usado *gyr* como referencia y control para reconocer *S. aureus* (Holtfreter et al., 2016; Tranchemontagne, Camire, O'donnell, Baugh, & Burkholder, 2015). Sin embargo, *gyr* fue menos estable frente a 16S.

Según Thompson & Brown (2014) no existe diferencia entre la virulencia de MRSA comparada con MSSA, ambas cepas causan igual severidad de infección. Sin embargo, el estudio analizó 35 factores de virulencia y ninguno coincide con los presentes en esta experimentación, además los resultados se basaron en *Caenorhabditis elegans* y no en aislados obtenidos de pacientes. Por otra parte, Horváth et al.(2020), comparó 306 aislados clínicos entre MRSA y MSSA, donde no encontró diferencia de virulencia ni patogenicidad. Aunque la mortalidad con pacientes MRSA fue mayor, es independiente de los factores de virulencia y se debe a la avanzada edad de los pacientes o aislados resistentes a glicopéptidos con tratamiento inadecuado. Igualmente, X. Chen et al. (2017), halló mayor prevalencia de *fnbA* y *hla* en las muestras sensibles que en resistentes provenientes de pacientes del área de quemados.

Entonces, podemos concluir que no existe diferencia si la bacteremia es causada por MRSA o MSSA en cuanto a patogenicidad. Las consecuencias del desarrollo de la enfermedad se deben al tratamiento y mecanismos de defensa de los pacientes. La diferencia significativa entre aislados sensibles y resistentes en este estudio para *fhuD*, *fnbA*, *gyr* y *hla*, debe ser corregida con un mayor número de muestras. De igual forma aumentar los aislados resistentes contribuirá a la robustez del análisis de expresión. Además, en este ensayo la diferencia fue significativa por la muestra F (resistente), que fue la única que amplificó todos los factores de virulencia. Esta muestra debe ser estudiada por secuenciación y determinar si se corresponde a una cepa resistente con alta virulencia presente en la comunidad.

Como medida preventiva a la infección y rebrote de *S. aureus*, las estrategias de descolonización no son efectivas si se realiza solo en el área nasal. Como se mencionó antes, se encuentran reservorios de MRSA en la cavidad vaginal, por lo cual el contacto durante las actividades sexuales son un factor de riesgo para adquirir la bacteria (Deng et al., 2019). Además, el contacto con MRSA comunitaria es mayor a diferencia de la hospitalaria con el simple roce con fómites (Miller & Diep, 2008). La prevención por medio de buenas prácticas de laboratorio limita el contacto con posibles aislados virulentos. Mientras que, las técnicas de higiene efectuadas correctamente previenen el contacto comunitario de patógenos.

Capítulo VI: Conclusiones

Se recuperó 50 aislados sensibles a antibióticos y 21 resistentes, obteniendo un total de 71 correspondientes a *S. aureus*, a partir de muestras adquiridas en los Hospitales Eugenio Espejo y Carlos Andrade Marín recolectadas en el período 2015-2017. La recuperación del 38.37% de aislados confirma la alta capacidad de adaptación de *S. aureus* a ambientes hostiles.

La aplicación de técnicas morfológicas, bioquímicas y moleculares contribuye con la correcta identificación de aislados clínicos. La sensibilidad en la identificación fue del 73.24 %. Ya que de las 71 muestras registradas como *S. aureus* en la base de datos, 52 fueron *nuc* positivas. El criterio de selección de *S. aureus* consiste en el reconocimiento de *nuc* en el genoma. A través del análisis por PCR multiplex se reconocieron 36 muestras sensibles y 16 resistentes. La proporción de sensibles sobre resistentes se mantuvo siendo siempre mayor para las sensibles.

La determinación de temperatura de alineamiento de los primers empleados para reconocer factores de virulencia y de los genes de referencia, es el paso previo a los análisis en tiempo real. Al verificar el alineamiento y detección de los fragmentos se estableció que *fhuD*, *fnbA*, *gyr*, *hla* y *sstD* amplifican a 55°C, mientras que *nuc* requiere de 61°C y *16S* de 64°C.

La concentración de primers durante la PCR en tiempo real para los factores de virulencia fue de 0.5 µM. En el caso de los dos genes de referencia propuestos *16S* y *nuc*, se necesitó de 0.2 µM de primers para evitar la asociación de productos inespecíficos.

La eficiencia de amplificación para todos los genes estuvo dentro del rango del 90 % al 110%. La menor fue de *sstD* con 92.27 %, seguido de *fnbA* con 97.13 %, *16S* 98.47 %, *nuc* 99.64 %, *fhuD* 102.24 %, *gyr* 105.16% y *hla* 108.38%.

Comparando entre *16S*, *gyr* y *nuc* como genes de referencia se estableció que *16S* era el candidato más estable y con menor variabilidad en su desviación por medio de cuatro programas, BestKeeper, DeltaCt, Genorm y NormanFinder.

La muestra ATCC 25923 no amplificó *hla*, *fnbA* y *sstD*, por lo que no se pudo usar como calibrador en el cálculo de las ratios de expresión y se sustituyó con el aislado sensible AA, con expresión de todos los factores de virulencia y genes de referencia.

La muestra F expresó *fhuD*, *fnbA*, *gyr*, *hla* y *sstD* siendo todos los factores de virulencia estudiados. Los aislados AD, B, BJ, G, expresaron en exceso todos a excepción de *gyr*. Las muestras AO *fhuD*, *fnbA*, *hla* y AP *fhuD*, *fnbA*. Las muestras AI, AL, U, solo fue significativo para *fnbA*, mientras que I *fhuD* y únicamente *hla* por A y AG.

Las muestras que expresan *fhuD*, *fnbA* y *sstD*, son las que se presume que provienen de pacientes con bacteremias tempranas, ya que los genes traducen proteínas asociadas a la captura de requerimientos nutricionales como el hierro y a la adhesión a las células para su propagación.

La expresión de *hla* implica la presencia de la α -hemolisina, la cual se asocia a las células induciendo daño celular, y la expresión de *hla* se asocia a lesiones endovasculares avanzadas o bacteremias causadas por *S. aureus*.

La función de genes asociados a funciones celulares intrínsecas, como *gyr* no se vio afectada y desconoce la diferencia entre aislados sensibles o resistentes. A excepción de la muestra F que fue la única con sobreexpresión.

Los genes *fhuD*, *fnbA* y *hla* tuvieron diferencia en la expresión según la susceptibilidad de la muestra. Esto se debe principalmente, al aislado F, que sobreexpresó todos los genes y contribuyó a la significancia estadística en el grupo de aislados resistentes.

Capítulo VII: Recomendaciones

Analizar por SEM y TEM, alteraciones en la morfología de la bacteria. En vista de que los aislados pasaron un largo periodo de tiempo a 4°C. Se considera la existencia de cambio fenotípicos, metabólicos y proteómicos, en las muestras frente a bacterias wildtype.

Se recomienda continuar con el estudio de secuenciación de las muestras. Con el objetivo de analizar la variabilidad genética en las secuencias de los genes. Esto permitirá identificar cambios que aporten información acerca de la sobreexpresión o inhibición de dichos genes, y el efecto en la respuesta infecciosa.

Completar el ensayo de expresión de factores de virulencia con las muestras restantes. Además, del estudio de expresión del gen *sdrC*, el cual por cuestión de insumos no se pudo ejecutar en este trabajo.

En la extracción de RNA utilizar un método de ruptura mecánico. Visto que, con el enzimático junto con el tiempo de incubación descrito por el inserto del kit, no se puede romper la pared celular de la bacteria coco Gram-positivo, obteniendo un RNA de baja concentración.

Realizar perfiles de susceptibilidad ha antibióticos de todas las muestras. Con el objetivo de confirmar el nivel de resistencia de los aislados conservados.

Analizar otros genes de resistencia a parte de *mecA*, como *ermA*, *femA* o el cassette SCCmec, para las muestras que se detectaron como sensibles y previamente como resistentes.

Secuenciar las muestras A, D, L y S para confirmar la presencia de *nuc* en el genoma. Y averiguar polimorfismos por los cuales no se reconoció como RNA en la qPCR.

Debido a que *gyr* no muestra diferencia significativa en MRSA se recomienda hacer el cálculo de ratios de expresión normalizando con dos genes, *gyr* y *16S* para seguir las sugerencias de las MIQE.

Bibliografía

- Alreshidi, M. M., Dunstan, R. H., Macdonald, M. M., Smith, N. D., Gottries, J., & Roberts, T. K. (2015). Metabolomic and proteomic responses of *Staphylococcus aureus* to prolonged cold stress. *Journal of Proteomics*, *121*, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.010>
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, *5*(2), 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
- Baconi, M., Haag, F., Chiarot, E., Donato, P., Bagnoli, F., Delany, I., ... Freitag, N. (2017). In vivo analysis of *Staphylococcus aureus* infected mice reveals differential temporal and spatial expression patterns of fhuD2. *American Society for Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/IAI.00270-17>
- Barghouthi, S. A. (2011). A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. *Indian Journal of Microbiology*, *51*(4), 430–444. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0122-5>
- Barski, P., Piechowicz, L., & Galin, J. (1996). Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. *Molecular and Cellular Probes*, *471–475*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9025087/>
- Beasley, F. C., Marolda, C. L., Cheung, J., Buac, S., & Heinrichs, D. E. (2011). *Staphylococcus aureus* transporters Hts, Sir, and Sst capture iron liberated from human transferrin by staphyloferrin A, staphyloferrin B, and catecholamine stress hormones, respectively, and contribute to virulence. *Infection and Immunity*, *79*(6), 2345–2355. <https://doi.org/10.1128/IAI.00117-11>
- Bignardi, G. E., Woodford, N., Chapman, A., Johnson, A. P., & Speller, D. C. E. (1996). Detection

of the *mec-A* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 37).

<https://pdfs.semanticscholar.org/e95e/b0a40fef7d187c92eeba67398a24297dda05.pdf>

BioSistemika. (n.d.). Understanding qPCR Efficiency and Why It Exceeds 100% | BioSistemika.

<https://biosistemika.com/2017/11/15/qpcr-efficiency-over-100/>

Bogestam, K., Vondracek, M., Karlsson, M., Fang, H., & Giske, C. G. (2018). *Introduction of a hydrolysis probe PCR assay for high-throughput screening of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with the ability to include or exclude detection of Staphylococcus argenteus*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192782>

Brakstad, O. G., Aasbakk, K., & Maeland, J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the *nuc* Gene. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 30). <http://jcm.asm.org/>

Budding, A. E., Hoogewerf, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Savelkoul, P. H. M. (2016). Automated Broad-Range Molecular Detection of Bacteria in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(4), 934–943. <https://doi.org/10.1128/JCM.02886-15>

Burns, M. J., Nixon, G. J., Foy, C. A., & Harris, N. (2005). Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods - Evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnology*, *5*, 31. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-5-31>

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611–622.

<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

- Bustos Cabrera, A. del R., & Salame Ortíz, A. C. (2015). *Prevalencia de Staphylococcus aureus meticilino resistente, en portadores nasales en el personal de la salud, en los Hospitales Públicos y de la Seguridad Social en la ciudad de Quito y su relación con factores de riesgo individuales y laborales*. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/4730>
- Cervantes, E., García, R., & Paz, M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. In *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* (Vol. 61). www.medigraphic.com/patologiaclinicawww.medigraphic.org.mx
- Chambers, H. F., & Deleo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(9), 629–641. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>
- Chen, F.-J., Wang, C.-H., Chen, C.-Y., Hsu, Y.-C., & Wang, K.-T. (2014). Role of the *mecA* Gene in Oxacillin Resistance in a *Staphylococcus aureus* Clinical Strain with a *pvl*-Positive ST59 Genetic Background. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 1047–1054. <https://doi.org/10.1128/AAC.02045-13>
- Chen, X., Wu, Z., Zhou, Y., Zhu, J., Li, K., Shao, H., & Wei, L. (2017). Molecular and virulence characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in burn patients. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 1(1), 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.flm.2017.02.010>
- Connolly, J., Boldock, E., Prince, L. R., Renshaw, S. A., Whyte, M. K., & Foster, S. J. (2017). Identification of *Staphylococcus aureus* Factors Required for Pathogenicity and Growth in Human Blood. *Infection and Immunity*, 85(11), 1–15. <https://doi.org/10.1128/iai.00337-17>
- Cook, H. A., Furuya, E. Y., Larson, E., Vasquez, G., & Lowy, F. D. (2007, February 1). Heterosexual transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 44, pp. 410–413. <https://doi.org/10.1086/510681>

- Cross, A. S. (2008). What is a virulence factor? *Critical Care (London, England)*, 12(6), 196.
<https://doi.org/10.1186/cc7127>
- Deng, L., Schilcher, K., Burcham, L. R., Kwiecinski, J. M., Johnson, P. M., Head, S. R., ... Doran, K. S. (2019). Identification of key determinants of *Staphylococcus aureus* vaginal colonization. *MBio*, 10(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.02321-19>
- Duquesne Amilcar, Castro, N., Monzote, A., & Paredes, I. (2015). Revista cubana de medicina general integral. In *Revista Cubana de Medicina General Integral* (Vol. 31).
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252015000300004
- Duran, A., Zhurbenko, R., & Viera, D. (2004). Propuesta de una modificación en la formulación del medio agar manitol salado utilizado en el aislamiento de estafilococos de importancia clínica. In *Revista Cubana de Medicina Tropical* (Vol. 56).
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602004000300004
- Endicott, N. P., Lee, E., & Wencewicz, T. A. (n.d.). *Structural Basis for Xenosiderophore Utilization by the Human Pathogen Staphylococcus aureus*.
- Feizabadi, M., Ghodousi, A., Nomanpour, B., Davoudi, S., Maleknejad, P., Omrani, M., ... Salehi, T. (2012). Application of fnbA gene as new target for the species-specific and quantitative detection of *Staphylococcus aureus* directly from lower respiratory tract specimens by real time PCR. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 55(4), 490.
<https://doi.org/10.4103/0377-4929.107787>
- Foster, T. J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 430–449.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fux007>
- Fowler, V., & Holland, T. (2019). Clinical approach to *Staphylococcus aureus* bacteremia in adults

- UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/clinical-approach-to-staphylococcus-aureus-bacteremia-in-adults#H1>

- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *The Journal of Investigative Dermatology*, *133*(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Goerke, C., Bayer, M. G., & Wolz, C. (2001). Quantification of bacterial transcripts during infection using competitive reverse transcription-PCR (RT-PCR) and LightCycler RT-PCR. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *8*(2), 279–282. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.2.279-282.2001>
- Goldmann, O., Tuchscher, L., Rohde, M., & Medina, E. (2016). α -Hemolysin enhances *Staphylococcus aureus* internalization and survival within mast cells by modulating the expression of β 1 integrin. *Cellular Microbiology*, *18*(6), 807–819. <https://doi.org/10.1111/cmi.12550>
- Goni, R., Garcí, P., & Foissac, S. (2009). The qPCR data statistical analysis . *Integromics SL* . <https://gene-quantification.de/integromics-qpcr-statistics-white-paper.pdf>
- Grundmeier, M., Hussain, M., Becker, P., Heilmann, C., Peters, G., & Sinha, B. (2004). Truncation of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* strain newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function. *Infection and Immunity*, *72*(12), 7155–7163. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.7155-7163.2004>
- Haaber, J., Penadés, J. R., & Ingmer, H. (2017). Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, *25*(11), 893–905. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.011>
- Habib, F., Rind, R., Durani, N., Latif Bhutto, A., Buriro, R. S., Tunio, A., ... Shoaib, M. (2015). Morphological and Cultural Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from

- Different Animal Species. *J. Appl. Environ. Biol. Sci*, 5(2), 15–26. www.textroad.com
- Hammer, N. D., & Skaar, E. P. (2011). Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annual Review of Microbiology*, 65, 129–147.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102851>
- Harris, L. G., Foster, S. J., Richards, R. G., Lambert, P., Stickler, D., & Eley, A. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. *European Cells and Materials*, Vol. 4, pp. 39–60. AO Research Institute Davos.
- Hoegh, S. V., Skov, M. N., Boye, K., Worning, P., Jensen, T. G., & Kemp, M. (2014). Variations in the *Staphylococcus aureus*-specific nuc gene can potentially lead to misidentification of methicillin-susceptible and -resistant *S. aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 63(PART 7), 1020–1022. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.076638-0>
- Holtfreter, S., Grumann, D., Balau, V., Barwich, A., Kolata, J., Goehler, A., ... Bröker, B. M. (2016). Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in the general Pomerania (SHIP-TREND-0) 3 4 Downloaded from. *J. Clin. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/JCM.00312-16>
- Horváth, A., Dobay, O., Sahin-Tóth, J., Juhász, E., Pongrácz, J., Iván, M., ... Kristóf, K. (2020). Characterisation of antibiotic resistance, virulence, clonality and mortality in MRSA and MSSA bloodstream infections at a tertiary-level hospital in Hungary: a 6-year retrospective study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 19, 17. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00357-z>
- Hui, K., & Feng, Z.-P. (2013). Efficient experimental design and analysis of real-time PCR assays. *Channels*, 7(3), 160–170. <https://doi.org/10.4161/chan.24024>
- Inoshima, I., Inoshima, N., Wilke, G. A., Powers, M. E., Frank, K. M., Wang, Y., & Wardenburg, J. B. (2011). A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to

cause lethal infection in mice. *Nature Medicine*, 17(10), 1310–1314.

<https://doi.org/10.1038/nm.2451>

Jayarathne, P., & Rutherford, C. (1999). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from growth on mannitol salt oxacillin agar using PCR for nosocomial surveillance. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 35(1), 13–18.

[https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(99\)00060-7](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(99)00060-7)

Jenkins, A., Diep, A., Mai, T. T., Vo, N. H., Warrenner, P., Suzich, J., ... Sellman, R. (2015).

Differential Expression and Roles of *Staphylococcus aureus* Virulence Determinants during Colonization and Disease. *MBio*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.02272-14>. Editor

Johnson, E. J., Zemanick, E. T., Accurso, F. J., Wagner, B. D., Robertson, C. E., & Harris, J. K.

(2016). Molecular Identification of *Staphylococcus aureus* in Airway Samples from Children with Cystic Fibrosis. *PLOS ONE*, 11(1), e0147643.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147643>

Jokinen, E., Laine, J., Huttunen, R., Lyytikäinen, O., Vuento, R., Vuopio, J., & Syrjänen, J. (2018).

Trends in incidence and resistance patterns of *Staphylococcus aureus* bacteremia.

Infectious Diseases, 50(1), 52–58. <https://doi.org/10.1080/23744235.2017.1405276>

Josse, J., Laurent, F., & Diot, A. (2017). Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion:

Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 2433.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02433>

Keene, O. N. (1995). The log transformation is special. *Statistics in Medicine*, 14(8), 811–819.

<https://doi.org/10.1002/sim.4780140810>

Kobayashi, S. D., Malachowa, N., & DeLeo, F. R. (2015). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. *The American Journal of Pathology*, 185(6), 1518–1527.

<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.11.030>

Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews. Microbiology*, *8*(6), 423–435.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>

Laabei, M., Uhlemann, A.-C., Lowy, F. D., Austin, E. D., Yokoyama, M., Ouadi, K., ... Massey, R. C. (2015). Evolutionary Trade-Offs Underlie the Multi-faceted Virulence of *Staphylococcus aureus*. *PLOS Biology*, *13*(9), e1002229. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002229>

Laupland, K. B., Lyytikäinen, O., Sgaard, M., Kennedy, K. J., Knudsen, J. D., Ostergaard, C., ... International Bacteremia Surveillance Collaborative. (2013). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. *Clinical Microbiology and Infection*, *19*(5), 465–471.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03903.x>

Lechner, S., Lewis, K., & Bertram, R. (2012). *Staphylococcus aureus* Persists Tolerant to Bactericidal Antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *22*(4), 235–244. <https://doi.org/10.1159/000342449>

Liao, C.-H., & Shollenberger, L. M. (2003). Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline*. *Letters in Applied Microbiology*, *37*(1), 45–50.

<https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01345.x>

Liu, H., Lv, J., Qi, X., Ding, Y., Li, D., Hu, L., ... Yu, F. (2015). The carriage of the serine-aspartate repeat protein-encoding sdr genes among *Staphylococcus aureus* lineages. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *19*(5), 498–502. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.07.003>

Liu, Y., Zhang, J., & Ji, Y. (2016). PCR-based Approaches for the Detection of Clinical Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Open Microbiology Journal*, *10*(1), 45–56.

<https://doi.org/10.2174/1874285801610010045>

Louie, L., Goodfellow, J., Mathieu, P., Glatt, A., Louie, M., & Simor, A. E. (2002). *Rapid Detection of Methicillin-Resistant Staphylococci from Blood Culture Bottles by Using a Multiplex PCR Assay*. *40*(8), 2786–2790. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2786>

Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, *111*(9), 1265–1273. <https://doi.org/10.1172/JCI18535>

Massachusetts Medical Society. (n.d.). Pathogenic factors of *Staphylococcus aureus* with structural and... | Download Scientific Diagram. 1998 website:

https://www.researchgate.net/figure/Pathogenic-factors-of-Staphylococcus-aureus-with-structural-and-secreted-products-both_fig5_318762255

Microbiology in Pictures. (2019). *Staphylococcus epidermidis* on agar plate with tryptic soy agar (trypticase soy agar, TSA). Growth of *S.epidermidis* in Petri dish on nutrient agar medium. Appearance and morphology of *Staphylococcus epidermidis* and *S.aureus* colonies. de <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/staphylococcus-epidermidis-photos/staph-epidermidis-tsa.html>

Miller, L. G., & Diep, B. A. (2008, March 1). Colonization, fomites, and virulence: Rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 46, pp. 752–760. <https://doi.org/10.1086/526773>

Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2013). Growth and laboratory maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Current Protocols in Microbiology*, CHAPTER 9(SUPPL.28), Unit. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc09c01s28>

Morrissey, J. A., Cockayne, A., Hill, P. J., & Williams, P. (2000). Molecular cloning and analysis of

- a putative siderophore ABC transporter from *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 68(11), 6281–6288. <https://doi.org/10.1128/iai.68.11.6281-6288.2000>
- Onyango, L. A., Hugh Dunstan, R., Roberts, T. K., Macdonald, M. M., & Gottfries, J. (2013). Phenotypic Variants of Staphylococci and Their Underlying Population Distributions Following Exposure to Stress. *PLoS ONE*, 8(10), 77614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077614>
- Pantosti, A., Sanchini, A., & Monaco, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*, 2(3), 323–334. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.3.323>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Poonawala, H., & Peaper, D. (2017). Bacterial Identification using 16S rRNA Gene Sequencing in a University Teaching Hospital. *Open Forum Infectious Diseases*, 4(suppl_1), S600–S600. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx163.1576>
- Powers, M. E., & Bubeck Wardenburg, J. (2014). Igniting the fire: *Staphylococcus aureus* virulence factors in the pathogenesis of sepsis. *PLoS Pathogens*, 10(2), e1003871. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003871>
- Quellhorst, G., & Rulli, S. (2012). A systematic guideline for developing the best real-time PCR primers Lessons learned from designing assays for more than 14 , 000 genes. *Qiagen*, 1–9.
- Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), 30–36. <https://doi.org/10.3329/akmmcj.v4i1.13682>
- Rajalakshmi, S. (2017). INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL, CHEMICAL AND

BIOLOGICAL SCIENCES DIFFERENT TYPES OF PCR TECHNIQUES AND ITS APPLICATIONS.

IJPCBS, (3), 285–292. www.ijpcbs.com

Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3), 71–85.

Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics, 3(3), 71–85.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25558171>

Saraiva, M. M., De Leon, C. M., Santos, S. C., Stipp, D. T., Souza, M. M., Santos Filho, L., ...

Oliveira, C. J. (2018). Accuracy of PCR targeting different markers for *Staphylococcus aureus* identification: a comparative study using matrix-assisted laser

desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as the gold standard. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of*

Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 30(2), 252–255.

<https://doi.org/10.1177/1040638717732370>

Schmitz, F. J., Jones, M. E., Hofmann, B., Hansen, B., Scheuring, S., Lockefahr, M., ... Kohrer, K.

(1998). Characterization of *grlA*, *grlB*, *gyrA* and *gyrB* mutations in 116 unrelated isolates of *Staphylococcus aureus* and effects of mutations on ciprofloxacin MIC. *Antimicrobial Agents*

and Chemotherapy, 42(5), 1249–1252. <https://doi.org/10.1128/aac.42.5.1249>

Sebulsky, M. T., & Heinrichs, D. E. (2001). Identification and characterization of *fhuD1* and

fhuD2, two genes involved in iron-hydroxamate uptake in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 183(17), 4994–5000. <https://doi.org/10.1128/jb.183.17.4994-5000.2001>

Sheldon, J. R., & Heinrichs, D. E. (2012, April 4). The iron-regulated staphylococcal lipoproteins.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Vol. 2, p. 41.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00041>

Sigma-Aldrich. (2020). PCR/qPCR Data Analysis A Technical Guide to PCR Technologies.

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/data-analysis.html>

Tavares, A., Nielsen, J. B., Boye, K., Rohde, S., Paulo, A. C., Westh, H., ... Miragaia, M. (2014).

Insights into Alpha-Hemolysin (Hla) Evolution and Expression among *Staphylococcus aureus* Clones with Hospital and Community Origin. *PLoS ONE*, *9*(7), e98634.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098634>

Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., & Fenrich, J. (2019). The Ultimate

qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, *37*(7), 761–774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>

Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2019). *Staphylococcus aureus*. In *StatPearls*.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28722898>

ThermoFisher Scientific. (n.d.). *Basic Principles of RT-qPCR - EC*.

<https://www.thermofisher.com/ec/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>

ThermoFisherScientific. (2015). Realtime PCR handbook. *Realtime PCR Handbook*, 1–68.

<https://doi.org/10.1006/excr.2001.5278>

Thomer, L., Schneewind, O., & Missiakas, D. (2016). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*

Bloodstream Infections. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *11*(1), 343–364. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044351>

Thompson, T., & Brown, P. D. (2014). Comparison of antibiotic resistance, virulence gene profiles, and pathogenicity of methicillin-resistant and methicillin-susceptible

Staphylococcus aureus using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Pathogens and*

- Global Health*, 108(6), 283–291. <https://doi.org/10.1179/2047773214Y.0000000155>
- Tranchemontagne, Z. R., Camire, R. B., O'donnell, V. J., Baugh, J., & Burkholder, K. M. (2015). *Staphylococcus aureus* Strain USA300 Perturbs Acquisition of Lysosomal Enzymes and Requires Phagosomal Acidification for Survival inside Macrophages. <https://doi.org/10.1128/IAI.00704-15>
- Trujillo, F., & Herrera, K. (2015). *Prevalencia de Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM) en pacientes atendidos en el Hospital General Enrique Garcés durante el periodo enero 2013-diciembre 2013*. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/8242>
- Trypsteen, W., De Neve, J., Bosman, K., Nijhuis, M., Thas, O., Vandekerckhove, L., & De Spiegelaere, W. (2015). Robust regression methods for real-time PCR. *Analytical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.04.001>
- Tucker, P. W., Hazen, E. E., & Cotton, F. A. (1978). Staphylococcal nuclease reviewed: A prototypic study in contemporary enzymology. I isolation; physical and enzymatic properties. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 22(2–3), 67–78. <https://doi.org/10.1007/BF00496235>
- Udvardi, M. K., Czechowski, T., & Scheible, W. R. (2008, July). Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell*, Vol. 20, pp. 1736–1737. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061143>
- Umeda, A., Ueki, Y., & Amako, K. (1987). Structure of the *Staphylococcus aureus* Cell Wall Determined by the Freeze-Substitution Method Downloaded from. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 169). <http://jlb.asm.org/>
- Vaca, S. (2016). *Prevalencia de Staphylococcus aureus meticilino resistente en portadores nasales del personal de salud de las áreas: unidad de cuidados intensivos, neonatología, quirófanos y el anexo de traumatología del Hospital Carlos Andrade Marín, de octubre a*

diciembre 2015. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6817/1/T-UCE-0006-012.pdf>

Van Griethuysen, A., Van Loo, I., Van Belkum, A., Vandenbroucke-Grauls, C., Wannet, W., Van Keulen, P., & Kluytmans, J. (2005). Loss of the *mecA* gene during storage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(3), 1361–1365.

<https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1361-1365.2005>

Vitko, N. P., & Richardson, A. R. (2013). Laboratory maintenance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Current Protocols in Microbiology*, *09*(SUPPL.28), Unit.

<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc09c02s28>

von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., & Peters, G. (2001). Nasal Carriage as a Source of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *New England Journal of Medicine*, *344*(1), 11–16.

<https://doi.org/10.1056/NEJM200101043440102>

Wang, H. Y., Kim, S., Kim, J., Park, S. D., Uh, Y., & Lee, H. (2014). Multiplex real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant staphylococci directly from positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(6), 1911–1920.

<https://doi.org/10.1128/JCM.00389-14>

Wilke, G. A., & Wardenburg, J. B. (2010). Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* α -hemolysin - Mediated cellular injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(30), 13473–13478.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1001815107>

Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, *80*(1), 75–84.

<https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>

Zendejas, G., Avalos, H., & Soto, Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*:

Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomed.*

<http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb142534.pdf>

