



DOCENCIA E INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes *nucA* y *femB*



Aida Hamdan-Partida, Samuel González García y Jaime Bustos-Martínez*

Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana –Xochimilco, Xochimilco, México

Recibido el 24 de noviembre de 2015; aceptado el 17 de diciembre de 2015

Disponible en Internet el 16 de marzo de 2016

PALABRAS CLAVE

Identificación;
Genes *nucA*;
femB;
Staphylococcus aureus;
PCR

Resumen

Objetivo: El objetivo del presente trabajo fue determinar si *Staphylococcus aureus* puede ser identificado por la presencia de los genes *nucA* y *femB*.

Metodología: Se analizó la presencia de los genes *nucA* y *femB* mediante PCR en 196 aislados de *Staphylococcus* previamente identificados por métodos microbiológicos, incluyendo la prueba de coagulasa.

Resultados: Entre los 196 aislados, 186 fueron coagulasa positivos. De estos, 184 presentaron el gen *nucA*. De los 10 aislados coagulasa negativos dos presentaron el gen *nucA*. De los dos aislados coagulasa positivos *nucA* negativos y de los dos aislados coagulasa negativos *nucA* positivos, ninguno resultó portador del gen *femB*.

Conclusiones: La detección de los genes *nucA* y *femB* identifica a *Staphylococcus aureus*, pues solo *S. aureus* porta ambos genes.

© 2016 Universidad Autónoma Metropolitana. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Identification;
nucA;
femB genes;
Staphylococcus aureus;
PCR

Identification of *Staphylococcus aureus* using *nucA* and *femB* genes as markers

Abstract

Objective: The aim of this work was to determine whether *Staphylococcus aureus* can be identified by the presence of the genes, *nucA* and *femB*.

Methods: *Staphylococcus* isolates (n = 196) previously identified by microbiological methods, including coagulase test, were analysed for the presence of the *nucA* and *femB* genes by PCR.

* Autor para correspondencia. Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana –Xochimilco, Calzada del Hueso 1100. México D.F. 04960. México, Teléfono: +54837000 ext. 3848.

Correo electrónico: jbustos@correo.xoc.uam.mx (J. Bustos-Martínez).

Results: Of the 196 isolates used, 186 were coagulase positive. Among these, 184 had the *nucA* gene. Of the 10 coagulase negative strains, two had the *nucA* gene. The *femB* gene was not detected in the two coagulase positive *nucA* negative strains or the two coagulase negative *nucA* positive isolates.

Conclusions: Detection of *nucA* and *femB* genes identified *Staphylococcus aureus*, as only *S. aureus* carries both genes.

© 2016 Universidad Autónoma Metropolitana. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Staphylococcus aureus causa una amplia variedad de enfermedades infecciosas tales como infecciones cutáneas, septicemia, neumonía e intoxicación alimentaria, entre otras^{1,2}. El principal impacto de este microorganismo se debe a las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), que tradicionalmente se encontraban limitadas al ámbito nosocomial (cepas MRSA adquiridas en el hospital), a nivel mundial. Sin embargo, en años recientes las cepas MRSA también se han encontrado en la comunidad (cepas MRSA adquiridas en la comunidad) y estas han ido incrementando sustancialmente su incidencia³.

Se sabe que alrededor del 30% de las personas son portadoras sanas de *S. aureus*^{1,4}, estos portadores sanos pueden transmitir a la bacteria a personas inmunodeficientes, con heridas o con implantes quirúrgicos, por lo que pueden llegar a provocar infecciones nosocomiales⁵. Se ha descrito la colonización nasal de *S. aureus* entre miembros de la misma familia sin producir la enfermedad, sin embargo, pueden dar lugar a infecciones^{6,7}, por lo que los portadores sanos de *S. aureus* son un factor de riesgo importante en la infección por este microorganismo.

Entre las especies de *Staphylococcus* clínicamente importantes se destacan *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, aunque no hay que descartar a las demás especies de estafilococos coagulasa negativos, que contribuyen a infecciones sobre todo a nivel intrahospitalario⁸.

Los estafilococos producen varias enzimas que pueden contribuir a su virulencia, *S. aureus* tiene la capacidad de producir coagulasa, por esta razón la detección de esta enzima es el criterio más utilizado para diferenciarlo de las otras especies⁹.

Actualmente la identificación de cepas de *S. aureus* se puede llevar a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Diferentes protocolos de PCR se han propuesto para detectar e identificar *S. aureus*, se detectan genes como *nucA*, *coaA*, *femA* o *femB* entre otros^{10,11}. Si además se requiere saber si son cepas MRSA se detecta el gen *mecA* que es un marcador molecular de resistencia a la meticilina^{12,13}.

Las cepas de *S. aureus* producen una termonucleasa extracelular (TNasa) con una frecuencia similar a las cepas que producen coagulasa. El gen *nucA* que codifica a la termonucleasa es producido por casi todas las cepas de *S. aureus* y es usado como criterio de diagnóstico de esta especie¹⁰.

Los genes *fem* (del inglés factors essential for methicillin resistance), como su nombre lo indica están involucrados en la resistencia a la meticilina. El gen *femB* es parte del operón *femAB*, involucrado en la síntesis del interpeptido de pentaglicina, importante en el entrecruzamiento del peptidoglicano de la pared celular de *Staphylococcus*^{11,14}.

El objetivo de este trabajo fue explorar si *S. aureus* puede ser identificado por la presencia de los genes *nucA* y *femB* en la misma bacteria.

Materiales y métodos

Cepas y diagnóstico microbiológico

Se utilizaron 196 aislados de estafilococos, obtenidos en un estudio previo¹⁵, de la nariz y de la faringe de una población de estudiantes universitarios de ambos sexos de entre 17 y 22 años de edad y personal de ambos sexos de entre 25 y 65 años de edad que laboraban en una empacadora de carnes frías de la Ciudad de México. Las cepas se encontraban conservadas a -70 °C. Las 196 cepas se habían identificado como *Staphylococcus* por pruebas microbiológicas incluyendo la prueba de coagulasa en tubo, de las cuales 186 eran coagulasa positivas y 10 coagulasa negativas. Todas las cepas eran sensibles a la meticilina. Las cepas se activaron inoculando 100 µL de la suspensión descongelada en caldo soya triptica-seína y se incubaron toda la noche a 37 °C. Posteriormente se sembraron en agar Sal Manitol (Bioxon) y se dejaron incubando toda la noche a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se verificó la morfología colonial y microscópica, se les realizaron las pruebas de catalasa y coagulasa en tubo siguiendo los protocolos de Koneman¹⁶.

Extracción de DNA

La extracción del DNA de las 196 cepas se realizó utilizando el equipo comercial Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Amplificación de los genes *nucA* y *femB* por PCR

La detección del gen *nucA* mediante PCR se llevó a cabo siguiendo la metodología de Brakstad et al.¹⁰, con algunas modificaciones. Se utilizaron los primers nucA1 5' GCG ATT

GAT GGT GAT ACG GTT 3' y *nucA* 2 5' AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC 3'. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial 94 °C durante 5 min, 10 ciclos de 94 °C por 40 s, 68 °C por 40 s, 72 °C por 1 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 1 min, 58 °C por 1 min, 72 °C por 2 min y una extensión final de 10 min a 72 °C, obteniéndose un amplicón de 270 pb. Se utilizaron *S. aureus* ATCC 43300 y *S. aureus* ATCC 29213 como controles positivos y *S. epidermidis* ATCC 35983 como control negativo.

La amplificación del gen *femB* mediante PCR se realizó siguiendo la metodología descrita por Jonas et al.¹¹, con modificaciones. Se utilizaron los primers FemB1 5' TTA CAG AGT TAA CTG TTA CC 3' y FemB2 5' ATA CAA ATC CAG CAC GCT CT 3'. Las condiciones de corrida de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 45s, 50 °C por 45s y 72 °C por 60s, con una extensión final de 72 °C por 5 min, se obtuvo un producto de PCR de 651 pb. Se utilizaron las mismas cepas de la reacción anterior como controles.

En ambos casos la amplificación se realizó con una mezcla de reacción compuesta de 1X de buffer de reacción, 1.5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerasa, 10 nM de los primers forward y reverse, 200 μM de dNTP's, <1 μg de DNA de muestra y H₂O grado biología molecular para completar 25 μL de volumen.

Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 1% a 80V y se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/mL) y se visualizaron en un transiluminador Bio Rad.

Resultados

Se analizaron 196 aislados de las cuales 186 se habían identificado presuntamente como *S. aureus*, por métodos microbiológicos por morfología microscópica y colonial en agar sal manitol, además de haber dado positivas las pruebas de catalasa y coagulasa en tubo. Diez cepas de las 196, resultaron ser coagulasa negativas. Para determinar la especie de las cepas analizadas se procedió a realizar la identificación molecular.

Se extrajo DNA cromosomal de todos los aislados. Mediante la técnica de PCR se detectó primeramente la presencia del gen *nucA*, se encontró que casi todas las cepas coagulasa positivas (184) presentaron este gen y solo dos de estas cepas coagulasa positivas no lo presentaron (67F y 527F), como se muestra en la tabla 1 y figura 1. Ocho de las diez cepas coagulasa negativas no presentaron el gen *nucA*, sin embargo, las otras dos cepas coagulasa negativa (12F y 287N) presentaron la presencia de este gen.

Para corroborar estos resultados se determinó la presencia del gen *femB* en las cepas coagulasa positivas (67F y 527F) y coagulasa negativas (12F y 287N), así como en otras cepas coagulasa positivas (10 cepas), que presentaron el gen *nucA* (tabla 1).

Las cepas coagulasa positivas que presentaron el gen *nucA* también presentaron el gen *femB* y las dos cepas coagulasa positivas que no presentaron el gen *nucA* (67F y 527F), tampoco presentaron el gen *femB*. Las cepas coagulasa negativas que presentaron el gen *nucA* (12F y 287N), no presentaron el gen *femB* (tabla 1 y fig. 2). En ambos ensayos se puede apreciar la amplificación de los controles ATCC (figs. 1 y 2).

Tabla 1 Genes detectados en las cepas de *Staphylococcus* analizadas

Genes detectados	Número de cepas de <i>Staphylococcus</i>	
	Coagulasa ⁺	Coagulasa ⁻
	186	10
<i>nucA</i> ⁺	184	2
<i>nucA</i> ⁻	2	8
<i>nucA</i> ⁻ / <i>femB</i> ⁺ ^a	0	0
<i>nucA</i> ⁺ / <i>femB</i> ⁻ ^b	0	2
<i>nucA</i> ⁺ / <i>femB</i> ⁺ ^c	10	0

^a Se analizaron las cepas *nucA*⁻ dos cepas coagulasa⁺ y las ocho coagulasa⁻.

^b Se analizaron cepas *nucA*⁺:10 cepas coagulasa⁺ y las dos cepas coagulasa⁻.

^c Son las mismas cepas de la fila anterior.



Figura 1 Detección del gen *nucA* por PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carriles: 1. cepa 6F; 2. cepa 67F; 3. cepa 105N; 4. cepa 106N; 5. Marcador de peso molecular 100pb; 6. cepa 139N; 7. cepa 211N; 8. cepa 217N; 9. cepa 220N; 10. cepa 527F; 11. cepa 637F; 12. Marcador de peso molecular 100pb; 13. cepa 22N; 14. *S. aureus* ATCC 29213; 15. *S. epidermidis* ATCC 35983; 16. Control de reactivos.

Discusión

La identificación de cepas de *S. aureus* es de gran importancia médica en los ámbitos hospitalarios y ahora también en la comunidad. Para esto se necesita contar métodos confiables y rápidos para identificar a este microorganismo.

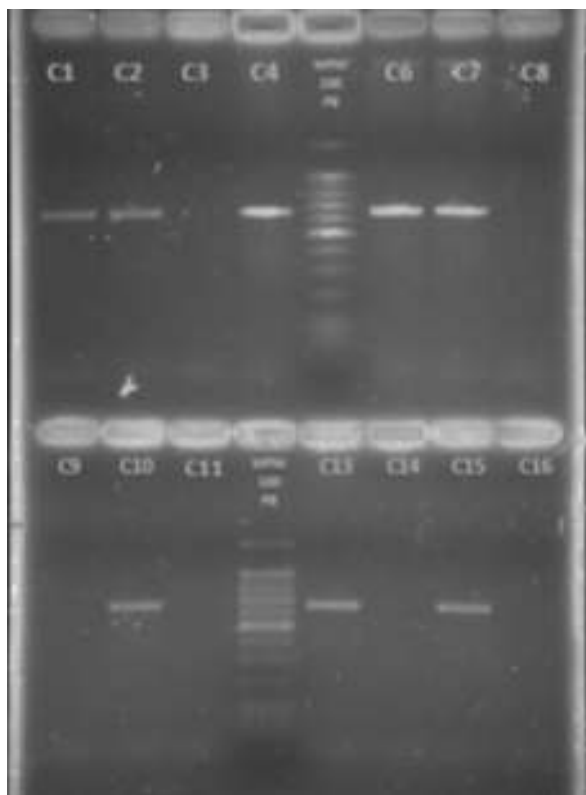


Figura 2 Detección del gen *femB*. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carriles: 1. cepa 211N; 2. cepa 6F; 3. cepa 67F; 4. cepa 106N; 5. marcador de peso molecular 100pb; 6. cepa 139N; 7. cepa 637F; 8. cepa 287N; 9. cepa 527F; 10. cepa 220N; 11. cepa 12F; 12. Marcador de peso molecular 100pb; 13. cepa 105N; 14. *S. epidermidis* ATCC 35983; 15. *S. aureus* ATCC 29213; 16. Control de reactivos.

Los medios de cultivo no son 100% seguros para identificar *S. aureus*, se necesitan siempre pruebas complementarias¹⁷. La prueba microbiológica más utilizada para la identificación de *S. aureus* es el ensayo para coagulasa que se puede realizar en portaobjeto o en tubo, sin embargo es recomendable hacerlo en tubo puesto que de este modo se detectan, tanto la coagulasa libre como la unida¹⁶. Se ha reportado que alrededor del 98% de las cepas de *S. aureus* dan positivo a la prueba de coagulasa. Entre un 10 y un 15% de las cepas de *S. aureus* pueden dar un resultado falso negativo. Algunas cepas de *S. aureus* producen fibrinolisisina, la que puede lisar los coágulos que se han formado durante las primeras h. Si los tubos no son leídos durante las primeras cuatro h puede obtener un resultado falso negativo por lisis del coágulo. Si se utilizan kits comerciales de diferentes marcas para realizar la prueba de coagulasa se reportan alrededor de entre 10 y 30% de falsos positivos^{9,16}. Además, también existen otras especies de estafilococos coagulasa positivos como *S. intermedius*, *S. pseudointermedius* y *S. hyicus* que pueden ser confundidos con *S. aureus* por la reacción de coagulasa¹⁸.

La termonucleasa (TNasa) es una proteína con un peso molecular de 17 Kda. Se trata de un endonucleasa, que degrada tanto al ADN como al ARN y la actividad enzimática puede resistir 100°C durante al menos 1 h. La TNasa es una proteína bien caracterizada y el gen que la codifica es *nucA*. Una prueba enzimática de producción de TNasa es

utilizada en muchos laboratorios para la identificación de *S. aureus*¹⁹. Sin embargo, la actividad TNasa no es específica de *S. aureus*, al igual que la coagulasa, *S. intermedius*, y *S. hyicus* son productores fuertes de esta enzima²⁰.

Por otro lado, a pesar de que la proteína FemB se ha caracterizado en *S. aureus*, existen genes que codifican para proteínas parecidas a FemAB y que se han identificado en otros tipos de estafilococos, como *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* con una función similar a las proteínas de *S. aureus*¹⁴.

Como se puede ver no existe una prueba cien por ciento segura que por sí sola nos permita identificar sin errores a *S. aureus*.

En nuestro caso se encontraron dos cepas coagulasa positivas que no presentaron el gen *nucA*, esto nos indica en principio que no se podrían clasificar en la especie *S. aureus*. Para corroborar los resultados se les detectó la presencia del gen *femB* y tampoco lo presentaron, por lo que de esta manera se infiere que estas cepas no eran de la especie *S. aureus*, a pesar de ser cepas coagulasa positiva, por lo que son otro tipo de estafilococos coagulasa positivos.

Entre las cepas coagulasa negativas analizadas se encontraron dos que presentaron el gen *nucA*, por lo que podrían tratarse de cepas de *S. aureus* que por alguna razón dan una prueba de coagulasa negativa, para confirmar esto se realizó la detección del gen *femB*, el cual no se detectó en estas cepas. Lo que nos indica que estas no son cepas de la especie *S. aureus*, por lo que son cepas coagulasa negativa que amplificaron para el gen *nucA* con los primers utilizados.

En las cepas analizadas no se encontraron cepas coagulasa negativas que presentaran el gen *femB*.

Con lo anterior podemos decir que bajo las condiciones estudiadas no existe una cepa coagulasa negativa, ni una cepa coagulasa positiva que no sea *S. aureus* que presenten tanto el gen *nucA* como el gen *femB*. Podemos decir que la detección de los dos genes en la misma cepa nos da una certeza de que se tiene una bacteria de la especie *S. aureus*, por lo que una detección de *S. aureus* implica la detección de ambos genes en el mismo microorganismo.

El siguiente paso es validar este método como una prueba diagnóstica rápida, realizando un análisis comparativo de su confiabilidad contra cepas ATCC para obtener valores predictivos positivo y negativo. También comparar costo/beneficio contra otros métodos ya establecidos entre los que se encuentran las galerías API y los agares cromogénicos^{21,22}, así como realizar ensayos de campo en muestras biológicas.

Financiación

Este trabajo se realizó con apoyo de la UAM-Xochimilco.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo técnico de Isaac Arteaga Larumbe.

Bibliografía

1. Bustos Martínez JA, Hamdan Partida A, Gutiérrez Cárdenas ME. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Bioméd*. 2006;17:287–305.
2. De Leo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest*. 2009;119:2464–74.
3. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39:273–82.
4. Sivaraman K, Venkataraman N, Cole AM. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and its contributing factors. *Future Microbiol*. 2009;4:999–1008.
5. Tilahun B, Faust AC, McCorstin P, Ortegon A. Nasal colonization and lower respiratory tract infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Crit Care*. 2015;24:8–12.
6. McCormack MG, Smith AJ, Akram AN, Jackson M, Robertson D, Edwards G. *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: an overlooked source of carriage and infection? *Am J Infect Control*. 2015;43:35–7.
7. Jones TF, Creech CB, Erwin P, Baird SG, Woron AM, Schaffner W. Family outbreaks of invasive community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis*. 2006;42:76–8.
8. Martins A, Cunha M de L. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiol Immunol*. 2007;51:787–95.
9. Chiarini F, del Piano M, Nicosia R. The coagulase test. I. *Boll Ist Sieroter Milan*. 1976;55:353–60.
10. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J Clin Microbiol*. 1992;30:1654–60.
11. Jonas D, Grundmann H, Hartung D, Daschner FD, Towner KJ. Evaluation of the *mecA femB* duplex polymerase chain reaction for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999;18:643–7.
12. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:2155–61.
13. Struelens MJ, Hawkey PM, French GL, Witte W, Tacconelli E. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:112–9.
14. Berger-Bächli B, Tschierske M. Role of fem factors in methicillin resistance. *Drug Resist Updat*. 1998;1:325–35.
15. Hamdan-Partida A, Sainz-Espuñes T, Bustos-Martínez J. Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* isolated from the anterior nares and throat from healthy carriers in a Mexican community. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1701–5.
16. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC, Woods GL. Koneman, Diagnóstico microbiológico Texto y Atlas en color. 6.ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 2008.
17. Bautista-Trujillo GU, Solorio-Rivera JL, Rentería-Solórzano I, Carranza-Germán SI, Bustos-Martínez JA, Arteaga-Garibay RI, et al. Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt3):369–76.
18. Blaiotta G, Fusco V, Ercolini D, Pepe O, Coppola S. Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial *kat* (catalase) gene sequences and design of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). *J Clin Microbiol*. 2010;48:192–201.
19. Brakstad OG, Maeland JA. Generation and characterization of monoclonal antibodies against *Staphylococcus aureus*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 1989;97:166–74.
20. Gudding R. Differentiation of staphylococci on the basis of nuclease properties. *J Clin Microbiol*. 1983;18:1098–101.
21. Valero-Leal K, Rivera-Salazar J, Valbuena E, Boscán L, Valeris R, Castro G, et al. Caracterización bioquímica y producción de enterotoxinas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche cruda y queso fresco artesanal en fincas del estado Zulia. *Revista Científica*. 2012;22:303–14.
22. Nonhoff C, Denis O, Brenner A, Buidin P, Legros N, Thiroux C, et al. Comparison of three chromogenic media and enrichment broth media for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from mucocutaneous screening specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28:363–9.