
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA.**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA.**

Evaluación de diferentes métodos de tipificación de *Staphylococcus aureus*.

QUE PRESENTA LA ALUMNA:

Nombre: Orpha Ithamar Salazar López

Matrícula: 2152028970

ASESORES:

Dra. Aída Hamdan Partida No. Econ. 26343

Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez No. Econ. 8758

Lugar de realización: Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del
Departamento de Atención a la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana;
Unidad Xochimilco.

Fecha de inicio: 05 de julio del 2018 y **Fecha de terminación:** 05 de enero del
2019

Ciudad de México

enero 2020

Índice.

Resumen.....	3
Introducción.....	4
1. Marco Teórico.....	5
1.1. Características microbiológicas de <i>S. aureus</i>	5
1.1. Factores de virulencia.....	6
1.2. Componentes de la superficie celular.....	9
1.3. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2. Tinción de Gram.....	11
2.1. Técnicas moleculares.....	12
2.2. Gen <i>spa</i>	13
2.3. Características genéticas de <i>S. aureus</i>	13
2.4. Epidemiología.....	14
2.5. Patogenia.....	15
3. Antecedentes.....	15
4. Objetivo general.....	17
4.1. Objetivos específicos.....	17
5. Materiales y métodos.....	17
5.1. Extracción de ADN Genómico.....	17
5.2. Purificación de ADN a partir de Gel de Agarosa.....	18
5.3. Detección del gen <i>spa</i> por PCR.....	19
5.4. Tipificación de <i>S. aureus</i> por <i>spa</i> - tipo (<i>spa</i> - typing).....	20
5.5. Tinción de Gram.....	21
5.6. Caracterización de la clonalidad genotípica por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).....	21
5.7. Análisis de los patrones de PFGE.....	23
6. Resultados y análisis de resultados.....	24
6.1. Amplificación del gen <i>spa</i>	24
6.2. Tipificación del gen <i>spa</i> (<i>spa</i> -Typing).....	26
6.3. Tipificación clonal de cepas de <i>S. aureus</i> aisladas por PFGE.....	30
7. Discusión de resultados.....	33
8. Objetivos y metas alcanzados.....	33
9. Conclusiones.....	34
Bibliografía citada.....	35

Resumen.

En este estudio, se realizaron dos métodos de tipificación molecular en cepas de *S. aureus*, en el caso del método de tipificación del gen *spa*, se logró identificar 6 tipos de *spa* *t1406, t701, t1710 t021, t723, t922* teniendo un tamaño de 294 a 551 pb, se cuenta con registros sobre la presencia de éstos tipos de *spa* alrededor del mundo desde el año 2000 hasta el presente.

En el caso del método de tipificación clonal de cepas por PFGE, el dendrograma nos muestra 3 grupos, no existe una clona predominante *S. aureus* 264F presente en el grupo 1. En el caso del grupo 2 se encuentra la cepa *S. aureus* 1518N y *S. aureus* 638N.

En el grupo 3 existen 2 subgrupos, en el primer subgrupo se encuentran las cepas *S. aureus* 17Nb, *S. aureus* 1236N, *S. aureus* 213F y una clona predominante *S. aureus* 213F.

En el segundo subgrupo se encuentra las cepas *S. aureus* 638N, *S. aureus* 408F, *S. aureus* 463F, *S. aureus* 628N y por último *S. aureus* 511N.

Tomando en cuenta esto, los dos métodos de tipificación nos mostraron resultados diferentes.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, tipificación molecular, *spa*-tipo, electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).

Introducción.

La relación del hombre con los microorganismos da lugar a una interacción que puede ser beneficiosa o nociva. Según la naturaleza de esta interacción, los microorganismos se clasifican:

- Comensales. Cuando colonizan las superficies corporales sin causar daño.
- Patógenos. Los que dañan al hospedero por invasión directa y lesión o por la producción de sustancias tóxicas.

Entre las bacterias potencialmente patógenas que colonizan con más frecuencia a la nasofaringe humana se encuentran: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Neisseria meningitidis*. Estos microorganismos causan infecciones del tracto respiratorio superior, además de ser responsables de afecciones graves que ocasionan la muerte.

Staphylococcus aureus se destaca como un importante patógeno humano, produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario (Sheagren, et al., 1998).

En la comunidad, las infecciones por *S. aureus* son a menudo agudas, piogénicas y superficiales, aunque también puede producir, con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda (Waldvogel., 2000)

Desde el punto de vista clínico epidemiológico, es importante conocer la presencia de bacterias patógenas en el tracto respiratorio, para determinar el riesgo biológico al que se exponen los individuos y establecer en la población las medidas de protección necesarias.

El objetivo de este proyecto fue evaluar y comparar los principales métodos de tipificación de *Staphylococcus aureus*.

1. Marco Teórico.

1.1. Características microbiológicas de *S. aureus*.

Los estafilococos fueron clasificados inicialmente en un género común en la familia *Micrococaceae* además de los géneros *Micrococcus*, *Stomacoccus* y *Planococcus*, pero a través de estudios recientes se observaron diferencias con estos géneros, por ejemplo la cantidad de guanina-citocina, homología genética, secuenciación del ADN, hibridación de ADN-ARNr y la secuenciación comparativa del ARNr 16S han establecido que el género *Staphylococcus* y *Micrococcus* están poco relacionados (Kloss, *et al.*, 1995).

El género *Staphylococcus* está conformado por cocos Gram-positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm . En 1880 el cirujano escocés Sir Alexander Ogston introdujo por primera vez el nombre de *Staphylococcus*, derivado del vocablo griego “*staphyle*” que significa racimo de uvas (Kloss, *et al.*, 1992).

Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, además de ser anaerobias facultativas y son capaces de crecer en un medio elevado de concentración de sal (NaCl al 10%) y a temperaturas de 18-40 °C, la mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de separar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar a los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativa (Kuroda, *et al.*, 2001).

La característica principal de este género, es que se dividen en agrupaciones que asemejan racimos de uva (Harris, *et al.*, 2002), a la fecha, se han reportado 35 especies conocidas con 17 subespecies en el género *Staphylococcus*.

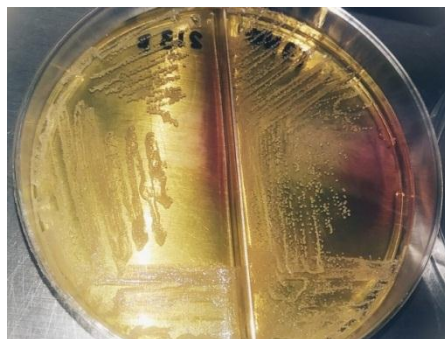


Fig. 1. Morfología colonial de *Staphylococcus aureus* en agar Sal Manitol, tomado en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la UAM-X, 2019.

En los medios de cultivo tradicionales como lo es Agar Sal manitol, la mayoría de las especies crecen después de incubarse durante 24 horas, formando colonias de 0.5-15 μm de diámetro. Las colonias de *S. aureus* se observan lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, además de presentar una consistencia cremosa con una coloración que va del amarillo a dorado (Fig.1.).

1.1. Factores de virulencia.

Los factores de virulencia con los que cuenta *S. aureus* se dividen en 3 grupos (Colsa, 2011):

a) Componentes de la pared celular.

b) Enzimas:

- Catalasa. Funciona en la inactivación de algunos sistemas de ingestión de los Leucocitos polimorfonucleares (PMN).
- Coagulasa (clumping factor). Actúa cubriendo a la célula de fibrina y por tanto haciéndola más resistente a la fagocitosis.
- Estafilocinasas. Degradan la fibrina y contribuyen a la invasión de tejidos vecinos.
- Hialuronidasas. Hidroliza la matriz intracelular de mucopolisacaridos de los tejidos
- Lipasas. Ayudan al microorganismo a diseminarse por los tejidos cutáneo y subcutáneo.
- Fosfolipasa C. Los tejidos afectados por esta enzima se vuelven más susceptibles al daño y destrucción.

c) **Toxinas:** *S. aureus* producen toxinas como son las hemolísinas del tipo α , β , γ y δ y la leucocidina Pantón-Valentine (PVL), así como, otras toxinas especializadas como las exfoliatinas, toxina del shock tóxico- 1 (TSST-1) y enterotoxinas.

En el caso de **α hemolisina o α toxina:** Tiene el efecto letal sobre las membranas celulares eucariotas, incluyendo la de PMN en humanos, así como también la de eritrocitos de diferentes especies de animales.

β hemolisina: Es una esfingomielinasa activa sobre diferentes células: como son los leucocitos, eritrocitos y fibroblastos.

γ y δ hemolisin: Se encuentran en algunas cepas de *S. aureus* y lisan una variedad de células diferentes.

Leucocidina Panton-Valentine (PVL): Es una exotoxina con efecto tóxico directo sobre las membranas de los PMN humanos, causando degranulación del citoplasma, hinchamiento celular y lisis.

Exfoliatinas o toxinas epidermolíticas: Son producidas por algunas cepas de *S. aureus* y consisten en dos proteínas, bioquímica e inmunológicamente diferentes, pero con funciones biológicas similares. La exfoliatina A es un producto de genes cromosómicos, termoestable y es inactivada por el EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético), mientras la exfoliatina B es de origen plasmídico, es inactivada por el calor y estable frente al EDTA.

Enterotoxinas: Se trata de moléculas termoestables responsables de la intoxicación alimentaria producida por algunas cepas *S. aureus*.

Toxina del shock tóxico (TSST-1): Es también denominada como enterotoxina F. Está implicada en la patogenia del síndrome del shock tóxico.

En la Figura 2 muestran enzimas que produce *S. aureus* como son: las DNAsas, proteasas y fosfatasa que colaboran en el proceso de infección y de lesión al hospedero.

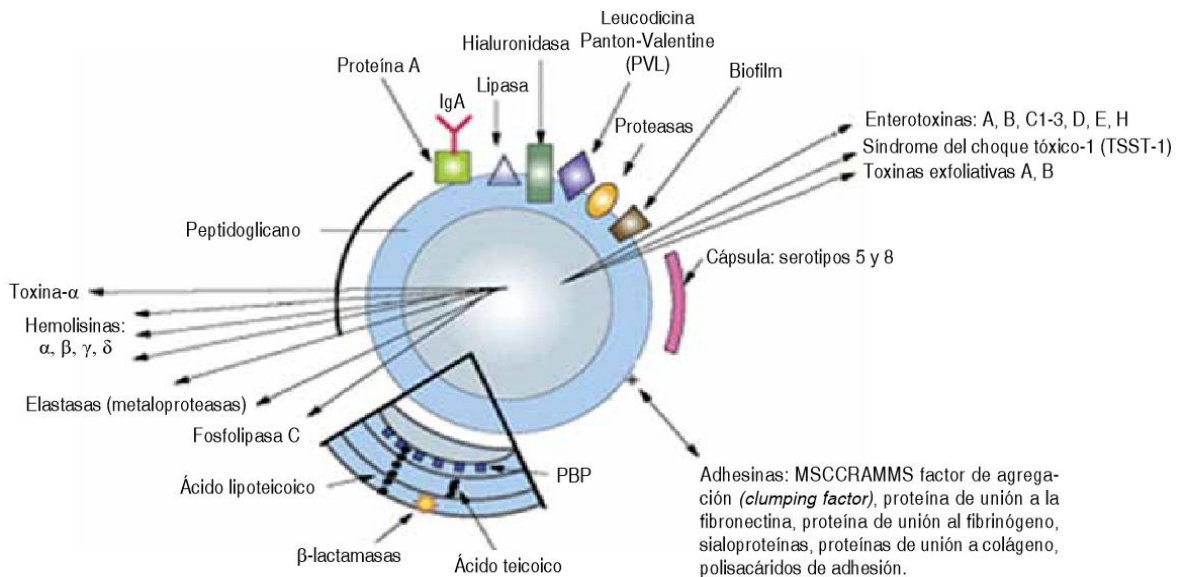


Fig. 2. Enzimas producidas por parte de *Staphylococcus aureus* (Colsa, 2011).

En la Tabla 1, (Cervantes, *et al.*, 2014) describen de una manera más simplificada los factores de virulencia de *S. aureus* y sus efectos en el hospedero.

Tabla 1. Factores de virulencia de *S. aureus* (Cervantes, *et al.*, 2014).

Factor de virulencia	Acción de los factores de virulencia.	Genes que codifican los factores de virulencia.	Síndromes clínicos.
MSCRAMMS Factor de agregación (clumping factor), proteínas de unión a: fibronectina, colágeno y sialoproteínas de unión a hueso	Unión a diferentes proteínas del hospedero.	clfA, clfB, fnbA, fnbB, cna, sdr, Bbp.	Endocarditis, osteomielitis, artritis séptica, infecciones de prótesis, catéteres y sondas.
Proteasas, lipasas, nucleasas, hialuronidasas, fosfolipasas C, elastasas (metaloproteasas) coagulasa.	Involucradas en la invasión y penetración a los tejidos del hospedero.	V8, hysA, hla, plc, sepa, arc	Destrucción de tejidos e infecciones metastásicas,
Enterotoxinas, toxina del choque tóxico-1 (TSST-1), toxina exfoliativa A y B, toxina α -peptidoglicano, ácidos lipoteicocicos	Involucrados en el desarrollo de diferentes enfermedades y sepsis.	Sea-q (no sef), tstH, eta, etb, hla.	Intoxicación alimentaria, envenenamiento, síndrome del choque tóxico, síndrome piel escaldada, impétigo y sepsis.
Bacteriocinas, ACME	Inhibición de otras bacterias, inhibición de los radicales.	Conjunto de genes arc, genes opp-3, bsa.	Inhiben factores del sistema inmune.

1.2. Componentes de la superficie celular.

A continuación, se hará mención de los componentes principales de la superficie celular de *S. aureus*.

- **Pared celular:** La pared celular del estafilococo está formada por un 50% de mureína de su peso seco. La mureína es un peptidoglucano compuesto por subunidades alternas de los polisacáridos ácido N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico con enlaces β -1,4 (Hurtado, *et al.*, 2002).
- **Proteína A:** Se encuentra en la pared celular de *S. aureus*; tiene un peso molecular de 42 KDa y se encuentra en la superficie celular. Es una proteína antifagocítica, ya que tiene la capacidad de unirse a la región Fc de todas las subclases de IgG humanas excepto IgG₃ (Koneman, *et al.*, 2009).
- **Biofilm (biopelícula):** Algunas cepas de *S. aureus* producen una capa polisacárida extracelular denominada Biofilm o biopelícula. Ésta es una red extracelular que ayuda a la comunidad bacteriana a adherirse a diferentes superficies (Lowy, 1998).
- **Cápsula:** Otro factor importante en *S. aureus* es la cápsula de naturaleza polisacárida denominado slime o cápsula mucoide, que facilita la adherencia de las bacterias a diversas células, además de tener capacidad antifagocitaria.

Se han identificado 11 serotipos capsulares, de los cuales los tipos 1 y 2 producen grandes cantidades de polisacáridos, dándole a la bacteria apariencia mucoide en los medios de cultivo (Watts, *et al.*, 2005).

- **Enzimas:** *S. aureus* produce un gran número de exoenzimas, proteínas de membranas activas (hemolisinas y leucocidinas), así como toxinas involucradas en las enfermedades (López *et al.*, 2012).
- **Las hemolisinas:** Se han identificado cuatro hemolisinas como: alfa, beta, gamma, delta, que sintetizadas por la mayoría de las cepas de *S. aureus*,

tienen capacidad hemolítica y citolítica, actuando sobre determinadas células del hospedero, como leucocitos, plaquetas, macrófagos y fibroblastos (Camussone, *et al.*, 2013)

- **Toxinas:** Algunas cepas de *S. aureus* son capaces de sintetizar proteínas extracelulares adicionales que producen su acción en zonas distantes del foco infeccioso.
- **Superantígenos:** La toxina del síndrome del choque tóxico (TSST-1) y las enterotoxinas estafilocócicas son el paradigma de una gran familia de exotoxinas pirógenas llamadas superantígenos (Koneman, *et al.*, 2009).

Los superantígenos son proteínas que no activan el sistema inmune a través de un contacto normal entre las células presentadoras del antígeno y los linfocitos (Ulrich., 2000).

Las enterotoxinas estafilocócicas son producidas de 30 a 50% de las cepas de *S. aureus*, de las que se han descrito 15 diferentes enterotoxinas estafilocócicas: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, siendo el serotipo A el más frecuente (Novick., 2003)

Son termoestables y resistentes a las enzimas digestivas del hospedero, además de ser responsables de intoxicaciones y cuadros de enterocolitis. Poseen características inmunomoduladoras propias de los superantígenos (Balaban, *et al.*, 2000)

1.3. Identificación de *Staphylococcus aureus*.

La identificación de *S. aureus* se realiza con el empleo de la tinción de Gram, pruebas bioquímicas como: prueba de la catalasa, fermentación de glucosa, que permite diferenciar al género *Staphylococcus* del género *Micrococcus*, que también se considera una catalasa positiva pero no fermenta la glucosa. Sin duda, la prueba de la coagulasa sigue siendo la más utilizada.

La detección de la coagulasa permite diferenciar *S. aureus* coagulasa positivo de las demás especies de estafilococos coagulasa negativos.

S. aureus también se puede identificar a través de diferentes técnicas moleculares como; la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real (Vivoni, *et al.*, 2005).

2. Tinción de Gram.

En la década de 1880, en un hospital de Berlín trabajó el médico danés Hans Christian Gram, quien desarrolló la más importante tinción bacteriológica. Las bacterias teñidas de violeta fueron conocidas como Gram positivas, y las teñidas de rojo como Gram negativas (fig. 3) (Rodríguez, *et al.*, 2018).

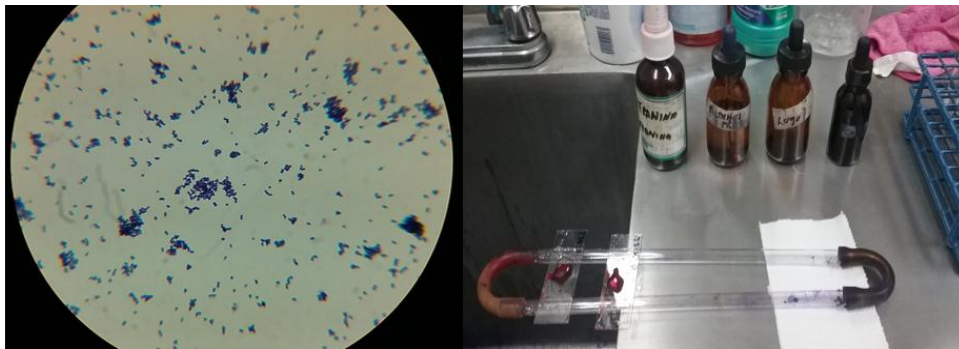


Fig. 3. Tinción de Gram, cocos Gram positivos, microscopia de campo claro (100X). Laboratorio de Microbiología y Biología molecular, UAM-X.

En la Tabla 2, muestra las diferencias que hay entre Gram negativas y Gram positivas.

Tabla 2. Diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

	Bacterias Gram positivas.	Bacterias Gram negativas
Color con la tinción de Gram.	Violeta	Rojo
Pared Celular	Gruesa	Delgada
Presencia de lipopolisacáridos en pared celular.	Ausente	Presente
Presencia de ácidos lipoteicoicos y teicoicos en pared celular	Presente	Ausente

2.1. Técnicas moleculares.

El diagnóstico molecular es de suma importancia para poder detectar el agente etiológico, además para determinar la resistencia a los antimicrobianos.

La técnica de electroforesis en campos pulsados (PFGE) es utilizado para establecer la relación entre clonas de aislados de *S. aureus*, es el «estándar de oro», método de referencia para la tipificación molecular de *S. aureus* resistentes a la metilina en epidemias intrahospitalarias, así como transmisiones hospital-hospital (Thurlow, *et al.*, 2012).

Otra técnica es el de análisis multilocus (MLST) es una técnica desarrollada y diseñada para identificar clonas y/o líneas clonales en poblaciones bacterianas

Por último, existe el método de tipificación, es la proteína A (*spa* typing). Esta técnica tiene un gran poder discriminativo; se ha mostrado que la tipificación de *spa*, en contraste con las técnicas de PFGE y MLST, puede usarse para estudiar, tanto la evolución molecular como los brotes epidémicos en los hospitales; para el análisis de las secuencias obtenidas de los aislamientos utiliza un paquete de software (Schouls, *et al.*, 2009).

2.2. Gen *spa*.

EL gen *spa* tiene un tamaño aproximado de 2 Kb; este gen posee unas regiones repetitivas llamadas secuencias repetidas cortas (SSR), que consisten de un número variable de nucleótidos repetidos de 21-27 pb, por lo que al realizar una tipificación del gen *spa*, se analiza el número y secuencia de las repeticiones (Young, *et al.*, 2010).

En este gen, las partes repetidas están localizadas en el extremo 3' e identificado como región X; la parte repetitiva de esta región X consiste de hasta 12 unidades con un tamaño de 24 nucleótidos. Esta región de 24 nucleótidos es altamente polimórfica con respecto al número de secuencias repetidas (Figura 4). La diversidad de la región X causa variación en la proteína A de *S. aureus* (Shakeri, *et al.*, 2010).

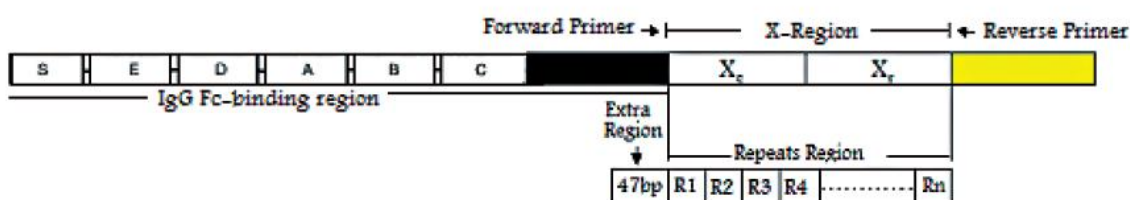


Fig. 4. Mapa genético de la proteína A. Tomado y modificado de (Majeed, *et al.* 2012).

La secuencia del gen *spa* en las regiones de variación en repeticiones en tándem (VNTRs) del gen que codifica la proteína A, se utiliza para llevar a cabo la tipificación de *S. aureus* (Shakeri, *et al.* 2010).

2.3. Características genéticas de *S. aureus*.

El genoma de *S. aureus* es circular, compuesto de aproximadamente 2.8 kb, con un contenido bajo de Guanina-Citocina (G-C) del 33%, además su genoma contiene 2,600 marcos de lectura abierta representando un 84.5% de su genoma (Washington, *et al.*, 2005).

La comparación del genoma indica que 50% de las proteínas codificadas en el cromosoma de *S. aureus* presentan gran homología con *B. subtilis*, lo que sugiere que ambos organismos tuvieron un ancestro común y divergieron más tarde.

La mayoría de los genes homólogos son un grupo de genes conocidos como housekeeping que son necesarios para el crecimiento y división de la bacteria.

Una característica sobresaliente del genoma de *S. aureus* es la presencia de gran número de elementos móviles (plásmidos, secuencias de inserción y transposones), que contienen factores de virulencia y resistencia a diversos antimicrobianos. El estudio de estos elementos ha permitido explicar los mecanismos de conjugación, transformación y transducción del material genético a través de plásmidos móviles (Kuroda, *et al.*, 2001).

El análisis del genoma de *S. aureus* confirmó que contiene varias islas de patogenicidad (SaPIs), las cuales varían en tamaño; además, reveló características adicionales como es el contenido de genes de virulencia y de resistencia (Novick, *et al.*, 2001).

2.4. Epidemiología.

Este género tiene una gran capacidad de adaptación, por lo cual afectan a todas las especies conocidas de mamíferos, incluyendo a los roedores comunes de laboratorio. Es por ello que, gracias a su fácil propagación, pueden transmitirse de una especie a otra, siendo frecuentes los casos humano-animales y viceversa (Fox, *et al.*, 2007).

De aquí surge la importancia de conocer más acerca de este patógeno, ya que, además de los animales, los mecanismos de invasión abarcan también fomites y el contacto de persona a persona.

Staphylococcus aureus, se ha convertido en la principal causa de infecciones en el torrente circulatorio (BSI) e intoxicaciones ocasionadas por alimentos. Estos brotes están surgiendo de manera alarmante en la mayoría de los países industrializados (Rasmussen, *et al.*, 2011) y dicho aumento puede ser debido a la gran cantidad de personas que habitan en dichos países.

De esta manera, al ser una especie bacteriana relativamente común, es natural que surjan investigaciones para mantenerse al tanto de la evolución de este patógeno. Una de las interrogantes, que antes consternaba mucho a los científicos, era cómo podía ser tan fácil la diseminación de esta bacteria. La respuesta está en la gravedad de su virulencia.

La patogenicidad de las infecciones por *Staphylococcus aureus* se relaciona con diversos componentes de la superficie bacteriana (Lina G, *et al.*, 1999).

Así pues, la patogenia provocada por este microorganismo surge cuando se produce la combinación de los factores de virulencia con la disminución de las defensas del hospedero (Borraz-Ordás, *et al.*, 2006); estas condiciones propician que *Staphylococcus aureus* posea características de virulencia y daño bastante particulares; aunado a esto, la situación se ve agravada debido a que el patógeno ha ido desarrollando múltiple resistencia contra los antibióticos, propiciando que cada vez sea mucho más difícil el tratamiento y la curación de las enfermedades ocasionadas por esta bacteria (Bustos-Martínez, *et al.*, 2006).

Sin embargo, *Staphylococcus aureus* es importante no solo porque ocasiona infecciones en diversas partes del organismo humano, sino porque es una de las principales bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

2.5. Patogenia.

Entre 20 y 50% de la población mundial es portadora de *S. aureus* en fosas nasales y 30% de forma permanente en piel y tracto gastrointestinal.

Cuando las barreras mecánicas se rompen, esta bacteria puede alcanzar los tejidos más profundos y producir enfermedad.

Los pacientes con infecciones por *S. aureus* suelen infectarse con la misma cepa que coloniza sus fosas nasales, la colonización también permite la transmisión entre individuos del hospital como en la comunidad.

Para una adecuada supervivencia e invasión del hospedero todos estos sistemas de factores de virulencia deben de estar dentro de un sistema de comunicación célula-célula conocido como quorum sensing (QS) (Vuong, *et al.*, 2000).

3. Antecedentes.

Staphylococcus aureus, se considera como la responsable de una amplia gama de enfermedades, que van desde una “simple” infección de piel hasta llegar a los tejidos blandos. Además del impacto hacia la salud, derivado de la resistencia a los antibióticos, pero sobre todo a la metilina, de ahí viene su nombre MRSA (*Staphylococcus aureus* Metilina Resistente).

El Centro de Enfermedades Infecciosas estima que en los Estados Unidos se han desarrollado 94,360 infecciones invasivas a causa de cepas de MRSA. Se retoma un punto importante, acerca de los estudios de epidemiología molecular éstos han tomado una mayor relevancia, ya que ha permitido entender las relaciones evolutivas entre las cepas, así como el conocimiento sobre el origen de los brotes epidémico, (Cervantes-García., et al. 2014).

Desde el punto de vista genómico, la resistencia a los antibióticos, se produce por selección natural a través de mutaciones producidas al azar, pero también influye en cómo estos han sido utilizados de manera errónea.

Se hace mención de algunas técnicas más empleadas en el estudio de cepas MRSA, como, por ejemplo, la técnica PFGE (electroforesis en gel de campo pulsado), actualmente, se considera el estándar de referencia para tipificar aislamientos de MRSA y se ha demostrado ser uno de los métodos para estudiar epidemias e infecciones tipo hospital-hospital.

La tipificación PFGE de MRSA se fundamenta en la digestión de DNA cromosomal purificado con la enzima de restricción *SmaI*, para un posterior corrimiento y visualización en geles de agarosa (Guadalupe, S Z-M., et al. 2014).

Se realizó un estudio sobre la “Caracterización molecular de cepas de MRSA a través de diferentes técnicas de tipificación en Holanda”, las muestras fueron obtenidas en el Instituto Nacional de Salud Pública y del Ambiente, de las cuales 2,619 fueron cepas de MRSA y 793 muestras cerca de un 30% fueron tipificadas a través de la técnica PFGE.

En el proceso de tipificación, se utilizó la enzima *SmaI* basándose en el protocolo de *HARMONY* para la técnica de PFGE, posteriormente se utilizó el software Ridom StaphType versión 1.5.13 (Ridom GmbH).

Para conocer los tipos de gen *spa* se utilizó el software Bionumerics versión 5.1 (Applied Maths), teniendo como resultado 27 diferentes tipos del gen *spa*, de los cuales 2 fueron los dominantes, el tipo *t011* y *t108* y sólo 11 tipos de *spa* fueron encontrados solo una vez, pero formando un solo tipo clonal (*spa-cluster*) (Schouls Leo, et al., 2009).

Por lo tanto, el problema de esta investigación sería: ¿las cepas que tienen el mismo perfil clonal en PFGE tienen el mismo *spa*? ¿O las cepas con el mismo *spa* tienen el mismo perfil de PFGE?

4. Objetivo general.

Evaluar y comparar los principales métodos de tipificación de *Staphylococcus aureus*.

4.1. Objetivos específicos.

1. Tipificar cepas de *Staphylococcus aureus* por *spa*-tipo.
2. Tipificar cepas de *Staphylococcus aureus* por PFGE.
3. Comparar y evaluar los diferentes métodos de tipificación.

5. Materiales y métodos.

5.1. Extracción de ADN Genómico.

La extracción del ADN de las cepas de *Staphylococcus aureus*, se realizó con el kit Wizard® Genomic ADN Purification Kit (Promega) de acuerdo con al protocolo establecido por el fabricante.

Se inició a partir de cepas aisladas de *S. aureus* crecidas en caldo soya tripticaseína se tomó 1 mL de cada cultivo de las muestras centrifugándose durante 2 minutos a 13 000 rpm, se decantó el sobrenadante y a los pellets celulares se les agregó 480 µL de EDTA 50mM, adicionando 5 µL de lisostafina (SIGMA L7386-5MG: 1mg/ml en 20 mM de acetato de sodio pH 4.5) y 60 µL de lisozima (10 mg/mL) incubándose durante una hora a 37°C.

Posteriormente, se centrifugó durante 2 minutos a 13 000 rpm y se decantó el sobrenadante; agregándose 600 µL de la solución lisis nuclear mezclando a través del método de pipeteo, incubándose a baño maría por 5 minutos a 80°C.

Luego se dejaron enfriaron a temperatura ambiente, añadiendo 3 µL de la solución RNasa, incubándolo por 37°C por 30 minutos, y se enfrió a temperatura ambiente.

Por último, se agregó 200 µL de la solución precipitación de proteínas mezclándolo con ayuda de un vortex durante 1 minuto, posteriormente se incubó por 5 minutos en hielo. Se centrifugó a 13 000 rpm durante 3 minutos, después el sobrenadante se transfirió en un tubo Eppendorf limpio que contenía 600 µL de Isopropanol.

Se centrifugó a 13 000 rpm durante 2 minutos y se decantó el sobrenadante posteriormente se le adicionó 600 μ L de etanol al 70%. Después se volvió a centrifugar durante 2 minutos a 13 000 rpm vaciando el sobrenadante.

Se dejó secar durante un lapso de 15 minutos eliminando cualquier resto de etanol, tomando en cuenta esto, se tomó 100 μ L de la solución de rehidratación de ADN para poder disolver los pellets, posteriormente las muestras se incubaron a 4°C.

5.2. Purificación de ADN a partir de Gel de Agarosa.

Para la purificación de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó un equipo comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Se determinó el peso del fragmento cortado, posteriormente se agregó 10 μ L de Membrane Binding Solution por cada 10 mg de gel de agarosa mezclándolo con ayuda del vortex durante 1 minuto. Para luego colocarlo en baño María durante 10 minutos a 50°C-65°C hasta que se disuelva el gel utilizando de nuevo el vortex durante 5 minutos.

El sobrenadante se vació en una microcolumna SV ensamblada a un tubo colector incubándolo durante 1 minuto a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm por 1 minuto y se decantó el sobrenadante que se encontraba dentro del tubo colector.

Posteriormente se le adicionaron 700 μ L de membrana Wash Solution para volver a centrifugar a 13 000 rpm por 1 minuto retirando el contenido dentro del tubo colector. Se realizó otro lavado con 500 μ L de membrana Wash Solution centrifugando a 13 000 rpm durante 5 minutos.

Por último, la microcolumna se retiró cuidadosamente del tubo colector transfiriéndolo a un tubo Eppendorf limpió, se le agregó 50 μ L de agua libre de nucleasas incubándolo durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 13 000 rpm por 1 minuto.

Las microcolumnas se desecharon y los tubos Eppendorf que contenían las muestras de DNA diluido se conservaron a 4°C, posteriormente se mandaron a secuenciar las muestras *S. aureus* 637N, *S. aureus* 637F, *S. aureus* 677N, *S. aureus* 677F, *S. aureus* 680F y *S. aureus* 978F.

5.3. Detección del gen *spa* por PCR.

Para la detección del gen *spa*, se realizó una reacción en cadena de polimerasa (PCR) del ADN de las cepas identificadas como *S. aureus*. En la tabla 3 muestra los primers o iniciadores que se utilizaron para llevar a cabo dicha reacción de acuerdo al manual de Random bioinformatics.

Tabla 3. Secuencia de iniciadores para la amplificación del gen *spa*.

No.	Iniciadores.	Secuencias.	Tamaño del amplificado.
1	<i>spa</i> -1113F	5'-TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3'	
2	<i>spa</i> -1514R	5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'	300 a 600 pb

Se utilizaron los siguientes controles positivo y negativo:

- Control positivo: Cepa control de *S. aureus* ATTC 43 300
- Control de reacción: Agua (H₂O)

Para obtener las cantidades necesarias para la realizar la PCR se utilizaron los siguientes cálculos con ayuda de una matriz original, para esto se multiplica los datos por el número de muestras excepto para el ADN, como se verá en la tabla 4.

Tabla 4. Matriz original para hacer la mezcla de reacción para la técnica de PCR.

Matriz	1x (Valores originales)	2.5x	12.5x
DNTP's	0.4 µL	1 µL	5 µL
MgCl ₂	1.5 µL	3.75 µL	18.75 µL
Buffer Sx	4.0 µL	10 µL	50 µL
Primer F (Forward)	0.5 µL	1.25 µL	6.25 µL
Primer R (Reverse)	0.5 µL	1.25 µL	6.25 µL
Taq pol (Taq polimerasa)	0.1 µL	0.25 µL	1.25 µL
H ₂ O	12 µL	30 µL	150 µL
ADN	1 µL	1 µL	1 µL
Concentración final	19 µL	19 µL	19 µL

Para la amplificación del gen de la proteína A (*spa*), se utilizó un volumen final de 20 µL para cada reacción.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

- Primera fase: Pre-desnaturalización a 80°C por 5 minutos.
- Segunda fase: Desnaturalización pasa a una temperatura de 94°C por 45 segundos.
- Tercera fase: Alineamiento a 60°C por 45 segundos.
- Cuarta fase: Extensión o elongación a 72°C por 90 segundos.
- Quinta fase: Extensión final de 72°C por 10 segundos.

Durante 35 ciclos equivalentes a tres horas con 40 minutos.

Los productos se analizaron y se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, utilizando 30 ml de buffer TBE 0.5X (Tris, 50 mM, ácido bórico 50 mM y EDTA 0.2 mM, a pH 8) y 0.45 g de agarosa.

El gel fue cargado con 4 µl de producto amplificado y con 1 µl de marcador de peso molecular de 100 pb. Se dejó correr la electroforesis con un voltaje de 80 V, a una corriente de 400 mA y por un tiempo de 40 minutos.

Posteriormente se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/ml concentración final) por 15 minutos y se visualizó en un transiluminador Gel Doc XR de BioRad, usando el software Quantity One con la que se capturó la imagen.

5.4. Tipificación de *S. aureus* por *spa*- tipo (*spa*- typing).

Para la interpretación de las secuencias de *spa*, se utilizó el software de SPA Typing (<http://seqtools.com/>) para alinear las secuencias y determinar qué tipo de *spa* se trata. También se utilizó el software Ridom Spa Server (<http://spa.ridom.de/>) que es una base de datos que se utilizó para recopilar y armonizar los datos de varias regiones geográficas, así como para identificar las secuencias de *spa* de repetición así como el tipo.

Las secuencias obtenidas se hicieron con el primer 1514R, por lo que son secuencias de la cadena complementaria; por lo que primeramente se tuvo que obtener la cadena complementaria-reversa utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.0 de Tom Hall. Esta secuencia

complementaria reversa se copió y se pegó en el programa SPA Typing para la tipificación de la secuencia.

La secuencia debe de cumplir con las siguientes características:

1. Contar con un extremo 5'.
2. Tener las series repetidas.
3. Tener una secuencia 3'.

Al tener estas tres características, el programa da la tipificación del gen *spa* del cual se nombra con letra t seguida del número que corresponde.

5.5. Tinción de Gram.

1. Con ayuda de un asa bacteriológica se tomó solo una colonia, se frotó dentro de la gota de agua, posteriormente se fijó pasándolo sobre el mechero.
2. Se cubrió el frotis con cristal violeta durante 1 minuto, pasado el tiempo se limpia con agua.
3. Agregando lugol durante 1 minuto posteriormente se realiza lo mismo que en el paso anterior.
4. Se agregó alcohol-acetona y se lava con agua.
5. Por último, se agregó safranina durante 1 minuto, pasado el tiempo se lava con agua.
6. Se dejan secar los portaobjetos para su observación con ayuda de un microscopio, se le agregó una gota de aceite de inmersión observándolo con el objetivo de 100X.

5.6. Caracterización de la clonalidad genotípica por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).

La caracterización de la clonalidad genotípica de las cepas de *Staphylococcus aureus*, se realizó por medio de la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), utilizando la cepa NCTC 8325 como control.

Se utilizó la metodología descrita por (McDougal, et al. 2003), se inoculó una sola colonia de *S. aureus* aislada en agar sal manitol en 3 ml de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y se incubaron a 37°C durante 24 h.

Posteriormente, se ajustaron las suspensiones a 4.0 Mc Farland, de ahí se tomaron 1000 μ L de células y se colocaron en tubos Eppendorf centrifugándose a 13 000 rpm durante 4 minutos.

Luego se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet obtenido con 200 μ L de buffer TE1X (TE 10X: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) centrifugándolo durante 2 minutos quitando todo el buffer, se re suspendió el pellet con 150 μ L de buffer TE1X y se colocaron los tubos a 37°C por 10 minutos.

Transcurrido este tiempo, se adicionaron 5 μ L de lisostafina (SIGMA L7386-5MG: 1mg/ml en acetato de sodio 20 mM pH 4.5), dejándolo reaccionar durante 20 minutos.

Se pesó 0.09 g de agarosa SeaKem Gold Agarose (Lonza Cat. 50152) diluido en 5 ml del buffer TE1X para una concentración final al 1.8%, manteniéndola a una temperatura de 60 a 70°C, guardándolo en un tubo Falcon estéril 50 μ L.

Después se tomaron 150 μ L de esta agarosa y se mezcló por pipeteo con las células para ser colocadas en moldes (previamente esterilizados con luz UV durante 10 minutos) y estos se refrigeraron por 10 minutos.

Transcurrido el tiempo, los cubos de agarosa (plugs) se retiraron de los moldes y se colocaron en tubos estériles con rosca, la cual contenían 3 ml de buffer de lisis EC (6 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.5% Brij-58, 0.2% Deoxicolato de sodio, 0.5% Laurilsarcosil de sodio pH 8.0) y se incubaron a 37°C por 4 horas (también se pueden dejar toda la noche a temperatura ambiente).

Luego se decantó el buffer de lisis EC y se lavaron los plugs cuatro veces con 4 ml de buffer TE1X con agitación de 15 minutos en un equipo Ultra Rocker Rocking Platform (BioRad). Después se cortó uno de los plugs de cada muestra y se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 2 ml y se realizó un último lavado con 300 μ L de buffer J1X (Buffer J10X: 100 mM Tris-HCl, 70 mM MgCl₂. 500 mM KCl, 10 mM DTT (1-4 Ditiotretitol) pH 7.5). La otra parte de los plugs se dejaron en los tubos estériles con 2 ml de buffer TE 1X manteniéndolos en refrigeración.

Al plug del tubo Eppendorf se le realizó la digestión enzimática adicionando 200 μ L de la mezcla: enzima de restricción *Sma* I 25 U/tubo (1.25 μ l New England, N01-R0141L), agua estéril y buffer J 10X, dejándolos a temperatura ambiente durante 4 horas en constante movimiento.

Mientras tanto se preparó 100 ml de agarosa para PFGE (Pulsed Field Certified Agarose, Ultra Pure DNA Grade Agarose, BioRad Cat. 162-0138) al 0.8% en 100 ml de TBE 0.5X (TBE 5X 450 mM Tris base, 450 mM ácido bórico, 10 mM EDTA pH 8.0).

Una vez solidificado el gel, se le incorporó los plugs en los pozos y se aplicó una capa de agarosa al 1% como sellador. Se utilizó un marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker de New England (N01-N0340S).

La corrida se realizó en un equipo de electroforesis con campos pulsantes CHEF-RD® II de BioRad. El buffer de la corrida fue de TBE 0.5X preparado con 2 litros de agua destilada estéril. Se utilizaron las siguientes condiciones de corrida: 6 volts, cambio de orientación inicial 5 s, final 45 s, durante 21 h. Transcurrido este tiempo se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/ml concentración final), durante 20 minutos y se observó en un transiluminador Gel Doc XR de BioRad, usando el software Quantity One con la que se capturó la imagen.

5.7. Análisis de los patrones de PFGE.

Se utilizó un patrón de la cepa de *S. aureus* NCTC 8325, para la normalización de los patrones de las cepas estudiadas. Los patrones de la PFGE se analizaron con el software Gene Tools versión 3.07 y el software Gene Directory versión 1.02 de Syngene, utilizando el coeficiente de similitud de Dice y para el dendrograma el método de medias aritméticas por pares no ponderados (Unweighted Pair Group Method of Averages; UPGMA) con un límite de tolerancia del 1.25%.

Para el análisis de los perfiles obtenidos, se realizó 3 cortes (cutoff) con respecto al porcentaje de similitud de los patrones de bandas de PFGE: si el porcentaje era <65% se consideraban cepas diferentes, del 65% al 80% son cepas posiblemente relacionadas; del 80% al 95% son consideradas cepas genéticamente relacionadas y del 95% al 100% las cepas se consideran idénticas (Tenover, 1995).

6. Resultados y análisis de resultados.

6.1. Amplificación del gen spa.

Para la detección del gen *spa* por PCR e electroforesis, se utilizaron 10 muestras de *S. aureus* que se muestra en la tabla 6.

Tabla 5. Cepas de MRSA utilizadas para la detección del gen *spa* a través de la técnica de PCR e electroforesis.

No.	Cepas	Amplificación.
1	637F	1 banda.
2	637N	1 banda.
3	677N	1 banda.
4	677F	1 banda.
5	680N	3 bandas.
6	680F	1 banda
7	689N	3 bandas
8	689F	4 bandas
9	978N	4 bandas
10	978F	1 banda

Los resultados obtenidos para la identificación del gen *spa* se muestran en las figuras 5, 6 y 7.

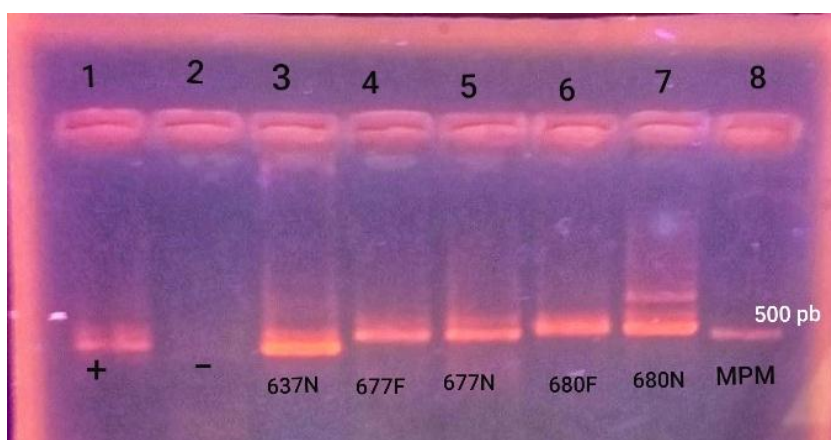


Fig. 5. Amplificación del gen *spa*. Electroforesis en gel agarosa al 1.5%. Carril 1: Control positivo, carril 2: Control de reacción, carril 3: *S. aureus* 637N, carril 4: 677F, carril 5: *S. aureus* 677F, carril 6: *S. aureus* 680F, carril 7: *S. aureus* 680N y en el carril 8: Marcador de peso molecular (Promega).

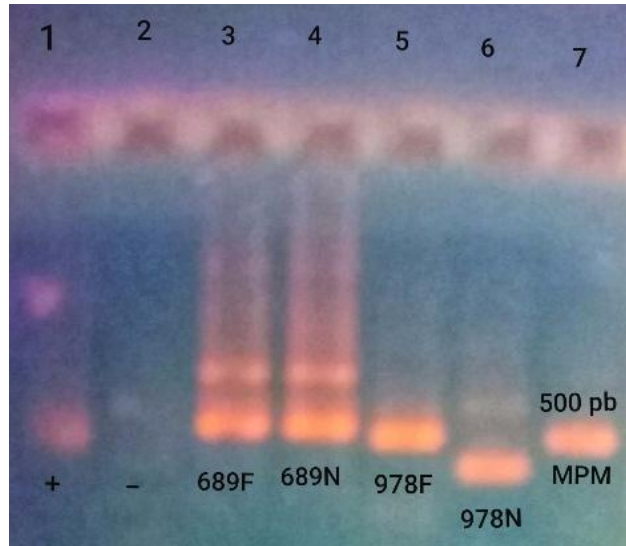


Fig. 6. Amplificación del gen *spa*. Electroforesis en gel agarosa al 1.5%. Carril 1: Control positivo, carril 2: Control de reacción, carril 3: *S. aureus* 689F, carril 4: 689N, carril 5: *S. aureus* 978F, carril 6: *S. aureus* 978N, carril 7: Marcador de peso molecular (Promega).

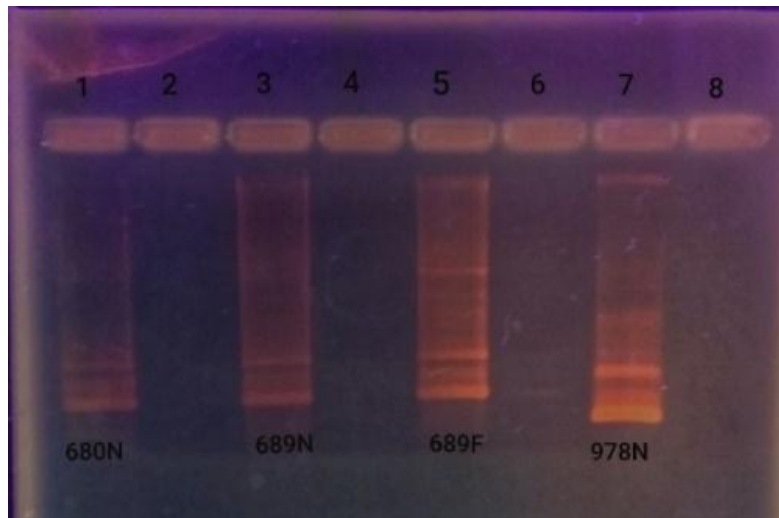


Fig. 7. Amplificación del gen *spa*. Electroforesis en gel agarosa al 1.5%. Carril 1: *S. aureus* 680N, carril 2: vacío, carril 3: *S. aureus* 689N, carril 4: vacío, carril 5: *S. aureus* 689F, carril 6: vacío, carril 7: *S. aureus* 978N, carril 8: vacío.


```
TTTAAAGACGATCCTTCGGTGAGCAAAGAAATTTTAGCAGAAGCTAAAATGCTAAACG
ATGCTCAAGCACCAAAAGAGGAAGACAATAACAAGCCTGGTAAAGAAGACAACAAAA
AACCTGGTAAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGCAAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGT
AAAGAAGACGGCAACAACCTGGCAAAGAAGATGGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGAT
GGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGACGGCAACGGAGTACATGTCGTAAACCTGGGATAC
AGTAAGTAT.
```

Fig. 10. Secuencia de la cadena complementaria-reversa de la muestra *S. aureus* 637F

En la Figura 11, indica el tipo de *spa* de la muestra 637F, con ayuda del programa SeqTool usando la secuencia complementaria obtenida con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor.



Fig. 11. Identificación del tipo de *spa* para la cepa *S. aureus* 637F.

En la Tabla 6, se indica los resultados obtenidos de la página SeqTools de las muestras mencionadas anteriormente.

Tabla 6. Muestras de *S. aureus* a las que se determinó el tipo de *spa*

No.	Cepa de <i>S. aureus</i>	Patrón de repeticiones	Tipo de <i>spa</i>
1	637F	04-34-22-17-23-24-24	<i>t1406</i>
2	637N	04-34-22-17-23-24-24	<i>t1406</i>
3	677F	04-17-25-16-23-34-50-50-17	<i>t1710</i>
4	677N	04-17-25-16-23-34-50-50-17	<i>t1710</i>
5	680F	11-10-21-17-34-24-34-22-25-25	<i>t701</i>
6	680N	11-10-21-17-34-24-34-22-25-25	<i>t701</i>
7	689F	07-23-21-16-33-13	<i>t922</i>
8	689N	11-10-21-17-34-24-34-22-25-25	<i>t701</i>
9	978F	15-12-16-02-16-0225-17-24	<i>t021</i>
10	978N	11-19-12-34-22-25	<i>t723</i>

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se logró identificar seis *tipos de spa* de las diez cepas que se mandaron a secuenciar. En las cepas 637F y 637N comparten el mismo *tipo de spa t1406*; existe un total de 25 registros de MRSA en los países de Alemania, Holanda e Italia desde el año 2006 al 2017.

Mientras que en las cepas 677F y 677N comparten el mismo *tipo de spa t1710*, existen 3 registros de MRSA en el país de Francia desde el año 2006 al 2008.

En el caso de las cepas 680F y 680N cuentan con el mismo *tipo de spa t701*, cuenta con un total de 1084 registros de MRSA en los países como Suecia, Islandia, Irlanda, India, Estados Unidos, Alemania, Austria, China, Italia, Sudáfrica, Rumania entre otros, desde el año 2003 hasta al 2019.

Las cepas 689F y 689N difirieron en el tipo de *spa*; en la cepa 689F se determinó que el tipo de *spa* es *t922*, teniendo un total de 461 registros de MRSA en los países de Alemania, Sudáfrica, Suecia, Irlanda, Noruega, Holanda, entre otros, desde el año 2005 hasta el 2019. Y la cepa 689N comparte el mismo tipo de *spa* con las cepas 680F y 680N.

Las cepas 978F y 978N difirieron el *tipo de spa*; en la cepa 978F se determinó que el *tipo de spa* es *t021*, además de que nos muestra el tipo de MLST (ST-30, ST-33, ST-35), contiene un total de 4523 registros de MRSA en los países de Alemania, Sudáfrica, Suecia, Islandia, India entre otros, desde el año 2000 hasta el 2019.

Y, por último, la cepa 978N el *tipo de spa* es *t723*, abarcando un total de 128 registros de MRSA en países como Alemania, Estados Unidos, Islandia, Emiratos Árabes Unidos, España, Holanda, Israel, Inglaterra, Noruega y por último Bélgica en los años 2003 hasta el 2018.

6.3. Tipificación clonal de cepas de *S. aureus* aisladas por PFGE.

Para el proceso de tipificación en electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), se utilizaron 11 muestras como se indica en la tabla 7.

Tabla 7. Lista de muestras de *S. aureus* utilizadas para la tipificación clonal a través de la técnica PFGE.

No.	Muestras de <i>S. aureus</i> .	Amplificación
1	17Nb	9 bandas
2	213F	8 bandas
3	264F	12 bandas
4	408F	2 bandas
5	463F	4 bandas
6	511N	10 bandas
7	628N	9 bandas
8	638N	11 bandas
9	1236N	1 banda
10	1518N	10 bandas
11	NCTC8325	

Los resultados obtenidos para el proceso de tipificación en electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) se muestran en las figuras 12 y 13.

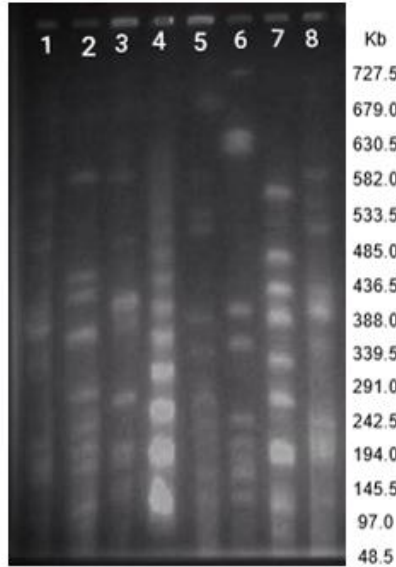


Fig. 12. Patrón de bandas de PFGE. Gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: *S. aureus* NCTC 8325, carril 2: *S. aureus* 17Nb, carril 3: *S. aureus* 213F, carril 4: Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs N0340S), carril 5: *S. aureus* 264F, carril 6: *S. aureus* 638N; carril 7: *S. aureus* 1518N; carril 8: *S. aureus* NCTC 8325.

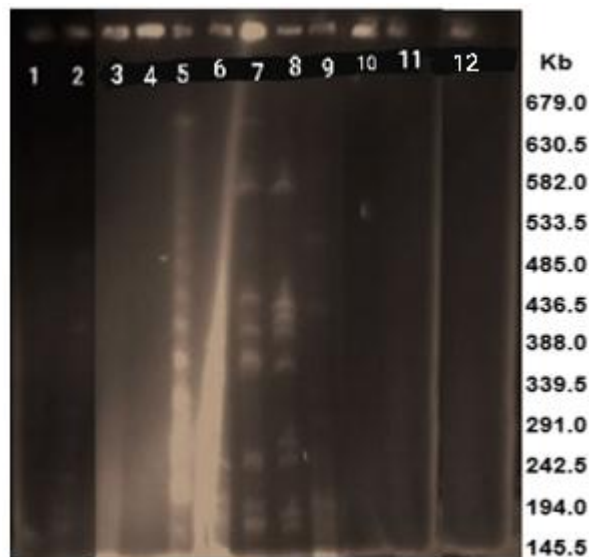


Fig. 13. Patrón de bandas de PFGE. Gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: *S. aureus* NCTC 8325, carril 2: *S. aureus* 17Nb, carril 3: *S. aureus* 213F, carril 4: *S. aureus* 264F, carril 5: *S. aureus* 408F, carril 6: Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs N0340S), carril 7: *S. aureus* 463F, carril 8: *S. aureus* 511N, carril 9: *S. aureus* 628N, carril 10: *S. aureus* 638N, carril 11: *S. aureus* 1236N y carril 12: *S. aureus* NCTC 8325.

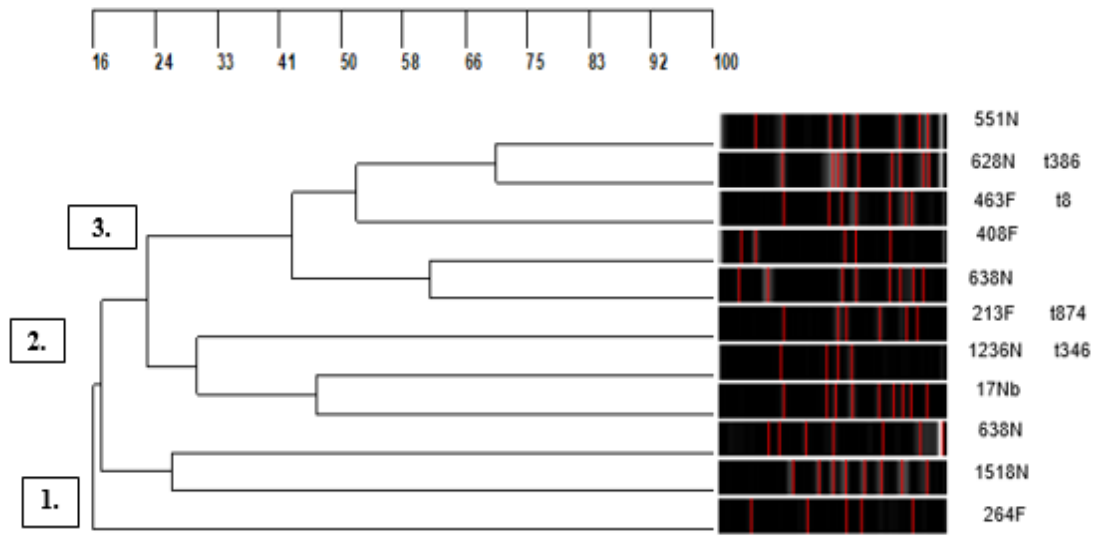


Fig. 14. Dendrograma de homología en cepas de *S. aureus* indican su similitud y el tipo de *spa* que poseen.

El dendrograma nos muestra 3 grupos, no existe una clona predominante *S. aureus* 264F presente en el grupo 1. En el caso del grupo 2 se encuentra la cepa *S. aureus* 1518N y *S. aureus* 638N.

En el grupo 3 existen 2 subgrupos, en el primer subgrupo se encuentran las cepas *S. aureus* 17Nb, *S. aureus* 1236N, *S. aureus* 213F y una clona predominante *S. aureus* 213F.

En el segundo subgrupo se encuentra las cepas *S. aureus* 638N, *S. aureus* 408F, *S. aureus* 463F, *S. aureus* 628N y por último *S. aureus* 511N.

7. Discusión de resultados.

Utilizando el método de tipificación para identificar el gen *spa*-tipo, de las 10 muestras que se utilizaron se identificaron 6 tipos de *spa* en las que 7 muestras obtuvieron el mismo gen, como son: *t1406*, *t1710* y *t701*

De acuerdo con el estudio de Majeed., (2012), se identificaron 118 tipos de *spa* en 366 muestras de MRSA, 5 de estas cepas no pudieron ser tipificadas, mientras que 16 tipos de *spa* no se encontraron en la base de datos Ridom StaphType, y los tipos de *spa* más comunes fueron el *t008* con un 31% y *t002* con un 12%.

El método de tipificación clonal de cepas de *S. aureus* por PFGE, arrojó que al utilizar la enzima de restricción *SmaI* generó 5 a 10 fragmentos con tamaños 242.5-485.0 Kb, comparándolo con el estudio de Tenover, *et al.* (1995), obtuvieron como resultado un número aproximado de 15 a 20 fragmentos con un peso de 10-700 kb, utilizando la misma enzima de restricción. La diferencia en el número de fragmentos difiere de una cepa a otra.

8. Objetivos y metas alcanzados.

Se lograron todos los objetivos propuestos en esta investigación, así que se le agradece al Dr. Jaime A. Bustos Martínez y a la Dra. Aida Hamdan Partida por todo el asesoramiento tanto académicas como prácticas, que me brindaron durante mi estadía en el laboratorio de Microbiología y Biología molecular.

Además, a la Lic., en QFB Erika Gómez Mateo y a la laboratorista Norma, por su paciencia, conocimiento y disponibilidad de su tiempo, ya que con todo este equipo se pudo realizar este proyecto.

La meta fue la esperada, ya que se identificaron las 10 muestras para el gen *spa*, teniendo que varias de las muestras tenían el mismo tipo de *spa* y otras que fueron totalmente diferentes.

Que sea esto, un antecedente más, para realizar más investigaciones de este tipo, pero sobre todo para impulsar el conocimiento de la biología molecular en diferentes campos de la ciencia.

9. Conclusiones.

- Se identificaron 6 tipos del gen *spa*, de los cuales 7 cepas obtuvieron el mismo gen.
- En el caso del método de tipificación clonal de PFGE, de acuerdo con el dendrograma mostró que existen dos clonas dominante y 3 grupos diferentes.
- De acuerdo con el dendrograma de homología en las cepas de *S. aureus* existe 3 grupos de similitud y en el último grupo existen 2 subgrupos.

Bibliografía citada.

Balaban N, Rasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. Revista. International Journal of Food Microbiology. 61:1 1-10

Borraz Ordás C. 2006. Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en Hospitales españoles. Tesis, para obtener el grado de doctor. Universidad de Barcelona. Barcelona, España. Disponible en: <http://www.tdx.cat/handle/10803/2513>.

Bustos Martínez JA, Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas M., 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Revista Biomédica. 17:4 287-305.

Camussone CM, Calvino LF. 2013. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. Elsevier España. Asociación Argentina de Microbiología. Revista Argentina Microbiológica. 45:2 119-130.

Cervantes GE, García GR, Salazar-Schettino PM. 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica Medicina de laboratorio. 61:1 28-40

Colsa RA. 2011. *Staphylococcus aureus*: De la genómica a la clínica. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. 24:95. 91-94

Fox J, Barthold S, Davisson M, Newcomer C, Quimby F, Smith A. 2007. The Mouse in Biomed Research: Diseases. 2nd Edition. Academic Press. New York. EUA.

Guadalupe S Z-M, Avalos-Flores H., M Y Soto-Padilla. 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Revista Biomédica 25:3

Harris LG, Foster SJ, Richards RG. 2002. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relations to adhesion to biomaterials: Revista Eur Cells Mater. 4:2 39-60.

Hurtado MP, De la Parte MA, Brito A. 2002. *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de Patogenicidad y la Fisiopatología de la Infección

estafilocócica. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 22:2 1315-2256.

Kloss WE, Schleir KH, Goirtz F. 1992. The genus *Staphylococcus*. In: Balows A, Truper HG, Dwoekin M, eds. The Prokaryotes, 2nd Ed. New York, Springer-Verlag.

Kloss WE, Bamerlan TL. 1995. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murra PR, Baron EJ, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. American Society for Microbiology, Washington DC. 384-04.

Koneman WE, Allen S, Janda, Procop, Schreckenberge, Woods. 2009. Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas en color. 6ª edición. Médica Panamericana. Argentina.

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 357 (9264) 1225-1240.

Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Review Clinical Infection Diseases. 29:5 1128–32.

López García MJ, Cárdenas Povedano M, Osuna Molina A. 2012. Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones genitales. Omnia Science Scholar. 1ª. Edición. España.

Lowy FD. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. New England Journal Medicine. 339:8 520-32.

Majeed Z, Arafat Y, Ajab Z, Akbar MS, Shehzad AW, Ajab H. 2012. Caracterización genotípica de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina prevalente en Hospitales de Pakistán. Acta Bioquímica Clínica Latinoamerica 46:2 257-269.

McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. 2003. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. Journal Clinical Microbiology. 41:11 5113-5120.

Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. 2001. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes and Infection*. 13:7 585-594.

Novick RP. 2003. Mobile genetic elements and bacterial toxins: The superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 49:2 93-105.

Rasmussen RV, Fowler VG Jr, Skov R, Bruun NE. 2011. Future challenges and treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia with emphasis in the MRSA. *Future microbiology*. 6:1 43-56.

Rodríguez PA, Arenas R. 2018. Hans Christian Gram y su tinción. *Revista Dermatología médica y quirúrgica*. 16:2 1-4

Shakeri F, Shojai A, Golalipour M, Rahimi AS, Vaez H, Allah GE. 2010. Spa Diversity among MRSA and MSSA Strains of *Staphylococcus aureus* in North of Iran. *International Journal of Microbiology*. 2010 1-5

Sheagren J., Schaberg D. 1998. Staphylococci. En *Infectious Diseases*. Gorbach, Barlett and Blacklow. Ed WB Saunders. 1697-1703

Schouls Leo M, Spablog EC, van Lut M, Huijdsens XW, Pluister GN. 2009. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and spa-Typing.

Tenover FC., R D Arbeit, R V Goering, P A Mickelsen, B E Murray, D H Persing, B Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. 33:9 2233:2239

Thurlow LR, Joshi GS, Richardson AR. 2012. Virulence strategies of the dominant USA300 lineage of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *FEMS Immunology Medical Microbiology*. 65:1 5-22.

Ulrich RG. 2000. Evolving superantigens *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and medical microbiology*. 27:1 1-7.

Vivoni MA, Meurer MB. 2005. Application of molecular techniques in the study of *Staphylococcus aureus* clonal evolution -A review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 100:7 693-98.

Vuong C, Saenz HL, Götz F, Otto M. 2000. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. The Journal Infectious Diseases. 182:6 1688-93.

Washington CW, Allen SD, Janda MW, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC. 2005. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Sixth Edition. Lippincott Williams & Wilkins.

Waldvogel, F.A. 2000. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mandell, G.L., Bennett, J. E. and Dolin, R., Eds., Principles and Practice of Infectious Diseases, Churchill Livingstone, Philadelphia. 2069-2092.

Watts A, Ke D, Wang Q, Pillay A, Nicholson-Weller A, Lee JC. 2005. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. Infect Immun. 73:6 3502-11.

Young Hwang S, Kyung Park Y, Cheong Koo H, Yong Ho P. 2010. Spa typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. Journal of Veterinary Science. 11:2 125-131.