



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

**Polimorfismos de Nucleótido Único y Secuencias Cortas
Repetidas del gen de la Proteína A de *Staphylococcus aureus*.**

TESIS

QUE PRESENTA

MVZ Francisco Ramón García Rodríguez

PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestro en Ciencias Biológicas

En el Área Temática de Microbiología Celular y Genética

Molecular en la Salud.

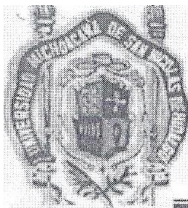
ASESOR

Dr. Juan José Valdez Alarcón.

Co. ASESOR

Dr. Alejandro Bravo Patiño.

Morelia Michoacán Agosto de 2013



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DR. HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E


Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Polimorfismos de nucleótido único y secuencias cortas repetidas en el gen de la proteína A de *Staphylococcus aureus*" presentado por el MVZ. FRANCISCO RAMÓN GARCÍA RODRÍGUEZ, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

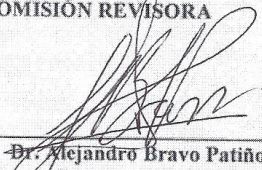
Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

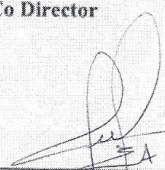
Morelia, Michoacán, a 21 de marzo de 2013

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA


Dr. Juan José Valdez Alarcón
Director de Tesis


Dr. Alejandro Bravo Patiño
Co Director


Dr. Jaime Amadeo Bustos


Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre


Dr. Daniel Val Arreola

Agradecimientos.

Por la beca asignada para la realización de los estudios se agradece al Consejo Nacional De Ciencia Y Tecnología. Registros de becario 239205

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Dedicatoria.

A mis padres y familia.

Y en especial a los profesores por el apoyo brindado en la elaboración de este trabajo.

Abreviaturas.

μl	Micro Litro
μM	Micro Molar
A	Nucleótido Adenina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BHI	Infusión Cerebro Corazón
C	Nucleótido Citosina
d´NTP´s	Desoxinucleótidos Trifosfato
F	Primer Adelantado
Fc	Fracción Cristalizable
G	Nucleótido Guanina
GenBank	Banco de genes
Hep-2	Derivado de células HeLa
IF 1	Interferón tipo 1
Ig	Inmuno globulina
IgG	Inmuno globulina G
INDEL´s	Inserciones o eliminaciones de secuencias de ADN
kDa	Kilo Daltones
M	Minutos
ml	Mililitro
MLST	Multilocus Sequence Typing
mm	Milímetros
mM	Mili Molar
NaCl	Cloruro de Sodio
NCBI	National Center of Bioinformatics Institute
Ng	Nanogramos
°C	Grados centígrados
Pb	Pares de bases
PFGE	Análisis de macrorrestricción en electroforesis en geles de campos pulsátiles
pH	Potencial de hidrógeno
R	Primer Reverso
rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Meticilina
SARM-AC	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Meticilina, adquiridos en la comunidad
SARM-AH	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Meticilina, adquiridos en hospitales
SCCmec	Casete cromosómico de resistencia a Meticilina
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SNP´s	Polimorfismos de Nucleótido Único
SpA	Proteína A
<i>spa</i>	Gen de la Proteína A
<i>spa</i>-typing	Caracterización molecular del gen de la Proteína A de <i>S. aureus</i>
SSR´s	Secuencias cortas repetidas
T	Nucleótido Timina
TNFR1	Receptor tipo 1 del factor de necrosis tumoral
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
X	Región X del gen de la proteína A
Xr	Región Xr del gen de la proteína A

Índice.	
I. RESUMEN.	1
II. SUMMARY	2
III. INTRODUCCIÓN GENERAL.	3
1. <i>Staphylococcus aureus</i>, un problema de salud pública a nivel mundial.	3
2. Factores de Virulencia.	4
3. Epidemiología de <i>S. aureus</i>.	4
3.1. Infecciones nosocomiales.	5
3.2. Infecciones en la comunidad.	7
3.3. <i>S. aureus</i> como patógeno en animales.	7
4. La Proteína A de <i>S. aureus</i>.	8
4.1. El gen de la proteína A de <i>S. aureus</i>.	9
4.2. Secuencias Cortas Repetidas (Xr).	10
4.3 Polimorfismos de Nucleótido Único.	10
5. Análisis bio-informático: Posible presencia de SNP's en las regiones EDABC de la proteína A.	11
6. Caracterización molecular de <i>S. aureus</i> mediante los <i>spa</i>-tipos	12
7. Funciones de SpA.	14
8. Componentes de la respuesta inflamatoria donde interviene SpA.	14
IV. Justificación.	16
V. Hipótesis.	16
VI. Objetivos.	17
VII. Estrategia experimental.	18
VIII. Resultados.	19
Capítulo 1. Caracterización molecular de aislados de <i>Staphylococcus aureus</i> asociados a mastitis bovina mediante <i>spa</i>-typing en el municipio de Tarímbaro, Michoacán.	19

Capítulo 2. Polimorfismos de productos de amplificación de la región EDABC del gen de la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> en infecciones en humanos y bovinos.	32
IX. Discusión general.	48
X. Conclusión General.	50
XI. Perspectivas.	51
XII. Bibliografía General.	54
Anexo I.	61
Anexo 2.	69

Índice de figuras

Figura 1.1. Esquema del gen de la Proteína A.	9
Figura 1.2. Esquema que muestra la estructura de un <i>spa</i>-tipo.	13
Figura 2.1. Frecuencia relativa de los <i>spa</i>-tipos en el estudio.	25
Figura 2.2 Alineamiento de secuencias firma en el extremo 5' de la región Xr de <i>spa</i>.	26
Figura 3.1. Mapa de iniciadores obtenidos por el software primers4clades.	36
Figura 3.2. Representación del gen de SpA	37
Figura 3.3. Figura generada a través de un algoritmo de mínima dispersión.	40
Figura 3.4. Representación del diagrama de mínima dispersión de los aislamientos clínicos de humanos.	42

Índice de tablas.

Tabla 2.1 Relación de <i>spa</i>-tipos encontrados en bovinos.	24
Tabla 3.1 Oligonucleótidos utilizados en el estudio.	35
Tabla 3.2. Asignación de alelos de acuerdo al fragmento de amplificación obtenido a través de cada juego de oligonucleótidos	38
Tabla 3.3. <i>spa</i>-tipos y alotipos de la región de unión a IgG encontrados en una colección generada de aislamientos de bovinos	38
Tabla 3.4. Relación de alotipos de la colección de aislamientos clínicos de humanos.	41

I. RESUMEN.

Staphylococcus aureus es una bacteria de distribución mundial que es responsable de una amplia gama de enfermedades infecciosas en diversos hospederos. La proteína A, uno de los múltiples factores de virulencia de *S. aureus*, es de naturaleza polimórfica y en epidemiología molecular se utiliza para la caracterización de *S. aureus*. Se han descrito diversas funciones que la proteína A ejerce sobre células del hospedero como la activación de la expresión de interferón y del receptor al factor de necrosis tumoral alfa 1 (TNFR1). En este trabajo se logró establecer una asociación entre el polimorfismo de la proteína A y el origen de la cepa de *S. aureus* a la que pertenece, lo cual permitió determinar una tendencia evolutiva de la proteína A de *S. aureus*. Además, se identificaron Polimorfismos de nucleótido único (SNP's) en las secuencias "firma" que delimitan la región Xr del gen de la proteína A, por lo que se propone un criterio nuevo de aceptación.

II. SUMMARY

Staphylococcus aureus is a bacterium with a worldwide distribution, which is responsible for a number of infectious diseases found in various hosts. Protein A is one of the many virulence factors of *S. aureus*. The polymorphic nature of protein A is used for molecular characterization of *S. aureus*. Several functions of protein A have been described such as activation of interferon gene expression and tumor necrosis factor α 1 receptor (TNFR1). In this work we were able to establish an association between protein A polymorphisms and the source of the *S. aureus* strain. These data allowed us to determine an evolutive trend of SpA. In addition, a new criteria for SpA characterization and acceptance is proposed, which is based on single nucleotide polymorphisms (SNP's) identification in the signature sequences that flank the Xr region of SpA.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL.

1. *Staphylococcus aureus*, un problema de salud pública a nivel mundial.

Staphylococcus aureus forma parte de la familia *Staphylococcaceae* dentro del género *Staphylococcus*, en el cual se han descrito 40 especies diferentes. *S. aureus* es un coco Gram-positivo, sin movilidad, no forma esporas, puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos. A pesar de ser un anaerobio facultativo, crece mejor en condiciones aerobias. El microorganismo produce diversas enzimas (como catalasa y coagulasa, hemolisinas y diversas enzimas hidrolíticas, entre otras) que le confieren su virulencia. Sus colonias miden de 1 a 3 mm de diámetro, producen un pigmento amarillo típico debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis entre las 24 y 36 horas (Bustos-Martínez *et al.*, 2006). Es un microorganismo mesófilo que requiere aminoácidos y vitaminas para su crecimiento, tiene la capacidad de fermentar glucosa y manitol con producción de ácido. Tolerancia valores de pH entre 4.0 y 9.8, siendo su óptimo cercano a la neutralidad. Una característica importante de *S. aureus* es su tolerancia a concentraciones altas de NaCl (aprox. 20%). Esta característica, junto con su capacidad fermentativa del manitol, es un criterio para su aislamiento e identificación (Mendoza, 2005, Bautista-Trujillo *et al.*, 2013).

S. aureus es un patógeno que puede presentar múltiples factores de virulencia y resistencia a diversos antibióticos. Esta bacteria es agente causal de múltiples enfermedades en humanos y animales, tales como piodermas, osteomielitis, endocarditis, mastitis entre otras (Leonard y Markey, en 2008, Hamdan-Partida *et al.*, 2010).

2. Factores de Virulencia.

Se considera a un factor de virulencia como aquella molécula o característica de un microorganismo que le confiere la capacidad de invadir un tejido o le permite la supervivencia y adaptación al medio ambiente proporcionado por el huésped. Resulta interesante que muchos de los factores de virulencia no se encuentran en el cromosoma bacteriano o también llamado “núcleo del genoma” (Dobrindt *et al.*, 2010), sino que se localizan en elementos exógenos al genoma bacteriano, es decir, están localizados en elementos genéticos móviles (transposones), islas de patogenicidad (PAI's, por sus siglas en inglés) o elementos genéticos adquiridos por transferencia horizontal, como es el caso del casete cromosómico de resistencia a meticilina (SCC*mec*), bacteriófagos integrados en el genoma como profagos, entre otros. Sin importar su origen estos genes o grupos de genes contribuyen a la adaptación del patógeno (Dobrindt *et al.*, 2010). Gracias a la variabilidad de estos factores podemos observar prevalencia de ciertos genotipos de *S. aureus* en poblaciones específicas, tal es el caso de los genes de coagulasa y la hemolisina α que presentan variaciones que se asocian al nicho donde es encontrado *S. aureus* (DeLeo y Chambers, en 2009; Kawaguchiya *et al.*, 2011; Urushibara *et al.*, 2012).

3. Epidemiología de *S. aureus*.

Pocos años después de la introducción de la penicilina en 1942, aparecieron las primeras cepas de *S. aureus* resistentes a este antibiótico. Aunque inicialmente se presentaron de forma esporádica en el ámbito nosocomial, en 1946 ya representaban el 60% de las cepas de *S. aureus* aisladas en los hospitales del Reino Unido y pocos años después se habían extendido ampliamente en la comunidad. La introducción de otros agentes antiestafilocócicos como estreptomicina, tetraciclinas, sulfamidas, cloramfenicol y eritromicina originó la aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a estos fármacos. Este patrón de resistencia era frecuente en los hospitales a finales de los años 50, lo que dificultó de nuevo el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* (Livermore y Warner en 2009).

3.1. Infecciones nosocomiales.

La aparición de la meticilina en 1960 y, posteriormente de otras penicilinas resistentes a la penicilinas y de las cefalosporinas de primera generación, supuso un nuevo avance en el tratamiento de las infecciones estafilocócicas. Sin embargo, Jevons y Parker (1964) comunicaron poco después el aislamiento en el Reino Unido de las primeras cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM). Estas cepas que eran resistentes únicamente a los antibióticos β -lactámicos, aparecieron de forma esporádica y ocasionaron escasos problemas clínicos. En los años posteriores se fueron identificando cepas resistentes en todo el mundo como sucedió con la vancomicina, antibiótico de elección para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* y para el que han aparecido cepas con diferentes niveles de resistencia (Tenover, 1999, Livermore *et al.*, 2003)

En la actualidad *S. aureus* permanece como el patógeno con mayor frecuencia de aislamientos en infecciones en la comunidad y en el ámbito nosocomial. En la última década la epidemiología de *S. aureus* ha cambiado mucho y en particular las cepas resistentes a meticilina (SARM “*S. aureus* resistente a meticilina” ó MRSA por sus siglas en inglés) porque generalmente se encontraban asociadas a los hospitales (SARM-AH “Adquiridos en Hospitales”). Sin embargo actualmente nos enfrentamos a una reemergencia de este patógeno ya que los estudios referentes en todo el mundo muestran una tendencia de las SARM a estar presentes en la comunidad (SARM-AC “Adquiridos en la comunidad”) en la que no se presenta la estancia en nosocomios como factor de riesgo (Hamdan-Partida *et al.*, 2010). *S. aureus* es el responsable de una gran cantidad de afecciones en humanos, entre las cuales se pueden mencionar: endocarditis, intoxicación por alimentos, síndrome de shock tóxico, septicemia, enfermedades de la piel, infecciones de tejidos blandos y osteomielitis además de mastitis ovina o bovina (Koreen *et al.*, 2004).

Al igual que las cepas de *S. aureus* sensible a la meticilina (SASM), las cepas SARM se introducen en el medio hospitalario a través de pacientes, visitantes o trabajadores sanitarios. El reservorio fundamental lo constituyen los pacientes ingresados que están infectados o colonizados, extendiéndose a otros pacientes principalmente por medio de las

manos del personal sanitario (infección cruzada). A medida que progresa un brote epidémico, aumenta el número de portadores nasales de SARM que constituyen, a menudo, la propia fuente de infección. La transmisión a través del entorno inanimado (reservorio ambiental) puede ser digna de mención, especialmente en ciertas áreas, como en las Unidades de Cuidados Intensivos (Bedolla, 2008), donde la inmovilidad y la intubación de los pacientes favorecen la colonización por este patógeno. La transmisión también puede producirse por vía aérea, en los pacientes intubados, o por proximidad con pacientes afectados de neumonía. El porcentaje de portadores de *S. aureus*, así como la densidad de la colonización, aumenta en los grupos de pacientes sometidos a punciones frecuentes, como los enfermos hospitalizados, diabéticos con dependencia de insulina, usuarios de drogas por vía parenteral y hemodializados (Koreen *et al.*, 2004, Hamdan-Partida *et al.*, 2010).

En general, la infección se produce en zonas con alteraciones previas de la barrera mucocutánea debido a heridas traumáticas, intervenciones quirúrgicas, instrumentación, drogadicción parenteral, enfermedades dermatológicas, úlceras isquémicas, etc. A partir de esta fuente endógena, *S. aureus*, que se comportaba hasta entonces como comensal, rompe el delicado equilibrio que impedía su capacidad de proliferación y ocasiona una infección local o generalizada. La morbilidad será variable y dependerá de factores propios del huésped (edad, estado de salud previo, nivel de riesgo de contagio, etc.), del tipo de infección (focal o sistémica) y de la precocidad del tratamiento (Vergison *et al.*, 2012).

Existen factores asociados que favorecen la adquisición nosocomial de infección por SARM, entre los que destacan: i) la manipulación diagnóstico-terapéutica (catéter intravascular, sondaje vesical, intubación oro-traqueal, etc.), ii) estancia en Unidades de Cuidado Intensivo, iii) enfermedad grave de base, iv) antibioterapia previa, v) estancia nosocomial prolongada, vi) cirugía previa o herida quirúrgica, vii) úlceras isquémicas. Las medidas más eficaces para el control de las infecciones por *S. aureus* en general y SARM en particular, son las barreras que limitan su extensión. Entre las precauciones habituales figuran el lavado de las manos antes y después de cualquier contacto con infectados, y el empleo de barreras que eviten el contacto con fluidos o sangre, como guantes de un solo uso y bata. Aunque en la mayoría de los servicios hospitalarios suele bastar con las

precauciones habituales de contacto, en el transcurso de brotes con pacientes afectados de neumonía por SARM, es necesario utilizar mascarilla. Cuando se recurre a los cultivos microbiológicos de vigilancia para el control de un brote, suele utilizarse mupirocina, tres veces al día, durante 5 días, para la erradicación nasal de portadores SARM. El cuidado de los pacientes con SARM debe ser riguroso para evitar contagios (Hamdan-Partida *et al.*, 2010).

3.2. Infecciones en la comunidad.

El principal reservorio de *S. aureus* es el ser humano, ya que se puede encontrar tanto en portadores sanos, especialmente en las fosas nasales (de manera particular), así como en los pacientes infectados. La colonización se puede asentar sobre la mucosa nasal, orofaringe, epidermis íntegra (es decir, sin una lesión de entrada para el patógeno), úlceras crónicas cutáneas, heridas en fase de cicatrización o en la uretra de portadores de sonda. Además, esta bacteria ha demostrado poseer una gran capacidad para sobrevivir en un ambiente adverso y, por la acción de sus determinantes de patogenicidad (cápsula mucoide, polisacáridos, componentes antigénicos de la pared, producción de enzimas como catalasa, coagulasa, hialuronidasa, estafiloquinasas, lipasas, β -lactamasas, o la secreción de diversas toxinas como la exotoxina epidermolítica, enterotoxinas o la toxina del síndrome de choque tóxico), producir la infección (Koreen *et al.*, 2004, Bustos-Martínez *et al.*, 2006, Apolonio-Alonso *et al.*, 2011).

3.3. *S. aureus* como patógeno en animales.

En los últimos años la detección del aumento de la incidencia de los SARM-AH ha logrado despertar alerta en los sectores de salud en todo el mundo. De la misma forma se han detectado alrededor del mundo la presencia de SARM en animales domésticos (Leonard *et al.*, 2008).

La producción lechera es una práctica afectada en gran medida por este patógeno, ya que se considera como el agente etiológico con mayor virulencia de la mastitis bovina afectando considerablemente la producción lechera y añadiendo un factor de riesgo a la sociedad.

Cabe mencionar que las enfermedades gastrointestinales provocadas por alimentos en su mayoría son ocasionadas por el consumo de lácteos contaminados por lo que la salud de la glándula mamaria tiene una función predominante en la salud pública (Akineden *et al.*, 2008).

4. La Proteína A de *S. aureus*.

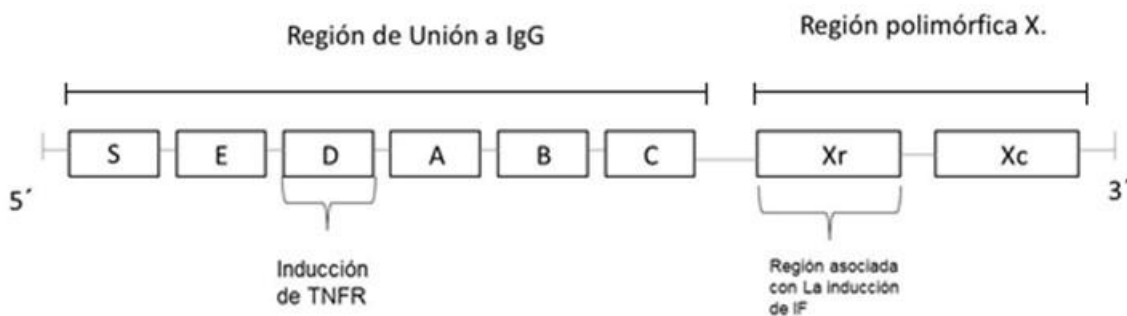
La proteína A (SpA) es uno de los factores de virulencia de *S. aureus* más estudiados. Tiene un tamaño aproximado de 42-kDa y está covalentemente anclada a la pared celular de *S. aureus*, a través de su dominio carboxilo terminal (Gómez *et al.*, 2006). SpA está compuesta por cinco dominios en tándem (E, D, A, B, C y X mostrados en la Figura 1.1). La región X_r, contiene un número variable de Secuencias Cortas Repetidas (SSR's, por sus siglas en inglés) que son secuencias cortas en tándem conformadas cada una por 24 a 26 pb y es utilizada para caracterizar molecularmente los aislamientos de *S. aureus* (Shopsin *et al.*, 1999, Harmsen *et al.*, 2003, Gómez *et al.*, 2006). Esta proteína es un factor de virulencia de *S. aureus* ya que tiene la propiedad de unirse a la Fracción cristalizable (Fc) de las Inmunoglobulinas (Ig), principalmente a la Inmunoglobulina "G" (IgG). Además, es un activador del receptor del Factor de Necrosis Tumoral 1 (TNF-1), el cual promueve la inflamación (Gómez *et al.*, 2006). Se ha reportado en la literatura que este factor de virulencia está presente en el 90 a 100% de aislamientos de *S. aureus*, provenientes de humanos, y en el 30% en los aislamientos provenientes de bovinos (Gómez *et al.*, 2006); sin embargo, en este trabajo, se ha encontrado que todos los aislamientos de bovinos (37) de *S. aureus* de origen bovino presentan el gen *spa*. La interacción de SpA con la región Fc de los anticuerpos, evita que *S. aureus* sea fagocitado, debido a que la bacteria se une a la IgG por la interacción de SpA con la región Fc, impidiendo que sea reconocida por el receptor de los macrófagos y ocasionando una baja en la opsonización. Además, el complejo SpA-IgG no puede estimular la fijación del complemento por la ruta clásica (Gómez *et al.*, 2006).

En trabajos anteriores sea reportado que SpA es sintetizada durante la fase de crecimiento exponencial de *S. aureus*. Además, se han reportado cepas que expulsan a SpA al medio, ya que probablemente algunas proteínas maduras no son capaces de anclarse a la pared celular. Algunas cepas SARM se caracterizan por expulsar SpA al medio donde se encuentra *S. aureus* (Duggleby and Jones, 1983, Lofdahl *et al.*, 1983). También se ha reportado que SpA es exocitado en microvesículas liberadas por *S. aureus* y que son capaces de inducir apoptosis en líneas celulares Hep-2 de un modo dependiente de la dosis (Gurung *et al.*, 2011).

4.1.El gen de la proteína A de *S. aureus*.

El gen de la proteína A (*spa*) presenta una región polimórfica, SSR's de la región X, a la cual se le ha atribuido la capacidad de activar la vía del interferón tipo 1 (IF-I) (Martin *et al.*, 2009). Además, presenta la región de unión a IgG que comprende las regiones homólogas E, D, A, B y C (Moks *et al.*, 1986).

Destaca la peculiaridad de presentar un codón TTG como codón inicio de la traducción en la posición 184 que es precedido por una posible secuencia Shine-Dalgarno (Uhlén *et al.*, 1983;Uhlén *et al.*, 1984)



Fi

gura 1.1. Esquema del gen de la Proteína A. En la imagen se representa la estructura del gen *spa*. En la región 5' se codifica el péptido señal "S", posteriormente se encuentran los 5 dominios de unión a IgG dispuestos en tándem "E, D, A, B y C"; en la región 3' se encuentra la región X subdividida en "Xr" (región de repetidos "SSR's") y "Xc".

4.2. Secuencias Cortas Repetidas (Xr).

Las Secuencias Cortas Repetidas (SSR's) se encuentran en la región X del gen *spa*, propiamente en la región Xr. A esta región se le denomina SSR debido a que las secuencias de esta región se conforman por uno o varios repetidos con cierto grado de homología de un tamaño aproximado de 24 a 30 pb ubicados hacia la derecha dominio "C" de la región de unión a IgG en el sentido 3' del gen (Shopsin *et al.*, 1999).

En esta región podemos encontrar dos secuencias "firma" (signature sequences: "RCAMCAAAA" en 5' y "TAYATGTCGT" en 3') flanqueando los SSR's. Esta región es conocida como Xr (Región X de repetidos) y es la base para un sistema de tipificación genética de *S. aureus* denominado *spa*-tipos. La secuencia de nucleótidos posterior a la firma en 5' corresponde a la región Xc de la cual se ahonda en un apartado propio que trata específicamente de esta región (Harmsen *et al.*, 2003).

4.3. Polimorfismos de Nucleótido Único.

Los Polimorfismos de Nucleótido Único o SNP's (por sus siglas en inglés) son mutaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos de un gen o alguna región regulatoria del genoma. Estos cobran su relevancia ya que se relacionan con grupos específicos de una determinada población o se asocian con enfermedades tales como el cáncer, enfermedades del corazón, padecimientos cardiacos, diabetes y desórdenes psiquiátricos (Kwok, 2003). Como se mencionó anteriormente, las variaciones en la región Xr son la base para la asociación de *S. aureus* con enfermedades infecciosas gracias a que los *spa*-tipos (*spa*-typing) presentan buena concordancia con Multilocus Sequence Typing (MLST) y SCC*mec*-typing además de otorgarle dispersión a los perfiles de análisis de macrorrestricción en electroforesis en geles de campos pulsados (PFGE). Debido a esto el *spa*-typing se usa en todo el mundo para la caracterización molecular de *S. aureus* (Harmsen *et al.*, 2003, Schouls *et al.*, 2009).

5. Análisis bio-informático: Posible presencia de SNP's en las regiones EDABC de la proteína A.

El análisis de las secuencias reportadas del gen *spa* reportadas en la base de datos de GenBank del National Center of Bioinformatics Institute (NCBI) muestra que el marco de lectura de todo el gen de SpA presenta polimorfismos a lo largo de todas las regiones de unión a IgG, a pesar de que se ha considerado que dicha región es constante. Con la finalidad de observar posibles SNP's en la secuencia mencionada, se generaron alineamientos sobre la secuencia de aminoácidos de las secuencias de las diferentes SpA encontradas dando como resultado la identificación de los SNP's y secuencias de inserción o eliminación (INDEL's) esquematizados en la Figura 1.2 (Roben *et al.*; 1995; Jansson *et al.*, 1998; Shopsin *et al.*, 1999; Blanco-Gelaz *et al.*, 2006; El-Sayed *et al.*, 2006; Oviedo-Boyso *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2009; Garofalo *et al.*, 2012).

Este hecho cobra relevancia debido a que en los ensayos realizados para la identificación de las interacciones de SpA con receptores celulares, se utilizan indistintamente aislamientos clínicos, cepas de referencia o fuentes de SpA comerciales sin tener en consideración los SNP's que puede presentar cada proteína. Por ejemplo, al dilucidar la interacción de SpA con TNFR1 se usó solo una SpA sin tomar en consideración las variantes con las que cuenta SpA (Gómez *et al.*, 2006) por lo que es de primordial relevancia utilizar aislamientos que concuerden con la patología estudiada ya que se ha demostrado que la región Xr es capaz de dar trazabilidad a cada aislamiento, por lo que de manera general uno o varios *spa*-tipo concuerdan con un origen o patología específicos.

Existen trabajos en los cuales se demuestra que los diferentes dominios E, D, A, B y C pueden anclar las IgG's de forma independiente aunque con distinto grado de afinidad, siendo el dominio D el más eficiente debido a que presenta mayor grado de afinidad por la porción Fc (Jansson *et al.*, 1998). Sin embargo, en el presente trabajo se observa que el dominio con mayor conservación es el E en los genomas de cepas de *S. aureus* (tomando en consideración sólo aquellos que cuentan con el proteoma editado y publicado en NCBI) por

lo que resulta interesante un análisis de conservación en estas regiones, ya que se cuentan con reportes sobre aislamientos que tienen INDEL's en esta región (Baum *et al.*, 2009).

La región X se encuentra subdivida en dos porciones: la región Xc cuya secuencia se caracteriza por ser conservada y la región Xr donde encontramos secuencias polimórficas como se describe en la sección 4.5 (Shopsin *et al.*, 1999, Harmsen *et al.*, 2003). En la porción Xc se encuentra el motivo LPXTG que marca la unión de SpA a la pared celular por lo que mutaciones o INDEL's en esta porción podrían ser factores que marquen una falla en la secreción de SpA

La porción Xr cobró importancia epidemiológica ya que siendo un marcador molecular basado en un solo gen ha podido equipararse con otras técnicas como el MLST para la genotipificación de *S. aureus* (Nubel *et al.*, 2011)

En los últimos años se ha comenzado a generar trabajos sobre el efecto que tiene la región Xr en las células del hospedero y se ha observado que esta región es capaz de activar la vía del interferón tipo 1 (Martin *et al.*, 2009). En este trabajo cabe destacar la utilización de aislamientos caracterizados por *spa*-tipos y que corresponden a una patología en específico con la cual el estudio es sustentado. Sin embargo, la activación del interferón tipo 1 en *spa*-tipos que se asocian a otro tipo de patología queda aún por analizarse.

6. Caracterización molecular de *S. aureus* mediante los *spa*-tipos

Esta técnica se basa en el análisis del polimorfismo de la región Xr del gen *spa* (Harmsen *et al.*, 2003). Estas secuencias reciben una nomenclatura de acuerdo con su orden secuencial (como lo indicado en la Figura 1.2) y posteriormente a esta sucesión de repetidos se asigna su *spa*-tipo (Shopsin *et al.*, 1999, Harmsen *et al.*, 2003).

Para la clasificación de las SSR's a cada repetido individual se le asigna un nombre y al conjunto de repetidos se le asigna un tipo (en conjunto *spa*-tipos ver figura 1.2). De esta forma se logra un conjunto de datos, que son analizados utilizando el software RidomStaphType (<http://www.ridom.de/spaserver/>). La base de datos mundial en la

actualidad cuenta con de 313 repetidos reportados y más de 100,000 *spa*-tipos encontrados. Además de los oligonucleótidos sugeridos en la literatura (Harmsen *et al.*, 2003) RidomStaphType recomienda la utilización de un protocolo de amplificación y secuenciación ya que las secuencias reportadas deben encontrarse indispensablemente entre las dos secuencias firma antes mencionadas. Debido a estas condiciones existen secuencias de aislamientos que no son aceptados en RidomStaphType por la carencia de las secuencias firma. Sin embargo, esto no impide que aislamientos con carencia de las secuencias firmas pueden caracterizarse, lo cual se lleva a cabo amplificando y secuenciando regiones con mayor amplitud en la secuencia blanco de *spa* (Baum *et al.*, 2009). En resumen, el análisis de secuencia de Xr es sencillo ya que se basa en la secuenciación de un solo *loci* lo que en un principio es fácil comparado con otras técnicas (Cookson *et al.*, 2007, Schouls *et al.*, 2009).

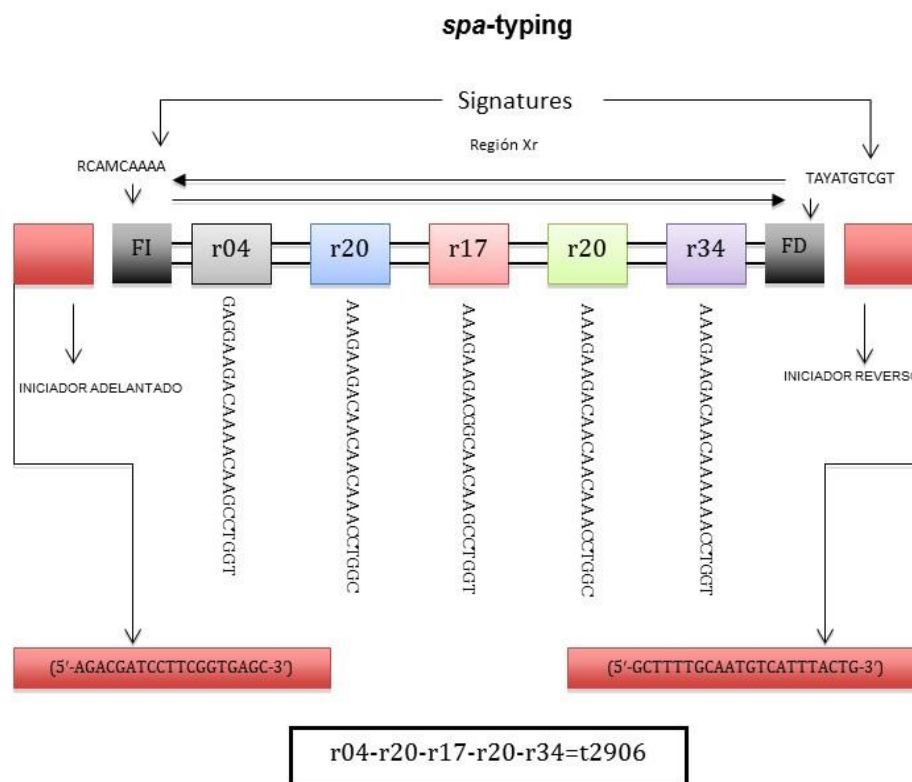


Figura 1.2. Esquema que muestra la estructura de un *spa*-tipo. Se cuenta con la indicación de las firmas (FI, FD) las cuales flanquean a la región y en la parte central se encuentran los repetidos marcados con una r y un número. Fuera de la región Xr se encuentra un par de oligonucleótidos, un adelantado y un reverso utilizados para amplificar la región correspondiente (Carmona-Gasca *et al.*, 2012).

7. Funciones de SpA.

La proteína A de *S. aureus* juega un papel importante en la patogénesis, debido a su interacción específica con la porción constante de las Inmunoglobulinas (Fc) de diversos mamíferos (Moks *et al.*, 1986). Cada dominio (EDABC) del gen *spa* puede unirse con gran afinidad a la región Fc de la IgG. Esta interacción con la Fc de la IgG permite eludir la fagocitosis (Foster and Hook, 1998) debido a que la bacteria se une a la IgG por el receptor Fc y no puede ser reconocido por los neutrófilos (Gómez *et al.*, 2006). Además, el complejo formado por la SpA con IgG no puede estimular la fijación del complemento por la ruta clásica evadiendo así al sistema inmune (Gómez *et al.*, 2006).

En un estudio publicado por Jansson *et al.*, 1998 se demuestra que la interacción de SpA con las IgG's se encuentra presente en cada uno de los dominios, aunque existen diferencias significativas por la afinidad que presentan de forma individual dando como evidencia que cada uno de los dominios son repeticiones con algún grado de divergencia. Estas variaciones podrían explicar de igual forma las diferencias encontradas en la interacción de los dominios de SpA con TNFR1.

Además de estas funciones Martin *et al.*, 2009 generaron construcciones a partir de la región Xr, utilizando cepas de tipo pandémico en EUA (USA 300 y Newman) y un par de aislamientos clínicos. Con ellas lograron determinar la activación de la señalización intracelular correspondiente la vía del Interferón (IFN). Estas construcciones tienen en común sólo un repetido (r07) el cual contiene una secuencia de aminoácidos que se encuentra conservada en la mayoría de los repetidos reportados hasta el momento.

8. Componentes de la respuesta inflamatoria donde interviene SpA.

La inflamación es una respuesta inespecífica que da frente a las agresiones generadas por agentes extraños al organismo, como es el caso de agentes tóxicos, virus, bacterias, hongos y algunos otros agentes que no son considerados patógenos entre ellos podemos encontrar

vidrío, polen, telas, etc., la respuesta inflamatoria en este caso depende de la sensibilidad que presenta el organismo a estos agentes (Rock *et al.*, 2010). La inflamación o respuesta inflamatoria tiene varios mediadores, como es el caso de las citocinas interleucina 1 (IL-1), interferón β y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que tienen acción en todo el organismo, estas son producidas por monocitos, macrófagos y algunos linfocitos T (Mateos Poumián, 2004).

La presencia de estas citocinas promueve la inflamación, por lo que también se les denomina “citocinas pro-inflamatorias” y como consecuencia son capaces de estimular distintas respuestas celulares que a continuación se enumeran.

- La activación de TNFR1 tiene como consecuencia la expresión de TNF- α , el cuál puede activar la ruta de las caspasas generando apoptosis en las células adyacentes y estimulando la producción de interleucinas (Mateos Poumián, 2004).
- La expresión de IL-1 promueve la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos, la expresión de ciertos proto-oncogenes, la producción de otras interleucinas, promueven la liberación de histamina por mastocitos, además de ser un pirógeno (Fenton, 1992).
- El interferón tiene acción directa sobre células cancerígenas disminuyendo su proliferación además su expresión también es inducida por compuestos bacterianos tóxicos, además la cascada de señalización del interferón tipo 1 es uno de los mayores efectores inmunológicos y es esencial para la respuesta a infecciones virales y la coordinación de la respuesta inmune innata y adaptativa (Jonasch and Haluska, 2001, Martin *et al.*, 2009, Ho and Ivashkiv, 2006)

Anteriormente se ha demostrado la participación de SpA en la inducción de estas citocinas, por ejemplo la interacción de SpA con el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1) en células endoteliales de pulmón, provocando la expresión de TNF- α y siendo un factor crítico en la patogenia de *S. aureus*, el cual depende de los dominios de unión a IgG de SpA (Gómez *et al.*, 2006, Gómez *et al.*, 2004).

También se ha demostrado que cuando SpA es endocitada en células endoteliales de pulmón es capaz de activar la producción de IF tipo 1, la activación de la vía de señalización JAK-STAT y la producción de IL-6, aunque aún no es claro el beneficio obtenido por *S. aureus* al provocar que estas citosinas se encuentren presentes se ha observado que son indispensables para que *S. aureus* prolifere y genere patogenicidad en el huésped (Martin *et al.*, 2009).

IV. Justificación.

La proteína A de *S. aureus* participa en la patogenicidad de esta bacteria, contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune. A cada una de las funciones anteriores se asocia una región específica de la proteína. Existen evidencias de que dichas regiones presentan polimorfismos en sus secuencias. Además, la región Xr del gen *spa* se ha utilizado como marcador para la caracterización de aislamientos de cepas de *S. aureus* de origen clínico debido a que presenta SSR's. Por lo anterior, es importante caracterizar los polimorfismos presentes en cada una de las regiones funcionales del gen *spa* en aislamientos clínicos de diferente origen y evaluar la asociación de estos polimorfismos con la especificidad de hospedero o de patogenicidad. Al caracterizar *spa* se puede vislumbrar en qué grado puede participar SpA como factor de virulencia en las clonas encontradas en distintos ambientes. Así mismo, estudios de la variación genética de la secuencia del gen *spa* revelarán datos para que se puedan generar anticuerpos específicos contra las clonas de *S. aureus*.

V. Hipótesis.

Los polimorfismos de nucleótido único (SNP's) presentes en la región de unión al Fc de las IgG's, en la región de activación de TNFR1 y los polimorfismos de secuencias cortas repetidas (SSRs) en la región X del gen *spa* que codifica para la proteína A (SpA) de *Staphylococcus aureus*, están correlacionados con el tipo de hospedero y la patología.

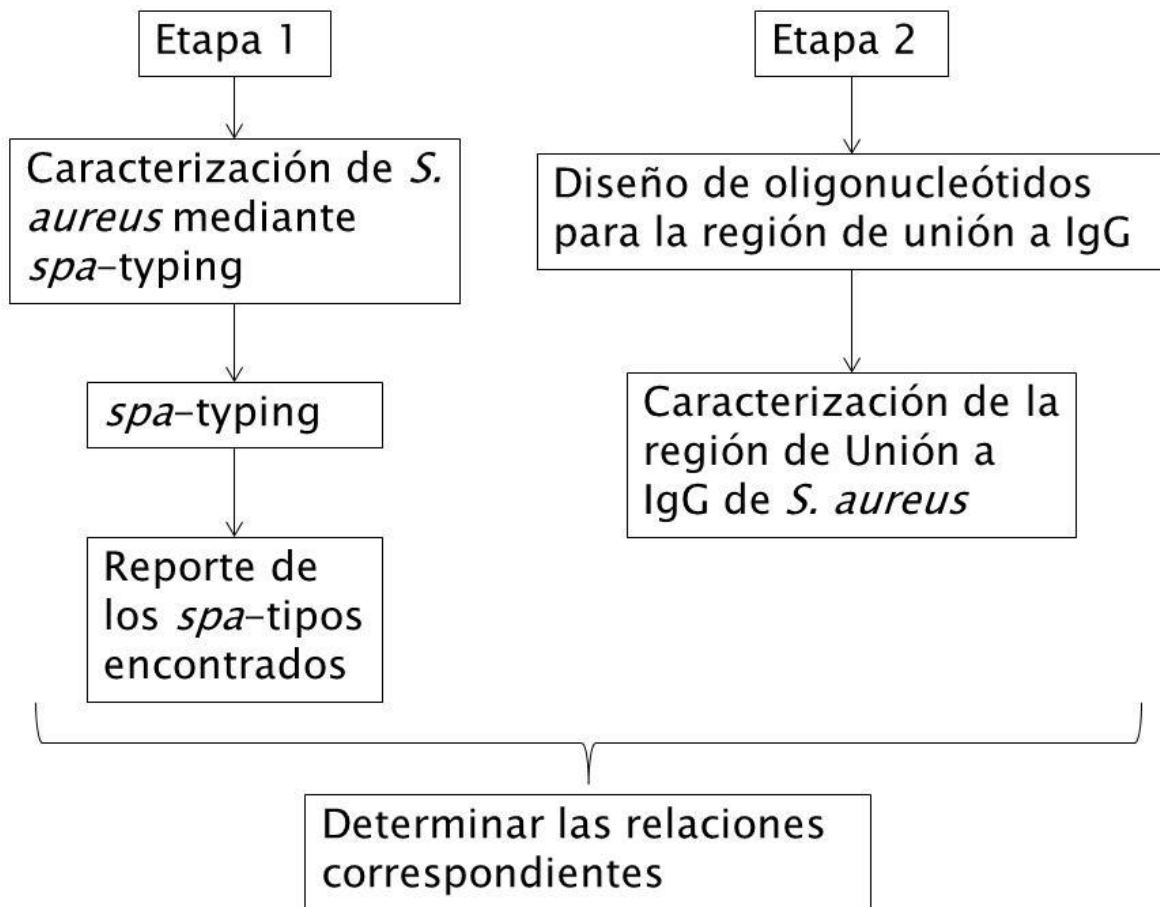
VI. Objetivos.

- **Objetivo general.**

Identificar los polimorfismos de nucleótido único (SNP's) y de secuencias cortas repetidas (SSR's) en el gen *spa* que codifica para la proteína A que se puedan asociar a la especificidad de hospedero o de patología.

- **Objetivos específicos.**

- Caracterizar los SNP's de las regiones de unión a Fc y de activación a TNFR1 en aislamientos de *S. aureus* de origen bovino y humano.
- Caracterizar los SSR's de la región Xr de la proteína A en aislamientos de *S. aureus* de origen bovino y humano.
- Establecer correlaciones entre el polimorfismo de cada región y la patología o la especificidad de hospedero.

VII. Estrategia experimental.

VIII. Resultados.

Capítulo 1. Caracterización molecular de aislados de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis bovina mediante *spa*-typing en el municipio de Tarímbaro, Michoacán.

RESUMEN.

Staphylococcus aureus es el patógeno que se observa con mayor prevalencia en la mastitis bovina de acuerdo con el tipo de explotación y también es un patógeno importante en humanos. Es agente causal de diversas enfermedades de tipo infeccioso, por lo que representa un riesgo para la salud pública. Debido a esto los estudios de tipo epidemiológico de este patógeno en los últimos años han cobrado relevancia en los últimos años. Una de las formas de caracterización molecular de *S. aureus* es el *spa*-typing, que se basa en la secuenciación de la región Xr del gen de la proteína A de *S. aureus*. En el presente trabajo se analizaron las regiones Xr de diversos y se detectaron mutaciones en las secuencias firma que impiden el reporte oficial de los *spa*-tipos asociados. También se identificaron nuevas secuencias de repetidos, diferentes a las reportadas en la base de datos de RidomSpaServer. Por lo anterior, se proponen modificaciones a las secuencias firma que permitan registrar apropiadamente los *spa*-tipos de aislados de *S. aureus* de origen bovino.

Palabras clave: Epidemiología, Proteína A, Región Xr, Ridomspa server, trazabilidad, Mastitis.

Introducción.

La mastitis bovina se define como una infección aguda, sobreaguda o crónica de la ubre, causada por la invasión bacteriana de los conductos lácteos ascendentes a partir del pezón (Turkyilmaz *et al.*, 2010). Esta enfermedad tiene un impacto tanto en la calidad y la cantidad de leche producida, como en la producción, y el bienestar animal. Probablemente la mastitis es la más costosa de las enfermedades infecciosas endémicas que afecta a las vacas y otras especies lecheras (Berry y Hillerton, en 2002).

La mastitis conduce a una disminución en la producción del 4 al 30% de leche y a una baja en su calidad, además, incrementa los costos del cuidado de la salud del hato y predispone

al desecho prematuro de los animales infectados (Bedolla, 2008). La patología más importante es la forma subclínica ya que no muestra evidencia de inflamación pero revela cambios en la composición de la leche (como el conteo de células somáticas, que son parte de la respuesta inflamatoria y un indicador del estado de salud de la glándula mamaria). Por su parte la forma clínica se caracteriza por una inflamación notoria de la ubre que puede ir acompañada de improductividad de la glándula (Hillerton y Berry, en 2005).

Hemolisinas, catalasa, lipasa, peptidoglicano, adhesinas como FnB y proteína A (SpA) son proteínas que participan en la virulencia de *S. aureus* y sirven también para evadir la respuesta inmune del huésped (Bustos Martínez J. A., 2006).

El gen que codifica para SpA se encuentra en la cadena negativa del genoma de *S. aureus*. Para su estudio se divide en dos regiones, la llamada región de unión a IgG y una región variable denominada “X” (Shopsin *et al.*, 1999, Gómez *et al.*, 2006). La región de unión a IgG consiste en cinco dominios precedidos por un péptido señal (S, E, D, A, B y C) y la región X se subdivide en “Xc” la cual se considera constante y una región “Xr” donde se localiza el mayor número de polimorfismos (Moks *et al.*, 1986).

Estos dominios son llamados región de unión a IgG debido a que SpA es capaz de interactuar con una porción de las Inmunoglobulinas (Ig) especialmente con la IgG (Inmunoglobulina “G”), aunque se ha demostrado que todos los dominios de esta región pueden interactuar con IgG (Jansson *et al.*, 1998).

La proteína A de *S. aureus* juega un papel importante como factor de virulencia, debido a su interacción específica con la porción Fc de las Inmunoglobulinas de diversos mamíferos ya que le confiere SpA confiere la capacidad a *S. aureus* de eludir a los neutrófilos (Foster y Hook, 1998; Gómez *et al.*, 2006).

En la región X se encuentran una serie de secuencias cortas repetidas denominadas SSR’s (por sus siglas en inglés) que tienen mucha similitud en su secuencia y tienen un tamaño aproximado de 24 a 30pb y se encuentran cercanas a la región carboxilo terminal de SpA (Shopsin *et al.*, 1999).

Los estudios referentes a la región Xr mostraron que este *locus* presenta variaciones que correspondían a aislamientos cuyo origen era similar o se encontraban asociados como es el caso de los *Staphylococcus aureus* Resistentes a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés) (Shopsin y Kreiswirth, en 2001). Derivado de los hayasgos encontrados por la genotipificación de *S. aureus* por la región Xr y gracias a su poder discriminatorio (Harmsen *et al.*, 2005) se generó una base de datos internacional (<http://www.ridom.de/spaserver/>) en la cual es posible encontrar y registrar todos los *spa*-tipos (secuencias de la región Xr) estudiados a nivel mundial, así como información sobre cada aislamiento (como es el caso del MLST, SCC*mec*-type, PFGE, origen del aislamiento, lugar del aislamiento, patología con la que se encuentra asociado, etc.). Para esto es asignada una nomenclatura y además se enumeran las condiciones necesarias para su aceptación como lo son: 1) la presencia de dos secuencias firma (“RCAMCAAAA” en 5’ y “TAYATGTCGT” en 3’ en ambos sentidos de la secuencia de nucleótidos delimitando los SSR’s (Shorh Sequence Repet’s); 2) inmediata a la primera firma se debe encontrar la primer secuencia de repetidos y antes de la segunda firma se acepta encontrar hasta 19 nucleótidos antes de esta firma (Harmsen *et al.*, 2003).

Los *spa*-tipos son generalmente usados en el ámbito nosocomial como un marcador molecular para *S. aureus* ya que se trata de una técnica sencilla que puede dar trazabilidad a los aislamientos. Al clasificar aislamientos de origen bovino (en concreto provenientes de mastitis bovina) podremos obtener información valiosa respecto al fondo genético de *S. aureus* ya que se podrán comparar con los aislamientos circulantes en todo el mundo.

En este trabajo, se utilizó la técnica de *spa*-typing para la caracterización molecular de *S. aureus* asociado a la mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro Michoacán en las comunidades de Cotzio y Téjaro. Este municipio en particular destaca en su producción lechera ya que forma parte importante en el abasto de productos lácteos dirigidos a la capital del estado. Además en este municipio predomina un sistema de producción de tipo familiar denominado “de traspatio” (Méndez *et al.*, 2000; Olivera-Mora M, 2008) dando un nicho peculiar para *S. aureus*.

Materiales y métodos.

Se utilizaron aislados de *Staphylococcus aureus* obtenidos a través de un muestro aleatorio de distribución proporcional, realizado en el Municipio de Tarímbaro Michoacán en las localidades de Cotzio y Téjaro con un total de 13 unidades de producción, 96 vacas muestreadas y un total de 25 aislamientos caracterizados como *S. aureus* (Granados-Beltrán, 2010) y 12 aislamientos obtenidos en la misma región en un estudio anterior (datos no publicados). Estos aislamientos forman parte de un estudio de orientación observacional transversal que se realiza en el Estado de Michoacán.

Una vez caracterizados los aislados fueron cultivados en 3 ml de caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) durante toda la noche en agitación a 37 °C. Posteriormente se depositaron 850 µl del cultivo en un criovial previamente esterilizado conteniendo 150 µl de glicerol (de Sigma TM), se agitaron y se almacenaron para su preservación a -80 °C. De manera paralela, se mantuvo un cultivo en fresco en placas de agar Sal y Manitol y un cultivo inclinado y por picadura en BHI.

Extracción de ADN.

Se dispuso un cultivo de 2 a 3 ml en caldo BHI y fue incubado a 37°C en agitación durante toda la noche. A continuación, se agregaron 500 µl de cultivo a un tubo de 600 µl y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. La pastilla se incubó en 400 µl de solución de lisis la cual contiene buffer TE (10 mM Tris-HCl con 1 mM EDTA pH 8), 8 µl de Lisozima (1 µg) por ml y 16 µl de Lisostafina (1 µg por ml por cada muestra), a continuación se incubó a 37 °C durante 30 minutos; posteriormente se añadieron 40 µl de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS Sigma TM), incubando a 55°C por 30 minutos. Transcurrido el tiempo se añadieron 20 µl de Proteínasa K, incubando a 55°C por 30 minutos. Después se incubó a 95°C durante 10 minutos. El ADN fue precipitado agregando NaCl a una concentración final de 0.3 mM y 0.6 volúmenes de Isopropanol manteniendo los tubos a -20 °C por 15 a 30 minutos. Posteriormente se centrifugó de nuevo a 10,000 rpm y el pellet se resuspendió en etanol al 70% manteniéndolos de nuevo a -20 °C durante 15 a 30 minutos. A continuación los tubos fueron secados a temperatura ambiente. Finalmente el ADN fue resuspendido en 100µl de Buffer TE.

Amplificación de la región Xr (*spa*-typing).

Para la caracterización de los aislamientos con base en la secuencia de la región X del gen *spa*, se obtuvieron productos de amplificación con los oligonucleótidos spa-1095F (5' AGA CGA TCC TTC GGT GAG C 3') y spa-1517R (5' GCT TTT GCA ATG TCA TTT ACT G 3') (Gilot *et al.*, 2002). Para la amplificación de los fragmentos por PCR se prosiguió con el protocolo descrito con anterioridad (Harmsen *et al* 2003), utilizando de 30-80ng de ADN molde, 2.5 mM de dNTP's, 0.2 µM de cada oligonucleótido y 1.2 u de DreamTaq™ (Fermentas) en un volumen final de 50 µl.

Secuenciación y análisis de secuencias.

La secuenciación se realizó por el método de Sanger *et al.*, 1977 utilizando los análogos de dideoxinucleótidos del kit Big Dye Terminator CycleSequencing Ready Reaction V 3.1 (Applied Biosystems), en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV-IPN. Las secuencias de la región Xr del gen *spa* se analizaron utilizando el software en línea (www.segtools.com) o utilizando el software NiSspa, una rutina informática diseñada en el laboratorio (Carmona-Gasca *et al.*, 2012).

Resultados.

En la colección perteneciente a aislados de bovino se encontraron los *spa*-tipos mostrados en la Tabla 2.1, donde se muestran las secuencias claramente asignables a un *spa*-tipo previamente reportado en las bases de datos de RidomStaphType. En contraste también se muestran *spa*-tipos que no cuentan con las firmas necesarias para su reporte. Sin embargo, con análisis de las secuencias se pudieron identificar variaciones en la secuencia correspondiente con la firma y así determinar la sucesión de repetidos para cada aislamiento.

Tabla 2.1 Relación de *spa*-tipos encontrados en bovinos.

Aislamiento	Firma 5'	Secuencia de repetidos	Firma 3'	<i>spa</i> -tipo	Origen	ST
ATCC 27543	GCACCAAAA	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25	TACATGTCGT	t008	MC, R	8
NCTC 8325	GCACCAAAA	11-19-12-12-21-17-34-24-34- 22-25	TACATGTCGT	t211	R	8
MRI-3	GCACCAAAA	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25	TACATGTCGT	t008	MSC	8
MRI-12	GCACCAAAA	07-23-12-21-17-34-33-34	TACATGTCGT	t224	MSC	352
MRI-21	GCACCAAAA	07-23-12-21-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t267	MSC	97
MRI-22	GCACCAAAA	07-23-12-21-17-34-33-34	TACATGTCGT	t224	MSC	97
MRI-23	GCACCAAAA	07-23-12-21-17-34-33-34	TACATGTCGT	t224	MSC	97
MRI-29	GCACCAAAA	26-30-17-34-17-17-16-12-17-16	TACATGTCGT	t265	MSC	97
MRI-32	GCACCAAAA	07-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t1965	MSC	97
MRI-33	GCACCAAAA	07-23-12-21-17-34-33-34	TACATGTCGT	t224	MSC	97
MRI-34	GCACCAAAA	07-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t1965	MSC	97
MRI-35	GCACCAAAA	07-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t1965	MSC	97
MRI-36	GCACCAAAA	07-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t1965	MSC	97
MRI-37	GCACCAAAA	07-23-12-21-34		t4570	MSC	97
MRI-147	GCACCAAAAC	07-23	TACATGTCGT	t605	MSC	126
MRI-148	GCACCAAAA	07	TACATGTCGT	t693	MSC	9**
MRI-149	GCACCAAAA	07-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t1965	MSC	97
MRI-150	GCACCAAAA	07-23-12-21-34	TACATGTCGT	t4570	MSC	97
MRI-151	GCACCAAAA	07-23-12-21-34	TACATGTCGT	t4570	MSC	97
MRI-152	GCACCAAAA	07-23	TACATGTCGT	t605	MSC	479
MRI-154	GCACCAAAA	07-23	TACATGTCGT	t605	MSC	479
MRI-155	GCACCAAAA	07-23-12-21-17-34	TACATGTCGT	t189	H	188
MRI-157	GCACCAAAA	07-23	TACATGTCGT	t605	MSC	126
MRI-158	GCACCAAAA	07-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t1965	MSC	1*
MRI-159	GCACCAAAA	07-23-12-21-34	TACATGTCGT	t4570	MSC	8
MRI-160	GCACCAAAA	07-23	TACATGTCGT	t605	MSC	126
MRI-161	GCACCAAAA	07-23-12-21-34	TACATGTCGT	t4570	MSC	352
MRI-162	GCACCAAAA	07-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t1965	H	97
MRI-163	GCACCAAAA	07-23	TACATGTCGT	t605	MSC	126
MRI-164	GCACCAAAA	07-23-12-21-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t267	MSC	97

MRI-165	GCACCAAAA	07-23	TACATGTCGT	t605	MSC	97
MRI-166	GCACCAAAA	07-23-12-21-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t267	MSC	352
MRI-167	GCACCAAAA	07-23-12-21-34	TACATGTCGT	t4570	MSC	352
MRI-170	GCACCAAAA	07-23-12-21-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t267	MSC	352
MRI-171	GCACCAAAAT	07-23-12-21-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t267	MSC	352
MRI-172	GCACCAAAA	07-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t1965	F	97
MRI-173	GCACCAAAA	07-23-12-21-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t267	MSC	352
MIR-176	GCACCAAAA	07-17-34-34-34-33-34	TACATGTCGT	t1965	MSC	97
MRI-180	GCACCAAAA	07-23-12-21-17-34-33-34	TACATGTCGT	t224	MSC	97

En la tabla se muestran los diversos *spa*-tipos encontrados en el estudio. La X indica un repetido que no se encuentra reportado en la base de datos. Los aislamientos MRI-147 y MRI-171 muestran una firma en 5' con un SNP. NA, no asignado. MC (mastitis clínica); R (cepa de referencia); MSC (Mastitis subclínica); F (fómite); (**) ST no asignados (*) ST nuevos no reportados en bases de datos (Ángel, 2012). Los *spa*-tipos fueron designados utilizando el software NiSspa.

De las secuencias analizadas sólo al 84% se les pudo asignar un *spa*-tipo. En particular, en los aislamientos MRI-147 y MRI-171 se encontró un SNP (Polimorfismo de nucleótido único mostrado en la imagen 2.1) en la firma 5' por lo que su caracterización formal no es posible por *spa*-typing según los criterios establecidos (Harmsen *et al.*, 2003). Los *spa*-tipos con mayor frecuencia es el estudio t1965 (19%) y t4570 (14%). La frecuencia relativa de los *spa*-tipos se encuentra representada en la Figura 2.1.

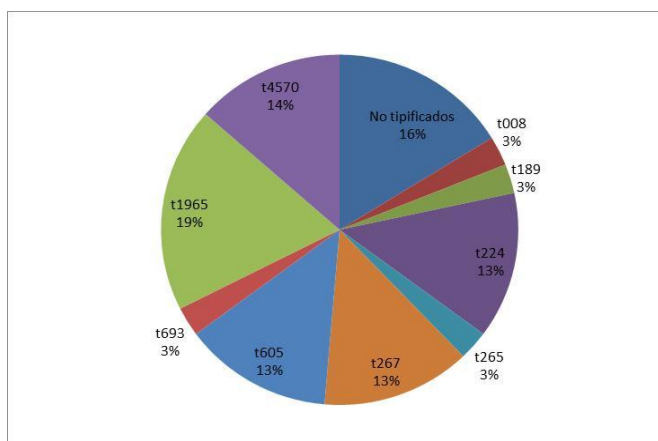


Figura 2.1. Frecuencia relativa de los *spa*-tipos en el estudio. En el gráfico se localizan los *spa*-tipos y su frecuencia.

En la Figura 2e.2, se muestra un alineamiento representativo de las secuencias firma de los aislamientos que cuentan con todas las condiciones necesarias para su reporte, conjuntamente con los aislamientos MRI-147 y MRI-171 que cuentan con dos sustituciones en los nucleótidos en la firma 5' (RCAMCAAAA) en la que se encuentran dos degeneraciones R (A o G) y M (A o C). Sin embargo se puede observar que la firma en 5' que otorgaría el *spa*-tipo a los aislamientos MRI-147 y MRI-171 es RCAMCAAH (H = A, C ó T) ya que presentan una mutación en el último nucleótido de la firma.

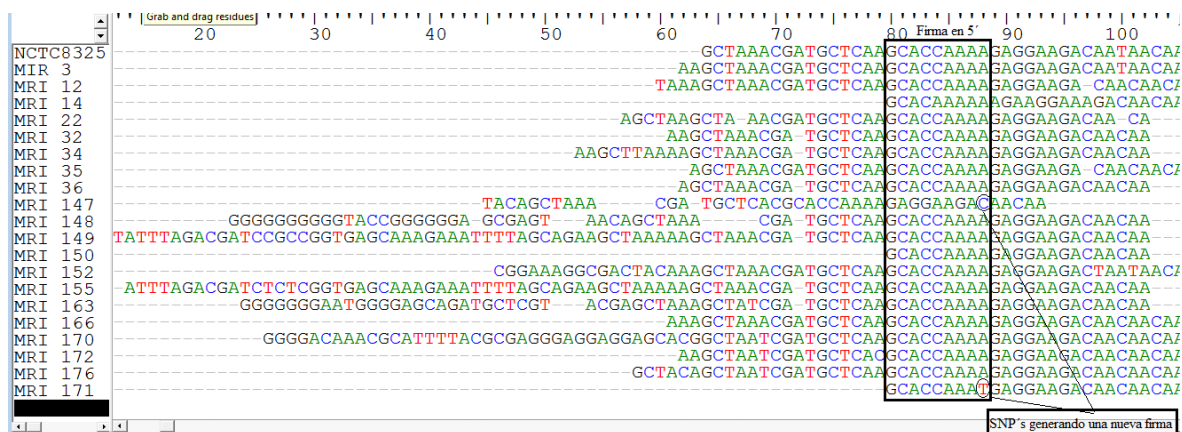


Figura 2.2 Alineamiento de secuencias firma en el extremo 5' de la región Xr de *spa*. En la figura se encuentran enmarcadas las secuencias firma en 5' de diversos alineamientos generados en el estudio. Se indica SNP's que formarían una nueva degeneración en la firma (RCAMCAAH) que incluiría los aislamientos MRI-147 y MRI-171 en la base de datos de Ridom. Alineamiento generado con el software ChromasLite 2.0.

Discusión.

La identificación de diversos *spa*-tipos que afecta a una población bovina localizada en las comunidades de Cotzio y Téjaro pertenecientes al municipio de Tarímbaro Michoacán nos indica la diversidad de *S. aureus* ya que como se muestra en la Figura 2.1 existen varios *spa*-tipos con la misma frecuencia conviviendo en el mismo lugar lo cual nos demuestra que no se comporta en forma clonal, es decir, diversos *spa*-tipos se encuentran agrupados en una población delimitada.

Cabe resaltar la presencia del aislamiento MRI-3 en una población bovina, ya que cuenta con el *spa*-tipo t008, el cual, de acuerdo a la información disponible en RidomStaphytype

corresponde a aislamientos que afectan a seres humanos y no a bovinos. La secuencia-tipo, determinada por MLST, corresponde con un ST-8, genotipo asociado a infecciones de comunidad, principalmente en escuelas o cárceles, pero que también ha causado infecciones nosocomiales. Este caso no es una peculiaridad ya que en el estudio se contó con la cepa ATCC27543 la cual también cuenta con un *spa*-tipo t008, ST-8 y también es un aislado de bovinos. Este hallazgo indica que existe la posibilidad de contagios cruzados entre humanos y bovinos ya que de acuerdo al genotipo de los aislamientos t008 son típicos en aislamientos clínicos de humanos.

En el estudio también contamos con otra cepa de referencia NCTC 8325 la cual es un aislado de osteomielitis, esta cuenta con *spa*-tipo t211 y se encuentra relacionada con las t008 ya que ambos *spa*-tipos comparten el mismo ST-8 por lo que pertenecen a un mismo complejo clonal. En el resto de los aislamientos se encontró un *spa*-tipo que corresponde a aislamientos relacionados con bovinos lo que corresponde a lo esperado.

Debido a que no fue posible definir el *spa*-tipo de algunas cepas aisladas de bovinos, por la falta de secuencias consenso para enmarcar los repetidos, es posible que como consecuencia de este trabajo surja una nueva propuesta sobre las firmas encontradas en los aislamientos de bovinos. De acuerdo a lo mencionado con anterioridad por Baum *et al* 2009 las eliminaciones sobre el dominio C (lugar donde se ubica el primer Forward y antecede a la firma en 3') son comunes en los aislamientos que no pueden ser caracterizados por *spa*-typing por lo que un análisis, como el presentado podría establecer nuevos criterios de información para la designación de nuevas firmas o los propios INDEL's (Inserciones o Eliminaciones (Insertions-Deletions) que pudieran generar variación a el criterio de clasificación.

A pesar de las dificultades con el reporte de los aislamientos, los *spa*-tipos resultan una poderosa herramienta para la caracterización de *S. aureus*, que tal vez es debido a que se trata de un factor de virulencia que se encuentra involucrado en la invasión del huésped. Esto se fortalece por los datos analizados en el Capítulo 2, que permiten establecer en análisis de mínima dispersión, asociaciones con la patología. A pesar de que los SNP's presentes en las firmas, no representan mutaciones en la secuencia de aminoácidos, su

diversidad nucleotídica implica marcadores moleculares cuyo poder discriminatorio puede compararse con MLST, ya que se trata de un factor de virulencia que interviene en la invasión primaria de los tejidos del huésped, por lo tanto, su impronta evolutiva se encuentra ligada a la evolución de la propia respuesta inmune del huésped, provocando que su secuencia (*spa*-typing) cobre relevancia en la caracterización de *S. aureus*.

En la actualidad, un diagnóstico rápido es necesario para poder establecer las medidas necesarias para evitar la propagación de una enfermedad y dado que *spa*-typing se plantea como un marcador único que corresponde con MLST y PFGE resulta muy atractivo para planteamientos de contingencia sobre todo en el ámbito nosocomial y en la comunidad donde este patógeno ha logrado alarmar a las dependencias de salud alrededor del mundo.

De la misma forma el monitoreo del comportamiento de *S. aureus* en nichos como el caso de mastitis bovina, revela información que generalmente pasa desapercibida en México por lo que la aportación del presente trabajo enriquece el conocimiento en nuestra área de trabajo.

Bibliografía

BEDOLLA, C. 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *REDVET*, IX. 1-26.

BERRY, E. A. & HILLERTON, J. E. 2002. The effect of an intramammary teat seal on new intramammary infections. *J Dairy Sci*, 85, 2512-20.

BUSTOS MARTÍNEZ J. A., Hamdan-Partida A, Homogenizar primero apellidos y luego inicial de nombre MARCIA GUTIÉRREZ-CÁRDENAS. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed*, 17, 287-305.

CARMONA-GASCA, C., A., TALAVERA-MORALES, L., E., GARCÍA-RODRÍGUEZ, F., R., OROZCO-ORTIZ, A., P. & VALDEZ-ALARCÓN, J., J. 2012. NiSspa:

software de código abierto para la caracterización de aislados de *Staphylococcus aureus* por *spa*-typing para epidemiología molecular. *Biológicas*, 14, 30-36.

FOSTER, T. J. & HOOK, M. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 6, 484-8.

GILOT, P., LINA, G., COCHARD, T. & POUTREL, B. 2002. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components *Agr* and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J Clin Microbiol*, 40, 4060-7.

GÓMEZ, M. I., O'SEAGHDHA, M., MAGARGEE, M., FOSTER, T. J. & PRINCE, A. S. 2006. *Staphylococcus aureus* Protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *J Biol Chem*, 281, 20190-6.

GRANADOS- BELTRÁN, E. 2010. *Caracterización de Aislamientos de Staphylococcus aureus asociados a la mastitis bovina en las localidades de Cotzío y Téjaro, mediante secuenciación d gen de ARN ribosomal 16S*. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hildalgo. Morelia Michoacán, México.

HARMSSEN, D., CLAUS, H. & VOGEL, U. 2005. DNA sequence-based tandem repeat analysis of the *clfB* gene is less discriminatory than *spa*-typing for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 294, 525-8.

HARMSSEN, D., CLAUS, H., WITTE, W., ROTHGANGER, J., TURNWALD, D. & VOGEL, U. 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol*, 41, 5442-8.

- HILLERTON, J. & AND BERRY, E. 2005. Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1250-1255.
- JANSSON, B., UHLÉN, M. & AND NYGREN, P. 1998. All individual domains of staphylococcal Protein A show Fab binding. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 20, 69-78.
- MÉNDEZ, D., M., TZINTZUN, R., R. & VAL D, A. 2000. Evaluación productiva, de efecto ambiental y de problemas relevantes en explotaciones lecheras de pequeña escala. *Livestock Research for Rural Development*, 12.1.
- MOKS T, ABRAHMSSEN L, NILSSON B, HELLMAN U, SJÖQUIST. J. &UHLÉN M. 1986. Staphylococcal Protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem* 156, 637-643. Homogeniza como pones las páginas así o 637-43.
- OLIVERA-MORA M, M. 2008. *Encadenamientos productivos y desarrollo de capacidades tecnológicas como instrumentos del desarrollo local. Análisis de explotaciones intensivas de bovinos de leche en San José de la Trinidad y Téjaro, Tarímbaro, Michoacán.* Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias en Gestión Estratégica del Desarrollo, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Morelia Michoacán, México
- SHOPSIN, B., GÓMEZ, M., MONTGOMERY, S. O., SMITH, D. H., WADDINGTON, M., DODGE, D. E., BOST, D. A., RIEHMAN, M., NAIDICH, S. & KREISWIRTH, B. N. 1999. Evaluation of Protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*, 37, 3556-63.
- SHOPSIN, B. & KREISWIRTH, B. N. 2001. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*, 7, 323-6.

TURKYILMAZ, S., TEKBIYIK, S., ORYASIN, E. & BOZDOGAN, B. 2010. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses Public Health*, 57, 197-203.

Capítulo 2. Polimorfismos de productos de amplificación de la región EDABC del gen de la proteína A de *Staphylococcus aureus* en infecciones en humanos y bovinos.

RESUMEN.

La proteína A de *Staphylococcus aureus* es uno de los factores de virulencia de este patógeno y se le considera primordial para las etapas tempranas de infección, ya que tiene la capacidad de unir a las IgG's por la porción Fc eludiendo la fagocitosis y reclutamiento de neutrófilos. También se ha demostrado la interacción de SpA con receptores celulares. Tal es el caso del receptor del factor de necrosis tumoral alfa 1 (TNFR1), la vía del interferón 1 (IF-1) y del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El gen *spa* consta de siete dominios divididos en dos regiones y un péptido señal, la región de unión a IgG compuesta por cinco dominios (E, D, A, B y C) y la región X conformada por dos fracciones una polimórfica (Xr) y una porción constante (Xc). Los polimorfismos presentes en la región de unión a IgG de *spa* se analizaron mediante análisis del polimorfismo en la longitud del producto de amplificación en aislamientos de origen humano y bovino.

Introducción.

S. aureus es un patógeno presente en todo el mundo y posee diferentes factores de virulencia lo cual lo hacen un patógeno exitoso que es capaz de sobrevivir en diversos ambientes (Enright, 2003, Bustos-Martínez *et al.*, 2006). El estudio de la proteína A de *S. aureus* (SpA) es importante ya que es el factor de virulencia del que *S. aureus* se vale para evadir la respuesta inmune en una etapa temprana de infección. El gen *spa* presenta dos regiones polimórficas, las ya mencionadas SSR's de la región X que recientemente se le ha atribuido la capacidad de activar la vía del interferón tipo 1 (IF-I) y la región de unión a IgG, que comprende una serie de dominios homólogos en tándem (regiones E, D, A, B y C). Estas regiones también pueden ser utilizadas para la discriminación entre aislados de *S. aureus* (Moks *et al.*, 1986, Brigido Mde *et al.*, 1991).

SpA destaca debido a su interacción específica con la porción Fc de las Inmunoglobulinas de diversos mamíferos (Moks *et al.*, 1986).. Cada dominio de SpA puede unirse con gran afinidad a la región Fc de IgG. Esta interacción permite eludir la fagocitosis (Foster y Hook, en 1998) debido a que la bacteria se une a la IgG por la región Fc, esto ayuda a que la bacteria no puede ser reconocida por los neutrófilos evitando la opsonización del patógeno. Además, el complejo formado por SpA con IgG no puede estimular la fijación del complemento por la ruta clásica, evadiendo así la respuesta inmune celular (Gómez *et al.*, 2006).

En reportes actuales, se han caracterizado algunas cepas de *S. aureus*, las cuales presentan eliminaciones en el gen *spa*, lo que ocasionó que no fuera posible su caracterización por la técnica de *spa*-typing, debido a que el oligonucleótido en 5' se encuentra en el dominio C, en el cual estas cepas presentan eliminaciones. A pesar de esto, dos de las cepas en dicho estudio se identificaron como incapaces de producir SpA. También se reportaron dos cepas que secretan SpA en el medio, una de estas, presenta un codón de paro (STOP) en la región de repetidos, lo que impide la síntesis de la región Xc que es la responsable del anclaje covalente con el péptidoglicano presente en la pared celular de *S. aureus*; lo cual provoca que SpA sea expulsada al medio sin anclarse a la pared celular de *S. aureus* (Baum *et al.*, 2009).

A pesar de que la región de unión a IgG de SpA se considera constante, es necesario analizar si existen SNP's, que relacionen su capacidad de activar las diferentes respuestas que en la célula hospedera se le han atribuido. Para ello, en este trabajo se abordaron dos estrategias, una de análisis bioinformático (presentado en el capítulo correspondiente a antecedentes) de las secuencias del gen *spa* disponibles en las bases de datos, y otra basada en el análisis de longitud en los fragmentos de amplificación de diferentes zonas de la región de unión a IgG.

Materiales y métodos.

Aislamientos bacterianos.

Se utilizaron los aislamientos provenientes de mastitis bovina que se encuentran descritos en el Capítulo 1 de este documento, además de aislados amablemente donados del Instituto Politécnico Nacional pertenecientes a una colección a cargo del D. C. Ramón I. Arteaga Garibay (25 aislamientos caracterizados como *S. aureus* y 43 por determinar su género).

El sembrado, la preservación y la obtención de ADN genómico se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en el Capítulo 1 de este documento.

Diseño de Oligonucleótidos

Con el fin de hacer un análisis sobre los polimorfismos encontrados en los distintos dominios E, D, A, B y C del gen *spa* y el tipo de información que generarán, se procedió a utilizar el algoritmo de CODEHOPE utilizando un software disponible en línea “primers4clades” (Contreras-Moreira *et al.*, 2009). Este software genera un análisis filogenético utilizando el modelo de máxima verosimilitud y propone el diseño de oligonucleótidos para generar amplicones que darán la máxima información respecto a la diversidad del gen o de su marco de lectura abierto, ya que los amplicones sugeridos regresan información de calidad de acuerdo al nivel de conservación de cada región (Figura 3.1). Los oligonucleótidos obtenidos se modificaron para optimizar la reacción de PCR utilizando la utilidad Primer Select del software de Lasergene, (Burland, 2000) y se presentan en la Tabla 3.1. Esto, aunado al hecho de determinar la afección o procedencia de las cepas analizadas, podría utilizarse además como un indicador de patogenia.

Amplificación de la región de unión a IgG.

Para la amplificación de la región de unión a IgG, se usarán las mismas condiciones de PCR utilizadas para *spa*-typing, pero en este caso se usarán los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 3.2 dando como resultado amplicones de diversos tamaños en cada región. Además, se busca establecer un marcador propio para la región de unión a IgG, por lo que se generó un alineamiento de *spa* de los genomas publicados de *S. aureus* en NCBI.

Tabla 3.1 Oligonucleótidos utilizados en el estudio.

Oligonucleótido	Adelantado	Reverso	Tm (°C)	Región de amplificación*
Spa-1	ACGCTGCACCTAASGCTAATGA	GTAAAGAAGAAGAYGGYACGGARTA	64	S E
Spa-2	ACMGCAATTTGTGACAGTA	CCTWTTRRCAGAAGCTAAAAAGTT	60	E D A
Spa-3	AGCCGTTACGTTGTTCTTC	RAAMATGCCTAACTTAAAYGRWGYR	60	A B C
Spa-4*	AGTGTGAGGCGTTTCAGAAAGTTGT	ACCTCAGCACATTCAAAGCCCCAC	65	S Xc

Se muestran los oligonucleótidos usados en el presente trabajo, del lado derecho se muestra la temperatura de alineamiento (Tm) usados para cada par. *Diseño para amplificar el marco de lectura completo de Spa. *según el esquema mostrado en la figura 3.2 y abarcando los INDEL's y SNP's señalados en esta figura.

Análisis de fragmentos obtenidos.

Los tamaños de los fragmentos amplificados para la designación de alelos fueron determinados utilizando un software (Gelalyzer2010™(Lazar, 2010)), diferenciándolos con un criterio de ± 50 pb. Con esta información se generó una matriz en la cual se utilizan los fragmentos correspondientes para cada aislamiento obtenidos con los tres pares de primers (mostrado en las Tablas 3.2 y 3.3) y se utilizó para alimentar un algoritmo de mínima dispersión (mínimum spanning tree <http://pubmlst.org/perl/mlstanalyse/mlstanalyse.pl?site=pubmlst&page=mst&referer=pubmlst.org>) que ejemplifica la dispersión y agrupamiento de los aislamientos utilizados en este trabajo y correspondientes al estudio de mastitis con estos datos ejemplificando la diversidad que *S. aureus* presenta en este nicho.

Índices de diversidad.

Para el trabajo se calculó el índice de diversidad de Simpson (Simpson, 1949) para cada uno de los perfiles de alelos, utilizando el software PAST (Ryan y Harper, en 2011); utilizando un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS.

Para la generación de oligonucleótidos, y para detectar posibles polimorfismos, se realizó una búsqueda en NCBI de los genes *spa* de los genomas reportados de *S. aureus* para detectar posibles polimorfismos. En la Figura 2.2 se muestra el alineamiento de SpA señalando las regiones del gen donde encontramos INDEL y SNP's. En la Figura 3.2 se muestra una representación de las eliminaciones y SNP's detectados a lo largo de todas las secuencias de aminoácidos de SpA. En cuanto a los dominios de unión a IgG se encontró que en el dominio D se pueden encontrar un mayor número de polimorfismos asociados a eliminaciones y el dominio A, se encuentran la mayor cantidad de SNP's que generan mutaciones. En la región X, el dominio Xr donde se encuentran las secuencias de repetidos, se observan la mayor cantidad de SNP's que representan mutaciones en *spa*, además de ser la región que presenta los SSR's asociados a la determinación del *spa*-tipo.

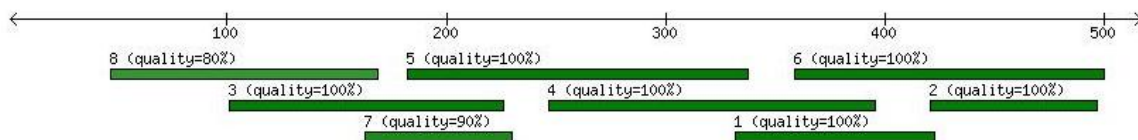


Figura 3.1. Mapa de primers obtenidos por el software primers4clades. Este mapa fue diseñado a partir de un alineamiento generado a partir de la secuencia de aminoácidos de la Proteína A y obtenidos de la base de datos de NCBI, pertenecientes a aquellas cepas de las cuales se tiene la secuencia de aminoácidos y de *spa*. En la parte superior se muestra el posicionamiento de los residuos de aminoácidos y en la parte inferior la localización de los primers, y un tamaño representativo del amplicon. Más bien es el mapa de los amplicones generados ya que no se distinguen los oligonucleótidos

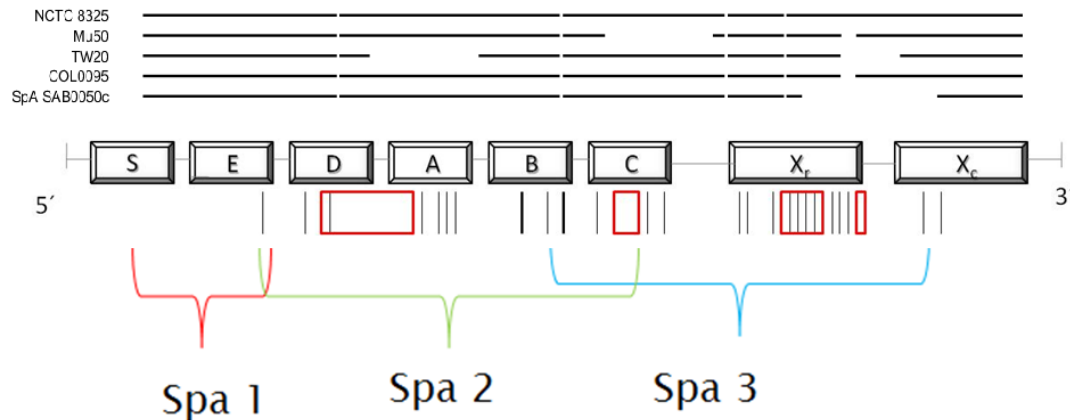


Figura 3.2. Representación del gen de Spa. En la imagen se indican SNP's y eliminaciones representadas por la siguiente nomenclatura: En líneas se encuentran indicados los SNP's (mutaciones no silenciosas). En los recuadros rojos se encuentran señaladas las eliminaciones. En la parte superior de la figura se muestra un alineamiento de secuencias (obtenidas en NCBI) de Spa de algunas cepas (NCTC 8325, Mu50, TW20, COL0095 y SAB0050c), generados a través de software CLC MainWorkbench 6.8.2 y que representan las regiones donde se pueden localizar INDEL'S y en la parte inferior se muestran las regiones contra las que son dirigidos los primers propuestos en el presente trabajo.

A pesar de que primers4clades utiliza algoritmos que prueban termodinámicamente los primers que sugiere, se procedió a utilizar el software DNASTar para ajustar el diseño de los juegos de primers que amplifiquen la misma región que la sugerida por primers4clades, esto debido al uso de codones y además de mejorar la calidad del amplicon, dando como resultado los primers mostrados en la Tabla 3.1.

***spa*-tipos y alotipos de la región de unión a IgG encontrados en aislados de *S. aureus* de la región de Cotzio y Téjaro.**

En la Tabla 3.3 se muestra una relación de *spa*-tipos y cuatro productos de amplificación (que forman parte de secuencias pertenecientes a la región de unión a IgG). En esta tabla se muestran los *spa*-tipos de una colección generada en los años 2004-2008 y pertenecen sólo al estudio de mastitis bovina en las localidades de Cotzio y Téjaro, municipio de Tarímbaro Michoacán. Cabe destacar que en la Tabla 3.3 se incluyen aislamientos encontrados en el personal que labora en las granjas de la región y un aislamiento de un fómite.

La determinación del tamaño de los fragmentos se realizó utilizando el software GELanalyser v.10 para cada uno de los oligonucleótidos dirigidos a la región de unión de IgG de *spa* y utilizando un criterio de asignación de ± 50 pb, para evitar errores de interpretación los valores se presentan en la siguiente Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Asignación de alelos de acuerdo al fragmento de amplificación obtenido a través de cada juego de oligonucleótidos.

SpA 1	Tamaño	SpA 2	Tamaño	SpA 3	Tamaño
2	200 pb.	1	500 pb.	1	200 pb.
1	100 pb.	3	700 pb.	2	280 pb.
3	350 pb.	2	900 pb.	3	400 pb.
4	250 pb.	4	1100 pb.	4	450 pb.

En la tabla se encuentran representados cada asignación de tamaño tomando en consideración ± 50 pb, por las diferencias de migración o de apreciación. En la columna se encuentran los 3 pares de oligos dirigidos a la secuencias de los dominios de unión a IgG seguido de su tamaño. Cada par de oligos genero 4 amplicones de diverso tamaño.

Tabla 3.3. *spa*-tipos y alotipos de la región de unión a IgG encontrados en una colección generada de aislamientos de bovinos.

AISLADO	Alotipos			<i>spa</i> -tipo	Origen
	SpA-1	SpA-2	SpA-3		
ATCC 27543	3	2	1	t008	Mastitis Clínica
NCTC 8325	2	2	1	t211	Osteomielitis
USA 300	2	2	1	t008	Aislamiento Clínico
MRI 3	3	2	2	t008	Leche
MRI 12	2	3	3	t224	Leche
MRI 21	3	3	3	t267	Leche
MRI 22	2	3	3	t224	Leche
MRI 23	1	3	3	t224	Leche
MRI 29	1	3	2	t265	Leche
MRI 32	1	2	1	t1965	Leche
MRI 33	3	1	1	t224	Leche
MRI 34	2	2	1	t1965	Leche

MRI 35	1	2	1	t1965	Leche
MRI 36	1	2	1	t1965	Leche
MRI 37	1	1	2	t4570	Leche
MRI 147	1	2	3	t605	Leche
MRI 148	1	4	2	t693	Leche
MRI 149	3	1	1	t4570	Leche
MRI 150	4	2	3	t4570	Leche
MRI 151	3	1	1	t4570	Leche
MRI 152	2	2	4	t605*	Leche
MRI 154	2	2	4	t605*	Leche
MRI 155	4	2	2	t189	Humano
MRI 156	1	1	3	t605	Leche
MRI 157	2	1	2	t605	Leche
MRI 158	1	3	2	t1965*	Leche
MRI 159	3	2	2	t4570*	Leche
MRI 160	2	3	2	t605	Leche
MRI 161	2	2	1	t4570	Humano
MRI 162	2	3	2	t1965	Leche
MRI 163	3	4	1	t605	Leche
MRI 164	2	2	2	t267	Leche
MRI 165	2	1	1	t605	Leche
MRI 166	1	1	1	t267	Leche
MRI 167	1	1	1	t4570	Fómite
MRI 170	2	2	1	t267	Leche
MRI 171	1	1	1	t267*	Leche
MRI 172	2	3	2	t1965*	Leche
MRI 173	2	2	2	t267	Leche
MRI 174	1	1	2	t1965	Leche
MRI 175	2	2	2	t224*	Leche
MRI 176	3	1	1	t1965	Leche
MRI 180	4	2	2	t224	Leche

Se muestran los aislamientos (MRI) seguidos de los alotipos representados por las regiones SpA-1 (Dominios E y D), SpA-2 (Dominios D, A y B) y SpA-3 (Dominios B y C), además de su *spa*-tipo correspondiente. *Se trata de secuencias que presentan nuevos repetidos por lo que se designaron *spa*-tipos de acuerdo a la similitud más próxima en su secuencia.

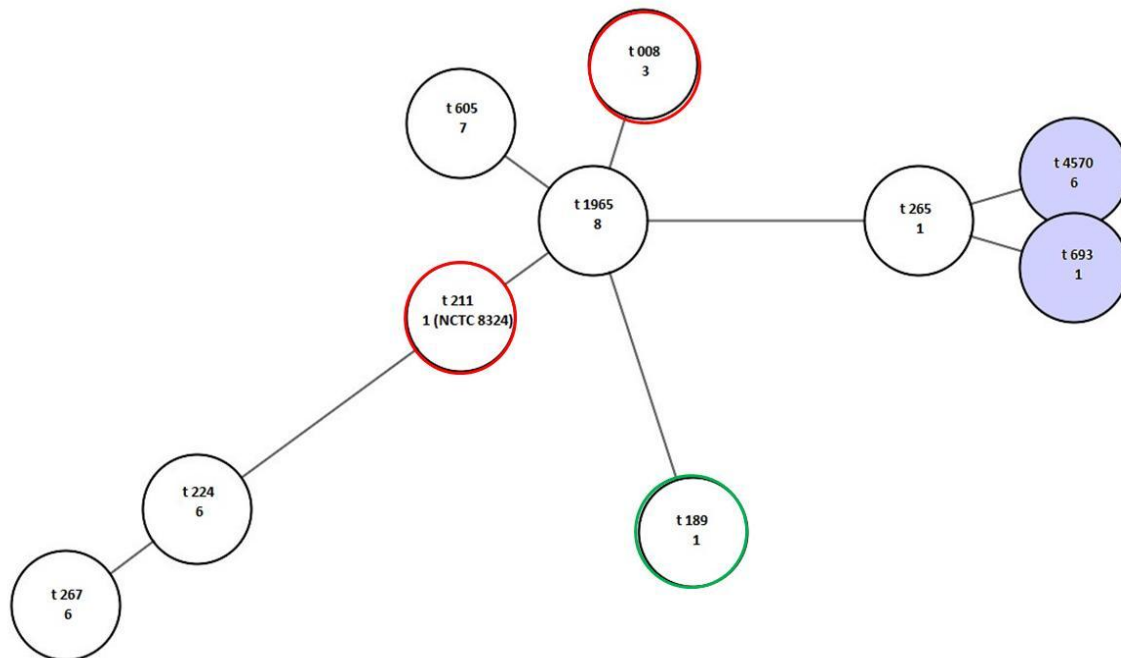


Figura 3.3. Figura generada a través de un algoritmo de mínima dispersión. En esta imagen se encuentra representada la información encontrada en la Tabla 3.3 (excluyendo el origen del aislamiento), en cada círculo se encuentra un *spa*-tipo el cual se encuentra indicado en el interior del círculo y en la parte inferior de éste se encuentra anotado el número de aislamientos. De color rojo se indican aislamientos provenientes de asociados a humanos, en verde el aislamiento de fómite y con el fondo azul se representan los grupos más distantes.

Los datos de la tabla 3.3 se encuentran representados en la Figura 3.3 la cual fue generada a través de un algoritmo de mínima dispersión el cual se basa en la agrupación o dispersión según sea el caso en base a la frecuencia de caracteres compartidos y la prevalencia de cada alotipo. En nuestro caso los aislamientos generaron dispersión ya que no comparten un fondo genético en común. Sin embargo se observa que los *spa*-tipos de humanos y de fómite no generan agrupamiento entre ellos ya que cuenta con un fondo genético compartido con los aislados de bovinos.

Por otro lado, se detectaron distintos *spa*-tipos (t267, t224, t605, t1965 y t4570) que tienen una concordancia con lo reportado en RidomStaphType y que se han relacionado con el ST 97 (Sequence Type 97 del MLST) el cual se ha relacionado con aislamientos de bovinos.

Alotipos de la región de unión a IgG encontrados en la colección de aislamientos clínicos de humanos.

A continuación se muestra una relación de alotipos (Tabla 3.4) encontrados en la colección de aislamientos de humanos, aunque no se cuenta con *spa*-tipo para esta colección se puede observar que se comporta de forma clonal y dispersándose solo por su origen como se observa en la figura 3.4.

Tabla 3.4. Relación de alotipos de la colección de aislamientos clínicos de humanos.

AISLADO	SpA-1	SpA-2	Spa-3	ORIGEN
48VPAY	3	2	4	Hemocultivo
49VPAY	3	2	4	Hemocultivo
63VPAY	2	1	2	Secreción
66VPAY	1	1	2	Secreción
83VPAY	2	1	2	Úlcera
84VPAY	2	1	2	Secreción
86JPAY	2	1	2	Secreción Purulenta
87JPAY	4	2	2	Expectoración
88JPAY	4	2	2	Exudado
89JPAY	1	3	3	Exudado Nasal
90JPAY	1	3	3	Exudado Faríngeo
91JPAY	1	3	3	Exudado Nasal
92RPAY	2	1	2	Secreción de Catéter
93RPAY	2	1	2	Punta de Catéter
94RPAY	2	1	2	Secreción de Catéter
95RPAY	3	2	4	Hemocultivo Periférico
96RPAY	2	1	2	Hemocultivo Catéter
97RPAY	3	3	3	Secreción Bronquial
98RPAY	3	3	3	Secreción Bronquial
99RPAY	4	3	3	Secreción Bronquial
100RPAY	3	3	3	Secreción Bronquial
101RPAY	4	1	2	Urocultivo

En esta tabla se muestran los alotipos de las regiones de unión a IgG de esta colección. En la Tabla se muestra el aislamiento seguido del alotipo obtenido de la amplificación de la región de unión a IgG además de su origen. Las regiones amplificadas son SpA-1 (Dominios E y D), SpA-2 (Dominios D, A y B) y SpA-3 (Dominios B y C).

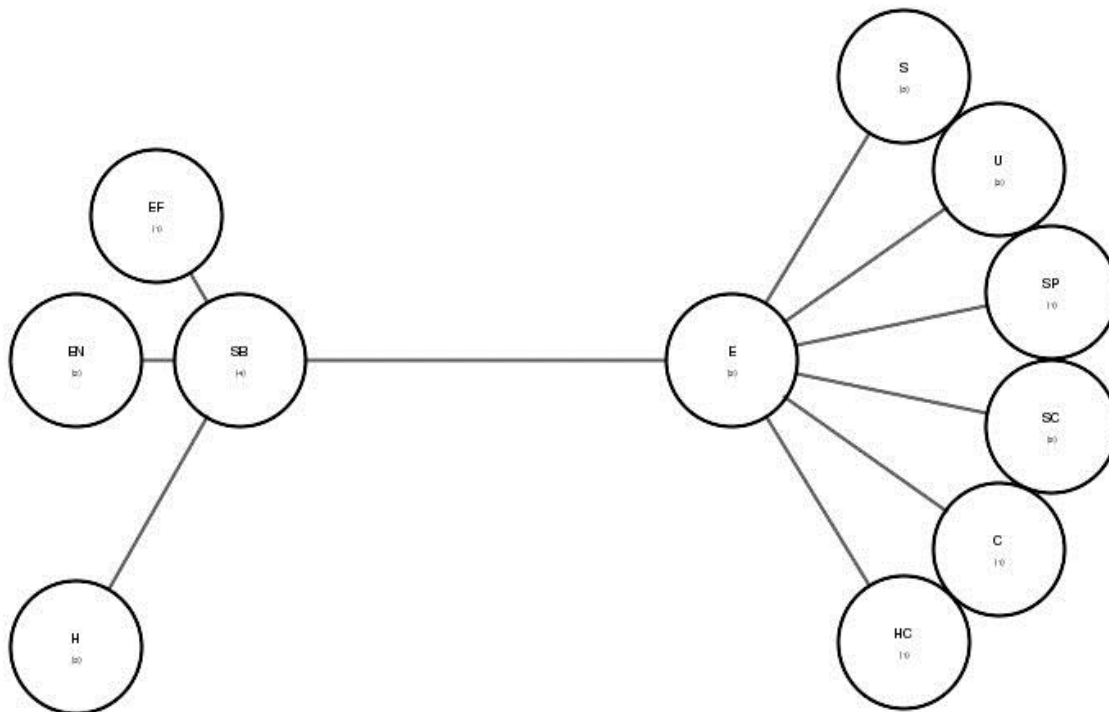


Figura 3.4. Representación del diagrama de mínima dispersión de los aislamientos clínicos de humanos. EF Exudado Faríngeo; EN Exudado Nasal; SB Secreción Bronquial; H Hemocultivo; E Exudado; H Hemocultivo de Catéter; C Catéter; SC Secreción de Catéter; SP Secreción de Punta de Catéter; U Urocultivo; S Secreción; E Exudado.

En la figura 3.4 se encuentran representados los aislamientos correspondientes a la colección de casos clínicos humanos. Es interesante observar que sólo se generan dos grupos los cuales su único elemento de dispersión es el origen del aislamiento, en el lado izquierdo se encuentran los aislamientos encontrados en exudados tomados de diversas mucosas y del lado derecho los aislamientos encontrados en secreciones de diversos tipos. En los aislamientos clínicos de humanos los amplicones de la región de unión a IgG no generaron grupos ni dispersión. Esto podría explicarse debido a que la presión de selección sobre SpA en estos aislamientos es muy similar.

Discusión.

De acuerdo con el análisis bioinformático de las regiones que se encuentran más conservadas en los alineamientos son la región E y la región Xc, una posible explicación sobre la conservación de estos dominios es la posición en que se encuentran; el dominio E se encuentra en el extremo N-terminal donde se encuentra el péptido señal para que la proteína sea trasladada a la membrana; y el dominio Xc se ancla covalentemente a la membrana externa de *S. aureus* donde SpA cumple su función por lo que su alto grado de conservación es necesario para que la proteína sea funcional (Heel *et al.*, 2010).

El análisis de mínima dispersión (figuras 3.3 y 3.4) sugiere que de acuerdo al nicho donde se encuentre *S. aureus* se conservan variaciones en la secuencia de *spa* que pudieran otorgar ventajas a este patógeno. Al analizar a nivel de secuencia los diversos dominios de *spa* se podrían enfatizar aquellas diferencias de SNP's que generen mutaciones no silenciosas y que puedan afectar la funcionalidad de SpA ya que se ha logrado demostrar que ciertas mutaciones sobre SpA alteran su función de manera drástica como ocurre en la cepa $\Delta\text{SpA}_{\text{KKAA}}$ al grado de perder la propiedad de interactuar con la porción Fc de las IgG disminuyendo su virulencia (Kim *et al* 2010). Resultados presentados en el diagrama de mínima dispersión (Figura 3.3 y 3.4) sugieren que la región de unión a IgG puede ser altamente polimórfica y los polimorfismos estar relacionados con la función de SpA ya que los grupos de aislamientos que presentan un genotipo propio de afecciones humanas se encuentran en grupos definidos y distantes.

Por lo que respecta a su capacidad de interacción con los distintos receptores como es el caso de TNFR1 las isoformas detectadas de SpA pueden afectar la interacción demostrada con anterioridad (Gómez *et al.*, 2006). Estas variaciones se encuentran presentes en los cinco dominios de unión a IgG y debido a que cada dominio individual podría aumentar o perder la capacidad de unirse a la fracción Fc de las IgG's, como se ha demostrado anteriormente (Birger *et al* 1997). Estas variaciones pueden sugerir variedad en la virulencia en cada grupo de aislamientos como lo sugerido en el diagrama de mínima dispersión (Figura 3.3 y 3.4).

Se determinaron índices de diversidad de Simpson tomando en consideración los diferentes alelos encontrados y con un nivel de confianza del 95% obteniendo como resultado que el alelo encontrado con el juego SPA 1 cuenta con un índice de 0.9806, SPA 1 0.9809 y SPA 3 0.9811, estos índices revelan que en cada uno de los alelos existe un alto grado de dominancia indicando poca diversidad.

Al comparar los alotipos de humanos contra bovinos utilizando el índice de Simpson encontramos un valor correspondiente a 0.7890 utilizando un intervalo de confianza del 95%) lo que nos indica un aumento en la diversidad de la región de unión a IgG. Esto podría explicarse debido a la diferencia en el origen de los aislamientos, sugiriendo que existe una relación directa entre el tipo de hospedero y las variaciones encontradas en *spa*.

Conclusiones.

La región de unión a IgG del gen *spa* de *S. aureus* presenta variaciones en su secuencia que aparentemente se encuentran relacionados con el origen del aislamiento.

El gen de *spa* posee regiones polimórficas en la región de unión a IgG que de acuerdo al origen del aislamiento obtienen dominancia, es decir su biodiversidad disminuye.

Los alotipos de SpA encontrados en aislados de glándula mamaria difieren de los alotipos encontrados en infecciones intrahospitalarias lo que indica adaptación a su nicho. Estas variaciones son suficientes para genotipificar a *S. aureus* que además corresponden con información obtenida a través de MLST y PFGE con la diferencia que se trata de un único marcador molecular. El trabajo demuestra que la secuenciación de la región Xr es capaz de generar trazabilidad en los aislamientos, ya que se lograron identificar aislamientos que corresponden a poblaciones bovinas alrededor del mundo y aislamientos que pueden infectar a humanos y bovinos tal es el caso de MRI-3 (t008) que se trata aislamiento reportado en humanos y MRI-160 (t605) que corresponde a aislamientos relacionados con mastitis bovina. .

Los estudios referentes a las funciones de SpA han sido generados utilizando solo algunos aislamientos de referencia por lo que en nuestro estudio demostramos la diversidad que

presenta *S. aureus* respecto a *spa* y que se encuentra relacionado con el nicho donde se encuentra este patógeno por lo que demostramos que un sustento epidemiológico es necesario para demostrar el papel que pudiera desempeñar SpA en una patología en específico.

Gracias a la información disponible en las bases de datos mundiales de *spa*-typing es posible asociar los diferentes *spa*-tipos con un origen o patología determinado ya que determinados *spa*-tipos han sido encontrados en nichos específicos. En cuanto a la región de unión a IgG y de acuerdo con el análisis generado para la obtención de oligonucleótidos es posible que las secuencias encontradas entre el término del dominio E, el dominio D y el inicio del dominio A regresen información que complemente la información obtenida mediante *spa*-typing.

Bibliografía.

- BAUM, C., HASLINGER-LOFFLER, B., WESTH, H., BOYE, K., PETERS, G., NEUMANN, C. & KAHL, B. C. 2009. Non-*spa*-typeable clinical *Staphylococcus aureus* strains are naturally occurring Protein A mutants. *J Clin Microbiol*, 47, 3624-9.
- BRIGIDO, M., BARARDI, C. R., BONJARDIN, C. A., SANTOS, C. L., JUNQUEIRA, M. L. & BRENTANI, R. R. 1991. Nucleotide sequence of a variant Protein A of *Staphylococcus aureus* suggests molecular heterogeneity among strains. *J Basic Microbiol*, 31, 337-45.
- BURLAND, T. G. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol Biol*, 132, 71-91.
- BUSTOS-MARTÍNEZ, J., HAMDAN-PARTIDA, A. & GUTIÉRRES-CÁRDENAS, M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomedica*, 17, 287-305.

- CONTRERAS-MOREIRA, B., SACHMAN-RUIZ, B., FIGUEROA-PALACIOS, I. & VINUESA, P. 2009. primers4clades: a web server that uses phylogenetic trees to design lineage-specific PCR primers for metagenomic and diversity studies. *Nucleic Acids Res*, 37, W95-W100.
- DUGGLEBY, C. J. & JONES, S. A. 1983. Cloning and expression of the *Staphylococcus aureus* Protein A gene in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 11, 3065-76.
- ENRIGHT, M. 2003. The evolution of a resistant pathogen "the case of MRSA". *Curr Opin Pharmacol*, 3, 474-479.
- FOSTER, T. J. & HOOK, M. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 6, 484-8.
- GÓMEZ, M. I., O'SEAGHDHA, M., MAGARGEE, M., FOSTER, T. J. & PRINCE, A. S. 2006. *Staphylococcus aureus* Protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *J Biol Chem*, 281, 20190-6.
- GURUNG, M., MOON, D. C., CHOI, C. W., LEE, J. H., BAE, Y. C., KIM, J., LEE, Y. C., SEOL, S. Y., CHO, D. T., KIM, S. I. & LEE, J. C. 2011. *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. *PLoS One*, 6, e27958.
- HEEL, T., PAAL, M., SCHNEIDER, R. & AUER, B. 2010. Dissection of an old protein reveals a novel application: domain D of *Staphylococcus aureus* Protein A (sSpAD) as a secretion--tag. *Microb Cell Fact*, 9, 92.
- KIM, C. M. & SHIN, S. H. 2009. Effect of iron-chelator deferiprone on the in vitro growth of staphylococci. *J Korean Med Sci*, 24, 289-95.
- LAZAR, I. 2010. GelAnalyzer2010a. <http://www.gelanalyzer.com/>

- LOFDAHL, S., GUSS, B., UHLEN, M., PHILIPSON, L. & LINDBERG, M. 1983. Gene for staphylococcal Protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 697-701.
- MOKS T , ABRAHMSSEN L, NILSSON B, HELLMAN U, S. J. &UHLÉN M, A. U. 1986. Staphylococcal Protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem* 156, 637-643.
- MOKS, T., ABRAHMSSEN, L., NILSSON, B., HELLMAN, U., SJOQUIST, J. & UHLEN, M. 1986. Staphylococcal Protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem*, 156, 637-43.
- RYAN. & HARPER, A., T, D. 2011. Palaeontological STatistics. 2.17 ed. Aplicación libre. UK.
- SHUTTLEWORTH, H. L., DUGGLEBY, C. J., JONES, S. A., ATKINSON, T. & MINTON, N. P. 1987. Nucleotide sequence analysis of the gene for Protein A from *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (NCTC8530) and its enhanced expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 58, 283-95.
- SIMPSON, E. H. 1949. RE: Measurement of diversity. Carta al editor. *Nat.* 163, 688

IX. Discusión general.

La asignación de los *spa*-tipos correspondientes a la región Xr del gen de Spa encontrados en las localidades de Cotzio y Téjaro en el estado de Michoacán reveló que estos aislamientos se comportan de acuerdo a lo reportado a nivel mundial, es decir que contienen un fondo genético típico de aislamientos de *S. aureus* que afectan a bovinos (Delgado *et al.*, 2011). En presente estudio se encontró el *spa*-tipo t008 el cual pertenece al aislamiento MRI-3 y cuenta con un ST-8. Este aislamiento presenta un fondo genético correspondiente a humanos aunque no es un caso peculiar ya que en el estudio se contó con la cepa de referencia ATCC27543 la cual cuenta con el mismo fondo genético y se trata también de un aislamiento proveniente de mastitis bovina. Sin embargo el fondo genético de estos aislamientos nos indica el riesgo de contagios cruzados entre humanos y bovinos.

En nuestro estudio logramos obtener el 100% de las secuencias en la región Xr ya que todos los productos pertenecen a SpA (con un análisis en BLAST Altschul *et al.*, 1990) en contraste con lo reportado, ya que en diversos estudios se observa un porcentaje de aislamientos que no son posibles de caracterizar mediante *spa*-typing (Klein *et al.*, 2012); sin embargo, no se logró asignar un *spa*-tipo a todos los aislamientos, ya que como se menciona en el Capítulo 1 solo el 84% de los aislamientos cuentan con los requerimientos necesarios para su reporte en base de datos (Ridomspaserver); aunque la mayoría de los casos se encuentran polimorfismos (SNP's) en la secuencias que indican la presencia de nuevos repetidos. Tal es el caso de los aislamientos MRI-147 y MRI-171 que en particular presentan un polimorfismo en una de las secuencias firma en 5' (RCMAAAH). Estos hallazgos sugieren que un criterio de aceptación, dando una mayor amplitud, en la variación de las secuencias firma, podría ser considerado de forma alternativa a las pautas sugeridas en Ridomspaserver; ya que en reportes provenientes de todo el mundo demuestran que no todos los aislados de *S. aureus* pueden ser caracterizados. La amplitud en este criterio podría lograr que un gran número de *S. aureus* entraran en la caracterización molecular mediante la región Xr de SpA. Este esquema resultaría interesante ya que podría determinar correlaciones que con anterioridad podrían pasar inadvertidas, ya que diversos

aislamientos presentan dificultades para su caracterización por *spa*-typing (Baum *et al.*, 2009).

A pesar de las dificultades que pudieran presentarse al caracterizar *S. aureus* por *spa*-typing y de acuerdo a lo reportado en la literatura, su utilización es indispensable para una caracterización completa de *S. aureus* ya que al ser usado en conjunto con la técnica de Multilocus Variable-number-repeats (MLVA), el *spa*-tipo es un factor que contribuye a la discriminación. En el caso del MLST complementa su caracterización con los datos cargados en las bases de datos disponibles. Para el caso de *S. aureus* asociado a infecciones en humanos, se recomienda la utilización combinada de PFGE, MLST y *spa*-typing (Schouls *et al.*, 2009), ya que entre las tres aportan las características de poder de discriminación y fondos genéticos compartidos, útiles para analizar la estructura genética de la población.

En cuanto a la frecuencia de los *spa*-tipos provenientes de mastitis bovina encontramos al *spa*-tipo t1965 con una frecuencia del 19% y al t4570 con un 14% y el resto con una frecuencia menor. Sin embargo la mayoría de los *spa*-tipos encontrados cuentan con un fondo genético característico de aislamientos relacionados con mastitis bovina a excepción del aislamiento MRI-3 el cual de acuerdo con las bases de datos cuenta con un *spa*-tipo que corresponde a aislamientos relacionados con infecciones en humanos. Estos hallazgos nos indican la capacidad con la que cuenta el *spa*-typing para la caracterización molecular de *S. aureus* ya que en el estudio generado en nuestro grupo de trabajo demostró la capacidad de asociación generado en el grupo de trabajo, se logró asignar el MLST correspondiente a cada aislamiento dando como resultado la concordancia con el fondo genético encontrado para los *spa*-tipos. A excepción del aislamiento MRI-3, el resto de los *spa*-tipos concuerdan en la base de datos con aislamientos que son reportados en bovinos, lo cual sugiere trazabilidad mediante *spa*-typing.

A pesar de la diversidad encontrada en la región Xr de *spa* y el papel que desarrolla al interactuar en la activación de Interferón, no se ha logrado determinar si los polimorfismos existentes alteren estas funciones.

Para el estudio de la región de unión a IgG del gen de SpA se diseñaron tres juegos de oligonucleótidos dirigidos a las regiones de *spa* (descritos en el Capítulo 2) que pudieran describir los INDEL's o SNP's que pudieran localizarse en la secuencia. Interesantemente se encontró que de acuerdo con el origen del aislamiento las combinaciones de fragmentos obtenidos varían por lo que se utilizó un algoritmo de mínima dispersión (figuras 3.3 y 3.4) observando que de acuerdo a su origen (aislamientos provenientes de humanos o aislamientos relacionados con mastitis bovina) estos conforman grupos diversos.

Los grupos generados correspondientes a mastitis bovina se encuentran dispersos conformando 3 sub-grupos de los cuales la dispersión es generada por el origen propio del aislamiento obtenido mediante *spa*-typing y de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 2.

En contraste los aislamientos correspondientes a casos clínicos humanos, a pesar de que no fue posible determinar su *spa*-tipo se encontró que estos tienen un fondo genético con una variación menor que los aislamientos relacionados con mastitis bovina resultando en una dispersión menor lo que sugiere un comportamiento clonal en lo que respecta a la región de unión a IgG de *spa*.

Se calcularon los índices de diversidad de Simpson para determinar la variabilidad de *spa* con los datos obtenidos de las diferentes regiones de unión a IgG como lo mostrado en el Capítulo 2 a pesar de que el índice de Simpson muestra un valor que corresponde a poca variación pero de acuerdo a la naturaleza del análisis las mínimas variaciones en un gen conservado en *S. aureus* son indicadores de diversidad que cobran relevancia al estar asociadas al origen del aislamiento (Said *et al.*, 2010, Rolo *et al.*, 2012).

X. Conclusión General.

1) Los *spa*-tipos determinados a los aislados de origen bovino, corresponden con *spa*-tipos previamente reportados para este tipo de patógeno, lo cual confirma una asociación del *spa*-tipo con la patología y no con la región.

2) Todos los aislados presentaron elementos de secuencia que permiten su caracterización por *spa*-typing, pero se encontraron SNP's en las secuencias firma de algunos de ellos, lo que impide la asignación formal del *spa*-tipo. Una asignación local de *spa*-tipos podría lograr un incremento en la capacidad de diagnóstico y trazabilidad de los aislamientos de *S. aureus* y lograr incrementar su poder discriminatorio.

3) El polimorfismo en los productos de amplificación derivados de la región “conservada” de unión a IgG en el gen *spa*, permiten asociar el tipo de polimorfismo con su origen clínico. Esto sugiere que debe haber SNP's y/o INDEL's asociados a cepas de *S. aureus* que se encuentran en diferentes nichos y que estos cambios pudieran estar relacionados con su capacidad de evadir la respuesta inmune y activar receptores celulares que garantizan la supervivencia de *S. aureus* en el hospedero.

XI. Perspectivas

- Debido a que no fue posible definir el *spa*-tipo de algunas cepas aisladas de bovinos, por la falta de la secuencias consenso (firmas o “signatures”) en el extremo 5' de la secuencia, se estableció una búsqueda de similitud en las secuencias obtenidas de nuestros aislamientos (como lo mostrado en el Capítulo 1), encontrando la firma “RCAMCAAH” lo que difiere con la condición necesaria para el reporte en la base de datos correspondiente, por lo que es posible que de este trabajo surja una propuesta para la caracterización de cualquier aislado, generando una mayor flexibilidad para la aceptación de las secuencias de repetidos.
- De acuerdo a lo mencionado con anterioridad por Baum *et al* (2009), las eliminaciones sobre el dominio C (lugar donde se ubica el primer adelantado y la firma en 3') son comunes en los aislamientos que no pueden ser caracterizados por *spa*-typing por lo que un análisis, como el presentado podría establecer nuevos criterios de información para la designación de nuevas firmas o la identificación los propios INDEL's que pudieran generar variación a la técnica.

- Al igual que los dominios de unión a IgG la región Xr es capaz de generar respuestas celulares, en específico la producción de IF- β , sin embargo también existen diferencias en la secuencia de Xr ya que se trata de una región hiperpolimórfica. Cada repetido puede constar de un número de 24 a 30 nucleótidos y pueden llegar a tener mutaciones sinónimas y no sinónimas, esto puede generar diferencias en la activación de la producción de IF- β o incluso activar otras respuestas celulares que aún no han sido descritas y ayudarían a entender la patogenia de *S. aureus*.
- Con un nuevo criterio de delimitación de la región Xr, podrían encontrarse nuevas secuencias de repetidos o nuevos *spa*-tipos en nichos donde no han sido reportados y lograr obtener un panorama de los genotipos de *S. aureus* con mayor amplitud.
- Al caracterizar la secuencia nucleotídica de las regiones de unión a IgG del gen *spa* podrían observarse diferencias entre SpA (SNP's o INDEL's) que pudieran generar efectos diferentes a los descritos en la actualidad. Una aproximación de este panorama pudiera observarse en los INDEL's de SpA descritos en el capítulo 2, debido a que la interacción de SpA con TNFR1 es dependiente secuencia completa de la región de unión a IgG de SpA.
- Debido a lo descrito en el capítulo 2, las diferentes Isoformas de SpA se encuentran asociadas de acuerdo a su origen, por lo que el efecto de SpA sobre células de distintos hospederos pudieran activar de forma diferencial las respuestas celulares descritas con anterioridad o provocar la activación de respuestas celulares completamente distintas por lo que el presente trabajo pudiera ofrecer esquemas de caracterización para la generación de modelos de estudio sobre la patología y virulencia de *S. aureus*.
- La interacción de SpA con la porción Fc de las IgG ha sido ampliamente descrita, sin embargo, la afinidad de las diversas isoformas de SpA se podría ver afectada por los INDEL's descritos en el capítulo 2, sugiriendo diferentes grados de afinidad de SpA por la porción Fc de las IgG, de acuerdo al origen de *S. aureus*. Esto podría

llegar a esclarecer el grado de virulencia que presenta cada aislamiento. Una alternativa podría ser el análisis de RFLP con los fragmentos amplificados en este trabajo, para aumentar la cantidad de información con cada fragmento amplificado en función del tipo de mutaciones que presenta.

- *S. aureus* se ha caracterizado por tener una amplia diversidad genética, ya que se han logrado establecer genotipos que afectan a una población en específico. Por lo que este trabajo pretende establecer nuevos criterios para la caracterización de SpA de *S. aureus*.

XII. Bibliografía General.

- AKINEDEN, O., HASSAN, A. A., SCHNEIDER, E. & USLEBER, E. 2008. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. *Int J Food Microbiol*, 124, 211-6.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-10.
- APOLONIO-ALONSO, A. N., ACOSTA-GIO, A. E., BUSTOS-MARTINEZ, J., SANCHEZ-PEREZ, L. & HAMDAN-PARTIDA, A. 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among dental patients. *Am J Infect Control*, 39, 254-5.
- BAUM, C., HASLINGER-LOFFLER, B., WESTH, H., BOYE, K., PETERS, G., NEUMANN, C. & KAHL, B. C. 2009. Non-spa-typeable clinical *Staphylococcus aureus* strains are naturally occurring Protein A mutants. *J Clin Microbiol*, 47, 3624-9.
- BAUTISTA-TRUJILLO, G. U., SOLORIO-RIVERA, J. L., RENTERIA-SOLORZANO, I., CARRANZA-GERMAN, S. I., BUSTOS-MARTINEZ, J. A., ARTEAGA-GARIBAY, R. I., BAIZABAL-AGUIRRE, V. M., CAJERO-JUAREZ, M., BRAVO-PATINO, A. & VALDEZ-ALARCON, J. J. 2013. Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Med Microbiol*, 62, 369-76.
- BEDOLLA, C. 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *REDVET*, IX. 1-26
- BLANCO-GELAZ, M., SUAREZ-ALVAREZ, B., GONZALEZ, S., LOPEZ-VAZQUEZ, A., MARTINEZ-BORRA, J. & C., A. L.-L. 2006. The amino acid at position 97 is involved in folding and surface expression of HLA-B27. *Int Immunol*, 18, 211-220.

- BUSTOS-MARTÍNEZ, J., HAMDAN-PARTIDA, A. & GUTIÉRRES-CÁRDENAS, M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomedica*, 17, 287-305.
- CARMONA-GASCA, C., A., TALAVERA-MORALES, L., E., GARCÍA-RODRÍGUEZ, F., R., OROZCO-ORTIZ, A., P. & VALDEZ-ALARCÓN, J., J. 2012. NiSspa: software de código abierto para la caracterización de aislados de *Staphylococcus aureus* por *spa*-typing para epidemiología molecular. *Biológicas*, 14, 30-36.
- COOKSON, B. D., ROBINSON, D. A., MONK, A. B., MURCHAN, S., DEPLANO, A., DE RYCK, R., STRUELENS, M. J., SCHEEL, C., FUSSING, V., SALMENLINNA, S., VUOPIO-VARKILA, J., CUNY, C., WITTE, W., TASSIOS, P. T., LEGAKIS, N. J., VAN LEEUWEN, W., VAN BELKUM, A., VINDEL, A., GARAIZAR, J., HAEGGMAN, S., OLSSON-LILJEQUIST, B., RANSJO, U., MULLER-PREMUR, M., HRYNIEWICZ, W., ROSSNEY, A., O'CONNELL, B., SHORT, B. D., THOMAS, J., O'HANLON, S. & ENRIGHT, M. C. 2007. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J Clin Microbiol*, 45, 1830-7.
- DELEO, F. R. & CHAMBERS, H. F. 2009. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest*, 119, 2464-74.
- DELGADO, S., GARCIA, P., FERNANDEZ, L., JIMENEZ, E., RODRIGUEZ-BANOS, M., DEL CAMPO, R. & RODRIGUEZ, J. M. 2011. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 62, 225-35.
- DOBRINDT, U., CHOWDARY, M. G., KRUMBHOLZ, G. & HACKER, J. 2010. Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol*, 199, 145-154.

- DUGGLEBY, C. J. & JONES, S. A. 1983. Cloning and expression of the *Staphylococcus aureus* Protein A gene in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 11, 3065-76.
- EL-SAYED, A., ALBER, J., LAMMLER, C., ABDULMAWJOOD, A., ZSCHOCK, M. & HUGO CASTANEDA, V. 2006. Comparative sequence analysis of spa gene of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis: characterization of an unusual spa gene variant. *J Dairy Res*, 73, 322-7.
- ENRIGHT, M. 2003. The evolution of a resistant pathogen "the case of MRSA". *Curr Opin Pharmacol*, 3, 474-479.
- ENRIGHT, M. & AND SPRATT, B. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol*, 7, 482-487.
- ENRIGHT, M. C., ROBINSON, D. A., RANDLE, G., FEIL, E. J., GRUNDMANN, H. & SPRATT, B. G. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 7687-92.
- FOSTER, T. J. & HOOK, M. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 6, 484-8.
- GAROFALO, A., GIAI, C., LATTAR, S., GARDELLA, N., MOLLERACH, M., KAHL, B. C., BECKER, K., PRINCE, A. S., SORDELLI, D. O. & GÓMEZ, M. I. 2012. The length of the *Staphylococcus aureus* Protein A polymorphic region regulates inflammation: impact on acute and chronic infection. *J Infect Dis*, 206, 81-90.
- GÓMEZ, M. I., O'SEAGHDHA, M., MAGARGEE, M., FOSTER, T. J. & PRINCE, A. S. 2006. *Staphylococcus aureus* Protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *J Biol Chem*, 281, 20190-6.

- GURUNG, M., MOON, D. C., CHOI, C. W., LEE, J. H., BAE, Y. C., KIM, J., LEE, Y. C., SEOL, S. Y., CHO, D. T., KIM, S. I. & LEE, J. C. 2011. *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. *PLoS One*, 6,27958.
- HAMDAN-PARTIDA, A., SAINZ-ESPUNES, T. & BUSTOS-MARTINEZ, J. 2010. Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. *J Clin Microbiol*, 48, 1701-5.
- HARMSSEN, D., CLAUS, H., WITTE, W., ROTHGANGER, J., TURNWALD, D. & VOGEL, U. 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol*, 41, 5442-8.
- JANSSON, B., UHLÉN, M. & AND NYGREN, P. 1998. All individual domains of staphylococcal Protein A show Fab binding. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 20, 69-78.
- JEVONS, M. P. & PARKER, M. T. 1964. The Evolution of New Hospital Strains of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Pathol*, 17, 243-50.
- KAWAGUCHIYA, M., URUSHIBARA, N., KUWAHARA, O., ITO, M., MISE, K. & KOBAYASHI, N. 2011. Molecular characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hokkaido, northern main island of Japan: identification of sequence types 6 and 59 Pantone-Valentine leucocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist*, 17, 241-50.

- KLEIN, R. C., FABRES-KLEIN, M. H., BRITO, M. A., FIETTO, L. G. & RIBON, A. D. 2012. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Vet Microbiol.*
- KOREEN, L., RAMASWAMY, S. V., GRAVISS, E. A., NAIDICH, S., MUSSER, J. M. & KREISWIRTH, B. N. 2004. *spa*-typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol*, 42, 792-9.
- KWOK, P.-Y. 2003. *Single Nucleotide Polymorphisms.*, Totowa, New Jersey, Humana Press Inc.
- LEONARD, F. C. & MARKEY, B. K. 2008. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Vet J*, 175, 27-36.
- LEONARD, S. N., CHEUNG, C. M. & RYBAK, M. J. 2008. Activities of ceftobiprole, linezolid, vancomycin, and daptomycin against community-associated and hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2974-6.
- LIVERMORE, D., MUSHTAQ, S., JAMES, D., POTZ, N., WALKER, R., CHARLETT, A., WARBURTON, F., JOHNSO, N. A., WARNE, R. M. & AND HENWOOD, C. 2003. In vitro activity of piperacillin/tazobactam and other broad-spectrum antibiotics against bacteria from hospitalised patients in the British Isles. *Int J Antimicrob Agents*, 22, 14-17.
- LIVERMORE, D. M. & WARNER, M. 2009. Effects of low temperature and high salt on the activity of the novel carbapenem PZ-601 (SMP-601) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 63, 411-3.

- LOFDAHL S, GUSS B, UHLEN M, L, P. & M, A. L. 1983. Gene for staphylococcal Protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 697-701.
- MARTIN, F. J., GÓMEZ, M. I., WETZEL, D. M., MEMMI, G., O'SEAGHDHA, M., SOONG, G., SCHINDLER, C. & PRINCE, A. 2009. *Staphylococcus aureus* activates type I IFN signaling in mice and humans through the Xr repeated sequences of Protein A. *J Clin Invest*, 119, 1931-9.
- MENDOZA, J. 2005. *Frecuencia de tipos de toxinas superantígenos en Staphylococcus aureus de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos*. Tesis de Doctorado, Universidad de Oviedo. Oviedo, España.
- MOKS T, ABRAHMSSEN L, NILSSON B, HELLMAN U, SJÖQUIST. J. & UHLÉN M. 1986. Staphylococcal Protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem* 156, 637-643.
- NUBEL, U., STROMMENGER, B., LAYER, F. & WITTE, W. 2011. From types to trees: reconstructing the spatial spread of *Staphylococcus aureus* based on DNA variation. *Int J Med Microbiol*, 301, 614-8.
- OVIEDO-BOYSO, J., BARRIGA-RIVERA, J. G., VALDEZ-ALARCON, J. J., BRAVO-PATINO, A., CARABEZ-TREJO, A., CAJERO-JUAREZ, M. & BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. 2008. Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF-kappaB and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta. *Scand J Immunol*, 67, 169-76.
- ROBEN, P., SALEM, A. & AND SILVERMAN, G. 1995. VH3 family antibodies bind domain D of staphylococcal Protein A. *J Immunol*, 154, 6437-6445.

- ROLO, J., MIRAGAIA, M., TURLEJ-ROGACKA, A., EMPEL, J., BOUCHAMI, O., FARIA, N. A., TAVARES, A., HRYNIEWICZ, W., FLUIT, A. C. & DE LENCASTRE, H. 2012. High genetic diversity among community-associated *Staphylococcus aureus* in Europe: results from a multicenter study. *PLoS One*, 7, e34768.
- SAID, K. B., ISMAIL, J., CAMPBELL, J., MULVEY, M. R., BOURGAULT, A. M., MESSIER, S. & ZHAO, X. 2010. Regional profiling for determination of genotype diversity of mastitis-specific *Staphylococcus aureus* lineage in Canada by use of clumping factor A, pulsed-field gel electrophoresis, and *spa*-typing. *J Clin Microbiol*, 48, 375-86.
- SCHOOLS, L. M., SPALBURG, E. C., VAN LUIT, M., HUIJSDENS, X. W., PLUISTER, G. N., VAN SANTEN-VERHEUVEL, M. G., VAN DER HEIDE, H. G., GRUNDMANN, H., HECK, M. E. & DE NEELING, A. J. 2009. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and *spa*-typing. *PLoS One*, 4, e5082.
- SHOPSIN, B., GÓMEZ, M., MONTGOMERY, S. O., SMITH, D. H., WADDINGTON, M., DODGE, D. E., BOST, D. A., RIEHMAN, M., NAIDICH, S. & KREISWIRTH, B. N. 1999. Evaluation of Protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*, 37, 3556-63.
- TENOVER, F. C. 1999. Implications of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*, 43 Suppl, S3-7.
- UHLÉN, M., GUSS, B., NILSSON, B., GATENBECK, S., PHILIPSON, L. & M, A. L. 1983. Complete Sequence of the Staphylococcal Gene Encodin Protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J. Biol. Chem*, 259, 1695-1702.

UHLÉN, M., GUSS, B., NILSSON, B., GOTZ, F. & LINDBERG, M. 1984. Expression of the gene encoding Protein A in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Bacteriol*, 159, 713-9.

URUSHIBARA, N., KAWAGUCHIYA, M. & KOBAYASHI, N. 2012. Two novel arginine catabolic mobile elements and staphylococcal chromosome cassette mec composite islands in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotypes ST5-MRSA-V and ST5-MRSA-II. *J Antimicrob Chemother*, 67, 1828-34.

VERGISON, A., MACHADO, A. N., DEPLANO, A., DOYEN, M., BRAUNER, J., NONHOFF, C., DE MENDONCA, R., MASCART, G. & DENIS, O. 2012. Heterogeneity of disease and clones of community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children attending a paediatric hospital in Belgium. *Clin Microbiol Infect*, 18, 769-77.

Anexo 1.

Biología, Diciembre 2012, 14(2): 30-36



NiSpa: software de código abierto para la caracterización de aislados de *Staphylococcus aureus* por spa-typing para epidemiología molecular

Carlos Alfredo Carmona-Gasca^{1*}, Luis Eduardo Talavera-Morales^{2*}, Francisco Ramón García-Rodríguez^{1*}, Ana Patricia Orozco-Ortiz², Juan José Valdez-Alarcón^{1□}

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro Posta Veterinaria, La Palma, C.P. 58893, Tarímbaro, Michoacán, México.

²Universidad Tecnológica de Morelia, Av. Vicepresidente Pino Suárez No. 750 CP58200, Morelia Michoacán.

Resumen

Staphylococcus aureus es un patógeno versátil capaz de causar infecciones en humanos y animales con diferentes tipos de patologías. El gen spa de *S. aureus* presenta secuencias cortas repetidas (SSR's) que se utilizan en la técnica de spa-typing para la caracterización molecular de aislados del patógeno con fines epidemiológicos. Las bases de datos y los diferentes tipos de software disponibles para spa-typing son poco amigables y presentan la información fragmentada. En este trabajo se presenta una aproximación al diseño de un software alternativo, NiSpa (Nicolaita-software para spa-typing), que relaciona de forma amigable la información de spa-typing con la información presente en las bases de datos globales de epidemiología molecular de *S. aureus*. El software se probó contra las herramientas disponibles en línea utilizando datos experimentales generados en el laboratorio.

Palabras clave: Proteína A, spa-tipos, SSR's, Secuencias Cortas Repetidas

Abstract

Staphylococcus aureus is a versatile and pathogenic bacteria that is able to cause infections in humans and animals with different pathologies. The protein A gene (spa) of *S. aureus* presents short sequences repeat (SSR's) that are used for spa-typing in molecular epidemiology for the characterization of *S. aureus*. The databases and different available tools for spa-typing are unfriendly and present fragmented information. This paper presents an approach to design an alternative software, NiSpa (Nicolaita-software for spa-typing), that friendly links spa-typing information with the global databases of molecular epidemiology of *S. aureus*. The software was tested against the available online tools using data generated in the laboratory.

Keywords: Protein A, spa-types, SSR's, Single Sequence Repeat's

Introducción

Staphylococcus aureus es un agente patógeno que causa diferentes tipos de infecciones en el hombre, en animales domésticos y salvajes. Entre las patologías más comunes en humanos se encuentran las infecciones de piel, tejidos blandos e intoxicaciones provocadas por enterotoxinas o la toxina de choque tóxico. Todas estas infecciones son Adquiridas en la Comunidad (denominadas AC), *S. aureus* es, además, uno de los patógenos más importante de infecciones Adquiridas en Hospitales (denominadas AH), en las que provoca osteomielitis, endocarditis infecciosa y septicemias (Bustos-Martínez *et al.*, 2006). En animales es capaz de causar piodermas, infecciones asociadas a intervenciones quirúrgicas y mastitis en los animales productores de leche (Graveland *et al.*, 2011). *S. aureus* es un patógeno exitoso gracias a que existen diferentes genotipos de y cada genotipo contiene variantes de un conjunto de factores de virulencia (Baizabal-Aguirre *et al.*, 2009). Uno de estos es la Proteína A (Spa), que

es la más abundante de la pared celular. Para su mejor estudio, Spa se divide en diferentes regiones funcionales (Figura 1): una región involucrada en su secreción (S), 5 dominios (E, D, A, B y C) de unión a inmunoglobulinas isotipo G (IgG) y una región denominada región X (Figura 1A). Esta se encuentra subdividida a su vez en una región constante (Xc), la cual es responsable de interactuar con la pared de *S. aureus* sirviendo como anclaje y la región (Xr), la cual está compuesta por un número variable secuencias cortas repetidas (SSR's) con un tamaño variable de 24 a 30 pares de bases (Shopsin *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2010) y que promueve procesos inflamatorios de una manera dependiente de la longitud de los SSR's (Garofalo *et al.*, 2012). La región Xr se encuentra delimitada por dos secuencias consenso que la flanquean y que se denominan secuencias "firma" (signature sequences). Las firmas en los extremos 5' (RCA MCA AAA) y 3' (TAY ATG TCG T), se utilizan así para identificar y delimitar la región de SSR's en Xr (Figura 1B).

La variabilidad en la longitud y en el polimorfismo de secuencias de las SSR's se ha aprovechado para utilizar a la región Xr como un marcador molecular en la caracterización de este patógeno, con la técnica llamada spa-typing (Harmsen *et al.*, 2003). En esta técnica se identifican el número y tipo de las SSR's y el orden en que se presentan. A la combinación de SSR's en la región Xr se le denomina spa-tipo y a la técnica se le conoce por su nombre en

□ Autor de correspondencia: J.J. Valdez Alarcón. Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología Fac. De Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Km 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro Posta Veterinaria, La Palma, C.P. 58893, Tarímbaro, Michoacán, México. Email: jvaldex_1@hotmail.com; jvaldex@umich.mx Tel/Fax: +52(443)293-8029.

*Estos autores contribuyeron de manera equivalente a este trabajo.

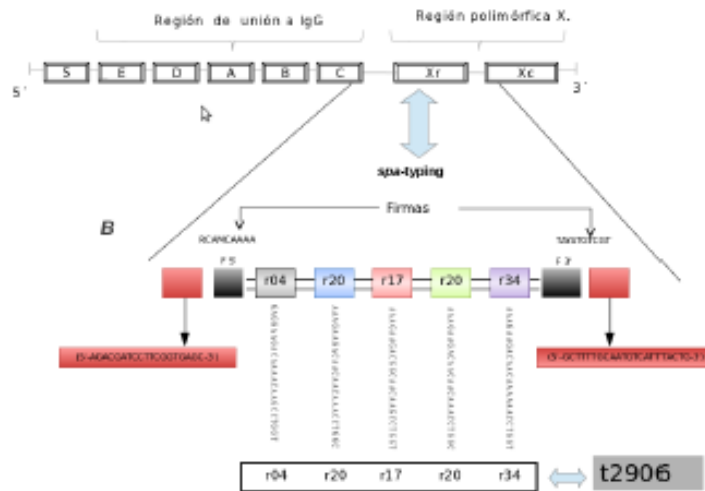


Figura 1. a) Estructura del gen *spa*. Las regiones del gen se describen en el texto. **b)** Organización estructural de la región *Xr*. Se muestran los oligonucleótidos *spa*-1113f y *spa*-1514r (rectángulos rojos) para la amplificación de la región *Xr*, la localización y secuencia de las firmas 5' (F5) y 3' (F3), la secuencia (vertical) y designación de cada repetido y el *spa*-tipo asignado (t2906).

inglés *spa*-typing. Una de las ventajas de la secuenciación de la región *Xr* en la técnica de *spa*-typing es la portabilidad y sencillez con la que puede manejarse la información de las secuencias de nucleótidos que pueden ser representadas mediante un código de cuatro letras y manejarse en la forma de un archivo de texto, permitido el desarrollo de bases de datos globales disponibles en internet, para saber el *spa*-tipo, la secuencia de la región *Xr* de aislados obtenidos de diferentes fuentes y en diversas partes del mundo se compara con estas bases de datos. El sitio de internet para *spa*-typing es conocido como Ridom SpaServer (<http://spa.ridom.de/>). Este sitio recibe los archivos de salida de los equipos de secuenciación (electroferograma) y una persona, denominada curador, determina la calidad y confiabilidad del electroferograma y asigna un número de repetido (*r*) a cada SSR y al conjunto del número de repetidos le asigna un *spa*-tipo (*t*). El conjunto de *spa*-tipos reportados por los usuarios ha sido recopilado en esta base de datos internacional de libre acceso. Actualmente, se han reportado más de 561 repetidos distintos y 11,165 *spa*-tipos derivados de las combinaciones de repetidos cuyo número continúa en aumento.

La base de datos de Ridom SpaServer contiene además información epidemiológica de los aislados asociados

con los *spa*-tipos. Dicha información se encuentra de forma dispersa y redundante en 4 tablas con los datos epidemiológicos y moleculares relevantes como la combinación de repetidos, la frecuencia global de cada *spa*-tipo y su relación con el análisis de secuencias de *loci* múltiples o multi-*locus* sequence typing (MLST), otro método de caracterización molecular para *S. aureus* (Maiden 2006; Enright *et al.*, 2000). Esta técnica permite determinar el fondo genético compartido entre los aislados de *S. aureus* y agrupar a los mismos de acuerdo al número de alelos compartidos entre siete genes que se analizan. A la combinación de alelos de los siete genes se les denomina Secuencia-tipo (ST). A los grupos de similitud que comparten seis, cinco o cuatro de los siete alelos, se les denomina Complejos Clonales (CC). Ridom SpaServer proporciona una base de datos que contiene el país de origen, el tipo de muestra, y el alotipo del casete de resistencia a meticilina (SCC_{mec}) de los aislados de *S. aureus* (IWG-SCC 2009).

De manera alterna, para designar el *spa*-tipo de forma rápida y sin tener que esperar a la evaluación del curador, existen herramientas en internet como SPA Searcher (PetXc<software>; <http://seqtools.com/>) y Spa Typer/Identifier (<http://fortinbras.us/cgi-bin/spaTyper/spaTyper.pl>) destinados exclusivamente

para la identificación de los *spa*-tipos y de las firmas que flanquean a la región *Xr*. Estas dos herramientas dependen de la base de datos en la página de Ridom SpaServer. Sin embargo, no manejan los datos epidemiológicos presentes en Ridom SpaServer. A la fecha no existen programas de código abierto para el análisis de los *spa*-tipos y de la información epidemiológica relevante a los aislados, por lo que en el presente trabajo se creó, hasta donde sabemos, el primer programa bioinformático de código abierto para la búsqueda de *spa*-tipos que permita usar la base de datos internacional de *spa*-typing. El software se denominó NiSpa (Nicolaita-Software para *spa*-typing) y fue diseñado para identificar los *spa*-tipos en aislados de *S. aureus* de bovinos y humanos obtenidos del municipio de Tarímbaro, Michoacán. A diferencia de las herramientas de internet, este software presenta simultáneamente el análisis de los *spa*-tipos junto con los datos epidemiológicos sobresalientes, en forma ordenada y no redundante y en un solo formato de salida que es visualmente amigable.

Materiales y métodos

Construcción de las bases de datos

La base de datos que al momento de este trabajo contenía 554 repetidos y 10,646 *spa*-tipos, y la información epidemiológica contenida en cuatro tablas de la página Ridom SpaServer (<http://spa.ridom.de/>), se copió para conjuntarla en una hoja de Excel de Microsoft Office, en una sola tabla que incluyó todos los datos asociados a cada *spa*-tipo. Para tal fin se modificó la tabla de frecuencias reordenándola de acuerdo al orden ascendente de los *spa*-tipos. También se reconstruyeron las secuencias de los *spa*-tipos a partir de las secuencias de los números de repetidos, de manera que se generó una columna con las secuencias de cada *spa*-tipo. La base de datos final de Excel contiene todas las variables de forma no redundante en una sola tabla que contiene únicamente 7 variables: *spa*-tipo, frecuencia internacional, país de origen, información relevante, Secuencia-tipo (ST), combinación de repetidos y la secuencia completa del *spa*-tipo. Para evaluar de manera preliminar la nueva

Carlos Alfredo Carmona-Gasca et al.

base de datos, la tabla de variables generada en Excel se introdujo en un archivo del programa de Access de la suite de Microsoft Office, con su respectivo formulario, permitiendo después de varias modificaciones hacer una búsqueda de cualquier *spat*-tipo y de la información relevante.

Diseño y programación del software

Para el diseño del software se utilizó el programa Visual Basic, que es un conjunto de herramientas gratuito para programación de aplicaciones en lenguaje BASIC (Beginners All purpose Symbolic Instruction Code 1). Los códigos desarrollados para programar el software NiSpa se presentan a continuación.

• FrmSpa.frm

```
Private Sub BtnBus_Click()
```

```
Dim DB As Database
```

```
Dim rs As Recordset
```

```
If Trim(TxtSeq.Text) <> "" Then
```

```
    sNomBd = App.Path & "\BDSpa.mdb"
```

```
    If gf_OpenBD(DB, sNomBd) = True Then
```

```
        Set rs = DB.OpenRecordset("tabla")
```

```
        c = 0
```

```
        Do While rs.EOF = False
```

```
            c = c + 1
```

```
            Cad = Trim(rs("secuencia completa").Value)
```

```
            cod = InStr(1, Trim(TxtSeq.Text), Cad)
```

```
            If cod <> 0 Then
```

```
                LblRep.Caption = rs("Repeat succession1").Value
```

```
                TxtTpo.Text = rs("Spa-type").Value
```

```
                TxtSeq2.Text = rs("secuencia completa").Value
```

```
                MLST.Caption = rs("MLST").Value & "
```

```
                comment.Caption = rs("Comment").Value & "
```

```
                Frequency.Caption = rs("Frequency").Value & "
```

```
                origen.Caption = rs("Countries of origin").Value
```

```
                & "
```

```
                ChkCtn.Value = False
```

```
                If InStr(1, Trim(TxtSeq.Text), "GCACCAAAA")
```

```
                Then
```

```
                    ChkCtn.Value = 1
```

```
                End If
```

```
                ChkTre.Value = False
```

```
                If InStr(1, Trim(TxtSeq.Text), "TACATGTCGT")
```

```
                Then
```

```
                    ChkTre.Value = 1
```

```
                End If
```

```
                Izquierda
```

```
                ACAACAAAA.Value = False
```

```
                If InStr(1, Trim(TxtSeq.Text), "ACAACAAAA")
```

```
                Then
```

```
                    ACAACAAAA.Value = 1
```

```
                End If
```

```
                GCAACAAAA.Value = False
```

```
                If InStr(1, Trim(TxtSeq.Text), "GCAACAAAA")
```

```
                Then
```

```
                    GCAACAAAA.Value = 1
```

```
                End If
```

```
                ACACCAAAA.Value = False
```

```
                If InStr(1, Trim(TxtSeq.Text), "ACACCAAAA")
```

```
                Then
```

```
                    ACACCAAAA.Value = 1
```

```
                End If
```

```
                GCACCAAAA.Value = False
```

```
                If InStr(1, Trim(TxtSeq.Text), "GCACCAAAA")
```

```
                Then
```

```
                    GCACCAAAA.Value = 1
```

```
                End If
```

```
                Derecha
```

```
                TACATGTCGT.Value = False
```

```
                If InStr(1, Trim(TxtSeq.Text), "TACATGTCGT")
```

```
                Then
```

```
                    TACATGTCGT.Value = 1
```

```
                End If
```

```
                TATATGTCGT.Value = False
```

```
                If InStr(1, Trim(TxtSeq.Text), "TATATGTCGT")
```

```
                Then
```

```
                    TATATGTCGT.Value = 1
```

```
                End If
```

```
                MsgBox "Encontrado a partir de la posición " & cod
```

```
            End If
```

```
            rs.MoveNext
```

```
            Loop
```

```
            DB.Close
```

```
        End If
```

```
    End If
```

```
End Sub
```

```
Private Sub BtnCerrFrm_Click()
```

```
    FraDerAut.Visible = False
```

```
End Sub
```

```
Private Sub BtnSal_Click()
```

```
    Unload Me
```

```
End Sub
```

```
Private Sub CmdLim_Click()
```

```
    TxtSeq.Text = ""
```

```
    TxtSeq2.Text = ""
```

```
    TxtTpo.Text = ""
```

```
    ChkCtn.Value = False
```

```
    ChkTre.Value = False
```

```
    ACAACAAAA.Value = False
```

```
    GCAACAAAA.Value = False
```

```
    ACACCAAAA.Value = False
```

```
    GCACCAAAA.Value = False
```

```
    TACATGTCGT.Value = False
```

```
    TATATGTCGT.Value = False
```

```
    LblRep.Caption = ""
```

```
    MLST.Caption = ""
```

```
    comment.Caption = ""
```

```
    Frequency.Caption = ""
```

NISpa software para spa-typing

```

        origen.Caption = ""
    End Sub

Private Sub Form_Load()
End Sub

Private Sub TxtSeq_Change()
    Label5.Caption = "Longitud= " & Len(TxtSeq.Text)
End Sub

Private Sub TxtSeq2_Change()
    Label6.Caption = "Longitud= " & Len(TxtSeq2.Text)
End Sub

• Archivo Modspa.bas
Attribute VB_Name = "ModSpa"

Global sNomBd As String 'Nombre de la Base de Datos
Global BanPanErrBas As Boolean 'Bandera que indica que ya se detecto
el error de la BD

Function gf_OpenBD(dBDOpen As Database, NomBd As String) As Boolean
    Dim rsOpen As Recordset
    If gf_ExtNomArc(NomBd) Then
        On Error GoTo ErrOpen
        Set dBDOpen = OpenDatabase(NomBd)
    Else
        GoTo ErrOpen
    End If
    gf_OpenBD = True
    BanPanErrBas = True
    Exit Function
ErrOpen:
    gf_OpenBD = False
    If Err = 3343 Then
        MsgBox "La base de Datos esta severamente dañada y no
        puede ser reparada", vbCritical, "Error" & Err & Kill (sNomBd)
    End If
End Function

Function gf_ExtNomArc(NomArcBus As String) As Boolean
    gf_ExtNomArc = False
    On Error GoTo Fallo
    X = GetAttr(NomArcBus)
    gf_ExtNomArc = True
    Exit Function
Fallo:
    'If NomArcBus = sNomBd And BanPanErrBas = True Then
    If NomArcBus = sNomBd Then
        MsgBox "No existe la base de Datos"
        gf_ExtNomArc = False
        BanPanErrBas = False
    End If
    gf_ExtNomArc = False
End Function
-----

```

La carpeta de instalación contiene 30 archivos. Los tipos de archivos que contiene la carpeta con el programa son: El tipo de

archivo *.DL se asocia con "animación" es el archivo que le da la imagen a la ventana del software, *.LST identifica los archivos de datos de lista, *.ex es un archivo fuente escrito y *.tl es un operador menor el cual hace que el programa lea los algoritmos y pueda abrir sin errores. La instalación del software es ejecutada por el archivo contenido en la carpeta del programa con el nombre SETUPEXE el cual permite la ejecución del software abriendo la ventana de instalación, donde se autoriza que el software sea corrido con un icono de seguimiento, para que pueda cargar los datos en una ventana. A su término creará un acceso directo para su ejecución.

El programa fue probado en 3 versiones del sistema operativos de la plataforma Windows: Windows XP Service Pack 1, 2 y 3, Windows vista (x86) y Windows 7 (x86). El programa no mostró errores al momento de su ejecución en ninguna de las plataformas utilizadas.

Validación; spa-typing de *S. aureus* de origen bovino

Se seleccionaron 23 aislados de *S. aureus* obtenidos en las localidades de Cotzío y Tējaro de los Izquierdo, municipio de Tarímbaro, Michoacán, México, pertenecientes a una colección del Laboratorio de Epidemiología Molecular y Biotecnología de Enfermedades Infecciosas del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB), en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Los aislados se obtuvieron a partir de muestras de leche positivas a la Prueba de California para la detección de la mastitis bovina (Rice, 1997) en medios de cultivo selectivos y/o diferenciales (Bautista-Trujillo *et al.*, 2012) y se denominaron con las letras MRI (Mastitis Related Isolate) y un número secuencial. Se utilizó también la cepa de referencia de *S. aureus* NCTC 8325. Los aislados se desarrollaron en medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) por 12 hrs a 37 °C, y se centrifugaron a 5,000 x g. El ADN fue obtenido con un protocolo modificado reportado previamente (Enright *et al.*, 2000), con 500 µl como volumen máximo y solución amortiguadora TEN_{30/1/100} (30mM Tris-Hcl, 1 mM EDTA, 100mM NaCl pH 8), Proteínasa K (20 mg) y SDS (1% v/v). La estrategia de spa-typing se realizó según lo recomienda Ridom Spa Server. La amplificación de la región Xr del gen se trabajó en un volumen de 50 µl, conteniendo ADN purificado, 200 µM de dNTP's, 10 pmol de los oligonucleótidos spa-1113f (5'- TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C -3') y spa-1514r (5'-CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT -3'), 1X de DreamTaq™ Buffer y 1.25 U de DreamTaq™ DNA polimerasa (Fermentas). Los ciclos térmicos fueron los siguientes: 95°C durante 5 min, seguidos de 35 ciclos a 94°C durante 45 s, 60°C durante 45 s y una extensión de 72°C durante 90 s y una extensión final de 72°C durante 10 min. La secuenciación se llevó a cabo utilizando los análogos de dideoxinucleótidos del kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction V 3.1 (Applied Biosystems). La polimerización se realizó en las siguientes condiciones: 1 ciclo por 5 min a 95°C; 25 ciclos de 0.5 min a 96°C, 0.5 min a 50°C y 4 min a 60°C; 1 ciclo sostenido de enfriamiento a 4°C. Los productos de polimerización se resolvieron en un secuenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer, utilizando un tiempo de inyección de 30 segundos, y la electroforesis a 15 kV, 50°C y 45 minutos de corrida;

Carlos Alfredo Carrama-Gasca et al.

en un capilar de 47 cm de longitud. La edición de los electroferogramas se realizó con el programa MEGA v5.0 (Tamura *et al.*, 2011), y la secuencia consenso de cada aislado fue introducida en el programa NiSpsa. Los resultados fueron corroborados con las herramientas SPA Searcher (PeDx<software>; <http://seqtools.com/>) y Spa Typer/Identifier (<http://fortinbras.us/cgi-bin/spaTyper/spaTyper.pl>).

Resultados

El software NiSpsa procesa la información obtenida de la secuenciación de la región Xr para la búsqueda e identificación independiente de las secuencias firma 5' y 3' que flanquean la región de SSR's y la secuencia correspondiente a cada uno de los spa-tipos disponibles en la base de datos recuperada de Ridom SpaServer.

En la Figura 2 se puede observar la ventana de análisis del software NiSpsa. En ella se muestran los siguientes elementos: 1) ventana para insertar la secuencia a analizar; 2) botones para las acciones buscar/limpiar/salir, con los que se activa la búsqueda, la limpieza de la ventana para insertar una nueva secuencia o la salida del software; 3) cuadros de marca para indicar el hallazgo y la integridad de las secuencias firma 5' y 3'; 4) cuadros de marca para indicar las secuencias encontradas en las firmas 5' (Izquierda) y 3' (Derecha); 5) indicador de la secuencia de repetidos; 6) ventana que indica el spa-tipo encontrado, seguido de 7) la secuencia-tipo (MLST) asociada; 8) comentarios derivados de la base de datos de Ridom SpaServer; 9) origen reportado de los aislados; 10) frecuencia del spa-tipo encontrado; 11) secuencia delimitada que contiene los SSR's.

Para validar el software diseñado, se analizaron secuencias obtenidas en el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Biotecnología de Enfermedades Infecciosas y secuencias de cepas de referencia. Las secuencias se analizaron en el software de NiSpsa y se compararon con lo obtenido en SPA Searcher y Spa Typer/Analyzer. La Tabla 1 se muestra los resultados de las secuencias que concordaron en los tres programas, las secuencias firma 5' y 3' identificadas, la secuencia de repetidos designada y el spa-tipo correspondiente. De la colección de aislados, no fue posible

Tabla 1. Caracterización de los aislados de *Staphylococcus aureus* de origen bovino utilizando NiSpsa.

Cepa/aislado	Firma 5'	Firma 3'	Secuencia de repetidos	spa-tipo
MRI-12	GCACCAAAA	TACATGTCGT	07-23-12-21-17-34-33-34	t224
MRI-13	GCACCAAAA	TACATGTCGT	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25	t008
MRI-147	GCACCAAAA	TACATGTCGT	07-23	t605
MRI-148	GCACCAAAA	TACATGTCGT	07	t693
MRI-149	GCACCAAAA	TACATGTCGT	07-17-34-34-34-33-34	t1965
MRI-150	GCACCAAAA	TACATGTCGT	07-23-12-21-34	t4570
MRI-155	GCACCAAAA	TACATGTCGT	07-23-12-21-17-34	t189
MRI-163	GCACCAAAA	TACATGTCGT	07-23	t605
MRI-166	GCACCAAAA	TACATGTCGT	07-23-12-21-17-34-34-34-33-34	t267
MRI-171	GCACCAAAA	TACATGTCGT	07-23-12-21-17-34-34-34-33-34	t267
MRI-172	GCACCAAAA	TACATGTCGT	07-23-12-21-17-34-34-34-33-34	t267
MRI-22	GCACCAAAA	TACATGTCGT	07-23-12-21-17-34-33-34	t224
MRI-3	GCACCAAAA	TACATGTCGT	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25	t008
MRI-32	GCACCAAAA	TACATGTCGT	07-17-34-34-34-33-34	t1965
MRI-34	GCACCAAAA	TACATGTCGT	07-17-34-34-34-33-34	t1965
MRI-35	GCACCAAAA	TACATGTCGT	26-16-23-31-29-29-17-17-25-16-28	t8265
MRI-36	GCACCAAAA	TACATGTCGT	07-17-34-34-34-33-34	t1965
NCTC-8325	GCACCAAAA	TACATGTCGT	11-19-12-12-21-17-34-24-34-22-25	t211

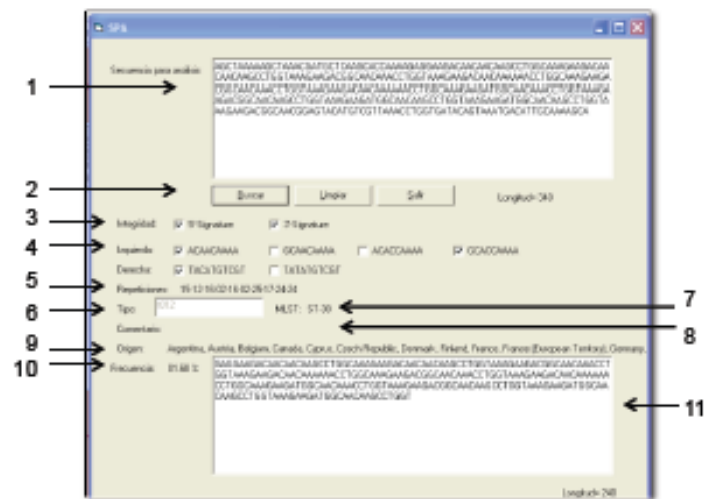


Figura 2. Imagen de salida de la pantalla de resultados de NiSpsa. La numeración se refiere en el texto.

adjudicar spa-tipos a 5 aislados, ya que en la combinación de repetidos hubo 2 aislados (MRI-171 y MRI-172) que presentan repetidos (designados con una X) los cuales indican la no concordancia con los SSR's registrados en la página web Ridom SpaServer y que por lo tanto, puedan ser SSR's nuevos, propios de los

aislados de bovinos, que deban registrarse. Para otros 3 aislados (MRI-14, MRI-23 y MRI-152), la secuencia de los repetidos no está registrada en la base de datos. La combinación de repetidos para cada aislado no identificado con NiSpsa son: MRI-14 (23-12-21-34), MRI-23 (23-12-21-17-34-33-34), MRI-152 (20-17),

MRI-171 (07-23-12-X-34-34-33-34) y MRI-172 (07-X-13-34-34-34-33-34). Las firmas oficiales 5' son 4 distintas: R(C o G)CA M(A o C)CA AAA habiendo otras 2 firmas 3': TAY(C o G) ATG TCG T en las reglas oficiales de Ridom SpaServer. En nuestros aislados se encontró una nueva firma 5' la cual es: GCACCAAAT, donde cambia la última A por una T, en la cepa MRI-171.

Discusión

El análisis de spa-typing depende primordialmente de las herramientas de internet. NiSpa ocupa la base de datos de Ridom SpaServer (<http://spa.ridom.de/>) que, aunque concentra la información de los spa-tipos no permite al usuario realizar comparaciones. Como alternativa existen dos herramientas en la red que dependen de Ridom SpaServer que son: SPA Searcher (SeqTools) (<http://seqtools.com/>) y Spa Typer/Analyzer (<http://fortinbras.us/cgi-bin/spaTyper/spaTyper.pl>) con las que se corroboraron los spa-tipo de los aislados, las firmas que lo flanquea y las secuencias de repetidos. Un aporte fundamental de Ridom SpaServer es que incluye datos epidemiológicos de los aislados y una relación de los perfiles genéticos obtenidos por las distintas técnicas utilizadas en *S. aureus* como Multilocus Sequencing Typing (MLST) (<http://saureus.mlst.net/>), la identificación por la secuencia parcial del gen ARN ribosomal 16S (SRV's) (<http://www.ridom-rdna.de/>), SCCmec typing (<http://www.staphylococcus.net/>) y de perfiles de macro-restricción en electroforesis de campos pulsados (PFGE; <http://www.harmony-microbe.net/microtyping.htm>). SPA Searcher y Spa Typer/Analyzer son herramienta que solamente manejan el análisis de secuencia de repetidos pero no ligan la base de datos de Ridom SpaServer con su información epidemiológica, al análisis de la secuencia de la región Xr. NiSpa aporta en una sola ventana el spa-tipo de la secuencia problema y toda su información epidemiológica relacionada encontrada en la base de datos internacional.

Para realizar la comparación de la información generada con la información contenida en las bases de datos es necesario utilizar programas bioinformáticos especializados. En la actualidad existe un aumento en la tendencia a crear programas de uso libre. Existen pocos programas especializados para el análisis global de datos de epidemiología molecular, como los spa-tipos en *S. aureus*. Hasta donde sabemos ninguno de ellos es de código abierto. NiSpa será el primer programa distribuido y desarrollado libremente cuya función principal será la detección del spa-tipo a partir de una secuencia curada de la región Xr del gen spa de *S. aureus*. NiSpa puede mostrar en una sola ventana la información epidemiológica relacionada, y permite la identificación de spa-tipos pudiendo trabajar sin necesidad de una conexión continua al internet.

Aunque NiSpa se operó en tres versiones de Windows, el programa está diseñado para trabajar en las versiones de Windows XP (x86) con Service Pack 3, Windows Vista (x86) con Service Pack 2 -, Windows 7 (x86), Windows Server 2003 (x86) con Service Pack 2, Windows Server 2003 R2 (x86), Windows Server 2008 (x86) con Service Pack 2, Windows Server 2008 R2 y la arquitectura de 32-Bit (x86). Los requerimientos del hardware son mínimos en cuanto a velocidad del procesador, memoria RAM

mínima de 512 MB, y solamente requiere 4 MB de espacio en disco duro. En su etapa de desarrollo actual, NiSpa solamente es capaz de identificar de manera independiente las secuencias firma y las secuencias de repetidos en los spa-tipos. Actualmente, se están desarrollando los códigos para incrementar las capacidades del software de manera que: 1) realice actualización automática de las bases de datos derivadas de la página <http://spa.ridom.de/>; 2) busque de manera independiente los SSR's individuales y 3) identifique las características de los posibles SSR's nuevos.

Referencias

- Baizabal-Aguirre VM, J Oviedo-Boyo, JJ Valdez-Alarcón, A Bravo-Patiño y M Cajero-Juárez (2009) Caracterización funcional de la interacción entre estructuras conservadas de *Staphylococcus aureus* y receptores celulares. En Bustos-Jaimes I, C Castañeda-Patlan, E Rendon-Huerta, H Reyes Vivas, Romero-Alvarez I (eds.), *Memoria Bioquímica Vol. XXIII*. Pp. 181-199.
- Bautista-Trujillo GU, JL Solorio-Rivera, I Rentería-Solórzano, SI Carranza-Germán, JA Bustos-Martínez, RI Arteaga-Garibay, VM Baizabal-Aguirre, M Cajero-Juárez, A Bravo-Patiño y JJ Valdez-Alarcón (2012) Performance of cultura media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of Medical Microbiology*. (En prensa) doi:10.1099/jmm.0.046284-0.
- Bustos-Martínez JA, A Hamdan-Partida y M Gutiérrez-Cárdenas (2006) *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomédica* 17: 287-305.
- Enright MC, NPJ Day, CE Davies, SJ Peacock y BG Spratt (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 1008-1015.
- Graveland H, B Duim, E van Duinkerken, D Heederik, y JA Wagenaar, JA (2011) Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. *International Journal of Medical Microbiology* 30: 630-634.
- Garofalo A, C Giái, S Lattar, N Gardella, M Mollerach, BC Kahl, K Becker, AS Prince, DO Sordelli, MI Gómez (2012) The length of *Staphylococcus aureus* protein A polymorphic region regulates inflammation: impact on acute and chronic infection. *Journal of Infectious Diseases*. 206: 81-90.
- Harmsen D, H Claus, W Witte, J Rothganger, D Turnwald y U Vogel (2003) Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using a novel software for spa repeat determination and database management. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 5442-5448.
- IWG-SCC, International Working Group on Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (2009) Classification of Staphylococcal Chromosomal Cassette mec (SCCmec): Guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53:4961-4967.
- Kim HK, AG Cheng, H Kim, DM Missiakas y O Shneewind (2010) Non-toxicogenic protein A vaccine for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in mice. *Journal of Experimental Medicine* 207:1863-1870.
- Maiden MCJ (2006) Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual Review of Microbiology* 60: 561-588.
- Rice DN (1997) *Using the California mastitis test (CMT) to detect*

Carlos Alfredo Carmona-Gasca et al

subclinical mastitis. Bulletin G81-556A. Nebguide Publication. University of Nebraska.

Shopsin B, M Gomez, SO Montgomery, DH Smith, M Waddington, DE Dodge, DA Bost, M Riehm, S Naidich y BN Krieswirth (1999) Evaluation of protein A gen polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of*

Clinical Microbiology 37:3556-3563.

Tamura K, D Peterson, N Peterson, G Stecher, M Nei y S Kumar (2011) MEGA 5: molecular evolutionary genetic analysis using maximum likelihood, evolutionary distances and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Anexo 2.

POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO (SNP'S) Y DE SECUENCIAS CORTAS REPETIDAS (SSR) EN REGIONES FUNCIONALES DEL GEN DE LA PROTEÍNA A (*spa*) DE *Staphylococcus aureus* ASOCIADO A ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

Francisco Ramón García Rodríguez¹, Ramón Ignacio Arteaga Garibay², Jaime Amadeo Bustos Martínez³, Víctor Manuel Baizabal-Aguirre¹, Alejandro Bravo-Patiño¹, Marcos Cajero-Juárez¹, Juan José Valdez-Alarcón¹
¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología UMSNH FMVZ, ²Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, ³Universidad Autónoma Metropolitana (Unidad Xochimilco).

Resumen.

Staphylococcus aureus es un agente patógeno exitoso que causa afecciones múltiples en distintas especies. El estudio de la variabilidad genética y funcional de los factores de virulencia con los que cuenta este patógeno es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias de control y caracterización epidemiológica. La proteína A de *S. aureus* (SpA) es un componente de pared que juega un papel importante en la virulencia. Se le ha involucrado en la activación de distintos receptores en las células eucariotas a las que invade, tal es el caso del Receptor 1 del Factor de Necrosis Tumoral o el receptor a Interferon gamma. Además, SpA tiene la peculiaridad de unirse a la región Fc de los anticuerpos, que es la que interactúa con los macrófagos, confiriéndole actividad anti-opsonizante. SpA cuenta con 5 dominios de unión a IgG y una región polimórfica denominada región X, que a su vez se encuentra formada por una serie de repetidos de un tamaño aproximado de 26 pb's (en *spa*) denominada región X_r y una región constante X_c las cuales son las responsables de interactuar con la membrana de *S. aureus* sirviendo como anclaje a esta. La región X_r se usa para la caracterización epidemiológica de *S. aureus*. Además se cuenta con una base de datos internacional, por lo cual se considera como único marcador molecular que es capaz de compararse con las técnicas consideradas como estándar de oro en la caracterización de este patógeno, sobre todo en el ámbito nosocomial. La presencia de polimorfismos en la región de SSRs del gen *spa* de *S. aureus* sugiere que en las demás regiones funcionales, pudieran encontrarse polimorfismos de nucleótido único (SNPs).

Introducción.

Mastitis bovina, un reservorio de *Staphylococcus aureus*.

La mastitis bovina se define como una infección aguda, sobreaguda o crónica de la ubre, causada por la invasión bacteriana de los conductos lácteos ascendentes a partir del pezón, de lo que resulta la alteración de la leche (Correa, 2007). Su impacto es en la producción animal, bienestar animal y la calidad de la leche producida. Esta enfermedad es probablemente la más costosa de las enfermedades infecciosas endémicas que afecta a las vacas y a otras especies lecheras (Hillerton y Berry, 2005).

La mastitis conduce a una disminución en la producción del 4 al 30% de leche y además disminuye su calidad, incrementa los costos del cuidado de la salud del hato y provoca un desecho prematuro de animales genéticamente mejorados (Bedolla, et al., 2008). La presentación más importante de esta enfermedad es la forma subclínica que no muestra evidencia de inflamación pero revela cambios en la composición de la leche (como el conteo de células somáticas, que son parte de la respuesta inflamatoria). La importancia de la mastitis, tanto por razones de salud humana como de salud animal, y los costos que este padecimiento representa en la economía del sistema de producción afectado, justifican la trascendencia del estudio de los diferentes procedimientos para la pronta y acelerada identificación de la glándula mamaria que sufre de mastitis subclínica (Blanco, 2001).

S. aureus es por mucho el patógeno más importante del género *Staphylococcus*, ya que este puede ser aislado en el medio ambiente y en las fosas nasales en un 20 al 40 % de adultos humanos (portadores sanos). Sin embargo, no ha sido posible estimar la cantidad de aislamientos ambientales de *S. aureus* que actúan como patógenos en los sistemas de producción lechera, debido a que no existen estudios de caracterización molecular de *S. aureus* en México que incluyan o delimiten distintos sistemas de ordeño. Graber et al (2009) demuestran que existen diferentes sub-tipos *S. aureus*, de los cuales algunos tienen una prevalencia mayor en casos de mastitis clínica y están genotípicamente relacionados.

S. aureus posee un alto grado de virulencia y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis. Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales. Provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del choque tóxico al liberar superantígenos al torrente sanguíneo. Además, causa septicemia, impétigo y fiebre (Bustos., 2006).

La proteína A de *Staphylococcus aureus*.

La proteína A (SpA) tiene un tamaño aproximado de 42-kDa y está covalentemente anclada a la pared celular de *S. aureus* a través de su grupo carboxilo terminal (Gómez et al 2006). La proteína A está compuesta por cinco dominios en tándem (E, D, A, B, C y X que se muestran en la Figura 1). La región X_r, contiene un número variable de Secuencias Cortas Repetidas (SSR) en

tándem conformadas cada una por 24 a 26 pb y es utilizada para caracterizar molecularmente los aislamientos de *S. aureus* (Shopsin *et al* 1999; Gómez *et al* 2006). Esta proteína es un factor de virulencia de *S. aureus* ya que tiene la propiedad de unirse a la Fracción cristalizable (Fc) de las Inmuno Globulinas (Ig), principalmente a la Inmuno Globulina "G" (IgG). Además es un activador del receptor al Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) lo cual promueve la inflamación (Gómez *et al*, 2006). Este factor de virulencia está presente en el 90 al 100% de aislamientos de *S. aureus*, provenientes de humanos, y en el 30% de los aislamientos en bovinos (Gómez *et al.*, 2006). La interacción con IgG en Fc "oculta" a *S. aureus* de la fagocitosis, debido a que la bacteria unida a IgG en una forma inapropiada no es reconocida por el receptor a Fc de los macrófagos, ocasionando una baja en la opsonización de los linfocitos. Además, el complejo SpA-IgG no puede estimular la fijación del complemento por la vía clásica (Gómez *et al.*, 2006).

En reportes actuales, Baum *et al* (2009) caracterizaron algunas cepas de *S. aureus*, que presentan eliminaciones en el gen *spa*, lo que generó que no fuera posible su caracterización por *spa*-typing. Esto se debió a que el oligonucleótido en 5' se encuentra en el dominio C, en el cual estas cepas presentan eliminaciones. A pesar de esto, dos de las cepas en el estudio se identificaron como incapaces de producir SpA, y no presentan cambios en su virulencia. También reportan dos cepas que secretan SpA al medio, sin cambios en su virulencia.

El gen *spa* presenta dos regiones polimórficas. Una de ellas es la región de las secuencias simples repetidas (SSR's) del dominio X cuya función aún no se ha descrito del todo, y la otra es la región de unión a IgG, que comprende una serie de regiones en tándem (regiones E, D, A, B y C) muy homólogas (Moks *et al* 1986), las cuales presentan indels y polimorfismos de nucleótido único (SNP's). Estas regiones también pueden ser utilizadas para la discriminación entre aislamientos de *S. aureus*.

Además de estas funciones, Martin *et al* 2009 generaron construcciones a partir de la región Xr (descrito en la Figura 1), utilizando cepas de tipo pandémico en EUA (USA 300 y Newman) más un par de aislamientos clínicos lograron determinar la activación de la señalización intracelular correspondiente la vía del Interferón (IFN).

spa-typing.

Esta técnica se basa en el análisis del polimorfismo de la región X del gen *spa* (Harmsen *et al* 2003). Esta región X consiste de un número variable de secuencias cortas repetidas (SSR's) con un tamaño de 24 pares de bases (24 pb) (Shopsin *et al* 1999).

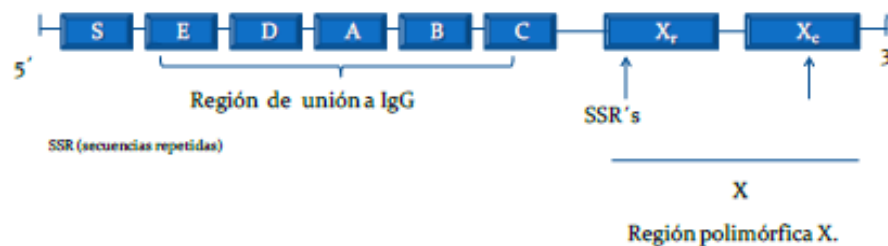


Figura 1. Esquema del gen de la proteína A. La región "S" es la secuencia de señalización en el extremo N-terminal. (Modificado de Shopsin *et al* 1999)

Esta técnica se usa en el ámbito nosocomial como un marcador molecular para la identificación *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (SARM), ya que teóricamente es una técnica sencilla y, de acuerdo con lo descrito por Harmsen *et al* (2003), la secuencia del gen *spa* se puede correlacionar con el análisis de secuencias de *loci* múltiples (MLST) de aislamientos identificados como SARM y rastrearlos, teniendo así una perspectiva rápida sobre las clonas circulantes en poblaciones con alto riesgo de infección.

Para la clasificación de las SSR's se usa una nomenclatura, en la que a cada repetido individual se le asigna un nombre (Tabla 1) y al conjunto de repetidos se le asigna un *spa*-tipo (Tabla 2). De esta forma se logra un conjunto de datos, que son analizados utilizando el software Ridom StaphType (<http://www.ridom.de/spaserver/>) y reportados a la base de datos mundial que actualmente cuenta con alrededor de 313 repetidos reportados y más de 100,000 *spa*-tipos encontrados.

Tabla 1. Ejemplo de repetidos. Aquí se muestra la relación entre algunos repetidos y su nombre asignado. La secuencia del repetido (rX) se le asigna un nombre representado al lado derecho, en la cual "X" recibe un número de forma aleatoria y "r" para identificar la región de la que se habla (www.Ridomspaserver.com).

Nombre asignado al repetido	Secuencia del repetido (rX)
r01	GAGGAAGACAACAACAAGCCTAGC
r02	AAAGAAGACAACAAAAACCTGGC
r03	GAGGAAGACAATAACAACCTGGT
r04	GAGGAAGACAATAACAAGCCTGGT
r05	AAAGAAGACAACAAAAAGCCTGGC
r06	AAAGAAGACGGCAAAAAACCTGGC
r07	GAGGAAGACAACAACAACCTGGT

Tabla 2. Relación entre las secuencias de repetidos y el tipo (o type "T") asignado. En este ejemplo es notable la variedad y cantidad de repetidos que se pueden encontrar en los SSR's. (Modificado de Harmsen *et al.*, 2003).

Tipos de spa (spa-types, TX)	Repetidos (rX)
01	r26r30r17r34r17r20r17r12r17r16
02	r26r23r17r34r17r20r17r12r17r16
03	r26r17r20r17r12r17r17r16
04	r09r02r16r13r13r17r34r16r34
05	r26r23r13r23r31r05r17r25r17r25r16r28
06	r26r23r13r23r31r05r17r17r25r16r28
08	r11r19r12r21r17r34r24r34r22r25
09	r11r12r21r17r34r24r34r22r24r34r22r33r25
10	r26r17r34r17r20r17r12r17r16
23	r26r37r17r12r17r16
26	r08r16r34
27	r26r17r13

Por otro lado, se han reportado aislamientos que no han podido caracterizarse mediante los spa-tipos. Baum *et al.* (2009) lo atribuye a que en algunos aislados, el gen spa presenta eliminaciones que impiden la amplificación de los SSR's. Debido a esto es importante caracterizar la funcionalidad del gen spa y de la región que codifica para la unión a IgG (El-Sayed *et al.*, 2006).

Justificación.

La proteína A de *S. aureus* es un factor de virulencia importante de esta bacteria, contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune o estimulando la respuesta inflamatoria. A cada una de las funciones anteriores se asocia una región específica de la proteína. Existen evidencias de que dichas regiones presentan polimorfismos en sus secuencias. Además, la región Xr del gen spa se ha utilizado como marcador para la caracterización de aislamientos de *S. aureus* de origen clínico debido a que presenta polimorfismos en SSRs. Por lo anterior, es importante caracterizar los polimorfismos presentes en cada una de las regiones funcionales del gen spa en aislamientos clínicos de diferente origen y evaluar la asociación de estos polimorfismos con la especificidad de hospedero o de patogenia. Al caracterizar el spa se puede vislumbrar en qué grado puede afectar SpA como factor de virulencia en las clonas circulantes ya que se aportan datos específicos acerca de los complejos clonales circulantes en poblaciones bovinas y el riesgo de salud que implican. Así mismo, se revelarán datos para que en un futuro generar anticuerpos específicos contra las clonas circulantes de *S. aureus* para dar pie a un tratamiento de este patógeno evitando el uso indiscriminado de antibióticos; ya que cada vez es más difícil combatirlo. Los anticuerpos se generarán contra los spa-tipos prevalentes en la región. Las bacterinas tradicionales funcionan temporalmente o localmente, debido a que nos e consideran los genotipos prevalentes de las bacterias que se quiere combatir.

En el laboratorio se analizaron 36 aislamientos de origen bovino de las localidades de Cotzio y Tájaro. De estos se han identificado al menos 7 alelos diferentes del

gen *spa* con base en el polimorfismo del tamaño de los productos de amplificación de la región *X_r*. Se está caracterizando la secuencia de estos fragmentos.

Hipótesis.

Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) presentes en la región de unión a Fc de las IgG's, en la región de activación de TNFR1, y los polimorfismos de secuencias cortas repetidas (SSRs) en la región *X_r* del gen de la proteína A (*spa*) de *Staphylococcus aureus*, se correlacionan con el tipo de hospedero y la patología.

Objetivo general.

- Identificar los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) y de secuencias cortas repetidas (SSRs) en el gen de la proteína A que se puedan asociar a la especificidad de hospedero o de patología.

Objetivos específicos.

- Caracterizar los SNPs de las regiones de unión a Fc y de activación de TNFR1 en aislamientos de *S. aureus* de origen bovino y humano.
- Caracterizar los SSRs de la región *X_r* de la proteína A en aislamientos de *S. aureus* de origen bovino y humano.
- Establecer correlaciones entre el polimorfismo de cada región y la patología o la especificidad de hospedero.

Materiales y Métodos.

Aislamientos bacterianos.

Se usaron aislamientos de *Staphylococcus aureus* obtenidos de muestras de leche de vacas con mastitis bovina ubicadas en el municipio de Tarímbaro, Michoacán. Se usaron también aislamientos donados de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, pertenecientes a una colección a cargo del D. C. Ramón I. Arteaga Garibay (25 aislamientos caracterizados como *S. aureus* y 43 por determinar su género). Todos los aislamientos serán caracterizados mediante secuenciación de la región variable 3 del ARN ribosomal 16S (Lee *et al.*, 1996).

Extracción de ADN genómico.

Se realizó un protocolo modificado respecto al descrito por Enright *et al* (2000). En éste se trabajó con un volumen menor (500 µl como máximo) y se usó Buffer TEN ^{30/1/1/00} (30mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100mM NaCl pH 8) Proteinasa K (20 mg) y SDS (1% v/v).

Amplificación de la región *X_r* del gen *spa*.

Se realizará de acuerdo con las condiciones descritas en la base de datos RidomStphtype. Se trabajará con un volumen de 50 µl, conteniendo ADN purificado, 200 µM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's), 10 pmol de cada oligonucleótido (mostrados en la Tabla 1) 1.25 U de DreamTaq™ Buffer (Fermentas), y 1.25 U de DreamTaq™ DNA polimerasa (Fermentas). Los ciclos térmicos serán los siguientes 95°C durante 5 min seguidos de 35 ciclos de 94°C

durante 45 s, 60°C durante 45 s y una extensión de 72 °C durante 90 s y una extensión final de 72°C durante 10 min.

Amplificación de la región de unión a IgG.

Para la amplificación de la región de unión a IgG, se usaron las mismas condiciones de PCR utilizadas para *spa*-typing, pero en este caso se usaron los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 1 en las condiciones anteriormente reportadas (El-Sayed *et al.*, 2006).

Además, se busca establecer un marcador propio para la región de unión a IgG, por lo que se generó un alineamiento del *spa* de los genomas publicados de *S. aureus* en NCBI.

Secuenciación.

La secuenciación se llevó a cabo por el método de Sanger *et al.* (1977) con los análogos de didesoxinucleótidos del kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction V 3.1 (Applied Biosystems). La polimerización se realizó en las condiciones siguientes: 1 ciclo por 5 min a 95°C; 25 ciclos de 0.5 min a 96°C, 0.5 min a 50°C y 4 min a 60°C; 1 ciclo sostenido de enfriamiento a 4°C. Los productos de polimerización se resolvieron en un secuenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer, con un tiempo de inyección de 30 segundos, y la electroforesis a 15 kV, 50°C y 45 minutos de corrida; en un capilar de 47 cm de longitud.

Análisis de datos.

La diversidad genética de los aislamientos analizados mediante *spa*-typing y análisis de la secuencias de la región de unión a Fc se establecerá calculando el índice de diversidad de Simpson (D). Para establecer la correlación entre los diferentes alelos y la asociación a hospederos, patologías o factores de riesgo se hará mediante un análisis de χ^2 y un análisis de regresión logística.

Identificación de Dominios.

Los dominios se identificaron mediante alineamientos de las respectivas secuencias con el software MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2011). Y comparándolas con las secuencias ya publicadas en el National Center of Biotechnology Information (NCBI).

RESULTADOS

spa-tipos encontrados de forma preliminar en la región de Cotzío y Tේjaro.

Las Tablas 3 y 5 muestran sólo algunos de los *spa*-tipos caracterizados en aislados de bovinos y que forman parte de una colección más grande. En la tabla 3, se muestran los *spa*-tipos sobre una colección generada en el 2006. En ella se muestran *spa*-tipos que por su estructura fácilmente identificable, pueden ser reportados a la base de datos de Ridom StaphType y que se describen con más detalle a continuación. En contraste en la Tabla 5 se muestran *spa*-tipos pertenecientes a una colección generada en el 2008, en estos se encuentran *spa*-tipos que no han podido ser definidos ya que carecen de secuencias conservadas que flanquean la región de los SSRs y se denominan secuencias firma o simplemente "firmas". En la Tabla 5 también se observan algunos repetidos nuevos.

Tabla 3. *spa*-tipos encontrados en una colección generada de aislamientos de bovinos.

Nombre	<i>spa</i> -tipo
ATCC27943	t008
MRI-3	t008
MRI-12	t224
MRI-22	t224
MRI-23	t224
MRI-32	t1065
MRI-34	t1065
MRI-35	t1065
MRI-36	t1065
NCTC8228	t211

De los *spa*-tipos referidos en la Tabla 3 destaca el de la cepa MRI-3, que es un t008. Este *spa*-tipo se encuentra reportado y relacionado con cepas SARM-AH y SARM-AC en Ridom StaphType. Lo que podría sugerir que el genotipo t008 es exitoso en términos de su rango de hospedero (afecta humanos y bovinos) y de la patología a la que se asocia (infecciones nosocomiales, adquiridas en comunidad, mastitis bovina). Por otro lado, se detectaron distintos *spa*-tipos que se relacionan con el genotipo denominado ST97 (Secuence Type 97), un genotipo descrito mediante MLST que se encuentra comúnmente asociado a aislados de *S. aureus* de origen bovino.

En la actualidad, el trabajo relacionado con la determinación de la resistencia a antibióticos que presenta un patógeno es de carácter obligatorio, así como su caracterización minuciosa, por lo que en colaboración con compañeros de trabajo se generaron anti-biogramas de acuerdo a criterios del Clinical Standards Laboratory Institute (CLSI) y los aislamientos se caracterizaron, previamente, por la técnica de MLST, y un **análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)** del gen de coagulasa, en combinación con los *spa*-tipos como se muestran en la Tabla 4, donde se definen claramente dos Complejos Clonales (grupos de STs que difieren en uno o dos alelos).

Tabla 4. MLST y *spa*-tipos de aislamientos de mastitis bovina. 1.- Origen; 2.- 1. Pen, Amp; 3. Pen, Amp, Tet. antibiograma (Resistencias 1.- P,AM; 2.- C; 3.- P, AM, Te.); 3.- Nivel de resistencia a penicilina (RM1. Sensible, RM2. Intermedia); CC, complejo clonal y Coa (Coagulo-tipo).

Nombre	spa-tipo	Origen	Anti-Biograma	Resist. Met.	CC	Coa
ATCC27543	t008	Bovino	R1	RM1	8	2
MRI-3	t008	Bovino	R1	RM1	8	1
MRI-12	t224	Bovino	R1	RM1	97	2
MRI-22	t224	Bovino	R1	RM2	97	1
MRI-23	t224	Bovino	R1	RM1	97	1
MRI-32	t1965	Bovino	R3	RM1	97	1
MRI-34	t1965	Bovino	R3	RM1	97	1
MRI-35	t1965	Bovino	R1	RM1	97	1
MRI-36	t1965	Bovino	R3	RM1	97	1
NCTC8325	t211	Humano	R1	RM1	8	1

Tabla 5. Relación de spa-tipos de la colección generada en el 2008 y pertenecientes a aislamientos de bovino. En esta colección se encuentran 5 spa-tipos, pero en la mayoría de los aislamientos se encontraron problemas al encontrar las firmas en ambos sentidos y en algunos casos se encuentran repetidos nuevos de los cuales no se tiene reporte.

Aislado	spa-tipo	Nota
MRI-147	t605	
MRI-148	¿t693?	Sin firma en 3'
MRI-149	07-23-12-34-34-X-34	Repetidos nuevos (X)
MRI-150	t4570	Sin firma en 3'
MRI-151	07-23-12-34-34-X-34	Repetidos nuevos (X)
MRI-152	20-17	Sin firma en 5'
MRI-153	07-X-13-34-34-34-33-34	Repetidos nuevos (X)
MRI-154	X-20-17	Repetidos nuevos (X)
MRI-155	t189	Sin firma en 3'
MRI-157	07-X-13-34-34-34-33-34	Repetidos nuevos (X)
MRI-158	07-X-13-34-34-34-33-34	Repetidos nuevos (X)
MRI-159	X-X-20-17	Repetidos nuevos (X)
MRI-160	X-X-X-X	Repetidos nuevos (X)
MRI-161	X-X-X-X	Repetidos nuevos (X)
MRI-163	t605	
MRI-164	t267	
MRI-170	t267	
MRI-171	07-23-12-34-34-X-34	Repetidos nuevos (X)
MRI-172	07-X-13-34-34-34-33-34	Repetidos nuevos (X)
MRI.173	t267	

Análisis de secuencias de genomas reportados en NCBI.

Para la generación de oligonucleótidos se realizó una búsqueda en NCBI de las SpA de los genomas reportados de *S. aureus* con el fin de observar las regiones que presentarían polimorfismos. En la Figura 4 se muestra una representación de las eliminaciones y SNP's detectados en los alineamientos generados a partir de

las secuencias de amino ácidos de SpA. En cuanto a los dominios de unión a IgG se encontró que en el dominio D se pueden encontrar un mayor número de polimorfismos asociados a eliminaciones. En el dominio A, se encuentran la mayor cantidad de SNP's que generan mutaciones. En la región X, el dominio Xr donde se encuentran las secuencias de repetidos, se observan la mayor cantidad de SNP's que representan mutaciones en el gen *spa*. Las regiones que se encuentran más conservadas en los alineamientos son la región E y la región Xc, una posible explicación sobre la conservación de estos dominios es la posición en que se encuentran; el dominio E se encuentra en el extremo N-terminal donde se encuentra el péptido señal para que la proteína sea trasladada a la membrana; y el dominio Xc se ancla covalentemente a la membrana externa de *S. aureus* donde SpA cumple su función por lo que su alto grado de conservación es necesario para que la proteína sea funcional.



Figura 4. Representación del gen de SpA. En la imagen se indican SNP's y eliminaciones representadas por la siguiente nomenclatura. "□" Eliminaciones . en líneas SNP's (mutaciones no silenciosas). Los oligonucleótidos diseñados para el estudio de este gen se encuentran indicados debajo.

Diseño de Oligonucleótidos o Primers

Con el fin de hacer un análisis sobre los polimorfismos encontrados en los distintos dominios del gen *spa* y el tipo de información que generaran, se procedió a utilizar el diseño de CODEHOPE, esto gracias al uso del software disponible en línea "primers4clades" (<http://floresta.eead.csic.es/primers4clades/index.html#0>) diseñado por Vinuesa *et al* el cual permite generar un mapeo de los amplicones generados por los primers (Figura 5); estos sugeridos por el software y de acuerdo con un modelo evolutivo utilizando filogenia de máxima verosimilitud. Como resultado se obtuvieron regiones delimitadas del gen, las cuales al ser analizadas generaran información sobre la evolución propia del factor de virulencia, esto aunado al hecho de determinar la afección o procedencia de las cepas analizadas podría utilizarse además como un indicador de patogenicidad.



Figura 5. Mapa de primers obtenidos por el software primers4clades. Este mapa fue diseñado a partir de un alineamiento generado a partir de la secuencia de aminoácidos de la Proteína A y obtenidos de la base de datos de NCBI, pertenecientes a aquellas cepas de las cuales se tiene la secuencia de aminoácidos y de *spa*. En la parte superior se muestra el posicionamiento de los

residuos de aminoácidos y en la parte inferior la localización de los primers, y un tamaño representativo del amplicon.

A pesar de que el programa primers4clades utiliza algoritmos que prueban termodinámicamente los primers que sugiere, se procedió a utilizar el software DNASTar para diseñar nuevos juegos de primers que amplifiquen la misma región que la sugerida por primers4clades, debido al uso de codones y además por mejorar la calidad del amplicón, dando como resultado los primers mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5. Primers diseñados para este estudio. En la tabla se muestra a la izquierda un código de identificación individual, en la parte central, las columnas muestran, primero el primer F (Delantero) y R (Reverso) seguidos en la parte derecha del tamaño del amplicón en pb (pares de bases).

	F	R	Tamaño del amplicón
Spa-1	ACGCTGCACCTAAGGCTAATGA	TGTCATTTACTGTATCACCA	203 pb
Spa-2	GCAGCAATTTTGTGACGAGTA	ACTTTTAGCTTCTGACAATAGGT	685 pb
Spa-3	AGCCGTTACGTTGTTCTTCAG	ATCAGCGTTTAAGTTAGGCATATT	725 pb

Discusión.

El trabajo presentado sugiere que en los aislados de *S. aureus* provenientes de casos de mastitis bovina, se identifican *spa*-tipos representantes de dos grandes complejos clonales (determinados mediante MLST, que han sido reportados por otros grupos como CC8 y CC97. El primero de ellos se asocia generalmente a infecciones en humanos y el segundo a infecciones en bovinos.

Además, los distintos *spa*-tipos encontrados pueden sugerir variaciones en la patogenicidad y virulencia de *S. aureus*, ya que SpA puede jugar un papel crucial en la patogénesis por *S. aureus*. Por lo que al determinar la homología de los dominios a unión a IgG de las cepas silvestres con aquellas que han funcionado como modelo de ensayos de infección, se espera generar una metodología para detectar a las cepas que poseen un mayor grado de patogenicidad y virulencia, determinando las cepas que representan mayor riesgo a la salud pública.

Al analizar los diversos dominios de *spa* se podrán localizar aquellas diferencias de SNP's que generen mutaciones no silenciosas y que puedan afectar la funcionalidad de SpA ya que se ha logrado demostrar que ciertas mutaciones sobre SpA alteran su función de manera.

Un punto importante en este estudio es la posibilidad de generar información que lleve a la generación de proteínas quiméricas que sean viables para su utilización en ensayos que permitan generar observaciones sobre la dinámica molecular ocasionada por SpA en la fisiología de las células de mamíferos. Esto es debido a que la información que se obtendrá de este trabajo generará una base de datos epidemiológica-molecular que será importante para puntualizar los tipos de construcciones que se deban generar para el estudio de la patogenia mediada por SpA en *S. aureus*.

El hecho de que en las secuencias de la región Xr del gen *spa* de aislados de bovinos se hayan encontrado repetidos como los reportados en la base de datos de Ridom SpaType pero que las secuencias-firma que flanquean los SSRs fueran divergentes, sugieren un origen polifilético de los aislados asociados a bovinos y humanos. La definición de nuevas secuencias-firma para bovinos permitirá integrar la caracterización de los aislados de origen bovino al sistema global de clasificación de Ridom SpaType

Bibliografía.

- Bedolla, C. C. Ponce de León, M. E. R. 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *Redvet* 9 (4): 1-26
- Blanco, O.M.A. 2001. Diagnóstico de la mastitis subclínica bovina. Memorias del III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. 21 al 23 de junio, León, Guanajuato, México.
- Baum C, Haslinger-Löffler B, Westh H, Boye K, Peters G, Neuman C, Kahl BC. 2009. Non-*spa*-Typeable Clinical *Staphylococcus aureus* Strains Are Naturally Occurring Protein A Mutants. *J. Clin. Microbiol.* p. 3624-3629.
- Bustos-Martínez J.A., Hamdan-Partida A., Gutiérrez-Cadenas M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev. Biomed.* 17: 287-305.
- Correa-Alarcón F., "Glosario de las principales enfermedades de los animales." <http://www.monografias.com/trabajos46/enfermedades-animales/enfermedades-animales.shtm> Consultada el 20 de Enero de 2009.
- Enright M.C., Day N.P.J., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.J. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1008-1015.
- El-Sayed A, Joachim A, Lämmle C, Jäger S, Wolter W, Castañeda-Vázquez. Estudio comparativo de las características genotípicas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica en México. *Vet Méx.* 37 (2) 2006.
- Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J., Kapur, V., 1997. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol. Infect.* 119, 261–269.
- Gómez I. M., O'Seaghda M., Magargee M., Foster T.J., Prince AS. 2006. *Staphylococcus aureus* Protein A Activates TNFR1 Signaling through Conserved IgG Binding Domains *J. Biol. Chemistry* Vol. 281, NO. 29, pp. 20190
- Harmsen D., Claus H., Witte W., Röthgänger J., Claus H., Tumwald D., Vogel U. 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by use of novel software for *spa* repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol.* 41:5442- 5448.

- Hernández, F. S. 2007. Factores de riesgo asociados a la prevalencia e incidencia de mastitis en el sistema de lechería familiar de Téjaro y Cotzio, Michoacán (Tesis de licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. p. 28
- Hillerton JE, y Berry EA. 2005. A review. Treating Mastitis in The Cow-a Tradition or an Archaism. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1250-1255.
- Löfdahl, S., B. Guss, M. Uhlen, L. Philipson, and M. Lindberg. 1983. Gene for staphylococcal protein A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:697-701.
- Simpson EH. 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163:688.
- Tamura K, Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011 MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. (en prensa) doi: 10.1093/molbev/msr121.