CARACTERIZACION DE *Staphylococcus aureus* MEDIANTE RIBOTIPIA.

Pilar Gómez-Lus[1], Francisco Adrián[1], Elena Gracía[2], Pilar Conchello[2], Beatriz Amorena[2] y Rafael Gómez-Lus[1].

[1] Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza. [2] CSIC - Unidad de Sanidad Animal SIA (DGA), Zaragoza.

Introducción.

Los últimos desarrollos en técnicas basadas en el genotipo han reducido la dependencia que se tenía en técnicas fenotípicas para el tipado intraespecifico de especies bacterianas. La principal ventaja de estas técnicas es que el genotipo de las bacterias es mucho más estable que el fenotipo. Varios métodos han sido utilizados para tipar *Staphylococcus aureus*: análisis del DNA total mediante enzimas de restricción, sondas de ácidos nucleicos, electroforesis en pulso y ribotipia (1).

La ribotipia se basa en la gran conservación del operón rRNA en el reino bacteriano. En el DNA cromosómico de las bacterias se hallan varias copias de los operones de rRNA, que comprenden los genes de las subunidades 23S rRNA, 16S rRNA y 5S rRNA, y algunos de los tRNA. La técnica básicamente consiste en: el DNA digerido, tras someterlo a electroforesis, es hibridado con una sonda marcada del DNA ribosómico de *Escherichia coli*. De esta manera se detectan los genes ribosómicos mediante señales en los sitios de migración de los fragmentos que los contengan. El patrón de bandas se denomina ribotipo (2).

Entre las posibles aplicaciones de la ribotipia, cabe destacar la identificación de cepas de distinto origen, las de un mismo origen y las variantes de la misma cepa. En este trabajo, se identifican por ribotipia cepas no productoras de exopolisacárido [NPE] procedentes de distintos aislamientos y variantes productoras de exopolisacárido [PE] obtenidas en nuestro laboratorio a partir de dichas cepas. El estudio se realizó bajo la hipótesis de que distintos aislamientos pueden dar lugar a diferentes ribotipos y de que, en principio, las variantes PE no deberían diferir de los aislamientos originales respectivos en cuanto a su ribotipo, a menos que las supuestas variantes PE fueran de hecho cepas contaminantes presentes en el laboratorio en lugar de verdaderas variantes PE de las cepas originales.

Materiales y métodos.

Cepas sometidas a estudio. Se han estudiado 13 aislamientos (cepas no productoras de exopolisacáridos, NPE) de *Staphylococcus aureus* aislados de

mamitis bovina (7), caprina (1) y ovina (5). A partir de cada uno de ellos, se ha obtenido una variante productora de exopolisacáridos [PE] según procedimiento descrito (3).

Ribotipia.El DNA cromosómico se aisló y purificó usando la técnica de Ish-Horowicz y Burke (4) con alguna modificación.

El resto de la técnica fue realizado según método descrito (5). El DNA fue digerido con *Hind* III. Transcurrido el tiempo de reacción, el DNA así digerido fue separado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. La electroforesis se llevó a cabo a 40 voltios durante 16 horas, después de las cuales se tiñó el gel con bromuro de etidio, se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta, y se fotografió.

El DNA del gel se transfirió a membranas de nylon mediante técnica de vacío. Una vez transferido el DNA se fijó a la membrana exponiéndolo a luz ultravioleta.

El plásmido pKK 3535 fue aislado mediante la técnica de Ish-Horowicz y Burke (4). El plásmido fue digerido con *Eco* RI. El DNA digerido fue purificado. Se desnaturalizó a 95 °C durante 10 minutos, y fue marcado con digoxigenina 11-dUTP mediante "random priming" según protocolo del fabricante.

La prehibridación se realizó a 60 °C durante 4 horas. Pasado este tiempo, se sustituyó la solución de prehibridación por la de hibridación y se incubó 24 horas a 60 °C. Una vez pasado el tiempo, se lavaron los filtros. Los resultados de la hibridación fueron visualizados mediante quimioluminiscencia utilizando Lumi-Phos 530 (Boehringer Mannheim).

Resultados.

Sin experiencia previa con el microorganismo con el que se va a trabajar, se recomienda probar al menos un conjunto de 10 enzimas con varias cepas tipo para demostrar cual de ellas permite el diferenciar mayor número de ribotipos. En nuesto caso no ha sido necesario ya que en un estudio realizado previamente con cepas de *S. aureus* de origen humano, se obsevó que de las enzimas probadas, *Hind* III era la que presentaba un mayor poder discriminatorio (F. Adrián, datos no publicados).

Al analizar los resultados obtenidos, se observó que el ribotipo era diferente para 8 de los 13 aislamientos. Uno de los ocho ribotipos apareció en dos aislamientos;ambos procedían de cepas aisladas de mastitis bovina. Se concluye que la ribotipia con la enzima *Hind* III puede distinguir algunos pero no todos los aislamientos de distinta procedencia.

Las variantes PE mostraron el mismo ribotipo que los aislamientos

originales respectivos [NPE] en 10 de los 13 casos estudiados (las 3 excepciones representan, posibles contaminaciones con cepas distintas a lo largo del proceso de obtención de variantes PE). Se concluye que la ribotipia con *Hind* III puede utilizarse en algunos casos para confirmar que la variante PE procede de la cepa original NPE (o viceversa) y no es el fruto de contaminaciones con cepas de distinto origen.

La ribotipia se presenta como una potencial herramienta en estudios epidemiológicos. Además, con los últimos avances se emplean otros métodos de detección como es el quimioluminiscente, dejando atrás las detecciones mediante radiactividad, que supone tomar mayores precauciones y disponer de un laboratorio adecuado. Por tanto la ribotipia quimioluminiscente es un método sencillo y asequible para cualquier laboratorio (6).

Referencias.

1. Tenover, F. C., R. Arbeit, G. Archer, J. Bidde, S. Byrne, et al. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 32: 407-415.

2. Stull, T. L., J. J. LiPuma, T. D. Edlind. 1988. A broad spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis 157: 280-286.

3. Baselga, R., I. Albizu, M. De la Cruz, E. Del Cacho, M. Barberán, B. Amorena. 1993. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. Infect Immun 61: 4857-4862.

4. Ish-Horowicz D., J. F. Burke. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. Nucleic Acids Res 9: 2989.

5. Gómez-Lus, P., B. S. Fields, R. F. Benson, W. T. Martin, S. P. O'Connor, C. M. Black. 1993. Comparison of arbitrarily primed PCR, ribotyping and monoclonal antibody for subtyping *Legionella pneumophila* serogroup 1. J Clin Microbiol 31: 1940-1942.

6. Gustaferro, C. A., D. H. Persing. 1992. Chemiluminiscent universal probe for bacterial ribotyping. J Clin Microbiol 30: 1039-1041.