

**Pontificia Universidad Católica del Ecuador**

Maestría en Biología Computacional

Proyecto de Titulación:

**ANÁLISIS FILOGENÓMICO DE *STAPHYLOCOCCUS***

***AUREUS***

Autor: María José Rengifo Lema

Director: Dr. Francisco Flores

Ecuador, Quito 2024

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	2
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	3
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	3
<b>1. RESUMEN</b> .....	4
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	13
<b>4. DISEÑO Y ALCANCE</b> .....	14
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	14
5.1. Objetivo general: .....	14
5.2. Objetivos específicos: .....	15
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	15
6.1. Preparación de Datos: .....	15
6.2. Blast (Basic Local Alignment Search School Tool) (Miruka et al., 2022): .....	16
6.3. Alineamiento múltiple de Secuencias: .....	17
6.4. Construcción de árboles filogenómicos .....	17
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	17
7.1. Alineamiento Múltiple de Secuencias .....	20
7.2. Árbol filogenómico .....	28
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	35

9. REFERENCIAS .....	38
----------------------	----

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Información de los 11 genomas que poseen el gen MecA de S. aureus. Estos datos fueron obtenidos de NCBI (National Library of Medicine).	17
<b>Tabla 2.</b> Información de los 11 genomas que poseen el gen blaZ de S. aureus. Estos datos fueron obtenidos de NCBI (National Library of Medicine).	18

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Perfil de Resistencia de aislados de S.aureus hospitalarios. Fuente: Tomado de (ANTIMICROBIANOS, 2018).	11
<b>Figura 2.</b> Alineamiento Múltiple de secuencias de genes MecA de S. aureus. (Programas utilizados: Clustal W y MAFFT)	22
<b>Figura 3.</b> Traducción de las secuencias del gen MecA de S. aureus a Proteínas	23
<b>Figura 4.</b> Alineamiento Múltiple de secuencias de genes blaZ de S. aureus. (Programas utilizados: Clustal W y MAFFT)	24
<b>Figura 5.</b> Traducción de las secuencias del gen blaZ de S. aureus a Proteínas.	25
<b>Figura 6</b> Árbol Filogenómico: Genomas de S. aureus que poseen genes de resistencia. Nombres de cepas de S. aureus resaltadas en color verde son genomas que poseen el gen MecA y resaltadas en color rosa, poseen el gen blaZ.	31

## 1. RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos es una amenaza seria para la salud pública, factores como el mal uso de antibióticos, la evolución espontánea y la transmisión de genes resistentes contribuyen significativamente a este problema. *Staphylococcus aureus* multirresistente, que posee el gen MecA asociado a la resistencia a meticilina, es una preocupación mundial, así mismo, esta bacteria posee otro gen de resistencia conocido como blaZ, que está relacionado con la resistencia a la bencilpenicilina. En Ecuador, las infecciones por *S. aureus* tienen una alta tasa de mortalidad, especialmente en cuidados intensivos y quirófanos. La filogenómica es esencial para comprender las relaciones evolutivas entre organismos y sus genes, y estudios demuestran que los genes MecA y blaZ han experimentado mutaciones, algunas de las cuales afectan su conservación, también, indica como la evolución de genes de resistencia en *S. aureus*, tiene patrones de transferencia lateral y vertical de genes. Como parte del planteamiento del problema se destaca la falta de estudios filogenómicos basados en la secuenciación de ADN de cepas de *Staphylococcus aureus* presentes en pacientes de hospitales o centros médicos en Ecuador. Por tal motivo, se propone un proyecto de investigación que utiliza secuencias de genomas que poseen genes de resistencia como MecA y blaZ, obtenidas de pacientes en Ecuador, para compararlas con secuencias de todo el mundo.

En relación con la parte metodológica, se llevó a cabo una preparación exhaustiva de datos que incluyó la búsqueda, selección y comparación de secuencias de genes de resistencia en *S. aureus*, seguida de alineamientos múltiples de secuencias y la construcción del árbol filogenómico para analizar la evolución de estas cepas en diferentes regiones del mundo.

El estudio se enfocó en analizar los genes MecA y blaZ en *Staphylococcus aureus*, utilizando datos de secuencias de diferentes regiones del mundo. Tras la preparación de

datos, se llevaron a cabo búsquedas BLAST y alineamientos múltiples de secuencias con MAFFT y Clustal W. Se construyó un árbol filogenómico, el cual expuso la conservación de los genes y su distribución geográfica, esto permitió discutir la posible transferencia horizontal de genes, la influencia de factores como la presión selectiva y el intercambio genético, y se compararon los resultados con investigaciones previas.

Los resultados indicaron una distribución global del gen *MecA*, sugiriendo transferencias horizontales frecuentes, mientras que el gen *blaZ* mostró agrupaciones específicas. La conservación de nucleótidos en ambos genes reveló baja variabilidad genética. Además, se identificaron patrones geográficos en la filogenia.

En conjunto, estos hallazgos proporcionan una comprensión general de la evolución de los genes de resistencia en *S. aureus*.

## **2. INTRODUCCIÓN**

La resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en una de las principales amenazas urgentes para la salud pública, lo que genera serios problemas para la prevención y el tratamiento exitosos de enfermedades persistentes. A pesar de las diferentes acciones tomadas en las últimas décadas para abordar este problema, las tendencias de la resistencia a los antimicrobianos global no muestran signos de desaceleración. El mal uso y el uso excesivo de diferentes agentes antibacterianos, así como en la industria agrícola, la evolución espontánea, la mutación de las bacterias y la transmisión de genes resistentes a través de la transferencia horizontal de genes contribuyen significativamente a la resistencia a los antimicrobianos. Muchos estudios han demostrado las desastrosas consecuencias financieras de este problema, incluidos los costos de atención médica extremadamente altos debido al aumento de los ingresos hospitalarios y el uso de medicamentos (Dadgostar, 2019).

*Staphylococcus aureus* multirresistente es una de las principales preocupaciones a nivel mundial. El gen *MecA* es responsable de la resistencia a meticilina junto con sus proteínas reguladoras que están incrustadas dentro del elemento genético móvil único llamado *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec) (John et al., 2019a). En cambio, la resistencia a la bencilpenicilina es producida principalmente por el gen *blaZ* que codifica la producción de beta-lactamasas, que destruyen hidrolíticamente a los beta-lactámicos (Godini & Fallahi, 2019).

Los estafilococos multirresistentes como *Staphylococcus aureus*, representan un grave problema para la salud humana porque en la mayoría de los casos tratar las enfermedades producidas por estos patógenos con antibióticos es complejo por la resistencia que se ha originado en contra de estos medicamentos. El mecanismo más importante de resistencia a la penicilina es la creación de betalactamasa que inactiva la penicilina por hidrólisis de su anillo betalactámico. Otro mecanismo está asociado con la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a), codificada por *MecA*. Además, un distinto gen implicado en la resistencia a la penicilina en estafilococos es *blaZ*, que codifica para la  $\beta$ -lactamasa (Duran et al., 2012). Genes resistentes codificados a partir de diferentes tipos y subtipos de elementos SCCmec altamente variantes y otras regiones no SCCmec; son la razón principal detrás de la rápida adaptación de *S. aureus* a diferentes ambientes (John et al., 2019b).

Hasta el momento, se conoce que en Ecuador la incidencia de infecciones ocasionadas por *S. aureus* genera una alta tasa de mortalidad a comparación con otros países cercanos como Colombia, Perú o Brasil. El patógeno *S. aureus* tiene la capacidad de colonizar diferentes zonas del cuerpo humano, por consiguiente, en un estudio realizado en un hospital de la ciudad de Quito, Ecuador, se demostró que la tasa de infecciones ocasionadas por este patógeno es de 1,03 x 1000 pacientes que fueron atendidos en ese

hospital, especialmente en el servicio de Cuidados Intensivos y Quirófano, lo que aumenta la mortalidad en los pacientes (Córdova et al., 2021).

Normalmente se cree que el problema de la resistencia a los antimicrobianos por parte de los patógenos, como *S. aureus*, se considera asociado únicamente con el uso excesivo o indebido de antibióticos en humanos. Sin embargo, la mayoría de las resistencias a los antimicrobianos se cree que probablemente sean casos de resistencia adquirida, a través de la transferencia lateral de genes de resistencia (Aminov & Mackie, 2007). Esto permite plantear una pregunta ¿Es posible entender la evolución y origen (historia) de la presencia del gen MecA y gen blaZ en *S. aureus* presente en una zona geográfica determinada, en este caso en el Ecuador, con la ayuda del análisis filogenético? La importancia del análisis filogenético se aplica no solamente a los organismos que albergan los genes, sino también a la historia evolutiva de los propios genes (Soltis & Soltis, 2003).

Se conoce que la filogenética es el estudio de la relación evolutiva entre grupos de organismos (Roy et al., 2014). En consecuencia, la selección natural se ha convertido en un tema importante para los biólogos moleculares, bioquímicos y virólogos porque esto les permite comprender las funciones de los nuevos genes mediante un estudio de los patrones de ubicaciones, estructura y expresiones (Long et al., 2013). Algunos estudios que utilizan enfoques filogenéticos/filogenómicos han identificado varios genes bajo selección positiva, especialmente genes involucrados en interacciones huésped-patógeno. Entonces podemos decir que la información sobre las secuencias de proteínas/nucleótidos de los organismos ancestrales es importante para identificar las sustituciones críticas que han causado algún cambio importante (Götesson et al., 2007).

La posición relativa de los nucleótidos dentro de un mismo gen se ha visto alterada por la inserción y eliminación de tramos de ADN a lo largo del tiempo. Los análisis genómicos deben basarse en comparaciones entre bases en sitios que coincidieron en un

antecesor común, por consiguiente, la alineación de secuencias de ADN es un requisito previo para prácticamente todos los análisis genómicos comparativos, incluida la identificación de motivos de secuencia conservados, la estimación de la divergencia evolutiva entre secuencias y la inferencia de relaciones históricas entre genes (Kumar & Filipowski, 2007).

Para la construcción de árboles filogenéticos/filogenómicos se consideran varios métodos, uno de ellos es el de máxima verosimilitud, el cual se considera un método bastante conocido para la construcción de árboles evolutivos. Este método se basa evaluar la probabilidad de un árbol hipotético para predecir las relaciones de las entidades de interés. Este modelo nos informa sobre todos los eventos evolutivos (observables o en secuencias ancestrales) que han ocurrido a lo largo de todo el árbol. Los modelos de sustituciones y reemplazos de nucleótidos son muy importantes en el método de verosimilitud (Godini & Fallahi, 2019).

El ADN es una molécula dinámica y adaptable, por lo que las secuencias de nucleótidos que se encuentra en él están sujetas a cambios como el resultado de un fenómeno llamado mutación. Hay que resaltar, que dependiendo de cómo o bajo que circunstancias ocurre la mutación está puede resultar en algunos casos útiles o inofensivas, pero en otros, altamente perjudicial(Heather & Chain, 2016). En los resultados del alineamiento múltiple de secuencias de los genes *MecA* y *blaZ*, se observó que las cadenas ADN de nucleótidos sufrieron algunas mutaciones por los cambios de nucleótidos observados, por ende, esto se vio reflejado en el porcentaje de conservación.

Una mutación es un cambio en la secuencia de nucleótidos de una región corta de un genoma, y los resultados fenotípicos pueden variar según la gravedad y la ubicación de la mutación. Las mutaciones pueden deberse a errores durante la replicación del ADN o ser inducidas por la exposición a sustancias químicas y radiación. Las mutaciones

espontáneas ocurren a una tasa de 1 en  $10^5$  a  $10^8$  y favorecen a la variación aleatoria de la población. Dado que las bacterias son haploides en la mayoría de sus genes y tienen un recambio generacional corto, la variación fenotípica debida a mutaciones puntuales puede ocurrir con relativa rapidez. Los resultados de las mutaciones pueden ocasionar cambios en las características estructurales o de las colonias o pérdida de sensibilidad a los antibióticos (Watford & Warrington, 2019). Algunas posibles consecuencias de las mutaciones son las siguientes:

- Mutantes resistentes: pueden resistir el estrés de la exposición a moléculas inhibidoras o antibióticos secundarios a una mutación adquirida (Watford & Warrington, 2019).
- Los mutantes reguladores tienen alteraciones en secuencias reguladoras como las regiones promotoras (Watford & Warrington, 2019).
- Mutantes constitutivos: expresan continuamente genes que normalmente se activan y desactivan como en los operones (Watford & Warrington, 2019).

Como es de conocimiento, los genes *MecA* y *blaZ*, son los causantes de la resistencia a los antibióticos y estos actúan a través de una variedad de mecanismos (Watford & Warrington, 2019):

1. Inhibidores de la síntesis de ADN.
2. Inhibidores de la síntesis de proteínas
3. Inhibidores de la síntesis de la pared celular.
4. Inhibidores de la síntesis de ARN
5. Inhibidores de la síntesis de ácido micólico.
6. Inhibidores de la síntesis de ácido fólico.

Cuando un antibiótico pierde la capacidad de matar o controlar el crecimiento bacteriano, se produce resistencia a los antibióticos. Esto puede ocurrir de dos maneras (Watford & Warrington, 2019):

1. A través de una mutación genética
2. Adquisición de resistencia de otras bacterias.

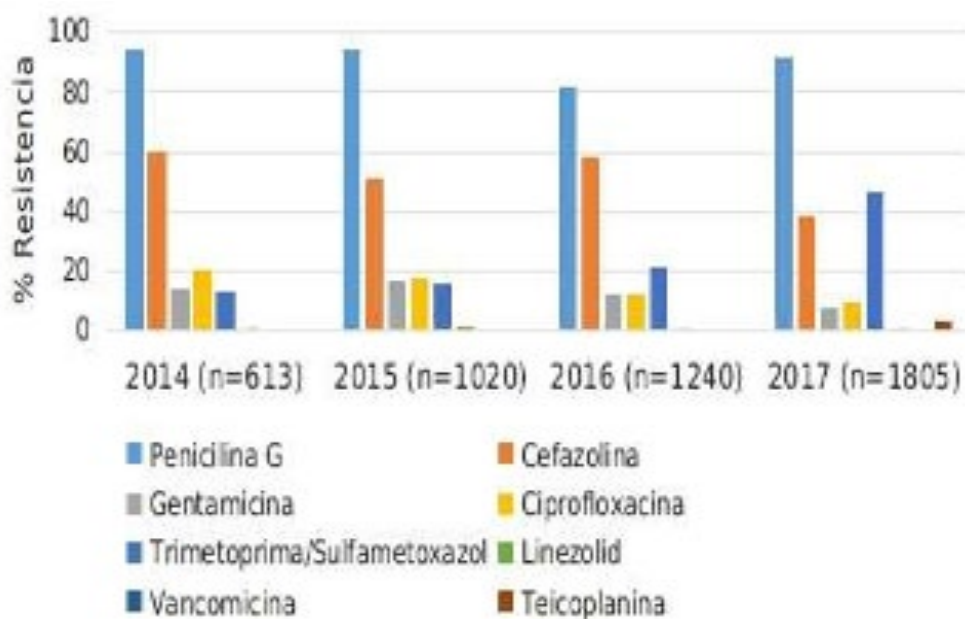
La resistencia a los antibióticos puede propagarse tanto vertical como horizontalmente en una población. La transferencia horizontal se considera el principal mediador de la resistencia a los antibióticos. Los mecanismos de resistencia a los antibióticos también pueden ocurrir mediante la incorporación de genes de resistencia en plásmidos y transposones, estos genes se propagan mediante transferencia horizontal mediante mecanismos de conjugación, transformación o transducción. Sin embargo, la mutación es esencial para la evolución o variedad de estos genes (Watford & Warrington, 2019). Para poder observar modificaciones o mutaciones en las secuencias seleccionadas para este estudio, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias.

En la actualidad no existe mucha información sobre un estudio filogenómico asociado con el gen *MecA* y el gen *blaZ* de *S. aureus* presente en el Ecuador, en consecuencia, la construcción de árboles filogenéticos/filgenómicos permite entender la evolución de estos genes, como han avanzado o se han desarrollado, para esto es necesario realizar una búsqueda de datos secuenciados de estos genes cuyo origen de país sea el de Ecuador y hacer un conjunto de procesos y análisis con la ayuda de herramientas bioinformáticas.

El origen del gen *MecA* y el gen *blaZ* sigue sin estar claro y encontrarlo es importante para comprender la evolución de *S. aureus* que ha tenido en el Ecuador. Además, puede contribuir a medidas de control más eficaces para disminuir la alta tasa de mortalidad en Cuidados intensivos de los Hospitales (Tsubakishita et al., 2010). A causa de lo antes dicho, es necesario realizar como primer paso, la identificación de un conjunto de

secuencias homólogas y la descarga de las mismas. Para el segundo paso, la alineación de esas secuencias y por último la construcción de un árbol filogenómico a partir de las secuencias alineadas, mediante el uso de los tres métodos utilizados con mayor frecuencia: Máxima verosimilitud, Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiano (Hall, 2013).

En Ecuador, *S. aureus resistente* se encuentra altamente asociado con infecciones en piel, tejidos blandos y bacteremias, dentro de zonas comunitarias y hospitalarias. Dentro de hospitales el antibiótico con mayor porcentaje de resistencia antimicrobiana es la penicilina con 87% y en segundo lugar está la cefazolina con 60%, estos datos corresponden hasta el 2017 (ANTIMICROBIANOS, 2018).



**Figura 1.** Perfil de Resistencia de aislados de *S.aureus* hospitalarios. Fuente: Tomado de (ANTIMICROBIANOS, 2018).

*Staphylococcus aureus* es uno de los microorganismos que comúnmente se aíslan en las infecciones asociadas a la atención sanitaria; en América Latina, más del 25% de los aislamientos de *S. aureus* son resistentes a la meticilina. El resultado es un 45,2% de exceso de mortalidad que se atribuye a la resistencia a la meticilina, en comparación con

las cepas susceptibles, y un aumento de los costes del tratamiento antibiótico (6,7 veces mayor) y de la hospitalización (casi 3 veces mayor) (J. B. Da Silva et al., 2020).

Como ya se mencionó anteriormente, la resistencia a los antibióticos puede ocurrir a través de un proceso de selección natural, en el que las bacterias resistentes permanecen, incluso en presencia del antibiótico, reproduciéndose (V. Silva et al., 2020). El problema de la resistencia a los antibióticos fue un tema a tratarse públicamente por primera vez a principios de la década de 1940, cuando se desalentó el uso excesivo de antibióticos. Lamentablemente, en muchos países estos medicamentos todavía están disponibles sin receta (V. Silva et al., 2020). El Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) estimó que, en 2018, el consumo de antibióticos de amplio espectro en la Unión Europea fue de 10,1 dosis diarias definidas por cada 1.000 habitantes. Además, según el ECDC, cada año se producen 33.000 muertes en la Unión Europea debido a infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos (V. Silva et al., 2020).

Los datos nacionales de 9 países africanos muestran tasas de *S. aureus* resistente aproximadas entre el 12 y el 80 %, y en algunos países que superan el 82 %. Por ejemplo, en África Oriental, se han registrado altas tasas de prevalencia de entre 31,5 y 42 % entre pacientes y trabajadores de la salud en Uganda, 31 a 82 % de prevalencia en Ruanda, y en 10 a 50% en estudios de Tanzania (Wangai et al., 2019).

En el estudio “Phylogenomic Analysis Reveals the Evolutionary Route of Resistant Genes in *Staphylococcus aureus*”, en donde para comprender mejor la evolución de los genes relacionados con la resistencia a los antibióticos en *S. aureus* (John et al., 2019c). Como resultados obtuvieron que el patrón de distribución de genes muestra claramente que los elementos SCCmec portadores de genes resistentes a antibióticos y sus reguladores no son exclusivos de *S. aureus*. También, las transferencias laterales de genes

no se limitaron a las especies de *Staphylococcus*, sino que genes resistentes únicos como blaZ, kmA y ble se adquirieron de linajes relacionados a distancia. En 130 genes resistentes no codificados por SCCmec, la mayoría de los genes resistentes codificados por cromosomas parecen heredarse verticalmente, mientras que los genes plasmídicos son más propensos a las transferencias laterales de genes. El análisis que realizaron, permite comprender mejor la evolución de los genes resistentes en las cepas de *S. aureus* (John et al., 2019c).

En otro estudio “Evidence for the evolutionary steps leading to mecA-mediated  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus*”, se indica que la resistencia se logró a través de cuatro mecanismos distintos: acumulación de sustituciones en un dominio específico de la proteína; diversificación del promotor del gen; adquisición de SCC *mec*, y adaptación del trasfondo genético. También, los resultados destacan los recursos que las bacterias primitivas utilizaron para prosperar en un entorno cambiante que ha llevado a las pandemias de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (Rolo et al., 2017).

En la publicación “Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci”, donde sus resultados indicaron una evolución separada para blaZ codificado por plásmidos y cromosomas. Aunque parece existir un acervo genético común entre los estafilococos, se considera que el intercambio de blaZ entre cepas y especies es un evento extremadamente raro (Olsen et al., 2006).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la actualidad existen numerosos estudios acerca de análisis filogenéticos/genómicos de varios genes de resistencia *S. aureus* relacionando estos análisis entre cepas del microorganismo y con otras especies. Pero no hay estudios de filogenia que se basen o tomen información de secuenciación de ADN de cepas de *S. aureus* presentes en pacientes de hospitales o centros médicos del país (Ecuador), por tal motivo se presenta

esta propuesta de proyecto de investigación, en donde se utilizó una secuencia del gen MecA y otra secuencia del gen blaZ provenientes del Ecuador, para compararlos con otras cadenas de nucleótidos secuencias en diferentes partes del mundo.

#### **4. DISEÑO Y ALCANCE**

En cuanto al diseño de esta investigación, se determina que es de tipo No Experimental y Transversal. En este proyecto de investigación se busca obtener información específica sin interponerse en las situaciones que se están estudiando. En este proyecto de investigación no se realizaron procedimientos experimentales bajo condiciones controladas en sujetos o situaciones de estudio, sino que se recopilieron datos a partir de muestras ya existentes, como secuencias de nucleótidos (genomas) previamente obtenidas de pacientes que se encuentran en el país, Ecuador, y en diversas partes del mundo.

El proyecto de investigación tiene un enfoque transversal porque se llevó a cabo en un solo momento del tiempo, recolectando secuencias de genomas ya secuenciadas provenientes del Ecuador (Quito) y de diversas partes del mundo. Por lo tanto, el propósito de este trabajo es describir y analizar la historia evolutiva de genomas de *S. aureus* que poseen genes de resistencia (gen MecA y gen blaZ). Para cumplir con el propósito de la investigación se utilizaron datos disponibles en la plataforma NCBI para poder realizar el estudio filogenómico.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo general:**

Determinar la historia evolutiva de genomas que poseen genes de resistencia (gen MecA y gen blaZ) de *Staphylococcus aureus*, responsables de generar resistencia antimicrobiana, mediante el uso de herramientas bioinformáticas.

## 5.2. Objetivos específicos:

- Obtener dos archivos de secuencias de nucleótidos/proteínas de genomas que contengan el gen MecA y el gen blaZ de *Staphylococcus aureus* a través del uso de plataformas o servidores web que permitan filtrar los datos de una zona geográfica específica, como Ecuador, para comparar cada secuencia de nucleótidos/proteínas obtenidas con otras secuencias similares de diferentes zonas geográficas del mundo.
- Realizar la búsqueda de secuencias de nucleótidos que posean el gen MecA y el gen blaZ de *Staphylococcus aureus* a través de una herramienta bioinformática para la construcción del árbol filogenómico.
- Comparar varias secuencias de nucleótidos/proteínas del gen MecA y el gen blaZ de *Staphylococcus aureus* a través del alineamiento múltiple de secuencias utilizando programas bioinformáticos para determinar las regiones en donde existan deleciones, inserciones o repeticiones (mutaciones).
- Construir un árbol filogenómico a partir de secuencias de nucleótidos/proteínas que contengan el gen MecA y el gen blaZ de *Staphylococcus aureus* basado en el método de máxima verosimilitud a través del uso de programas bioinformáticos para analizar el origen y evolución de estos genomas que poseen genes resistentes a los antibióticos.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Preparación de Datos:

Como primer paso se ingresó a la página de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Luego, en el panel de opciones, en All Databases, se escogió la opción de Nucleotide. En seguida, en el buscador de la página de NCBI, se colocó lo siguiente: MecA [All Fields] AND "Staphylococcus aureus"[Primary Organism] AND "Ecuador"[All Fields], esto con

la finalidad de filtrar las búsquedas, en total hubo 441 secuencias de nucleótidos (Jr. et al., 2023). El mismo proceso se realizó con respecto a la búsqueda de una secuencia del gen blaZ, por eso en el buscador se colocó lo siguiente: blaZ [All Fields] AND "Staphylococcus aureus"[Primary Organism] AND "Ecuador"[All Fields], para filtrar las búsquedas y así en total se encontró: 158 secuencias de nucleótidos (Jr. et al., 2023).

Posteriormente se escogió una secuencia con la que se va a trabajar, para ello, el Locus escogido fue: NZ\_LALC01000373, Country: Ecuador, Quito, para el caso del gen MecA (Planet et al., 2015). Para el caso del gen blaZ, la secuencia que se escogió y cuyo Locus fue: NZ\_LGXC01000007.1, Country: Ecuador, Quito (Arias et al., 2017).

## **6.2. Blast (Basic Local Alignment Search Tool) (Miruka et al., 2022):**

Del proceso anterior, con las secuencias seleccionadas, tanto para el gen MecA, como para el gen blaZ, se descargaron los respectivos archivos en formato fasta. Después, los archivos descargados se subieron en la plataforma de BLAST, específicamente en el panel de opciones desplegadas, en la opción: Upload file. En el mismo panel de opciones, en la parte Organism, se delimitó a: Staphylococcus aureus (taxid:1280), de la misma forma, en la sección de Max target sequences, se limitó a: 30 secuencias de genes con las que se va a realizar los análisis filogenómicos. Luego, se dejó correr el programa y una vez finalizado se descargó las secuencias en archivo formato FASTA. Este procedimiento se realizó tanto con el archivo descargado del gen MecA (NZ\_LALC01000373) y del archivo del gen blaZ (NZ\_LGXC01000007.1).

En total se trabajó con 30 secuencias homólogas del gen MecA y 30 secuencias homólogas del gen blaZ. Las 30 secuencias del gen MecA se descargaron en un solo archivo en formato fasta, lo mismo se hizo para las secuencias del gen blaZ.

### **6.3. Alineamiento múltiple de Secuencias:**

Para este proceso, se ingresó a la página de Galaxy: <https://usegalaxy.eu/>. En seguida, se cargó los dos archivos con las secuencias del gen MecA y del gen blaZ con las que se va a trabajar, esto se lo hizo en la opción Cargar Datos (Blankenberg et al., 2010). Luego, se seleccionó herramienta **MAFFT**, y en la sección Sequences to align, se escogió el archivo que posee las secuencias con las que se va a trabajar (Kato et al., 2019). Posteriormente, se eligió todas las opciones requeridas y se dejó correr la herramienta (Kato et al., 2019). Para visualizar los resultados del alineamiento múltiple de secuencias de MAFFT, se utilizó el programa Jalview 2.11.2.7. (Procter et al., 2021).

Por otro lado, se inició el programa bioinformático **MEGA** y en la opción, File/Open File, se cargaron los archivos de tipo fasta que se descargaron previamente de las secuencias en BLAST. Luego, se escogió la opción Alinear, luego la opción Edit>Select All> by **Clustal W** (Kumar et al., 2018). Una vez finalizado el proceso de alineamiento múltiple de secuencias por Clustal W, se guardó el proceso realizado en la opción Data>Export Alignmet>Mega/Fasta format. Para visualizar los resultados del alineamiento múltiple de secuencias de Clustal W, se utilizó el servidor web Clustal Omega: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>(Sahoo et al., 2022).

### **6.4. Construcción de árboles filogenómicos**

Para la construcción del árbol filogenómico se utilizó la herramienta bioinformática BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center). En la opción Tools and Services, se utilizó la opción Bacterial Genome Tree, en donde se utilizaron 36 genomas que poseen en gen MecA (29 genomas) y blaZ (7 genomas), los cuales fueron secuenciados en diferentes partes del mundo, incluido Ecuador (Olson et al., 2023).

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Datos de los genomas utilizados para la construcción de árboles filogenómicos y alineamiento múltiple de secuencias:

**Tabla 1.** Información de los 11 genomas que poseen el gen MecA de *S. aureus*. Estos datos fueron obtenidos de NCBI (National Library of Medicine).

<b>Locus del gen MecA</b>	<b>Longitud (pb)</b>	<b>Ciudad, País</b>	<b>Artículo Científico/ Referencia</b>
NZ_LALC01000373	3028	Ecuador	(Planet et al., 2015)
AP023034.1	2007	Japón	(Takadama et al., 2020)
CP053356.1	720	Estados Unidos	(Tickler et al., 2020b)
CP053353.1	2010	Estados Unidos	(Tickler et al., 2020a)
CP053639.1	2010	Estados Unidos	(Tickler et al., 2020a)
CP053636.1	720	Estados Unidos	(Tickler et al., 2020a)
CP053183.1	2010	China	(Sivaraman et al., 2021)
CP047021.1	2010	Dinamarca	(Bartels et al., 2021)
CP045468.1	2010	China	(Ji et al., 2020)
CP047802.1	720	Alemania	(Dilthey et al., 2020)
CP047863.1	720	Alemania	(Dilthey et al., 2020)
CP047861.1	720	Alemania	(Dilthey et al., 2020)
CP047854.1	720	Alemania	(Dilthey et al., 2020)
CP047803.1	720	Alemania	(Dilthey et al., 2020)
CP047859.1	720	Alemania	(Dilthey et al., 2020)
CP047865.1	720	Alemania	(Dilthey et al., 2020)
CP047804.1	720	Alemania	(Dilthey et al., 2020)
CP047867.1	720	Alemania	(Dilthey et al., 2020)
CP047856.1	720	Alemania	(Dilthey et al., 2020)
CP033085.1	720	China	(Chopjitt et al., 2021)
CP034008.1	2010	Israel	(Chopjitt et al., 2021)
CP034014.1	2010	Israel	(Chopjitt et al., 2021)
CP034011.1	2010	Israel	(Chopjitt et al., 2021)
CP034005.1	2010	Israel	(Chopjitt et al., 2021)
CP034002.1	2010	Israel	(Chopjitt et al., 2021)
CP033999.1	2010	Israel	(Chopjitt et al., 2021)
CP033996.1	2010	Israel	(Chopjitt et al., 2021)
CP034259.1	2010	Israel	(Chopjitt et al., 2021)

CP033990.1	2009	Israel	(Chopjitt et al., 2021)
------------	------	--------	-------------------------

Fuente: Elaboración propia

Las 30 secuencias homólogas del gen MecA, se obtuvieron luego del proceso realizado en BLAST. Estas secuencias tienen como origen de estudio y secuenciación en diferentes lugares del mundo como: Ecuador (América del Sur), Dinamarca (Europa), China (Asia), Alemania (Europa), Israel (Asia), Australia (Oceanía) y Japón (Asia), tal como se observa en la Tabla 1.

**Tabla 2.** Información de los 11 genomas que poseen el gen blaZ de *S. aureus*. Estos datos fueron obtenidos de NCBI (National Library of Medicine).

<b>Locus del gen blaZ</b>	<b>Longitud (pb)</b>	<b>Ciudad, País</b>	<b>Artículo Científico/ Referencia</b>
NZ_LGXC01000007.1	845	Ecuador	(Planet et al., 2015)
AP023035.1	845	Japón	(Takadama et al., 2020)
CP030542.1	846	Estados Unidos	(Sullivan et al., 2019)
CP030541.1	845	Estados Unidos	(Sullivan et al., 2019)
CP030464.1	846	Estados Unidos	(Sullivan et al., 2019)
CP030703.1	845	Estados Unidos	(Sullivan et al., 2019)
CP030394.1	845	Estados Unidos	(Sullivan et al., 2019)
NG_055999.1	845	Estados Unidos	(Highlander et al., 2007a)
CP127805.1	845	Australia	(Shaghayegh et al., 2023)
CP127815.1	845	Australia	(Shaghayegh et al., 2023)
CP127789.1	845	Australia	(Shaghayegh et al., 2023)
CP127606.1	845	Australia	(Shaghayegh et al., 2023)
CP127548.1	845	Australia	(Shaghayegh et al., 2023)
CP127542.1	845	Australia	(Shaghayegh et al., 2023)
CP089166.1	845	Estados Unidos	(Bragonzi, 2010)
CP049568.1	845	Estados Unidos	(Berbel Caban et al., 2020)
CP000732.1	845	Estados Unidos	(Highlander et al., 2007b)
CP030413.1	843	Estados Unidos	(Sullivan et al., 2019)
GQ900448.1	845	Australia	(Shearer et al., 1993)
LC377540.1	845	Taiwán	No publicado
CP048646.1	845	China	(Cai et al., 2015)
AP020323.1	845	Japón	(Hikichi et al., 2019)
NG_047533.1	845	Estados Unidos	(Kuroda et al., 2001)
CP013956.1	845	Corea del Sur	No publicado
CP109935.1	845	China	(Kuroda et al., 2001)
CP107529.1	845	China	No publicado
CP099496.1	845	China	(Zou et al., 2022)
CP099503.1	845	China	(Zou et al., 2022)

CP099509.1	845	China	(Zou et al., 2022)
CP080567.1	845	Corea del Sur	(Kim et al., 2019)

Fuente: Elaboración propia

Las 30 secuencias homólogas del gen blaZ, se obtuvieron luego del proceso realizado en BLAST. Estas secuencias tienen como origen de estudio y secuenciación en diferentes lugares del mundo como: Ecuador (América del Sur), Australia (Oceanía), Estados Unidos (América del Norte), Taiwán (Asia), China (Asia), Japón (Asia) y Corea del Sur (Asia) tal como se indica en la Tabla 2.

Las alineaciones de secuencias frecuentemente proporcionan la primera conexión entre el ADN recién secuenciados y las secuencias ya categorizadas, en este caso se utilizaron ya datos secuenciados dentro del Ecuador para buscar conexión con otros datos secuenciados en diferentes partes del mundo. La herramienta básica de búsqueda de alineación local Blast, es una de las opciones más populares para buscar y alinear secuencias (Boratyn et al., 2013).

Blast toma una secuencia de nucleótidos como entrada y la busca en una base de datos de secuencias de nucleótidos. Este programa bioinformático también provee estadísticas que estiman la probabilidad de que se produzca una coincidencia por casualidad. Las búsquedas son generalmente rápidas, en donde, la mediana del tiempo de búsqueda para consultas de longitud moderada (<2000 bases) en la colección de nucleótidos suele ser de ~4 s y, en general, la mediana del tiempo de búsqueda para el sitio web suele ser de 14 s (Boratyn et al., 2013). En este proceso, para la búsqueda realizada en este proyecto, los resultados tardaron entre 1-3 minutos. También, el porcentaje de similitud entre las secuencias relacionadas tanto al gen MecA como al gen blaZ, es del 100%.

### **7.1. Alineamiento Múltiple de Secuencias**

En este estudio se utilizó dos programas para el alineamiento múltiple de secuencias, en donde se conoce que en Clustal W, la parte más exigente de la estrategia de alineación

múltiple, en términos de procesamiento informático y uso de memoria, es la alineación de dos grupos de secuencias en cada paso de la alineación progresiva final. Para poder alinear secuencias muy largas en una cantidad razonable de memoria, se utiliza el algoritmo de programación dinámica de coeficiente de memoria de Myers y Miller. Una de las desventajas de este algoritmo es que no permite diferentes grados de apertura y extensión en cada posición (Thompson et al., 1994).

El programa detecta automáticamente y lee seis formatos de entrada de secuencias diferentes: EMBL/SwissProt, NBRF/PIR, Pearson/FASTA, GCG/MSF, GDE y alineaciones en formato CLUSTAL. Los tres últimos formatos permiten utilizar alineaciones más completas para calcular árboles filogenéticos/genómicos (Thompson et al., 1994).

El algoritmo básico de alineación múltiple consta de tres etapas principales:

- Etapa 1: Todos los pares de secuencias se alinean por separado para calcular una matriz de distancia que dé la divergencia de cada par de secuencia (Thompson et al., 1994).
- Etapa 2: Se calcula un árbol de guía a partir de la matriz de distancia (Thompson et al., 1994).
- Etapa 3: Estas secuencias se alinean progresivamente según el orden de ramificación en el árbol de guía (Thompson et al., 1994).

Por otro lado, en MAFFT, la demanda de alineamiento múltiple de secuencias (MSA) con un gran número de secuencias está aumentando junto con el avance de las tecnologías de secuenciación (Kato et al., 2002).

La versión actual de MAFFT utiliza la siguiente fórmula para calcular la distancia  $D_{ij}$  entre las secuencias  $i$  y  $j$  :

$$D_{ij} = (1 - S_{ij} / \min(S_{ii}, S_{jj})) / f(x, y)$$

**Ecuación 1** Calcular Distancias entre secuencias (Kato et al., 2002)

donde  $S_{ij}$  es la puntuación de alineación entre las secuencias  $i$  y  $j$ . En cuanto a  $f(x, y)$ , ajusta la distancia para evitar un caso en el que la distancia entre secuencias no relacionadas se vuelve cero cuando se comparan una secuencia larga y una secuencia corta (Kato et al., 2002).

Algunos de los métodos que se utilizan en MAFFT son:

- FFT-NS-2: Es la opción por defecto de MAFFT. En este método, después de realizar la FFT-NS-1, se recalculan una nueva matriz de distancias y un nuevo árbol guía basándose en el MSA y, a continuación, se construye el MSA final utilizando el nuevo árbol guía. En las pruebas de referencia, la precisión suele mejorar con el recálculo del árbol guía (Kato et al., 2019). Este fue el método utilizado en este proyecto de investigación, el cual es utilizado por defecto en la plataforma.









En la Figura 4 y 5, se muestra los resultados del alineamiento múltiple de secuencias y la traducción a proteínas de las mismas secuencias del gen *blaZ*. Como se puede observar, el nivel de conservación de los nucleótidos es alto, no hay mutaciones entre las secuencias. Esta alta conservación podría reflejar un período relativamente breve de evolución en donde hubo pocas mutaciones y que estos cambios han sido mantenidos (Ponting, 2017). Existen genes conocidos como esenciales porque son indispensables para el mantenimiento de los organismos y desempeñan papeles importantes en procesos celulares, por lo tanto, estos genes son más conservados evolutivamente (Luo et al., 2015). En este contexto, el gen *MecA* es el responsable de la resistencia a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *S. aureus*, este mecanismo se debe a la producción de la proteína fijadora PBP2a que está codificada por este gen. El gen *MecA* está compuesto por un conjunto de genes reguladores *mecl* y *mecR* y residen dentro de una isla genética móvil, el llamado cromosoma en casete estafilocócico *mec* (*SCCmec*) (Maltezou & Giamarellou, 2006). Aunque los elementos *SCCmec* son muy diversos en su organización estructural y contenido genético, el determinante *mecA* está muy conservado entre los estafilococos resistentes a la metilina (Meng et al., 2020). De la misma manera, la resistencia a los antibióticos mediante la producción de una enzima  $\beta$ -lactamasa, es también codificada por el gen *blaZ*, que hidroliza el anillo  $\beta$ -lactámico del antibiótico. El gen *blaZ* suele estar presente en plásmidos, pero también puede encontrarse en el ADN cromosómico de la bacteria. La expresión de *blaZ* está controlada por dos genes adyacentes, *blaI* y *blaRI*, siendo el primero un represor de la transcripción de *blaZ* y el segundo un antirrepresor (Rocha et al., 2022). Al igual que el gen *MecA*, estudios han demostrado que el gen *blaZ* es altamente conservado (Vesterholm-Nielsen et al., 1999). En cuanto a los diferentes métodos y algoritmos empleados por cada programa bioinformático, los resultados muestran que no existen variación entre los programas

utilizados debido a la alta conservación de los nucleótidos de las secuencias de los genes *MecA* y *blaZ*.

## 7.2. Árbol filogenómico

Primeramente, es necesario definir conceptos, como la definición de árbol filogenómico que no es más que un diagrama que representa las relaciones evolutivas entre organismos, en este caso se evalúa las relaciones evolutivas entre las diferentes cepas de *S. aureus*, y la evolución de estos a partir de ancestros comunes.

Partiendo de la raíz del árbol salen todas las ramas del árbol, y varios puntos de ramificación que se conocen también como nodos internos. Estos nodos internos representan eventos de divergencia o separación de un grupo en dos grupos descendientes.

Antes de continuar, es necesario puntualizar además que este árbol tiene politomías (*poli*, muchos; *tomía*, corte), lo que significa que un punto de ramificación tiene tres o más especies diferentes que surgen de él. Para una mejor comprensión del árbol se decidió nombrar los clados A, B y C. Un clado es conocido como un grupo monofilético o grupo natural, comienza con un antepasado en común y consta de todos sus descendientes formando una única rama en el árbol filogenético.

Los resultados de BLAST y del alineamiento múltiple de secuencias de los genes resistentes de *S. aureus* muestran que existe un porcentaje de identidad del 100% entre todas las accesiones, demostrando que no existen mutaciones (deleciones, inserciones, etc.). Estos resultados corroboran estudios realizados previamente, donde se ha observado que estos genes son altamente conservados. Para poder comprender la historia evolutiva de los genomas de *S. aureus* que contienen los genes de resistencia *blaZ* y *MecA*, se realizó un árbol filogenómico que incluye cepas secuenciadas en Quito, Ecuador, y en diferentes localidades del mundo. En la Figura 6, se encuentra el resultado del análisis

filogenómico, en donde, las cepas resaltadas de color verde son los genomas que poseen el gen de resistencia MecA (29 genomas) y las cepas resaltadas de color rosado son los genomas que poseen el gen de resistencia blaZ (7 genomas). La cepa *Staphylococcus aureus* strain E1470, fue secuenciada en Quito y además posee el gen de resistencia MecA. La cepa *Staphylococcus aureus* strain UE203, también fue secuenciada en la ciudad de Quito y además posee el gen de resistencia blaZ.

Como se ha mencionado con anterioridad, los genes resistentes codificados a partir de diferentes tipos y subtipos de elementos SCCmec altamente variantes y otras regiones no SCCmec; son la razón principal detrás de la rápida adaptación de *S. aureus* a diferentes ambientes.

### ***Clado A***

El clado A está conformado solo por tres cepas las cuales contienen el gen MecA, lo que evidencia la distribución de los genes MecA en cepas con ancestros comunes cercanos y lejanos, lo que podría indicar que los genes MecA han experimentado un intercambio frecuente dentro de la especie de *S. aureus*, prevaleciendo por encima del gen blaZ. Lamentablemente esto es solo una suposición y no puede ser demostrado por este árbol. Es necesario considerar también que los ancestros en común están representados en un árbol filogenómico por los nodos y la presencia de MecA en la mayoría de los nodos de este árbol es incierta, a pesar de que es muy probable que sí esté presente en la mayoría de los nodos.

Existen varios estudios que han investigado la presencia de los genes MecA y blaZ en *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, la prevalencia de estos genes puede variar dependiendo de la población de bacterias estudiada.

Por ejemplo, un estudio realizado en la Universidad Católica de Cuenca en Ecuador analizó la presencia de los genes blaZ y MecA en cepas de *Staphylococcus aureus*

aisladas de cajas multipropósito utilizadas por estudiantes de Odontología. En este estudio realizado por Andrade et al., en la Universidad Católica de Cuenca en el 2023 se identificó el gen *MecA* en dos cepas, mientras que el gen *blaZ* se encontró en todas las cepas. (Andrade et al., 2023)

Otro estudio realizado en China investigó la resistencia a los antibióticos y la genotipificación de *Staphylococcus aureus* obtenidos de animales de granja. En este estudio, se encontró que el 63.98% de las cepas de *S. aureus* portaban el gen *blaZ*, mientras que el 11.02% portaba el gen *MecA*. (Gan et al., 2021)

Estos estudios sugieren que la prevalencia de los genes *MecA* y *blaZ* puede variar considerablemente. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos resultados pueden no ser representativos de todas las poblaciones de *Staphylococcus aureus*, ya que la prevalencia de estos genes puede estar influenciada por factores como el uso de antibióticos y las prácticas de control de infecciones. Para obtener una imagen más completa, sería útil revisar más estudios y realizar análisis comparativos.

En este árbol se evidencia además una distribución universal del gen *MecA* ya que se usaron genomas de diferente ubicación geográfica, y se muestra la evolución filogenómica y filogeográfica del mismo, conservándose desde ancestros comunes más lejanos y prevaleciendo en ambos clados. Lo anterior podría ser el resultado de un intercambio frecuente de estos genes dentro de una misma especie de *Staphylococcus*. Las transferencias laterales de genes *MecA* no se limitaron dentro de las cepas de *Staphylococcus aureus* que estaban más relacionadas y que compartían ancestros comunes, sino que linajes más bien distantes compartían genes entre ellos.

El componente lateral de la evolución del genoma microbiano (LGT/HGT) ha desempeñado un papel esencial en la configuración del contenido del genoma bacteriano, así como en sus capacidades metabólicas. Estudios previos han señalado la importancia

de la transferencia horizontal de genes (HGT) y la recombinación, sobre todo en *S. aureus*. (Murray et al., 2017)

Existen varias teorías sobre el origen del gen MecA en *S. aureus*. Se encontró la presencia de un complejo mec-gen codificado por plásmidos (mecAm-mecRm-mecIm-blaZm) en una cepa de *Micrococcus caseolyticus* JSCS5402, lo que sugiere que los estafilococos patógenos humanos adquirieron genes mec de *Micrococcus* linaje. Otros estudios indicaron que los elementos SCCmec se ensamblan dentro de los estafilococos coagulasa negativos (CoNS), como *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Staphylococcus schleiferi* y luego se transfirieron a *S. aureus* (John et al., 2019a).

No podemos confirmar esto en nuestro estudio, pero sí es necesario tenerlo en cuenta para entender la gran prevalencia del gen MecA en todas las especies de estafilococos y particularmente en *S. aureus*.

Un gen se considera adquisición en *S. aureus* cuando es obtenido de una fuente externa (por lo general especies lejanas relacionadas) a través de un proceso llamado transferencia horizontal de genes (John et al., 2019a). Por ejemplo, el gen MecA, que confiere resistencia a la meticilina en *S. aureus*, es un ejemplo de un gen adquirido. Este gen no es endógeno de *S. aureus* y aun así se encuentra integrado en el cromosoma bacteriano.

### **Clado B**

Analicemos ahora, en el clado B, el nodo donde solo aparece un genoma con BlaZ y el resto con MecA. Como se mencionó con anterioridad, esto puede ser producto de la transferencia horizontal de genes, pero es común que existan nodos con genomas que tienen BlaZ junto con nodos que contienen MecA.

También es necesario resaltar que en este árbol la cepa UP1097 de Alemania parece ser un outgroup y la cepa M2024 forma un clado monotípico, compuesto por una sola cepa y que se ha decidido no señalar con letras.

El gen blaZ, que está presente en una única cepa del clado B en *Staphylococcus aureus* strain UE203, ausente en sus vecinos cercanos. Sin embargo, está ampliamente distribuido en cepas lejanas relacionadas como las que están en el clado C. Precisamente esta cepa *Staphylococcus aureus* strain UE203 que posee el gen blaZ ha sido secuenciada en Quito.

¿Puede este suceso interpretarse como que *Staphylococcus aureus* tiene un pangenoma abierto?

Un “pangenoma abierto” se refiere a aquel en el que se siguen añadiendo genes con cada genoma secuenciado adicional, lo que hace que sea imposible predecir el tamaño del pangenoma. El pangenoma de *S. aureus* es abierto ( $\alpha < 1$ ) y parece estar expandiéndose moderadamente con la inclusión de nuevos genomas (John et al., 2019a). La apertura del pangenoma y la presencia de elementos genéticos móviles en *S. aureus* es similar a la de muchas otras especies bacterianas, por ejemplo, *Escherichia coli*, que se sabe que tiene una capacidad esencial de adquirir nuevos genes en su genoma a través de transferencias entre especies (Touchon et al. 2009).

Algunos estudios plantean que los genes resistentes como blaZ (resistencia a los betalactámicos), kmA (resistencia a la kanamicina), tetK (resistencia a la tetraciclina) y ble (resistencia a la bleomicina) que se incrustan en los elementos SCCmec de *S. aureus* son algunos de los buenos ejemplos de genes transferidos lateralmente de especies no relacionadas lejanamente que no son *Staphylococcus*. Por ejemplo, *S. aureus* podría recibir el gen blaZ de *Geobacillus stearothermophilus*; una especie en la que no hay evidencia de cassette SCCmec pero filogenéticamente están mostrando una estrecha relación con *S. aureus* (John et al., 2019a).

Esto indica precisamente que la transferencia horizontal de genes especies cercanas y lejanamente relacionadas contribuyó en gran medida a la estructura actual del casete

SCCmec de *S. aureus*. El gen MecA fue objeto de múltiples transferencias laterales dentro de los miembros de la familia *Staphylococcaceae*.

### ***Clado C***

Es el clado más grande de este árbol, y es el que más contiene cepas con el gen blaZ. Precisamente la diversificación de genes en un mismo clado es una de las explicaciones de que este clado sea de mayor tamaño que los otros. También es posible plantear que las especies de este clado tengan mayor capacidad de adaptación y supervivencia.

Retomando el análisis de la presencia del gen blaZ llama considerablemente la atención la agrupación de los genomas blaZ en un solo nodo, en este caso en el clado C, presente en 6 cepas. ¿Qué tan frecuente es esto?

En el caso de *Staphylococcus aureus*, la presencia del gen blaZ podría influir en la agrupación de ciertos genomas en el árbol filogenético. Sin embargo, la agrupación de genomas en un árbol filogenómico depende de muchas características genéticas, no solo de la presencia de un solo gen. Por lo tanto, aunque es posible que los genomas que contienen blaZ se agrupen juntos, también podrían distribuirse en todo el árbol dependiendo de otras características genéticas.

Además, es importante tener en cuenta que los árboles filogenómicos son hipótesis, no hechos definitivos. La construcción de un árbol filogenómico se basa en la información recopilada acerca de este conjunto de especies, cosas como sus características físicas y la secuencia de ADN de sus genes.

Por lo tanto, aunque es posible observar tendencias generales, siempre hay un grado de incertidumbre y los resultados pueden variar dependiendo de la población de bacterias estudiada y los métodos utilizados para construir el árbol.

La distribución del gen blaZ en un árbol filogenómico de *Staphylococcus aureus* puede estar influenciada por varias características genéticas. Aquí hay algunos factores que podrían influir:

1. Origen del gen blaZ: Un estudio encontró que el gen blaZ existe en tres líneas evolutivas: una de origen plasmídico, una de origen cromosómico y una intermedia. Esto sugiere que la ubicación del gen blaZ (ya sea en el cromosoma o en un plásmido) podría influir en cómo se agrupan los genomas en el árbol filogenético. (Olsen et al., 2006)
2. Presión selectiva: La resistencia a los antibióticos puede surgir a través de mutaciones aleatorias o puede ser inducida artificialmente mediante la aplicación de una presión selectiva a una población, como sería el uso o abuso de antibióticos. Por lo tanto, la presión selectiva podría influir en la distribución del gen blaZ en el árbol filogenético ( Zendejas-Manzo et al., 2014).
3. Intercambio genético: *Staphylococcus aureus* tiene características genéticas que le permiten intercambiar genes con otras bacterias. Este intercambio genético podría influir en la distribución del gen blaZ en el árbol filogenético ( Zendejas-Manzo et al., 2014).

La distribución de los genes blaZ y mecA en un árbol filogenómico de *Staphylococcus aureus* puede variar dependiendo de varios factores, incluyendo la presión selectiva, el intercambio genético y la diversidad genética (como se mencionó con anterioridad). En un árbol filogenético, los nodos representan los ancestros comunes de los organismos que se están comparando. Por lo tanto, es posible que los genomas que contienen blaZ o mecA se agrupen juntos en ciertos nodos si comparten un ancestro común.

### ***Estructura geográfica***

Para culminar el análisis evaluemos la estructura geográfica del árbol, la mayoría de las especies con el gen *MecA* provenían de Alemania e Israel, patrón de distribución geográfica que coincide con investigaciones realizadas. La más relevante la realizada en el 2021 por Effelsberg et al. Para obtener más información sobre el origen y la diseminación de *S. aureus*, se reconstruyó el desarrollo temporal y espacial de los aislados con un análisis bayesiano para mostrar el origen geográfico más probable del linaje y de todos los subclados, así como estimaciones temporales para la aparición de nuevos clados basadas en las tasas de sustitución y los metadatos de los aislados en un árbol. En este estudio Alemania aparece como el lugar de origen, divergencia y transmisión de varias especies de *S. aureus*. (Effelsberg et al, 2020)

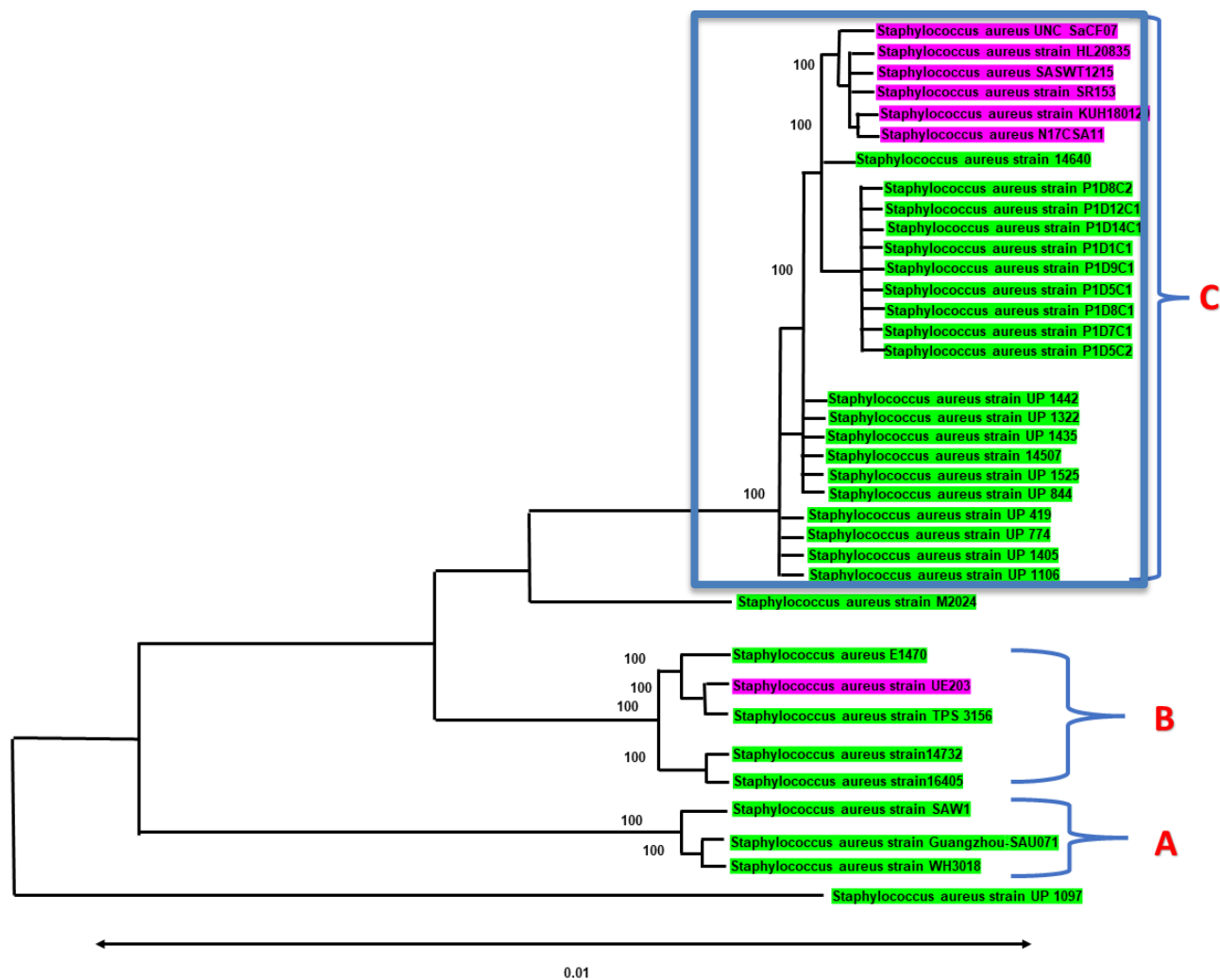
Aunque con diferentes prevalencias, el conjunto de datos de este estudio contenía especímenes aislados de *S. aureus* procedentes de seis continentes. Aunque se pueden encontrar aislados de diferentes regiones en todo el árbol, se observan ciertos grupos regionales dentro de la filogenia.

La filogenia de *S. aureus* con gen *MecA* se evidencia en este árbol en subgrupos geográficos (Alemania, Israel, Estados Unidos), similar sucede para *S. aureus* con gen *blaZ* (China, Estados Unidos). Solo una especie con gen *blaZ* fue identificada en Ecuador, *Staphylococcus aureus* strain UE203 y una especie con gen *MecA*, *Staphylococcus aureus* E1470.

## **8. CONCLUSIONES**

1. Se utilizó una herramienta bioinformática para buscar secuencias de nucleótidos que poseen los genes *MecA* y *blaZ*, y luego se construyó un árbol filogenómico, el cual mostró una distribución universal del gen *MecA*, sugiriendo transferencias horizontales frecuentes dentro de la especie *S. aureus*. La presencia del gen *blaZ* mostró una agrupación específica en ciertos nodos.

2. Se compararon varias secuencias de los genes *MecA* y *blaZ* mediante alineamiento múltiple, buscando deleciones, inserciones o repeticiones para identificar mutaciones, en donde se observó una alta conservación de los nucleótidos en los genes *MecA* y *blaZ*, lo que indica una baja variabilidad genética en estas secuencias.
3. Se construyó un árbol filogenómico basado en el método de máxima verosimilitud utilizando programas bioinformáticos y se estableció que factores como la presión selectiva, el intercambio genético y la diversidad genética pueden afectar la distribución de los genes en el árbol filogenómico. También, hubo patrones geográficos en la filogenia, con especímenes de *S. aureus* con *MecA* provenientes principalmente de Alemania e Israel, y con gen *blaZ* de China y Estados Unidos.
4. El estudio proporciona una visión general de la historia evolutiva de los genomas de *S. aureus* con genes de resistencia. La conservación de *MecA* y *blaZ* sugiere una presión selectiva constante. La transferencia horizontal y la variabilidad geográfica se destacan en la evolución de estos genes. La interpretación de la agrupación específica del gen *blaZ* requiere la consideración de múltiples factores como intercambio genético, presión selectiva y la diversidad genética.



**Figura 6** Árbol Filogenómico: Genomas de *S. aureus* que poseen genes de resistencia. Nombres de cepas de *S. aureus* resaltadas en color verde son genomas que poseen el gen *MecA* y resaltadas en color rosa, poseen el gen *blaZ*.

## 9. REFERENCIAS

- Aminov, R. I., & Mackie, R. I. (2007). Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 271(2), 147–161. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2007.00757.X>
- ANTIMICROBIANOS, I. N. D. I. E. S. P. R. D. D. D. R. A. L. (2018). *Resistencia antimicrobiana*. [https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta\\_ram2018.pdf](https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf)
- Andrade, C. F., Orellana, P. P., Reinoso, N., González, L. A., Toledo, K. M., & Vélez, P. A. (2023). Detection of blaZ and mecA genes and antimicrobial susceptibility in *Staphylococcus aureus* colonizing multipurpose boxes of dentistry students. *Genetics and Molecular Research*, 22(1), 1-9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4238/gmr19119>
- Andrade, C. F., Orellana, P. P., Reinoso, N., González, L. A., Toledo, K. M., & Vélez, P. A. (2023). Detection of blaZ and mecA genes and antimicrobial susceptibility in *Staphylococcus aureus* colonizing multipurpose boxes of dentistry students. *Genetics and Molecular Research*, 22(1), 1-9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4238/gmr19119>
- Arias, C. A., Reyes, J., Carvajal, L. P., Rincon, S., Diaz, L., Panesso, D., Ibarra, G., Rios, R., Munita, J. M., Salles, M. J., Alvarez-Moreno, C., Labarca, J., Garcia, C., Luna, C. M., Mejia-Villatoro, C., Zurita, J., Guzman-Blanco, M., Rodriguez-Noriega, E., Narechania, A., ... Seas, C. (2017). A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.00816-17>
- Bartels, M. D., Worning, P., Andersen, L. P., Bes, M., Enger, H., Ås, C. G., Hansen, T. A., Holzkecht, B. J., Larssen, K. W., Laurent, F., Mäkitalo, B., Pichon, B., Svartström, O., & Westh, H. (2021). Repeated introduction and spread of the MRSA clone t304/ST6 in northern Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(2), 284.e1-284.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2020.05.004>
- Berbel Caban, A., Pak, T. R., Obla, A., Dupper, A. C., Chacko, K. I., Fox, L., Mills, A., Ciferri, B., Oussenko, I., Beckford, C., Chung, M., Sebra, R., Smith, M., Conolly, S., Patel, G., Kasarskis, A., Sullivan, M. J., Altman, D. R., & van Bakel, H. (2020). PathoSPOT genomic epidemiology reveals under-the-radar nosocomial outbreaks.

- Genome Medicine*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S13073-020-00798-3>
- Blankenberg, D., Kuster, G. Von, Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., Nekrutenko, A., & Taylor, J. (2010). Galaxy: A Web-Based Genome Analysis Tool for Experimentalists. *Current Protocols in Molecular Biology*, 89(1), 19.10.1-19.10.21. <https://doi.org/10.1002/0471142727.MB1910S89>
- Boratyn, G. M., Camacho, C., Cooper, P. S., Coulouris, G., Fong, A., Ma, N., Madden, T. L., Matten, W. T., McGinnis, S. D., Merezhuk, Y., Raytselis, Y., Sayers, E. W., Tao, T., Ye, J., & Zaretskaya, I. (2013). BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), W29. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT282>
- Bragonzi, A. (2010). Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 300(8), 584–593. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2010.08.012>
- Cai, J. C., Hu, Y. Y., Zhou, H. W., Chen, G. X., & Zhang, R. (2015). Dissemination of the same cfr-carrying plasmid among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcal isolates in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), 3669–3671. <https://doi.org/10.1128/AAC.04580-14>
- Chopjitt, P., Wongsurawat, T., Jenjaroenpun, P., Boueroy, P., Kamjumhol, W., Hatrongjit, R., & Kerdsin, A. (2021). Draft Genome Sequence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Harboring Staphylococcal Cassette Chromosome mec Type IX, Isolated from a Fatal Bacteremic Pneumonia Case. *Microbiology Resource Announcements*, 10(30). <https://doi.org/10.1128/MRA.00616-21>
- Córdova, S. D. V., Pierard, S. M. C., & Jiménez, S. O. I. (2021). Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en el personal de salud de un Hospital de Especialidades en Quito-Ecuador. *Revista San Gregorio*, 0(45). <https://doi.org/10.36097/RSAN.V0I45.1515>
- Da Silva, J. B., Espinal, M., & Ramón-Pardo, P. (2020). Antimicrobial resistance: time for action. *Rev Panam Salud Publica*;44, Sept. 2020, 44. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.131>
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3903. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
- Dilthey, A. T., Meyer, S. A., & Kaasch, A. J. (2020). Ultraplexing: increasing the efficiency of long-read sequencing for hybrid assembly with k-mer-based multiplexing. *Genome Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S13059-020-01974-9>

- Duran, N., Ozer, B., Duran, G. G., Onlen, Y., & Demir, C. (2012). Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. *The Indian Journal of Medical Research*, *135*(3), 389. [/pmc/articles/PMC3361877/](https://doi.org/10.1186/s12917-021-02884-z)
- Gan, T., Shu, G., Fu, H., Yan, Q., Zhang, W., Tang, H., . . . Lin, J. (2021). Antimicrobial resistance and genotyping of *Staphylococcus aureus* obtained from food animals in Sichuan Province, China. *BMC Veterinary Research*, *17*(177), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02884-z>
- Effelsberg, N., Stegger, M., Peitzmann, L., Altinok, O., Coombs, G. W., Pichon, B., Kearns, A., Randad, P. R., Heaney, C. D., Bletz, S., Schaumburg, F., & Mellmann, A. (2020). Global Epidemiology and Evolutionary History of *Staphylococcus aureus* ST45. *Journal of clinical microbiology*, *59*(1), e02198-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.02198-20>
- Gan, T., Shu, G., Fu, H., Yan, Q., Zhang, W., Tang, H., . . . Lin, J. (2021). Antimicrobial resistance and genotyping of *Staphylococcus aureus* obtained from food animals in Sichuan Province, China. *BMC Veterinary Research*, *17*(177), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02884-z>
- Godini, R., & Fallahi, H. (2019). A brief overview of the concepts, methods and computational tools used in phylogenetic tree construction and gene prediction. *Meta Gene*, *21*, 100586. <https://doi.org/10.1016/J.MGENE.2019.100586>
- Götesson, A., Marshall, J. S., Jones, D. A., & Hardham, A. R. (2007). Characterization and Evolutionary Analysis of a Large Polygalacturonase Gene Family in the Oomycete Plant Pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, *56*(9), 907–921. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.9.907>
- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(5), 1229–1235. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MST012>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, *107*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2015.11.003>
- Highlander, S. K., Hultén, K. G., Qin, X., Jiang, H., Yerrapragada, S., Mason, E. O., Shang, Y., Williams, T. M., Fortunov, R. M., Liu, Y., Igboeli, O., Petrosino, J., Tirumalai, M., Uzman, A., Fox, G. E., Cardenas, A. M., Muzny, D. M., Hemphill, L., Ding, Y., . . . Weinstock, G. M. (2007a). Subtle genetic changes enhance

- virulence of methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-99>
- Hikichi, M., Nagao, M., Murase, K., Aikawa, C., Nozawa, T., Yoshida, A., Kikuchi, T., & Nakagawa, I. (2019). Complete Genome Sequences of Eight Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Patients in Japan. *Microbiology Resource Announcements*, 8(47), 1212–1231. <https://doi.org/10.1128/MRA.01212-19>
- Ji, S., Jiang, S., Wei, X., Sun, L., Wang, H., Zhao, F., Chen, Y., & Yu, Y. (2020). In-Host Evolution of Daptomycin Resistance and Heteroresistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains From Three Endocarditis Patients. *The Journal of Infectious Diseases*, 221(Suppl 2), S243–S252. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIZ571>
- John, J., George, S., Nori, S. R. C., Nelson-Sathi, S., & Pisani, D. (2019a). Phylogenomic Analysis Reveals the Evolutionary Route of Resistant Genes in *Staphylococcus aureus*. *Genome Biology and Evolution*, 11(10), 2917–2926. <https://doi.org/10.1093/GBE/EVZ213>
- Jr., T. S., Sindi, S., & Siström, M. (2023). Going through phages: a computational approach to revealing the role of prophage in *Staphylococcus aureus*. *Access Microbiology*, 5(6), 000424. <https://doi.org/10.1099/ACMI.0.000424>
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/BIB/BBX108>
- Kim, J. M., Kim, I., Chung, S. H., Chung, Y., Han, M., & Kim, J. S. (2019). Rapid Discrimination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by MALDI-TOF MS. *Pathogens* 2019, Vol. 8, Page 214, 8(4), 214. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS8040214>
- Kumar, S., & Filipski, A. (2007). Multiple sequence alignment: in pursuit of homologous DNA positions. *Genome Research*, 17(2), 127–135. <https://doi.org/10.1101/GR.5232407>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSY096>
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Kobayashi, N., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K. I., Nagai, Y., Lian, J. Q., Ito, T., Kanamori, M.,

- Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., ... Hiramatsu, K. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 357(9264), 1225–1240. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04403-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04403-2)
- Long, M., Vankuren, N. W., Chen, S., & Vibranovski, M. D. (2013). New Gene Evolution: Little Did We Know. *Annual Review of Genetics*, 47, 307. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-111212-133301>
- Luo, H., Gao, F., & Lin, Y. (2015). Evolutionary conservation analysis between the essential and nonessential genes in bacterial genomes. *Scientific Reports* 2015 5:1, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep13210>
- Maltezou, H. C., & Giamarellou, H. (2006). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(2), 87–96. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2005.11.004>
- Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., & Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed*, 25(3), 129-143. <https://doi.org/https://doi.org/10.32776/revbiomed.v25i3.42>
- Meng, X., Zhang, G., Sun, B., Liu, S., Wang, Y., Gao, M., Fan, Y., Zhang, G., Shi, G., & Kang, X. (2020). Rapid Detection of *mecA* and *femA* Genes by Loop-Mediated Isothermal Amplification in a Microfluidic System for Discrimination of Different *Staphylococcal* Species and Prediction of Methicillin Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01487/FULL>
- Miruka, S. A., Aboge, G. O., Macharia, R. W., Obiero, G. O., & Omwenga, I. M. (2022). Beta hemolysin gene of *Staphylococcus* phage 3AJ\_2017 genome is a suitable molecular marker for identification and characterization of pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Medicine and Science*, 8(2), 845–851. <https://doi.org/10.1002/VMS3.676>
- Murray, S., Pascoe, B., Méric, G., Mageiros, L., Yahara, K., D Hitchings, M., . . . Sheppard, S. K. (2017). Recombination-Mediated Host Adaptation by Avian *Staphylococcus aureus*. *Genome biology and evolution*, 9(4), 830–842. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/gbe/evx037>
- Olsen, J. E., Christensen, H., & Aarestrup, F. M. (2006). Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 450–460. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKI492>

- Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J. J., Dempsey, D. M., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Kenyon, R. W., Kuscuoglu, M., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Machi, D., Macken, C., Mao, C., Niewiadomska, A., Nguyen, M., Olsen, G. J., ... Stevens, R. L. (2023). Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D678. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC1003>
- Planet, P. J., Diaz, L., Kolokotronis, S. O., Narechania, A., Reyes, J., Xing, G., Rincon, S., Smith, H., Panesso, D., Ryan, C., Smith, D. P., Guzman, M., Zurita, J., Sebra, R., Deikus, G., Nolan, R. L., Tenover, F. C., Weinstock, G. M., Robinson, D. A., & Arias, C. A. (2015). Parallel Epidemics of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Infection in North and South America. *The Journal of Infectious Diseases*, *212*(12), 1874–1882. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIV320>
- Ponting, C. P. (2017). Biological function in the twilight zone of sequence conservation. *BMC Biology*, *15*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12915-017-0411-5/FIGURES/6>
- Procter, J. B., Carstairs, G. M., Soares, B., Mourão, K., Ofoegbu, T. C., Barton, D., Lui, L., Menard, A., Sherstnev, N., Roldan-Martinez, D., Duce, S., Martin, D. M. A., & Barton, G. J. (2021). Alignment of Biological Sequences with Jalview. *Methods in Molecular Biology*, *2231*, 203–224. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7_13)
- Rocha, G. D., Nogueira, J. F., Gomes dos Santos, M. V., Boaventura, J. A., Nunes Soares, R. A., José de Simoni Gouveia, J., Matiuzzi da Costa, M., & Gouveia, G. V. (2022). Impact of polymorphisms in blaZ, blaR1 and blaI genes and their relationship with  $\beta$ -lactam resistance in *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Microbial Pathogenesis*, *165*, 105453. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2022.105453>
- Rolo, J., Worning, P., Boye Nielsen, J., Sobral, R., Bowden, R., Bouchami, O., Damborg, P., Guardabassi, L., Perreten, V., Westh, H., Tomasz, A., de Lencastre, H., & Miragaia, M. (2017). Evidence for the evolutionary steps leading to mecA-mediated  $\beta$ -lactam resistance in staphylococci. *PLOS Genetics*, *13*(4), e1006674. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1006674>
- Roy, S. S., Dasgupta, R., & Bagchi, A. (2014). A Review on Phylogenetic Analysis: A Journey through Modern Era. *Computational Molecular Bioscience*, *04*(03), 39–45. <https://doi.org/10.4236/CMB.2014.43005>
- Sahoo, S., Routray, S. P., Nayak, D. S. K., & Swarnkar, T. (2022). An Enhanced Web-based Tools for Multiple Sequence Alignment: A Comparative Approach. *ICAN*

- 2022 - 3rd International Conference on Computing, Analytics and Networks - Proceedings. <https://doi.org/10.1109/ICAN56228.2022.10007275>
- Shaghayegh, G., Cooksley, C., Bouras, G., Nepal, R., Houtak, G., Panchatcharam, B. S., Fenix, K. A., Psaltis, A. J., Wormald, P. J., & Vreugde, S. (2023). Staphylococcus aureus biofilm properties and chronic rhinosinusitis severity scores correlate positively with total CD4+ T-cell frequencies and inversely with its Th1, Th17 and regulatory cell frequencies. *Immunology*. <https://doi.org/10.1111/IMM.13655>
- Shearer, B. G., Summers, A. O., Wireman, J., Billard, L., Bennett, S., Lorscheider, F. L., Vimy, M. J., Levy, S. B., & Marshall, B. (1993). Dental amalgam and multiple antibiotic resistance: an untested hypothesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(8), 1730. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.8.1730>
- Silva, V., Capelo, J. L., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). Molecular Epidemiology of Staphylococcus aureus Lineages in Wild Animals in Europe: A Review. *Antibiotics* 2020, Vol. 9, Page 122, 9(3), 122. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9030122>
- Sivaraman, G. K., Sivam, V., Ganesh, B., Elangovan, R., Vijayan, A., & Mothadaka, M. P. (2021). Whole genome sequence analysis of multi drug resistant community associated methicillin resistant Staphylococcus aureus from food fish: detection of clonal lineage ST 28 and its antimicrobial resistance and virulence genes. *PeerJ*, 9. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.11224/SUPP-3>
- Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2003). The Role of Phylogenetics in Comparative Genetics. *Plant Physiology*, 132(4), 1790. <https://doi.org/10.1104/PP.103.022509>
- Sullivan, M. J., Altman, D. R., Chacko, K. I., Ciferri, B., Webster, E., Pak, T. R., Deikus, G., Lewis-Sandari, M., Khan, Z., Beckford, C., Rendo, A., Samaroo, F., Sebra, R., Karam-Howlin, R., Dingle, T., Hamula, C., Bashir, A., Schadt, E., Patel, G., ... Van Bakel, H. (2019). A Complete Genome Screening Program of Clinical Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates Identifies the Origin and Progression of a Neonatal Intensive Care Unit Outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(12). <https://doi.org/10.1128/JCM.01261-19>
- Takadama, S., Nakaminami, H., Kaneko, H., & Noguchi, N. (2020). A novel community-acquired MRSA clone, USA300-LV/J, uniquely evolved in Japan. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(11), 3131–3134. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA313>
- Tickler, I. A., Goering, R. V., Dewell, S., Le, V. M., Johar, L., Obradovich, A. E., & Tenover, F. C. (2020a). Mobile genetic elements responsible for discordant

- Staphylococcus aureus phenotypes and genotypes in the same blood culture bottle. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 98(4). <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2020.115175>
- Tickler, I. A., Goering, R. V., Dewell, S., Le, V. M., Johar, L., Obradovich, A. E., & Tenover, F. C. (2020b). Mobile genetic elements responsible for discordant Staphylococcus aureus phenotypes and genotypes in the same blood culture bottle. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 98(4). <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2020.115175>
- Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T., & Hiramatsu, K. (2010). Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4352–4359. <https://doi.org/10.1128/AAC.00356-10>
- Vesterholm-Nielsen, M., Ølholm Larsen, M., Elmerdahl Olsen, J., & Møller Aarestrup, E. (1999). Occurrence of the blaZ gene in penicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 40(3), 279–286. <https://doi.org/10.1186/BF03547026>
- Wangai, F. K., Masika, M. M., Maritim, M. C., & Seaton, R. A. (2019). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in East Africa: Red alert or red herring? *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12879-019-4245-3/FIGURES/2>
- Watford, S., & Warrington, S. J. (2019). Bacterial DNA Mutations. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459274/>
- Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., & Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed*, 25(3), 129-143. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v25i3.42>
- Zou, G., Matuszewska, M., Jia, M., Zhou, J., Ba, X., Duan, J., Zhang, C., Zhao, J., Tao, M., Fan, J., Zhang, X., Jin, W., Cui, T., Zeng, X., Jia, M., Qian, X., Huang, C., Zhuo, W., Yao, Z., ... Zhou, R. (2022). A Survey of Chinese Pig Farms and Human Healthcare Isolates Reveals Separate Human and Animal Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Populations. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 9(4). <https://doi.org/10.1002/ADVS.202103388>