

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO RESISTENTES ADQUIRIDOS EN LA COMUNIDAD, MEDIANTE LA TÉCNICA DE *MULTILOCUS SEQUENCE TYPING* (MLST)

Pereyra Vidoni, Camila Evangelina^A

^ACátedra de Bacteriología Clínica – FBCB – UNL

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Bioquímica

Grupo: X

Palabras clave: secuenciotipo, SAMR-AC, clones

INTRODUCCIÓN

Las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (SAMR) han sido ampliamente reportadas alrededor del mundo, tradicionalmente asociadas al ámbito intrahospitalario, actualmente denominado “asociado a cuidados de la salud” (*healthcare associated*, SAMR-AH). Sin embargo, en los últimos quince años se han reportado infecciones causadas por este patógeno en pacientes con escaso o ningún contacto con el ámbito hospitalario (adquirido en la comunidad, SAMR-AC)

Las cepas pertenecientes al grupo SAMR-AC se asocian principalmente con infecciones de piel y partes blandas (PPB) y muestran una escasa resistencia a antibióticos no beta-lactámicos. Se diferencian genéticamente de las SAMR-AH por presentar el gen codificante de la leucocidina de Pantón Valentine (PVL) y el tipo de cassette *SCCmec* IV o V (Fernández y col., 2013). Además, se asocian a linajes genéticos específicos, determinados con la técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) con diferente distribución geográfica (Monecke y col., 2011).

Existen reportes que comunican una fuerte asociación entre el tipo de proteína A (*spa*) y el secuenciotipo determinado por MLST (<http://www.spaserver.ridom.de/>).

En nuestro país se han reportado dos clones circulantes con elevada prevalencia: SAMR-AC ST5-*SCCmec* IVa-LPV⁺ (Gardella y col., 2008 y 2011; Sola y col., 2008 y 2012) y más recientemente el clon SAMR-AC ST30-*SCCmec* IVc-LPV⁺ (Egea y col., 2014; Fernández y col., 2014).

Los objetivos del presente trabajo fueron avanzar en la caracterización molecular, mediante la aplicación de la técnica de MLST, de SAMR-AC clínicamente significativos, e identificar los clones circulantes en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia durante el año 2013.

METODOLOGÍA

Aislamientos bacterianos

Se estudiaron 22 aislamientos de *Staphylococcus aureus* provenientes de pacientes que asistieron al Hospital J. M. Cullen de la ciudad de Santa Fe durante el primer trimestre del año 2013, conservados en el cepario del laboratorio de la Cátedra de Bacteriología Clínica. Estos aislamientos fueron estudiados genotípicamente en investigaciones previas por el equipo de la Cátedra.

Para el presente trabajo se seleccionaron 12 aislamientos identificados como SAMR-AC en base a datos clínicos de los pacientes (procedencia ambulatoria con infecciones de PPB), datos fenotípicos de los aislamientos (resistencia a no más de un antimicrobiano no beta lactámico) y sus características genotípicas (PVL⁺, tipo de cassette *SCCmec* IV). Analizando el tipo de *spa* de cada uno de estos aislamientos, se Proyecto: “Investigación de la diversidad de aislamientos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes provenientes de muestras obtenidas en centros de salud de Santa Fe y zona de influencia”.

Director del proyecto: Dra. Emilce de los Ángeles Mendez

Director del becario: Dra. Emilce de los Ángeles Mendez

redujeron a 5 las cepas para la aplicación de MLST, quedando una representante de cada tipo (*spa* t311, 3 aislamientos; *spa* t002, 3 aislamientos; *spa* t019, 4 aislamientos; *spa* t214, 1 aislamiento; *spa* t2121, 1 aislamiento).

Extracción de ADN

La extracción del ADN cromosómico de los aislamientos seleccionados fue realizada paralelamente mediante dos técnicas con el fin de determinar la utilidad y practicidad de cada una en la obtención de ADN genómico para la aplicación de MLST.

La técnica de extracción de ADN a través de la utilización de solventes orgánicos en combinación con enzimas líticas es la recomendada en el sitio oficial de MLST (www.mlst.net). Se aplicó el protocolo disponible en la Cátedra para tal fin. Las cepas, una vez reactivadas, se cultivaron en caldo BHI a 37°C durante 24 h. Para la lisis de la pared y membranas celulares se utilizaron *buffer* TES en combinación con lisozima, *buffer* TE con 10% de SDS y proteinasa K. Luego se realizaron dos extracciones sucesivas utilizando partes iguales de fenol equilibrado (pH=8) y cloroformo, y la última extracción con cloroformo. Se precipitó el ADN con etanol 70% frío y por último se lo resuspendió en *buffer* TE 1/10.

Los mismos aislamientos fueron sometidos a extracción de ADN genómico mediante la técnica de *boiling*. Se tomaron colonias de cultivos de 24 horas y se resuspendieron en 200 µL de agua calidad PCR, aproximando a un inóculo de 1 Mc Farland. Se llevaron a ebullición por 15 minutos y luego se centrifugaron a 13000 r.p.m. durante 5 minutos. Luego se separaron los sobrenadantes conteniendo el ADN genómico de las cepas.

MLST

Se aplicó el protocolo propuesto en www.mlst.net. Los resultados obtenidos no fueron de la calidad esperada. Se observaron bandas muy tenues y de baja nitidez en la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR.

En consecuencia, se procedió a la optimización de la técnica con el fin de mejorar el rendimiento de la PCR. Se modificaron la temperatura y el tiempo de alineamiento o *annealing*. En una segunda etapa, se trabajó sobre las concentraciones de los diferentes reactivos de la PCR que afectan significativamente el rendimiento de la misma, tales como el MgCl₂, los *primers* y el templado de ADN.

Se utilizaron los *primers* propuestos por Enright y col., (2000). La *Master Mix* para un volumen final de 50 µL se preparó con 6 µL de templado de ADN, 28,1 µL de agua calidad PCR, *buffer* 1X (GoTaq *buffer*, Byodinamics), MgCl₂ 2 mM, 0,5 mM de cada dNTP, 4 µM de cada *primer*, 0,4 µL de ADN polimerasa 5U/µL (GoTaq, Byodinamics). La amplificación se realizó en un termociclador Ivema Desarrollos T-18 con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C seguida por 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de alineamiento a 55°C y 1 minuto de extensión a 72°C, seguidos por una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Se comprobó la amplificación de los siete genes de cada aislamiento mediante electroforesis en gel de agarosa.

Purificación de los productos de PCR

Los siete productos obtenidos para cada aislamiento estudiado, se purificaron mediante la precipitación con polietilenglicol (PEG) para eliminar subproductos, cebadores y dNTPs que interfieren en la secuenciación. Se mezcló PEG-6000 al 20%/2,5 M de NaCl con el remanente de la reacción de PCR. Se incubaron a 37°C y centrifugaron a 12000 r.p.m. durante 15 minutos. Se añadió etanol 70% frío al sedimento y se volvió a centrifugar a 12000 r.p.m. Se repitieron los últimos dos pasos y se descartó el sobrenadante. Los *pellets* se colocaron en estufa a 37°C durante toda

Proyecto: "Investigación de la diversidad de aislamientos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes provenientes de muestras obtenidas en centros de salud de Santa Fe y zona de influencia".

Director del proyecto: Dra. Emilce de los Ángeles Mendez

Director del becario: Dra. Emilce de los Ángeles Mendez

la noche. Por último, se resuspendieron en magua calidad PCR y se los conservó a 4°C para su posterior cuantificación.

Para la medición de la concentración de los productos purificados se realizó lectura en espectrofotómetro digital (NANODrop LTE *spectrophotometer thermo scientific*).

Secuenciación de los productos génicos

Una vez purificados, los productos de las reacciones de PCR aptos para la secuenciación se enviaron a la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología – CICVyA correspondiente al INTA Hurlingham, provincia de Buenos Aires, Argentina.

La secuenciación automática fue llevada a cabo mediante la técnica de Sanger y resuelta por electroforesis capilar. Los *primers* utilizados en la secuenciación coinciden con los utilizados para la amplificación, según el protocolo propuesto por Enright y col., (2000).

Determinación del secuenciotipo (ST)

Se utilizó el *software* Chromas 2.6.3. (Technelysium Pty Ltd) para la visualización de las secuencias y de los cromatogramas obtenidos para los siete genes conservados de cada uno de los aislamientos. Se determinó el inicio y el final de cada secuencia y se verificó la identidad de algunas bases. Mediante la base de datos provista en <http://saureus.mlst.net> se le asignó a cada secuencia su número de alelo. Luego, la combinación de los siete alelos permitió determinar el secuenciotipo de cada aislamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se comprobó la utilidad de la técnica de *boiling* para la extracción de ADN genómico de *Staphylococcus aureus* para su aplicación en MLST.

Se obtuvieron los fragmentos internos de los siete genes conservados de la cepa 1023 mediante la técnica de MLST, como se observa en la **Figura 1**. El secuenciotipo asignado fue ST5. Éste nuevo dato se le suma a los ya conocidos, tipo de cassette *SCCmec* IV, presencia de la leucocidina de Pantón Valentine y tipo de proteína A (*spa*) t311.

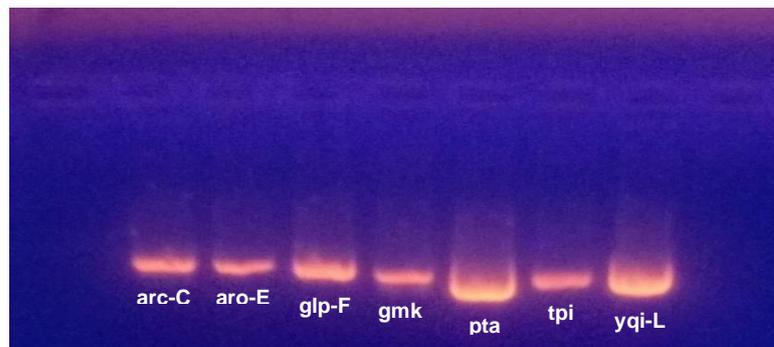


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos amplificados de los siete genes conservados de la cepa 1023.

El secuenciotipo asignado a la cepa estudiada fue el previsto por los reportes de asociación *spa*-MLST en el servidor *Ridom SpaServer* y, en conjunto con las otras características moleculares, se puede inferir que pertenecería al clon epidémico SAMR-AC ST5-*SCCmec* IVa-LPV⁺. Éste fue reportado en nuestro país como clon prevalente desde 2004 (Gardella y col., 2008 y 2011; Sola y col., 2008 y 2012). Sin embargo, Egea y col., (2014) y Fernández y col. (2014) advierten sobre el aumento de la prevalencia de otro clon de linaje SAMR-AC ST30-*SCCmec* IVc-LPV⁺.

Proyecto: “Investigación de la diversidad de aislamientos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes provenientes de muestras obtenidas en centros de salud de Santa Fe y zona de influencia”.

Director del proyecto: Dra. Emilce de los Ángeles Mendez

Director del becario: Dra. Emilce de los Ángeles Mendez

Se encuentran en estudio los cuatro aislamientos restantes seleccionados (1015, 1018, 1025 y 1031).

CONCLUSIÓN

Hasta el momento se puede concluir que se avanzó en la caracterización molecular de la cepa 1023 aplicando exitosamente la técnica de MLST. El secuenciotipo asignado confirma la asociación entre *spa*-ST. Las características genotípicas del aislamiento estudiado son coincidentes con las de uno de los clones prevalentes que circula en nuestro país, comunicado por los autores nacionales antes mencionados.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Egea, A. L., Gagetti, P., Lamberghini, R., Faccione, D., Lucero, C., Vindel, A., Tosorini, D., Garnero, A., Saka, H. A., Galas, M., **S. aureus Study Group-Argentina**, Bocco, J. L., Corso, A., Sola, C., 2014. New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8), 1086-1099.
- Enright M. C., Day N. P., Davies C. E., Peacock S. J., Spratt B. G., 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillinsusceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1008–15.
- Fernandez, S., de Vedia, L., Furst, M. L., Gardella, N., Di Gregorio, S., Ganaha, M. C., Prieto, S., Carbone, E., Lista, N., Rotrying, F., Stryjewski, M. E., Mollerach, M., 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmec IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, 14, 401-405.
- Gardella, N., Murzicato, S., Di Gregorio, S., Cuirolo, A., Desse, J., Crudo, F., Guttkin, G., Mollerach, M., 2011. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in a city of Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 1066-1071.
- Gardella, N., von Specht, M., Cuirolo, A., Rosato, A., Gutkind, G., et al., 2008. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, eastern Argentina. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62, 343–7.
- Monecke, S., Coombs, G., Shore, A. C., Coleman, D. C., Akpaka, P., Borg, M., Chow, H., Ip, M., Jatzwauk, L., Jonas, D., Kadlec, K., Kearns, A., Laurent, F., O'Brien, F. G., Pearson, J., Ruppelt, A., Schwarz, S., Scicluna, E., Slickers, P., Tan, H. L., Weber, S., Ehricht, R., 2011. A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 6, e17936.
- Sola, C., Paganini, H., Egea, A. L., Moyano, A. J., Garnero, A., Kevric, I., Culasso, C., Vindel, A., **Study Group of CA-MRSA in children, Argentina 2007**, Lopardo, H., Bocco, J. L., 2012. Spread of epidemic MRSA-ST5-IV clone encoding PVL as a major cause of community onset staphylococcal infections in Argentinean children. *PLoS One*, 7(1), e30487.
- Sola, C., Saka, H. A., Vindel, A., **Córdoba MRSA Collaborative Study Group**, Bocco, J. L., 2008. Emergence and dissemination of a community-associated methicillin-resistant Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* clone sharing the sequence type 5 lineage with the most prevalent nosocomial clone in the same region of Argentina. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 1826–31.

Proyecto: “Investigación de la diversidad de aislamientos de *Staphylococcus aureus* metilino resistentes provenientes de muestras obtenidas en centros de salud de Santa Fe y zona de influencia”.

Director del proyecto: Dra. Emilce de los Ángeles Mendez

Director del becario: Dra. Emilce de los Ángeles Mendez