

ANÁLISIS DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* METICILINO RESISTENTES Y DISEMINACIÓN DE CLONES EN LA CIUDAD DE SANTA FE Y ZONA DE INFLUENCIA

Garberi, María Sol¹

¹ Cátedra de Bacteriología Clínica – FBCB – UNL

Directora: Méndez, Emilce de los Ángeles

Codirectora: Baroni, María Rosa

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus meticilino resistente (SAMR) es uno de los principales grupos de microorganismos causantes de infecciones asociadas al cuidado de la salud (SAMR-AH). En los últimos años se ha registrado un aumento en el número de casos de infecciones y se han informado pequeñas epidemias en individuos carentes de contacto con el mundo hospitalario o de factores predisponentes. A la cepa causante de infecciones en este tipo de individuos se la denominó *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad (SAMR-AC).

Los SAMR-AC constituyen en muchos países la causa más frecuente de infecciones de piel y partes blandas (PPB) pudiendo causar en algunos casos infecciones invasivas más severas. El grupo de los SAMR-AC se caracteriza por afectar principalmente a individuos jóvenes, sin comorbilidades en los cuales, situaciones tales como contacto directo de piel infectada o con fomites contaminados facilitarían la transmisión del agente causal.

Actualmente, existen diferentes técnicas y marcadores genéticos que ayudan al entendimiento de la epidemiología molecular de SAMR, como así también al conocimiento de los clones circulantes y la dinámica de su diseminación. Una de esas técnicas, *Multilocus Sequence Typing* (MLST), analiza la secuencia de nucleótidos de fragmentos internos de siete genes *housekeeping* (*arcC* – *aroE* – *glpF* – *gmk* – *pta* – *tpi* – *yqiL*). A cada secuencia se le asigna un número particular de alelo que, en conjunto, permiten determinar su secuenciotipo (ST). Entre los diferentes marcadores genéticos que pueden utilizarse se encuentran el estudio de la región polimórfica del gen *spa* y la detección del gen que codifica la leucocidina de Pantón Valentine (LPV). La región polimórfica del gen *spa* codifica una proteína de superficie conocida como proteína A que protege a la bacteria de los mecanismos de defensa del huésped. La leucocidina de Pantón Valentine (LPV) es una citotoxina que destruye la célula alterando la permeabilidad de su membrana.

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron 1) caracterizar molecularmente las colonias de SAMR aisladas de pacientes infectados mediante el uso de la técnica MLST, la determinación del tipo de marcador epidemiológico *spa* y la portación de LPV y 2) identificar los clones circulantes en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia durante el año 2015.

METODOLOGÍA

Muestras

Se estudiaron 25 *Staphylococcus aureus* aislados a partir de muestras biológicas de pacientes que asistieron al Hospital J. M. Cullen de la ciudad de Santa Fe durante el segundo trimestre del año 2015.

Título del proyecto: “Avances en el conocimiento de las plataformas de resistencia móviles en enterobacterias y de la epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* de importancia clínica”.

Instrumento: CAI+D 2016

Año convocatoria: 2017

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral (UNL)

Directora: Méndez, Emilce de los Ángeles

Extracción de ADN

La extracción del ADN cromosómico se realizó mediante dos técnicas diferentes: Técnica de *boiling* y la Técnica recomendada por el sitio oficial de MLST (www.mlst.net).

La técnica de *boiling* se utilizó para la extracción de ADN destinado a la detección del gen que codifica la LPV y para la determinación del tipo de marcador epidemiológico *spa*. Brevemente, esta técnica consiste en tomar colonias de cultivos de 24 horas y resuspenderlas en 200 μ L de agua calidad PCR, obteniendo un inóculo de turbidez comparable a 1 Mc Farland. Luego, el inóculo se lleva a ebullición por 15 minutos y se centrifuga a 13000 r.p.m. durante 2 minutos. Finalmente, se extrae el sobrenadante y se descarta el *pellet*, obteniendo así el ADN genómico de las cepas.

La técnica recomendada por el sitio oficial de MLST se utilizó para extraer el ADN genómico destinado a la determinación de los siete genes *housekeeping* a través del uso de la técnica de MLST. Para ello se aplicó un protocolo previamente validado en la Cátedra de Bacteriología Clínica de la FBCB-UNL, en la que se utilizan solventes orgánicos en combinación con enzimas líticas.

El fundamento de usar dos técnicas diferentes fue que la de *boiling* es más rápida y accesible en comparación con la que utiliza solventes orgánicos y enzimas líticas. Ambas resultaron útiles para los diferentes métodos moleculares según estudios de optimización realizados por este grupo de trabajo.

Detección de genes *housekeeping*, marcador epidemiológico *spa* y portación de gen que codifica la LPV

Para todas las metodologías se realizaron PCRs de punto final sobre el ADN genómico aislado según se explica en la sección anterior. Para la detección de genes *housekeeping* mediante técnica MLST se aplicó el protocolo propuesto por Enright y col. (2000) y, de esta manera, determinar el ST de cada muestra.

Para la determinación de tipo de marcador epidemiológico *spa*, se puso a punto el procedimiento descrito por Harmsen y col (2003).

Para la detección de portación del gen que codifica la LPV se siguió el protocolo descrito por Lina y col.

Análisis de los productos de PCR

Se corroboró la amplificación y el tamaño de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % a 100 V durante 30 minutos, corriendo en simultáneo un marcador de peso molecular. Para la visualización de los transcritos, el gel fue teñido con *GelRed* y transiluminado con luz UV.

Para el caso del gen que codifica la LPV, la observación de una determinada banda en el gel de agarosa, de un peso molecular aproximado de 430 pares de bases, permite detectar su presencia. Estos productos no son enviados a secuenciar, razón por la cual no es necesaria su purificación.

Purificación de los productos de PCR para *spa* y MLST

La purificación de los productos de PCR se realizó por precipitación con polietilenglicol (PEG) para eliminar subproductos, *primers* y dNTPs que interfieren en la secuenciación. Para ello, cada producto se mezcló separadamente con PEG-6000 al 20%/2,5 M de NaCl, se incubó a 37°C durante 15 minutos y se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos. Tras descartar el sobrenadante, se agregó etanol 70% frío y se centrifugó a 12000 rpm durante 2 minutos. Esta última operación se repitió una vez más. Tras descartar el sobrenadante, cada *pellet* se secó en estufa a 37°C durante toda la noche. Finalmente, los mismos se resuspendieron en agua 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 PCR se enviaron a la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología – INTA Hurlingham (Buenos Aires, Argentina), para ser secuenciados.

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.

Determinación del tipo *spa*

Las secuencias obtenidas fueron verificadas utilizando el *software* Chromatogram y expresadas en formato FASTA. A partir de éste, se identificó el número de repeticiones (secuencias cortas de nucleótidos) presentes en la región X del gen *spa* que es un marcador de *locus* único utilizado en la tipificación de dicho gen. Luego se determinaron dichas repeticiones mediante el *software online* <http://spa.ridom.de/repeats.shtml>. Finalmente, la serie de repeticiones arrojada se cargó en la página <http://spa.ridom.de/spatypes.shtml>, la cual dio como resultado el tipo de *spa* de cada muestra.

Determinación del ST

Se utilizó el *software* Chromas 2.6.3. (Technelysium Pty Ltd) para la visualización de las secuencias de nucleótidos de los productos amplificados y de los cromatogramas obtenidos para los siete genes *housekeeping* de cada una de las muestras. El cromatograma proporciona un gráfico de señal en función del tiempo de la secuencia ordenada de nucleótidos (previamente marcados con fluoróforos). 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 ST de cada muestra.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Procedencia de SAMR estudiados a partir de muestras clínicas de pacientes y caracterización genotípica.

Tipo <i>spa</i>	ST	PROCEDENCIA		LPV				PPB	SANGRE	LÍQUIDO PLEURAL	LAVADO BRONCO-ALVEOLAR	LÍQUIDO ASCÍTICO
		COM.	HOSP.	COM.		HOSP.						
				+	-	+	-					
t002	5	1	4		1		4	3	1		1	
t019	30	8	8	7	1	7	1	13	1	1	1	
t024	8		1				1	1				
t214	5		1				1				1	
t311	5		2			2		1				1

COM. = adquirido en la comunidad; **HOSP.** = Intra-hospitalario; **LPV** = Leucocidina de Pantone-Valentine; **PPB** = Piel y partes blandas; **ST** = secuenciotipo.

Del total de cepas caracterizadas, el 64% provino de muestras clínicas de pacientes hospitalarios, mientras que el 36% restante, de la comunidad. La muestra biológica de la cual se aislaron SAMR con mayor frecuencia fue PPB, seguida por lavado broncoalveolar, sangre y otros líquidos de punción.

La mayoría de las cepas se caracterizaron molecularmente como: ST30, *spa* t019 y LPV positivas, coincidente con la bibliografía nacional.

La importancia de este estudio radica en conocer los clones circulantes, lo que permite identificar aquellos esporádicos y que, en un futuro, pueden transformarse en epidémicos, evento epidemiológico que va cambiando a lo largo del tiempo.

Por otra parte, es posible aplicar medidas de control de infección para evitar la diseminación de los mismos.

Los clones tienen características particulares referidas al perfil de sensibilidad a los antimicrobianos (no mostrados) que permiten, una vez conocidos aquellos prevalentes en la región, tomar conducta terapéutica antibiótica empírica basada en el conocimiento de la epidemiología de los SAMR frente a infecciones por este microorganismo.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

David M. Z., Taylor A., Lynfield R., Boxrud D. J., Short G., Zychowski D., Boyle-Vavra S., Daumb R. S., 2013. Comparing pulsed-field gel electrophoresis with multilocus *sequence* typing, *spa* typing, Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing, and PCR for Pantone-Valentine Leukocidin, *arcA*, and *opp3* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a U.S. Medical Center. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 814-9.

Egea A. L., Gagetti P., Lamberghini R., Faccione D., Lucero C., Vindel A., Tosorini D., Garnerio 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, 1086-99.

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.

Gardella N., Murzicato S., Di Gregorio S., Cuirolo A., Desse J., Crudo F., Gudtkin 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, 1066-1071.

Harmsen D., Claus H., Vogel U., 2005. DNA *sequence*-based tandem repeat analysis of the *clfB* gene is less discriminatory than *spa* typing for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 294, 525-8.

Jordens J. Z., Pennington T. H., 1991. Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates by ribosomal RNA gene restriction patterns and restriction endonuclease digestion of chromosomal DNA. *Epidemiology and Infection*, 107, 253-62.

Li V., Chui L., Louie L., Simor A., Golding GR., Louie M., 2013. Cost-effectiveness and efficacy of *spa*, SCC*mec*, and PVL genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as compared to pulsed-field gel electrophoresis. *PLoS ONE*, 8, e79149.

Lina G., Piémont Y., Godail-Gamot F., Bes M., Peter M. O., Gauduchon V., Vandenesch F., Etienne J., 1999. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin—producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 29, 1128-32.

Milheirico C., Oliveira D. C., de Lencastre H., 2007. Update to the multiplex PCR strategy for the assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 3374-7.

Multi Locus Sequence Typing home page. Disponible en: <http://www.mlst.net>

O'Hara F. P., Suaya J. A., Ray T., Baxter R., Brown M. L., Mera R. M., Close N. M., Thomas E., Amrine-Madsen H., 2016. *spa* typing and multilocus *sequence* typing show comparable performance in a macroepidemiologic study of *Staphylococcus aureus* in the United States. *Microbial Drug Resistance*, 22, 88-96.

Ridom SpaServer – SpaServer Database. Disponible en: <http://spaserver.ridom.de/>

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.