



INVESTIGACIÓN FENO Y GENOTÍPICA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PRODUCTORES DE INFECCIONES INVASIVAS. DETECCIÓN DEL GEN *PVL* QUE CODIFICA LA LEUCOCIDINA DE PANTON- VALENTINE

Vidaechea, Arnoldo¹

¹Laboratorio de la Cátedra de Bacteriología Clínica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas- Universidad Nacional del Litoral.

Director/a: Méndez, Emilce

Coodirector/a: Mendosa, María Alejandra

Área: Ciencias de la Salud

Palabras claves: *Staphylococcus aureus*, leucocidina de Pantón-Valentine, fenotipos de resistencia.

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus (Sau) es un patógeno importante, uno de los principales agentes etiológicos de enfermedades infecciosas y una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Esta bacteria tiene una elevada capacidad de generar resistencia a los antimicrobianos (ATM) y producir numerosos factores de virulencia.

Sau se puede clasificar; en relación a la sensibilidad a meticilina, en sensibles (SAMS) o resistentes (SAMR), como resultado de una alteración cromosómica de la proteína PBP2a de unión a la penicilina, codificada por el gen *mecA* (Ávila L, 2010) que presenta una afinidad disminuida por los ATM betalactámicos, de uso común para el tratamiento de estas infecciones.

Las infecciones por SAMR pueden estar asociadas a los hospitales (SAMR-AH) y ocurrir en personas con factores de riesgo predisponentes; o pueden ser adquiridas en la comunidad (SAMR-AC) y producirse en pacientes sin factores de riesgo. Se ha observado un incremento en estas últimas tal vez debido a la presión de los ATM, que ha favorecido la evolución genética de Sau con la consecuente aparición de cepas con distintos determinantes de virulencia y patrones variables de susceptibilidad, que se diferencian epidemiológicamente y en las infecciones que producen (Romero S, 2016).

Aunque existen diferencias genéticas entre las cepas adquiridas en la comunidad y las nosocomiales, ambas presentan genes comunes como el *mecA* y el gen del factor de virulencia que codifica para la leucocidina de Pantón-Valentine (*pvl*) (Romero S, 2016); sin embargo, la leucocidina suele asociarse a las infecciones por SAMR-AC. Además, ambas

Título del Proyecto: INVESTIGACIÓN FENO Y GENOTÍPICA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PRODUCTORES DE INFECCIONES INVASIVAS. DETECCIÓN DEL GEN *PVL* QUE CODIFICA LA LEUCOCIDINA DE PANTON-VALENTINE.

Instrumento: CAID

Año de convocatoria: 2022

Organismo Financiador: UNL

Director/a: Méndez, Emilce

cepas varían entre sí en cuanto a la susceptibilidad a los diversos tipos de antimicrobianos ensayados.

La toxina de Pantón-Valentine (PVL) es una leucocidina que se une a los fosfolípidos de membrana de los leucocitos y macrófagos, induciendo la formación de poros que alteran la permeabilidad celular, causando la destrucción de las células fagocíticas. Se cree que la PVL es uno de los factores de virulencia responsable de la alta patogenicidad que tienen las cepas que la presentan, ocasionando desde infecciones de piel y tejidos blandos, hasta enfermedades invasivas como neumonías necrotizantes. Su producción está comúnmente relacionada con los SAMR, sin embargo, se ha demostrado la existencia de cepas SAMS que son *pvl* positivas (Goemanne S, 2022).

Además de los betalactámicos, otras opciones terapéuticas muy utilizadas para el tratamiento de estas infecciones son los macrólidos y lincosamidas. Estos dos grupos actúan sobre la subunidad 50 S del ribosoma bacteriano, impidiendo la elongación de la cadena polipeptídica y por ende la traducción y síntesis proteica. Existen tres fenotipos de resistencia a estos ATM, siendo el principal, el cambio del sitio blanco de acción, mediado por genes *erm*, que codifican enzimas que catalizan la metilación del sitio al que se unen estos ATM, confiriendo resistencia cruzada a macrólidos y lincosamidas. Este fenotipo MLSb puede expresarse de forma constitutiva (MLSbc) o inducible (MLSbi). Otro mecanismo descrito es el que involucra a las bombas de eflujo, el cual confiere resistencia sólo a los macrólidos (fenotipo M). Por último, la resistencia específica a lincosamidas (fenotipo L) es debida al mecanismo de inactivación enzimática de los ATM por la lincosamida-nucleotidiltransferasa codificada por los genes *Inu*, que causa cambios en la estructura de las lincosamidas (Pardo L, 2020).

OBJETIVOS

-Evaluar a través del método de difusión con discos los mecanismos de resistencia de *Sau* a macrólidos y lincosamidas.

-Detectar a través de técnicas de biología molecular el gen *InuA*, que otorga resistencia a lincosamidas, y el gen *pvl* que codifica para la producción de la leucocidina de Pantón-Valentine.

METODOLOGÍA

Se estudiaron 24 aislamientos de *Sau* provenientes de hemocultivos de pacientes que asistieron a un centro de salud de la ciudad de Santa Fe durante los primeros 5 meses de 2022 y conservados en viales con leche a -20 °C hasta su análisis. La identificación microbiológica y la detección de la sensibilidad a la meticilina se realizó en el centro de salud por métodos automatizados. La sensibilidad a eritromicina (Ery), clindamicina (Cli) y lincomicina (Linco) se determinó por método de difusión con discos según normas *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* y Sociedad Francesa de Microbiología 2010. Se utilizaron discos de Linco (2 ug), Ery (15 ug) y Cli (2 ug), a 20 mm de distancia entre ellos y colocando el disco de Ery en el centro para realizar el D-test.

Para la extracción de ADN se tomaron colonias de un cultivo puro de TSA y se hizo una suspensión en buffer TE (0,1 mM, pH=8) que se llevó a 100 °C en baño de agua durante 15 minutos . Luego se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm, quedando el ADN bacteriano en el sobrenadante. Se preparó una *mastermix* con MgCl₂ (25mM), buffer de reacción (5X Green GoTaq), dNtps (10 mM), *primers* y GoTaq (G2DNA *Polymerase* 5u/uL) más una alícuota del ADN. Se realizó la amplificación por PCR, utilizando los oligonucleótidos detallados en la Tabla 1. Los controles positivos fueron: USA300 (*pvl* positivo) y Sau 6276 (*InuA* positivo). Además se realizaron controles de extracción, para detectar la presencia de ARNr 16S de Sau, utilizando los *primers* detallados en la Tabla 2. Las mezclas de PCR fueron amplificadas en un termociclador. El producto amplificado, fue sometido a electroforesis (80V/cm, durante 30 minutos) en gel de agarosa al 1,5% sumergido en buffer TAE 1X y utilizando gel red como colorante. Los geles fueron visualizados en un transiluminador y fotografiados con un celular, como se puede observar en la Figura 1.

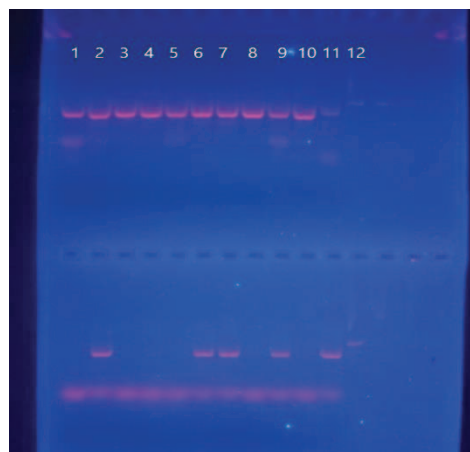


Figura 1: Expresión de genes control 16 S y *pvl* en muestras. Las bandas superiores corresponden al control de genoma bacteriano 16 S y las inferiores a la presencia de *pvl*. Calles 1, 3, 4, 5, 8 y 10: muestras *pvl* (-). Calles 6, 9 y 11: muestras *pvl*(+). Calles 2 y 7: USA300. Calle 12: Blanco.

Tabla 1: *Primers* utilizados para la amplificación de los genes y sus controles.

GEN	Secuencia 5' → 3'	Referencia
<i>pvl</i>	luk-PV-1 (F):ATCATTAGGTAATAATGTCTGGACATGATCCA	Lina y col
	luk-PV-2 (R):GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	
<i>InuA</i>	linA-F (F):GGCGTAGATGTATTAAGTGG	Corso y col
	linA-R (R):GAAAAAGAAGTTGAGCTTC	

Tabla 2: *Primers* utilizados para la amplificación del control de genoma bacteriano 16 S en sentido 5'→ 3'.

16 S	Plus (F): AGGAGGTGATCCAACCGCA
	Minus (R): AACTGGAGGAAGGTGGGGAT

El análisis estadístico de PVL, para la evaluación de la proporción para obtener el intervalo de confianza, se realizó utilizando la prueba binomial exacta aplicando el software estadístico RStudio.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

De los 24 aislamientos estudiados, 11 fueron SAMS y 13 SAMR (12 SAMR-AC y 1 SAMR-AH). Respecto de la sensibilidad a macrólidos y lincosamidas, el 75% de los aislamientos (18/24) fueron sensibles a ambos ATM, el 20,8% (5/24) presentaron el fenotipo MLS_{bi} y el 4,2% (1/24) resultó resistente a Cli y Linco, pero no presentó el gen *InuA*. Respecto al factor de virulencia PVL, se detectó su presencia sólo en 3 aislamientos SAMR y con perfil de adquiridos en la comunidad, por lo que también fueron sensibles a Ery, Cli y Linco.

Los aislamientos provinieron de pacientes adultos cuya edad oscilaba entre los 30 y 70 años, la mayoría de sexo masculino y con factores predisponentes como insuficiencia renal

crónica, diabetes o HIV, que llevaban varios días internados y estaban bajo tratamiento con antimicrobianos. Aunque los pacientes estaban internados y presentaban factores predisponentes, sólo hubo un caso en el que el *Sau* presentaba el perfil típico de un SAMR-AH. En los 3 pacientes que resultaron PVL(+), se aislaron *Sau* con perfil de SAMR-AC, los cuales causaron infecciones graves, con mala evolución y desenlace fatal.

Se puede decir que, si bien se deberían analizar un mayor número de aislamientos para obtener afirmaciones más definitivas, el simple hecho de aislar *Sau* de infecciones graves no permite presumir su perfil de sensibilidad, encontrándose que dichas infecciones pueden ser causadas tanto por SAMR, como por SAMS (Goemanne S, 2022). En cambio encontramos que la presencia del gen *pvI* parece tener relación con la mala evolución que presentaron los pacientes ya que, con el análisis estadístico utilizado se puede inferir que la verdadera proporción de muestras en una población similar a la estudiada, con un intervalo de confianza del 95%, fue de [0,03 ; 0,32]. La prueba resultó significativa con un p-valor=0,0003.

Se concluye, coincidiendo con otros autores, que el estudio de la leucocidina de Pantón-Valentine es un factor importante a investigar para predecir la gravedad de las infecciones invasivas por *Sau*.

BIBLIOGRAFÍA

Ávila L,M, Pérez M,A, Ávila C,A, Rugeles C,I, 2010. Infecciones por *Staphylococcus aureus* metilino resistente en niños en Bucaramanga Colombia, Revista de la Universidad Industrial de Santander; 42 (3): 248-255.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA, 2022.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2010. (Edition de Janvier 2010). Disponible en: <http://www.asso.fr/publi/general.php?pa=1>.

Corso A, Faccione D, Togneri AM, Modesta L, Perez M, Gagetti P, 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) outbreak in a neonatal unit carrying an unusual genotype of macrolide-lincosamide-resistance: *ermC* plus *InuA* genes. 6to Congreso Mundial (WSPID) Organizado por: World Society for Pediatric Infectious Diseases, con colaboración de la Sociedad Argentina de Pediatría. 18-22 de noviembre, Buenos Aires, Argentina.

Goemanne S, Tilmanne A, Biarrent D, Smeesters P, Simoni P, Mahadeb B,A, Vicinanza A, 2022. Severe *Staphylococcus aureus* infections in children: case reports and management of positive Pantón-Valentine leucocidin cases. *Frontiers in Pediatrics*, 2-7. 10:1003708. doi: 10.3389/fped.2022.1003708.

Lina G, Piémont Y, Gmail-Gamot F, Bes M, Meter MO, Gauduchon V,... Etienne J, 1999. Involvement of Pantón-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*; 29(5):1128-1132.

Pardo L, Machado V, Cuello D, Aguerrebere P, Seija V, Braga V, Varela G, 2020. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and their associated genotypes in *Staphylococcus aureus* isolates from a tertiary level public hospital of Uruguay. *Rev Argent Microbiol* ;52(3):202-210.

Romero S, Castellano M, Ginestre M, Perozzo A, 2016. Leucocidina de Pantón Valentine en cepas SAMR aisladas de pacientes del Hospital Universitario de Maracaibo. *Kasmera* 43(2);111-120.

