



INFORME BREVE

Tipos de *spa* no reportados en nuestro país en *Staphylococcus aureus* de pacientes adultos de un hospital escuela, Santa Fe, Argentina



Carla Tomatis^{a,*}, María R. Baroni^a, María A. Mendosa^{a,b}, Alicia Nagel^b,
Analía Mollerach^b, Claudia Alvarez^a, María Laura Zurbriggen^a, Sabrina Cristobal^a,
Glenda Segovia^a y Emilce de los A. Méndez^a

^a Cátedra de Bacteriología Clínica/FBCB-UNL, Santa Fe, Argentina

^b Laboratorio Central/Hospital Dr. José María Cullen, Santa Fe, Argentina

Recibido el 4 de enero de 2017; aceptado el 30 de septiembre de 2017

Disponible en Internet el 12 de enero de 2018

PALABRAS CLAVE

Staphylococcus aureus resistente a metilicina;
Staphylococcus aureus sensible a metilicina;
spa;
SCCmec;
Leucocidina de Pantón Valentine

KEYWORDS

Methicillin-susceptible
Staphylococcus aureus;
Methicillin-resistant
Staphylococcus aureus;

Resumen *Staphylococcus aureus* es un patógeno responsable de diversos cuadros clínicos. Los marcadores moleculares son útiles para el estudio de la epidemiología microbiana. Se estudiaron 22 aislamientos de *S. aureus* resistentes a metilicina (SARM) y 23 sensibles a metilicina (SASM) mediante *mecA*, *cassette SCCmec*, leucocidina de Pantón Valentine (LPV) y polimorfismo *spa*; se analizaron datos de los pacientes. SASM predominó en muestras distintas de piel y partes blandas de internados, mientras SARM en partes blandas. Predominó el SCCmec tipo IV seguido del I. Se encontró baja presencia de LPV. En SARM hubo 11 tipos de *spa* diferentes, t019 fue el más frecuente y en pacientes ambulatorios. En SASM se hallaron 17 tipos con prevalencia del t189. El *spa* t002 estuvo presente en SASM y SARM. Se hallaron 11 tipos de *spa* no reportados en nuestro país.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Non reported *spa* types in our country in *Staphylococcus aureus* from adult patients of a school hospital, Santa Fe - Argentina

Abstract *Staphylococcus aureus* is a pathogen associated a different kind of infection. Molecular markers are useful tools to study microbial epidemiology. Twenty two methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and 23 methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) were studied by *mecA* gene, SCCmec cassette, Pantón Valentine leucocidin (PVL) and *spa* polymorphism. The clinical data patients were analyzed. MSSA was prevalent in samples different from skin and soft tissue (SST)

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: carla.tomatis@hotmail.com (C. Tomatis).

spa;
SCCmec;
Panton Valentine
leucocidin

and in hospitalized patients, whereas MRSA in SST. SCCmec type IV was predominant, followed by type I. Low presence of PVL was found. In MRSA 11 different types of *spa* were detected, t019 was the most frequent and associated with outpatient, 17 types were found in MSSA and t189 was prevalent. *spa* t002 was present in MSSA and MRSA. We found 11 types of *spa* not reported in our country.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Staphylococcus aureus coloniza la piel y las mucosas de humanos y animales, y es causa frecuente de una amplia gama de infecciones. Su patogénesis ha sido atribuida a la capacidad de generar resistencia (R) y a sus factores de virulencia¹⁰.

S. aureus resistente a meticilina (SARM) se asoció al ámbito hospitalario (SARM-AH) pero desde los años 90 ha emergido como agente de infecciones adquiridas en la comunidad (SARM-AC). SARM-AH suele portar *cassettes* de R de mayor tamaño (I, II y III) e incluir R a múltiples antimicrobianos (AM). SARM-AC suele llevar *cassettes* chicos (IV o V) sin R asociada y con frecuencia porta la leucocidina de Panton Valentine (LPV)¹⁰.

La proteína A protege a la bacteria de los mecanismos de defensa del huésped y está codificada por el gen polimórfico *spa*. Su secuenciación emerge como un marcador prometedor para la tipificación de cepas y presenta buena correlación con las metodologías de referencia MLST y PFGE^{5,11}.

En Argentina hasta el año 2008 el 50% de los aislamientos nosocomiales eran SARM, siendo prevalente el clon epidémico chileno/cordobés (ST5-SCCmec I)¹³. En el año 2009 hubo una diseminación de 2 clones SARM-AC: ST5-SCCmecIV-LPV(+)-*spa* t311¹² y ST30-SCCmecIVc-LPV(+)-*spa* t019³, con importantes diferencias regionales y según los grupos etarios. Entre 2010-2011 predominó este último en pacientes adultos sin factores de riesgo con infecciones invasivas de inicio en la comunidad⁴.

La importancia de conocer la diversidad genómica de los clones circulantes a nivel local radica en la necesidad de implementar terapias empíricas y medidas de control adecuadas.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar una población de *S. aureus*. Para ello se propuso: a) el estudio genotípico de *mecA*, *cassette* SCCmec, LPV y polimorfismo *spa*; y b) relacionar datos de los pacientes (procedencia y tipo de muestra) con los resultados fenotípicos y genotípicos de los aislamientos.

Se estudiaron 45 aislamientos consecutivos de importancia clínica de pacientes adultos (16-65 años) que concurrieron al hospital Dr. José María Cullen nivel II de la ciudad de Santa Fe, Argentina, durante los meses de enero-abril de 2013. Se estudió un aislamiento por paciente. Fueron caracterizados fenotípicamente en la sección de microbiología del laboratorio central del hospital resultando 22 SARM y 23 *S. aureus* sensibles a meticilina (SASM). Se registraron los datos de los pacientes (procedencia y tipo de muestra) y el perfil de R de los aislamientos a los AM no betalactámicos obtenido mediante método automatizado

Phoenix (BD). El estudio genotípico se realizó en la cátedra de bacteriología clínica de la FBCB-UNL.

Se realizó la extracción de ADN genómico mediante lisis celular utilizando proteinasa K (Promega-Biodynamics SRL, BA, Argentina) y lisozima (Promega-Biodynamics SRL, BA, Argentina) y posterior purificación con solventes orgánicos.

Por técnicas de PCR se corroboró la R a meticilina detectando el gen *mecA*¹⁵, se caracterizó el SCCmec⁹, se determinó la portación de los genes *lukS/F-PV* que codifican a la LPV⁷ y se amplificó el gen *spa*⁶. Se cuantificaron los productos *spa* por espectrofotometría y se enviaron a secuenciar (Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología-CICVyA, INTA Hurlingham, BA, Argentina). Se tipificaron las secuencias con el sitio de referencia <http://www.spaserver.ridom.de/>. Se analizaron los datos accesorios del mismo: asociación al tipo MLST, frecuencia de aparición, pertenencia a clones, países de procedencia, presencia en SASM o SARM.

Se determinó la frecuencia relativa porcentual de cada variable categórica. Se establecieron las relaciones entre dichas variables con la prueba exacta de Fisher. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0,05$. Para dicho análisis las variables nominales fueron divididas en 2 grupos: el tipo de muestra de donde provienen los aislamientos: «PPB» y «muestras distintas a PPB», los tipos *spa* en «*spa* X» (siendo X los distintos tipos *spa* más frecuentes) y «otros tipos *spa*» y los tipos de *cassettes* en «SCCmec IV/V» y «demás SCCmec».

En las tablas 1 y 2 se exponen los datos recolectados y los hallazgos del trabajo.

Los SASM se aislaron principalmente de muestras distintas a PPB (73,91%) y fueron de procedencia hospitalaria ($p=0,0113$); la muestra prevalente fue BAL y todas de pacientes de terapia intensiva sometidos a ventilación mecánica y con infección precoz. La mayoría de los SARM se aislaron de muestras de PPB (86,36%) y fueron de ambas procedencias. Los pacientes ambulatorios, cuyos aislamientos de SASM y SARM provenían de PPB y un único de sangre, no residían en geriátricos, se movilizaban por sus propios medios y no habían tenido contacto con el sistema sanitario. Es necesario aclarar que cuando se expresa procedencia hospitalaria el aislamiento se obtuvo luego de las 48 horas de haber ingresado al hospital. En el conjunto de SARM y SASM se detectó una asociación estadística altamente significativa entre el tipo de la muestra y la procedencia del paciente ($p=0,0003$) acorde con la bibliografía que reporta a SARM-AC como agente etiológico frecuente de infecciones cutáneas.

Tabla 1 Datos de los pacientes con infecciones por SARM, sensibilidad antimicrobiana y caracterización genotípica de los aislamientos

SARM (<i>mecA</i> positivos) n=22						
Cepa	Datos del paciente		Perfil fenotípico	Perfil genotípico		
	Procedencia	Muestra		LPV	SCC <i>mec</i>	Tipo
1	Hosp	Sangre	No	–	IV	t8291
2	Hosp	Hueso	R a GEN, CLI, ERI, RIF	–	IV	t002
3	Amb	PPB	No	–	IV	t019
4	Hosp	PPB	R a ERI	–	IV	t311
6	Amb	PPB	No	–	IV	t019
8	Amb	PPB	No	–	IV	t019
9	Hosp	PPB	R a GEN, CIP, RIF	–	IV	t4916
10	Hosp	PPB	No	+	V	t433
11	Amb	Sangre	No	+	IV	t4286
12	Amb	PPB	No	+	IV	t311
13	Amb	PPB	R a RIF, GEN	–	NT	t002
15	Amb	PPB	No	–	IV	t214
16	Amb	PPB	R a ERI	–	IV	t311
17	Amb	PPB	No	–	IV	t311
18	Hosp	PPB	R a GEN, CLI, ERI	–	I	t149
19	Hosp	PPB	No	–	I	t149
20	Hosp	PPB	No	–	IV	t019
21	Amb	PPB	No	–	IV	t2121
23	Hosp	PPB	No	–	IV	t002
24	Amb	PPB	No	+	IV	t002
26	Hosp	PPB	No	–	IV	t8354
45	Amb	PPB	No	+	IV	t019

R a ATB: resistencia a antibiótico no beta-lactámicos; LPV: leucocidina de Pantón-Valentine; SCC*mec*: *staphylococcal cassette chromosome mec*; Hosp: procedencia hospitalaria; No: no presenta resistencia conjunta; GEN: gentamicina; CLI: clindamicina; ERI: eritromicina; RIF: rifampicina; Amb: procedencia ambulatoria; PPB: infecciones de piel y partes blandas; CIP: ciprofloxacina; +/–: presencia/ausencia de LPV; NT: no tipificable.

Se encontró con mayor frecuencia el SCC*mec* IV (81,82%) seguido del SCC*mec* I (9,09%), al igual que en la investigación previa realizada en el laboratorio de nuestra cátedra². Un único aislamiento fue tipo V (4,55%) y una cepa resultó no tipificable.

En SARM y SARM se halló una baja tasa de aislamientos resistentes a antibióticos no beta-lactámicos: 4 SARM (17,39%), 3 de procedencia hospitalaria y uno ambulatorio, y 4 SARM (18,18%), 3 hospitalarios —uno SCC*mec* I y 2 SCC*mec* IV— y el cuarto de procedencia ambulatoria con SCC*mec* incierto. El hallazgo de cepas SARM y SARM con multiresistencia entre los pacientes ambulatorios podría constituir una alerta sobre la diseminación de estas como causantes de infección en la comunidad.

Cinco SARM portaron LPV (22,73%). En la última década se produjo un incremento significativo de las infecciones por SARM-LPV (+) detectadas en la comunidad debido a la diseminación de ciertos linajes, generalmente asociado a lesiones cutáneas en pacientes jóvenes y niños¹². La prevalencia de LPV fue baja, al igual que en el estudio del año 2009-2010 de aislamientos SARM provenientes del mismo hospital⁸.

En SARM se halló un aislamiento LPV (+) (4,35%). Si bien SARM es estudiado con menor énfasis, existen reportes de cepas SARM portadoras de LPV asociadas a infecciones comunitarias y hospitalarias¹.

De los 22 aislamientos SARM 12 pertenecieron a pacientes ambulatorios, 4 LPV (+) y SCC*mec* IV (33,33%) que cumplen con la condición de no presentar resistencia acompañante o asociada a un AM no beta-lactámicos, en su mayoría aislados de muestras de PPB y de pacientes ambulatorios, particularidades que definen a las cepas SARM-AC¹⁰. Una cepa con dichas características fue de origen hospitalario, lo que demuestra el ingreso de las cepas SARM-AC a los nosocomios. Esto podría deberse a la colonización preexistente con aislamientos SARM-AC LPV (+) que encuentran una puerta de entrada durante procedimientos invasivos realizados en el hospital.

En las cepas SARM se encontraron 11 tipos de *spa*: t019 (22,73%), t311 y t002 (18,18%), t149 (9,09%) y un aislamiento de cada uno de los 7 tipos restantes (4,55%). En los aislamientos de SARM se diferenciaron 17 tipos *spa* con prevalencia del t189 (21,74%), t3051 y t024 (8,70%). De los 14 tipos restantes se encontró un aislamiento de cada uno (4,35%). El tipo *spa* t002 fue el único encontrado en SARM y SARM.

Al comparar el número de tipos *spa* hallados en SARM y SARM se demuestra la mayor diversidad genómica de SARM, al igual que en otros trabajos¹⁴.

Del análisis de los tipos de *spa* hallados se desprenden varias asociaciones estadísticamente significativas. Entre el tipo de *spa* y la procedencia del paciente ($p = 0,036$) el tipo

Tabla 2 Datos de los pacientes con infecciones por SASM, sensibilidad antimicrobiana y caracterización genotípica de los aislamientos

SASM (<i>mecA</i> negativos) n = 23					
Cepa	Datos del paciente		Perfil fenotípico	Perfil genotípico	
	Procedencia	Muestra		LPV	<i>spa</i>
30	Hosp	BAL	No	-	t3051
31	Hosp	BAL	No	-	t6665
32	Hosp	BAL	No	-	t021
34	Hosp	PPB	R a TMS, ERI	-	t1688
36	Hosp	BAL	R a TMS, ERI	-	t189
37	Hosp	ITU-sangre-catéter	No	-	t189
38	Hosp	PPB	No	-	t002
39	Amb	PPB	R a CLI, ERI	-	t012
40	Hosp	BAL	No	-	t189
41	Hosp	BAL	No	-	t024
42	Hosp	PPB	R a CLI, ERI	+	t024
44	Amb	PPB	No	-	t701
46	Hosp	Líquido cefalorraquídeo	No	-	t325
48	Hosp	BAL	No	-	t3051
49	Hosp	BAL	No	-	t065
50	Hosp	BAL	No	-	t189
51	Hosp	BAL	No	-	t2883
52	Hosp	Hueso	No	-	t550
53	Hosp	Sangre	No	-	t1549
54	Amb	PPB	No	-	t592
55	Hosp	Sangre	No	-	t189
56	Hosp	PPB y sangre	No	-	t304
59	Hosp	Hueso	No	-	t521

R a ATB: resistencia a antibiótico no beta-lactámico; LPV: leucocidina de Pantón-Valentine; *SCCmec*: *staphylococcal cassette chromosome mec*; Hosp: procedencia hospitalaria; No: no presenta resistencia conjunta; CLI: clindamicina; ERI: eritromicina; Amb: procedencia ambulatoria; PPB: infecciones de piel y partes blandas; +/-: presencia/ausencia de LPV; BAL: lavado broncoalveolar; TMS: trimetoprima/sulfametoxazol; ITU: infección del tracto urinario.

t019 fue predominante en los ambulatorios. Además, entre los tipos de *spa* y las poblaciones SARM y SASM se encontró asociación entre t311 ($p=0,04$) y t019 ($p=0,0216$) con SARM y t189 ($p=0,05$) con SASM.

En el análisis de los datos accesorios de los tipos *spa* provistos por la página *Ridom SpaServer* se encontraron 11 tipos *spa* no reportados en nuestro país: t4916, t8291, t214, t2121, t8354, t4286, t1549, t024, t6665, t325 y t592.

La cantidad de tipos *spa* muestran el alto grado de polimorfismo de la región Xr de la proteína A. Al ser un marcador molecular de *locus* único resulta indispensable el uso de marcadores adicionales como lo son el *cassette* de R *SCCmec* y el factor de virulencia LPV. Su rápida evolución hace a la técnica discriminatoria para la investigación de brotes¹⁴. Además, la evolución de la región de *spa* durante un tiempo prolongado resulta en diferentes tipos de *spa* consecutivos isogénicos o estrechamente relacionados con perfiles de repetición similares, lo que refleja que la tipificación *spa* también puede ser utilizada como un marcador epidemiológico a largo plazo⁵. Se debería validar por técnicas de referencia la asociación entre ellos, ya que se reporta un pequeño número de agrupaciones clonales de *S. aureus* que circulan en todo el mundo.

Es interesante destacar que las cepas *SCCmec* IV y V portadoras de LPV arrojaron distintos tipos de *spa*, mientras que los 2 aislamientos que resultaron *SCCmec* I, el mismo tipo. En la página se localizó la asociación del *spa* t019 al MLST ST30; por homología de las repeticiones se intuye que el t433 y el t4286, de los cuales no existen datos de la asociación *spa*-MLST, también pertenecerían a dicho ST. Por otro lado, los tipos de *spa* t002 y t311 se asocian al ST5. También se podría inferir que *spa* t149 se podría asociar al mismo ST.

Las características de los 2 aislamientos hallados *cassette* I, sin portación de LPV, de procedencia hospitalaria, *spa* t149, asociado al ST5, coinciden con las características al clon hospitalario chileno/cordobés diseminado en el sur de América Latina¹³. De los 5 aislamientos hallados SARM-AC LPV (+), 2 resultaron portar los tipos *spa* que definen a los clones SARM-AC epidémicos predominantes en América del Sur y en nuestro país, el t019 (ST30)³ y el t311 (ST5)¹².

En esta caracterización hallamos gran diversidad genómica en los aislamientos recolectados de un hospital en un período corto de tiempo. Las cepas SASM presentaron mayor variabilidad genética que SARM. Se destaca que se identificaron tipos *spa* no comunicados en

nuestro país hasta el momento en el sitio de referencia (<http://www.spaserver.ridom.de/>).

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, a través de los fondos de la programación CAI + D 2011.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existen conflictos de intereses.

Bibliografía

1. Cristobal S, Baroni MR, Mendosa MA, Alvarez C, Velez LM, Méndez EA. Impacto clínico de la producción de la leucocidina de Pantón-Valentine en infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* metilino-sensible. Segundo Congreso Bioquímico del Litoral. Argentina: Paraná; 2013. p. 19. Resumen P022.
2. Cristobal S, Baroni M, Mendosa M, Segovia G, Nagel A, Mollerach A, Zurbriggen L, Mendez E. *Staphylococcus aureus* metilino resistente aislados de pacientes sin factores de riesgo: investigación de SCCmec y su relación con la leucocidina y la resistencia antimicrobiana. XV Jornadas Argentinas de Microbiología. Argentina: Córdoba; 2014. p. 78. Resumen P037.
3. Egea AL, Galletti P, Lamberghini R, Faccone D, Lucero C, Vindel A, Tosoroni D, Garnero A, Saka HA, Galas MS, Bocco JL, Corso A, Sola C, aureus Study Group-Argentina. New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. Int J Med Microbiol. 2014;304:1086–99.
4. Fernandez S, de Vedia L, Lopez Furst MJ, Gardella N, di Gregorio S, Ganaha MC, Prieto S, Carbone E, Lista N, Rotrying F, Stryjewski ME, Mollerach M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30 SCCmec IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina. Infect Genet Evol. 2013;14:401–5.
5. Hallin M, Friedrich AW, Struelens MJ. Spa typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus*. Methods Mol Biol. 2009;551:189–202.
6. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Turnwald D, Vogel U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. J Clin Microbiol. 2003;41:5442–8.
7. Lina G, Piédmont Y, Godaíl-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Pantón-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis. 1999;29:1128–32.
8. Méndez EA. Actividad bacteriostática y bactericida de antibióticos betalactámicos y glucopéptidos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* de importancia clínica. Caracterización genotípica de aislamientos tolerantes. Tesis de grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas 2012. Cátedra de Bacteriología Clínica, FBCB, Universidad Nacional del Litoral.
9. Milheirico C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for the assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:3374–7.
10. Otto M. Community-associated MRSA: What makes them special? Int J Med Microbiol. 2013;303:324–30.
11. Shopsis B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol. 1999;37:3556–63.
12. Sola C, Paganini H, Egea AL, Moyano AJ, Garnero A, Kevric I, Culasso C, Vindel A, Lopardo H, Bocco JL. Spread of epidemic MRSA-ST5-IV clone encoding PVL as a major cause of community onset staphylococcal infections in Argentinean children. PLoS One. 2012;7:e30487 [On-line] <http://www.plos.org>.
13. Sola C, Saka HA, Vindel A, Cordoba MRSA Collaborative Study Group y Bocco JL. Emergence and dissemination of a community-associated methicillin-resistant Pantón-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* clone sharing the sequence type lineage with the most prevalent nosocomial clone in the same region of Argentina. J Clin Microbiol. 2008;46:1826–31.
14. Strommenger B, Bräulke C, Heuck D, Schmidt C, Pasemann B, Nübel U, Witte W. spa typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. J Clin Microbiol. 2008;46:574–81.
15. Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, Gala JL. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 1995;33:2864–7.