

Padronização de Multiplex-PCR para identificação de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pseudointermedius* com detecção simultânea dos genes *mecA* e PVL

Monica de Souza Ferreira de Mattos (PIC/CNPq/FA/UEM), Franciele Viana Fabri, Paulo Victor Batista Marini, Ihorrana Wencz Alflen, Sheila Alexandra Belini Nishiyama, Pedro Marquetti Pereira, Maria Cristina Bronharo Tognim (Orientadora), e-mail: mcbtognim@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea: Microbiologia/ Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: Métodos moleculares, estafilococos coagulase positiva, genes

Resumo:

Staphylococcus aureus e *S. pseudointermedius* são estafilococos coagulase positivas comuns a microbiota humana e animal, sendo também patógenos oportunistas. A diferenciação dessas espécies por meios fenotípicos representa um desafio devido à falta de marcadores bioquímicos que as caracterizem. Essas espécies podem carrear o gene *mecA* de resistência à meticilina e o gene de virulência que codifica a leucocidina de *Panton-Valentine* (PVL) responsável por infecções mais severas. Assim, o presente estudo teve por objetivo desenvolver um método de *Multiplex-PCR* (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), capaz de identificar essas espécies e detectar os genes *mecA* e codificador de PVL em uma única reação molecular. A reação de *Multiplex-PCR* foi padronizada com *primers* específicos, inicialmente testados com cepas ATCCs e isolados determinados como controles positivos. Após estabelecer as condições da reação, especialmente de ciclagem, amostras clínicas hospitalares e comunitárias de humanos e cães foram analisadas. A *Multiplex-PCR* padronizada nesse trabalho demonstrou ser capaz de diferenciar os isolados de *S. aureus* e *S. pseudointermedius* apresentando similaridade de 100% com os resultados obtidos em reações *PCR single*. Além disso, a *multiplex* permitiu a detecção simultânea dos genes *mecA* e codificador de PVL em amostras de humanos e cães, provenientes do ambiente hospitalar ou da comunidade.

Introdução

Staphylococcus aureus e *S. pseudointermedius* são estafilococos coagulase positivas (ECP) que colonizam a mucosa nasal de humanos e de animais domésticos, como os cães (MOUSAVI *et al.*, 2017). No entanto, esses microrganismos também podem se comportar como patógenos oportunistas. *S. aureus* é frequentemente associado com infecções de pele e pneumonias e *S. pseudointermedius* com pioderma canino e infecções em humanos (LEE *et al.*, 2018).

A diferenciação dessas duas espécies, apenas por características fenotípicas, representa um grande desafio, pois não há marcadores bioquímicos específicos.

Apesar disso, métodos fenotípicos ainda têm sido os mais empregados na rotina laboratorial. Por outro lado, o interesse por métodos moleculares têm crescido devido sua rapidez e maior sensibilidade (RATHORE *et al.*, 2018).

Essas espécies de ECP podem carrear o gene *mecA* e o gene codificador da leucocidina de *Panton-Valentine* (PVL). O *mecA* é responsável pela expressão de uma proteína ligante de penicilina alterada (do inglês, *penicillin-binding protein* - PBP2a) e confere resistência à meticilina (oxacilina no Brasil). A PVL é uma toxina que causa lise celular e necrose tecidual, responsável por infecções mais severas, associada principalmente a isolados da comunidade, mas já observada em isolados hospitalares (ZHANG; GUO; CHU, 2018).

Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo propor um novo método de *Multiplex-PCR* (do inglês, *Polymerase Chain Reaction* - PCR) para diferenciar as espécies *S. aureus* e *S. pseudointermedius* e detectar os genes *mecA* e codificador de PVL de amostras coletadas de humanos e cães, provenientes do ambiente hospitalar e da comunidade.

Materiais e métodos

Seleção dos primers e controles positivos

Foram selecionados pares de *primers* espécie-específicos, baseados na sequência do gene 16SrDNA para *S. aureus* e *S. pseudointermedius*, além dos *primers* selecionados para a detecção dos genes *mecA* e para codificação da PVL. Cepas de referência (ATCC 33591 e ATCC 25923 - *S. aureus*) e isolados clínicos previamente testados e identificados foram selecionados como controles positivos.

Padronização da Multiplex-PCR com os primers selecionados

Os *primers* selecionados foram analisados quanto ao número de pares de bases, as possíveis temperaturas de *melting* e o tamanho do *amplicon*. A partir dessas informações foram testadas diferentes condições de ciclagens, com variações na temperatura de *melting* e no número de ciclos. Um novo par de *primers* foi testado para a detecção do gene *mecA* na *Multiplex-PCR*.

Seleção das amostras hospitalares e comunitárias

Como última etapa para padronização da *Multiplex-PCR* foram testadas 65 amostras hospitalares de hemoculturas positivas para *S. aureus*, identificadas e com o perfil de sensibilidade aos agentes antibacterianos determinado pelo método automatizado BD Phoenix® (Becton and Dickinson, Sparks, USA), de pacientes internados no Hospital Universitário de Maringá, no período de fevereiro de 2015 a abril de 2019.

Também foram testadas 69 amostras estocadas no banco do LMM, caracterizadas fenotipicamente como estafilococos coagulase positivos (ECP) provenientes da comunidade, sendo 30 de amostras de humanos e 39 de cães. O perfil de sensibilidade dessas amostras já estava previamente determinado pelos testes de Kirby-Bauer (disco-difusão) e pelo ágar diluição, de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Todas as 134 amostras foram submetidas a reações moleculares de PCR para identificação das espécies de ECP, do gene *mecA* e do gene codificador de PVL, para posterior confirmação na reação de *Multiplex-PCR* sugerida nesse trabalho. O

projeto foi aprovado no comitê de ética animal e biossegurança da Universidade Estadual de Maringá - UEM (COPEP – 075/2011) e comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da UEM (CAAE 318.0.093.000-11/COPEP).

Resultados e Discussão

Nos testes iniciais, os *primers* selecionados para a padronização da *Multiplex-PCR* foram capazes de detectar as espécies *S. aureus* e *S. pseudointermedius*, assim como os genes *mecA* e codificador de PVL nas cepas de referência e nos isolados clínicos utilizados como controles positivos. Em seguida, foram testadas diferentes condições de ciclagens. Inicialmente, a reação foi padronizada com temperatura de *melting* de 56°C, uma média da temperatura dos *primers* selecionados. Entretanto, as amostras positivas para o gene *mecA* não amplificaram na *Multiplex-PCR*, sendo na sequência testadas as temperaturas de 52°C e 54°C. Também foi alterado o primer de *mecA* de 310 pares de bases (pb) selecionado no início do estudo, por um primer de 147pb. Após os testes da temperatura de *melting* e número de ciclos mais eficazes, a reação foi padronizada nas seguintes condições de ciclagem: ciclo de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e um final de 72°C por 10 minutos.

Os resultados obtidos na última etapa estão demonstrados na tabela 1. A *Multiplex-PCR* padronizada nesse trabalho demonstrou ser capaz de diferenciar os isolados de *S. aureus* e *S. pseudointermedius* apresentando resultados com similaridade de 100% com os resultados obtidos em reações *PCR single*. Outros autores já padronizaram a *Multiplex-PCR* para diferenciação de ECPs e do gene *mecA*, mas não foi encontrado na literatura uma *Multiplex-PCR* que abrangesse os genes propostos, capaz de detectar simultaneamente a espécie *S. pseudointermedius*, muitas vezes identificado como *S. aureus*.

Tabela 1. Distribuição das amostras quanto a espécie, presença dos genes *mecA* e codificador de PVL

Amostras		<i>S. aureus</i> n(%)	<i>S. pseudointermedius</i> n(%)	Sem espécie definida n(%)	<i>mecA</i>	PVL**
Hospitalares	Humanos (n:65)	65 (100)	0	0	20 (30,7)	3 (4,6)
	Comunidade					
	Humanos (n:30)	30 (100)	0	0	2 (6,6)	1 (3,3)
	Cães (n:39)	35 (89,8)	3 (7,7)	1 (2,5)	4* (10,2)	0
	Total	130 (97)	3 (2,2)	1 (0,8)	26 (19,4)	4 (2,9)

Das 4 amostras, 3 são *S. aureus* e 1 é sem espécie definida **Leucocidina de *Panton-Valentine*, n: número de amostras

A reação de *Multiplex-PCR* pode auxiliar na diferenciação dessas espécies e reduzir, particularmente o subdiagnóstico de *S. pseudointermedius* em humanos, o que poderia induzir a erro no tratamento, pois ECPs apresentam diferentes pontos de corte de sensibilidade à oxacilina. Isolados sensíveis de *S. aureus* possuem uma concentração inibitória mínima (CIM) ≤ 2 µg/mL e isolados resistentes CIM ≥ 4 µg/mL. Enquanto isolados sensíveis de *S. pseudointermedius* possuem CIM de $\leq 0,25$ µg/mL para isolados resistentes CIM de $\geq 0,5$ µg/mL.

Outro ponto a ser considerado é que as técnicas de sensibilidade aos antibacterianos podem falhar na detecção de isolados resistentes. Há discrepância entre os resultados dos testes fenotípicos e moleculares para detecção desses isolados. Em nosso estudo, das 25 amostras positivas para o gene *mecA*, seis delas haviam sido previamente caracterizadas como sensíveis à meticilina por métodos fenotípicos.

Embora tenha sido encontrado somente isolado portador do gene codificador de PVL na comunidade, onde geralmente é mais encontrado, o mesmo foi identificado também em amostras hospitalares (4,6%). O que está de acordo com a literatura recente, que vem relatando a presença desse gene em isolados hospitalares, resultando em infecções nosocomiais mais severas e de difícil tratamento.

Conclusões

A reação *Multiplex*-PCR padronizada nesse estudo mostrou ser uma ferramenta eficiente e segura para a diferenciação das espécies *S. aureus* e *S. pseudointermedius* entre os demais estafilococos coagulase positivos e para detecção simultânea dos genes *mecA* e codificador de PVL em amostras de humanos e animais, provenientes do ambiente hospitalar ou da comunidade.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio ao desenvolvimento científico.

Referências

1. MOUSAVI, M. N. S.; et al. The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* in autoimmune diseases. **Microbial pathogenesis**, v.111, p. 503-507, 2017.
2. LEE, A. S.; et al. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, 2018.
3. ZHANG, C.; GUO, Y.; CHU, X. *In Vitro* generation of Panton-Valentine leukocidin (PVL) in clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its correlation with PVL variant, clonal complex, infection type. **Scientific reports**, 2018.
4. RATHORE, K.; et al. Evaluation of multiplex polymerase chain reaction as an alternative to conventional antibiotic sensitivity test. **Veterinary world**, v.11, p. 474, 2018.
5. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. 25th ed. CLSI Document M02-A1. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.