

# Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* de origen nosocomial por Electroforesis de Enzimas Multilocus (MLEE)

## Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* from nosocomial sources by Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)

Zulma Suárez \*, Emilia María Valenzuela \*, José Ramón Mantilla \*, Carlos Agudelo\*\*

### RESUMEN

Se caracterizaron 41 aislamientos de *Staphylococcus aureus* tomados a pacientes y personal de la unidad de cuidados intensivos (UCI) del Hospital San Juan de Dios, en el periodo comprendido entre septiembre de 1998 y septiembre de 1999 por medio del método de caracterización de Electroforesis de Enzimas Multilocus (MLEE). Se establecieron las relaciones genéticas entre los individuos, así como influencia del perfil de resistencia, el biotipo y el periodo de recolección. La evidencia experimental sugirió que la estructura de la población analizada encaja en el modelo clonal descrito previamente para las poblaciones de *Staphylococcus aureus*, coincidiendo con la prevalencia de un pequeño número de clones durante el periodo de recolección.

Palabras clave: Electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), *Staphylococcus aureus*, Enfermedades nosocomiales.

### ABSTRACT

Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) was used to characterise 41 *Staphylococcus aureus* isolates taken from Hospital San Juan de Dios (Bogotá) patients and personnel at the Intensive Care Unit (ICU), from September 1998 to September 1999. The genetic relationships between isolates, as well as resistance profile influence, biotype and compilation time/date, were established. The experimental evidence suggests that the population structure corresponds to the clonal model described for *Staphylococcus aureus* populations, reflecting the prevalence of a small number of clones during the collection period.

Key words: Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), *Staphylococcus aureus*, nosocomial diseases

### INTRODUCCIÓN

Los trabajos realizados en torno a *Staphylococcus aureus* Meticilino-Resistentes (MRSA) residentes en el ambiente hospitalario son numerosos. Sin embargo, pocos se ajustan a la realidad de hospitales y clínicas colombianas, de modo que no se dispone de estudios profundos que describan la situación real y con ello, permitan proponer alternativas.

El objeto de este estudio fue estimar las relaciones existentes entre 41 aislamientos de *Staphylococcus aureus* tomados a pacientes y personal de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital San Juan de Dios, en el periodo comprendido entre septiembre de 1998 y septiembre de 1999 por medio del método de tipificación Electroforesis de Enzimas Multilocus (MLEE), y deducir las asociaciones entre las relaciones detectadas por la téc-

\* Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional De Colombia. Ciudad Universitaria. Edificio Manuel Ancizar. A.A. 14490.  
Fax 3165415 Teléfono 3165000 extensión 16959. e- mail: zulsua@ciencias.unal.edu.co

\*\* Instituto de Salud en el Trópico. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Teléfono 3165000 extensión 15036

Recibido: julio 26 de 2002; aceptado: diciembre 20 de 2002

nica y la información obtenida entre la historia clínica, como por ejemplo la terapia antibiótica usada y el periodo de permanencia en la sala.

## METODOLOGÍA

### Población analizada

La población total estuvo conformada por 41 muestras de *Staphylococcus aureus*, 27 de las cuales fueron aisladas de pacientes hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital San Juan de Dios, Bogotá D.C. Colombia entre septiembre de 1998 y septiembre de 1999 (subpoblación de Pacientes). Simultáneamente, se tomaron 54 muestras al personal de la sala, identificando 12 de éstas como *Staphylococcus aureus* (subpoblación de personal). Se incluyeron además una cepa patrón de *S. aureus* ATCC 25932 y un *Sfaphylococcus xilosus* recolectado en la UCI durante el mismo periodo. Todas las muestras fueron identificadas con el sistema API ID 32 system para *Staphylococcus* y *Micrococcus* (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), el cual asigna un número de biotipo a cada aislamiento de acuerdo con un set de pruebas bioquímicas

### Antibiogramas

Todas las cepas fueron sometidas a pruebas de susceptibilidad de antibióticos mediante el Kit *bioMérieux's ATB Staph system* (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

### Electroforesis de Enzimas Multilocus (MLEE)

Cada aislamiento fue crecido en 40 ml\_ de infusión cerebro-corazón (BHI Difco USA) durante toda la noche a 37°C en un agitador orbital (250 rpm) y recogido por centrifugación a 6000 g por 30 minutos. Posteriormente, las proteínas fueron extraídas y sometidas a electroforesis bajo condiciones previamente establecidas para el laboratorio (Bustamante 1999). Se determinó la actividad enzimática de 11 enzimas: Adenilato kinasa (ADK 2.7.4.3), Alanina deshidrogenasa (ALD 4.1.2.13), nucleósido fosforilasa (NSP 2.4.2.1), NADH diaforasa (NADH DÍA 1.8.4.1), NADPH diaforasa (NADH DÍA 1.6.99.1), lactato deshidrogenasa

(LDH 1.1.1.27), enzima málica (ME 1.1.1.40), fosfoglucosa isomerasa (PGI 5.3.1.9), glutámico pirúvico transaminasa (GPT 2.6.1.2), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P 1.1.1.49), y alcohol deshidrogenasa (ADH 1.1.1.1), de acuerdo con la técnica descrita previamente (Selander *etal.* 1986)

Las variantes de movilidad de cada enzima (electromorfos) se numeraron en orden decreciente de migración anodal y se igualaron a alelos al correspondiente locus estructural. El desplazamiento de los electromorfos fue expresado en términos de la movilidad relativa con respecto al azul de bromofenol. La ausencia de actividad enzimática fue atribuida a un alelo nulo y se asignó un valor de cero. Cada aislamiento fue caracterizado a partir de la combinación de los alelos de los 11 loci enzimáticos, lo cual se designó como tipo electroforético.

### Análisis estadístico

Se utilizaron los programas elaborados por TS Whittam para analizar los datos de los TE y para calcular las diversidades genéticas y genotípicas como resultado de sus trabajos en MLEE en poblaciones de *Escherichia coli* (Whittam 1983). La diversidad genética por locus se calculó como se describe previamente (Selander *etal.* 1986). Se construyó una matriz de distancia basada en las diferencias existentes entre pares de TE. Los alelos nulos no fueron tenidos en cuenta para las comparaciones. La matriz de distancia permitió obtener un dendograma usando como estrategia de agrupamiento el método UPGMA (Figura 1).

La estructura de la población fue establecida calculando el índice de asociación ( $I_A$ ) descrito por Maynard (1993) como medida de la asociación no aleatoria entre loci.  $I_A$  se calculó a partir de la matriz del número de diferencias entre aislamientos o entre TE, a nivel de la población total o de las subpoblaciones de pacientes y personal, y de los dos principales grupos de biotipo. También se hizo la distribución de frecuencias para el número de diferencias, tanto entre TE como entre aislamientos, como indicador de alta varianza. (Figura 2)

La técnica se evaluó en cuanto a su capacidad de tipificación y su poder de discriminación, usando el índice de discriminación (D) reportado por Hunter y Gastón (1988).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Biotipos y antibiogramas

Se identificaron 9 biotipos, pero fueron predominantes los biotipos 1 y 2. Se determinó que todas las cepas fueron sensibles a teicoplanina, trimetropin-sulfa y vancomicina, mientras que presentaron resistencia a eritromicina, clindamicina, pefloxacina y ciprofloxacina. Este hecho sugiere preliminarmente la presencia de un antecesor común con este perfil de resistencia dentro de la población analizada. La combinación de los resultados de resistencia a otros antibióticos (penicilina, cefalotin, ampicilina-sulbactam, gentamicina, netilmeticilina, tetraciclina, furantoína y rifampicina) permitió generar 19 patrones de resistencia antibiótica (Datos no mostrados) (Suárez 2000)

### TE y diversidad genética

Todas las enzimas analizadas fueron polimórficas. El número de alelos varió entre 2 y 7, para las enzimas G6PD y NADH DÍA respectivamente. Con este resultado se obtuvo un promedio de 4.5 alelos por locus. La diversidad genética promedio para la población fue de 0.506 (Tabla 1). La diversidad genotípica calculada para la población total fue de 0.948. La diversidad genotípica calculada sobre las

subpoblaciones fue de 0.894 y 0.913 para personal y pacientes, respectivamente. (Datos no mostrados). Estos valores resultan altos al compararlos con otros valores obtenidos en estudios previos de *S. aureus*, sin embargo este comportamiento puede estar revelando variabilidad genética, hecho que se ha relacionado con un impacto notable en las propiedades biológicas de relevancia medica. (Tibayrenc 1996). De otro lado, una alta diversidad genotípica como la observada podría revelar la coexistencia de clones de abundancia similar (Fuste *et al.* 1996; Go *et al.* 1996)

La combinación de electromorfos permitió obtener 30 tipos electroforéticos (TE). El promedio de aislamientos por TE fue de 1.36. La frecuencia más alta fue para el TE 4, el cual caracterizó 6 aislamientos. 24 TE representaron un solo aislamiento, sin embargo debe resaltarse que las poblaciones de personal y pacientes no tuvieron TE en común. En siete casos diferentes, se obtuvieron dos aislamientos del mismo paciente, pero en sólo uno de ellos los dos aislamientos fueron representados por el mismo TE, y los casos restantes mostraron diferentes TE e incluso diferentes patrones de resistencia

### Estructura de la población

Los valores obtenidos para el índice de asociación a todos los niveles (Tabla 2) sugieren que la estructura de la población encaja en el modelo clonal descrito por Maynard Smith (Maynard 1993), siendo esto coherente con la tendencia bimodal presentada por la distribución de frecuencias tanto para TE como para aislamientos (Figura 2).

**Tabla 1.** Número de alelos por locus y diversidad genética

Locus	Número de alelos	Diversidad
NADH DIA	7	0.503
NADPH DIA	7	0.464
NSP	4	0.251
ALD	6	0.752
ADK	4	0.356
LDH	4	0.513
ME	4	0.552
PGI	3	0.503
GTP	4	0.616
G6P	2	0.515
ADH	5	0.540
Total	4.5	0.506

**Tabla 2.** Índice de asociación calculado para todas las subpoblaciones consideradas, tanto entre Aislamientos como entre TE

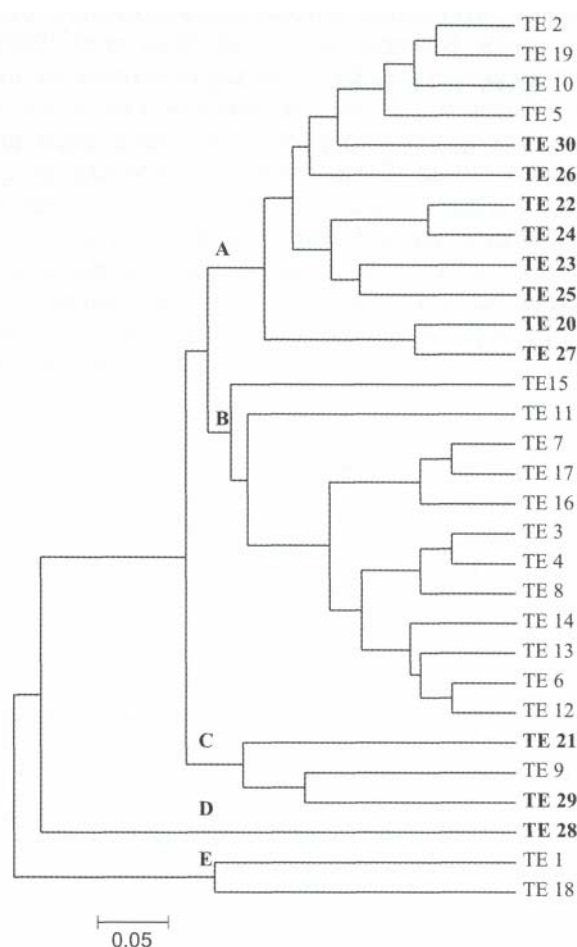
Población	Aislamientos	TE
Pacientes	1.413± 0.253	1.451± 0.311
Personal	1.110± 0.384	1.307± 0.402
Grupo A	0.449± 0.3776	0.554± 0.393
Grupo B	0.223± 0.293	0.387± 0.388
Biotipo 1*	1.501± 0.3732	1.733± 0.4053
Biotipo 2	1.408± 0.3612	1.231± 0.4067
Total	1.129± 0.2120	0.994± 0.247

Estos dos indicadores han sido referenciados previamente para la estimación de la estructura de poblaciones de otros patógenos multirresistentes (Fuste *et al.* 1996; Go *et al.* 1996). Las poblaciones son clónales cuando la recombinación no es frecuente y el desequilibrio de ligamiento es alto. En este caso, los valores de  $I_A$  son estadísticamente diferentes de 0 a todos los niveles del análisis. En contraste, cuando la recombinación es frecuente los valores de  $I_A$  no difieren estadísticamente de 0, lo cual sugiere que la población es sexual o panmítica.

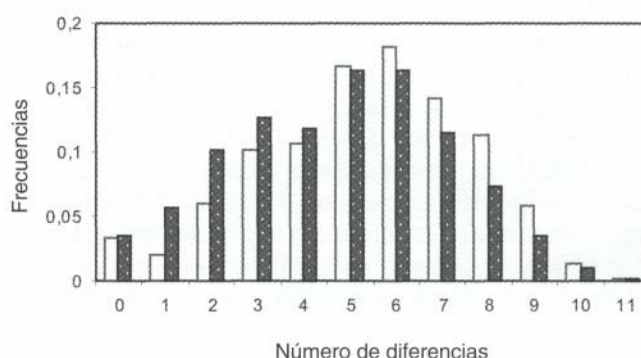
En los valores obtenidos para  $I_A$  se observa una disminución al contemplar los grupos obtenidos por el dendograma, lo cual podría sugerir una estructura epidémica, sin embargo esta consideración se invalida ya que al examinar los grupos o cluster se remueve la mayor parte del desequilibrio automáticamente y por esto no puede detectarse al calcular  $I_A$ . Además, la baja asociación a este nivel puede justificarse por la presencia de un TE más común que los demás (TE 4) que difiera de ellos en uno o dos loci. El hecho de que los grupos existan porque la recombinación no los ha roto es evidencia de una estructura cercanamente clonal para la población completa. Este hecho sería acorde con lo previamente establecido para la diversidad genotípica. Todo lo anterior es válido para sugerir una estructura poblacional en la que algunos clones emergieron como resistencia a una presión selectiva, tal como la resistencia antibiótica, razón por la cual conservan resistencia a un grupo de antibióticos.

En el dendograma obtenido (Figura 1) se observa la formación 5 grupos principales a una distancia genética de 0.22, comportamiento similar al reportado en estudios previos. (Musser *et al.* 1992; Fitzgerald *et al.* 1997) Este agrupamiento coincide con la subpoblación de origen, ya que el 75% de los individuos de la población de personal fueron incluidos en el grupo A y el 78% de los individuos de la subpoblación de pacientes fueron incluidos en el grupo B. Igualmente se observó que el aislamiento de *S. xilosus* incluido se ubicó en la rama más distante del dendograma, representado por el TE 1.

La forma del dendograma ha sido utilizada para elucidar la estructura de la población, dado que los dendogramas que tengan ramificaciones profundas (semejantes a un árbol) podrían ser identificados con poblaciones clónales, mientras que aquellos con muchas ramificaciones no profundas (como un cepillo)



**Figura 1.** Dendograma obtenido a partir de la matriz de diferencias entre TE, usando como estrategia de agrupamiento UPGMA. En negrilla los TE de la población de personal, el TE 1 ubicado en la rama más alejada corresponde a *S. xilosus*. A una distancia de 0.22 se observan los grupos demarcados por las letras mayúsculas.



**Figura 2.** Distribución de frecuencias para el número de diferencias. Las barras negras representan las diferencias entre TE y las barras blancas entre aislamientos.

pueden corresponder a poblaciones sexuales (Fuste *et al.* 1996; Selander *et al.* 1994; Wise *et al.* 1995). En el caso bajo estudio, el dendograma presenta una ramificación a 0.34 pero se asemeja a un cepillo si sólo se consideran los grupos A y B en la unión que aparece a 0.22. Estos resultados, además de los obtenidos para el índice de asociación, soportan la hipótesis de que la población examinada tiene una estructura clonal. Un comportamiento similar al observado ha sido reportado en estudios previos para *Staphylococcus aureus* y, *Haemophilus influenzae* (Fuste *et al.* 1996; Musser *et al.* 1992; Selander *et al.* 1985)

La razón principal para determinar la estructura de la población fue saber si los clones existentes provenían de un antecesor común. Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que dada la presencia de resistencias comunes en los grupos A y B, y la detección de nuevas resistencias en los individuos sometidos a terapia es probable que un clon con el perfil de resistencia conservado circulara dentro de la sala, hecho que le permitió colonizar a los pacientes y con ello adquirir resistencia a los antibióticos de la terapia de cada paciente, como resultado de la presión antibiótica. Dado que los aislamientos caracterizados por el TE 4 fueron colectados en diferentes momentos del periodo de tiempo contemplado, se puede sugerir que dicho clon tiene estabilidad espacio temporal.

### Análisis de la técnica

La capacidad de tipificación para MLEE fue del 100%, resultado que corresponde a una capacidad de tipificación ideal para cualquier técnica de tipificación y que sugiere que la detección de polimorfismos por MLEE representa una característica estable para la tipificación. Los resultados del índice de discriminación otorgan el mayor poder de discriminación a la caracterización por MLEE (97.35%), con respecto a la caracterización por biotipo (77.19%) o antibiogramas (90.51%). Este resultado revela la importancia de implementar técnicas de tipificación que aumenten la información obtenida en la práctica médica de rutina, la cual se basa esencialmente en el uso del biotipo y el perfil de resistencia.

El desarrollo de este trabajo permitió establecer las relaciones genéticas existentes entre una población de *Staphylococcus aureus* obtenidos en el ámbito hospitalario. Igualmente, fue posible proponer una estructura clonal para población bajo estudio dada la presencia de perfiles de resistencia comunes a la mayoría de la población, usando una técnica que demostró tener una capacidad de tipificación y poder de discriminación aceptables para los objetivos del trabajo.

### AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo fue desarrollado con Financiación del Posgrado Interfacultades de Microbiología. Los autores agradecen la colaboración del Dr. T. Whittam de la Universidad Estatal de Pensilvania y de Diego Riaño y Silvia Bustamante del Instituto de Biotecnología en el análisis de los datos.

### BIBLIOGRAFÍA

- Bustamante, S.1999. Caracterización por Electroforesis de Enzimas Multilocus de *Vibrio cholerae*. Trabajo de grado para optar al título de Bióloga. Universidad Nacional de Colombia.
- Fitzgerald J.R., Meaney W.J., Hartigan P.J., Smyth C.J., Kapur V.1997. Fine-Structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol Infect.* 119:261-269.
- Fuste M.C., Pineda A., Palomar J., Viñas M., Loren J.G. 1996. Clonality of multidrug-resistant non-typeable strains of *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* 34:2760-2765.
- Go M., Kapur V., Graham D., Musser J. 1996. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J. Bacteriol.* 178:3934-3938.
- Hunter P., Gastón M.1988. Numerical Index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson Index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26.2465-2466.

- Kapur V., Sisco W., Greer R., Whittam T.S., Musser J. 1995. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from Cows. *J. Clin. Microbiol.* 33:376-380.
- Maynard S.J., 1993. ¿How Clonal are bacteria?. *Proc Natl Acad Sci.* 90:4384-4388.
- Musser J., Kapur V. 1992. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J Clin Microbiol.* 30:2058-2063.
- Selander K., Li J., Boyd F., Wang F. y K. Nelson. 1994. DNA sequence analysis of the genetic structure of populations of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. En *Bacterial Diversity and Systematics. Series FEMS symposium.* Priest, F, Ramos Cormezana A, Tindall, B.J.. Plenum Press. New York.
- Selander R., Mckinnety R., Whittam T., Bibb W., Brenner D., Nolte F., Pattison P. 1985. Genetic Structure of Populations of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 163;(3):1021-1037.
- Selander R.K., Caugant D., Ochman H., Musser J., Gilmour M. y T. Whittam. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Env. Microbiol.* 5:873-883.
- Suárez, Zulma. 2000 Caracterización Molecular de *Staphylococcus aureus* por Electroforesis de Enzimas Multilocus. Tesis de Grado para optar al título de Química Farmacéutica. Universidad Nacional de Colombia.
- Tenover F., Arbeit R., Archer G. 1994. Comparison of Traditional and Molecular Methods of Typing Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 32;(2).407-415.
- Tibayrenc M. 1996. Towards a Unified Evolutionary Genetics of Microorganism. *Ann. Rev. Microbiol.* 50:401-429.
- Whittam T., Ochman H., y R.K, Selander. 1983. Multilocus Genetic Structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 80:1951-1955.
- Wise M., Shimkets L y V. McArthur. 1995. Genetic Structure of a Lotic Population of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *Appl Env Microbiol.* 61(5):1791-1798.