

# **Factores de virulencia y formación de biofilm en *Staphylococcus* spp. aislados de infecciones en humanos y bovinos**

---

---

Año  
2018

Directoras del proyecto  
Porporatto, Carina y Sola, Claudia

Equipo de investigación  
Aimaretto, Claudia; Conesa, Agustín; Giordanengo, Laura;  
Orellano, Soledad y Raimondi, Karina

Alumna participante  
Delgado, Silvina

Este documento está disponible para su consulta y descarga en el portal on line de la Biblioteca Central "Vicerrector Ricardo Alberto Podestá", en el Repositorio Institucional de la **Universidad Nacional de Villa María**.

CITA SUGERIDA

Porporatto, C., [et al.] (2018). *Factores de virulencia y formación de biofilm en Staphylococcus spp. aislados de infecciones en humanos y bovinos*. Villa María: Universidad Nacional de Villa María





---

**INFORME ACADÉMICO FINAL**  
**Proyectos de Investigación 2016-2017**

**PROYECTO:**

**Factores de virulencia y formación de biofilm en *Staphylococcus* spp. aislados de infecciones en humanos y bovinos**

**DIRECTOR:**

Carina Porporatto

**CO-DIRECTOR:**

Claudia Sola

**EQUIPO DE INVESTIGACIÓN:**

Aimaretto, Claudia

Conesa, Agustín

Giordanengo, Laura

Orellano, Soledad

Raimondi, Karina

**ALUMNOS INTEGRANTES:**

Delgado Silvina

**1. INFORME ACADÉMICO DEL PROGRAMA/PROYECTO**

El presente proyecto estudia a las bacterias del género *Staphylococcus* como importantes patógenos responsables de infecciones nosocomiales graves y asociadas a la comunidad en los seres humanos, pero también de infecciones del ganado lechero con un impacto

---



---

## INFORME ACADÉMICO FINAL

### Proyectos de Investigación 2016-2017

considerable en la economía del sector lácteo. Estas bacterias tienen la capacidad de adquirir resistencia a los antibióticos, emergiendo así cepas de *Staphylococcus aureus*, resistentes a metilina (MRSA), y el control de su diseminación es uno de los principales objetivos en salud pública a nivel mundial. El aumento en el número de infecciones por MRSA asociadas a la comunidad ha dado lugar a estudios tendientes a evaluar el origen de estas cepas y las bases que determinan su mayor virulencia.

El desarrollo de las infecciones estafilocócica y su persistencia dependen de la interacción entre bacterias invasoras y el sistema inmune del tejido infectado. *Staphylococcus spp.* presenta la habilidad de formar biopelículas o biofilm, resistiendo de esta forma a la terapia antibiótica y a la acción del sistema inmunológico. Este factor de virulencia es importante tanto en contextos médicos como veterinarios, dado que participaría en el desarrollo de infecciones persistentes. La formación de biofilm por estas bacterias se asocia a la síntesis del polisacárido de adhesión intercelular, regulada por el operón *icaABCD*, y a ciertas proteínas asociadas a la adhesión celular.

La mayoría de los estudios en relación con la formación de biofilm en animales, se han centrado en cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina. Este equipo de investigación ha determinado una elevada prevalencia de aislamientos formadores de biofilm en los establecimientos lecheros de la región. Dada la importancia de este factor de virulencia detectada, nos planteamos ampliar los estudios para conocer la relevancia de la formación de biofilm en aislamientos bovinos y humanos género *Staphylococcus*. En base a los antecedentes planteados, el objetivo general del presente proyecto es evaluar la capacidad de formación de biofilm de cepas de *Staphylococcus spp* aisladas tanto de infecciones humanas como bovinas en nuestra región, la prevalencia de genes implicados en este proceso, y la epidemiología molecular de los aislamientos de *S. aureus* bovinos en relación a los de humanos.

1. Obtención e identificación de aislamientos de *Staphylococcus spp* bovinos y humanos. Se tomaron aislamientos humanos de distintas fuentes de pacientes del Hospital Pasteur de Villa María, se recuperaron 200 cepas de *S. aureus* aisladas de: heridas de sitio quirúrgico, hemocultivos, punta de catéter, líquidos de punción, abscesos, portación nasal, urocultivos, prótesis. Se encontró un 48 % de MRSA. Además, 50 cepas de *Staphylococcus spp* coagulasa negativa se aislaron de hemocultivos, punta de catéter, urocultivos y otros materiales donde se jerarquizó el hallazgo por considerarlo vinculante a la patología y factores de riesgo asociados. Los mismos presentaron una metilina resistencia del 55%. En



---

## INFORME ACADÉMICO FINAL

### Proyectos de Investigación 2016-2017

ambos grupos se probó sensibilidad a macrólidos, fluorquinolonas, trimetoprima-sulfametoxazol, minociclina, rifampicina y gentamicina.

En cuanto a los aislamientos bovinos, se utilizaron 120 aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) obtenidos de muestras de leche compuesta de vacas pertenecientes a tambos de la región centro-sur de la provincia de Córdoba. Se planteó la identificación de los mismos a nivel de especie mediante el análisis del polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) del gen gap. Como resultado se obtuvo que las especies de SCN más prevalentes en los aislamientos bovinos estudiados resultaron: *S. chromogenes* (n=42, 35%), *S. xylosus* (n=39, 32.5%) y *S. haemolyticus* (n=24, 20,4%), y las de menor prevalencia fueron *S. warneri* (n=10, 8%), *S. simulans* (n=3, 2.5%), *S. hominis* (n=1, 0.8%) y *S. cohnii* (n=1, 0.8%). La identificación de las especies de SCN se comparó con los obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), técnica utilizada en la identificación de microorganismos mediante la creación de un espectro basado en el perfil de proteínas, considerada como metodología de referencia. Mediante este estudio, identificamos 114 cepas de SCN bovinas a nivel de especie, considerando una puntuación de corte > 1,7. El 96,5% (110/114) de los resultados de identificación de especies obtenidos por gap PCR-RFLP coincidieron con aquellos obtenidos por MALDI-TOF MS. Estos estudios se realizaron en colaboración con la Dra. Claudia Raspanti de la UNRC.

2- Evaluación de la formación de biofilms en aislamientos bovinos y humanos de *Staphylococcus* spp.

Como segundo objetivo nos planteamos evaluar la formación de biofilms en aislamientos bovinos y humanos de *Staphylococcus* spp. Se determinó la formación de biofilm mediante el método de adherencia al plástico y tinción con cristal violeta (CV) al 0.1% (CITA). A partir de un cultivo de 16 hs estandarizado a 0,5 de la escala de McFarland, se inocularon alícuotas de 200 µl de cada dilución en pocillos de policubetas de cultivo celular. Se continuó la prueba con una incubación a 37°C por 24 hs, descarte del cultivo planctónico mediante 3 lavados con NaCl 0,9% y secado por 1 h a 60°C para fijar el biofilm. A continuación, se agregó igual volumen de cristal violeta 0,1% y luego de incubar la placa 15 min a Tº ambiente, se lavó 3 veces con agua destilada y se agregó alcohol al 96%. Finalmente, se obtuvo la lectura de DO a 570 nm en lector de ELISA. Se clasificaron los aislamientos a partir de la DOc (0,026) en no formadores, débiles, intermedios y fuertes. La mayoría (74,2%) de los aislamientos de *S. aureus* humanos analizados no presentaron la habilidad para formar biofilm, mientras que una minoría fueron considerados aislamientos



---

## INFORME ACADÉMICO FINAL

### Proyectos de Investigación 2016-2017

positivos para esta capacidad (25,8%). Del total de los aislamientos positivos para la formación de biofilm, el 6.9% resultaron débiles, el 4.4% intermedios y el 14.5 fuertes formadores.

En cuanto a los aislamientos bovinos analizados, la mayoría de los SCN (92,5%) presentaron la habilidad para formar biofilm, mientras que una minoría fueron considerados aislamientos negativos para la formación de biofilm (7,5%). Del total de los aislamientos positivos para la formación de biofilm, el 64,9%, 16,2% y 18,9% resultaron fuertes, intermedios y débiles formadores de biofilm, respectivamente. La capacidad de formación de biofilm mostró variaciones en las distintas especies. De las cuatro especies de SCN más prevalentes, *S. xylosum* y *S. haemolyticum* resultaron los mayores productores de biofilm, con 84,6% y 80,0% de los aislamientos fuertes formadores, mientras que solo el 29,5% de los aislamientos identificados como *S. chromogenes* presentaron esta capacidad. Los resultados sugieren una elevada prevalencia de cepas formadoras de biofilm en los aislamientos bovinos, lo cual no se observa en los aislamientos humanos.

3- Detección de la presencia de genes asociados a la adhesión y formación de biofilms en aislamientos bovinos y humanos de *Staphylococcus* spp.

Se detectó la presencia de genes asociados a la adhesión y formación de biofilms en 18 aislamientos bovinos de SCN. Se estudiaron los genes asociados a adherencia (*clfA*, *clfB*, *FnbpA*, *FnbpB*, *agr*, *sar*, *ebps*, *aap*, *fbe*, *altE*, *embP*, *eno* y *cna*) y biofilm (*bap*, *icaA* e *icaD*) en los aislamientos mediante PCR. Para la amplificación de los fragmentos de interés se utilizaron oligonucleótidos específicos siguiendo las condiciones de reacción descritas previamente en otros trabajos. En cuanto a los genes estudiados, no se observó señal de amplificación para los genes *clfA*, *clfB*, *FnbpA*, *FnbpB*, *agr*, *sar*, *ebps*, *bap* e *icaA*. Respecto a los restantes genes evaluados, el orden en frecuencia decreciente de detección, fue: *eno* > *aap* > *cna* > *fbe* > *altE* > *icaD* > *embP*. Los porcentajes obtenidos para cada gen fueron de 100% (18/18), 72,2% (13/18), 55,5% (10/18), 50% (9/18), 22,2% (4/18), 16,6% (3/18), y 11,1% (2/18) para cada gen respectivamente. Los resultados sugieren una elevada prevalencia de genes asociados a adhesión celular y biofilm en los aislamientos bovinos en estudio.

4- Caracterizar molecularmente los aislamientos de *S. aureus* de bovinos y compararlo con los clones prevalentes en humanos.

Se estudiaron 130 aislamientos bovinos de *S. aureus* obtenidos y caracterizados previamente por el grupo. En el análisis de susceptibilidad a los antibióticos por difusión en



---

## INFORME ACADÉMICO FINAL

### Proyectos de Investigación 2016-2017

disco a todos los aislamientos se detectó 100% de susceptibilidad a Cefoxitina, Oxacilina, Ciprofloxacina, Tetraciclina y Gentamicina, y solo se detectó resistencia a Eritromicina y Clindamicina en 7/130 (5%) de los aislamientos. La susceptibilidad a los antibióticos  $\beta$ -Lactámicos fue confirmada por PCR para el gen mec A y mec C, que resultó negativa en todos los casos.

A una muestra representativa elegida al azar de los aislamientos MSSA (n: 35) se realizó el análisis molecular por spa typing (spa type; t) y PFGE. El tipo secuencial (ST)/Complejo Clonal (CC) se infirió de acuerdo al t, en aquellos que no tuvieron un ST relacionado se realizará Multilocus Sequence Typing (MLST). La resistencia a MLSbC se detectó en 8,5% (3/35) de estos aislamientos analizados a nivel molecular. Si bien se demostró la existencia de 11 genotipos entre estos aislamientos de MSSA, el 68% de los aislamientos estuvieron representados por dos genotipos principales: 1-PulsotipoDD-t267-ST97 (34%, n: 12) y 2-PulsotipoDDO-t17743 (34%, n: 12). En este segundo genotipo, el spa type fue un nuevo tipo incorporado en la base de datos <http://www.spaserver.ridom.de/>. Por tal motivo, todavía no se puede inferir el ST relacionado y se va a realizar experimentalmente (segundo semestre 2018). Además del t267, los tipos spa t1190 y t2844 también están asociados al CC97, por lo tanto este linaje representa el 40% de los aislamientos. Además es el único genotipo que se detectó la resistencia a macrólidos y lincosaminas en el 25% (3/12) de estos aislamientos MSSA. Otro dato importante, es la distribución clonal en los diferentes establecimientos, lo que demuestra la transmisión dentro de los mismos. Estos resultados sugieren el salto evolutivo desde el ganado bovino al hombre de este linaje con alta capacidad de transmisión o diseminación, en Argentina siendo el ganado posible reservorio de genotipos resistentes a los ATB. Esta hipótesis se podría confirmar a través del análisis del secuenciación del genoma completo tanto de muestras del ganado como de humanos. Se proyecta culminar el análisis molecular por MLST en el año 2018.

## 2. VINCULACIÓN CIENTÍFICA

### 2.1. *Describir vínculos generados desde el Programa/Proyecto con referencia a demandas del Sector Productivo.*

Se establecieron vínculos con la empresa la Craikense, Nestlé (Villa Nueva) y Estancia Yucat, quienes han prestado conformidad para prestar sus establecimientos lecheros con los fines de obtener muestras de leche y hacer ensayos en los animales.



---

## INFORME ACADÉMICO FINAL

### Proyectos de Investigación 2016-2017

Se establecieron vínculos con investigadores de otras **universidades nacionales** realizando trabajos en colaboración.

- Dr. Dario Falcone (UNRC). Se dirige en forma conjunta la tesis de doctorado de María Soledad Orellano, la cual ha dado lugar a presentaciones a congreso y publicaciones conjuntas.
- Dra. Claudia Raspanti (UNRC). Se desempeña como co-directora de la tesis de doctorado de Agustín Conesa. Se relizaron trabajos en conjunto que han dado lugar a presentaciones a congreso.
- Dra. Melina Talano (UNRC). ¿Mayor viabilidad de cepas rizosféricas cocultivadas en presencia de arsénico?. Olmos Nicotra MF, Breser L, Porporatto C, Agostini E, Talano MA. XXI Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba. 2017. La Falda, Córdoba.
- Dra Carolina Ceriani (Centro de Investigación Veterinaria de Tandil, Facultad de Cs. Veterinarias, UNCPBA) y Dra Laura Cariddi y Elina Reinoso (UNRC). Se realizaron trabajos en colaboración.

#### **2.2. Describir vínculos que respondan a demandas internas de distintas aéreas de la UNVM.**

Se establecieron vínculos con otros integrantes de la línea de investigación que se viene desarrollando en la UNVM desde el 2008, realizando los trabajos que se mencionan:

- **Dra. María Laura Breser:** es investigadora asistente de CONICET, bajo la dirección de la Dra. Porporatto. Se trabajo en un tema estrechamente relacionado al tema de investigación y continuando con estudios previos, evaluando el efecto anti-microbiano del polimero quitosano en combinación con antibióticos. Los resultados obtenidos han sido presentado a reuniones científicas: Chitosan and cloxacillin combination improve antibiotic efficacy on different lifestyle growth of bacterial isolates from chronic bovine mastitis. Breser ML; Tisera L, Felipe V; Bohl LP; Orellano S; Conesa A; Isaac P; Porporatto C. Reunión Conjunta de Sociedades Biomédicas. LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). 2017. Mar del Plata. Medicina (Buenos Aires), 2017, 77 (1): 291. ISSN 1669-9106, y publicados: Chitosan and cloxacillin combination improves antibiotic efficacy against different lifestyle growth of coagulase-negative Staphylococcus isolates from chronic bovine mastitis. Breser ML, Felipe V; Bohl LP; Orellano MS; Isaac P; Conesa A; Rivero VE; Correa SG; Bianco ID; Porporatto C. Scientific Reports. 2018, 8(1):5081. ISSN: 20452322. DOI: 10.1038/s41598-018-23521-0.

- **Dra. Paula Isaac:** durante este período la Dra. Porporatto ha dirigido su trabajo de beca posdoctoral orientado al estudio del efecto anti-biofilm de productos liberados por microorganismos que conforman la flora comensal de la glándula mamaria bovina de animales sano, una temática estrechamente relacionada al presente proyecto de investigación. Los resultados obtenidos fueron publicados: Commensal coagulase-negative Staphylococcus from the udder of healthy cows inhibits biofilm formation of mastitis-related pathogens. Isaac P, Bohl



---

## INFORME ACADÉMICO FINAL

### Proyectos de Investigación 2016-2017

LP, Breser ML, Orellano MS, Conesa A, Ferrero MA, Porporatto C. Veterinary Microbiology. 2017, 207: 259-266. ISSN: 0378-1135. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.05.025.

- **Dra. Luciana Bohl**: investigadora asistente de CONICET bajo la dirección de la Dra. Porporatto. Durante este período se evaluó la respuesta inmune desarrollada en células epiteliales mamarias bovinas frente a bacterias crecidas en estado planctónico o en biofilm.

- **Bioq Sonia Soderó**: se encuentra realizando una tesis de doctorado contando con una beca de CONICET (directora: Dra. Carina Porporatto). Se trabajó en la determinación de IgG total y específica en calostro y suero bovino.

Se establecieron vínculos con otros investigadores de la UNVM, con las **Dra. Mariana Montenegro** y **Dra. Noelia Vanden Braber**. Se trabajó en evaluación de la respuesta inmune desarrollada por un aditivo nutracéutico a base de quercetina microencapsulada en quitosano. Los resultados obtenidos dieron lugar a la publicación: Controlled release and antioxidant activity of chitosan or its glucosamine water-soluble derivative microcapsules loaded with quercetin. Vanden Braber NL, Paredes AJ, Rossi YE, Porporatto C, Allemandi DA, Borsarelli CD, Correa SG, Montenegro MA. International Journal of Biological Macromolecules. 2018, 112: 399–404. ISSN: 01418130. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.085

### 3. PUBLICACIÓN EN REPOSITORIO DIGITAL DE LA UNVM

AUTORIZO LA PUBLICACIÓN DE ESTE INFORME ACADÉMICO FINAL EN EL REPOSITORIO DIGITAL DE LA UNVM: SI