

Avaliação da presença dos genes *lukS-PV* e *lukF-PV* em cepas pediátricas de *Staphylococcus aureus*

Detection of *lukS-PV* and *lukF-PV* in *Staphylococcus aureus* pediatric isolates

Rozane de Lima Bigelli Carvalho¹, Eitan Naaman Berezin², Marcelo Jenne Mimica³

Resumo

Introdução: A leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) é uma toxina associada a novos clones de *Staphylococcus aureus*. Apesar da discussão quanto ao seu poder de virulência, ela representa no mínimo um marcador da presença de outros fatores, sendo importante conhecer sua presença no nosso meio. **Objetivo:** Detectar os genes codificadores da PVL em cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis (MSSA) e resistentes (MRSA) à oxacilina, invasivas e não-invasivas, isoladas de pacientes pediátricos. **Materiais e Métodos:** Foram incluídas cepas de *S. aureus*, isoladas de diversos sítios, de diferentes pacientes, e identificadas por testes bioquímicos tradicionais. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada de acordo com os critérios do Clinical and Laboratory Standards Institute. Os genes codificadores da PVL, *lukF-PV* e *lukS-PV* foram detectados por meio de PCR e, nas cepas resistentes à oxacilina, foi realizada a tipagem do SCCmec através de PCR multiplex. **Resultados:** Dos 24 MSSA e 37 MRSA, houve apenas uma cepa, que foi resistente à oxacilina, positiva para PVL. Dos MRSA, um carregava SCCmec do tipo I, três do tipo II, 17 do tipo III, 15 do tipo IV e um foi não tipável. As cepas dos tipos I, II e III foram todas multirresistentes, enquanto as do tipo IV foram resistentes apenas à penicilina, oxacilina e eritromicina. **Conclusão:** A prevalência de cepas produtoras de PVL em nosso estudo, diferente do que é relatado em alguns outros

países, foi baixa, mesmo em *S. aureus* com SCCmec do tipo IV. Ainda não é possível avaliar qual o verdadeiro impacto clínico-epidemiológico destas diferenças.

Descritores: *Staphylococcus aureus*; Leucocidinas/genética, Leucocidinas/toxicidade

Abstract

Introduction: Pantón-Valentine Leukocidin (PVL) has been associated with novel *Staphylococcus aureus* clones. Although there is controversy regarding its virulence potential, at least it represents a surrogate marker for other important virulence factors. Thereby, it is important to determine its prevalence in our setting. **Objective:** To detect the PVL codifying genes in methicillin-susceptible (MSSA) and methicillin-resistant (MRSA) *Staphylococcus aureus*, including both invasive and non-invasive pediatric isolates. **Materials and Methods:** We included *S. aureus* isolates from various anatomical sites and different patients, identified by standard biochemical tests. Antimicrobial susceptibility was determined according to Clinical and Laboratory Standards Institute criteria. The PVL codifying genes, *lukF-PV* e *lukS-PV* were detected using PCR and, in MRSA isolates, SCCmec was typed by multiplex PCR. **RESULTS:** From 24 MSSA e 37 MRSA, only one methicillin-resistant isolate was positive for PVL. Of the MRSA, one had SCCmec type I, three type II, 17 type III, 15 type IV and one was non typeable. Isolates with types I, II and III were all multiresistant, whereas type IV isolates were resistant only to penicillin, oxacillin and erythromycin. **Conclusion:** Different from what is reported in other countries, PVL-producing isolates were rare in our study, even in isolates carrying SCCmec type IV. It is not possible yet to estimate the exact clinical and epidemiological impact of these differences.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Leukocidin/genetics, Leukocidins/toxicity

Introdução

A partir dos anos 90 começaram os relatos de infecções por MRSA associado à comunidade (CA-MRSA: community-associated methicillin-resistant

1. Professora Assistente da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Departamento de Ciências Patológicas

2. Professor Adjunto da Faculdade Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Departamento de Pediatria e Puericultura

3. Professor Assistente da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Departamento de Pediatria e Puericultura. Departamento de Ciências Patológicas

Trabalho realizado: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Departamentos de Ciências Patológicas e de Pediatria e Puericultura

Fonte de auxílio: MJM recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Endereço para correspondência: Marcelo Jenne Mimica. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Departamento de Pediatria e Puericultura. Rua Dr. Cesário Motta Jr, 112 – Vila Buarque – 01221-020 – São Paulo – SP – Brasil. E-mail: mjmmimica@hotmail.com.

Staphylococcus aureus) em pacientes sem fatores de risco identificáveis para aquisição de MRSA, ou seja, não tinham contato frequente, direto ou indireto com serviço de saúde que pudesse explicar a infecção por MRSA associado aos cuidados em saúde (HCA-MRSA: health-care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)⁽¹⁻⁶⁾.

Existem diferenças genéticas, clínicas e epidemiológicas entre os CA-MRSA e os *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina associados aos cuidados em saúde (HCA-MRSA). Uma diferença importante diz respeito aos tipos de SCCmec (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*). Já foram descritos oito tipos de SCCmec, mas os mais comuns são os de I a IV⁽⁷⁻⁹⁾. A classificação nos diferentes tipos se faz a partir das sequências de regiões internas do *cassette*, sendo assim uma classificação molecular, e não clínico-epidemiológica. No entanto, enquanto os HCA-MRSA carregam SCCmec dos tipos I a III, os CA-MRSA estão mais associados principalmente ao tipo IV^(9,10). O tipo IV é um elemento genético menor e mais móvel que os outros, o que pode facilitar sua disseminação. Esse tipo, por outro lado, carrega um número mais limitado de genes determinantes de resistência que os dos tipos I, II e III. Assim os CA-MRSA caracteristicamente mostram resistência apenas aos beta-lactâmicos, enquanto os HCA-MRSA tendem a ser multirresistentes^(11,12). É importante lembrar que recentemente tem se relatado os típicos clones associados à comunidade (principalmente SCCmec tipo IV) como causa de infecções associadas aos cuidados em saúde^(13,14). Além disso, existe um fator de virulência que tem sido identificado em grande parte dos CA-MRSA, que é a leucocidina de Pantón-Valentine (PVL). Existe discussão na literatura sobre se a PVL é realmente um fator de virulência importante nas infecções estafilocócicas ou apenas um marcador da presença de outros fatores de virulência⁽¹⁵⁻¹⁷⁾, mas sua importância epidemiológica na era dos novos clones comunitários de *S. aureus* é inegável.

O objetivo deste estudo foi detectar os genes codificadores da PVL em cepas de MSSA e MRSA, invasivas e não-invasivas, isoladas de pacientes pediátricos, visando contribuir para o conhecimento de sua frequência em nosso meio.

Materiais e Métodos

Foram incluídas cepas de *S. aureus* isoladas, não consecutivamente na rotina clínica entre janeiro de 2004 e dezembro de 2007, de crianças (hospitalizados ou não) de até 14 anos. Apenas uma cepa por paciente foi incluída. As cepas foram classificadas como provenientes de sítio estéril (incluindo sangue, cateter venoso ou de sistema nervoso central, líquido articular, líquido pleural, líquido peritoneal, além de amostras

colhidas cirurgicamente de coleções/abscessos) ou não estéril (trato respiratório alto, "swabs" de vigilância). A identificação de gênero e espécie foi feita por meio de testes bioquímicos tradicionais, incluindo catalase, coagulase e DNase. A susceptibilidade a antimicrobianos foi determinada por disco-difusão, de acordo com os critérios do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) vigentes na ocasião⁽¹⁸⁾. A resistência à oxacilina foi confirmada pela semeadura em placa de Ágar Mueller-Hinton com 6 µg/mL de oxacilina e 4% de NaCl.

As cepas foram testadas para a presença dos genes codificadores da leucocidina de Pantón-Valentine, *lukF-PV* e *lukS-PV*, utilizando-se os primers *luk-PV-1*, 5'-ATCATTAGGTAATAATGTCTGGACATGATCA-3'; *luk-PV-2*, 5'-GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAGC-3', conforme protocolo previamente descrito por Lina et al em 1999⁽¹⁹⁾. As cepas resistentes à oxacilina foram submetidas a PCR multiplex para tipagem do SCCmec, anteriormente descrito por Oliveira et al⁽²⁰⁾.

Os prontuários médicos foram revisados para possibilitar a classificação provável dos isolados em associados aos cuidados de saúde ou à comunidade, baseado em internação no último ano e/ou contato frequente, mesmo que ambulatorial, com serviço de saúde. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da instituição.

Resultados

Durante o período do estudo, 61 pacientes com *S. aureus* isolado foram identificados no laboratório, incluindo 26 com cepas isoladas de sítio estéril e 35 de sítio não-estéril. Quanto à susceptibilidade à oxacilina, 24 foram MSSA e 37 MRSA. Houve apenas uma cepa positiva para PVL, resistente à oxacilina, isolada do sangue de uma criança previamente hígida com quadro de osteomielite multifocal. Todos os pacientes, com exceção desta última, apresentaram fatores de risco para aquisição de *Staphylococcus aureus* de ambiente hospitalar, sendo os isolados classificados como associados aos cuidados de saúde.

Entre os MRSA, um carregava SCCmec do tipo I, três do tipo II, 17 do tipo III e 15 do tipo IV. As cepas pertencentes aos tipos I, II e III foram todas multirresistentes, enquanto as do tipo IV foram resistentes à penicilina, oxacilina e eritromicina. Uma cepa, justamente a que foi PVL-positiva, foi não tipável pelo PCR multiplex, mas fenotipicamente apresentou características do tipo IV, já que foi resistente a penicilina, oxacilina e eritromicina.

Discussão e conclusão

A produção de PVL em *Staphylococcus aureus* já foi

Tabela 1

Número de isolados de *Staphylococcus aureus* sensíveis à oxacilina e resistentes à oxacilina, com diferentes tipos de SCCmec.

	Número de isolados
MSSA	24
MRSA	37
SCCmec tipo I	1
SCCmec tipo II	3
SCCmec tipo III	17
SCCmec tipo IV	15
Não-tipável	1
Total	61

relacionada a infecções muito graves e com alta letalidade, incluindo pneumonia necrotizante e infecções de pele e partes moles^(19,21-23). A despeito de não haver consenso sobre seu exato papel nas diferentes infecções estafilocócicas, os genes *lukF-PV* e *lukS-PV* são frequentemente encontrados em clones de CA-MRSA, seja colonizando ou infectando indivíduos^(11,12). Em nosso estudo, o único paciente que foi classificado como tendo infecção por CA-MRSA teve isolada uma cepa PVL-positiva, a única na casuística. Infelizmente o protocolo de tipagem utilizado não nos permitiu classificar esse SCCmec.

Estudos multicêntricos, tanto experimentais como clínico-epidemiológicos, têm tentado estabelecer a importância da PVL em infecções estafilocócicas envolvendo diferentes topografias^(24,25). Bae et al⁽²⁴⁾, em estudo publicado em 2009, incluíram 522 pacientes com infecções de pele/partes moles por MRSA, oriundos de um total de 92 centros em 15 países. Nesse estudo, a presença dos genes *lukF-PV* e *lukS-PV* não foi associada a pior evolução clínica. Outro estudo multicêntrico, divulgado em 2007, também falhou em mostrar pior prognóstico em casos de infecção de pele/partes moles por MRSA PVL-positivo⁽²⁵⁾. A maioria dos outros estudos epidemiológicos prévios sobre a PVL incluiu cepas de um só local, limitando a validade das conclusões devido à clonalidade. Outras evidências indiretas também apontam preliminarmente para essas conclusões. Anticorpos contra PVL não parecem ser protetores contra infecções por MRSA PVL-positivo⁽²⁶⁾. A ocorrência dos genes codificadores da PVL também não se relacionou com gravidade da doença em um modelo animal (coelho) de infecção de pele⁽²⁷⁾. Nós não tivemos cepas PVL-positivas em pacientes com infecções de pele e partes moles, impossibilitando qualquer conclusão nesse sentido.

Os estudos em coelho são hoje considerados fundamentais para os estudos experimentais sobre o papel patogênico da PVL, já que recentemente se esclareceu que os neutrófilos do coelho e os neutrófilos humanos

têm maior sensibilidade à atividade citolítica da toxina do que os neutrófilos dos camundongos e outras espécies de animais de laboratório⁽²⁸⁾. Em outras infecções que não pele/partes moles, incluindo bacteriemia, pneumonia e osteomielite, é possível que a PVL tenha um papel de maior destaque. Modelos dessas infecções em coelho mostraram essa potencial importância⁽²⁹⁻³¹⁾. No presente estudo, o único paciente em que houve isolamento de cepa PVL-positiva teve uma osteomielite de grave evolução. Mesmo assim, obviamente não é possível imputar a PVL como principal ou única responsável por essa evolução.

Apesar do pequeno número de cepas e da heterogeneidade de amostras clínicas, incluindo muitas amostras clínicas de sítios não-estéreis, nosso estudo indica que a prevalência de cepas produtoras de PVL em nosso meio, diferente do que ocorre em alguns países, parece ser baixa, mesmo em *S. aureus* com SCCmec do tipo IV. Ainda não é possível concluir de forma definitiva se essa menor prevalência está ou não relacionada à circulação de cepas com menor virulência, tampouco qual o verdadeiro impacto clínico-epidemiológico destas diferenças.

Referências Bibliográficas

1. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis. 2001; 7:178-82.
2. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gasikin RE, Boyle-Vavra S, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. JAMA. 1998; 279:593-8.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*- Minnesota and North Dakota, 1997-1999. Morb Mortal Wkly Rep. 1999; 48:707-10.
4. Gorak EJ, Yamada SM, Brown JD. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized adults and children without known risk factors. Clin Infect Dis 1999; 29:797-800.
5. Mimica MJ, Mendes CMF. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. J Bras Patol Med Lab. 2007; 43:399-406.
6. Mimica MJ, Berezin EN, Carvalho RLB, Mimica IM, Mimica LMJ, Sáfadi MAP, et al. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from pediatric patients: is the cefoxitin disk diffusion test accurate enough? Braz J Infect Dis. 2007;11:415-7.
7. Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RNS, et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. J Clin Microbiol. 2005; 43:1985-8.
8. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Conly JM. Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53:531-40.
9. Ito T, Hiramatsu K, Oliveira DC, de Lencastre H, Zhang K, Westh H, et al. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 4961-7.

10. Coombs GW, Pearson JC, O'Brien FG, Murray RJ, Grubb WB, Christiansen KJ. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones, Western Australia. Emerg Infect Dis. 2006; 12:241-7.
11. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. Comparison of community and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. JAMA. 2003; 290:2976-84.
12. Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in three communities. N Engl J Med. 2005; 352:1436-44.
13. Trindade PA, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Barone AA, Mami-zuka EM, et al. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2005; 43:3435-7.
14. Gonzalez BE, Rueda AM, Shelburne SA 3rd, Musher DM, Hamill RJ, Hulten KG. Community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as the cause of healthcare-associated infection. Infect Control Hosp Epidemiol. 2006; 27:1051-6.
15. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. Science. 2007; 315:1130-3.
16. Bubeck-Wardenburg J, Palazzolo-Ballance AM, Otto M, Schneewind O, DeLeo FR. Panton-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. J Infect Dis. 2008; 198:1166-70.
17. Otto M. A MRSA-terious enemy among us: end of the PVL controversy? Nat Med. 2011; 17:169-70.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. In: 18th Informational Supplement. Wayne, PA; CLSI; 2008.
19. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis. 1999; 29:1128-32.
20. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:2155-61.
21. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet. 2002; 359:753-9.
22. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis. 2003; 9:978-84.
23. Chambers HF. Community-associated MRSA-resistance and virulence converge. N Engl J Med. 2005; 352:1485-7.
24. Bae IG, Tonthat GT, Stryjewski ME, Rude TH, Reilly LF, Barriere SL, et al. Presence of genes encoding the panton-valentine leukocidin exotoxin is not the primary determinant of outcome in patients with complicated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a multinational trial. J Clin Microbiol. 2009; 47:3952-7.
25. Jones RN, Nilius AM, Akinlade BK, Deshpande LM, Notario GF. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from a 2005 clinical trial of uncomplicated skin and skin structure infections. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51:3381-4.
26. Hermos CR, Yoong P, Pier GB. High levels of antibody to panton-valentine leukocidin are not associated with resistance to *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft-tissue infection. Clin Infect Dis. 2010; 51:1138-46.
27. Li M, Cheung GY, Hu J, Wang D, Joo HS, Deleo FR, et al. Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J Infect Dis. 2010;202:1866-76.
28. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Bruck M, Holzinger D, Varga G, et al. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. PLoS Pathog. 2010; 6:e1000715.
29. Diep BA, Palazzolo-Ballance AM, Tattevin P, Basuino L, Braughton KR, Whitney AR, et al. Contribution of Panton-Valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. PLoS One. 2008; 3:e3198.
30. Crémieux AC, Dumitrescu O, Lina G, Vallee C, Côté JF, Muffat-Joly M, et al. Panton-valentine leukocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit osteomyelitis. PLoS One. 2009; 4:e7204.
31. Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. Proc Natl Acad Sci USA. 2010; 107:5587-92.

Trabalho recebido: 26/04/2012

Trabalho aprovado: 16/08/2012