



Persistencia intracelular de *Staphylococcus aureus* en un modelo celular con macrófagos alveolares

A.Lacoma 1,3, R. Villar-Hernández 1,3, N. Pagán 1, M. Calvet 4, T. Ivanytsia 5, K. Krylova 5, F. Arméstar 2, C.Prat 1,3

1. Servei de Microbiologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Universitat Autònoma de Barcelona. 2. Servicio de Medicina Intensiva. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Universitat Autònoma de Barcelona. 3. CIBER Enfermedades Respiratorias. 4. Institut de Biotecnologia i de Biomedicina. Universitat Autònoma de Barcelona. 5. Microbiology, virology and biotechnology department. Odesa National Mechnikov University, Odessa, Ukraine.

Introducción y Objetivo. Existe evidencia que *Staphylococcus aureus* es capaz de infectar y sobrevivir en el interior de distintos tipos celulares. En nuestra experiencia previa, observamos que el aislamiento repetido de *S.aureus* en muestra respiratoria de pacientes sometidos a ventilación mecánica (VM) era frecuente sin correlacionar con el pronóstico. El objetivo de este estudio es testar cepas clínicas en un modelo celular con macrófagos alveolares murinos, para establecer si el microorganismo es capaz de persistir intracelularmente.

Material y Métodos. Se seleccionaron 4 cepas clínicas de *S.aureus* aisladas de muestra de aspirado traqueal de pacientes sometidos a VM. Los pacientes fueron clasificados según criterios clínicos, radiológicos y microbiológicos como traqueobronquitis (n=2) y neumonía (n=2). Se definió como caso persistente, cuando pese a recibir tratamiento ajustado a antibiograma, se aislaba el microorganismo en muestra respiratoria después de más de 72h. Las cepas se caracterizaron mediante métodos fenotípicos (antibiograma y funcionalidad del operón *agr*) y genotípicos (*S.aureus* genotyping, Alere Technologies, Alemania) (Tabla 1).

La línea celular que se empleó es MH-S (ATCC- CRL2019), que se mantiene en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal, hepes y una mezcla de antibióticos y antimicóticos. En la Figura 1 se muestra el protocolo para la preparación de la suspensión bacteriana y en la Figura 2 el protocolo para el ensayo de adhesión e invasión.

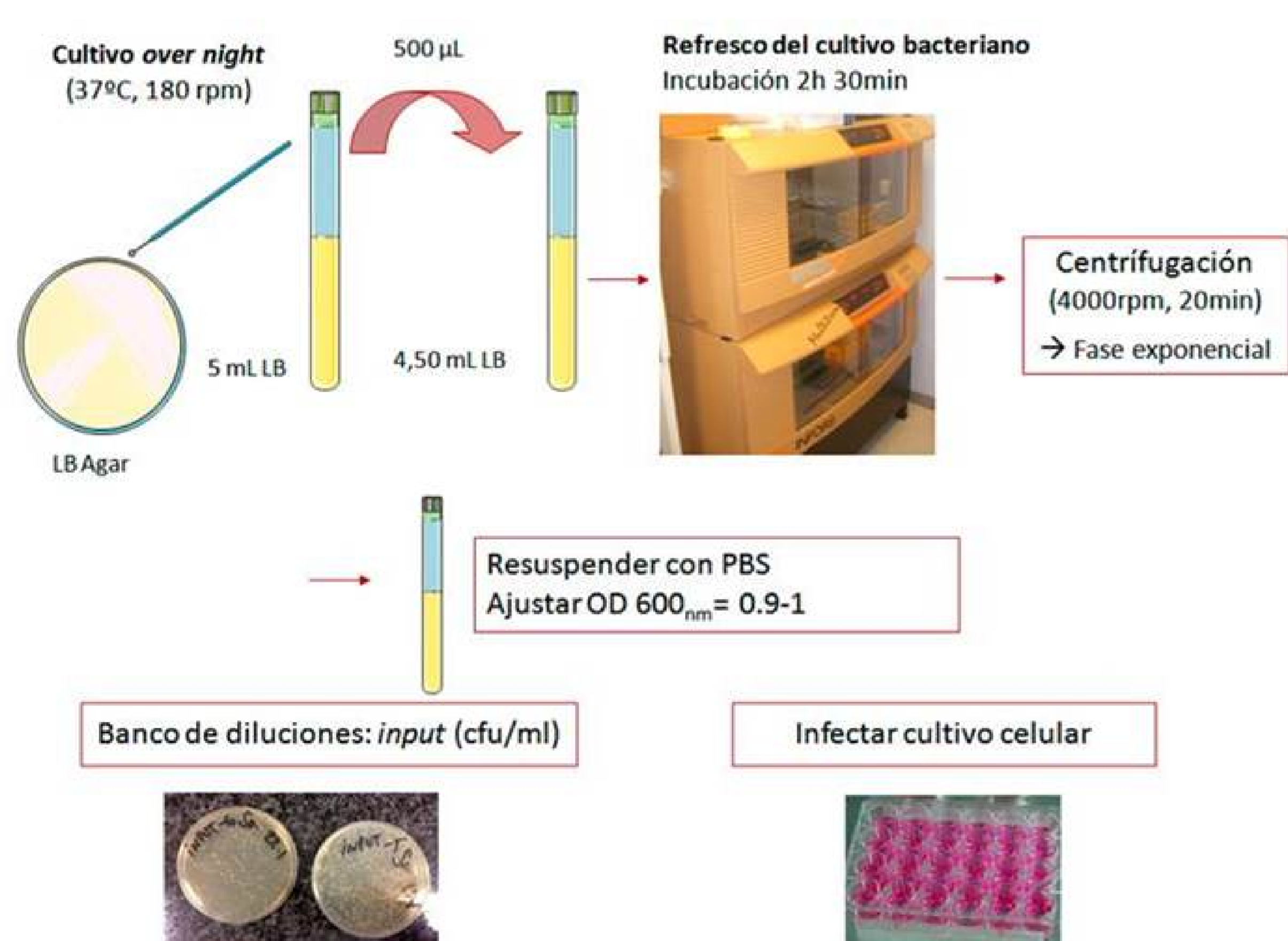


Figura 1. Protocolo para la preparación de la suspensión bacteriana

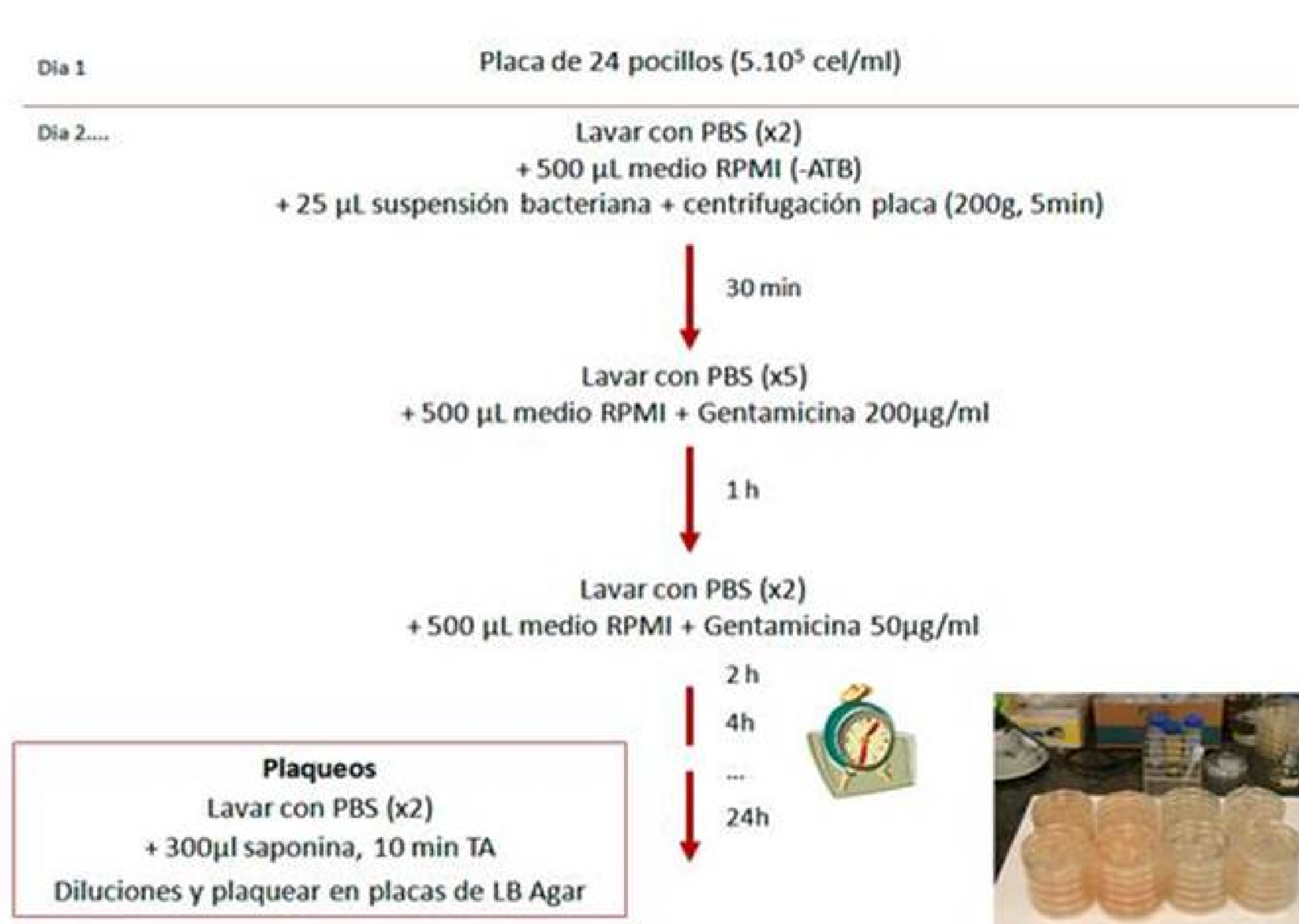


Figura 2. Protocolo para el experimento de adhesión e invasión.

Resultados.

Tabla 1. Características fenotípicas y genotípicas de las cepas seleccionadas a testar en el modelo celular.

| Cepa | Grupo de estudio | Persistencia (días) | Complejo clonal | Operón <i>agr</i> y alelo | Presencia de genes seleccionados |
|------|-------------------|---------------------|-----------------|---------------------------------|--|
| P137 | Traqueobronquitis | - | CC30 ST34-MSSA | funcional, alelo <i>agr</i> III | <i>hla, hld, sarA, saeS, sak, scn, tst-1</i> y <i>fnbA</i> |
| P36 | Neumonía | - | CC5-MSSA | funcional, alelo <i>agr</i> II | <i>hla, hld, sarA, saeS, sak, chp, scn, fnbA</i> y <i>fnbB</i> . |
| P181 | Traqueobronquitis | 92 | CC30- MSSA | funcional, alelo <i>agr</i> III | <i>hla, hld, sarA, saeS, sak, chp, scn, tst-1, fnbA</i> y <i>cna</i> |
| P59 | Neumonía | 62 | CC8-MSSA | funcional, alelo <i>agr</i> I | <i>hla, hld, sarA, saeS, scn, fnbA</i> y <i>fnbB</i> |

- Los valores de multiplicidad de infección [unidades formadoras de colonias (ufc)]/ concentración celular) fueron: 24 para la cepa P137, 27.5 para la cepa P181, 17 para la P59 y 15 para la cepa P36. Todas las cepas se adhirieron a la línea celular y fueron eficazmente fagocitadas por los macrófagos.
- En todos los casos, los recuentos de ucf/pocillo para los distintos tiempos post-infección muestran que las cepas son capaces de persistir en el interior de la célula eucariota (Figura 3).
- Sin embargo existen distintas dinámicas en función de la cepa considerada: para la cepa P36 se observa un aumento en el número de ufc/pocillo en el tiempo, sugiriendo replicación intracelular, mientras que para la cepa P137, se observa una disminución de ufc, hecho que indicaría que el macrófago es capaz de controlar la infección. Sin embargo, la carga bacteriana no se elimina completamente. Para las dos cepas restantes, los recuentos son bastante similares en el tiempo.
- Con los resultados obtenidos hasta el momento, no parece que el hecho de que los casos se clasificaran como “no persistentes”, se correspondan con un comportamiento “no persistente” en el modelo celular con macrófagos alveolares.

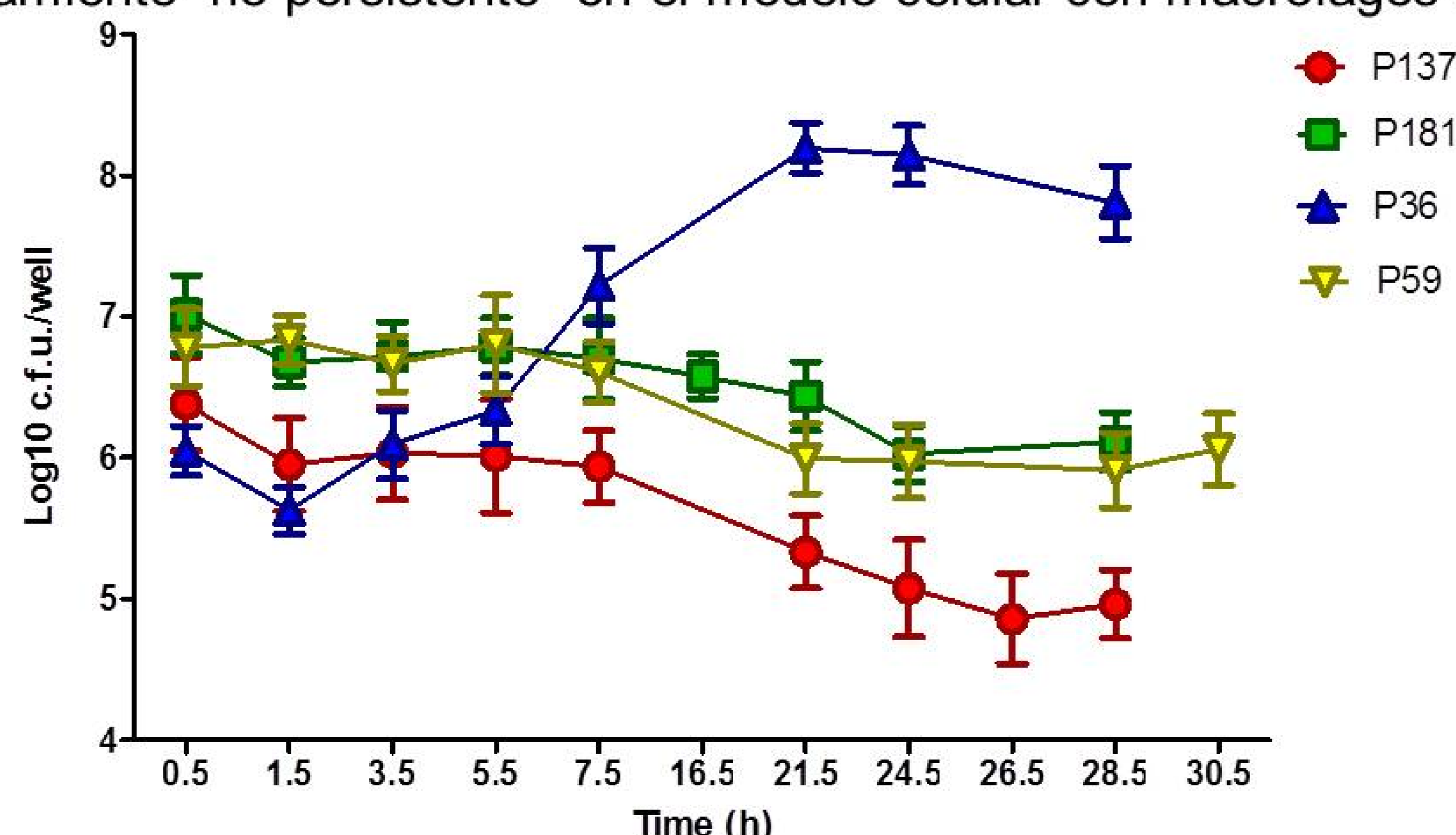


Figura 3. Recuento de ufc intracelulares para las distintas cepas en función del tiempo post- infección considerado.

Conclusiones: Las cepas de *S.aureus* testadas en el modelo celular muestran dinámicas diferentes en el tiempo, aunque de forma general en todos los casos se observa un cierto grado de persistencia intracelular. Los datos sugieren una posible adaptación del microorganismo que permitiría su supervivencia intracelular.

Financiación: SEPAR 054/2011, FIS P113/0148. IP:C.Prat