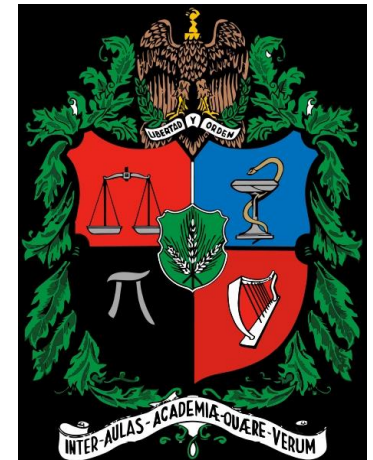


Efecto de los péptidos LL-37 sobre la expresión de proteínas del Quorum sensing en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*



Sergio Alejandro Gutierrez Riveros
Asesora: Liliana Muñoz Molina
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Bacteriología y Laboratorio Clínico
Grupo de investigación REMA



S. aureus y *S. epidermidis*

S. aureus

- Formación de biopelícula
- Resistencia a antimicrobianos
- Producción de diferentes toxinas

S. epidermidis

- Formación de biopelícula
- Toxinas peptídicas PSM
 - Exoenzimas

Colonización de los *Staphylococcus*

Secretaria de Salud Distrital 2017

S. aureus

Tercer microorganismo mas comúnmente aislado en UCI (9%) y no UCI (10%)

Resistencia a oxacilina UCI (24.4%) y no UCI (33,7%)

CDC 2014

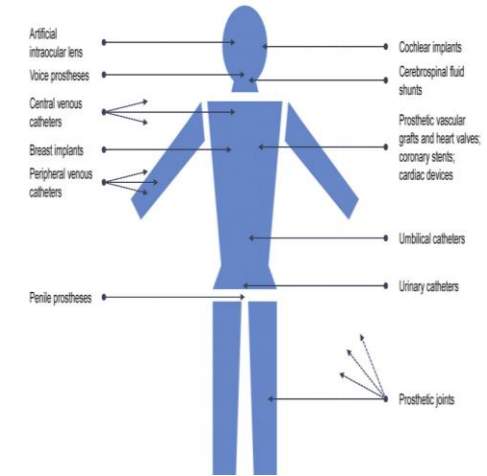
Microorganismos aislados relacionados con los servicios de salud

S. aureus 11.8%

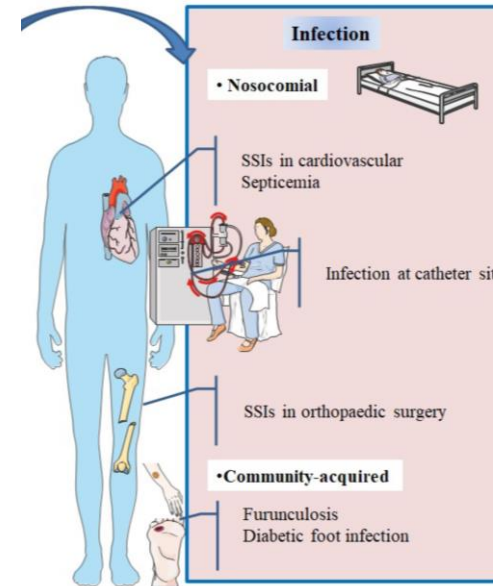
SCN 7.7%

GREBO 2016

Para la UCI neonatal, *S. epidermidis* es el patógeno más frecuentemente aislado (20- 25%)

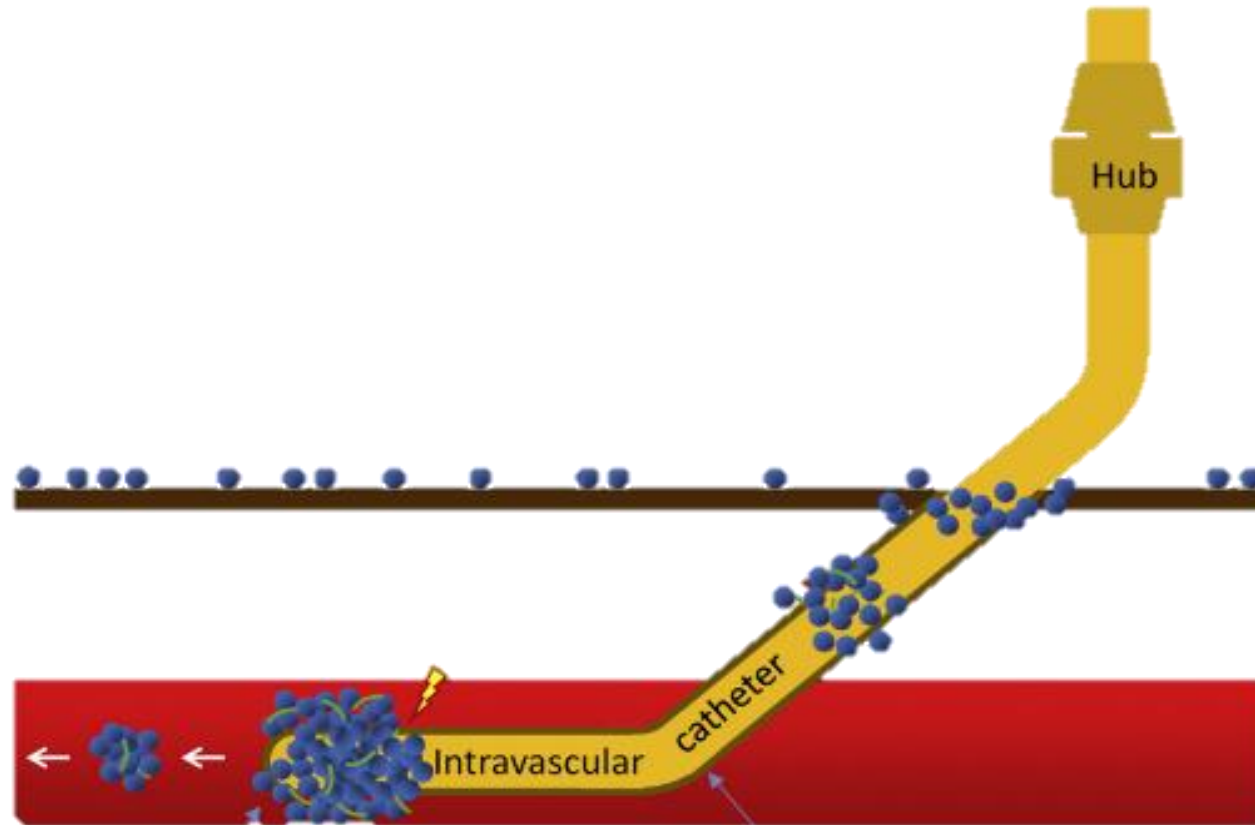


Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K. Are coagulase-negative staphylococci virulent?. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2018



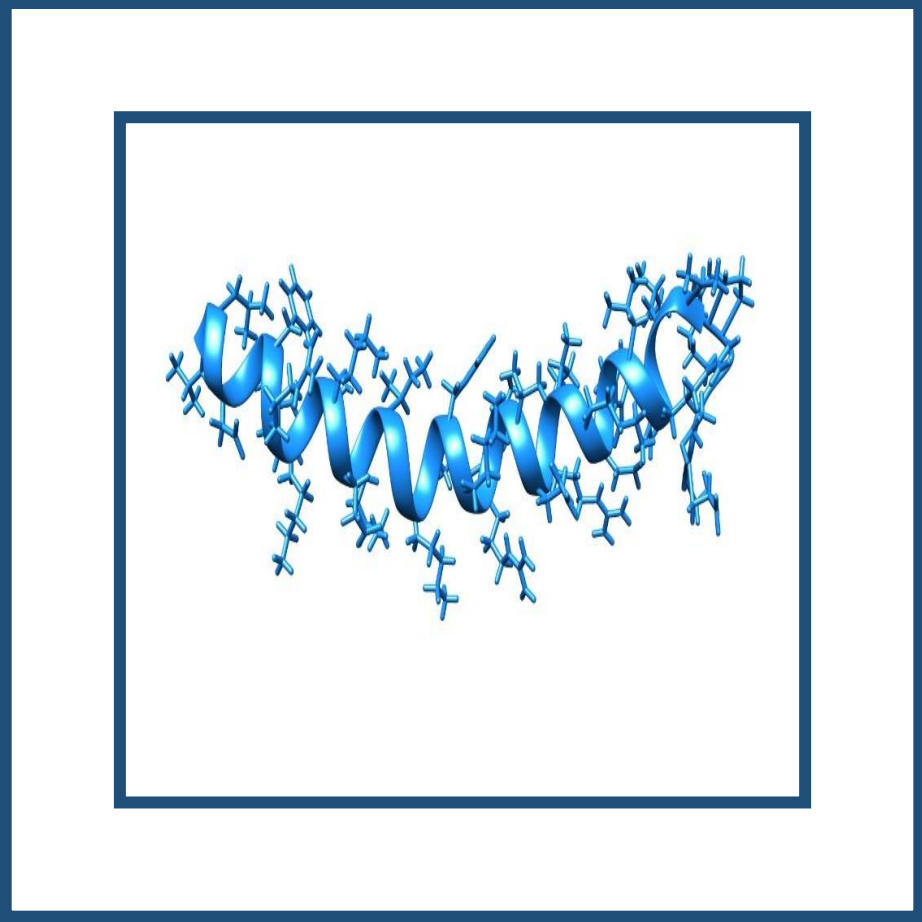
Sakr A, Brégeon F, Mège J, Rolain J, Blin O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9.

Formación de biopelícula



Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K. Are coagulase-negative staphylococci virulent?. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2018

Peptidos LL-37



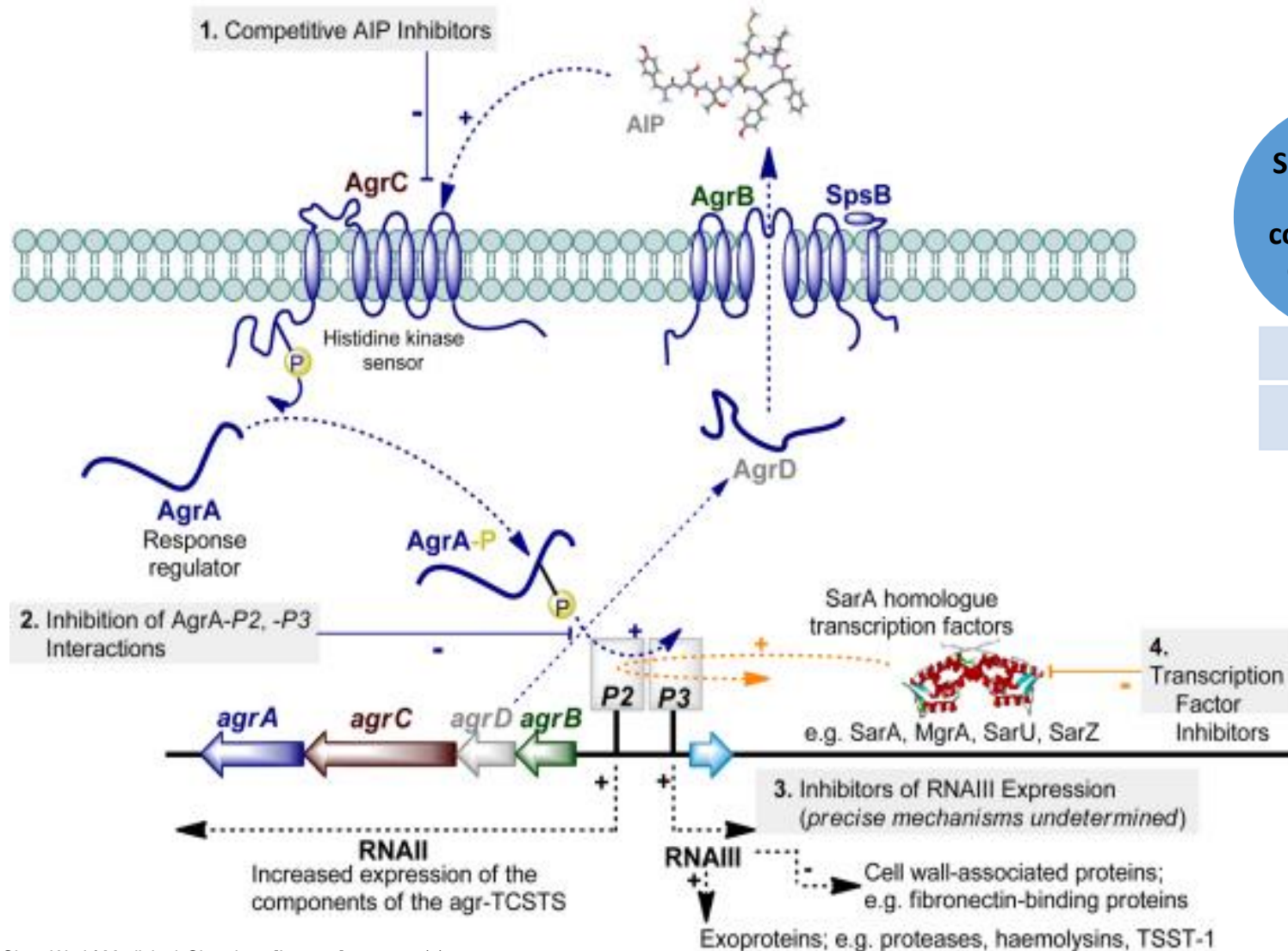
Antimicrobiano

Antibiopelícula

LL37-1

DLL-37

Quorum sensing



Sistema de dos componentes es *agrAC*

- agrA*
- agrC*

Cassete de QS *agrBD*

- agrB*
- agrD*

Objetivos

- **General**

Determinar el efecto de los péptidos LL-37 sobre la expresión del Quorum sensing en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

- **Específicos**

1. Identificar los genes *agr* que intervienen en el proceso de comunicación bacteriana y sus autoinductores del Quorum sensing en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

2. Medir el nivel de expresión de los genes *agr* involucradas en el proceso de comunicación bacteriana Quorum sensing en diferentes cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* en ausencia y presencia de los péptidos LL-37.

Caracterización de las cepas en estudio

19 aislamientos
clínicos de *S.*
aureus
17 aislamientos
de *S. epidermidis*

ATCC *S. aureus*
USA300
ATCC *S. epidermidis*
12228
ATCC *S. epidermidis*
35984

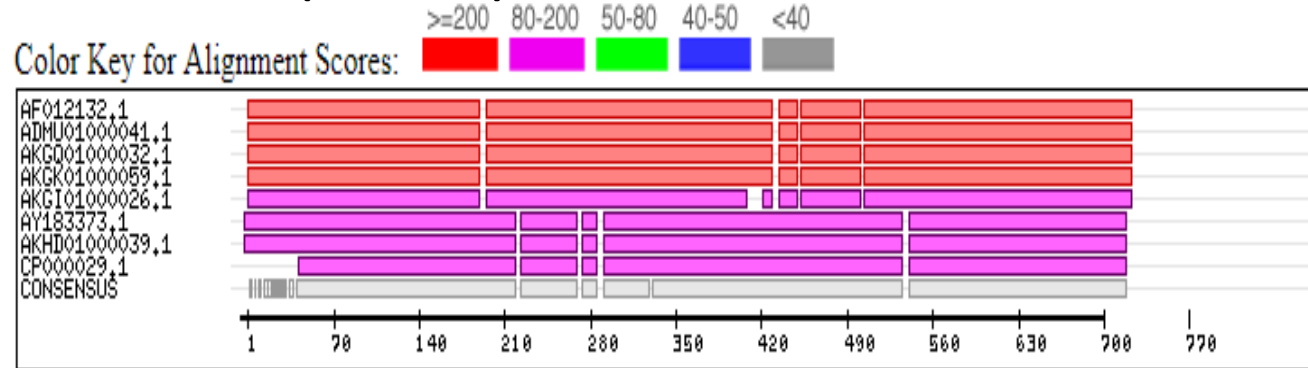
ESTUDIOS PREVIOS

- Evaluación genotípica y fenotípica de producción de biopelícula
- Análisis de susceptibilidad a antimicrobianos
 - Curvas de crecimiento
- Identificación por medio de biología molecular

1. Identificar los genes *agr* y los autoinductores del sistema QS en *S. aureus* y *S. epidermidis*

1.1 Diseño de primers

a. Alineamiento (Multalin)



b. Creación de primers (Primer3Plus)

Pair 2:

Left Primer 2:

Sequence:

Start: 324 Length: 22 bp Tm: 58.9 °C GC: 45.5 % ANY: 3.0 SELF: 0.0

Right Primer 2:

Sequence:

Start: 504 Length: 23 bp Tm: 61.2 °C GC: 39.1 % ANY: 5.0 SELF: 2.0

Product Size: 181 bp Pair Any: 5.0 Pair End: 3.0

c. Evaluación de las secuencias (Blast)

Sequences producing significant alignments:

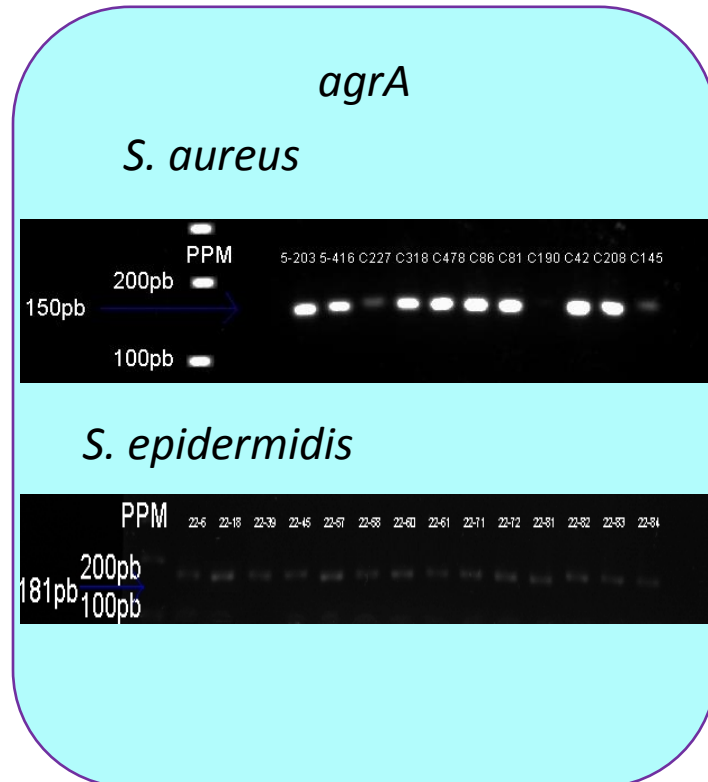
Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

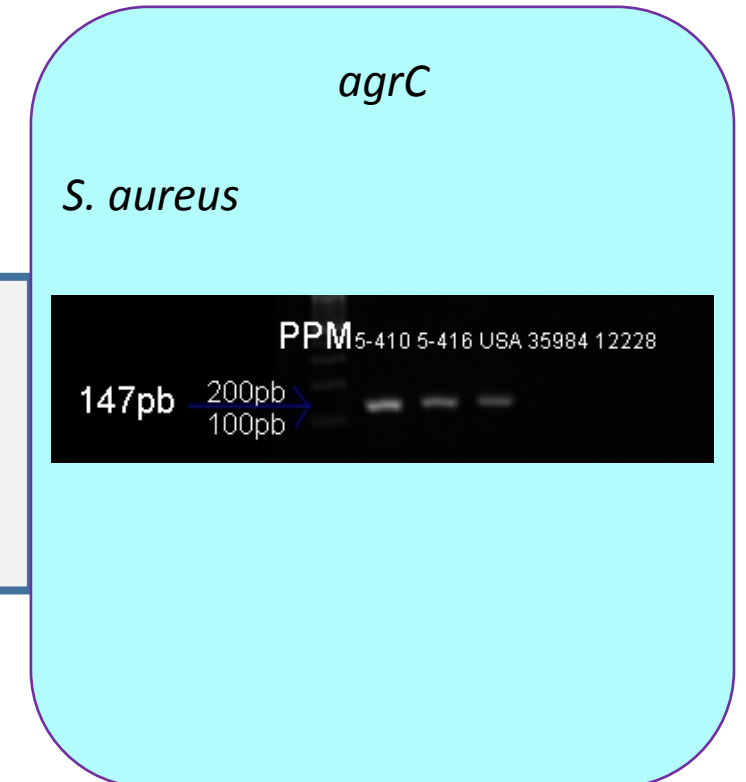
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain CSF41498 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP030246.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain GTH12 chromosome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP028282.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain FDAARGOS_161 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP014132.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain FDAARGOS_153 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP014119.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain DAR1907 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP013943.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus epidermidis strain SE95 chromosome	40.1	40.1	100%	0.32	100%	CP024437.1

d. Consulta de primers

1.2 Determinación los genes *agr* del sistema QS en *S. aureus* y *S. epidermidis*

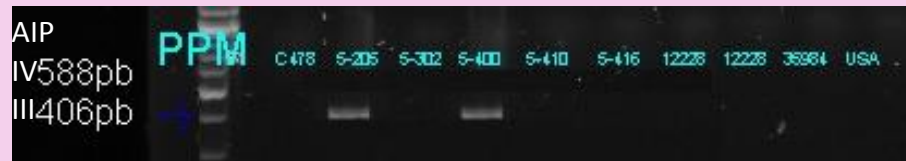
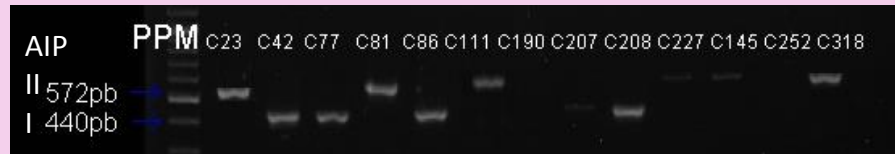


Cepa \ Gen	<i>agrA</i>	<i>agrC</i>
<i>S. aureus</i>	100% (19)	100% (19)
<i>S. epidermidis</i>	100% (17)	-

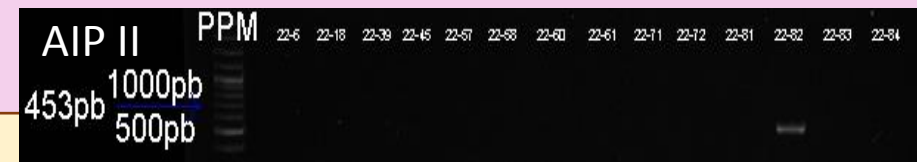
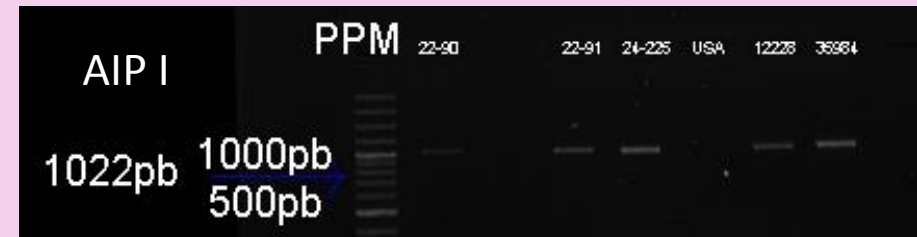
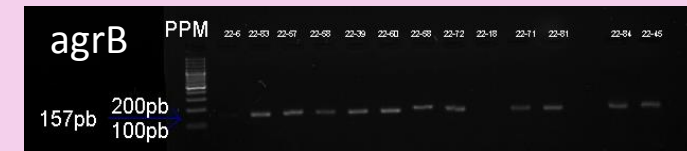


1.2 Determinación de los autoinductores en *S. aureus* y *S. epidermidis*

S. aureus



S. epidermidis



Especia bacteriana	<i>agrB</i>	AIP I	AIP II	AIP III	AIP IV	SA*
<i>S. aureus</i>	57.9% (12)	42.1% (8)	31.5% (7)	10.5% (2)	0%	10.5% (2)
<i>S. epidermidis</i>	76.4% (13)	94.10% (16)	5.80% (1)	0%	SA*	0%

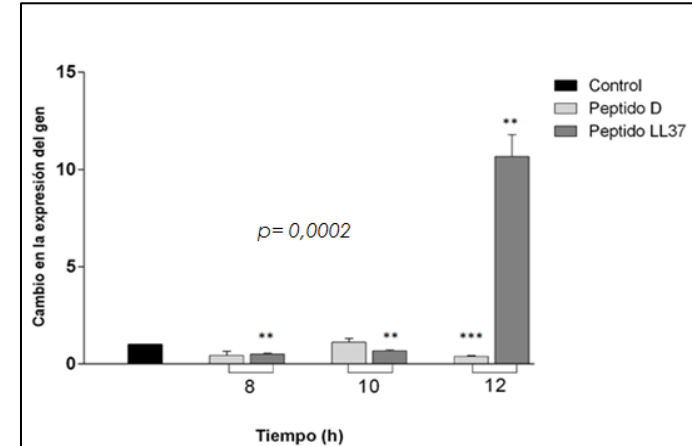
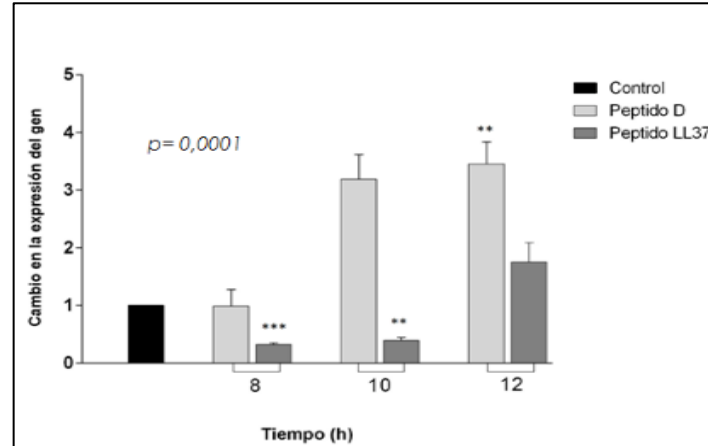
• Sin amplificación
NA No aplica

2.1 Análisis de expresión de los genes *agrA* y *agrB* de *S. aureus*

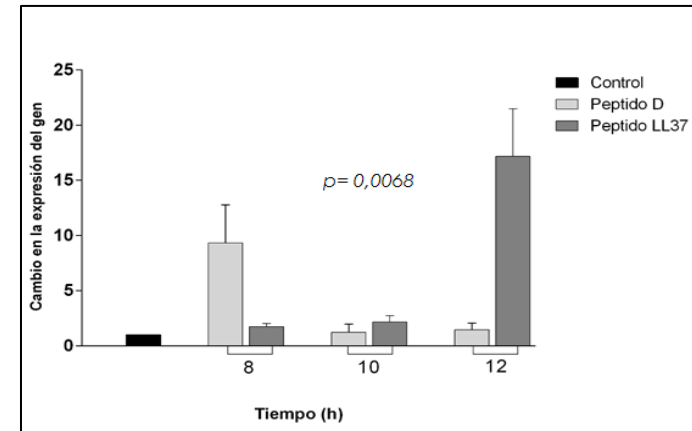
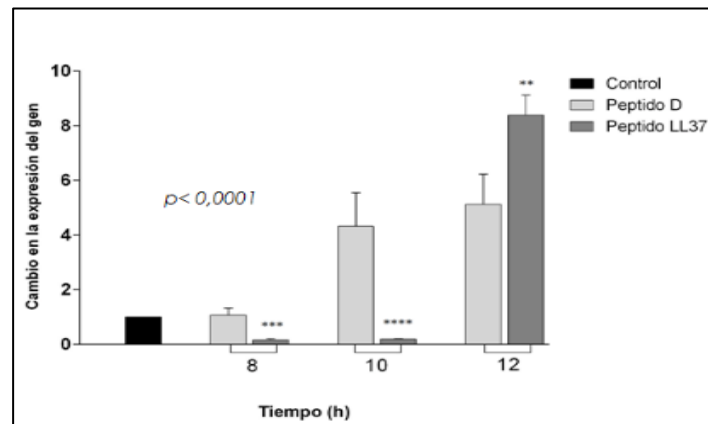
ATCC USA 300

Col81

agrA



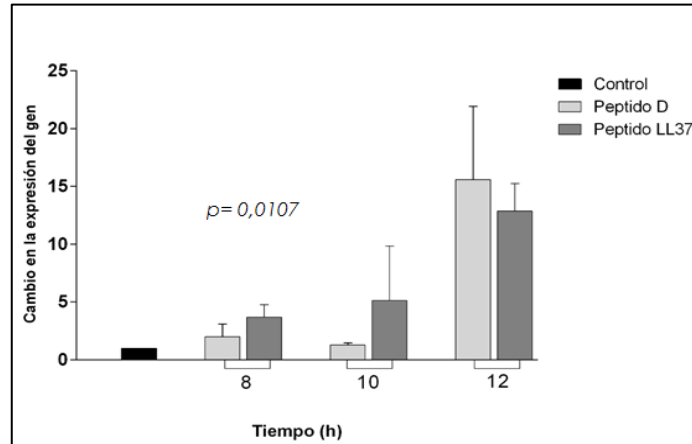
agrB



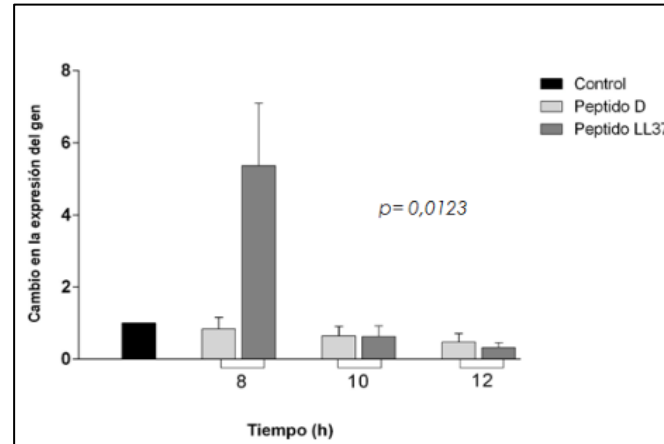
2.2 Análisis de expresión de los genes *agrA* y *agrB* de *S. epidermidis*

agrA

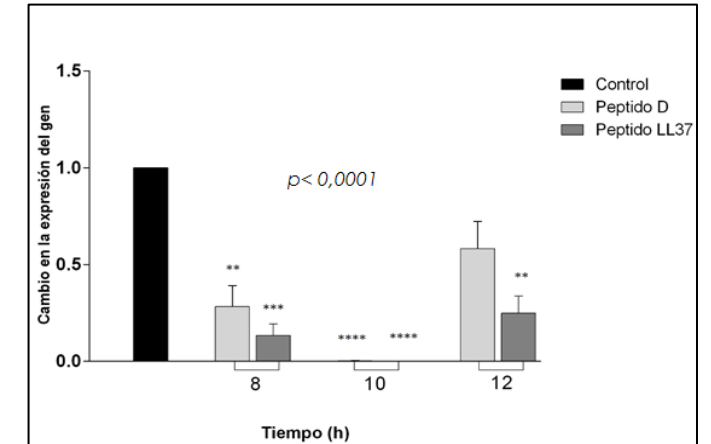
ATCC 12228



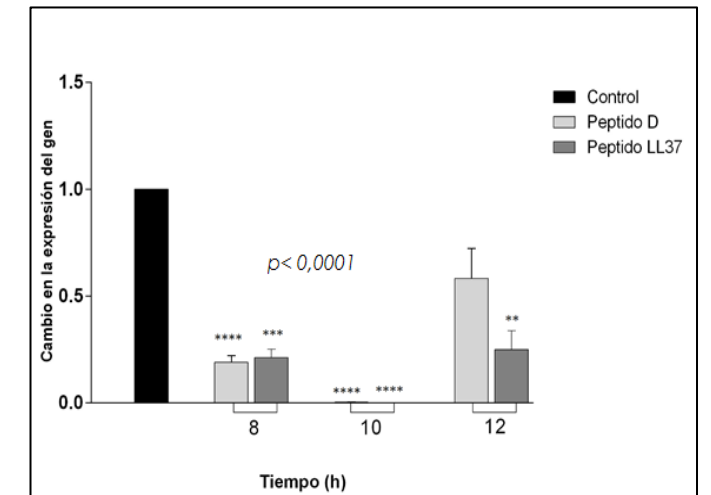
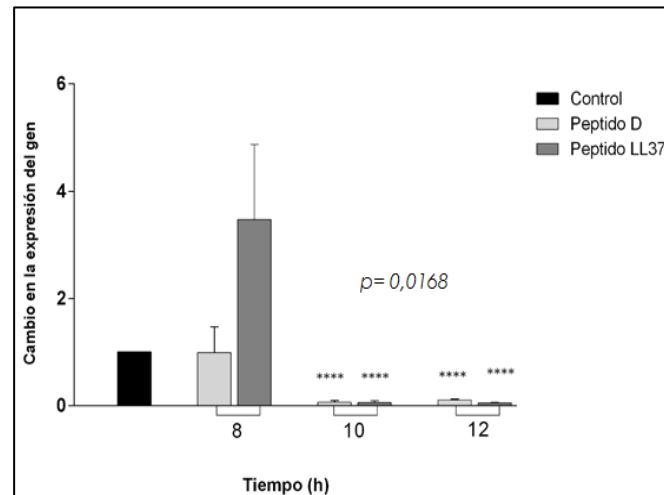
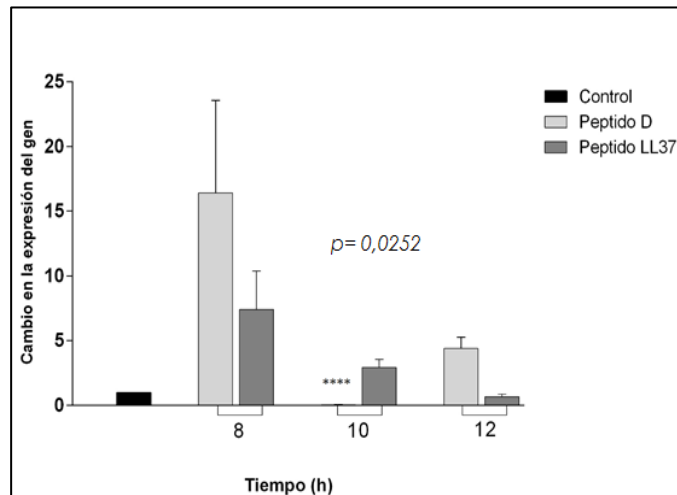
ATCC 35984



22-6



agrB



Cambio en la expresión de los genes *agrA* y *agrB*

Peptido DLL-37							
Genes		agrA			agrB		
Horas		8H	10H	12H	8H	10H	12H
<i>S. aureus</i>	ATCC USA300	1.0%	-218.7%	-200.4 % (**)	-7.1%	-332.0%	-412.5%
	Col81	57.1%	-11.1%	61.3% (***)	-834.3%	-23.5%	-46.2%
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	-100.5%	-28.4%	-1458.0%	-1542.0%	95,3% (****)	-339%
	ATCC 35984	15.9%	34.9%	52.3%	1.2%	93,7% (****)	89,7% (****)
	22-6	71,76% (**)	99,8% (****)	41.7%	81,0% (****)	99,8% (****)	41.7%

Peptido LL-37							
Genes		agrA			agrB		
Horas		8H	10H	12H	8H	10H	12H
<i>S. aureus</i>	ATCC USA300	67.7% (***)	60.7% (**)	-75.7%	83,5% (***)	80,6% (****)	-739,3 (**)
	Col81	49.3% (**)	33.4% (**)	-966.4 (**)	-75.1%	-118.1%	-1617%
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	-268.4%	-413.8%	-1187%	-640.8%	-193%	32.6%
	ATCC 35984	-437.0%	36.9%	67.9%	-247.0%	94,4% (****)	94,7% (****)
	22-6	86,6% (***)	99,9% (****)	75,0% (**)	78,7% (***)	99,9% (****)	75,0% (**)

** p hasta 0,0021 *** p hasta 0,0002 **** $p < 0,0001$

Conclusiones

- Todas las cepas bacterianas estudiadas presentan al menos uno de los componentes evaluados que integran el sistema agr del Quorum sensing, lo que nos permite decir que todas las cepas estudiadas presentan este sistema de sincronización de comportamientos celulares.
- El AIP I es el más frecuente encontrado en los aislamientos clínicos, aunque no fue posible relacionarlo con la procedencia de los mismos.
- Los péptidos LL37-1 y DLL-37 reducen la expresión de los genes *agrA* y *agrB* en los aislamientos estudiados tanto como en las cepas ATCC usadas, aunque se observa un comportamiento diferente en cada especie bacteriana

Recomendaciones

- Ampliar la cantidad de cepas a estudiar para determinar si el efecto de los péptidos es el mismo sobre la totalidad de las cepas o si este varia en cada aislamiento.
- Determinar por medio de técnicas mas sensibles el mecanismo de acción de los péptidos.

Bibliografía

- Natsis NE, Cohen PR. Coagulase-Negative Staphylococcus Skin and Soft Tissue Infections. *Am J Clin Dermatol*. 2018 Jun 7. Doi: 10.1007/s40257-018-0362-9.
- Weiner L, Webb A, Limbago B, Dudeck M, Patel J, Kallen A et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infection Control & Hospital Epidemiology* [Internet]. 2016 [cited 15 February 2018]; 37(11):1288-1301. Available from: <https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/datastat/2014-AR-data-summary-nhsn.pdf>
- Grupo Para el Control de la Resistencia Antimicrobiana en Bogotá (GREBO). Resultados de la vigilancia de la resistencia bacteriana año 2016 Componente pediátrico y adulto Análisis de percentiles marcadores de resistencia 2016. Componente pediátrico y adulto. Tendencias de los principales marcadores de resistencia 2008-2016 [Internet]. Bogotá D. C.; 2017. Available from: http://www.grebo.org/documentos/Boletin_Grebo_2017.PDF

Gracias