

Proiect TE 76/2010 Raportare Faza I

CARACTERIZAREA PATTERN-URILOR DE VIRULENȚĂ ȘI REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE ALE TULPINILOR DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ȘI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IZOLATE DIN INFECȚII NOSOCOMIALE

În această etapă a fost realizată caracterizarea fenotipică și genotipică a factorilor de virulență prezenti la 47 de tulpini de *S. aureus* și 50 de *Ps. aeruginosa* izolate din infecții nosocomiale și identificate de către Laboratorul de Microbiologie al Institutului de Boli Cardiovasculare "Prof. C.C. Iliescu" din București, în perioada septembrie-noiembrie 2010, în scopul stabilirii unor potențiale corelații existente între diferitele *pattern*-uri de factori de virulență, tipul de infecție determinată și sursa de izolare ale tulpinilor studiate.

Materiale și metode

Spectrul de factori de virulență s-a determinat prin **metode fenotipice și genotipice**. Abordarea mixtă, fenotipică și genotipică utilizată este complementară, lărgind spectrul de factori de virulență analizați pentru a putea stabili *pattern*-urile de virulență caracteristice tulpinilor studiate.

Metodele fenotipice au permis detectarea unor factori de virulență asociați peretelui celular (adezine implicate în aderența la substratul celular și respectiv inert) și solubili, prin cultivarea tulpinilor pe medii ce conțin substratul enzimatic corespunzător fiecărui factor de virulență: toxinele formatoare de pori (lecitinaza, lipaza, hemolizine), și exoenzimele (gelatinaza, cazeinaza, amilaza și DN-aza). La tulpinile de *S. aureus* s-a realizat suplimentar testul fermentării manitolului, al coagulazei legate (clumping factor) și libere (testul coagulării plasmei de iepure) și al factorului CAMP (hemolizina incompletă ce necesită aportul sinergic al unei sfingomielinaze pentru liza hematiilor). Tulpinile de *Ps. aeruginosa* studiate au fost cultivate pe mediu Cetrimid pentru observarea morfologiei coloniilor dezvoltate și a tipului de pigment.

Capacitatea de **aderență**, etapa esențială în stabilirea procesului infecțios cu *S. aureus* și *Ps. aeruginosa*, determinată de o serie de adezine produse de celulele bacteriene, și de **invazie** ulterioară a celulelor eucariote au fost investigate pe culturi de celule HeLa (metoda Cravioto, 1979, modificată, ce presupune infectarea unei culturi celulare *in vitro*, îndepărtarea bacteriilor neaderente după incubare și determinarea capacității de aderență și invazie bacteriană prin însămânțarea suspensiilor rezultate după liza celulelor monostratului și determinarea UFC/ml).

Metodele genetice au fost utilizate pentru a caracteriza anumiți factori de virulență pentru care metodele PCR reprezintă o alternativă la metodele clasice, care nu sunt optimizate, sau nu îi pot detecta în mod corepunzător.

ADN genomic a fost extras din 25 din cele 50 de tulpini clinice de *Ps. aeruginosa* și din 9 de *S. aureus* studiate, cu ajutorul kit-ului Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega, USA) în acord cu recomandările producătorului. ADN genomic obținut a fost utilizat ca matriță pentru toate experimentele PCR. Stabilirea concentrației și a purității ADN extras au fost determinate spectrofotometric (A 260/280 nm). Toate reacțiile PCR au fost efectuate în thermal cycler-ul Corbet.

La *Ps. aeruginosa*, s-a urmărit detectarea genelor ce codifică pentru: 3 proteaze, elastază (*lasB*), proteaza alcalină (*aprA*) și proteaza IV, ramnolipid (*rhlAB*), fosfolipaza C hemolitică (*plcH*), fosfolipaza C nehemolitică (*plcN*), sideroforul pioverdină (*pvdA*) și pentru 3 exotoxine (ExoA, ExoS, ExoT).

La *S. aureus* au fost detectate genele ce codifică pentru 8 adezine, respectiv: *ebpS* (proteina de legare a elastinei), *fnbB* (proteina B de legare a fibronectinei), *fib* (proteina de legare a fibrinogenului), *clfA* și *clfB* (factorii clumping A și B), și *bbp* (proteina de legare a sialoproteinei osoasă). Amplificarea genelor *bbp* și *ebpS*, respectiv *fnbB*, *fib*, *clfA* și *clfB* s-a realizat prin cîte o reacție PCR multiplex. Producția de amplificare pentru fiecare reacție PCR (multiplex/simplex) au fost verificate prin electroforeza în gel de agaroză 1.5% colorat cu bromură de etidiu (10 μg/ml) și identificați pe baza dimensiunilor caracteristice cu ajutorul unor markeri de greutate moleculară specifici. Gelurile au fost fotografiate cu instrumentul de documentare pentru geluri UVP.

Rezultate și discuții

În cadrul acestei prime etape au fost investigate 97 de tulpini de *Ps. aeruginosa* și *S. aureus*, izolate și identificate pe parcursul primelor 3 luni de desfășurare a proiectului (septembrie – noiembrie 2010). Distribuția

tulpinilor analizate in functie de sursa de izolare este prezentata in Fig. 1. Tulpinile de *S. aureus* au fost izolate predominant din exsudate faringiene, secretii plaga, traheale si hemoculturi, iar cele de *Ps. aeruginosa* din secretii bronșice, secretii plaga si uroculturi.

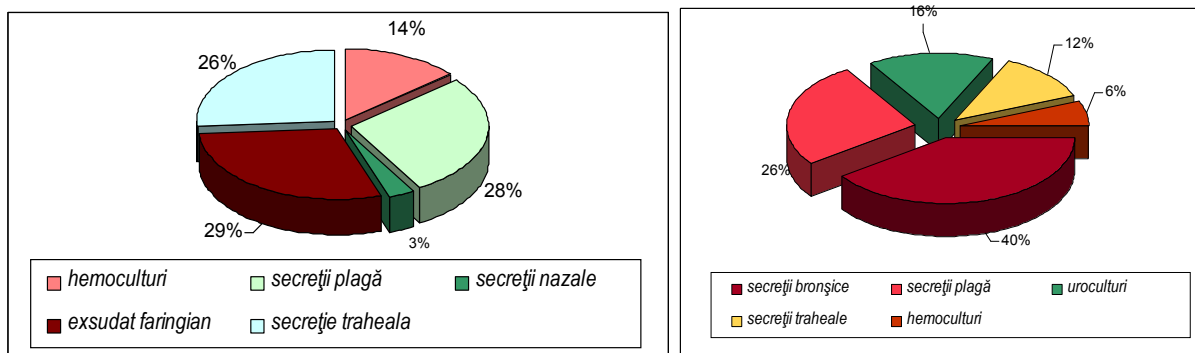


Figura 1. Distribuția procentuală, în funcție de sursa de izolare, a tulpinilor de *S. aureus* (stg.), respectiv *Ps. aeruginosa* (dr.) analizate.

Tulpinile de *Ps. aeruginosa* au generat, după cultivare pe mediul selectiv Cetrimid, atât colonii nepigmentate, cât și producătoare de piocianină (pigment albastru-verde), pioverdină (pigment galben fluorescent) sau, în număr mai redus pigmentul brun (piomelanină). Piocianina, pigment derivat din fenazină, este un important factor de virulență prin variatele efecte pe care le exercită asupra organismului gazdă: citotoxicitate, împiedicarea funcției normale a cililor epitelului nazal uman, întreruperea epitelului respirator, efect proinflamator asupra fagocitelor, apoptoza neutrofilelor, și efect pro-oxidant. În ceea ce privește producerea de factori de virulență solubili, lecitinaza, lipaza, amilaza au fost exprimate predominant la tulpinile izolate din secretii de plaga și bronșice, gelatinaza predominant la cele izolate din secretii bronșice. Tulpinile izolate din secretii de plaga au exprimat preferențial DN-aza și hemolizine, dar nu au exprimat gelatinaza. Dintre factorii testați, tulpinile izolate din secretii traheale, nu au prezentat gelatinaza și hemolizine (Fig. 2). Tulpinile de *S. aureus* analizate au prezentat un spectru bogat de exoenzime și toxine formatoare de pori evidențiate la nivel fenotipic (Fig. 2). Indiferent de sursa de izolare, tulpinile de *S. aureus* analizate au exprimat în mod constant DN-aza, lecitinaza și cazeinaza. Lipazele au fost prezente mai ales la tulpinile din secretii plaga. Hemolizina și lipaza (ambele cu acțiuni de toxine formatoare de pori) au fost slab exprimate, în timp ce gelatinaza a fost absentă la tulpinile izolate din hemoculturi. Majoritatea tulpinilor de *Ps. aeruginosa* și *S. aureus* analizate au prezentat o capacitate marcată de aderență la substratul celular eucariot, demonstrată prin valorile ridicate ale indicilor de aderență, de tip difuz-agregativ și difuz pentru *Ps. aeruginosa*, și în maniera difuză, localizată sau prezentând un pattern mixt, difuz agregativ sau localizat-agregativ pentru *S. aureus*. De asemenea, majoritatea tulpinilor analizate au prezentat o capacitate ridicată de invazie, demonstrată prin numărul crescut de UFC/ml, constatată după însămânțarea pe mediul cu manitol, respectiv cetrimid a suspensiilor bacteriene care au aderat și au invadat substratul celular.

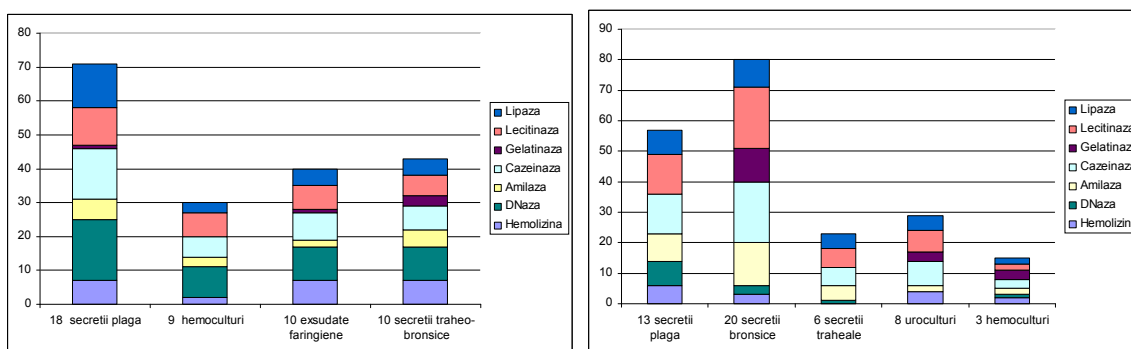


Figura 2. Spectrul factorilor de virulență solubili la tulpinile de *S. aureus* (stg.) și *Ps. aeruginosa* (dr.) studiate în funcție de sursa de izolare

Rezultatele testărilor prin PCR a genelor pentru: proteaze, ramnolipid, fosfolipaze, exotoxine și pioverdina la tulpinile de *Ps. aeruginosa* sunt prezentate în Fig. 3, 5-14. Tulpinilor izolate din diferite surse, au prezentat pattern-uri relativ similare de gene de virulență, atât în ceea ce privește prezența, cât și prevalența acestora. Genele care pot fi folosite ca markeri de diferențiere între tulpinile cu diferite surse de izolare sunt reprezentate de gena pentru **exotoxina S**, prezenta la tulpinile izolate din secreții plaga și bronsice și absenta la cele din secreții traheale și respectiv gena pentru **proteaza IV**, cu un nivel scăzut de pozitivitate la tulpinile izolate din secreții plaga și traheale, și absenta la cele izolate din secreții bronsice (Fig. 3).

Prezența proteazei alcaline și a elastazei B (lasB) la toate tulpinile analizate confirmă datele existente în literatură care atestă că peste 90% dintre izolatele clinice de *Ps. aeruginosa* produc aceste enzime [1]. Elastaza LasB distruge diferite componente tisulare (elastina, fibrina și colagenul) și interferează cu mecanismele de apărare ale gazdei (inactivează IgG, IgA, diferite componente ale sistemului complement, lizozimul din căile aeriene, precum și substanțele implicate în protecția tractului respirator față de proteaze: inhibitorul proteinazei alfa-1 și inhibitorul proteinazei din mucusul bronhial) [2]. Rolul proteazei alcaline în invazia țesuturilor și în infecțiile sistemice nu este clar stabilit, în schimb joacă un rol important în infecțiile corneei. Virulența proteazei IV a fost atribuită degradării proteinelor gazdă: fibrinogen și componente ale sistemului imunitar. De asemenea, proteaza IV degradează proteinele structurale, inclusiv elastina, ceea ce facilitează aderența bacteriană și instalarea procesului infecțios. Această enzimă a fost detectată în plămâni pacienților cu fibroză chistică, ceea ce sugerează că este un important factor de virulență la tulpinile de *Ps. aeruginosa* izolate din diferite tipuri de infecții [3]. Prezența proteazei IV la tulpinile izolate din secreții plaga demonstrează rolul acestei enzime și în procesele infecțioase cutanate.

Ps. aeruginosa produce trei proteine solubile implicate în invazia tisulară: două fosfolipaze C – fosfolipaza hemolitică (*haemolytic phospholipase C* [PLC-H]) și fosfolipaza nehemolitică (*non-haemolytic phospholipase C* [PLC-N]) și ramnolipidul [4]. Aceste enzime pot acționa sinergic pentru a degrada fosfolipidele (ex, fosfatidilcolina și sfingomielina) și contribuie la invazie prin efectele citotoxice pe care le exercită asupra neutrofilelor, limfocitelor și a altor celule eucariote.

Analiza rezultatelor PCR privind prezența genei *rhlAB*, ce codifică ramnolipidul la tulpinile de *Ps. aeruginosa* analizate, a arătat că toate tulpinile posedă această genă, ceea ce confirmă datele din literatură care susțin prezența constantă a acestui factor de virulență în rândul izolatelor clinice de *Ps. aeruginosa*. Ramnolipidul este un biosurfactant glicolipidic ce determină solubilizarea fosfolipidelor din surfactantul pulmonar, făcându-le mai accesibile clivării de către fosfolipaza C. De asemenea, studiul rezultatelor PCR a arătat că gena *plcN*, ce codifică fosfolipaza C nehemolitică (PLC-N) a fost detectată la toate tulpinile analizate, rezultate ce sunt în concordanță cu cele furnizate de diferite studii experimentale care au arătat că fosfolipaza C, o hemolizină labilă termic este produsă de toate tulpinile de *Ps. aeruginosa*. Această proteină solubilă este implicată în invazie prin efectele citotoxice asupra neutrofilelor, limfocitelor și a altor celule, și acționează sinergic cu fosfolipaza C hemolitică și cu ramnolipidul pentru a degrada fosfolipidele. De asemenea toate tulpinile analizate posedă gena *plcH*, care codifică sinteza fosfolipazei C hemolitice (PLC-H) [5]. Studiile experimentale au arătat că PLC-H purificat determină creșterea permeabilității vasculare, lezarea organelor și moartea atunci când este injectată la șoareci în doze mari, astfel PLC-H este un important factor de virulență. *Ps. aeruginosa* secretă patru proteine efector de tip III: ExoU, ExoY, ExoT și ExoS, fiind asociate cu un grad mai ridicat de mortalitate sau morbiditate [6]. Datele din literatura arată că nicio tulpină nu posedă toate exoenzimele, dar aproape toate tulpinile studiate codifică și exprimă toxina ExoT, ceea ce sugerează că această proteină are un rol mai conservat în contextul patogenezei *Ps. aeruginosa*, rezultat confirmat și de studiul nostru. Exoenzima S este responsabilă de distrugerea tisulară din infecțiile pulmonare (în cazul nostru fiind evidențiată la tulpinile izolate din secreții bronsice și plaga) și poate fi importantă pentru diseminarea bacteriană. Domeniul N-terminal este responsabil de inhibiția migrării celulare și are activitate anti-internalizare.

Rezultatele analizei PCR privind prezența genei *exoA*, ce codifică exotoxina A în rândul tulpinilor analizate, a arătat că toate tulpinile au această genă. Exotoxina A este produsă de majoritatea tulpinilor de *Ps. aeruginosa* ce determină infecții cronice [7]. *Ps. aeruginosa* poate determina lezarea și necroza directă a țesuturilor, adesea ca o consecință a producerii de exotoxină A, care este o enzimă cu un potențial excelent de ribozilare ADP, fiind implicată în invazia bacteriei, care intră în celulele eucariote prin endocitoză mediată de receptor și catalizează ADP-ribozilarea factorului de elongare 2 eucariotic. Acest proces inhibă sinteza proteică și în final conduce la moartea celulară. Exotoxina A este responsabilă de leziunile tisulare locale, de invazie și posibil de imunosupresie. Studiile

realizate la pacienții cu septicemie cu *Ps. aeruginosa*, au arătat că prezența unor titruri ridicate de anticorpi anti-exotoxină A în serurile acestora se asociază cu o rată mai bună supraviețuire.

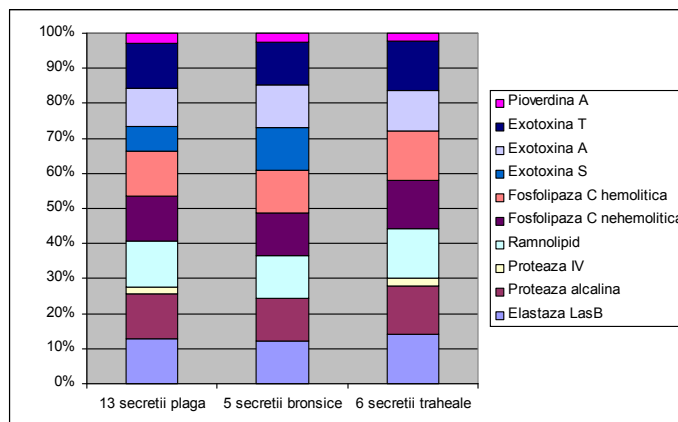


Figura 3. Spectrul genelor codificatoare pentru 10 factori de virulență la tulpinile de *Ps. aeruginosa* studiate în funcție de sursa de izolare

S. aureus secretă o serie de proteine extracelulare (proteaze, lipaze, nucleaze, collagenaze, coagulază, hialuronidază, hemolizine, leucocidină) cu rol în degradarea componentelor țesuturilor gazdă și toxine (TSST-1, exfoliatine și enterotoxine), a căror funcție principală este de a inhiba răspunsul imun ale gazdei față de *S. aureus*, dar fiecare toxină exercită și funcții biologice specifice, responsabile de manifestări clinice particulare. La tulpinile de *S. aureus*, au fost analizate pînă în prezent doar 9 tulpini izolate din hemoculturi, la care s-a observat prezența constantă a majorității genelor testate, cu excepția genelor *bbp* și *fnbB* (Fig. 4, 15-20).

Toate tulpinile au gena *fnbA*, ce codifică sinteza unei proteine de legare a fibronectinei (FnbpA), în timp ce gena *fnbB*, ce codifică o proteină omoloagă de legare a fibronectinei (FnbpB) este absentă la toate tulpinile studiate, rezultat așteptat, având în vedere redundanța funcțională a genelor pentru adezine. Toate tulpinile de *S. aureus* izolate din clinică posedă cel puțin una din cele două FnBPs (FnbpA, FnbpB)[8]. Tulpinile de *S. aureus* analizate provin din hemoculturi recoltate de la pacienți spitalizați cu dispozitive cardiovasculare, unde incidența adezinei FnbpA este recunoscută a fi ridicată, deoarece există studii care au demonstrat implicarea acestei adezine în endocarditele infecțioase [8].

Analiza rezultatelor PCR privind prevalența genelor care codifică aceste trei proteine ce leagă fibrinogenul, a arătat că toate tulpinile posedă gena *cflA*, ce codifică factorul clumping A, gena *fib*, ce codifică proteina extracelulară care leagă fibrinogenul, la 90%, în timp ce gena *cflB*, ce codifică factorul clumping B a fost detectată numai la 30% din tulpinile analizate. Prezența la majoritatea tulpinilor de *S. aureus* analizate a două gene (*cflA* și *fib*), ce codifică pentru 2 tipuri de proteine de legare a fibrinogenului (ClfA și Fib/Efb) demonstrează redundanța funcțională a genomului acestor tulpini [9]. Prezența acestor importante adezine la tulpinile analizate (izolate de la pacienți cu dispozitive cardiovasculare implantate) confirmă datele unor experimente *in vitro*, care au arătat implicarea factorilor clumping în aderența *S. aureus* la suprafețele îmbrăcate cu fibrinogen cum sunt și dispozitivele cardiovasculare [10]. De asemenea studiile experimentale *in vivo* realizate pe modelele animale au arătat că factorii clumping sunt implicați în endocardite [10, 11].

Rezultatele analizei PCR referitoare la prezența genei *bbp* la tulpinile analizate, au arătat că nicio tulpină de *S. aureus* din cele studiate nu posedă această genă, ce codifică adezina Bbp, o proteină ce leagă sialoproteina osoasă, rezultat așteptat având în vedere sursa de izolare a tulpinilor analizate pînă în prezent.

În ceea ce privește prezența genei *ebpS*, ce codifică proteina de legare a elastinei, rezultatele PCR au arătat că 66% din tulpinile de *S. aureus* analizate posedă această genă.

Analiza rezultatelor PCR privind prezența genei *cna*, ce codifică proteina de legare a colagenului, a arătat că 88.8% dintre tulpinile analizate posedă această genă. Gena *cna* este recunoscută ca fiind singura genă a *S. aureus* care codifică o adezină ce leagă în mod specific colagenul [12,13].

Analiza rezultatelor PCR privind prezența genei *spa* în rândul tulpinilor studiate, a arătat că toate tulpinile de *S. aureus* analizate posedă această genă, ce codifică proteina A caracteristică izolatelor de *S. aureus* [14].

Rezultatele PCR privind prezența genei *coag*, ce codifică coagulaza, la tulpinile de *S. aureus* analizate, arată prezența acesteia la toate tulpinile studiate, ceea ce confirmă rezultatele testelor fenotipice folosite pentru detectarea acestui important factor de virulență caracteristic tulpinilor de *S. aureus*.

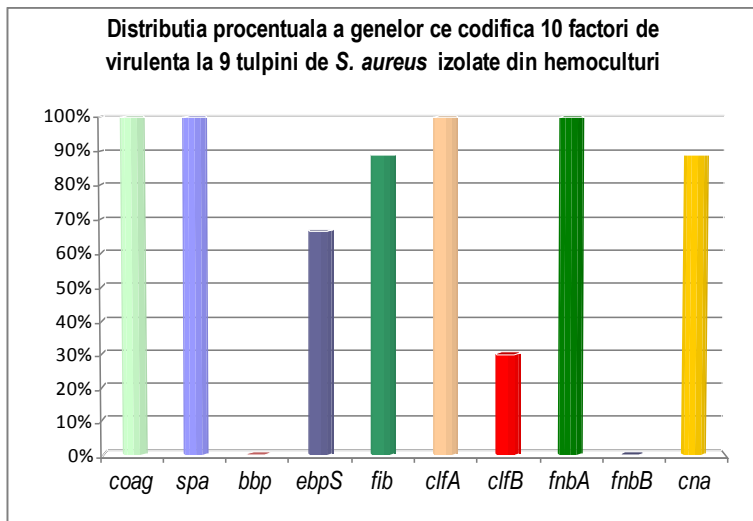


Figura 4. Spectrul genelor codificatoare pentru 10 factori de virulenta la tulpinile de *S. aureus* izolate din hemoculturi.

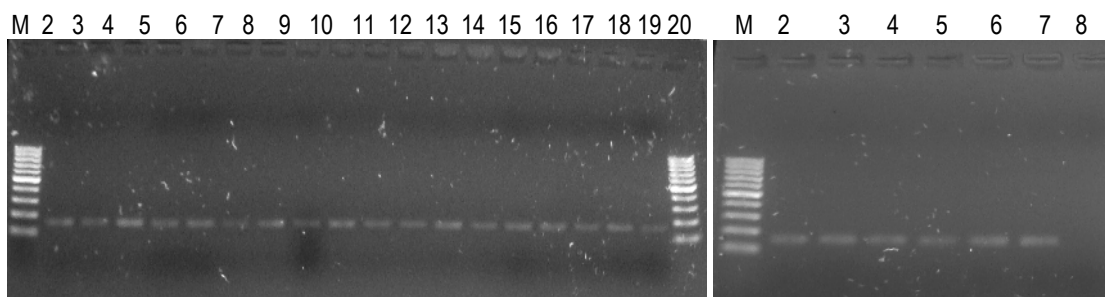


Figura 5. Electroforeza în gel de agaroză 1.5% a produșilor de amplificare a genei *lasB*. Stanga Godeurile 1 si 20 - M - Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, godeurile - 2-19 - tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1pl-13 pl, 1br-5br, ATCC. Dreapta Godeul 1 - M - Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, godeurile 2-7 tulpinile 1tr-6tr si godeul 8 - control negativ.

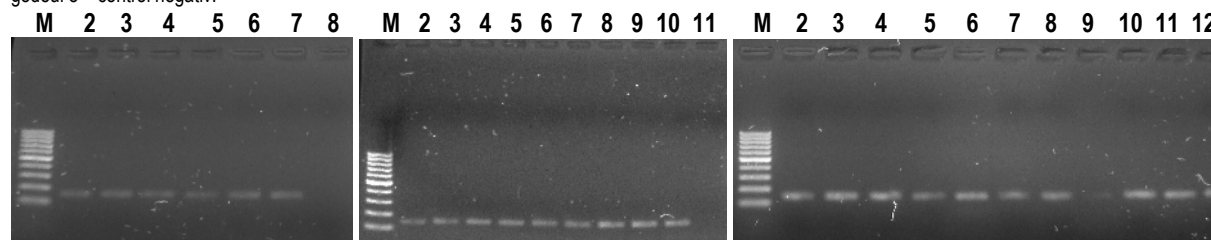


Figura 6. Electroforeza în gel de agaroză 1.5% a produșilor de amplificare a genei *aprA*. Stanga Godeul 1 - M - Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, godeurile - 2-7 - tulpinile de *Ps. aeruginosa* 12pl, 13 pl, 1br-3br 4br. Centru Godeul 1 - M - Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, godeurile - 2-10 - tulpinile de *Ps. aeruginosa* 4br, 5br, 1tr, 2tr, 3tr, 4tr, 5tr, 6tr si ATCC, godeul 11- control negativ. Dreapta Godeul 1 - M - Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, godeurile - 2-12 tulpinile 1pl-11pl.

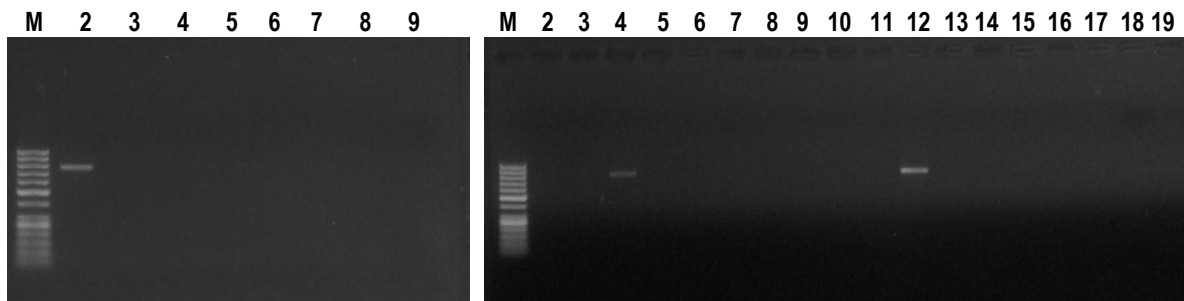


Figura 7. Electroforeza în gel de agaroză 1.5% a produșilor de amplificare a genei pentru proteaza IV. Stanga Godeul 1 – M - Gene Ruler 50bp DNA Ladder, godeurile – 2-8 – tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1tr-6tr, ATCC și 9- control negativ. Dreapta Godeul 1 – M - Gene Ruler 50bp DNA Ladder, godeurile – 2-19 – tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1pl-13pl, 1br-5br.

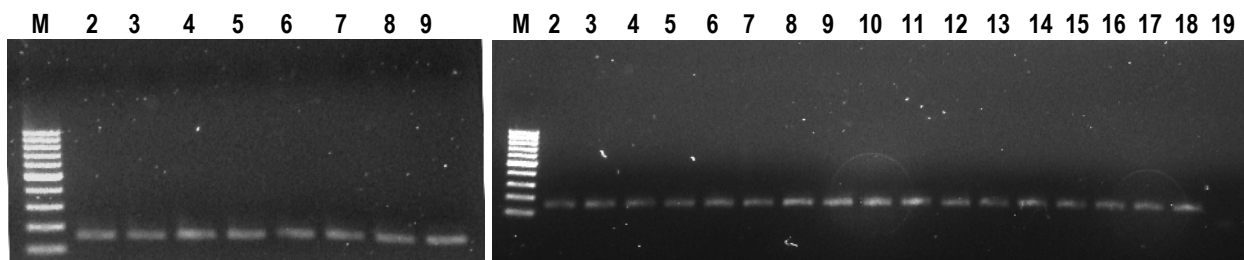


Figura 8. Electroforeza în gel de agaroză 1.5% a produșilor de amplificare a genei *rhIB*. Stanga Godeul1 – M- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, godeurile – 2-9 – tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1pl-8pl. Dreapta Godeul1 – M- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, godeurile – 2-18 – tulpinile de *Ps. aeruginosa* 9pl-13pl, 1br-5br, 1tr-6tr, ATCC și godeul 19- control negativ.

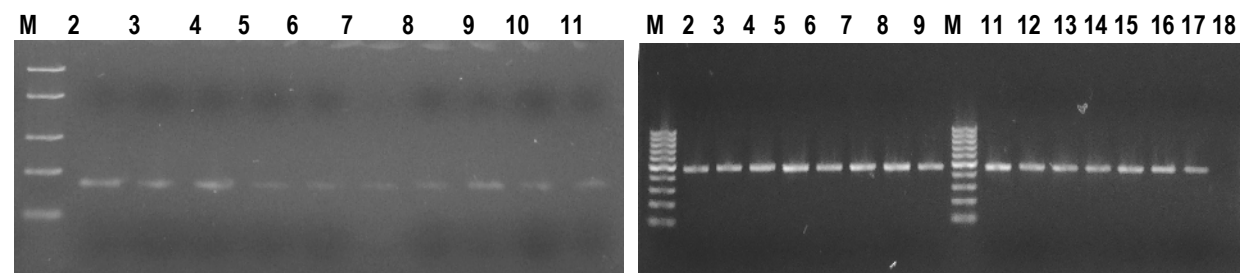


Figura 9. Electroforeza în gel de agaroză 1.5% a produșilor de amplificare a genei *plcN*. Stânga Godeul 1 – M – FastRuler Middle Range DNA Ladder, godeurile – 2-11 – tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1pl-10pl. Dreapta Godeurile 1 și 10 – M - Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, godeurile – 2-9 – tulpinile de *Ps. aeruginosa* 11pl-13pl, 1br-5br, godeurile 11-17 – tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1tr-6tr, ATCC, godeul 18- control negativ.

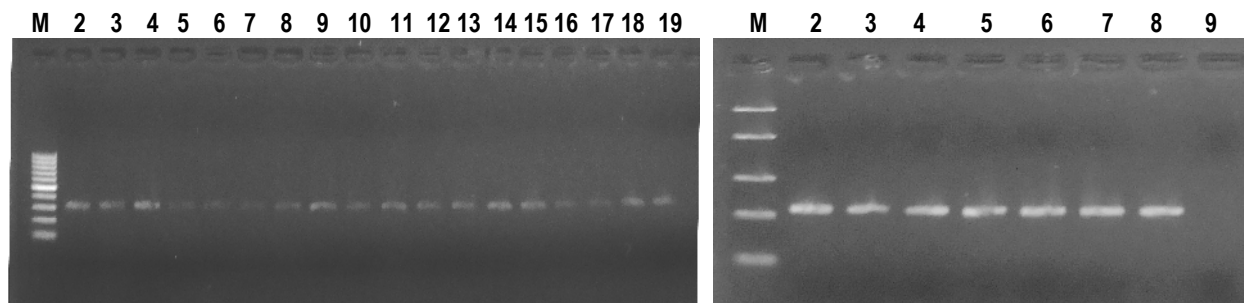


Figura 10. Electroforeza în gel de agaroză 1.5% a produșilor de amplificare a genei *plcH*. Stanga Godeul 1 – M - Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, godeurile – 2-19 – tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1pl-13pl, 1br-5br. Dreapta Stanga Godeul 1 – M – FastRuler Middle Range DNA Ladder, godeurile – 2-8– tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1tr-6tr, ATCC, godeul 9 – control negativ.

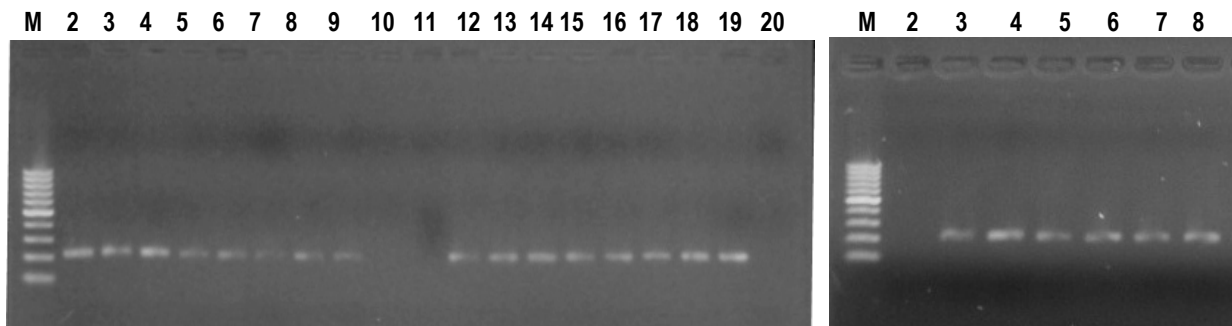


Figura 11. Electroforeza în gel de agaroză 1.5% a produșilor de amplificare a genei *exoA* Stanga Godeul 1 – M - Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, godeurile – 2-19 – tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1pl-13pl, 1br - 5br si godeul 20 - control negativ. Dreapta Godeul 1 – M - Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, godeurile – 2-8 – tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1tr-6tr, ATCC.

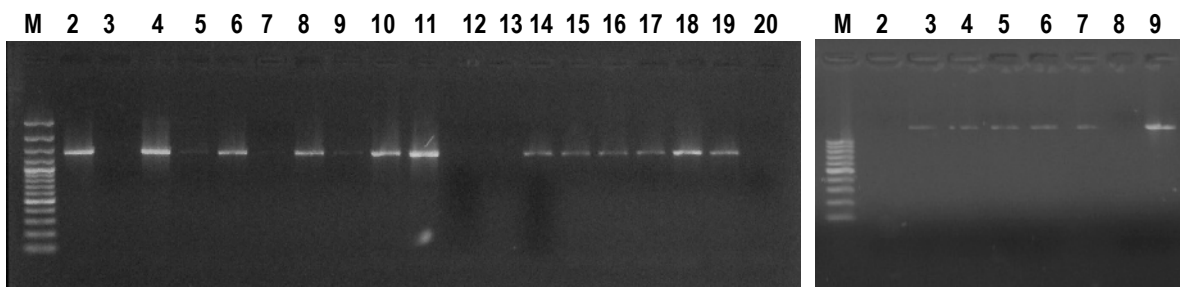


Figura 12. Electroforeza în gel de agaroză 1.5% a produșilor de amplificare a genei *exoS* Stanga Godeul 1 – M - Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder, godeurile – 2-19 – tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1pl-13pl, 1br-5br, godeul 20- control negativ. Dreapta Godeul 1 – M - Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, godeurile – 2-7 – tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1tr-6tr, godeul 8- control negativ si godeul 9- ATCC.

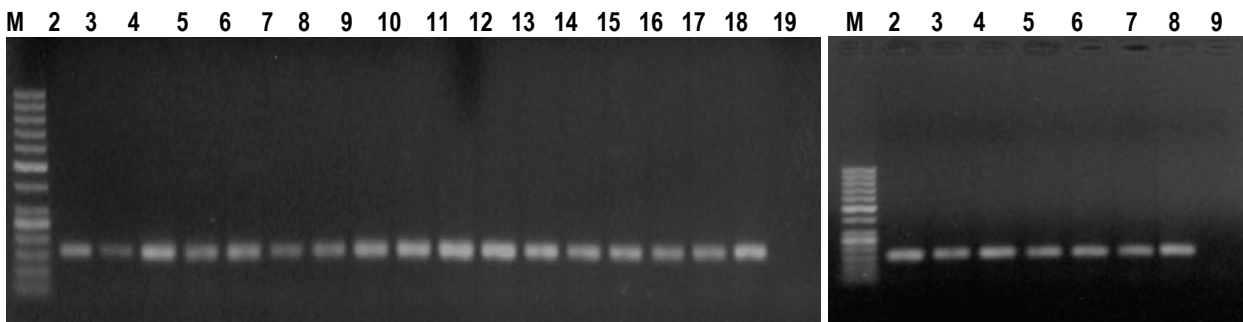


Figura 13. Electroforeza în gel de agaroză 1.5% a produșilor de amplificare a genei *exoT* Stanga Godeul 1 – M - Gene Ruler 50bp DNA Ladder, godeurile – 2-19 – tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1pl-13pl, 1br-5br. Centru Godeul 1 – M - Gene Ruler 50bp DNA Ladder, godeurile – 2-9 – tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1tr-6tr, ATCC si godeul 10- control negativ.

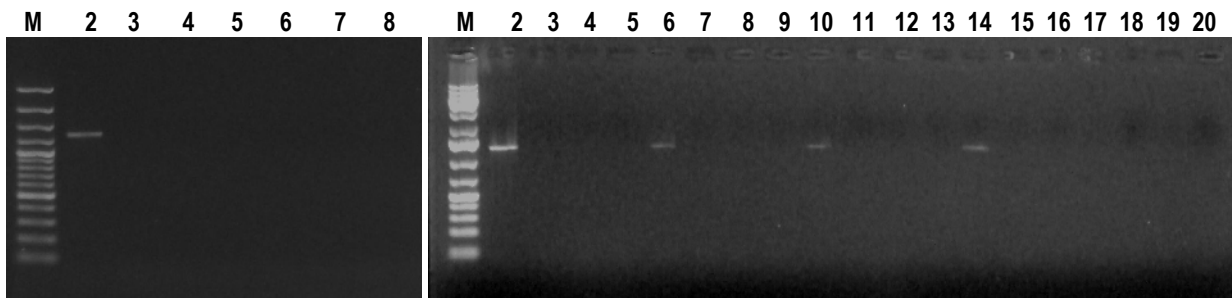


Figura 14. Electroforeza în gel de agaroză 1.5% a produșilor de amplificare a genei *pvdA* Stanga Godeul 1 – M - Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder, godeurile – 2-8– tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1tr-6tr, ATCC. Dreapta Godeul 1 – M - Gene Ruler 1 Kbp DNA Ladder, godeurile – 2-18– tulpinile de *Ps. aeruginosa* 1pl-13 pl, 1br-5br si godeul 20 - control negativ.

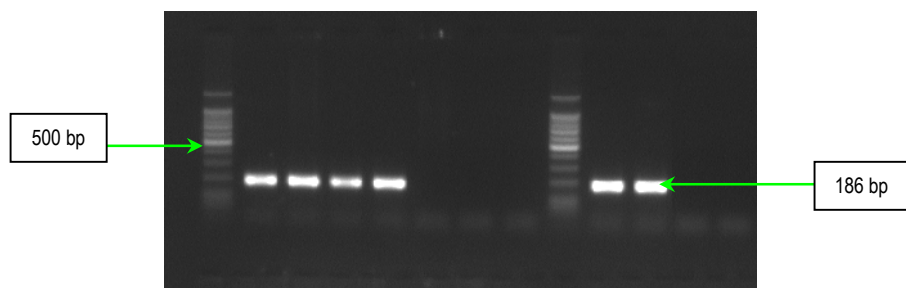


Figura 15. Multiplex PCR pentru detectarea simultană a genelor *bbp* și *ebpS*. Godeurile 1 și 9 – Marker de greutate moleculară (M) - Bench Top PCR Marker (Promega), godeurile 2 – 11 – tulpinile 1 - 9 de *S. aureus*, godeul 12 – control negativ.

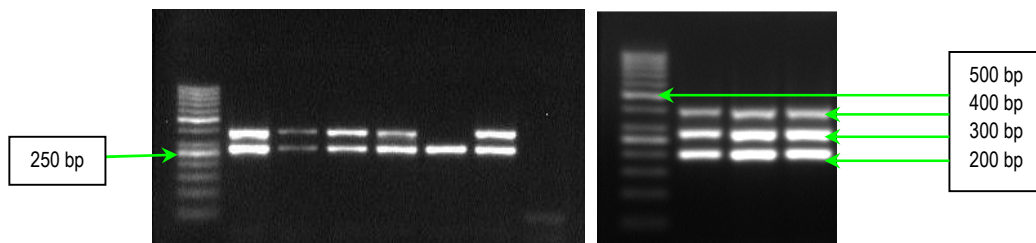


Figura 16. Multiplex PCR pentru detectarea simultană a genelor *fib*, *clfA*, *clfB* și *fnbB*. Stânga Godeul 1 – M- GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas), 2 – 7 – tulpinile 1 – 6 de *S. aureus* și 8 – control negativ. Dreapta Godeul 1 – M - GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas), 2-4 – tulpinile 7-9 de *S. aureus*.

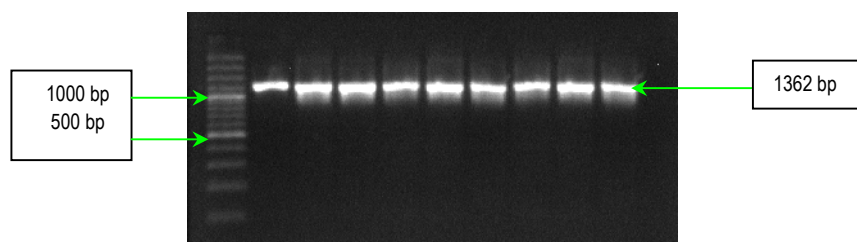


Figura 17. Electroforeza în gel de agaroză a produșilor de amplificare a genei *fnbA*. Godeul 1 – M - Fermentas - GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 2 - 10 – tulpinile 1 - 9 de *S. aureus* și 11 - control negativ.

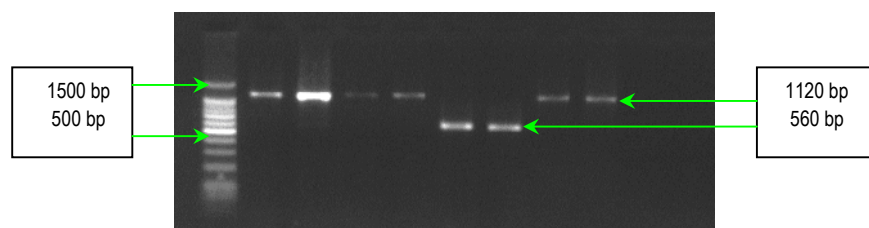


Figura 18. Electroforeza în gel de agaroză a produșilor de amplificare a genei *cna*. Stânga Godeul 1 – M - Bench Top 100bp DNA Lader (Promega), godeurile 2 –10 tulpinile 1 - 9 de *S. aureus* și 11 – control negativ.

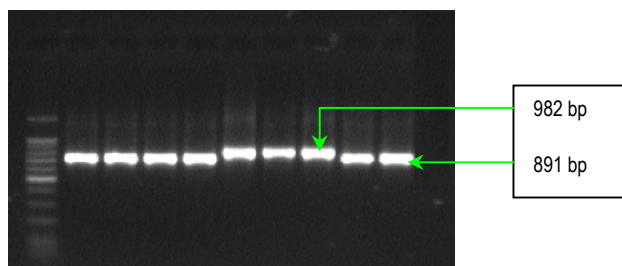


Figura 19. Electroforeza în gel de agaroză a produșilor de amplificare a genei *coag*. Godeul 1 – M- BenchTop 100 bp (Promega), godeurile 2 - 10 – tulpinile 1 – 9 de *S. aureus* și godeul 11 – control negativ.

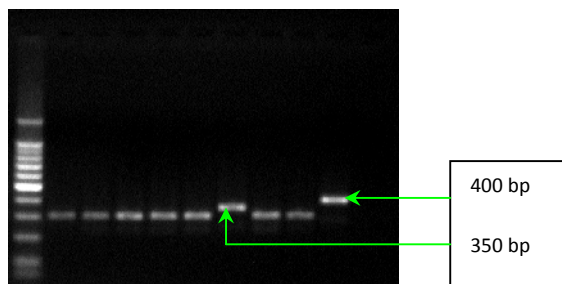


Figura 20. Electroforeza în gel de agaroză 1,5% în TAE 1X a produșilor de amplificare a genei *spa*. Godeul 1 – M - Bench Top 100bp DNA Lader (Promega), godeurile 2 – 10 – tulpinile 1-9 de *S. aureus* și 11 - control negativ.

Concluzii

Studiul la nivel fenotipic și genetic al factorilor de virulență exprimați de 97 de tulpini de *Ps. aeruginosa* și *S. aureus* izolate din diferite produse patologice de la pacienți spitalizați a permis elaborarea unor concluzii preliminare privind asocierea caracteristică dintre un anumit spectru de factori de virulență și sursa de izolare a tulpinilor microbiene:

- Capacitatea de aderență și invazie a substratului celular a fost o caracteristică generală a tulpinilor analizate.
- La tulpinile de *Ps. aeruginosa*, lecitinaza, lipaza, amilaza au fost exprimate predominant la cele izolate din secreții de plăgă și bronșice, gelatinaza predominant la cele izolate din secreții bronșice, în timp ce tulpinile izolate din secreții traheale, nu au prezentat gelatinaza și hemolizine.
- Tulpinilor de *Ps. aeruginosa* izolate din diferite surse, au prezentat pattern-uri relativ similare de gene de virulență, atât în ceea ce privește prezența, cât și prevalența acestora, cu excepția genei pentru **exotoxina S**, prezența la tulpinile izolate din secreții plăgă și bronșice și absența la cele din secreții traheale și a genei pentru **proteaza IV**, cu un nivel scăzut de pozitivitate la tulpinile izolate din secreții plăgă și traheale, și absența la cele izolate din secreții bronșice.
- Indiferent de sursa de izolare, tulpinile de *S. aureus* analizate au exprimat în mod constant DN-aza, lecitinaza și cazeinaza. Lipazele au fost prezente mai ales la tulpinile din secreții plăgă. Hemolizina, lipaza și gelatinaza a fost absentă la tulpinile izolate din hemoculturi.
- La tulpinile de *S. aureus* izolate din hemoculturi s-a observat prezența constantă a majorității genelor testate, cu excepția genelor *bbp* (ce codifică o proteină ce leagă sialoproteina osoasă) și *fnbB* (ce codifică o proteină omologă de legare a fibronectinei).

Bibliografie

1. Nathan E. and Hongwei Yu. 2004. Cross sectional analysis of clinical factors and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence and Genome biodiversity, *Infection and Immunity* **72** (1): 133–144.
2. Mariencheck William I., Alcorn John F., Palmer Scott M., and Wright Jo Rae. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Degrades Surfactant Proteins A and D. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28**: 528–537.
3. Smith L., Rose Barbara, Tingpej P., Zhu H., Conibear T., Manos J., Bye P., Elkins M., Willcox M., Bell S., Wainwright Claire and Harbour C.. 2006. Protease IV production in *Pseudomonas aeruginosa* from the lungs of adults with cystic fibrosis. *Journal of Medical Microbiology* **55**: 1641–1644.
4. Abusriwil, H. and Stockley R. A. 2007. The Interaction of Host and Pathogen Factors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations and Their Role in Tissue Damage. *Proc Am Thorac Soc* **4**: 611–617.
5. Meyers D. J. and Berk R. S. 1990. Characterization of Phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* as a Potent Inflammatory Agent. *Infection and Immunity* **58**(3): 659–666.
6. Kaufman Melissa R., Jia J., Zeng L., Ha U., Chow Marie and Jin Shouguang. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* mediated apoptosis requires the ADP-ribosylating activity of ExoS. *Microbiology* **146**: 2531–2541.

7. **Sadikot Ruxana T., Blackwell T. S., Christman J. W., and Prince Alice S.** 2005. Pathogen–Host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **171**: 1209–1223.
8. **Que Yok-Ai, Haefliger J. A., Piroth L., François P., Widmer Eleonora, Entenza J. M., Sinha B., Herrmann M., Francioli P., Vaudaux P., Moreillon P.** 2005. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *JEM*. **201**(10):1627-1635.
9. **Palma M., Shannon O., Quezada H. C., Berg A., Flock Jan-Ingmar.** 2001. Extracellular Fibrinogen Binding Protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* blocks platelet aggregation due to its binding to the alfa-chain. *The Journal of Biological Chemistry* **276** (34): 31691–31697.
10. **Moreillon P., Entenza J. M., Francioli P., Mcdevitt D., Foster T. J., Francois P., Vaudaux P.** 1995. Role of *Staphylococcus aureus* Coagulase and Clumping Factor in Pathogenesis of Experimental Endocarditis. *Infection and Immunity* **63** (12): 4738–4743.
11. **Foster, T. J. Eidhin D. N., Vaudaux P., Francioli P., Moreillon P.** 2000. Contribution of Clumping Factor B to Pathogenesis of Experimental Endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* **68** (9): 5443–5446.
12. **Blevins, J. S., Gillaspay Allison F., Rehtin T. M., Hurlburt B. K., Smeltzer M. S.** 1999. The *staphylococcal accessory regulator (sar)* represses transcription of the *Staphylococcus aureus collagen adhesin gene (cna)* in an *agr*-independent manner. *Molecular Microbiology* **33** (2): 317-326.
13. **Ciampolini J., Harding K.G.** 2000. Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis Why do antibiotics fail so often? *Postgrad Med J.* **76**:479–483.
14. **Strommenger B. C., Kettlitz T., Weniger D., Harmsen, Friedrich A. W., Witte W.** 2006. Assignment of *Staphylococcus* Isolates to Groups by *spa* Typing, Smal Macrorestriction Analysis, and Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, **44** (7): 2533–2540.