

PROIECT TE 135/2010
CARACTERIZAREA PATTERN-URILOR DE VIRULENȚĂ ȘI REZISTENȚĂ LA
ANTIBIOTICE A TULPINILOR DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ȘI *PSEUDOMONAS*
***AERUGINOSA* IZOLATE DIN INFECȚII NOSOCOMIALE**
SINTEZA LUCRARILOR

FAZA III

În cursul acestei faze au fost stabilite, cu ajutorul metodelor genotipice, gradul de variabilitate genetică al tulpinilor de *S. aureus* și de *P. aeruginosa* izolate din diferite tipuri de infecții apărute la pacienți spitalizați și studiate în fazele anterioare ale proiectului elaborate printr-o abordare complementară, fenotipică și genotipică, pentru factorii de virulență și mecanismele de rezistență la antibiotice. De asemenea, a fost demarat ultimul obiectiv al acestui proiect, reprezentat de stabilirea unor corelații între prezența unor factori de virulență și rezistența la antibiotice în scopul evidențierii unor profiluri caracteristice utile în managementul infecțiilor nosocomiale.

INTRODUCERE

La ora actuală, în literatura de specialitate există foarte puține date referitoare la asocierea unui anumit profil de virulență și/sau rezistență al tulpinilor de *S. aureus* și *P. aeruginosa* cu o anumită sursă de izolare și implicit, cu un anumit tip de infecție. În cazul tulpinilor de *S. aureus*, s-a demonstrat că rezistența la meticilină poate influența secreția factorilor solubili de virulență, tulpinile MRSA producând mai multe superantigene decât tulpinile meticilino-sensibile (Schlievert, 2009; Schlievert et al., 2010). Clonele de MRSA circulante în mediul spitalicesc exprimă preferențial TSST-1 (*toxic shock syndrome toxin*) și enterotoxina A (SEA), în timp ce clonele comunitare leucocidina Panton-Valentine (Tristan et al., 2007; Diep et al., 2008). S-a demonstrat că tulpinile de *P. aeruginosa* izolate din keratitele bacteriene asociate lentilelor de contact prezintă o asociere unică a factorilor de virulență grupați pe insule de patogenitate, care includ în majoritatea cazurilor exotoxina S (Lee et al., 2003; Tam et al., 2007).

MATERIALE SI METODE

1. Identificarea tulpinilor bacteriene prin tehnica Rep-PCR

Secvențele repetitive din genomul procariotelor pot fi folosite ca situsuri pentru primeri oligonucleotidici. Această tehnică permite amplificarea secvențelor repetitive de la nivelul ADN-

cromosomal. Ampliconii obținuți sunt evidențiați prin electroforeză, astfel fiecare specie și uneori chiar tulpina prezentand un profil specific.

În reacția de amplificare au fost utilizați: 10μl PCR MasterMix (Promega) 2X, 50ng ADN, 0.1μM primer și apă până la un volum final de 20μl.

S-a utilizat un singur primer (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') iar programul PCR include: denaturarea inițială (7 min la 95°C); amplificare (40 cicluri, 1 minut la 94 °C, 1 minut 53 °C, 8 min la 65 °C); elongare finală (16 min la 65 °C).

Pentru evidențierea produșilor de amplificare s-a realizat o migrare în gel de poliacrilamidă de 10%, în TBE 1X, migrea s-a realizat la o tensiune de 7V/cm timp de 5h. După migrare gelul a fost colorat în EtBr (0.01mg/ml) 10 min și apoi fotografiat. Pentru procesarea rezultatelor s-a folosit programul informatic Quantity One 4.6.7. (Biorad) care a permis analiza similitudinilor dintre specii.

2.Stabilirea asocierilor dintre factorii de virulenta si rezistenta la tulpinile de *S. aureus* si *P. aeruginosa* izolate din infectii nosocomiale, s-a realizat prin analiza stratificata, mai intii a asocierilor semnificative dintre rezultatele obtinute prin metode fenotipice, apoi a celor obtinute prin metode genetice, in final realizandu-se corelarea integrata a acestora.

REZULTATE SI DISCUTII

Profilurile electroforetice obținute (Fig. 1-2) au permis realizarea unor dendrograme utilizând programul informatic Quantity One 467 (Biorad) cu algoritmul UPGMA în scopul analizei filogenetice a tulpinilor de bacterii patogene nou izolate.

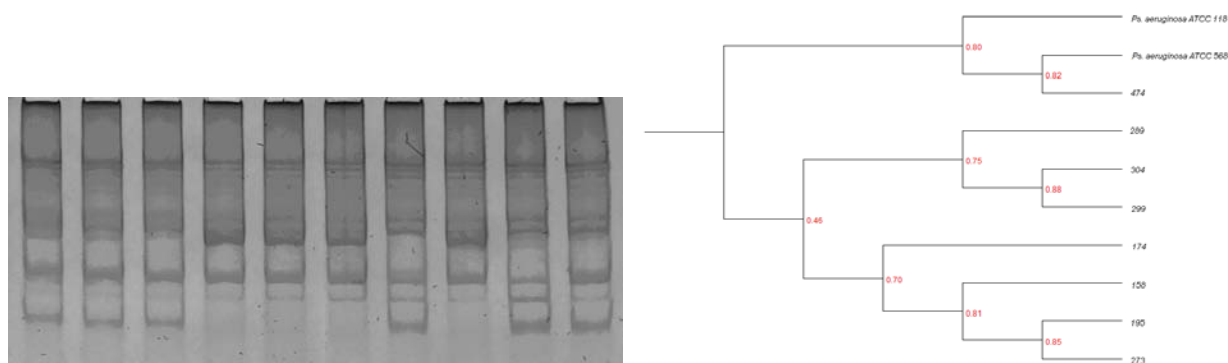


Figura 1. Profilul rep-PCR al unor tulpini de *Ps. aeruginosa* si dendrograma obținută în urma analizei profilelor Rep-PCR

1- 474; **2-** *Ps. aeruginosa* ATCC 118; **3-** *Ps. aeruginosa* ATCC 568; **4-** 299; **5-** 304, **6-** 289; **7-** 273; **8-** 158; **9-** 195; **10-** 174

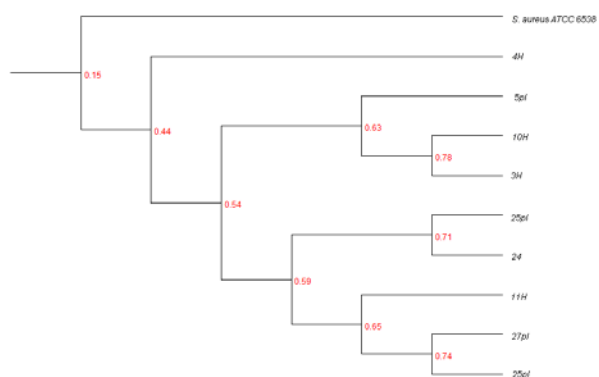
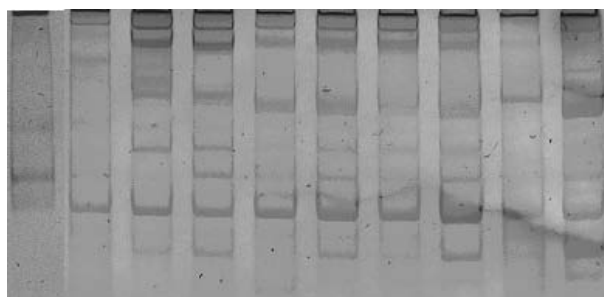


Figura 2. Profilul rep-PCR al unor tulpini de *S. aureus*

1- *S. aureus* ATCC 6538; 2- 4H; 3-24; 4- 25pl; 5-3H, 6-25pl; 7-27pl; 8-10H; 9-11H; 10-5pl

În urma analizei relațiilor filogenetice obținute prin utilizarea algoritmului UPGMA s-a constatat că tulpinile de *Pseudomonas* prezintă un profil asemănător cu cel al tulpinilor de referință utilizate. În cazul tulpinilor de *Staphylococcus* se observă o variabilitate genetică mai ridicată.

În ceea ce privește corelarea rezultatelor fenotipice privind spectrul de factori de virulență și rezistență, la tulpinile analizate până în prezent, datorită predominanței fenotipurilor de multirezistență (MDR) și rezistență extinsă la antibiotice (XDR), precum și spectrului larg de factori de virulență solubili produși de către tulpinile analizate (Tabel nr. 1, 2), pentru diferențierea unor profile caracteristice ale tulpinilor în funcție de sursa de izolare a fost luată în considerație incapacitatea unor tulpini de a produce un anumit factor de virulență. Astfel, pentru tulpinile de *P. aeruginosa*, a putut fi stabilit un profil de factori de virulență caracteristic pentru tulpinile izolate din **secreții traheale care nu produc gelatinază și hemolizina** și pentru cele din **uroculturi, care nu produc DN-aza**.

Tabelul.1. Corelarea dintre *pattern*-urile de virulență și rezistență la antibiotice la tulpinile de *P. aeruginosa* evidențiate prin metode fenotipice

| <i>P. aeruginosa</i> | Profilul de virulență evidențiat fenotipic | Profilul de rezistență fenotipică | Profil caracteristic în funcție de sursa de izolare |
|----------------------|--|-----------------------------------|---|
| Secretii de plaga | Lecitinaza, Lipaza, Hemolizine, Amilaza, DN-aza, Cazeinaza | MDR | Gelatinaza - |
| Secretii bronsice | Lecitinaza, Lipaza, Hemolizine, Amilaza, Gelatinaza, DN-aza, | MDR | - |

| | | | |
|-------------------|--|-----|--|
| | Cazeinaza | | |
| Secretii traheale | Lecitinaza, Lipaza, Amilaza, DN-aza, Cazeinaza | MDR | Gelatinaza (-) Hemolizine (-) |
| Uroculturi | Lecitinaza, Lipaza, Hemolizine, Amilaza, Gelatinaza, Cazeinaza | MDR | DN-aza (-) |
| Hemoculturi | Lecitinaza, Lipaza, Hemolizine, Amilaza, Gelatinaza, DN-aza, Cazeinaza | MDR | - |

Tabelul.2. Corelarea dintre *pattern*-urile de virulență și rezistență la antibiotice la tulpinile de *S. aureus* evidențiate prin metode fenotipice

| <i>S. aureus</i> | Profilul de virulență evidențiat fenotipic | Profilul de rezistență fenotipică | Profil caracteristic în funcție de sursa de izolare |
|-------------------|--|-----------------------------------|---|
| Secretii de plaga | Lecitinaza, Lipaza, Hemolizine, Amilaza, Gelatinaza, DN-aza, Cazeinaza | PEN, FOX, Te, MLSb | - |
| Secretii bronșice | Lecitinaza, Lipaza, Hemolizine, Amilaza, Gelatinaza, DN-aza, Cazeinaza | XDR | - |
| Secretii traheale | Lecitinaza, Lipaza, Hemolizine, Amilaza, Gelatinaza, DN-aza, Cazeinaza | FOX, Q, Te, MLSb | - |
| Hemoculturi | Lecitinaza, Lipaza, Hemolizine, Amilaza, DN-aza, Cazeinaza | XDR | Gelatinaza - |

În ceea ce privește rezultatele obținute în urma analizei datelor genotipice, La *P. aeruginosa*, s-a urmărit frecvența genelor ce codifică pentru: 3 proteaze, elastaza (*lasB*), proteaza alcalină (*aprA*) și proteaza IV, ramnolipid (*rhlAB*), fosfolipaza C hemolitica (*plcH*), fosfolipaza C nehemolitica (*plcN*), sideroforul pioverdină (*pvdA*) și pentru 3 exotoxine (ExoA, ExoS, ExoT), iar la *S. aureus* au fost analizate genele ce codifică pentru 8 adevine, 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 osoasa). Analiza rezultatelor testelor PCR privind spectrul genelor ce codifică importante adevine și invazine la tulpinile de *S. aureus* studiate a permis constatarea existenței unor redundanțe funcționale a unor perechi de adevine (*fnbA*, *fnbB*, respectiv *clfA*, *clfB*), însă majoritatea tulpinilor au exprimat gena pentru câte o singură adevină (*fnbA*, respectiv *clfA*). Genele *cna*, *bbp* și *ebpS* au fost detectate la un număr mic dintre tulpinile studiate, ceea ce sugerează posibilitatea utilizării acestora ca markeri de virulență pentru tulpinile provenite din tipuri de infecții specifice asociate cu exprimarea acestor adevine specifice.

În ceea ce privește genele de rezistență investigate, la *P. aeruginosa* a fost analizată frecvența genelor care codifică sinteza de ESBL (*bla_{ampC}*, *bla_{TEM}* grup, *bla_{SHV}* grup, *bla_{PSE}* grup (PSE-1, PSE 4, CARB-3)), MBL (*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SIM}* și *bla_{SPM}*), rezistența la ciprofloxacin prin mutații sau sinteza de pompe de eflux (*gyrA*, *parC*, *mexB*, *mexD*, *mexF* și *mexY*), iar la *S. aureus* gena care codifica rezistența la beta-lactami (*mecA*), la macrolide și la steptograminele de tip B prin mecanismul de eflux activ (gena *msrA*); fenotipul MLSb inductibil sau constitutiv (*ermA*, *ermC*). la tetraciclina (genele *tetK*, *tetM*).

În tabelele de mai jos (Tabelele 3, 4) sunt prezentate exclusiv genele asociate specific cu tulpinile provenite dintr-o anumită sursă de izolare, și nu cele prezente simultan la tulpini provenite din surse diferite sau genele care nu au fost exprimate de tulpini izolate dintr-o anumită sursă.

Tabelul.3. Corelarea dintre *pattern*-urile de virulență și rezistență la antibiotice la tulpinile de *P. aeruginosa* evidențiate prin metode genotipice

| <i>P. aeruginosa</i> | Profilul de virulență evidențiat genotipic | Profilul de gene de rezistență | Profil caracteristic în funcție de sursa de izolare |
|----------------------|--|--------------------------------|---|
| Secretii de plaga | exotoxina S +, proteaza IV - | | exotoxina S +, proteaza IV - |
| Secretii bronșice | exotoxina S + | | exotoxina S + |
| Secretii traheale | proteaza IV | | proteaza IV - |
| Uroculturi | | | |
| Hemoculturi | | | |

Gena *ermA* responsabilă de fenotipul MLSbI a fost detectată numai la tulpinile izolate din hemoculturi, în timp ce gena *ermC*, care codifică fenotipul MLSbC a fost detectată în proporții variabile la tulpinile izolate din celelalte surse de izolare.

Tabelul 4. Corelarea dintre *pattern*-urile de virulență și rezistență la antibiotice la tulpinile de *S. aureus* evidențiate prin metode genotipice

| <i>S. aureus</i> | Profilul de virulență evidențiat la nivel genotipic | Profilul de gene de rezistență | Profil caracteristic în funcție de sursa de izolare |
|-------------------|---|--------------------------------|---|
| Secretii de plaga | | <i>ermC</i> + | |
| Secretii bronșice | | <i>ermC</i> + | |
| Secretii traheale | | <i>ermC</i> + | |
| Hemoculturi | Bbp- fnbB- | <i>ermA</i> + | Bbp-, fnbB-, <i>ermA</i> + |

În urma corelării rezultatelor obținute prin abordarea fenotipică și genotipică, s-au putut evidenția unele profiluri de rezistență și virulență caracteristice pentru tulpini izolate din anumite tipuri de produse biologice (Tabelul 5).

Se observa aportul redus al profilului de rezistență la antibiotice la diferențierea tulpinilor provenite din diferite surse clinice, mai ales în cazul tulpinilor de *P. aeruginosa* (Figura 1).

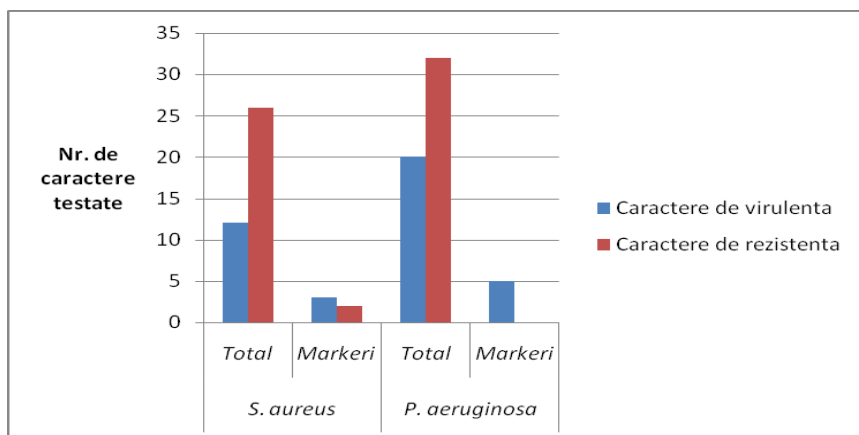


Fig. 1. Raportul dintre numărul total de caractere studiate și numărul de markeri selectați pentru stabilirea unor profiluri de rezistență și virulență caracteristice pentru tulpinile cu o anumită sursă de izolare

Aceste rezultate pot fi explicate prin următoarele ipoteze: i) localizarea genelor de rezistență pe elemente genice mobile, care sunt transferate în mediul spitalicesc, pe orizontală, între diferite tulpini bacteriene; ii) diseminarea clonală în mediul spitalicesc a anumitor tulpini adaptate la presiunea selectivă a antibioticelor; această ipoteză fiind susținută și de rezultatele repPCR care demonstrează, cel puțin în cazul tulpinilor de *P. aeruginosa*, un grad ridicat de înrudire filogenetică a tulpinilor studiate.

Dintre factorii de virulență fenotipici testați, proteazele (gelatinaza), DN-aza și toxinele formatoare de pori (hemolizinele) au permis diferențierea unor fenotipuri distincte la tulpinile de *P. aeruginosa* izolate din secreții de plagă, traheale și din uroculturi. Gelatinaza a permis de asemenea stabilirea unui fenotip distinct pentru tulpinile de *S. aureus* izolate din hemoculturi.

Dintre genele de virulență, cele pentru exotoxina S și proteaza IV au permis diferențierea unor profiluri distincte ale tulpinilor de *P. aeruginosa* izolate din secreții de plagă, bronșice și traheale, în timp ce la tulpinile de *S. aureus*, 2 gene de virulență, ce codifică pentru două adevine și alela *ermA* ce codifică pentru un anumit mecanism de rezistență la macrolide și streptograme, au condus la diferențierea unui profil distinct al tulpinilor de *S. aureus* izolate din hemoculturi.

Tabelul 5. Profilul caracteristic de virulență și rezistență la antibiotice la tulpinile de *P. aeruginosa* și *S. aureus* izolate din diferite surse clinice

| <i>P. aeruginosa</i> | |
|----------------------|---|
| Secretii de plaga | Gelatinaza -, Exotoxina S +, Proteaza IV - |
| Secretii bronșice | Exotoxina S + |
| Secretii traheale | Gelatinaza -, Hemolizine , - Proteaza IV - |
| Uroculturi | DN-aza - |
| Hemoculturi | - |
| <i>S. aureus</i> | |
| Secretii de plaga | - |
| Secretii bronșice | - |
| Secretii traheale | - |
| Hemoculturi | XDR, gelatinaza -, Bbp-, fnbB-, ermA+ |

CONCLUZII

- 1 Abordarea fenotipică și genotipică a virulenței și rezistenței, a permis investigarea unui număr total de 52 de caractere la tulpinile de *P. aeruginosa* și 38 la tulpinile de *S. aureus*, dintre care, în urma corelațiilor realizate, un număr limitat (5) au fost selectate ca markeri de diferențiere între tulpinile cu diferite surse de izolare.
- 2 Au fost stabilite profiluri caracteristice pentru tulpinile de *P. aeruginosa* izolate din secreții de plagă, secreții bronșice, traheale și uroculturi și pentru tulpinile de *S. aureus* izolate din hemoculturi.
- 3 Analiza rezultatelor prelucrate până în prezent demonstrează necesitatea extinderii panelului de teste fenotipice și genotipice pentru evidențierea factorilor de virulență și de rezistență la antibiotice, în scopul identificării unor noi markeri utili pentru diferențierea tulpinilor izolate din diferite contexte clinice.

Referinte

Lee E. J., et al. 2003. Contribution of ExsA-regulated factors to corneal infection by cytotoxic and invasive *Pseudomonas aeruginosa* in a murine scarification model. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:3892–3898

Tam C., et al. 2007. Mutation of the phospholipase catalytic domain of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU abolishes colonization promoting activity and reduces corneal disease severity. *Exp. Eye Res.* 85:799–805;

Tristan A. et al.. 2007. Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect.* 2007 Jun;65 Suppl 2:105-9;

Schlievert P.M. Secreted Virulence Factor Comparison Between Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*, and its Relevance to Atopic Dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.*; 125(1): 39;

Schlievert PM. Cytolysins, superantigens, and pneumonia due to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 2009; 200:676–8;

Diep BA, et al. Contribution of Pantone-Valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *PLoS One.* 2008;3:e3198 .