

Nozokomiālo koagulāzes negatīvo stafilokoku meticilīnrezistences un virulences faktoru pētījums *Study on Virulence Factors and Methicillin Resistance in Nosocomial Coagulase Negative Staphylococci*

Iveta Līduma, Tatjana Tračevska, Aija Žileviča

Latvijas Universitāte
Medicīnas fakultāte
Šarlotes iela 1a, Rīga, LV-1001
E-pasts: iveta.liduma@lu.lv

Koagulāzes negatīvie stafilokoki (KONS) ir kļuvuši par nozīmīgiem hospitālo infekciju ierosinātājiem. Lai varētu diferencēt komensālos mikroorganismu celmus no invazīviem celmiem, ir jāizpēta, kādi faktori veicina KONS virulences paaugstināšanos. Koagulāzes negatīvo stafilokoku identificēšanai tika lietota *BBL™ Crystal™* identifikācijas sistēma (*Beckton, Dickinson and Company*, ASV), KONS jutības pret meticilīnu noteikšanai tika izmantota *Bauer-Kirby* metode. Metodes pamatā ir pretmikrobu aģenta, ar kuru piesātināts papīra disks, difūzija agarā gelā. Virulences faktoru noteikšanai bija lietotas molekulārās bioloģijas izmeklēšanas metodes, detektējot *aap* un *icaA* gēnu. Rezistence pret meticilīnu tika apstiprināta, nosakot *mecA* gēnu.

Iegūtie rezultāti liecināja, ka invazīvie KONS celmi visbiežāk ir rezistenti pret meticilīnu. Virulences faktoru – *aap* un *icaA* gēna – klātbūtne invazīvajos paraugos bija novērojama biežāk nekā kolonizējošo KONS paraugos.

Atslēgvārdi: koagulāzes negatīvie stafilokoki, meticilīnrezistence, virulences faktori.

Ievads

Koagulāzes negatīvie stafilokoki ir kļuvuši par galvenajiem polimērasociēto infekciju un bakterēmiju ierosinātājiem daudzās klīnikās. Interesi ir izraisījuši KONS grupas pārstāvji, kas spēj radīt infekcijas novājinātā organismā, piemēram, pēcoperācijas brūču infekcijas, bakterēmiju, endokardītu u. c. (6).

Klīnisko manifestāciju dažādība ir raksturīga galvenokārt *S. epidermidis* grupas pārstāvjiem. *S. epidermidis sensu stricto* visbiežāk izraisa katetru un protēžu infekciju ar bakterēmiju, brūču infekciju, peritonītu peritoneālās dialīzes gadījumā un osteomielītu. *S. haemolyticus* izraisa bakterēmiju un endokardītu, brūču, locītavu, kaulu infekcijas. Klīniski nozīmīgi piogēno infekciju ierosinātāji ir arī *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. capitis* u. c. (9, 16).

Lai gan koagulāzes negatīvos stafilokokus pieskaita pie nosacīti patogēno mikroorganismu grupas, daudzi hospitālie celmi ir ieguvuši izteiktas adhezīvās un invazīvās īpašības un tiek uzskatīti par īstiem patogēniem. Pēdējā laikā šie mikroorganismi cirkulē ne tikai slimnīcās, bet nereti sastopami arī sabiedrībā (10).

Koagulāzes negatīvo stafilokoku rezistence pret antibakteriālajiem līdzekļiem ir plaši izplatīta. Nopietna problēma ir meticilīnrezistence, kas nozīmē rezistenci pret visiem antibakteriālajiem β -laktāmu preparātiem. Vairāk nekā 80% no hospitālajiem *S. epidermidis* celmiem ir rezistenti pret meticilīnu. Meticilīnrezistenci nosaka *mecA* gēna iegūšana ar tā integrāciju baktērijas genomā (2). Pierādīta ir meticilīnrezistences horizontālā izplatība, tas nozīmē – no rezistentā stafilokoku celma uz jutīgu celmu. *S. epidermidis* kaseti SCCmec spēj nodot arī citu sugu mikroorganismiem (10, 16). Spēja veidot un pārmantot rezistenci pret antibakteriālās terapijas līdzekļiem padara šos mikroorganismus sevišķi bīstamus priekšlaikus dzimušiem bērniem un pieaugušiem cilvēkiem ar novājinātu imūnsistēmu (1). Meticilīnrezistentie stafilokoki viegli iegūst rezistenci arī pret citu grupu antibakteriālajiem preparātiem un kļūst polirezistenti. Ar rezistentajiem mikroorganismiem inficētas personas ir pakļautas ilgākam hospitalizācijas laikam. Turklāt biežāk ir nepieciešama otrās un trešās rindas antibiotiku lietošana, taču tās ir dārgākas. Jo augstāka ir rezistentu mikroorganismu izplatība populācijā, jo lielāks ir iespējamais risks inficēties ar rezistentu celmu (2, 14).

Tiek uzskatīts, ka *S. epidermidis* un pārējiem koagulāzes negatīviem stafilokokiem svarīgākais virulences faktors ir spēja kolonizēt uz implantēto biomateriālu virsmas: uz katetriem, protēzēm, mākslīgiem sirds vārstuļiem un izveidot biofilmu. Viens no svarīgākajiem biofilmu stabilizējošiem adhezīniem ir PIA (polisaharīdu intercelulārs adhezīns). Tas ir homoglikāns, 2-deoksi-2 amino-D glikopiranozila homopolimērs, kas satur nedaudz fosfātu un sukcināta. To tagad uzlūko par vienu no galvenajiem *S. epidermidis* virulences faktoriem, un parasti tas ir saistīts ar meticilīnrezistenci (4, 12). PIA produkciju nosaka *ica* ADBC operons, tas kodē virkni biosintētisku enzīmu, kuru darbības rezultātā veidojas PIA. *IcaA* gēns kodē transmembrānu proteīna N-acetilglikozaminila transferāzes producēšanu. *Ica* operons ir reti sastopams stafilokoku celmos, kas izdalīti ārpus klīniskās aprūpes iestādēm, tātad eventuāli tas ir saistīts ar nozokomiālām infekcijām. Visbiežāk *icaADBC* operons atrodams celmos, kuri izdalīti ar intravaskulārajiem katetriem saistīto bakterēmiju un septicēmiju gadījumos (5, 7).

Baktēriju apvienošanas biofilmā veicina Aap proteīns, kuru kodē *aap* gēns.

Ar akumulāciju asociētais Aap proteīns novietots mikroorganisma šūnas sienā un piedalās biofilmas veidošanā. Eksperimenti rāda, ka Aap ir vairāk izteikts klīniskiem izolātiem nekā komensāliem mikroorganismiem. Proteīnu kodējošais *aap* gēns, līdzīgi kā *ica* operona *icaA* gēns, ir biežāk konstatējams nozokomiālos izolātos, sevišķi bakterēmijas izraisītājos (4, 11). Biofilmu veidojošie celmi ir rezistentāki pret antibiotikām, tie ir arī pasargāti no organisma aizsargspēkiem – fagocītiem un antivielām. Biofilmā esošie mikroorganismi maina savas īpašības, samazinot augšanas ātrumu un gēnu ekspresiju, līdz ar to fenotipiski atšķiras no planktoniskām baktērijām (6).

Aap un *ica* gēna detektēšana bieži tiek izmantota stafilokoku virulences faktoru pētījumos. Iespējams, ģenētiski līdzīgiem celmiem ir jābūt *ica/aap* pozitīviem un biežāk sastopamiem starp invazīviem izolātiem, pateicoties to *ica* un *aap* faktoru priekšrocībām. Pētījumos ir aprakstīts, ka, izmantojot *icaADBC* operonu un proteīnu Aap kodējošo gēnu *aap* kā ģenētisko marķieri, ir iespējams diferencēt *S. epidermidis* komensālos celmus no invazīviem celmiem (13).

Materiāli un metodes

Koagulāzes negatīvo stafilokoku celmi iegūti, sadarbojoties ar P. Stradiņa Klīnisko universitātes slimnīcu, RAKUS klīniku „Gaiļezers” un Traumatoloģijas un ortopēdijas slimnīcas bakterioloģiskajām laboratorijām. DNS izdalīšana, PCR un sekojošas analīzes tika veiktas LU Bioanalītisko metožu laboratorijā un Latvijas Infektoloģijas centra Mikobakterioloģijas nodaļas laboratorijā. Invazīvo paraugu grupā iekļauti stafilokoku celmi, kas izolēti no operāciju un brūču, kā arī asins bakterioloģiskajiem uzņēmumiem. Kontroles grupas celmi tika iegūti, ņemot iztriepes no deguna veseliem cilvēkiem.

Mikroorganismu identifikācijas testi

Koagulāzes negatīvo stafilokoku identificēšanai tika lietota *BBL™ Crystal™* identifikācijas sistēma (*Beckton, Dickinson and Company, ASV*). Mikroorganismi tika izolēti no Triptona sojas agara (*Oxoid CM0131*) ar 5% asins piedevu saskaņā ar standarta mikrobioloģisko tehnoloģiju. Identifikācijas sistēmās tika izmantoti standartizēti un miniaturizēti fermentatīvi testi, kā arī speciāli adaptēta datubāze. *BBL™ Crystal™* ir miniaturizēta 18 stundu identifikācijas metode, kurā tiek lietoti fluorogēnie un hromogēnie substrāti. Reakciju interpretācijai izmantoja krāsu karti, lai varētu izveidot profila skaitli. Iegūto profila skaitli un šūnu morfoloģijas datus ievadīja datorā, kurā instalēta *BBL Crystal ID* sistēmas elektroniskā datubāze, lai varētu identificēt izdalīto stafilokoku sugu.

Mikroorganismu antibiotiskās jutības noteikšana

Izmantota *Bauer-Kirby* metode, kas ir aprakstīta ASV Nacionālās komitejas klīnisko laboratoriju standartā (3). Metodes pamatā ir pretmikrobu aģenta, ar kuru piesātināts papīra disks, difūzija agara gelā. Testēšanai tika lietots *Mueller-Hinton* agars.

Disku difūzijas tests

Baktēriju suspensiju tika gatavota tieši no kolonijas fizioloģiskajā šķīdumā. Šim nolūkam izmanto kolonijas, kas augušas 18 līdz 24 stundas uz neselektīva agara plates. Suspensijas blīvums tiek mērīts vai salīdzināts ar 0,5 *McFarland* standartu. Lai standartizētu jutības testam nepieciešamā inokulāta blīvumu, tiek lietotas automātiskās ierīces, kas paredzētas baktēriju blīvuma noteikšanai mēģenē ar šķidru vidi. Iegūtā blīvuma rezultāts ir izteikts *McFarland* vienībās.

Diski 6 mm diametrā, kas piesūcināti ar antibakteriālo vielu – cefoksiīnu (30 µg), tika novietoti uz *Mueller Hinton* agara platēm. Agara plates tika inokulētas ar izolēto mikroorganismu tūrkultūrām. Inokulēšanai tika izmantota mikroorganismu suspensija, duļķainība atbilstoši 0,5 *McFarland* standarta vienībām. Plates tika inkubētas 24 stundas 36 °C temperatūrā.

Pēc inkubēšanas tika mērīta inhibīcijas zona. Zona mērāma milimetros, par zonas robežu uzskata nepārprotami redzamo inhibīcijas joslas malu. Inhibīcijas zonas tika novērtētas atbilstoši interpretācijas kritērijiem.

DNS izdalīšana

No iegūtajām stafilokoku tīrkultūrām natīvā genomiskā DNS tika izolēta ar standartprocedūru (izmantojot lizocīmu, proteināzi K un N-cetil-N,N,N,-trimetil amonija bromīdu) un izgulsnēta ar izopropanolu. Natīvās DNS paraugi uzglabāti saldētavā – 80 °C temperatūrā.

aap un *icaA* gēna noteikšana ar polimerāzes ķēdes reakciju

Polimerāzes ķēdes reakcija (PCR) *aap* gēnam tika veikta ar šādiem praimeriem: *aap1* (5'-ATA CAA CTG GTG CAG ATG GTT G-3') un *aap2* (5'-GTA GCC GTC CAA GTT TTA CCA G-3').

icaA tika lietoti praimerī: *ica1* (5'-CAC GTG CTC TAT GCT GGA TG-3') un *ica2* (CCG TTG GAT ATT GCC TCT GT 3').

PCR produktu: *aap* gēna 399-bp un *icaA* – 502 bp fragmentu klātbūtne tika analizēta elektroforētiski 1,5% agarozes gelā. Katrā PCR tika iekļauta pozitīvā *S. epidermidis* ATCC 35984 un negatīvā *S. epidermidis* ATCC 12228 kontrole.

mecA gēna noteikšana ar polimerāzes ķēdes reakciju

mecA-PCR tika veikta ar šādiem praimeriem: *mecA1* (5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A) un *mecA2* (5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A). Standarta PCR maisījumam uz 50 µl tika pievienota 20–50 ng DNS un veikta reakcija ar 30 amplifikācijas cikliem, *mecA* gēna 310-bp fragmenta klātbūtni analizēja elektroforētiski 1,5% agarozes gelā. Vizuālai analīzei agarozes gels tika krāsots ar etīdija bromīdu 10–15 minūtes. Lai pārliecinātos par metodes ticamību, katrs paraugs tika analizēts divreiz.

Rezultāti un diskusija

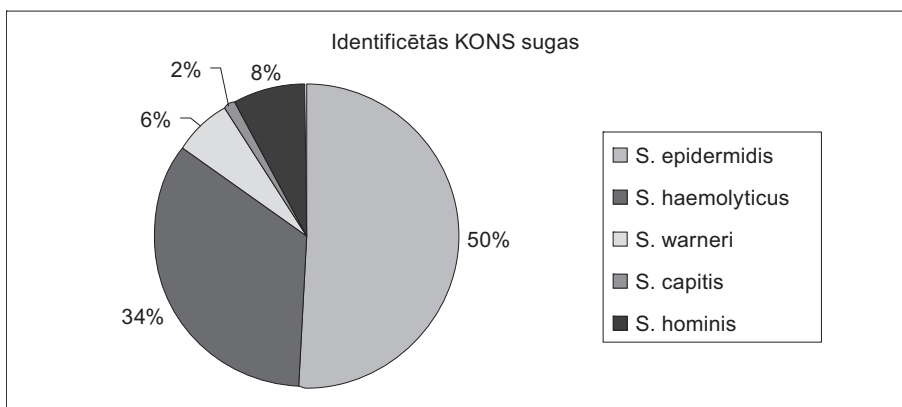
Pētījuma periodā tika ievākti 65 paraugi, no kuriem 41 bija invazīvais paraugs, 24 kontroles paraugi no veselīem pacientiem.

No izdalītajiem 65 KONS paraugiem *S. epidermidis* suga tika identificēta 33 izolātos, *S. haemolyticus* 22, *S. warneri* 4, *S. capitis* 1, *S. hominis* 5 izolātos. Izdalīto celmu mikroorganismi raksturoti fenotipiski, izmantojot mikrobioloģiskās testēšanas *BBL™ Crystal™* identifikācijas sistēmas. Visiem izdalītajiem stafilokoku celmiem noteikta jutība pret metecilīnu, lietojot cefoksiīna disku.

No invazīvajiem paraugiem izdalītā 41 celma rezistence pret metecilīnu konstatēta 34 KONS celmiem (82,9%). Taču, izmantojot PCR un nosakot *mecA* gēnu, vienā gadījumā metecilīna jutīgajam KONS celmam konstatēts *mecA* gēns. Iespējams, tādejādi izpaužas stafilokokiem raksturīgā heterorezistence, kuru grūti identificēt ar fenotipiskām metodēm, bet var skaidri atšķirt ar genotipiskām metodēm.

Invazīvajos paraugos abi *aap* un *ica* gēni detektēti 18 paraugos (43,9%), rezistence pret metecilīnu konstatēta 16 paraugos, divi celmi bija metecilīnjutīgi.

Virulences gēni netika atrasti sešos KONS paraugos (14,6%), metecilīnrezistence bija noteikta piecos gadījumos, un viens stafilokoku celms identificēts kā metecilīnjutīgs.



1. att. Pētījumā identificētās KONS sugas

Fig. 1. Species of CONS identified in this study

Viens no virulences gēniem – *icaA* vai *aap* – tika noteikts: *icaA* sešos paraugos (14,6%), *aap* detektēts 11 paraugos (26,8%).

Aap 11 pozitīvajiem paraugiem, nosakot rezistenci pret meticilīnu, konstatēts, ka meticilīnrezistenti ir deviņi un meticilīnjutīgi ir divi stafilokoku celmi.

IcaA pozitīvajiem paraugiem meticilīna rezistence noteikta pieciem celmiem, meticilīna jutīgs bija viens KONS celms.

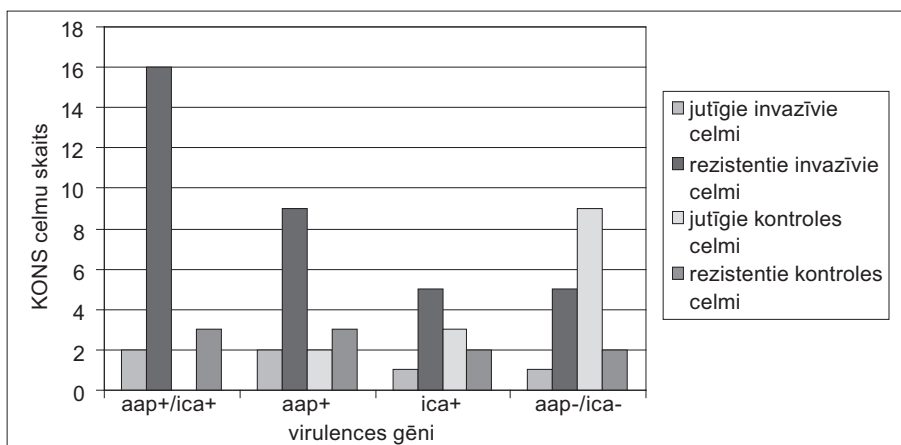
Kontroles grupā abi gēni *aap/icaA* noteikti trijos paraugos (12,5%), šajos paraugos rezistence pret meticilīnu konstatēta visiem KONS celmiem. Kontroles grupā *aap* gēns detektēts piecos paraugos (20,8%). Virulences *icaA* gēns noteikts pieciem stafilokoku celmiem (20,8%).

Pieciem *aap* pozitīvajiem paraugiem, nosakot rezistenci pret meticilīnu, tika konstatēts, ka trīs stafilokoku celmi bija meticilīnrezistenti un divi meticilīnjutīgi.

Pieciem *icaA* pozitīvajiem paraugiem meticilīnrezistence konstatēta divos KONS celmos, bet trīs celmi bija meticilīnjutīgi.

1. tabula. Atrasto *aap* un *ica* gēnu salīdzinājums starp meticilīnjutīgiem un meticilīnrezistentiem KONS izolātiemTable 1. Comparison of *aap* and *ica* genes between methicillin-sensitive and methicillin-resistant CONS isolates

Virulences gēni	Jutīgie invazīvie celmi	Rezistentie invazīvie celmi	Jutīgie kontroles celmi	Rezistentie kontroles celmi
<i>aap+/ica+</i>	2	16	0	3
<i>aap+</i>	2	9	2	3
<i>ica+</i>	1	5	3	2
<i>aap-/ica-</i>	1	5	9	2
Kopā:	6	35	14	10



2. att. KONS paraugos noteikto *aap* un *ica* gēnu dominēšana starp meticilīna rezistentiem paraugiem

Fig. 2. Prevalence of *aap*, *ica* genes determined in methicillin resistant CoNS

Pētījumos par KONS virulences faktoriem tika parādīts (13), ka visaugstākā *icaA* gēna un biofilmas marķiera Aap proteīna prevalence ir kolonizējošos izolātos, lai gan divās trešdaļās paraugu, kuri iegūti, ņemot iztriepes no ādas, arī sastopams viens no šiem gēniem. Pētījumos par *S. epidermidis* celmiem, kuri izdalīti bakterēmiju un septicēmiju gadījumos, parādīts, ka visbiežāk invazīvajos paraugos atrasti abi *aap* un *icaA* gēni kopā.

Vairākos pētījumos konstatēts, ka nepatogēnajiem celmiem atšķirībā no patogēnajiem nav *icaA* gēnu.

Apkopojot zinātnisko publikāciju informāciju, jāsecina, ka rezultāti ne vienmēr ir liecinājuši par virulences gēnu klātbūtnes specifiskumu un klīnisko nozīmīgumu.

Secinājumi

Analizējot pētījuma rezultātus, var secināt, ka virulences faktoru – *aap* un *icaA* gēna – klātbūtne invazīvajos paraugos ir biežāka. Abu *aap/ica* gēnu esamība meticilīna jutīgajos kontroles grupas celmos netika konstatēta. Pārbaudot jutību pret meticilīnu, var secināt, ka invazīvie celmi visbiežāk ir rezistenti pret meticilīnu, un to apstiprina arī citu pētījumu rezultāti. Invazīviem KONS paraugiem ir raksturīga polirezistence, un precīza identificēšana klīnikās ir ļoti nozīmīga.

Koagulāzes negatīvo stafilokoku virulences pētījumi Latvijā ir sākumstadijā, un iesāktais darbs tiks turpināts, lai izpētītu, kādi faktori veicina KONS spēju veidot biofilmas un to saistību ar rezistences īpašībām. Turpmākiem pētījumiem būs iekļauti papildus *S. epidermidis* paraugi, kuri tiks izdalīti ar katetru un citu invazīvo ierīču lietošanu saistīto infekciju gadījumos. No veselīgiem cilvēkiem iegūtie KONS paraugi tiks analizēti, lai varētu izprast situāciju par virulento un rezistentu stafilokoku nēsāšanu sabiedrībā. Ir svarīgi noteikt kritērijus, kas ļautu atšķirt kolonizējošos celmus no klīniski nozīmīgiem virulentiem KONS celmiem.

Pateicība

Autores izsaka pateicību par sadarbību LU Bioanalītiskās laboratorijas vadītājam Dr. biol. Jānim Ancānam un LIC Mikobakterioloģijas nodaļas vadītājam Ģirtam Šķenderam.

Literatūra

1. Amita Jain, Jyotsna Agarwal and Seema Bansal. Prevalence of methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci in neonatal intensive care units: findings from a tertiary care hospital in India. *J. Med Microbiol*, 2004, 53: 941–944.
2. Bogado E, Sutich A, Krapp P, Marchiaro M, Marzi J, Putero & N. Carrillo. Methicillin resistance study in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci and determination of their susceptibility to alternative antimicrobial agents. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 2: 344–350.
3. CLSI 2007 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Tenth informational supplement (aerobic dilution), M100-S17 Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
4. Fitzpatrick F, Humphreys H, O’Gara JP. The genetics of staphylococcal biofilm formation. *J. Clin. Microbiol. Inf. Dis.*, 2005, 11: 967–973.
5. Fitzpatrick F, Humphreys H, Smyth E, Kennedy CA, O’Gara JP. Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of hospital infection*, 2002, 52(3): 212–8.
6. James P, O’Gara, Hilary Humphreys. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications *Journ. Med. Microbiol*, 2001, Vol. 50: 582–587.
7. Rogers KL, Rupp ME, and Fey PD. The Presence of *icaADBC* Is Detrimental to Colonization of Human Skin by *Staphylococcus epidermidis*. *Appl Environ. Microb.*, October 2008, 74(19): 6155–6157.
8. Kok-Fai Kong, Cuong Vuong, Michael Otto. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection *Journal of Clinical Microbiology*, February 2006, Vol. 296, Issues 3: 57–170.
9. Mack D, Rohde H, Harris LG, Davies AP, Horstkotte MA, Knobloch J. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int. J. Artif. Organs*, 2006, 29: 343–359.
10. Maria Miragaia et al. Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Clones: Evidence of Geographic Dissemination *Journal of Clinical Microbiology*, February 2002, Vol. 40, No. 2: 430–438.
11. Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA. Induction of *staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.*, 2005, 55: 1883–1895.
12. Stevens NT, Tharmabala M, Dillane T, Greene CM, O Gara JP. Biofilm and the role of the *ica* operon and *aap* in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing neurosurgical meningitis. *J. Clin. Microb. Inf. Dis.*, 2008, 14: 716–730.
13. Vandecasteele SJ, Peetermans WL, Merckx R, Rijnders BJA, van Eldere J. Reliability of the *ica*, *aap* and *atIE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. *J. Clin. Microb. Inf.*, 2003, 9: 114–119.
14. Zilevica A, Tracevska T, Vingre I, Pabērza R. Identification of methicillin resistance in staphylococci. *Acta Universitatis Latviensis*, 2004, 668.

15. Zilevica A., Vingre I. Update in staphylococcal infections. LU Zinātniskie raksti, IV (I), 2001, 151–159.
16. Tračevska T., Žilēvica A., Baumanis V. Stafilokoku molekulārā diagnostika. LU 62. zin. konference, medicīnas sekcija, 6/02/04. Rīga, LU, LEKMI, 67. 1pp.

Summary

Coagulase negative Staphylococci (CoNS), particularly the S. epidermidis and S. haemolyticus, have emerged as important cause of nosocomial infections in recent twenty years. CoNS are the opportunistic pathogens which colonize and infect both hospitalized patients with decreased host response and healthy, immuno-competent people in the community. The pathogenity of CoNS, which have been regarded for a long time as relatively innocuous inhabitants of the human skin, is mainly due to ability to form biofilms on indwelling medical devices. Up to now, the molecular basis of virulence in CoNS is not well understood. This study reveals that two genes, namely aap and icaA, involved in formation of quorum-sensing system, are mostly prevalent in invasive CoNS (43,9%), than in control group (12,5%). Our preliminary data indicates for potential role for combination of two gene icaA/aap for predicting invasiveness of CONS strains. We suppose that detection of colonization by icaA⁺/aap⁺ strains could help to evaluate the potential risk of infection by CoNS.

Keywords: *Coagulase negative staphylococci, virulence factors, methicillin resistance.*