

Virulence factors in *P. aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients

Giovanna Pulcrano, Francesco Antonio Blasio, Dimitrios Panellis, Nunziata Ciccone, Vita Dora Iula, Mariassunta Del Pezzo, Maria Rosaria Catania, Fabio Rossano

Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "Luigi Califano", Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli "Federico II"

Key words: pili, biofilm, alginate, cystic fibrosis

Studio sui fattori di virulenza di ceppi di *P. aeruginosa* isolati da espettorati di pazienti affetti da fibrosi cistica

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is the major pulmonary pathogen that causes morbidity and mortality in burned, immunocompromised and cystic fibrosis patients. Among the various virulence factors, type IV-pili, flagella, biofilm formation and alginate production play a major role in pathogenicity of bacteria. The aim of our work is the study of these virulence factors in 14 *P. aeruginosa* strains with different phenotype chosen in the same sputum or in sputa collected in subsequent time of Cystic Fibrosis patients.

La fibrosi cistica (FC), è una malattia genetica autosomica recessiva a interessamento multiorganico causata da una mutazione nel gene CFTR che causa un'alterazione nel trasporto di sali con aumento della viscosità delle secrezioni (muco, sudore, saliva, sperma, etc.); tali secrezioni, ristagnando, occludono i dotti con progressivo danno agli organi interessati (4). L'organo maggiormente colpito è il polmone, dove queste secrezioni formano delle vere e proprie "placche" mucosali, nelle quali possono penetrare batteri in fase mobile causando infezioni respiratorie ricorrenti (7).

L'infezione da parte di *P. aeruginosa* subentra in età adolescenziale, inizialmente ad opera di ceppi ambientali che, con caratteristiche genotipiche e fenotipiche differenti, possono colonizzare contemporaneamente il polmone FC. La persistenza di *P. aeruginosa* nel polmone FC è legata all'espressione da parte del germe di alcuni fattori di virulenza, tra cui diverse proteasi e pigmenti solubili e insolubili, la presenza di uno o più flagelli polari, la produzione di esopolisaccaride esterno (alginato) e la capacità di formare biofilm (2, 5).

L'obiettivo del nostro lavoro è stato studiare alcuni di questi fattori di virulenza in ceppi di *P. aeruginosa* isolati dagli espettorati di pazienti affetti da FC, esaminando per ogni paziente coppie di isolati indistinguibili genotipicamente, ottenuti a distanza di alcuni mesi oppure che persistessero nel polmone nello stesso periodo di tempo ma con morfologia evidentemente differente, allo scopo di verificare variazioni nell'espressione dei fattori di virulenza all'interno della coppia.

Lo studio è stato effettuato su 14 ceppi (7 rugosi e 7 mucoidi) di *P. aeruginosa*, isolati e conservati presso l'Area Funzionale di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico "Federico II" di Napoli. L'identificazione degli isolati è stata ottenuta in base a test biochimici effettuati dal sistema automatico VitekII (bioMérieux). Il DNA di ciascun ceppo è stato isolato e sottoposto ad amplificazione con primers che, amplificando regioni genomiche di lunghezza variabile comprese tra i siti di inserzione delle sequenze ERIC, evidenziassero *patterns* di amplificazione unici per ogni ceppo (ERIC-PCR).

La funzionalità di pili e flagelli è stata evidenziata con lo studio della mobilità su agar all'1% (*twitching*) e 0.3% (*swimming*) rispettivamente. La capacità di formare bio-

film è stata saggiata con un metodo colorimetrico su micropietra (3). Infine per tutti i ceppi in analisi è stata saggiata l'antibiotico-sensibilità con metodi Kirby-Bauer.

Sette coppie di ceppi di *P. aeruginosa* isolati da espettorati di pazienti FC sono stati sottoposti ad estrazione del DNA e genotipizzazione mediante ERIC-PCR. Come è evidente dalla Figura 1, i pattern elettroforetici sono identici in cinque coppie di isolati (1, 2, 4, 6 e 7); nella coppia 5 i pattern differiscono per una sola banda di amplificazione di circa 1200 pb, presente solo nel ceppo mucoide; nella coppia 3 l'isolato mucoide presenta una banda elettroforetica aggiuntiva di circa 400 bp mentre l'isolato rugoso presenta delle bande aggiuntive ad alto peso molecolare.

Dei quattordici ceppi in analisi è stato analizzato il pattern di sensibilità a sette antibiotici di classi diverse, la funzionalità di flagelli e pili e la capacità di formare biofilm. I risultati sono riportati in Tabella 1. Sono state ritrovate coppie in cui la variazione di fenotipo rugoso/mucoide si accompagna ad una variazione della mobilità legata a pili o flagelli e coppie per cui non si verifica questo fenomeno. Anche la variazione della capacità a formare biofilm e della chemiosensibilità interessano solo alcune coppie. In tutti i casi la variazione di un fattore di virulenza non è necessariamente collegata a

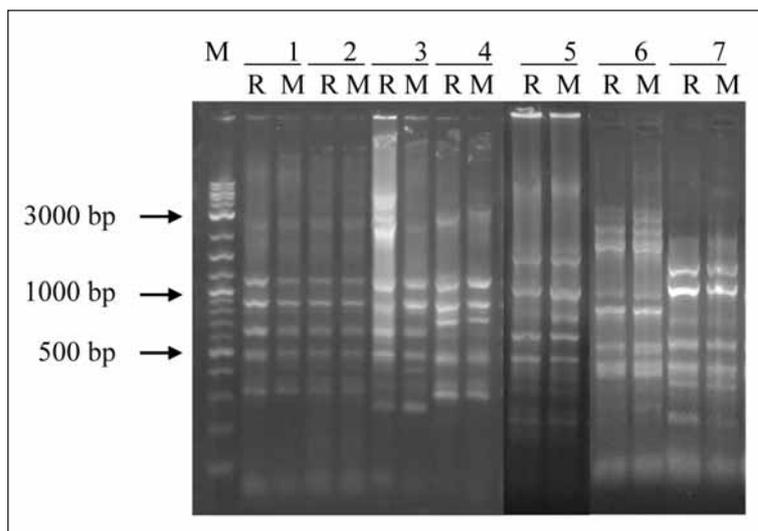


Figura 1. Elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di amplificazione dopo ERIC-PCR. I numeri progressivi sono identificativi dei pazienti, le sigle R e M indicano l'isolato rugoso e mucoide per ogni coppia. M: Marker 2-log ladder (New England Biolabs).

Corresponding author: Giovanna Pulcrano

Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano" - Facoltà di Medicina e Chirurgia - Università di Napoli "Federico II"
80131 Napoli - Via Pansini n°5 - Tel. 081/7462530 - Fax 081/7462530
E-mail: giovannapulcrano@libero.it

variazione degli altri.

P. aeruginosa è un tipico patogeno opportunisto, che ha la capacità di adattarsi a numerose nicchie ambientali e di infettare diversi ospiti. La sua attività patogena è dovuta a numerosi fattori di virulenza. Non sono state evidenziate differenze in questi fattori fra specie cliniche e ambientali, suggerendo così che qualsiasi ceppo è capace di infettare un ospite o colonizzare un ambiente a seconda delle circostanze (1, 6). In questo lavoro sono stati analizzati ceppi di *P. aeruginosa* responsabili di infezioni ricorrenti in pazienti affetti da fibrosi cistica. In tutti i pazienti analizzati, le coppie di isolati confrontati sono risultati essere geneticamente indistinguibili,

mentre i fattori di virulenza analizzati hanno mostrato solo per poche coppie di isolati una differenza evidente tra l'isolato a fenotipo rugoso e quello a fenotipo mucoide; inoltre tutte queste variazioni non erano strettamente legate tra loro. Si può concludere che le differenze osservate tra isolato rugoso e isolato mucoide ottenuti in tempi successivi dall'espettorato dello stesso paziente potrebbero essere il frutto di adattamenti a variazioni avvenute nel tempo delle condizioni dell'habitat polmonare. Al contrario le differenze degli isolati ottenuti dal medesimo espettorato potrebbero essere correlate a mutazioni genetiche non evidenziabili con metodiche di genotipizzazione.

Tabella I. Tabella riassuntiva dei fattori di virulenza testati per i ceppi in analisi. Per il biofilm le sigle indicano: poco aderente (PA), moderatamente (MA) o fortemente aderente (FA). Per l'antibiotico-sensibilità: ATM: aztreonam; FEP: cefepime; CAZ: ceftazidim; CIP: ciprofloxacina; TZP: piperacillina-tazobactam; NET: netilmicina; AMK: amikacina.

Paziente	Morfologia	Swimming	Twitching	Biofilm	ATM	FEP	CAZ	CIP	TZP	NET	AMK
1	R	13 mm	6 mm	M.A	S	S	S	S	S	S	R
1	M	15 mm	6 mm	M.A	S	S	S	S	S	S	R
2	R	6 mm	5 mm	P.A	S	S	S	S	S	S	R
2	M	6 mm	12 mm	M.A	S	S	S	S	S	S	R
3	R	18 mm	7 mm	P.A	R	I	R	S	S	R	R
3	M	18 mm	7 mm	M.A	I	I	R	S	S	R	R
4	R	40 mm	10 mm	M.A	S	S	S	S	I	R	S
4	M	100 mm	8 mm	P.A	S	S	S	S	I	S	S
5	R	40 mm	12 mm	F.A.	S	S	S	S	I	R	R
5	M	100 mm	14 mm	F.A.	S	S	S	S	S	R	R
6	R	25 mm	10 mm	P.A	R	R	R	R	R	R	R
6	M	25 mm	10 mm	M.A	R	R	R	R	R	R	R
7	R	100 mm	10 mm	P.A	S	S	S	S	S	S	R
7	M	100 mm	20 mm	P.A	S	R	S	S	R	R	S

BIBLIOGRAFIA

- Høiby N, Frederiksen B, Pressler T. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Cyst Fib* 2005; Suppl. 2: 49-54.
- Mattich JS. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 289-314.
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 2008; 72: 157-65.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-73.
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 2002; 184: 1140-54.
- Sener B, Köseoglu O, Özçelik U, Kocagöz T, Günalp A. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Int J Med Microbiol* 2001; 291: 387-93.
- Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting G. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular basis of inherited diseases, 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001; 5121-88.