

IDENTIFICAREA RAPIDĂ A TULPINILOR METICILINO-REZISTENTE ALE GENULUI STAPHYLOCOCCUS CU AJUTORUL TEHNICILOR MOLECULARE

M. COLCIERU¹, E. JAKAB², O. POPESCU³

¹Spitalul General C.F. Sibiu, ^{2,3}Universitatea "Babeş-Bolyai" Cluj-Napoca

Cuvinte cheie: MRSA – methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*, MRSS - methicillin-resistant *Staphylococcus strains*, MSSA - methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSS - methicillin-susceptible *Staphylococcus strains*, PCR - polymerase chain reaction, tulpină, genă

Keywords: MRSA - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSS- methicillin-resistant *Staphylococcus strains*, MSSA- methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSS - methicillin-susceptible *Staphylococcus strains*, PCR-polymerase chain reaction, strain, gene.

Rezumat: Infecțiile nozocomiale sunt o problemă serioasă în cele mai multe țări. *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA) reprezintă unul din cei mai incriminați germeni. Bineînțeles există metode clasice pentru determinarea susceptibilității la meticilină dar expresia fenotipică a acestei rezistențe deseori reprezintă un caracter heterogen. (1) S-a efectuat un test de determinare simultană a rezistenței la meticilină și confirmarea speciei cu ajutorul tehnicii duplex PCR *mecA/nucA* (2). Gena *mecA* codifică proteina de legare a penicilinei 2a (PBP2a) care este caracteristică pentru stafilococii rezistenți la meticilină (3). Gena *nucA* codifică nucleaza termostabilă de la *Staphylococcus aureus*, fragmentul amplificat fiind caracteristic tulpinilor de *S. aureus* (4). Amorsele oligonucleotidice folosite pentru amplificarea fragmentelor generează în final pentru gena *mecA* un produs de reacție de 533 pb, iar pentru gena *nucA* un produs de aproximativ 279 pb, vizualizați cu ajutorul electroforezei în gel de agaroză. Tehnica duplex PCR *mecA/nucA* a fost aplicată pe un lot de 93 de tulpini de stafilococ. Această metodă permite identificarea tulpinilor MRSA în aproximativ 18 ore.

Abstract: Nosocomial infections cause serious problems in most countries. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the most incriminated germs. Of course there are traditional methods for determining susceptibility to methicillin, but the phenotypic expression of this resistance often shows a heterogeneous nature. (1) We tested the methicillin resistance and confirmed the strain using *mecA/nucA* duplex PCR technique (2). The *mecA* gene encodes the penicillin binding protein 2a (PBP2a) that is characteristic to methicillin-resistant staphylococci (3). The *nucA* gene encodes a thermostable nuclease. The amplified fragment is unique to the *S. aureus* strains (4). The size of the amplified product was 533 bp in the case of the *mecA* gene, respectively 279 bp for the *nucA* gene. The amplified products were separated by agarose gel electrophoresis. A total of 93 staphylococcus strains were tested using the *mecA/nucA* duplex PCR technique. The genotypic duplex PCR method lasts maximum 18 hours.

INTRODUCERE

Infecțiile nozocomiale sunt o problemă serioasă în cele mai multe țări. *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA) reprezintă unul din cei mai incriminați germeni. Bineînțeles există metode clasice pentru determinarea susceptibilității la meticilină dar expresia fenotipică a acestei rezistențe deseori reprezintă un caracter heterogen.

SCOPUL STUDIULUI

Scopul studiului este de a demonstra posibilitatea identificării timpurii a tulpinilor rezistente la meticilină prin tehnica duplex PCR *mec A/nuc A*.

MATERIAL ȘI METODĂ

Tulpinile bacteriene și condițiile de cultură

Tulpinile bacteriene au fost izolate în Sibiu în perioada 16.07.2008 - 10.07.2009. Ele au fost identificate prin metode clasice: culturi bacteriene, teste biochimice și efectuarea antibiogramelor. Produsele patologice din care provin probele sunt variate: secreții din plagă, secreții otice, secreții conjunctivale, secreții nazale, secreții uretrale, exudat faringian etc.

Probele oligonucleotidice

Amorsele oligonucleotidice folosite pentru tehnica PCR au fost pentru gena *mecA*: MecA₁-5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC complementar

nucleotidelor 1282 până la 1303 și MecA₂-5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC complementar nucleotidelor 1793 până la 1814. (3) Pentru gena *nucA* secvența celor două amorse de 21 respectiv 24 baze azotate este: NucA₁-5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT și NucA₂-5'-AGCCAAGCCTTGACGAAGTAAAGC. Amorsele au fost localizate printre cele 447 perechi de baze ale genei *nucA* ce codifică nucleaza termostabilă A; amorsa 1 se situează între nucleotidele +49 și +69, iar amorsa 2 între poziția +304 și +327. Astfel se amplifică un fragment de 279 pb (4). Ambele perechi de amorse au fost sintetizate la Institutul de Cercetări Biologice al Academiei Maghiare de Științe, Szeged, Ungaria.

Prepararea probelor bacteriene pentru PCR

Pentru determinările directe din culturi au fost folosite suspensii bacteriene obținute prin adăugarea unei colonii bacteriene în 15 μl apă pură. După testarea tuturor tulpinilor au fost selecționate tulpinile rezistente la meticilină, pentru care s-a trecut la izolarea ADN-ului și repetarea amplificării. Tamponul de liză conține lizostafină 0,2 mg/ml, Tris/HCl 20 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 1% la pH 8 (5). Ulterior se adaugă proteinaza K și se trece la izolarea și purificarea propriu-zisă folosind kit-ul comercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germania).

Tehnica PCR

Amestecul PCR conține: TP 5x concentrat Green,

¹Autor Corespondent: M. Colcieru, Spitalul General C.F. Sibiu, str. C-tin Noica nr. 20, Sibiu, România, e-mail: mcolcieru@yahoo.com_@yahoo.com, tel +40-0723 809490

ACTA MEDICA TRANSILVANICA Martie 2010; 2(1):72-74

ASPECTE CLINICE

MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM (pentru fiecare dezoxiribonucleotid-trifosfat), amorsă NucA₁ 1 μM, amorsă NucA₂ 1 μM, amorsă MecA₁ 1 μM, amorsă MecA₂ 1 μM, 1,25 U polimerază GoTaq® Flexi, 10 μl colonii suspendate sau soluție cu 100 ng ADN și apă ultrapură/UV (Purelab Ultra Genetic, ELGA LabWater, High Wycombe, Marea Britanie) până la un volum final de 50 μl. ADN polimeraza, tamponul și clorura de magneziu sunt furnizate în kit-ul comercial GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, SUA). Amestecul de dNTP provine de la același producător. Pentru amplificarea probelor se utilizează aparatele PCR Mastercycler® și Mastercycler® EP gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germania). Programul folosit pentru aceste aparate a fost: denaturare inițială 5 minute la 94°C, denaturare 30 secunde la 92°C, aliniere 30 secunde la 56°C, elongare 90 secunde la 72°C, 5 minute la 72°C. Etapele 2-4 se repetă de 30 de ori (6).

Electroforeza produsilor de amplificare

Pentru separarea fragmentelor amplificate prin duplex PCR au fost folosite: cuva CONSORT H₁-SET cu distanța între electrozi de 10 cm și cuva CONSORT H_U-10 cu distanța între electrozi de 15 cm. Sursa a fost de tip CONSORT E 835, cu voltaj aplicat de 52 V, respectiv 80 V pentru cuva mare. S-au turnat 50 ml sau 90 ml gel de agaroză 1% (Promega Corporation, Madison, SUA). S-au încărcat în godeuri câte 10 μl amestec PCR alături de markeri de greutate moleculară Generuler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Lituania) sau 1 kb DNA Ladder (Axigen Biosciences, Union City, SUA).

REZULTATE

Tehnica duplex PCR, *mecA/nucA* a fost aplicată celor 93 de tulpini, iar 21,5% dintre acestea au fost *mecA* pozitive; 33,33% din totalul tulpinilor testate au fost pozitive pentru gena *nucA* fiind astfel considerate tulpini de *Staphylococcus aureus*. Restul tulpinilor *nucA* negative sunt reprezentate de alte tulpini de stafilococi coagulazo-negativi sau pozitivi (tabelul nr. 1).

Tabelul nr. 1. Numărul de tulpini și ponderea acestora în funcție de prezența sau absența genelor *mecA/nucA*

| NR. CRT. | CARACTERIS TICA | NR. TULPINI | PONDER E % |
|----------|---------------------------------------------------|-------------|------------|
| 1 | <i>mecA</i> ⁺ | 20 | 21,50 |
| 2 | <i>mecA</i> ⁻ | 73 | 78,50 |
| 3 | <i>nucA</i> ⁺ | 31 | 33,33 |
| 4 | <i>nucA</i> ⁻ | 62 | 66,66 |
| 5 | <i>mecA</i> ⁺ <i>nucA</i> ⁺ | 6 (MRSA) | 6,45 |
| 6 | <i>mecA</i> ⁺ <i>nucA</i> ⁻ | 14 (MRSS) | 15,05 |
| 7 | <i>mecA</i> ⁻ <i>nucA</i> ⁺ | 25 (MSSA) | 26,88 |
| 8 | <i>nucA</i> ⁻ <i>nucA</i> ⁻ | 48 (MSSS) | 51,61 |

După testarea tuturor tulpinilor s-au selectat tulpinile rezistente la meticilină, respectiv tulpinile 1, 8, 9, 15, 20, 25, 26, 27, 33, 47, 51, 54, 55, 60, 66, 68, 69, 89, 92 și s-a efectuat izolarea și purificarea ADN în vederea retestării prin aceeași metodă. Tulpinile cu numărul 73, 75, 77, deși reprezintă tulpini de interes, nu au crescut în cultură pentru a putea fi testate și prin această metodă.

Calcularea concentrației de ADN

În lucrarea de față a fost folosit spectrofotometrul automat NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, SUA) cu ajutorul căruia au fost analizate cele 19 probe. Raportul absorbanțelor și concentrația ADN-ului exprimată în ng/μl au fost sintetizate în tabelul nr. 2.

După izolarea și purificarea ADN-ului genomic, se procedează la amplificare prin metoda duplex PCR *mecA/nucA* în aceleași condiții (Figura 1 și 2). Tulpina cu numărul 47 este MRSA. Se poate observa prezența produsilor de amplificare atât pentru gena *mecA* (533 pb) cât și pentru *nucA* (270 pb). O altă

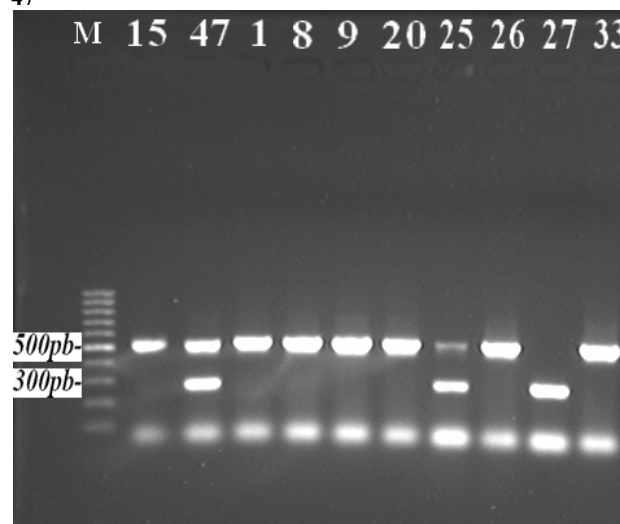
tulpină de interes este cea cu numărul 25 pentru care inițial nu a fost semnalată prezența amplificării pentru gena *mecA*. De această dată se poate observa o bandă corespunzătoare genei *mecA* de aproximativ 533 pb, dar nu la fel de intensă ca în cazul tulpinii 47.

Cel mai probabil, în cazul tulpinii 25 este vorba despre un caracter de heterogenitate al rezistenței la meticilină. De asemenea, tulpina cu numărul 66 este MRSA. Pentru restul tulpinilor, respectiv 1, 8, 9, 15, 20, 26, 33, 51, 54, 55, 68, 69, 89 se poate observa amplificarea fragmentului de aproximativ 533 pb corespunzător genei *mecA* și de aceea pot fi considerate tulpini MRSS.

Tabelul nr. 2. Măsurarea concentrației ADN-ului cu NanoDrop ND-1000

| NR. CRT. | PROBA | 260NM/280NM | 260NM/230NM | NG/M L |
|----------|-------|-------------|-------------|--------|
| 1 | 1 | 2,02 | 1,93 | 45,6 |
| 2 | 8 | 1,91 | 2,21 | 98,3 |
| 3 | 9 | 1,94 | 1,98 | 90,6 |
| 4 | 15 | 1,87 | 1,97 | 97 |
| 5 | 20 | 2,06 | 2,36 | 101,2 |
| 6 | 25 | 1,98 | 2,36 | 109,6 |
| 7 | 26 | 1,98 | 1,88 | 68,8 |
| 8 | 27 | 2,19 | 2,47 | 797 |
| 9 | 33 | 1,94 | 2,49 | 290,8 |
| 10 | 47 | 2,04 | 2,43 | 350 |
| 11 | 51 | 2,11 | 2,17 | 245,5 |
| 12 | 54 | 2,05 | 2,37 | 200,8 |
| 13 | 55 | 2,14 | 2,37 | 258,5 |
| 14 | 60 | 2,1 | 2,41 | 558,6 |
| 15 | 66 | 2,02 | 2,29 | 108,8 |
| 16 | 68 | 2,06 | 2,36 | 162,6 |
| 17 | 69 | 2,18 | 2,3 | 178,3 |
| 18 | 89 | 2,01 | 2,14 | 42,8 |
| 19 | 92 | 2,08 | 2,25 | 72,5 |

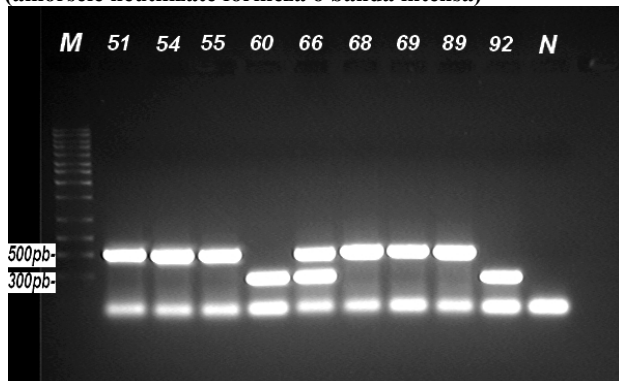
Figura nr. 1. Electroforeza în gel de agaroză a produsilor de amplificare pentru tulpinile 1, 8, 9, 15, 20, 25, 26, 27, 33, și 47



Identificarea timpurie a tulpinilor rezistente la meticilină permite implementarea strategiilor de prevenție și control cu reducerea totală a costurilor în cazul infecțiilor stafilococice.

Procedurile standard de microbiologie clinică întâmpină cel mai frecvent dificultăți în identificarea tulpinilor MRSA, mai ales dacă rezistența la meticilină reprezintă un caracter heterogen. Durata acestor tehnici este de cel puțin 2-3 zile.

Figura 2. Electroforeza în gel de agaroză a produșilor de amplificare pentru tulpinile 51, 54, 55, 60, 66, 68, 69, 89, și 92; ultima poziție corespunde controlului negativ notat cu N (amorsele neutilizate formează o bandă intensă)



CONCLUZII

Metoda duplex PCR *mecA/nucA* permite identificarea rapidă a tulpinilor rezistente la meticilină și mai ales a tulpinilor MRSA în maximum 18 ore.

Specificitatea amorselor folosite pentru tehnica PCR conferă metodei sensibilitate și o foarte bună aplicabilitate pentru scopul propus.

BIBLIOGRAFIE

1. Hartman BJ, Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986 Jan;29(1):85-92.
2. Geha DJ, Uhl JU, Gustaferrero CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994 Jul;32(7):1768-1772.
3. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol* 1991 Oct;29(10):2240-2244.
4. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of *nuc* gene. *J Clin Microbiol* 1992 Jul;30(7):1654-1660.
5. Nucleospin tissue DNA purification kit (user manual). Düren (Germany): Macherey-Nagel; 2009.
6. Jakab E, Popescu O. Identificarea directă a tulpinilor de *Staphylococcus aureus* rezistente la meticilină prin amplificarea genelor *mecA* și *nucA*. *Analele SNCB* 2005;10(1):331-335.