

**Συγκριτική λοιμογόνος ικανότητα ευαίσθητων  
και πολυανθεκτικών στελεχών  
*Pseudomonas aeruginosa*  
*In vitro* και *in vivo* μελέτη**

**ΣΚΟΠΟΣ** Η σύγκριση της λοιμογόνου ικανότητας ανάμεσα σε ευαίσθητα και πολυανθεκτικά στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Επιλέχθηκαν 8 ευαίσθητα και 12 πολυανθεκτικά στελέχη, όλα γενετικά διακριτά, όπως καθορίστηκε μετά από ηλεκτροφόρηση του ολικού DNA τους σε εναλλασσόμενο πεδίο. Μελετήθηκε η απελευθέρωση ελαστάσης και ενδοτοξινών με χρωματομετρική μέθοδο, ενώ ενοφθαλμια λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης κάθε στελέχους προστέθηκε σε καλλιέργεια ανθρώπινων μονοκυττάρων. Οι συγκεντρώσεις του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) και των ιντερλευκινών IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 και IL-12 προσδιορίστηκαν στο υπερκείμενο των καλλιεργειών με EIA, της μαθηματικής διαλυθείδος (MDA) με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος και της προκαλσιτονίνης με ανοσοχημειοφωταύγεια. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η επιβίωση σε 20 αρουραίους, από τους οποίους ενέθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε 10 ευαίσθητο και σε 10 πολυανθεκτικό στέλεχος. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Σημαντική διαφορά διαπιστώθηκε στην παραγωγή MDA, IL-1β και IL-6 από τα μονοκύτταρα μετά από διέγερση από τα ευαίσθητα, συγκριτικά με τα πολυανθεκτικά στελέχη. Αν και ανάλογες διαφορές βρέθηκαν για την ελαστάση, τον TNF και την IL-8, αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Σε κανένα από τα διεγερθέντα κύτταρα δεν διαπιστώθηκε παραγωγή IL-10 και IL-12, ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές στην παραγωγή της προκαλσιτονίνης. Η μέση ( $\pm$ SE) επιβίωση των ζωικών προτύπων, στα οποία ενοφθαλμίστηκε το ευαίσθητο στέλεχος, ήταν 21,80 ( $\pm$ 7,87) ώρες, ενώ σε αυτά όπου ενέθηκε το πολυανθεκτικό στέλεχος ήταν 61,8 $\pm$ 11,81 ώρες ( $P=0,0065$ ). **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Διαπιστώνεται σημαντική διαφορά στη λοιμογόνο ικανότητα των ευαίσθητων στα αντιμικροβιακά σε σύγκριση με τα πολυανθεκτικά στελέχη *P. aeruginosa*, όπως φαίνεται από τη διαφορά τόσο στην παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών μετά τη διέγερση των ανθρώπινων μονοκυττάρων, όσο και στην επιβίωση των ζωικών προτύπων, συμπέρασμα που ενδέχεται να οδηγήσει σε κλινικούς προβληματισμούς κατά τη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων.

Η *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί παθογόνο μικροοργανισμό που συχνά προσβάλλει ανοσοκατασταλμένους και βαριά πάσχοντες ασθενείς. Είναι αίτιο συστηματικών λοιμώξεων σε ουδετεροπενικούς ασθενείς και σε ασθενείς με κυστική ίνωση, αλλά και συχνό αίτιο νοσοκομειακής σήψης στις μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ).<sup>1</sup> Τα παθογόνα στελέχη της είναι συχνά πολυανθεκτικά και το ποσοστό αντοχής τους στη ΜΕΘ στην Ελλάδα κυμάνθηκε από 47–62% στο πρώτο εξάμηνο του 2002.<sup>2</sup>

Η αντιμετώπιση μιας νοσοκομειακής λοίμωξης από ένα πολυανθεκτικό στέλεχος δημιουργεί στον κλινικό ιατρό πολλαπλά ερωτηματικά για τη λοιμογόνο ικανότητά του και τον τρόπο με τον οποίο αυτό αλληλεπιδρά με τον ξενιστή. Τα ερωτηματικά αυτά αναζητούν καθημερινά επιτακτική απάντηση, καθόσον διαφαίνεται ότι η αντιμετώπιση των λοιμώξεων από πολυανθεκτικά στελέχη προσανατολίζεται στην εφαρμογή ανοσοτροποποίησης, δεδομένου ότι οι θεραπευτικές επιλογές περιορίζονται σε αντιμικροβιακά περιορισμένης βακτηριοκτό-

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2004, 21(3):245–252  
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2004, 21(3):245–252

Δ. Πλαχούρας,<sup>1</sup>  
Ε.Ι. Γιαμαρέλλης-Μπουρμπούλης,<sup>1</sup>  
Β. Κούσουλας,<sup>2</sup>  
Ά. Τζιβρά,<sup>1</sup>  
Ν. Μπολάνος,<sup>3</sup>  
Μ. Ραφτογιάννη,<sup>1</sup>  
Ε. Γαλήνη,<sup>1</sup>  
Ι. Δοντά,<sup>3</sup>  
Α. Διονυσίου-Αστερίου,<sup>2</sup>  
Ε. Γιαμαρέλλου<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Δ' Παθολογική Κλινική,  
<sup>2</sup>Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας,  
<sup>3</sup>Εργαστήριο Πειραματικής  
Χειρουργικής και Χειρουργικής  
Έρευνας, Ιατρική Σχολή,  
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Comparative virulence of  
susceptible and multidrug-  
resistant isolates  
of *Pseudomonas aeruginosa*:  
An *in vitro* and *in vivo* study

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Αντοχή  
Κυτταροκίνες  
Λοιμογονικότητα  
*Pseudomonas aeruginosa*  
Σήψη

Β' Βραβείο  
Επαθλο «Σωτήρης Παπασταμάτης», 2003

νου ικανότητας και υψηλής τοξικότητας, όπως η κολιμικίνη.<sup>3</sup>

Η λοιμογόνος δράση της *P. aeruginosa* αποδίδεται τόσο στην παραγωγή διαφόρων εξωτοξινών (εξωτοξίνη Α, εξωένζυμο S, ελαστάση κ.ά.) όσο και στο λιποπολυσακχαρίτη (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου.<sup>4</sup> Ο λεπτομερής καθορισμός της λοιμογονικότητας δεν βασίζεται μόνο στην παραγωγή εξωτοξινών και ενδοτοξινών από το βακτηριακό κύτταρο, αλλά κυρίως στον τρόπο με τον οποίο το βακτηριακό κύτταρο αλληλεπιδρά με τα κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας του ξενιστή.<sup>5</sup>

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η σύγκριση της λοιμογόνου ικανότητας των ευαίσθητων και των πολυανθεκτικών στα αντιμικροβιακά στελεχών *P. aeruginosa*, σύγκριση για την οποία δεν παρέχονται βιβλιογραφικά δεδομένα. Η σύγκριση αυτή έγινε σε τρία επίπεδα: (α) απελευθέρωση ενδοτοξινών και ελαστάσης από τα στελέχη, (β) ικανότητα διέγερσης των ανθρώπινων μονοκυττάρων για παραγωγή φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών και (γ) μελέτη επιβίωσης σε πειραματικό μοντέλο σήψης σε ινδικά χοιρίδια.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### Στελέχη

Επιλέχθηκαν 20 στελέχη *P. aeruginosa* από κλινικά δείγματα ασθενών (ούρα: 7, πύον: 5, βρογχικές εκκρίσεις/πτύελα: 5, αίμα: 3). Ως πολυανθεκτικά ορίστηκαν τα στελέχη που εκδήλωσαν αντοχή σε 2 ή περισσότερες ομάδες αντιμικροβιακών διαφορετικής χημικής σύνθεσης.<sup>6</sup> Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας τους σε 12 αντιμικροβιακά καθορίστηκε με τη μέτρηση των ελάχιστων ανασταλτικών πυκνοτήτων των αντιμικροβιακών (ΕΑΠ). Οι ΕΑΠ προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο μικροδιάλυσης του αντιμικροβιακού σε τελικό όγκο 0,1 mL με τη χρήση ενοφθαλμίσματος λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης ίσου με  $5 \times 10^5$  cfu/mL. Ως ΕΑΠ ορίστηκε η ελάχιστη πυκνότητα του αντιμικροβιακού που ανέστειλε την ορατή βακτηριακή ανάπτυξη μετά από 18ωρη επώαση στους 35 °C. Τα όρια των ΕΑΠ που αποτέλεσαν κριτήριο αντοχής για τα μελετηθέντα αντιμικροβιακά ήταν: τικαρκιλίνη και πιπερακιλίνη 64 µg/mL, κεφταζιδίμη και κεφεπίμη 8 µg/mL, ιμιπενέμη και μεροπενέμη 4 µg/mL, σιπροφλοξασίνη 2 µg/mL, γενταμικίνη και τομπραμυκίνη 4 µg/mL και αμικασίνη 16 µg/mL.<sup>7</sup>

Για τον καθορισμό της γενετικής διακρίσιμότητας των στελεχών έγινε ηλεκτροφόρηση του ολικού DNA κάθε στελέχους σε εναλλασσόμενο πεδίο (PFGE).<sup>8</sup> Σε συντομία, μετά από λύση του βακτηριακού κυττάρου με ακτινοβολία με υπερήχους και απομόνωση του ολικού DNA, έγινε πέψη του DNA με την ενδονουκλεάση περιορισμού *SpeI* και ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 1,5% σε τάση 200 Volt σε θερμοκρασία 12 °C σε

δύο φάσεις διάρκειας 15 και 23 ωρών, αντίστοιχα, σε συσκευή Gene Navigator (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

### Προσδιορισμός ελαστάσης και ενδοτοξινών (LPS)

Η δραστηριότητα της ελαστάσης προσδιορίστηκε με χρωματομετρική μέθοδο με υπόστρωμα ελαστίνης συνδεδεμένης με ερυθρό του Congo (Elastin-Congo red, Sigma, St. Louis, USA).<sup>9</sup> Λεπτομερέστερα, αποικίες των στελεχών επώαστηκαν επί 15 ώρες σε θρεπτικό ζωμό Mueller-Hinton (Oxoid, London, UK) εμπλουτισμένο με 5% πεπτόνη (Difco, London, UK) και 0,25% Tryptycase soy broth (Difco). Στη συνέχεια, το καλλιέργημα αραιώθηκε 1:100 με θρεπτικό ζωμό Mueller-Hinton και επώαστηκε στους 32 °C για 22 ώρες. Μετά από φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 20 min, σε 1 mL υπερκείμενου προστέθηκαν 2 mL αντιδραστήριου trismaleate buffer 0,1 M και 1 mM CaCl<sub>2</sub> και 10 mg Elastin Congo red. Ακολούθησε επώαση για 2 ώρες στους 37 °C σε υδατόλουτρο με ανακίνηση και η αντίδραση τερματίστηκε με 2 mL PBS (0,7 M, pH 6,0). Το υπόστρωμα απομακρύνθηκε μετά από διάβαση από βακτηριοκραπτικό ηθμό και προσδιορίστηκε η απορρόφηση με φασματοφωτόμετρο στα 495 nm. Η δραστηριότητα ελαστάσης εκφράστηκε σε μονάδες οπτικής πυκνότητας.<sup>9</sup>

Για τον προσδιορισμό της απελευθέρωσης των LPS, ενοφθαλμίσμα λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης υποβλήθηκε σε τρεις διαδοχικές πλύσεις με ζωμό Mueller-Hinton. Τελικά, τα βακτηριακά κύτταρα αραιώθηκαν με 10 mL ζωμού Mueller-Hinton και επώαστηκαν στους 37 °C σε υδατόλουτρο με ανάδευση, αφού προσδιορίστηκε με ακρίβεια το ενοφθαλμισμό τους σε cfu/mL μετά τη λήψη δείγματος όγκου 0,1 mL, τη διαδοχική αραιώσή του 1:10 και την καλλιέργεια όγκων 0,1 mL κάθε αραιώσης σε άγαρ McConkey (Becton Dickinson, Cockeysville Md). Μετά από επώαση 0,5, 2 και 4 ωρών, 1 mL καλλιέργηματος φυγοκεντρήθηκε στα 1700 g επί 7 min. Ο προσδιορισμός των LPS έγινε στο υπερκείμενο με τη χρωματομετρική μέθοδο QCL-1000 LAL (BioWhittaker, Maryland, USA, κατώτερο όριο ανίχνευσης 0,1 EU/mL). Οι συγκεντρώσεις των ελευθέρων LPS εκφράστηκαν σε EU/10<sup>6</sup> cfu ενοφθαλμίσματος.

### In vitro διέγερση ανθρώπινων μονοκυττάρων

Ανθρώπινα μονοκύτταρα απομονώθηκαν από 2 υγιείς εθελοντές ηλικίας 30 ετών, ως ακολούθως:<sup>10</sup> Ηπαρινισμένο φλεβικό αίμα επισπιβάστηκε σε Ficoll Hypaque (Biochrom, Berlin, Germany) και φυγοκεντρήθηκε. Το απομονωθέν λεμφομονοπυρηνικό κλάσμα πλύθηκε 3 φορές με PBS (pH 7,2) (Merck, Darmstadt, Germany) και προστέθηκε σε RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Germany) εμπλουτισμένο με 10% fetal bovine serum (FBS, Biochrom, Berlin, Germany) και 2 mM γλουταμίνη (Biochrom, Berlin, Germany) παρουσία 100 U/mL πενικιλίνης G και 0,1 mg/mL στρεπτομυκίνης (Sigma, St. Louis, USA) σε φιάλες των 75 cm<sup>3</sup>. Μετά από 1 ώρα επώαση στους 37 °C σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> απομακρύνθηκαν τα μη προσκολλημένα κύτταρα, ενώ τα προσκολλημένα μονοκύτταρα

πλύθηκαν τρεις φορές με διάλυμα Hawks (Biochrom, Berlin, Germany). Τα τελευταία απομακρύνθηκαν από τη φιάλη με τη χρήση διαλύματος 0,25% θρυψίνης/0,02% EDTA (Biochrom, Berlin, Germany) και διαμοιράστηκαν σε πλάκα 12 κυψελίδων σε συγκέντρωση περίπου  $1 \times 10^5$  κύτταρα ανά κυψελίδα παρουσία RPMI 1640 εμπλουτισμένου με 10% FBS και 2 mM γλουταμίνης. Ο τελικός όγκος ανά κυψελίδα ήταν 2,4 mL και η καθαρότητα των μονοκυττάρων ανά κυψελίδα >95%. Μετά από επώαση για 30 min στους 37 °C σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>, προστέθηκαν σε κάθε κυψελίδα 20 μL ενοφθαλμίσματος στελέχους *P. aeruginosa* λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, ώστε το τελικό ενοφθαλμίσμα ανά κυψελίδα να είναι  $5 \times 10^4$  cfu/mL και  $5 \times 10^6$  cfu/mL. Πριν από την προσθήκη στην κυψελίδα, τα βακτηριακά κύτταρα είχαν πλυθεί τρεις φορές με PBS (pH: 7,2), προκειμένου να απομακρυνθούν οι ελεύθερες ενδοτοξίνες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν επί 2 και 4 ώρες στους 37 °C σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> παρουσία των μελετηθέντων στελεχών, οπότε το υπερκείμενο κάθε κυψελίδας απομακρύνθηκε και διατηρήθηκε στους -70 °C μέχρι την επεξεργασία.

Όλα τα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν για τη διέγερση των μονοκυττάρων και των δύο εθελοντών. Η ανωτέρω διεργασία διέγερσης των μονοκυττάρων έγινε για κάθε στέλεχος δύο φορές, ενώ χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες μονοκύτταρα που δεν διεγέρθηκαν από βακτηριακά κύτταρα.

#### Προσδιορισμός κυτταροκινών, μαλονικής διαλδεΐδης και προκαλιτονίνης

Οι συγκεντρώσεις του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) και των ιντερλευκινών IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 και IL-12 στα υπερκείμενα των καλλιέργειών των μονοκυττάρων μετά την *in vitro* διέγερσή τους μετρήθηκαν με ανοσοενζυμική μέθοδο (EIA, Amersham, London, UK). Τα κατώτερα όρια ανίχνευσης ήταν για τον TNFα 15,1 pg/mL, για τις IL-1β και IL-6 10 pg/mL και για τις IL-8, IL-10 και IL-12 30 pg/mL. Όλες οι μετρήσεις έγιναν δύο φορές και οι συγκεντρώσεις των κυτταροκινών εκφράστηκαν σε pg/10<sup>4</sup> μονοκύτταρα.

Η συγκέντρωση της μαλονικής διαλδεΐδης (MDA) προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος, ως ακολούθως:<sup>11</sup> Όγκος 0,1 mL υπερκείμενου καλλιέργειας μονοκυττάρων αραιώθηκε 1:10 με τριχλωροξικό οξύ 20% (Merck, Darmstadt, Germany) και φυγοκεντρήθηκε στα 12.000 g στους 4 °C για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και επώαστηκε με 1 mL PBS pH 7,0 και 1 mL θειοβαρβιτουρικού οξέος 0,6% (Merck) για 20 min στους 90 °C. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 535 nm, χρησιμοποιώντας ως τυφλό δείγμα ύδατος που υποβλήθηκε σε ανάλογη επεξεργασία (Hitachi Spectrophotometer, Tokyo, Japan). Οι συγκεντρώσεις της MDA προσδιορίστηκαν με πρότυπη καμπύλη που σχεδιάστηκε με γνωστές συγκεντρώσεις 1,1,3,3-τετραμεθοξυ-προπανίου (Merck) και εκφράστηκαν σε mmol/10<sup>4</sup> μονοκύτταρα. Όλες οι μετρήσεις έγιναν δύο φορές και το κατώτερο όριο ανίχνευσης ήταν 0,03

mmol/mL. Ο παράγοντας μεταβλητότητας του αποτελέσματος αυτής της μεθόδου για τη μέτρηση της MDA υπολογίστηκε σε 5,45% για μετρήσεις της ίδιας ημέρας και σε 11,45% για μετρήσεις διαφορετικών ημερών.

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων της προκαλιτονίνης στα υπερκείμενα των καλλιέργειών των μονοκυττάρων έγινε δύο φορές με μέθοδο ανοσοχημειοφωταύγειας (BRAHMS Diagnostica GmbH, Berlin, Germany, κατώτερο όριο ανίχνευσης 0,08 ng/mL). Οι συγκεντρώσεις εκφράστηκαν σε ng/10<sup>4</sup> μονοκύτταρα.

#### Μελέτη σε ζωικά πρότυπα

Ως ζωικά πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν 20 αρσενικοί αρουραίοι τύπου Wistar μέσου βάρους ( $\pm$ SD) 300,1 $\pm$ 26,4 g. Τα ζωικά πρότυπα διέμεναν σε μεταλλικούς κλωβούς και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Η θερμοκρασία κυμαινόταν μεταξύ 18 και 22 °C, η σχετική υγρασία μεταξύ 55% και 65% και ο κύκλος φωτός ήταν 6 π.μ./6 μ.μ. Η μελέτη έλαβε άδεια από τη Νομαρχία Αθηνών, σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη *P. aeruginosa*, ένα ευαίσθητο και ένα πολυανθεκτικό. Μονήρεις αποικίες επώαστηκαν σε ζωμό Mueller-Hinton στους 37 °C επί 18 ώρες, οπότε τα βακτηριακά κύτταρα υποβλήθηκαν σε τρεις πλύσεις με PBS (pH: 7,2) προς απομάκρυνση των ελεύθερων ενδοτοξινών. Ενοφθαλμίσμα  $1 \times 10^8$ /kg κάθε στελέχους σε όγκο 1 mL ενέθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε 10 ζωικά πρότυπα.<sup>12</sup> Η επιβίωση των ζωικών προτύπων μετρήθηκε ανά 4 ώρες.

#### Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσες τιμές ( $\pm$ SE) και 95% όρια αξιοπιστίας. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ευαίσθητων και των πολυανθεκτικών στελεχών πραγματοποιήθηκαν με τη δοκιμασία Mann-Whitney. Η επιβίωση των ζωικών προτύπων μετά το βακτηριακό ενοφθαλμισμό προσδιορίστηκε κατά Kaplan-Meier και η σύγκριση ανάμεσα στα ζωικά πρότυπα, στα οποία ενοφθαλμίστηκε ευαίσθητο, και σε αυτά όπου ενοφθαλμίστηκε πολυανθεκτικό στέλεχος, έγινε με τη δοκιμασία log-rank. Κάθε τιμή του P μικρότερη ή ίση του 0,05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οκτώ στελέχη ήταν ευαίσθητα σε όλα τα μελετηθέντα αντιμικροβιακά και 12 πολυανθεκτικά. Η ηλεκτροφόρηση του γενετικού υλικού των στελεχών φαίνεται στην εικόνα 1, από την οποία καθίσταται σαφές ότι όλα τα μελετηθέντα στελέχη ήταν γενετικά διακριτά. Η ΕΑΠ<sub>50</sub> των ευαίσθητων στελεχών στην τικαρκιλίνη, την πιπερακιλίνη, την κεφταζιμίμη, την κεφεπίμη, την ιμιπενέμη, τη μεροπενέμη, τη σιπροφλοξασίνη, τη γενταμικίνη,

την τομπραμυκίνη και την αμικασίνη ήταν 4, 4, 2, 2, 2, 0,25, 0,12, 1, 1 και 1 µg/mL, αντίστοιχα, και των πολυανθεκτικών στελεχών >256, >256, 128, 64, 64, 64, 128, 256, 256 και 125 µg/mL, αντίστοιχα.

Η απελευθέρωση ελαστάσης και LPS από τα ευαίσθητα και τα ανθεκτικά στελέχη περιγράφεται στον πίνακα 1. Είναι σαφές ότι, παρά την έλλειψη στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ ευαίσθητων και πολυανθεκτικών στελεχών, η απελευθέρωση των LPS από τα κύτταρα των ευαίσθητων στελεχών αυξανόταν κατά την επώαση, σε αντίθεση με τα πολυανθεκτικά στελέχη, όπου διατηρείτο σταθερή.

Οι συγκεντρώσεις των κυτταροκινών, της προκαλσιτονίνης και της MDA στα μονοκύτταρα-μάρτυρες ήταν μη ανιχνεύσιμες. Η παραγωγή TNFα, προκαλσιτονίνης και MDA από τα μονοκύτταρα μετά από διέγερση από τα ευαίσθητα και τα πολυανθεκτικά στελέχη, σε συνάρτηση με το χρησιμοποιηθέν ενοφθάλμισμα, δίνεται στην εικόνα 2. Στατιστικώς σημαντική διαφορά διαπιστώθηκε στις συγκεντρώσεις MDA μετά από διέγερση επί 2 και 4 ώρες από ενοφθάλμισμα ίσο με  $5 \times 10^6$  cfu/mL μεταξύ ευαίσθητων και πολυανθεκτικών στελεχών ( $P=0,05$ ). Η παραγωγή IL-1β, IL-6 και IL-8 από τα μονοκύτταρα μετά από διέγερση από τα ευαίσθητα και τα πολυανθεκτικά στελέχη σε συνάρτηση με το χρησιμοποιηθέν ενοφθάλμισμα φαίνεται στην εικόνα 3. Στατιστικώς σημαντική διαφορά διαπιστώθηκε στις συγκεντρώσεις της IL-1β μετά από διέγερση επί 4 ώρες από ενοφθάλμισμα ίσο με  $5 \times 10^6$  και της IL-6 μετά από διέγερση επί 2 ώρες από ενοφθάλμισμα ίσο με  $5 \times 10^4$  cfu/mL μεταξύ

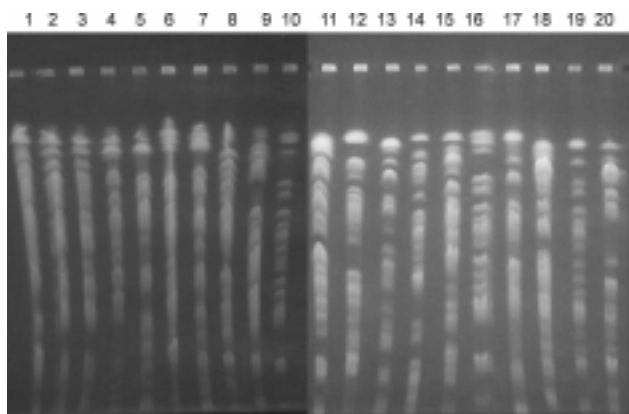
ευαίσθητων και πολυανθεκτικών στελεχών ( $P=0,003$  και  $P=0,05$ , αντίστοιχα). Σε κανένα από τα διεγερθέντα κύτταρα δεν διαπιστώθηκε παραγωγή IL-10 και IL-12.

Η μέση ( $\pm$ SE) επιβίωση των ζωικών προτύπων στα οποία ενοφθαλμίστηκε το ευαίσθητο στέλεχος ήταν 21,80 ( $\pm 7,87$ ) ώρες, ενώ σε αυτά που ενέθηκε το πολυανθεκτικό στέλεχος ήταν  $61,8 \pm 11,81$  ώρες ( $P=0,0065$ ). Το συγκριτικό διάγραμμα της επιβίωσης για τα 20 ζωικά πρότυπα δίνεται στην εικόνα 4.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η *P. aeruginosa* αποτελεί παθογόνο αίτιο νοσοκομειακών λοιμώξεων που χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό διασταυρούμενης αντοχής σε αντιμικροβιακά διαφορετικής χημικής δομής.<sup>1</sup> Η δυσχέρεια αντιμετώπισης των λοιμώξεων από αυτά τα στελέχη καθιστά σημαντική τη γνώση της λοιμογόνου ικανότητάς τους, δεδομένου ότι οι υπάρχουσες θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες. Αν και οι παράγοντες που καθορίζουν τη λοιμογονικότητα της *P. aeruginosa* έχουν περιγραφεί με αρκετή ακρίβεια,<sup>3,5</sup> οι γνώσεις που συσχετίζουν την αντοχή με τη λοιμογόνο δράση των στελεχών αυτών είναι περιορισμένες. Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε για να προσεγγίσει το ερώτημα αν τα πολυανθεκτικά στελέχη είναι περισσότερο, λιγότερο ή εξίσου λοιμογόνα με τα ευαίσθητα στα αντιμικροβιακά.

Ένα παρόμοιο πρόβλημα είναι σύνθετο και η απάντησή του απαιτεί επαρκή διερεύνηση κάθε συνιστώσας. Οι συνιστώσες αφορούν αφενός στα χαρακτηριστικά των μελετηθέντων στελεχών και αφετέρου στην αλληλεπί-

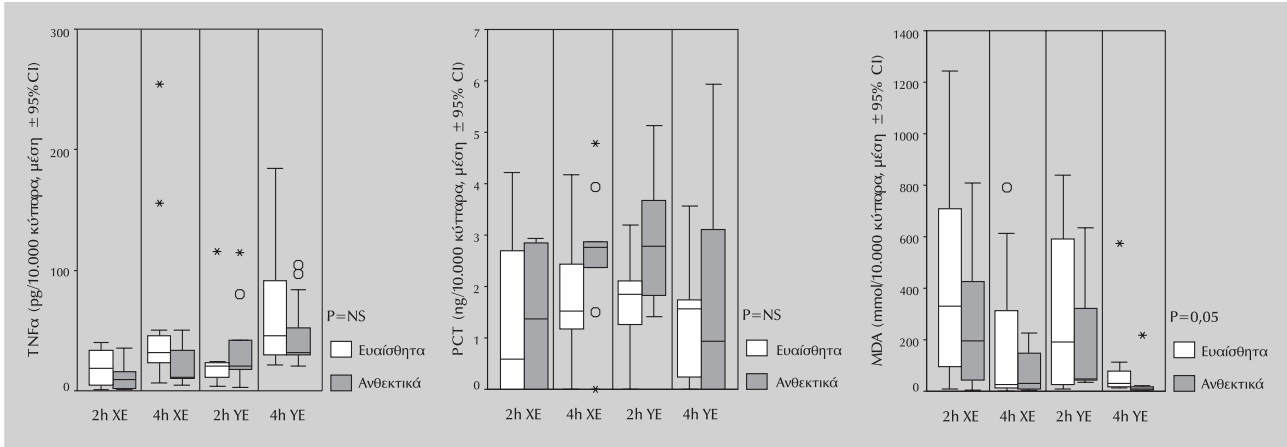


**Εικόνα 1.** Ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου πεδίου (PFGE) των 20 μελετηθέντων στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*. Όλα τα στελέχη είναι γενετικά διακριτά. Από τα μελετηθέντα στελέχη, τα 5, 8, 9, 11, 12, 13, 16 και 19 είναι ευαίσθητα σε όλα τα αντιμικροβιακά με γνωστή αντιψευδομοναδική δραστηριότητα και τα 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 14, 15, 17, 18 και 20 είναι πολυανθεκτικά.

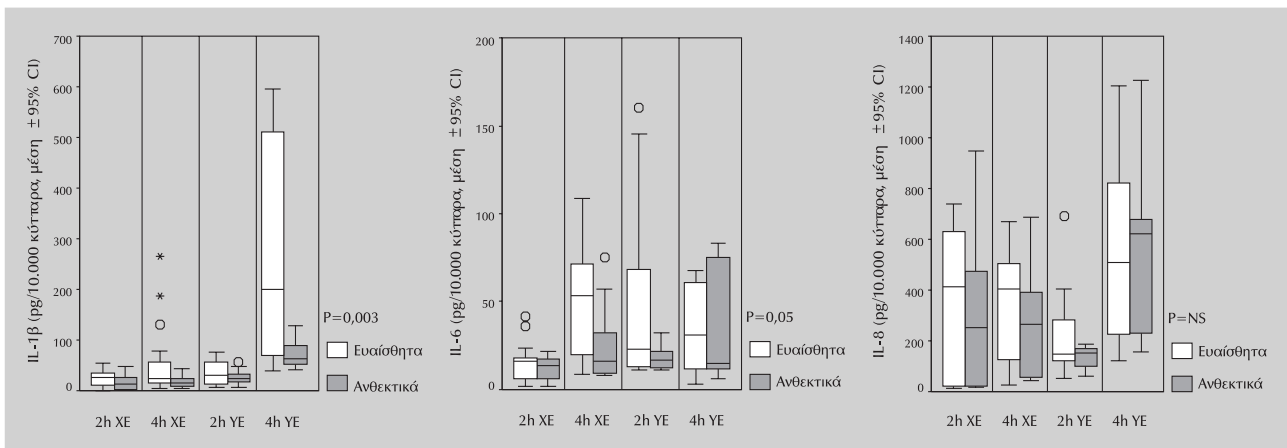
**Πίνακας 1.** Απελευθέρωση ελαστάσης και ενδοτοξινών (LPS) από 8 ευαίσθητα και 12 πολυανθεκτικά στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*. Η απελευθέρωση των LPS προσδιορίστηκε σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα από την έναρξη της βακτηριακής ανάπτυξης. Η ελαστάση αποτελεί εξωτοξίνη και ο προσδιορισμός της δεν εξαρτάται από το χρόνο επώασης.

Χρόνος επώασης (ώρες)	Ευαίσθητα	Πολυανθεκτικά
	Ελαστάση (Μέση $\pm$ SE, OD)	
0,5	0,70 $\pm$ 0,28	0,53 $\pm$ 0,14*
	LPS (Μέση $\pm$ SE, EU/10 <sup>6</sup> cfu)	
0,5	36,75 $\pm$ 15,22	83,99 $\pm$ 23,97*
2,0	60,87 $\pm$ 24,62	81,94 $\pm$ 17,29*
4,0	69,29 $\pm$ 14,37	84,43 $\pm$ 21,20*

\*Μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ ευαίσθητων και πολυανθεκτικών στελεχών



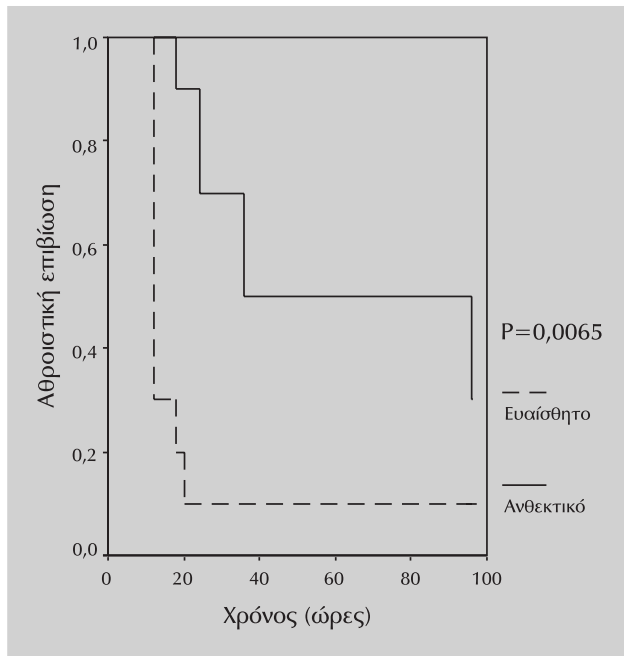
**Εικόνα 2.** Παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNFα), της προκαλσιτονίνης (PCT) και της μαλονικής διαλδεύδης (MDA) από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα δύο υγιών εθελοντών μετά την επώασή τους για δύο (2h) και τέσσερις ώρες (4h), παρουσία ενός χαμηλού ενοφθαλμίσματος (XE) ίσου με  $5 \times 10^4$  cfu/mL και ενός υψηλού ενοφθαλμίσματος (YE) ίσου με  $5 \times 10^6$  cfu/mL από 8 ευαίσθητα και 12 πολυανθεκτικά στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*.



**Εικόνα 3.** Παραγωγή των ιντερλευκινών IL-1β, IL-6 και IL-8 από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα 2 υγιών εθελοντών μετά την επώασή τους για δύο (2h) και τέσσερις ώρες (4h) παρουσία ενός χαμηλού ενοφθαλμίσματος (XE) ίσου με  $5 \times 10^4$  cfu/mL και ενός υψηλού ενοφθαλμίσματος (YE) ίσου με  $5 \times 10^6$  cfu/mL από 8 ευαίσθητα και 12 πολυανθεκτικά στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*.

δρασή τους με τον ξενιστή. Τα στελέχη πρέπει να είναι γενετικά διακριτά, ώστε να διασφαλίζεται ο βαθμός αξιοπιστίας και επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Στην παρούσα μελέτη, αυτό εξασφαλίστηκε με την ανάλυση του ολικού τους DNA (εικ. 1). Η ολοκλήρωση της μελέτης των στελεχών απαιτεί τον καθορισμό της παραγωγής εξωτοξινών και της απελευθέρωσης ενδοτοξινών από αυτά (πίν. 1). Εξάλλου, η επαρκής μελέτη της λοιμογόνου ικανότητας των στελεχών πρέπει να καθορίζεται σε σχέση με το κύτταρο του ξενιστή που είναι επιφορτισμένο με τη μη ειδική ανοσιακή απόκριση.<sup>13</sup> Το ανθρώπινο κύτταρο που είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης είναι

το μονοκύτταρο.<sup>14</sup> Κατά συνέπεια, μελετήθηκε η παραγωγή φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, προκαλσιτονίνης και MDA από τα μονοκύτταρα υγιών εθελοντών μετά την *in vitro* έκθεσή τους στα μελετηθέντα στελέχη. Αν και στις περισσότερες μελέτες με επικέντρωση στην αλληλουχία της σπητικής διεργασίας χρησιμοποιείται ο μικτός λεμφοκυτταρικός πληθυσμός, δηλαδή το σύνολο των λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων ενός υγιούς εθελοντή,<sup>14</sup> στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά μονοκύτταρα. Τέλος, επιχειρήθηκε κλινική συσχέτιση των *in vitro* δεδομένων με τα αποτελέσματα της επιβίωσης μετά τον ενοφθαλμισμό ευαίσθητου και πολυανθεκτικού στελέχους σε ζωικά



**Εικόνα 4.** Συγκριτικές καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan-Meier 10 αρουραίων τύπου Wistar μετά από ενδοπεριτοναϊκό ενοφθαλμισμό ενός ευαίσθητου και 10 αρουραίων τύπου Wistar μετά από ενδοπεριτοναϊκό ενοφθαλμισμό ενός πολυανθεκτικού στελεχούς *Pseudomonas aeruginosa*.

πρότυπα. Ανάλογη προσπάθεια καθορισμού της συγκριτικής λοιμογόνου ικανότητας των ευαίσθητων στα αντιμικροβιακά και των πολυανθεκτικών στελεχών δεν έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία, ούτε για τα στελέχη *P. aeruginosa* ούτε και για άλλα στελέχη Gram-θετικών κόκκων ή Gram-αρνητικών βακτηρίων.

Από τα αποτελέσματα (εικόνες 2 και 3), καθίσταται σαφές ότι η παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών αλλά και MDA από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα είναι μεγαλύτερη μετά την *in vitro* διέγερσή τους από ευαίσθητα στελέχη συγκριτικά με τα πολυανθεκτικά στελέχη. Οι διαφορές που παρατηρούνται είναι στατιστικά σημαντικές για την IL-1β και την IL-6. Αντίθετα, η IL-10 είναι αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη που εκκρίνεται καθυστερημένα σε σχέση με τις φλεγμονώδεις,<sup>14</sup> γεγονός που πιθανότατα εξηγεί την έλλειψη παραγωγής της κατά το χρονικό διάστημα της τετράωρης διέγερσης των μονοκυττάρων.

Η παραγωγή των φλεγμονωδών κυτταροκινών θα πρέπει να εξεταστεί σε σχέση με την απελευθέρωση εξωτοξινών και ενδοτοξινών από τα βακτηριακά κύτταρα, εφόσον οι τελευταίες διεγείρουν τους υποδοχείς των μονοκυττάρων.<sup>14,15</sup> Η απελευθέρωση LPS φαίνεται μεγαλύτερη από τα πολυανθεκτικά συγκριτικά με τα ευαίσθητα στελέχη κατά την αρχή της επώασης των

στελεχών. Με την πρόοδο όμως της επώασης παρατηρείται σταδιακή αύξηση της απελευθέρωσης των LPS από τα ευαίσθητα στελέχη, σε αντίθεση με τα πολυανθεκτικά, από τα οποία η απελευθέρωση LPS διατηρείται σταθερή (πίν. 1). Το εύρημα αυτό, σε συνδυασμό με τη μεγαλύτερη απέκκριση της ελαστάσης από τα ευαίσθητα στελέχη, μπορεί να αιτιολογήσει επαρκώς τη διαφορά έκλυσης φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα μεταξύ ευαίσθητων και πολυανθεκτικών στελεχών.

Ιδιαίτερος λόγος θα πρέπει να γίνει για την MDA, η οποία είναι δείκτης του οξειδωτικού δυναμικού και αυξάνεται σημαντικά στο αίμα στα πλαίσια του σππτικού συνδρόμου.<sup>16</sup> Η βακτηριακή ελασάση επιδρά στα φωσfolιπίδια των ανθρώπινων κυτταρικών μεμβρανών, διευκολύνοντας τη μη ενζυμική υπεροξειδωση των εστεροποιημένων σε αυτά πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε MDA. Κατά συνέπεια, η αυξημένη παραγωγή ελαστάσης από τα ευαίσθητα στελέχη θα μπορούσε να ερμηνεύσει την αύξηση της MDA (εικ. 2).

Ανάλογες διαφορές δεν διαπιστώνονται για την προκαλσιτονίνη, η οποία αποτελεί ισχυρό προγνωστικό δείκτη σοβαρής σήψης και σππτικής καταπληξίας.<sup>17</sup> Για το ρόλο και την εστία παραγωγής της τα δεδομένα είναι αντιφατικά. Τα αποτελέσματα ενισχύουν μεμονωμένα βιβλιογραφικά δεδομένα από μελέτες σε μικτό λεμφομονοκυτταρικό πληθυσμό κυττάρων, που ενοχοποιούν τα μονοκύτταρα ως εστία παραγωγής της.<sup>18</sup> Η προκαλσιτονίνη θεωρείται αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη, όπως και η IL-10. Κατά συνέπεια, η απουσία διαφορών στην παραγωγή της από τα μονοκύτταρα μετά τη διέγερση από ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη είναι αναμενόμενο να μην εμφανίζει διαφορές (εικ. 2).

Οι *in vitro* διαφορές της λοιμογόνου ικανότητας μεταξύ ευαίσθητων και πολυανθεκτικών στελεχών είναι πιθανό ότι θα αποκτήσουν κλινική σημασία, εφόσον διαπιστωθούν σε πειραματικό μοντέλο σήψης υψηλής θνητότητας. Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε σε ανάλογο μοντέλο σήψης σημαντική καθυστέρηση στην επέλευση θανάτου των ζωικών προτύπων που ενοφθαλμίστηκαν με πολυανθεκτικό στέλεχος *P. aeruginosa*, συγκριτικά με εκείνα που ενοφθαλμίστηκαν με ευαίσθητο στέλεχος (εικ. 4). Στην κλινική πράξη, ενδιαφέρον δεν έχουν μόνο οι μεμονωμένες διαφορές που διαπιστώνονται *in vitro* αλλά και η συνισταμένη τους,<sup>19</sup> η οποία στο συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο υποστηρίζει τη διαφορά λοιμογόνου ικανότητας μεταξύ ευαίσθητων στα αντιμικροβιακά και πολυανθεκτικών στελεχών, τουλάχιστον για το είδος της *P. aeruginosa*.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναδεικνύουν την ύπαρξη σημαντικής διαφοράς στη λοιμογόνο ικανότητα των ευαίσθητων στα αντιμικροβιακά σε σύγκριση με τα πολυανθεκτικά στελέχη *P. aeruginosa*. Οι ανωτέρω ενδείξεις απαιτούν περαιτέρω άθροιση πειραματικών

παρατηρήσεων και από άλλα είδη ευαίσθητων και ανθεκτικών μικροοργανισμών, εφόσον για κάθε νοσηλευόμενο ασθενή επικρέμεται σήμερα η απειλή του «Τέλους των Αντιβιοτικών».<sup>20</sup>

## ABSTRACT

### Comparative virulence of susceptible and multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: An *in vitro* and *in vivo* study

D. PLACHOURAS,<sup>1</sup> E.J. GIAMARELLOS-BOURBOULIS,<sup>1</sup> V. KOUSOULAS,<sup>2</sup> A. TZIVRA,<sup>1</sup> N. BOLANOS,<sup>3</sup> M. RAFTOGIANNIS,<sup>1</sup> I. GALANI,<sup>1</sup> I. DONTAS,<sup>3</sup> A. DIONYSSIOU-ASTERIOU,<sup>2</sup> H. GIAMARELLOU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>4th Department of Internal Medicine, <sup>2</sup>Department of Biological Chemistry, <sup>3</sup>Laboratory for Experimental Surgery and Surgical Research, University of Athens, Medical School, Athens, Greece  
*Archives of Hellenic Medicine* 2004, 21(3):245–252

**OBJECTIVE** The comparative virulence properties of susceptible and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates *in vitro* and *in vivo*. **METHOD** Eight susceptible and 12 multidrug-resistant genetically distinct isolates were tested, as defined by PFGE. Production of elastase and release of endotoxins were defined by chromogenic assays. Human monocytes were stimulated *in vitro* by the selected isolates for the production of pro-inflammatory (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines, of malondialdehyde (MDA) and of procalcitonin. Cytokines were estimated by EIA, MDA by the thiobarbiturate assay and procalcitonin by immunochemiluminescence. Survival of 20 Wistar rats was recorded after intraperitoneal injection of one susceptible isolate in 10 and one resistant isolate in the other 10. **RESULTS** Statistically significantly higher production of MDA, of IL-1 $\beta$  and of IL-6 from monocytes was observed after stimulation by susceptible isolates than after stimulation by multidrug-resistant isolates. Similar differences were found for elastase, TNF $\alpha$  and IL-8, but these were not statistically significant. No production of IL-10 or IL-12 was detected after stimulation with any isolate. Levels of procalcitonin were similar after induction with either susceptible or multidrug-resistant isolates. Mean ( $\pm$ SE) survival of rats after inoculation with the susceptible isolate was 21.80 ( $\pm$ 7.87) hours and after inoculation with the multidrug-resistant isolate 61.8 $\pm$ 11.81 hours (P=0.0065). **CONCLUSIONS** Considerable differences were encountered in the virulence properties of susceptible and resistant isolates of *P. aeruginosa*, according to both *in vitro* and *in vivo* evidence. These results could influence therapeutic decision.

**Key words:** Cytokines, *Pseudomonas aeruginosa*, Resistance, Sepsis, Virulence

## Βιβλιογραφία

1. TACONELLI E, TUMBARELLO M, BERTAGNOLIO S, CITTON R, SPANU T, FADDA G ET AL. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: Analysis of trends in prevalence and epidemiology. *Emerg Infect Dis* 2002, 8:220–221
2. WHONET GREECE. The Greek system for surveillance of antimicrobial resistance. [www.mednet.gr/whonet/02a-pseu1-blood.htm](http://www.mednet.gr/whonet/02a-pseu1-blood.htm)
3. KURAHASHI K, KAJIGAWA O, SAWA T, OHARA M, GROPPER MA, FRANK DW ET AL. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 1999, 104:743–750
4. REINHART K, KARZAI W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med* 2001, 29(Suppl 1):S121–S125
5. RUMBAUGH KP, COLMER JA, GRISWOLD JA, HAMOOD AN. The effects of infection of thermal injury by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on the murine cytokine response. *Cytokine* 2001, 16:160–168
6. HIRAKATA Y, SRIKUMAR R, POOLE K, GOTOH N, SUEMATSU T, KOHNO S ET AL. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Exp Med* 2002, 196:109–118
7. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 12th International Supplement 2002, 22:94–95

8. GIAMARELLOS-BOURBOULIS EJ, KARNESSIS L, GALANI I, GIAMARELOU H. *In vitro* killing effect of moxifloxacin on clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46:3997–3999
9. OHMAN DE, CRYZ SJ, IGLEWSKI BH. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *J Bacteriol* 1980, 142:836–842
10. LIEL Y, RUDICH A, NAGAUKE-SHRIKER O, YERMIYAHU T, LEVY R. Monocyte dysfunction in patients with Gaucher disease: evidence for interference of glucocerebrosidase with superoxide generation. *Blood* 1994, 83:2646–2653
11. BEGIN ME, ELLS G, HORROBIN DF. Polyunsaturated fatty acid-induced cytotoxicity against tumor cells and its relationship to lipid peroxidation. *J Natl Cancer Inst* 1988, 80:188–194
12. SHORT BL, GARDINER WM, WALKER RI, FLETCHER JR, ROGERS JE. Rat intraperitoneal sepsis. A clinically relevant model. *Circ Shock* 1983, 10:351–359
13. KOEHLER T, VAN DELDEN C, CURTY LK, HAMZEHPUR MM, PECHERE JC. Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2001, 183:5213–5222
14. VAN DER POLL T, VAN DEVENTER SJH. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999, 13:413–426
15. MISFELDT ML, LEGAARD PK, HOWELL SE, FORNELLA MH, LeGRAND RD. Induction of interleukin-1 from murine peritoneal macrophages by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Infect Immun* 1990, 58:978–982
16. GOODE HF, COWLEY HC, WALKER BE, HOWDLE PD, WEBSTER NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 1995, 23:646–651
17. GIAMARELLOS-BOURBOULIS EJ, MEGA A, GRECKA P, SCARPA N, KORATZANIS G, THOMOPOULOS G ET AL. Procalcitonin: a marker to clearly differentiate systemic inflammatory response syndrome and sepsis in the critically ill patient? *Intensive Care Med* 2002, 28:1351–1356
18. OBERHOFFER M, STONANS I, RUSSWURM S, STONANE E, VOGEL-SANG H, JUNKER U ET AL. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines *in vitro*. *J Lab Clin Med* 1999, 134:49–55
19. NETEA MG, BLOK WL, KULLBERG BJ, BEMELMANS M, VOGELS MTE, BUURMAN WA ET AL. Pharmacologic inhibitors of tumor necrosis factor production exert differential effects in lethal endotoxemia and in infection with live microorganisms in mice. *J Infect Dis* 1995, 171:393–399
20. COHEN ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antibiotic era. *Science* 1992, 257:1050–1055

*Corresponding author:*

E.J. Giamarellos-Bourboulis, 4th Department of Internal Medicine, "Attikon" University Hospital, 1 Rimini street, GR-124 64 Athens, Greece