Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca

AGAUR

UNIÓ EUROPEA
Fons Social Europeu

Memòria justificativa de recerca de les beques predoctorals per a la formació de personal investigador (FI)

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Títol del projecte ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Paper de l' Haemophilus influenzae en les exacerbacions de la Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica (MPOC). Tipificació molecular i factors de virulència.

Dades de l'investigador (benficiari de l'ajut)

Nom
Carmen

Cognoms
Puig Pitarch

Correu electrònic
cpuig@bellviygehospital.cat

Dades del director del projecte

Nom
Josefina

Cognoms
Liñares Louzao

Correu electrònic
jlinares@bellvitgehospital.cat

Dades de la universitat / centre al que s'està vinculat

Universitat / Centre de Recerca: Fundació Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)
Departament: Departament de Patologia i Terapèutica Experimental -Microbiologia H.U.Bellvitge

Número d'expedient

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
MPOC, H. influenzae, P. aeruginosa, sensibilitat antibiòtica, genotip

Data de presentació de la justificació

Nom i cognoms, i signatura del beneficiari/ària

Vist i plau del/de la director/a del projecte

Generalitat de Catalunya
Departament d'Economia i Coneixement

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

Objetivos: 1.-Identificar los factores clínicos y microbiológicos que ayuden a predecir la aparición de exacerbaciones en la EPOC. 2.-Diagnóstico y cuantificación de las especies bacterianas aisladas en esputo (fase de exacerbación y estable) .3.- Tipificación genotípica secuencial de las cepas de H. influenzae y P. aeruginosa. 4.- Impacto del tratamiento antibiótico en la aparición de resistencias en estos patógenos. 5.- Diseño: Estudio prospectivo (3 años).
Ámbito del estudio: Hospital Universitario de tercer nivel. Pacientes con EPOC grave atendidos en la Consulta Monográfica de EPOC del Servicio de Neumología.
Métodos microbiológicos: Cuantificación de la carga bacteriana en muestras respiratorias en fase estable y en exacerbación. Estudio de la sensibilidad “in vitro”. Tipificación molecular (PFGE y MLST) de H. influenzae y P. aeruginosa. Estudio de los genes de virulencia de H. influenzae mediante PCR.
Resultados: Desde Febrero de 2010 a Julio de 2011 se han incluido 77 pacientes. Los microorganismos más frecuentemente aislados en fase de exacerbación fueron: P. aeruginosa (29.3%), H. influenzae (15.92%), M. catarrhalis (12.74%), S. pneumoniae (10.19%) y S. aureus (5.10%). En los 88 episodios por P. aeruginosa se detectaron 38 genotipos diferentes. En los 41 episodios por H. influenzae se detectaron 39 genotipos diferentes. El 10% de los episodios fueron polimicrobianos.
Los episodios de EAEPOC y de fase estable tuvieron una distribución de microorganismos similar. Sin embargo, cuando se cuantificaron las cargas bacterianas fueron mayores en EAEPOC (intervalo 4x107 -2x108) que en fase estable (intervalo 2x105 -4x107).
Conclusiones: El genotipo de las cepas de P. aeruginosa y H. influenzae aisladas en EAEPOC difieren de un paciente a otro, sin embargo la mayoría de los episodios de cada paciente están causados por un genotipo único.

Resum en anglès(màxim 300 paraules)
Objectives: 1. To identify clinical and microbiological factors in order to predict COPD exacerbations. 2. To determine and quantify the bacterial strains isolated in sputum samples during exacerbation and stable COPD. 3. Molecular typing of H. influenzae and P. aeruginosa sequential strains. 4. Impact of antimicrobial treatment in the development of resistance in these microorganisms.
Design: Prospective study for the follow-up of severe COPD patients (3 years).
Setting: Third level teaching hospital.
Patients: adult patients diagnosed with severe COPD attended in the Monographic COPD consulting room of the Pneumology Service.
Microbiology methods: Bacterial load detection during exacerbation and stable COPD phases. Study of antibiotic sensibility in vitro. Molecular typing (PFGE and MLST) of H influenzae and P. aeruginosa strains. PCR detection of virulence genes of H. influenzae. Results: Seventy seven COPD patients have been included from February 20100 to July 2011. The most frequent microorganisms isolated during exacerbation were: P. aeruginosa (29.3%), H. influenzae (15.92%), M. catarrhalis (12.74%), S. pneumoniae (10.19%) and S. aureus (5.10%). Among 88 episodes caused by P. aeruginosa, 38 different genotypes were found. Among 41 episodes of H. influenzae, 39 genotypes were observed. The 10% of the episodes were caused by more than two microorganisms. The bacterial load was higher among AECOPD episodes (range 4x107 -2x108) than those found in stable COPD (range 2x105 -4x107).
Conclusions: The genotype of P. aeruginosa and H. isolated in AECOPD were different for each patient, however the majority of episodes occurred in same patient were caused by the same genotype.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

ANTECEDENTS

La MPOC és un procés inflamatori que es caracteritza per una progressiva limitació del flux respiratori que apareix degut a una exposició respiratòria repetida a partícules o gasos nocius, especialment continguts en el fum del tabac. És una de les malalties més prevalent en els països desenvolupats, amb una tendència ascendent que, segons les previsions de la OMS, serà la tercera causa de mort en el món l'any 2020.
Les exacerbacions (episodis d'agudització dels símptomes clínics de la MPOC) ocasionen un augment de la mobilitat i mortalitat dels pacients, empitjorant la qualitat de vida. El 75% d'aquestes aguditzacions són d'etiologia infecciosa, principalment d'origen bacterià. El patogen aïllat amb més freqüència és *H. influenzae*, tot i que la infecció per *P. aeruginosa* esdevé un marcador rellevant de gravetat, associant-se amb una intensa inflamació de les vies respiratòries.
En condicions normals, el tracte respiratori inferior és estèril, però en un 25-50% dels pacients amb MPOC en fase estable es poden aïllar microorganismes.

HIPOTESIS

La nostra hipòtesis és que les exacerbacions no només són causades per l'adquisició d'una nova soca de *H. influenzae* o *P. aeruginosa*, sinó que també poden aparèixer quan canvia l'expressió de gens de virulència i de resistència anitbiòtica en bacteris colonitzants durant llargs períodes de temps. Una segona hipòtesis és que la colonització/infecció per *P. aeruginosa* multiresistents serà molt més freqüent en pacients amb MPOC més evolucionada i tindràn un comportament similar als pacients amb fibrosis quísitca.

OBJECTIUS

1.- Diagnóstic i quantificació de les espècies bacterianes *H. influenzae* i *P. aeruginosa* aïllades en esput, tant en fase d'exacerbació com en la fase estable de la MPOC.
2.- Tipificació genotípica seqüencial de totes les soques de *H. influenzae* i *P. aeruginosa.*
3.- Impacte del tractament antibiòtic en l'aparició de resistències en aquests patògens.

METODOLOGIA

1. Selecció de pacients. Tots els pacients diagnosticats de MPOC greu, d'acord a les guies internacionals GOLD, amb un FEV_1 <50% del valor de referència i dispnea CFIII-IV de la MRC (Medical Research Council modificada), controlats en la consulta externa monogràfica de MPOC de l'Hospital Universitari de Bellvitge, durant el període 2010-2011.
2. Recollida de mostres i processament. Es recolliran mostres d'esput per a cultiu bacterià per a la detecció bacteriana per PCR, tant en fase estable com en les exacerbacions. Les mostres d'esput s'homogeneïtzaran amb ditotreitol (esputolisina) previ al seu cultiu. Es realitzaran dilucions seriades del homogeneïtzat (1:10-1:10-2:10-3) en PBS i es sembrarà en agar sang, agar xocolata i agar McConkey. S'aïllaran 10 o més colònies de cada espècie bacteriana i es conservaran a –80ºC.
3. Proves de sensibilitat antibiòtica. Es realitzaran pel mètode de disc-difusió i/o microdilució, seguint les pautes del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).
4. Tipificació molecular dels microorganismes. S'estudiaran com a mínim 10 colònies diferents per mostra mitjançant electroforesis de camp pulsàtil (PFGE) del DNA bacterià cromosòmic prèviament tallat amb els enzims de restricció SmaI, ApaI o XbaI.
5. Detecció de gens de resistència i factors de virulència de *H. influenzae*. En els pacients amb colonització persistent per *H. influenzae* que presentin exacerbacions, es detectarà per PCR la presència dels gens que codifiquen el lipooligosacàrid bacterià (lgtF, lic2A, lic1D, siaA, lic2C, lic3A i lic3B.).
6. Anàlisis estadístic. Mitjançant el programa SPSS es realitzaran les proves estadístiques Xi-quadrat o el test exacte de Fisher. Es considerarà significatiu un valor de $P<0.05$

RESULTATS

S'han cultivat quantitativament els esputs pacients amb MPOC greu i exacerbacions repetides que hagin requerit < de 3 ingressos o 2 ingressos i > 2 visites a urgències per exacerbació de la seva MPOC, tant en fase estable com en fase d'exacerbació.
Fins a la data s'han inclòs en l'estudi un total de 77 pacients. La mitjana d'edat dels pacients fou de 71 anys (54-84). El 94.8% (73/77) dels pacients foren homes.
Els resultats que s'han optes s'expliquen a continuació:

1. Diagnòstic i quantificació de les espècies bacterianes aïllades en esput

El total d'episodis inclosos en l'estudi és de 235, dels que 157 (66.8%) són exacerbacions i 78 (33.2%) fases estables. El 36.36% (28/77) dels pacients presentaren un únic episodi d'exacerbació, el 25.97% (20/77) presentaren dos episodis d'exacerbació, el 9.09% (7/77) presentaren tres episodis, el 9.09% (7/77) presentaren quatre episodis d'exacerbació i el 9.09% (7/77) presentaren més de quatre episodis d'exacerbació. El 10.38% de pacients (8/77) no presenten cap exacerbació.
En els 157 episodis d'exacerbació estudiats els microorganismes aïllats en major freqüència són: *P. aeruginosa* (29.30%), *H. influenzae* (15.92%), *M. catharralis* (12.74%), *S. pneumoniae* (10.19%) i *S. aureus* (5.10%).

Microorganismes	N. mostres	%	Interval quantificació
P. aeruginosa	31	19,75	$100\text{-}2\cdot10^8$
H. influenzae	17	10,83	$4\cdot10^6\text{-}2\cdot10^8$
B. catharralis	11	7,01	$6\cdot10^7\text{-}2\cdot10^8$
S. pneumoniae	9	5,73	$1\cdot10^7\text{-}2\cdot10^8$
S. aureus	5	3,18	$1\cdot10^8\text{-}2\cdot10^8$
E. coli	4	2,55	$2\cdot10^7\text{-}2\cdot10^8$
P. aeruginosa + B. catharralis	4	2,55	$8\cdot10^6\text{-}2\cdot10^7$/ $2\cdot10^7\text{-}2\cdot10^8$
P. aeruginosa + S. pneumoniae	2	1,27	$2\cdot10^6\text{-}3\cdot10^7$/ $8\cdot10^6\text{-}4\cdot10^7$
P. aeruginosa + C. pseudodiphtheriticum	2	1,27	$2\cdot10^7\text{-}1\cdot10^8$/ $2\cdot10^8$
P. aeruginosa + S. aureus	2	1,27	$100\text{-}2\cdot10^6$/ $2\cdot10^7$
H. influenzae + C. pseudodiphtheriticum	1	0,64	$2\cdot10^8$/ $2\cdot10^8$
H. influenzae + B. catharralis	1	0,64	$1\cdot10^7$/ $1\cdot10^7$
S. pneumoniae + H. influenzae	1	0,64	$6\cdot10^7$/ $2\cdot10^8$
S. pneumonia + P. fluorescens	1	0,64	$2\cdot10^6$/ 100
H. influenzae + K. pneumoniae	1	0,64	$2\cdot10^8$/ 100
H. influenzae + P. aeruginosa + M. catharralis	1	0,64	$2\cdot10^8$/<100/ $2\cdot10^8$
B. catharralis + S. aureus + E. coli	1	0,64	$2\cdot10^8$/<100/<100
H. influenzae + B. catharralis + P. stutzeri	1	0,64	100/ $2\cdot10^8$/ 100
S. pneumoniae + H. influenzae + B. catharralis	1	0,64	1·108/2·108/2·108
S. pneumoniae + H. influenzae + P. aeruginosa	1	0,64	$2\cdot10^8$/ $2\cdot10^8$/ <100
S. pneumoniae + P. aeruginosa+ B. catharralis	1	0,64	$3\cdot10^6$/ 100/ $6\cdot10^7$
Altres microorganismes menys freqüents	13	8,28	
Total mostres valorables	111	70,70	

En 20 (12.74%) mostres d'esput es trobà microbiota pròpia de la orofaringe i 26 (16.56%) de mostres d'esput no presentaren la qualitat necessària per a ser sembrats.

En els 78 episodis de fase estable estudiats els microorganismes aïllats en major freqüència són: *P. aeruginosa* (28.20%), *H. influenzae* (11.53%), *M. catharralis* (7.69%), *S. pneumoniae* (6.41%), *S. aureus* (6.41%).

Microorganismes	N. mostres	%	Interval quantificació
P. aeruginosa	18	23,08	$2\cdot10^5\text{-}2\cdot10^8$
H. influenzae	7	8,97	$2\cdot10^7\text{-}1{,}2\cdot10^8$
M. catharralis	4	5,13	$6\cdot10^7\text{-}2\cdot10^8$
S. pneumoniae	3	3,85	$4\cdot10^7\text{-}6\cdot10^7$
S. aureus	2	2,56	$2\cdot10^5\text{-}1\cdot10^7$
E. coli	2	2,56	$<100\text{-}2\cdot10^8$
S. pneumoniae + H. influenzae	1	1,28	$2\cdot10^8$/ $2\cdot10^8$
H. influenzae + M. catharralis	1	1,28	<100/ $2\cdot10^5$
P. aeruginosa + M. catharralis	1	1,28	$2\cdot10^7$/ $2\cdot10^8$
P. aeruginosa + S. aureus	1	1,28	100/ $1\cdot10^7$
S. pneumoniae + S. aureus	1	1,28	$2\cdot10^8$/ $4\cdot10^7$

Altres microorganismes menys freqüents	8	10,26	
Total mostres valorables	49	62,82	

En 13 (16.67%) mostres d'esput es trobà microbiota pròpia de la orofaringe i 16 (20.51%) de mostres d'esput no presentaren la qualitat necessària per a ser sembrats.

2. Proves de sensibilitat antibiòtica

Les soques d' *H. influenzae* aïllades en pacients amb MPOC presenten una sensibilitat a ampicil·lina 95%, amoxicil·lina/clavulànic 100%, tetraciclina 95%, ciprofloxacina 100%, cotrimoxazol 82.5%, cefonicid 100%, cefaclor 100%, cloramfenicol 100%, cefuroxima 100% i un 5% de les soques presentes producció de la betalactamasa cromosòmica.
Les soques de *P. aeruginosa* presenten una sensibilitat antibiòtica a tobramicina (82%), gentamicina (48%), amikacina (96%), ciprofloxacina (55%), ofloxacina (45%), cefotaxima (39%), ceftazidima (93%), cefepime (82%), aztreonam (82%), imipenem (84%) i meropenem (91%).

3. Tipificació dels microorganismes

De cada episodi on s'aïllà *H. influenzae*, s'aïllaren 8 colònies diferents per a l'estudi de possible policlonalitat de l'episodi. Les diferents soques es genotiparen per camp polsat. En els pacients amb aïllaments repetits es realitzà el camp polsat de les 8 colònies.
S'han genotipat per electroforesis de camp polsat 30 de les 43 soques de H. influenzae aïllades en 31 pacients amb MPOC. S'han trobat 26/30 patrons de PFGE diferents. En 21 pacients amb un únic episodi d' EAMPOC per H. influenzae, les 21 soques aïllades foren genotípicament diferents. Vuit pacients presentaren dos episodis d' EAMPOC (5 pacients amb un genotip diferent en cada episodi i 3 amb el mateix genotip en els dos episodis). Dos pacients presentaren 3 episodis de EAMPOC (1 pacient amb 3 genotips diferents i un altre pacient amb dos genotips d' H. influenzae diferents).
Per determinar si en cada episodi d' EAMPOC s'aïllava més d'una soca d' H. influenzae, es tipificaren 8 colònies d' H. influenzae en cada episodi i només en un cas es detectaren dos genotips diferents.
S'han aïllat un total de 105 soques de *P. aeruginosa* aïllades en 40 pacients on s'han trobat 55 genotips diferents. El 62% dels pacients tingueren episodis d' EAMPOC causats per un únic genotip, el que era diferent als genotips presents en els altres pacients; en el 22% dels pacients s'observà una substitució entre dos soques diferents, de forma que una nova soca desplaçava a la soca inicial; pacients als que se'ls identificaren genotips diferents en un mateix episodi i que es produïa una alternança d'aquests genotips durant el temps estudiat.

El segon any d'estudi s'afegí un **nou objectiu**, la caracterització de soques de *H. influenzae* no tipables aïllades en pacients amb pneumònia adquirida a la comunitat.

4. Caracterització de soques de *H. influenzae* no tipables aïllades en pacients amb pneumònia adquirida a la comunitat.

S'ha estudiat una col·lecció de 91 soques d' *H. influenzae* no tipables aïllades en 88 pacients adults amb pneumònia no bacterièmica adquirida a la comunitat (NAC) a l' Hospital Universitari de Bellvitge. Totes les soques foren aïllades en mostres d'esput recollits entre els anys 1997 i 2009.
La majoria (70%) dels episodis de NAC tingueren lloc en persones majors de 65 anys d'edat i 27 (29%) dels episodis ocorregueren en pacients amb MPOC. Pel que fa al sexe dels pacients, el 70% foren homes i la mortalitat trobada fou del 7.9%.
La sensibilitat antibiòtica de les 91 soques fou: ampicil·lina 70%, amoxicil·lina/clavulànic 94%, cefuroxima 96%, cefotaxima 100%, azitromicina 100%, tetraciclina 100%, ciprofloxaciona 100% i cotrimoxazol 67%. De les 27 (30%) de les soques resistents a ampicil·lina, 10/27 (37%) sintetitzen β-lactamasa i de les 17/27 (63%) són β-lactamasa negatives però presenten un baix nivell de resistència a l'ampicil·lina (CMI de 2µl/ml).

S'han trobat dos patrons de lipooligosacàrid majoritaris: 53% Patró 1 (*lgtF*+, *lic2A*+, *lic3A*+, *lic3B*+, *siaA*- , *lic2C*+) i 42% Patró 2 (*lgtF*+, *lic2A*+, *lic3A*+, *lic3B*+, *siaA*- , *lic2C*-). No s' han trobat diferències entre els patrons de LOS dels NT-Hi que causen NAC en pacients amb MPOC comparat amb els pacients no MPOC.
De les 91 soques de NT-Hi s'han trobat 82 patrons de camp polsat diferents (figura 1). A més, a 70 soques se'ls ha realitzat la determinació del sequence type (ST). S'han trobat 44 STs diferents on 14 (20%, 14/70) d'ells foren nous STs. Després de l'anàlisi del e-burst (figura 2) es trobaren 7 grups. Cinc d'aquests foren grups minoritaris que agrupaven dos aïllats cadascun, en canvi, els dos grups restants agruparen nou aïllats cadascun:

- El grup 1 inclou 3 aïllats del ST 11, 1 aïllats del ST 103, 2 aïllats del ST 139 i 3 aïllats del ST 145.
- El grup 7 inclou 7 aïllats del ST 159 i 2 aïllats del ST 819.

Figura 1. Gran diversitat de patrons de camp polsat (PFGE) de les soques de NTHi aïllades de pacients amb NAC.

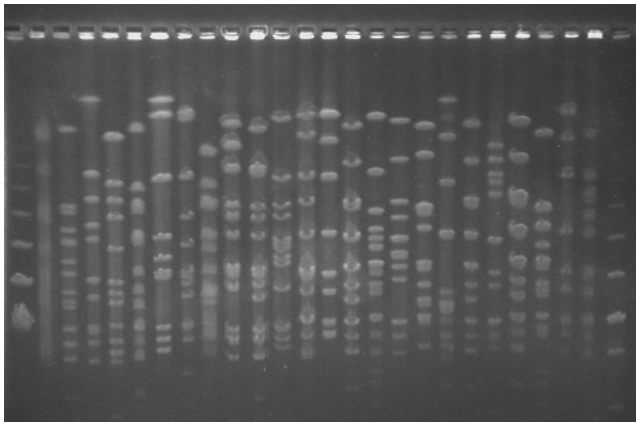
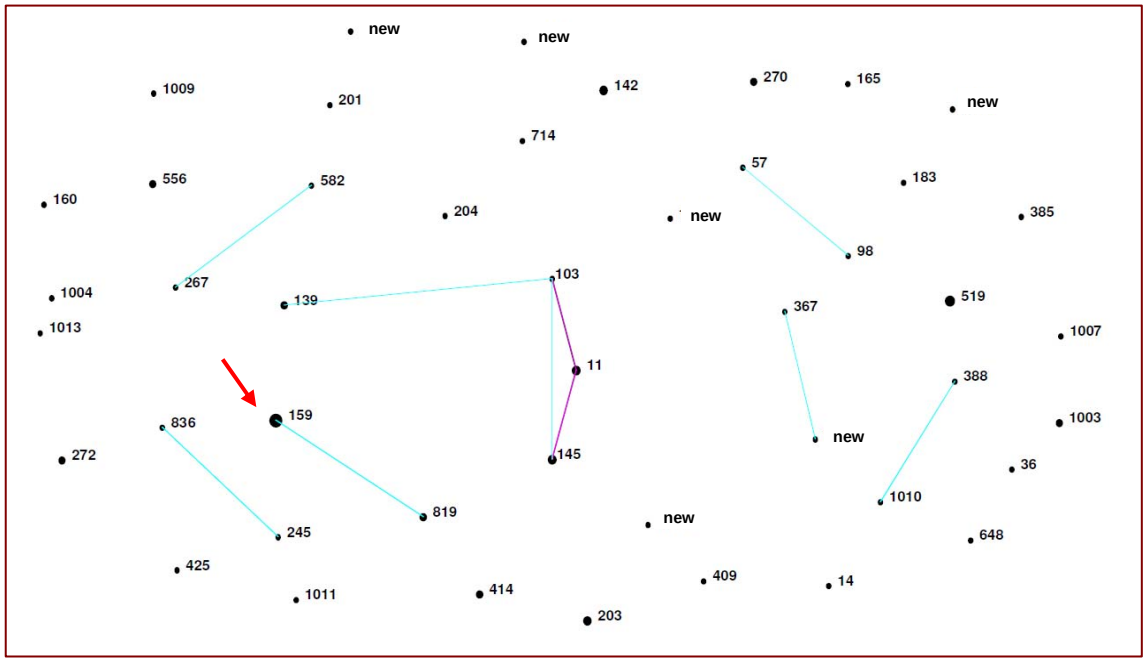


Figura 2. Anàlisis per e-burst de les 70 soques de NTHi estudiades per MLST.



Conclusions: La majoria d' episodis de NTHi-NAC tingueren lloc en pacients d'edat avançada amb alguna malaltia de base. A pesar d' existir una gran diversitat clonal entre les soques de NTHi, només es detectaren dos patrons de virulència majoritaris.