



Coneixem la Patogènia de Staphylococcus aureus? Implicacions en el tractament

Cristina Prat Aymerich
Octubre 2015

crisprat2010@gmail.com



Sumari

1. El microorganisme
2. Proteïnes de superfície, proteïnes secretades i sistemes reguladors
3. Cicle de vida parcialment intracel·lular?
4. Resposta inflamatòria
5. Mecanismes d'acció dels fàrmacs i interaccions amb els mecanismes de patogenicitat
6. Noves aproximacions terapèutiques a partir de la patogènia

El microorganisme: *Staphylococcus aureus*

Cocs grampositius

Gènere *Staphylococcus*

Gènere *Streptococcus*

Gènere *Enterococcus*

Estafilococs.

Agrupació en acúmul irregulars

(*Staphylè* = carroll de raïm)

Immòbils. No formen espores.

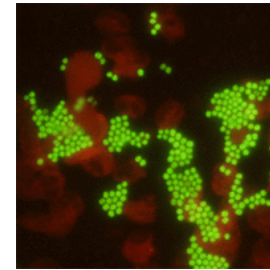
Alguns produeixen una càpsula polisacàrida



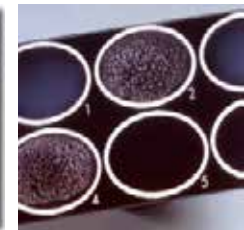
Poc exigents des del punt de vista nutritiu.

Creixen en medis ordinaris

Medi selectiu. Chapman.
10 % ClNa. Manitol



Fermenten alguns sucres. **CATALASA POSITIUS**
(diferència amb els estreptococs)



capacitat de coagular el plasma (convertir el fibrinogen en fibrina) (**COAGULASA**)



Pigment daurat, beta-hemòlisi

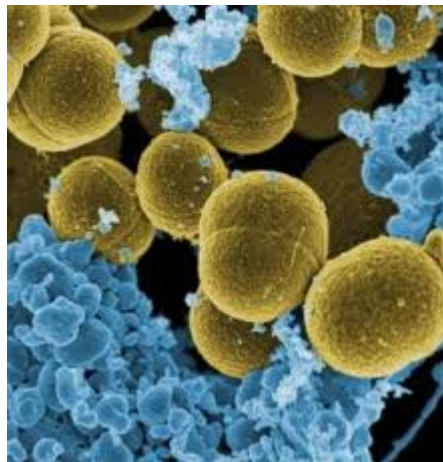
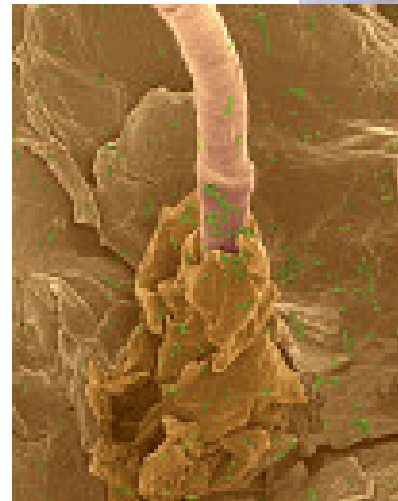
Hàbitat natural estafilococs

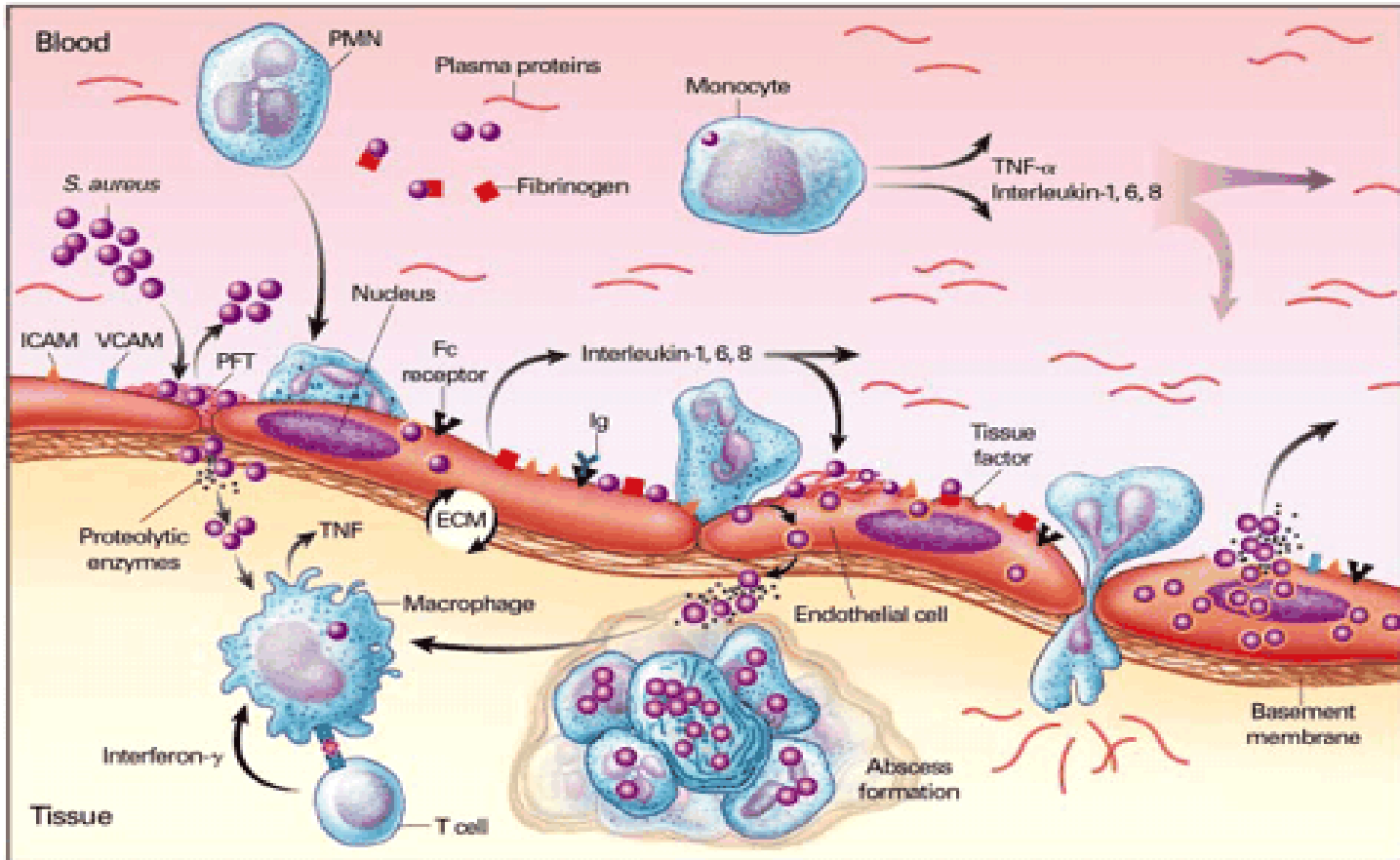
Pell i mucoses de l'home,
Altres mamífers i aus

Reservori *S.aureus*: vestíbul
anterior de les fosses nasals

Portadors persistents: 10-30%

Portadors intermitents: 20-75%





Lowy NEJM 1998

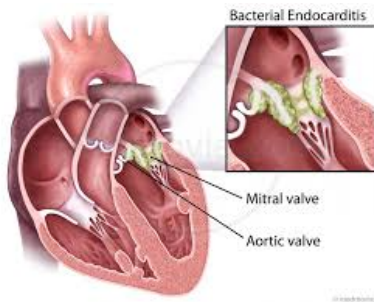
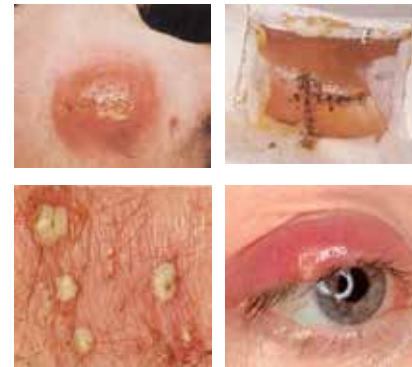
Microorganisme **piogen**: lesions supuratives.
 Multiplicació local i secreció enzims per intentar invasió a distància

Infecció estafilocòccica

1. Infeccions supurades locals
 2. Regionalització (limfadenitis)
 3. Disseminació amb sèpsia greu
- Metàstasis a distancia amb cert organotropisme

Infecció supurada local

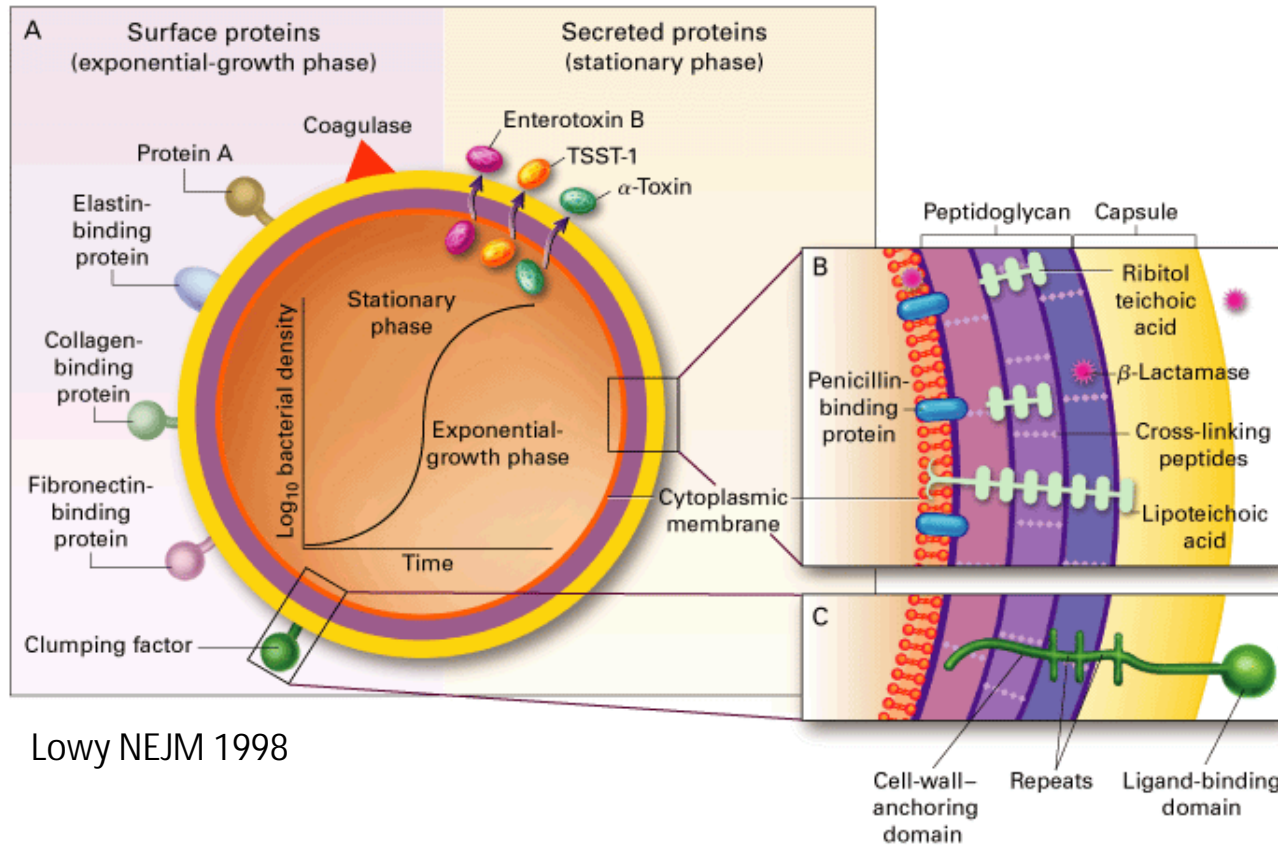
Foliculitis, impetigen, infecció de ferida,
Dacriocistitis, cel·lulitis orbitària



Infecció disseminada

Bacterièmia, osteomièlitis, abscessos,
Empiema, endocarditis

Staphylococcus aureus: factors de virulència



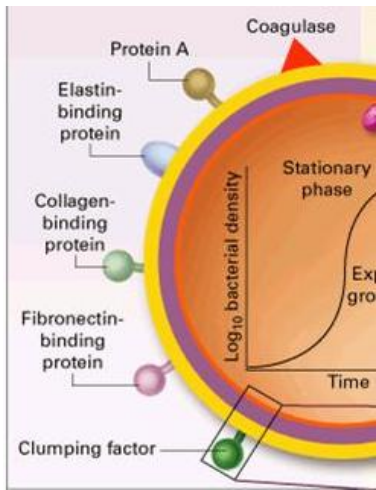
Lowy NEJM 1998

Proteïnes de superfície
Proteïnes secretades, toxines
Proteïnes immunomoduladores

Sistemes de regulació *quorum sensing*

Mecanisme invasiu
Mecanisme toxigènic
Mecanisme immunopatogènic

Proteïnes de superfície



■ Components de la paret:

Adhesines: proteïna fixadora de fibronectina, proteïna fixadora de col·làgena (**adhesió** als teixits)

Factor d'agregació (*clumping factor*)

Proteïna A (activació del complement, bloqueig Fc de les IgG)

■ Càpsula polisacàrida:

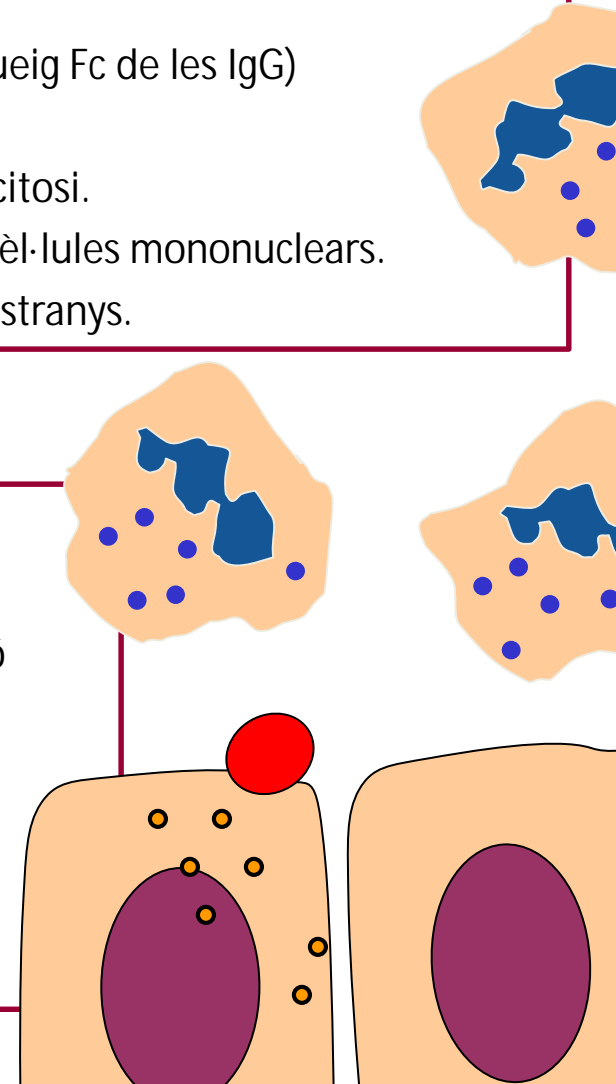
Inhibeix la quimiotaxi i la fagocitosi.

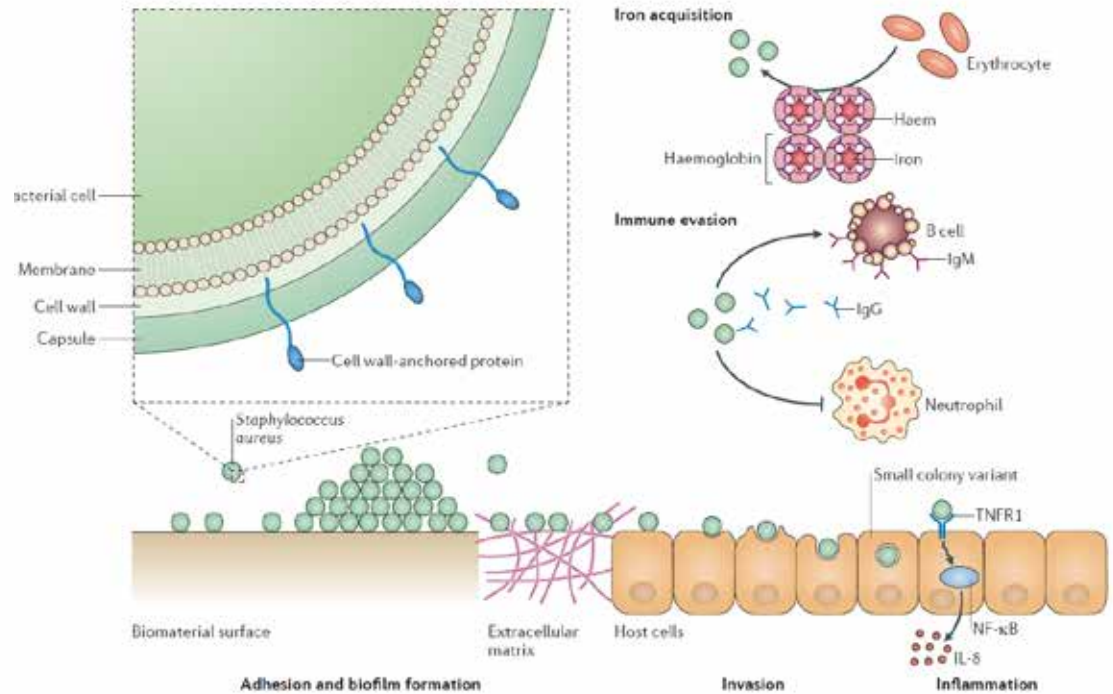
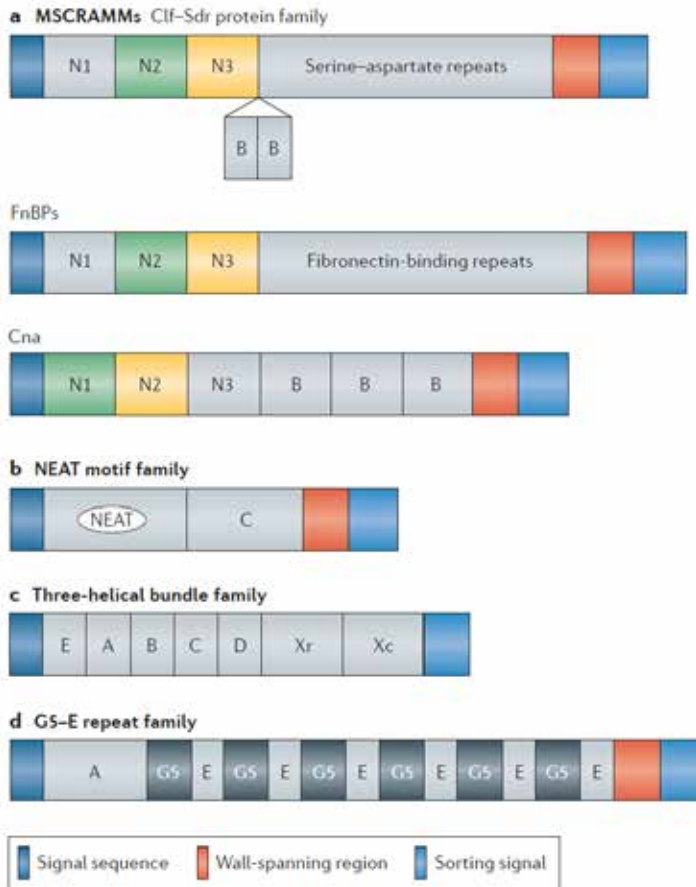
Inhibeix la proliferació de les cèl·lules mononuclears.

Facilita l'adherència a cossos estranys.

Enzims: Faciliten la **invasió** dels teixits

- **Catalasa:** desdoblament H_2O_2 , tòxic pel microorganisme
- **Coagulasa:** convertir fibrinogen en fibrina. Evasió fagocitosi?
- **Hialuronidasa:** hidròlisi àcid hialurònic del teixit connectiu
- **Penicil·linaasa:** hidròlisi de l'anell b-lactàmic de la penicil·lina
- Altres: lipases, nucleases, etc





Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*

Timothy J. Foster¹, Joan A. Geoghegan¹, Vannakambadi K. Ganesh² and Magnus Höök²

Nature Reviews Microbiology 2014



Adherència a focus metastàsics, alguns tipus més preferència endocardi
Clumping factor, estat protrombòtic
 Formació de **biofilm**
 Major supervivència al torrent sanguini
Redundància funcional

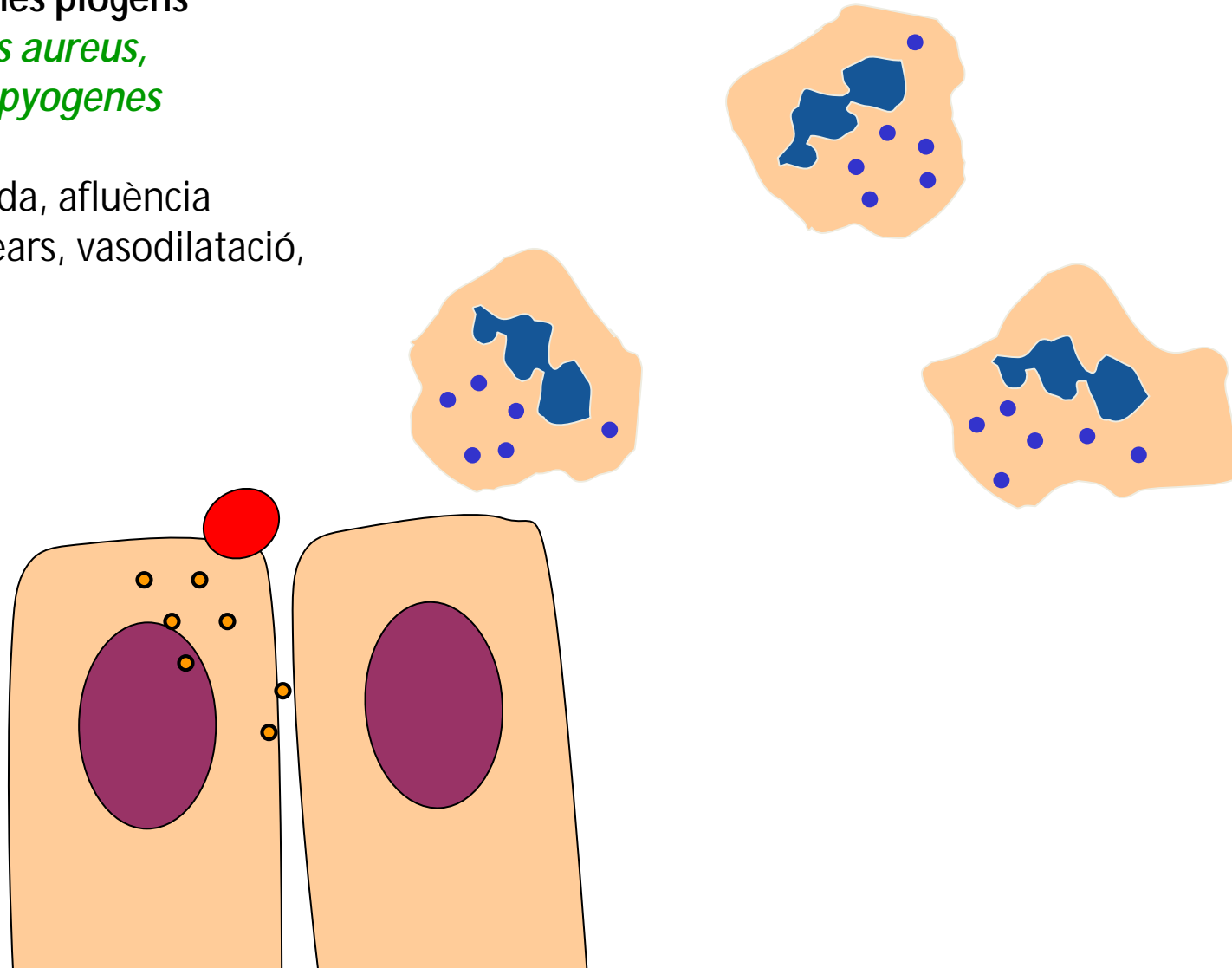
"Prototip" Multiplicació extracel·lular. Infeccions invasives

Microorganismes piògens

Staphylococcus aureus,

Streptococcus pyogenes

Inflamació aguda, aflluència
polimorfonuclears, vasodilatació,
supuració



Proteïnes secretades, mecanisme toxigènic

Citotoxicitat, destrucció cel·lular

- Gastroenteritis (toxoinfeccions alimentàries)

Enterotoxines formades als aliments



- Síndrome de la "pell escaldada"

Exfoliatines. Dos tipus:

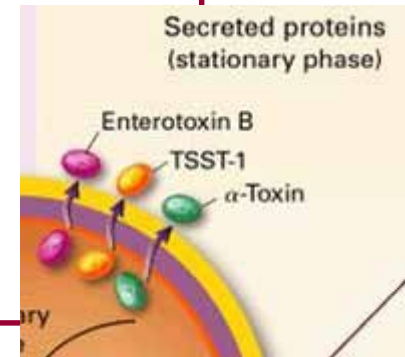
ETA (termoestable i de codificació cromosòmica) i **ETB** (termolàbil i de codificació plasmídica)

- Síndrome del "shock tòxic"

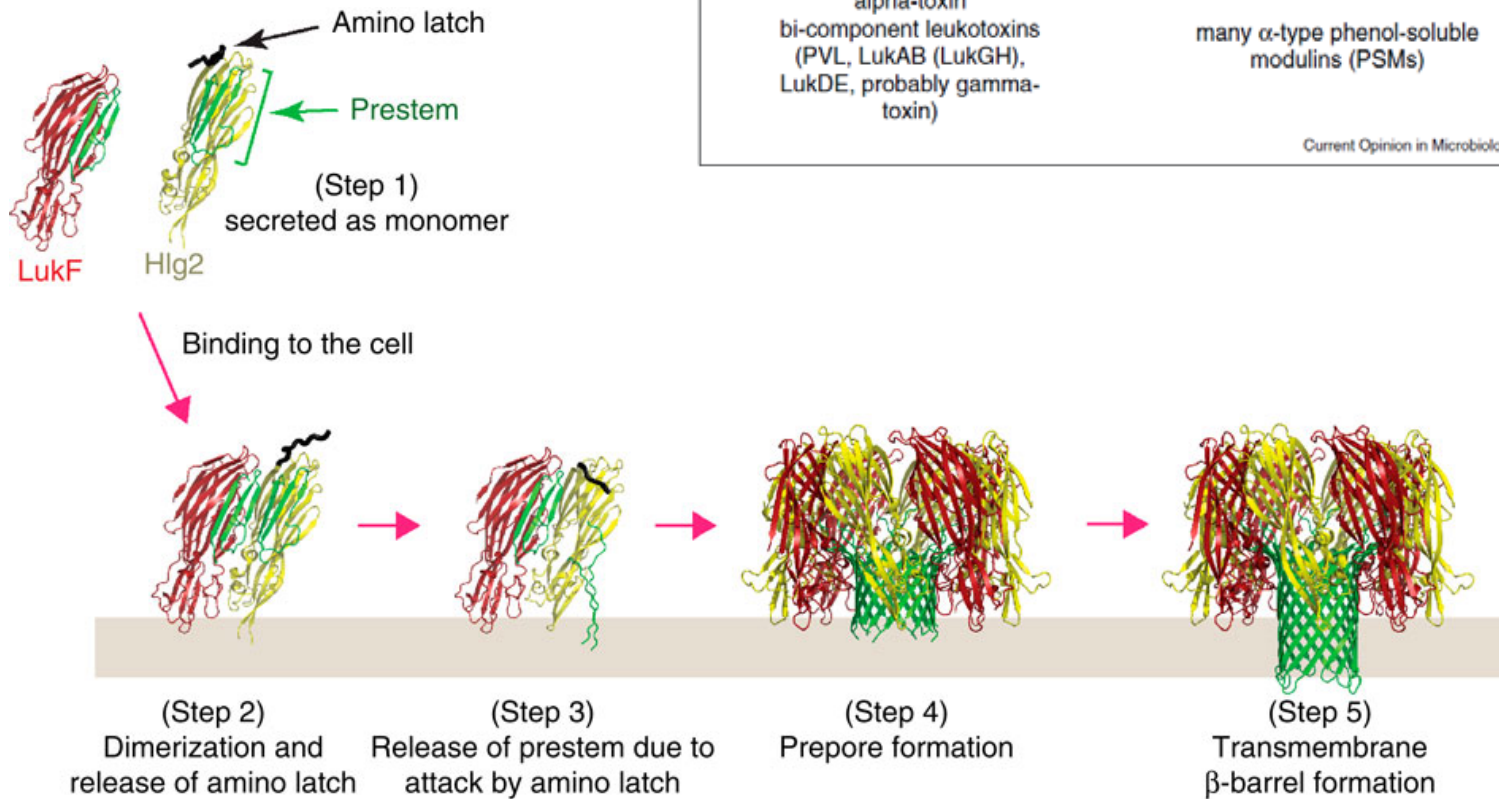
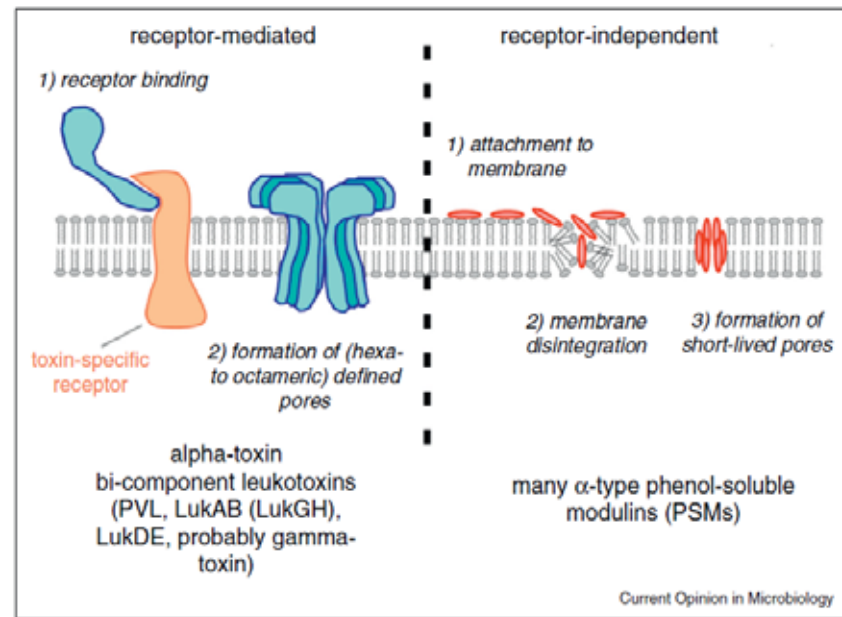
Toxina (TSST-1) de codificació cromosòmica

- Citotoxines

a, b, d, gi leucocidines (ex. Panton-Valentine),

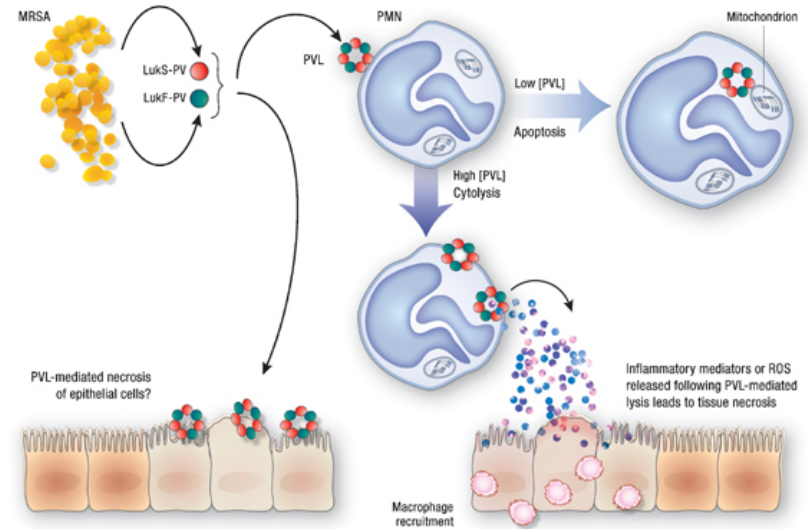


Proteínas formadoras de poros,
Beta-barrel









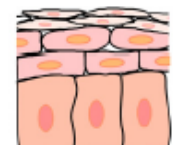

Panton Valentine leukocidin

Lesions necrotizants pell i parts toves i pneumònia
Receptor C5aR



Alpha-toxin

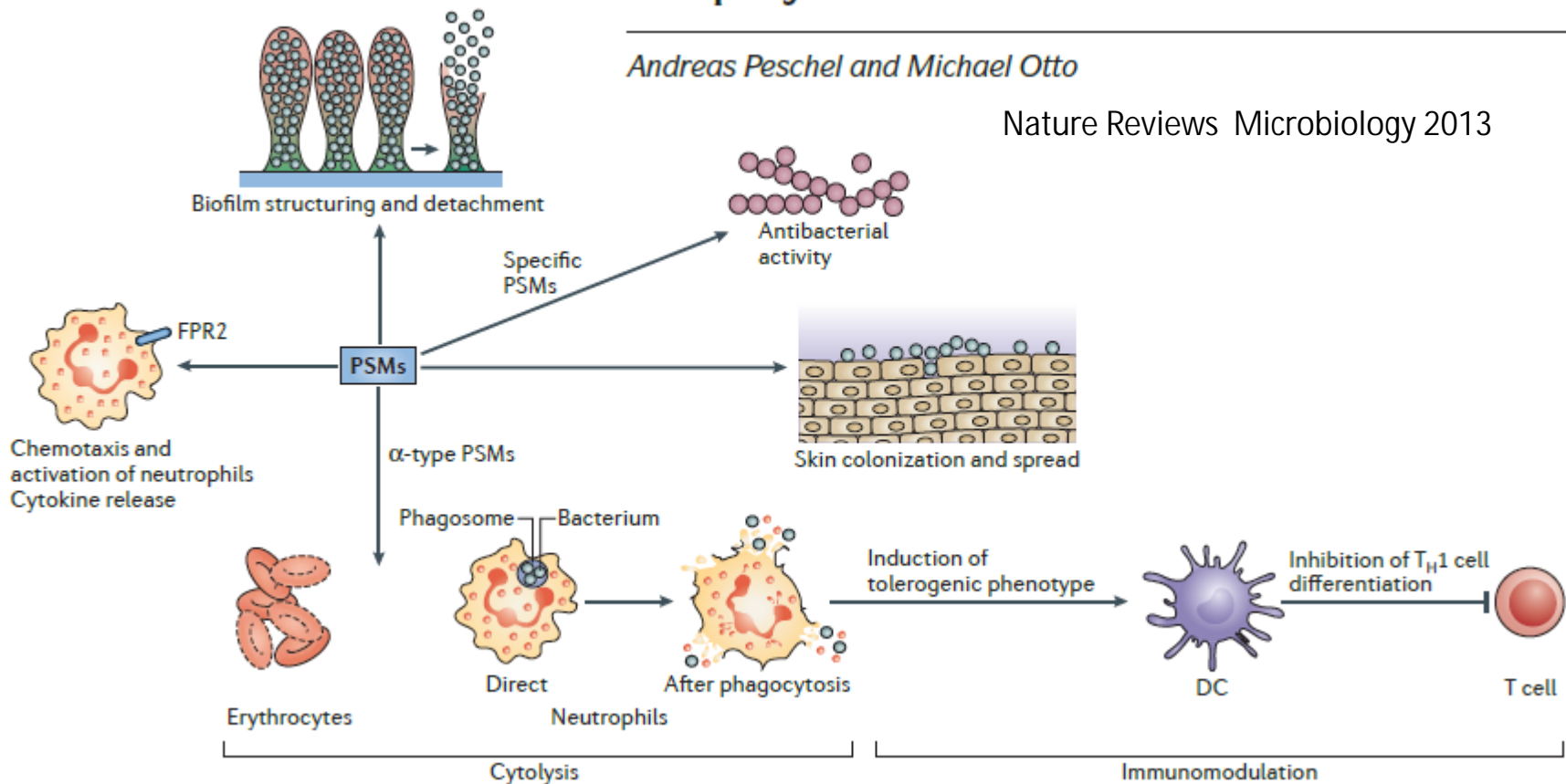
Prototip toxines formadores de porus
lisi hematies però també disrupció tissular
cèl·lules endotelials, epitelials, cèl·lules T,
macròfags, neutròfils

								
	erythrocytes	platelets	monocytes	neutrophils	T cells	pneumocytes	keratinocytes	endothelial cells
α-toxin concentration	lysis (human)	lysis	lysis	lysis	lysis	lysis	lysis	lysis
	lysis (mouse)	aggregation	apoptosis	chemokine secretion	apoptosis	apoptosis	↑EGFR-dependent proliferation	apoptosis
	lysis (rabbit)	↓interaction with clotting factors/ECM	↓phagocytosis	inflammasome activation	cytokine secretion	focal adhesion disruption	cytokine secretion	neutrophil adhesion
		activation	inflammasome activation		activation/proliferation	barrier disruption	p38 MAPK activation	cytokine, NO release
						barrier disruption	barrier disruption	barrier disruption

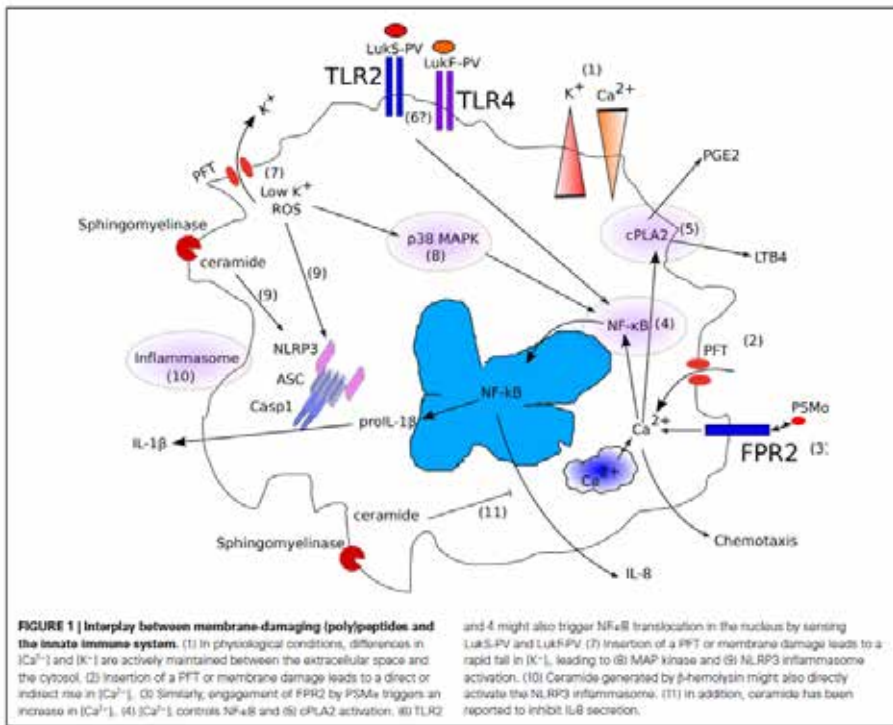
Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection

Andreas Peschel and Michael Otto

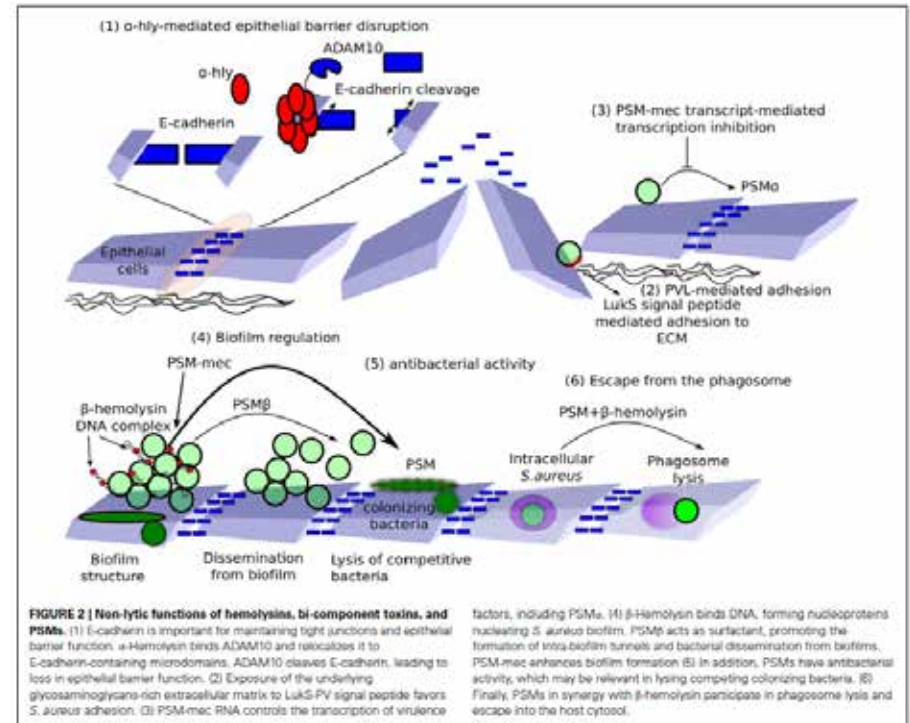
Nature Reviews Microbiology 2013



Codificades al genoma *core*, excepte PSM-mec
Activitat citolítica en qualsevol tipus de cèl·lula
Regulades per *accessory gene regulator (agr)*
Major activitat en CA-MRSA



and 4 might also trigger NF- κ B translocation in the nucleus by sensing LukS-PV and LukF-PV. (7) Insertion of a PFT or membrane damage leads to a rapid fall in $[K^+]$, leading to (8) MAP kinase and (9) NLRP3 inflammasome activation. (10) Ceramide generated by β -hemolysin might also directly activate the NLRP3 inflammasome. (11) In addition, ceramide has been reported to inhibit IL8 secretion.



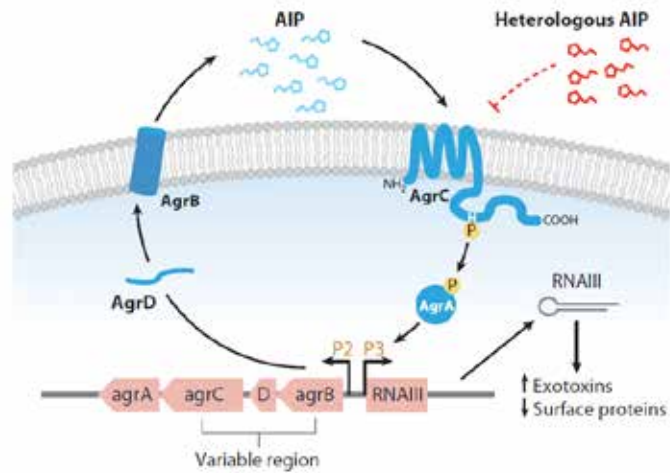
and PSMs. (1) E-cadherin is important for maintaining tight junctions and epithelial barrier function. α -Hemolysin binds ADAM10 and relocates it to E-cadherin-containing microdomains. ADAM10 cleaves E-cadherin, leading to loss in epithelial barrier function. (2) Exposure of the underlying glycosaminoglycan-rich extracellular matrix to LukS-PV signal peptide favors *S. aureus* adhesion. (3) PSM-mec RNA controls the transcription of virulence

factors, including PSMs. (4) β -Hemolysin binds DNA, forming nucleoproteins nucleating *S. aureus* biofilm. PSM δ acts as surfactant, promoting the formation of intra-biofilm tunnels and bacterial dissemination from biofilms. PSM-mec enhances biofilm formation (5) In addition, PSMs have antibacterial activity, which may be relevant in lysing competing colonizing bacteria. (6) Finally, PSMs in synergy with β -hemolysin participate in phagosome lysis and escape into the host cytosol.



Staphylococcus aureus hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors?

François Vandenesch^{1,2,3*}, G. Lina^{1,2,3} and Thomas Henry^{1,2*}

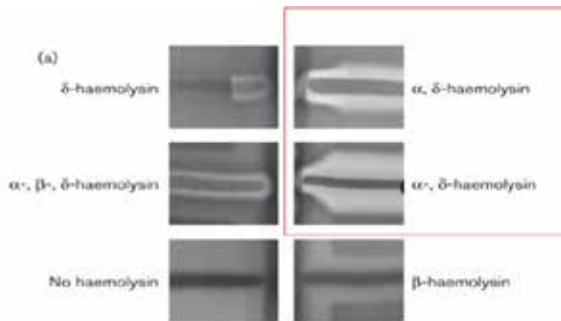


Sistemes reguladors secreció factors de virulència

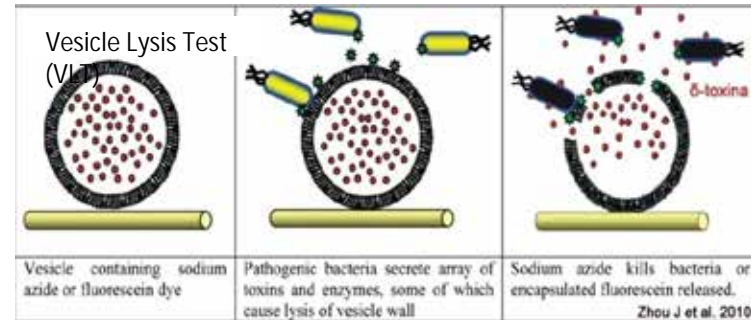
agr (accessory gene regulator)

sigB (sigma B)

sarA (staphylococcal accessory regulator)



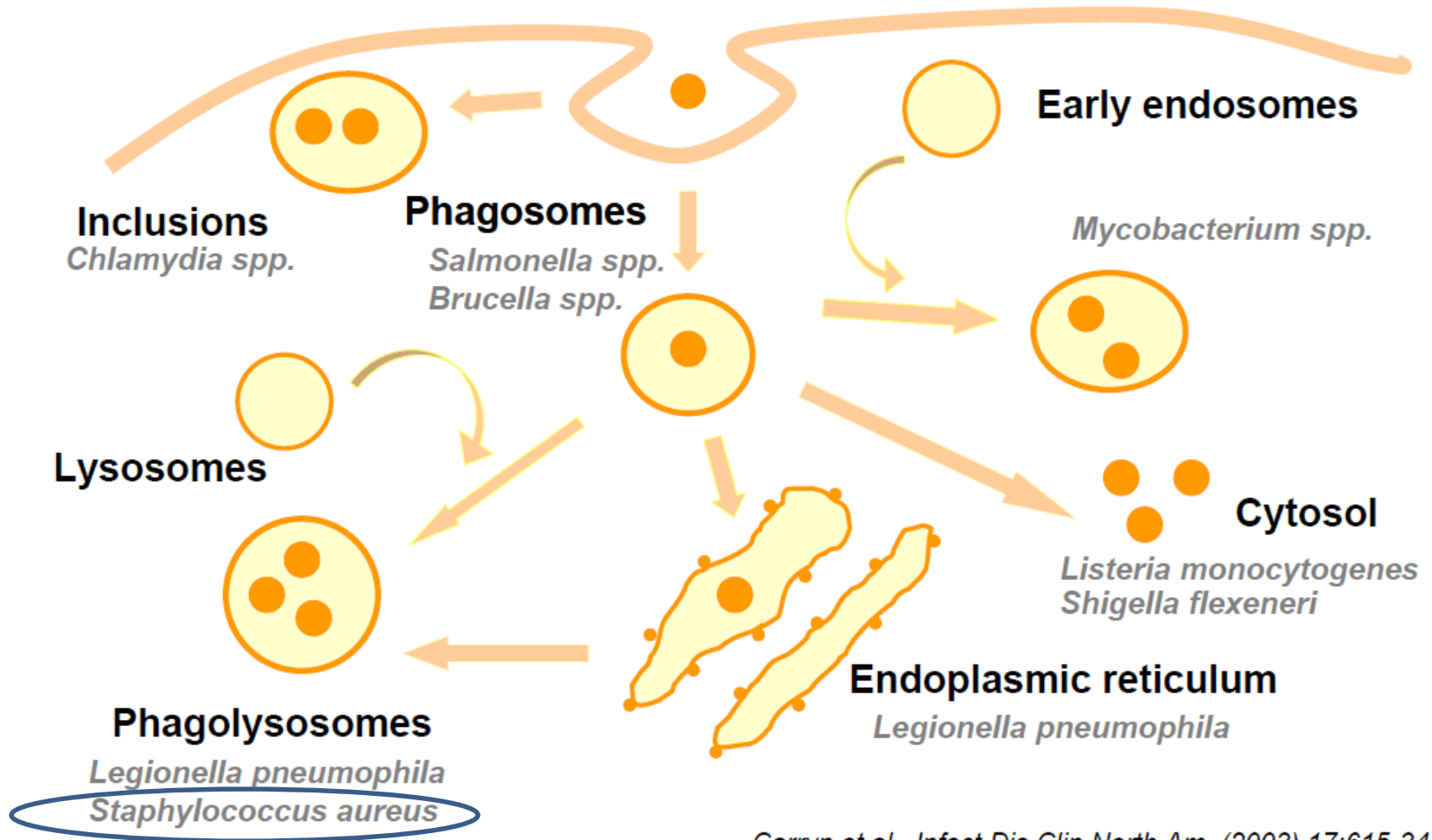
Traber 2008



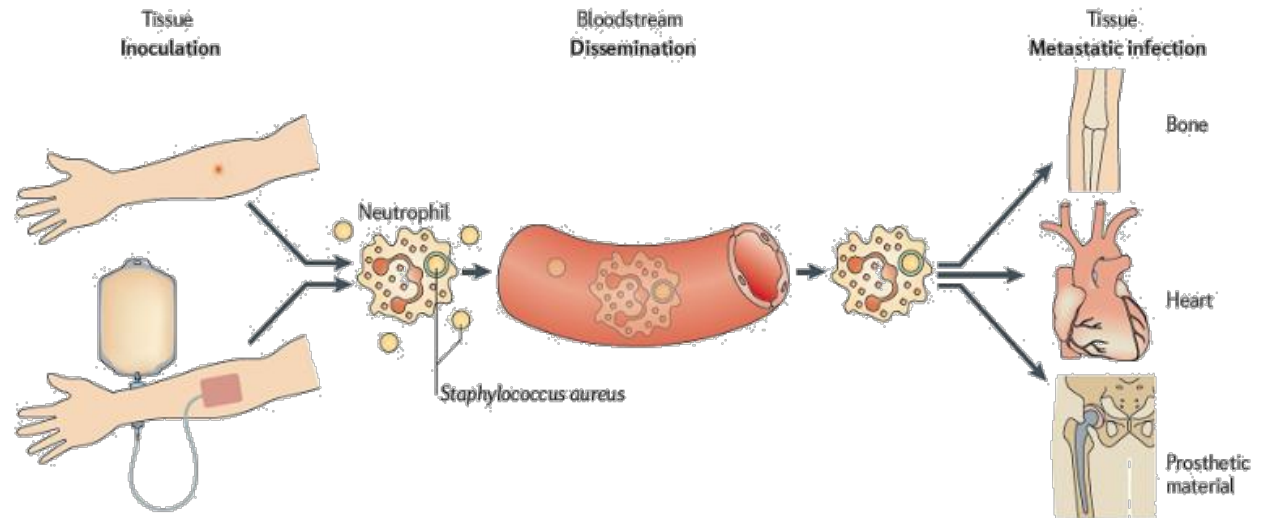
agr: augment expressió proteïnes secretades, disminució proteïnes superfície
 Activat per feromones d'autoinducció (AIP), sistema *quorum sensing*
 Disfunció *agr*: alteració síntesi paret, formació de biofilms, augment resistència vancomicina, bacterièmia persistent

sigB: augment expressió proteïnes superfície, disminució secretades

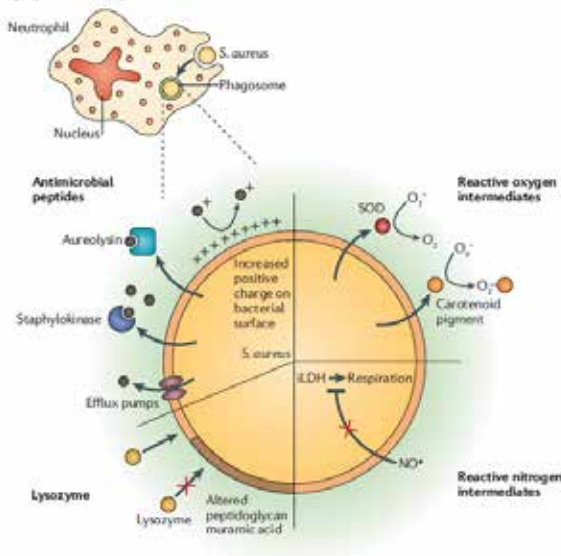
Cicle de vida parcialment intracel·lular?



Focus extracel·lulars i intracel·lulars??



Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*



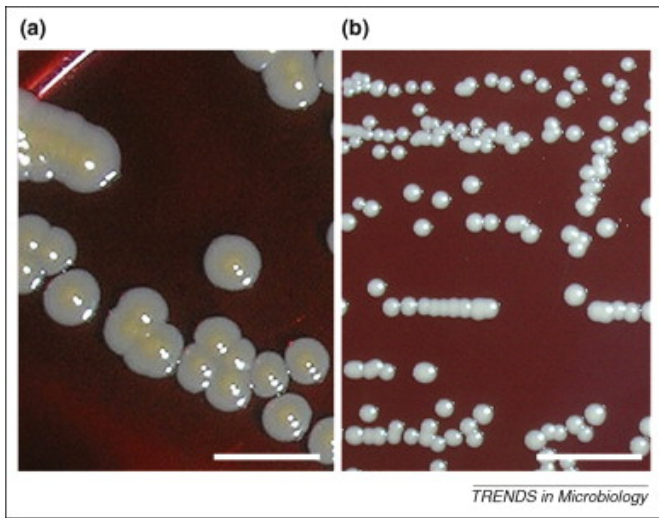
OPINION

Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*?

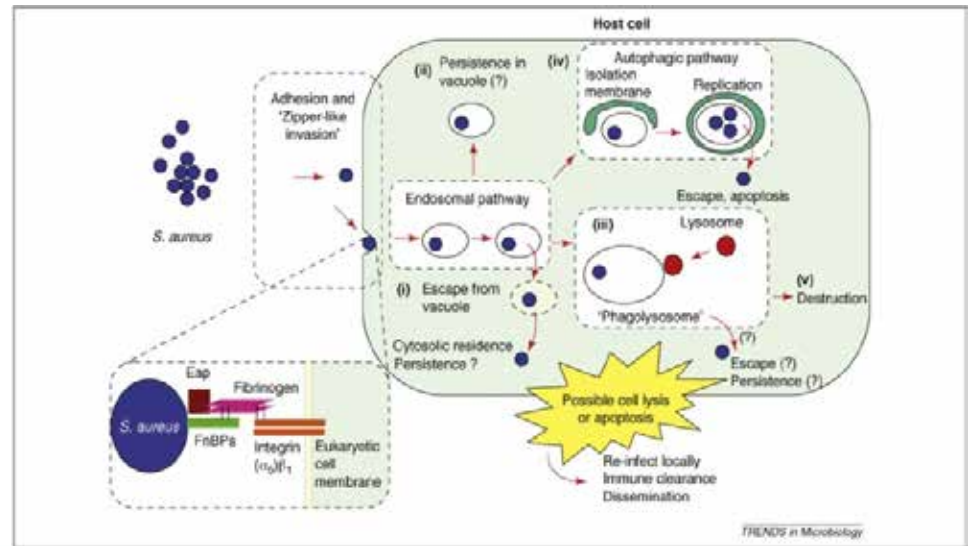
Guy E. Thwaites and Vanya Gant

Nature Reviews Microbiology 2011

Beneficis intracel·lularitat: protecció, persistència, invasió

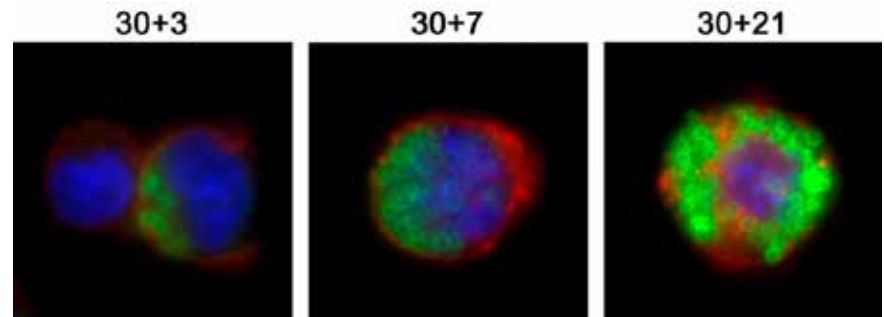
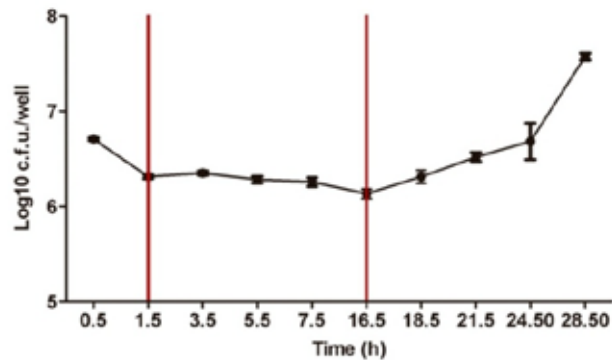


The role of small colony variants
Trends in Microbiology 2009



Staphylococcus aureus: new evidence for intracellular persistence

Christian Garzoni¹ and William L. Kelley² *Trends in Microbiology 2009; 17 (2):59-65*



Characterization of intracellular life stage of *Staphylococcus aureus*. Involvement in treatment and outcome of staphylococcal infections.

FIS Exp PI13/01418. 2014-2016.

Resposta inflamatòria

Fenomen dinàmic



Host

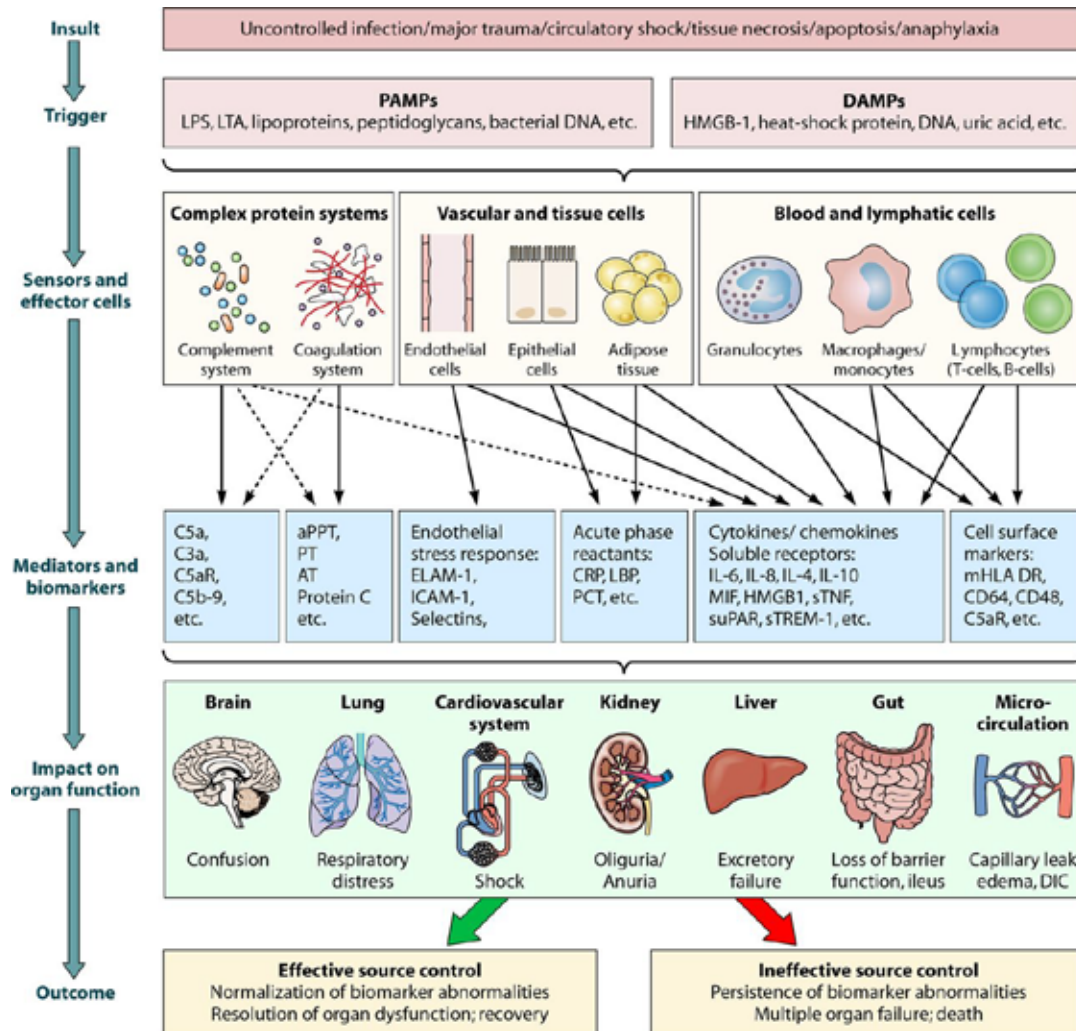
Importance and function of the organ,
Age, immune status, comorbidities
Antimicrobial treatment
Genetic polymorphisms

Microorganism

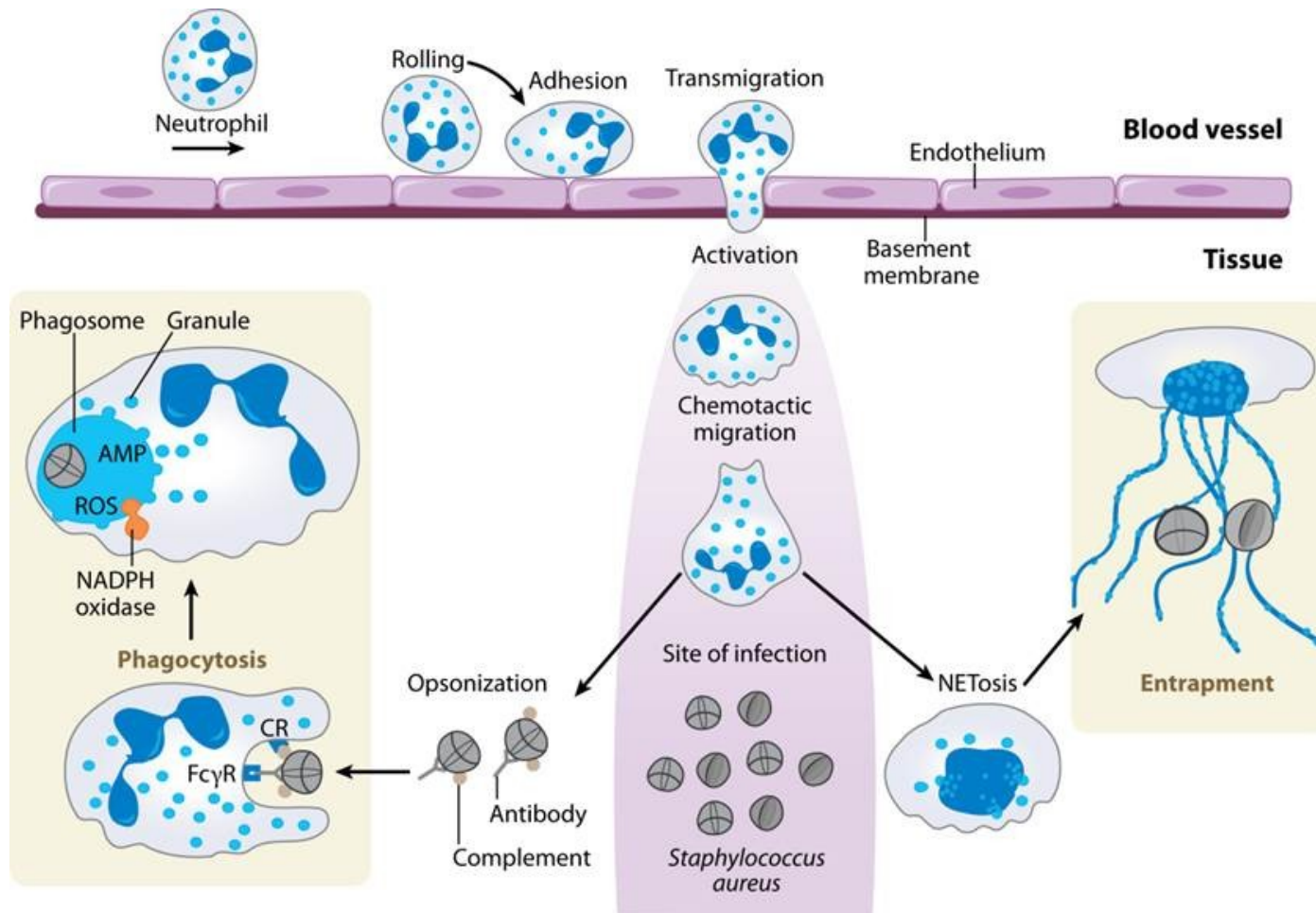
Genus, strain, virulence factors
Immune evasion mechanisms,
Innoculum size,
extra/intracellular



The inflammatory response



Konrad Reinhart et al. Clin. Microbiol. Rev. 2012;25:609-634



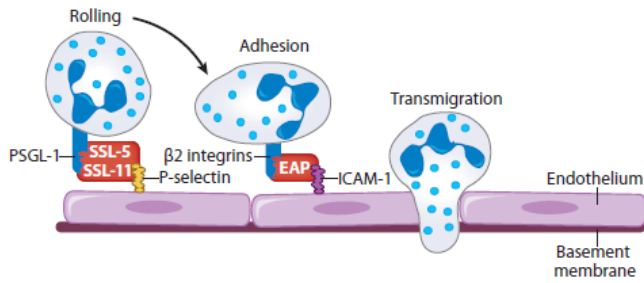
Neutrophils Versus *Staphylococcus aureus*: A Biological Tug of War*

Andr s N. Spaan, Bas G.J. Surewaard, Reindert Nijland,
and Jos A.G. van Strijp

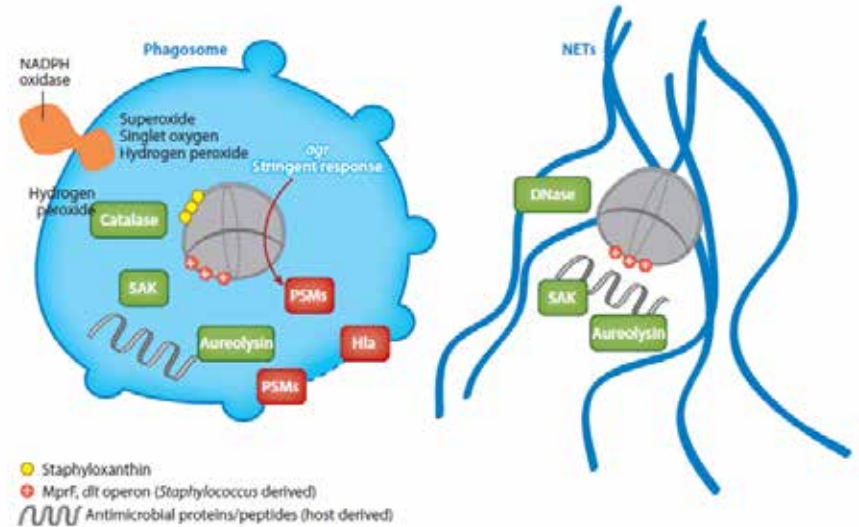
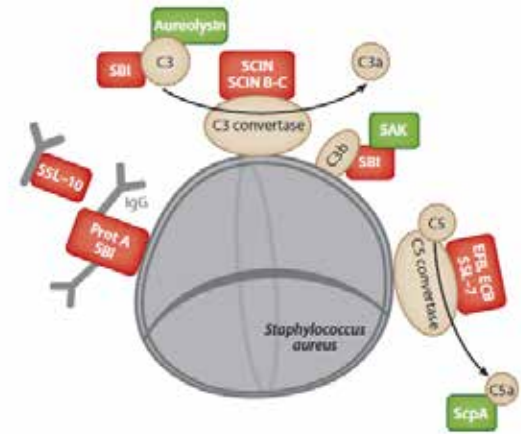
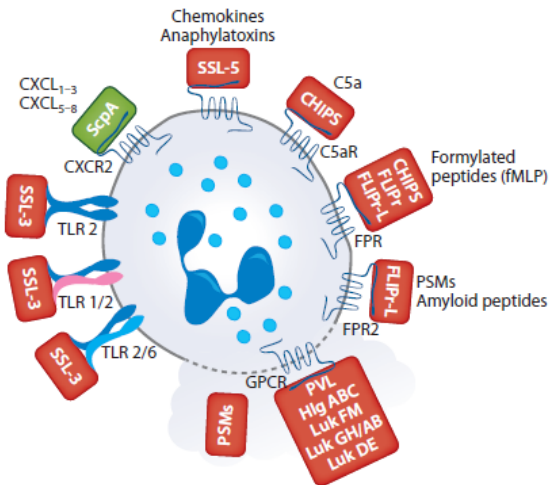
Rev Microbiol 2013

Evasió de la immunitat

a Evading extravasation



b Neutrophil attack and evading activation



Evasió del complement

Estafilocinasa
Extracellular fibrinogen binding protein
Staphylococcal complement inhibitor

Evasió dels peptids antimicrobians

Estafilocinasa

Evasió dels anticossos

Proteïna A
(bloqueig fracció Fc de les IgG)

Evasió del reclutament de neutròfils

Extracellular adherence protein
Chemotaxis inhibitory protein
FPR-like 1 inhibitory protein

Modulació resposta adaptativa

Alfa-toxina: dany cel·lular a monòcits, cèl·lules B i cèl·lules T
Alteració senyalització entre innata i adaptativa via IL17A
Accés citosòlic al lligand intracel·lular del peptidoglicà NOD2
Regulació inflamàsoma

Receptors específics hostatger, **polimorfismes genètics** que determinen susceptibilitat

Acció dels fàrmacs

Sabem que:

- Importància eradicació del focus
- Necessitat de tractament perllongat
- Beta-lactàmics millor que glicopèptids, també MSSA

El/s fàrmac/s



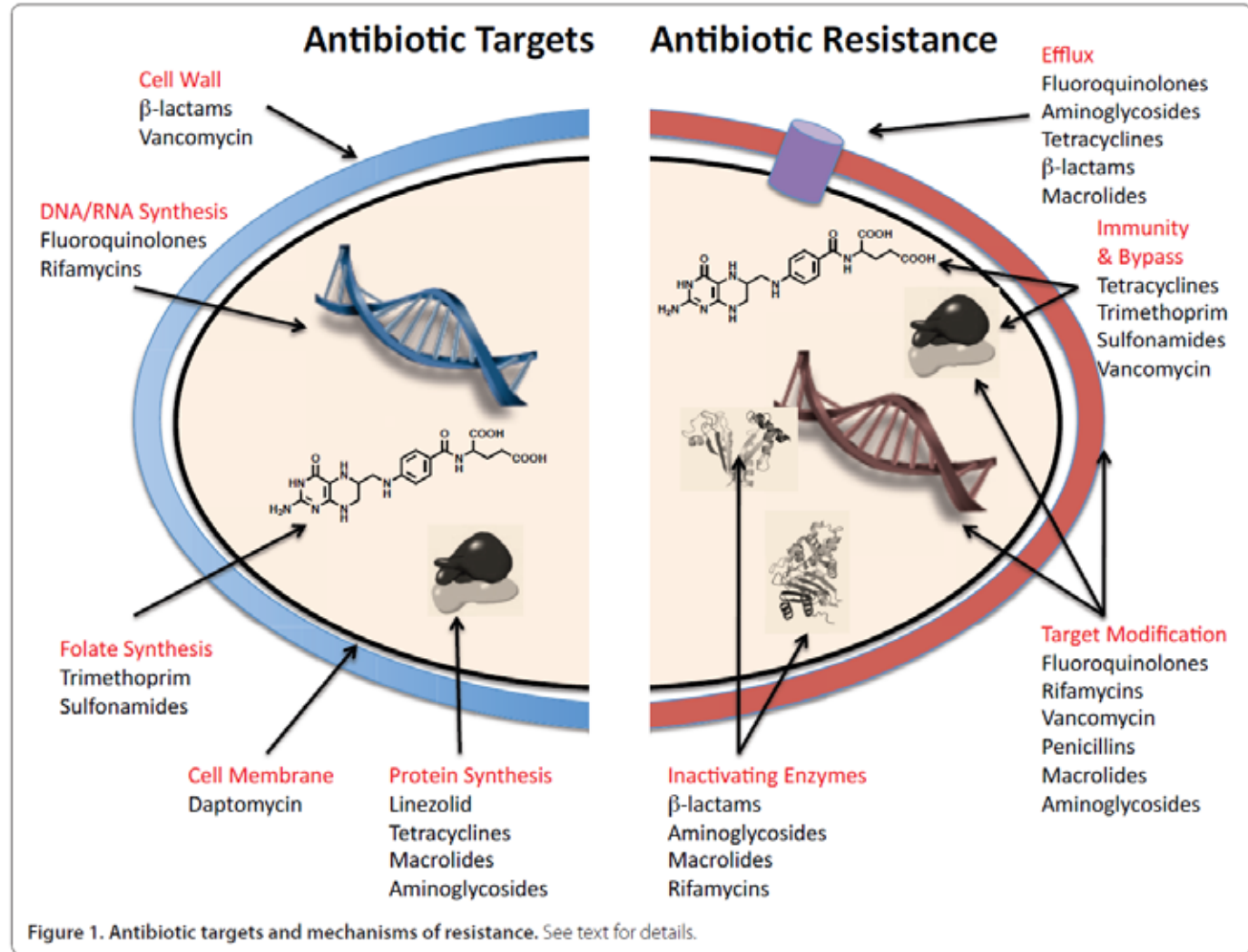
El microorganisme



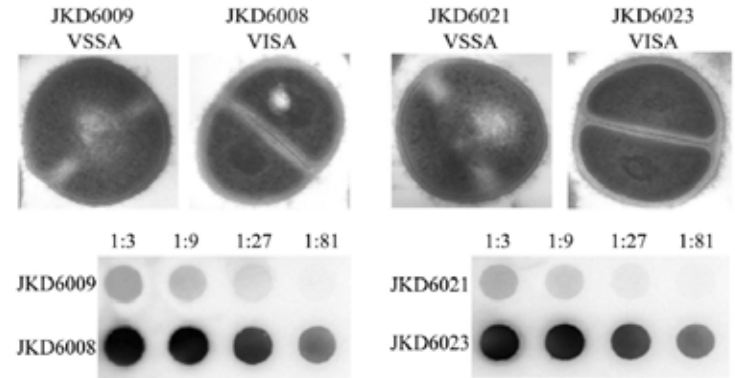
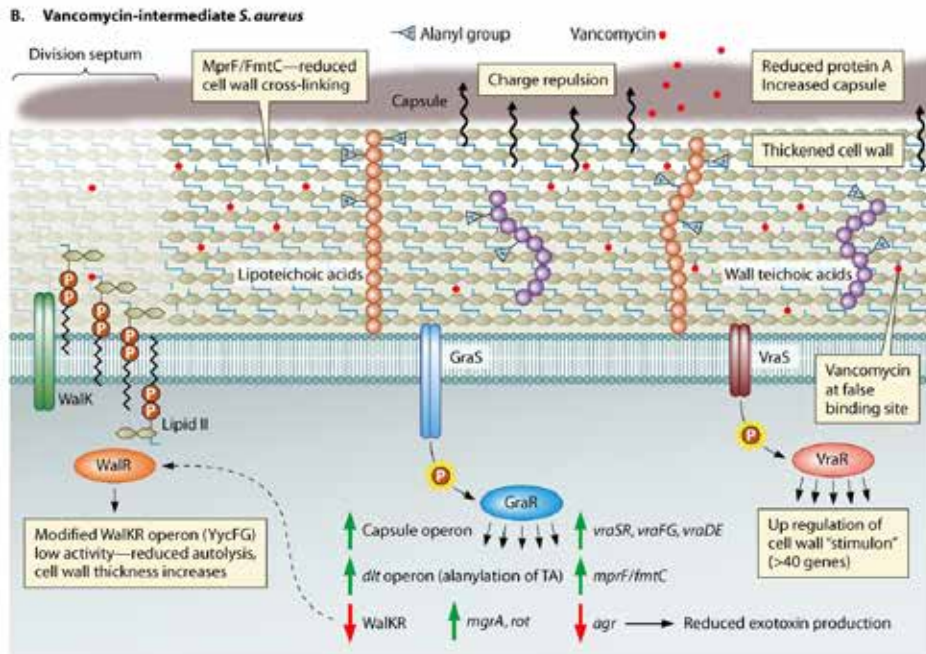
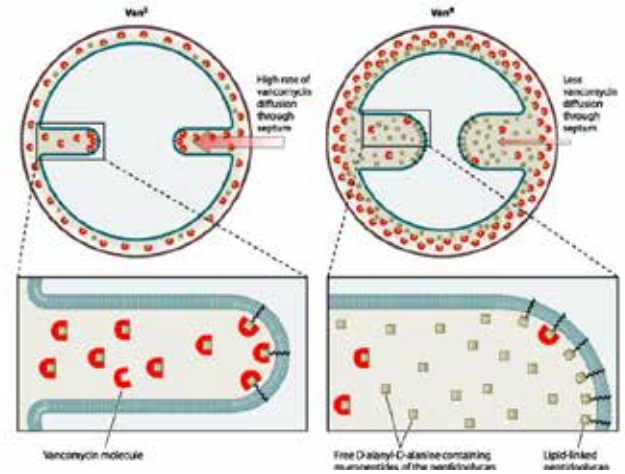
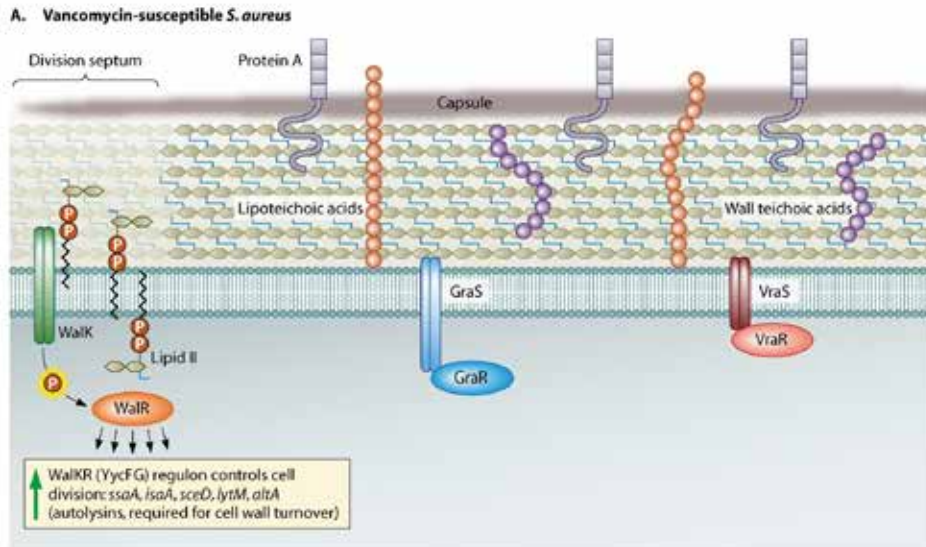
L'hostatger

Bactericida o bacteriostàtic
Farmacocinètica/farmacodinàmica
Acció intracel·lular o extracel·lular
Acció diferent en diferents subpoblacions
Inducció de resistències
Acció sobre resposta inflamatòria
Canvis durant tractament perllongats

Mecanisme d'acció i desenvolupament de resistències



Canvis durant tractaments perllongats



Heteroresistència
 Enguixament paret
 Menor autolisi
 Menor producció proteïna A
 Augment expressió càpsula
 Menor activitat *agr*, modificació de gens regulats per *agr*

Vancomicina

Bactericida o bacteriostàtic? Acció en resposta inflamatòria

Bactericidal or bacteriostatic?

adverse effects of bactericidal drugs because of the release of large amounts of PAMPs including bacterial lipoproteins and lipoteichoic acids recognized by TLR and leading to overproduction of ROI, excessive inflammatory reaction as a response to bacterial lysis

Pankey GA, CID 2004.

*Drugs such as clindamycin, rifampin or linezolid **inhibit protein synthesis** so also **toxin production**.*

*Vancomycin interferes cell wall biosynthesis so releases cytosolic toxins upon cell lysis. Linezolid could be superior to vancomycin by **attenuating an excessive inflammatory reaction***

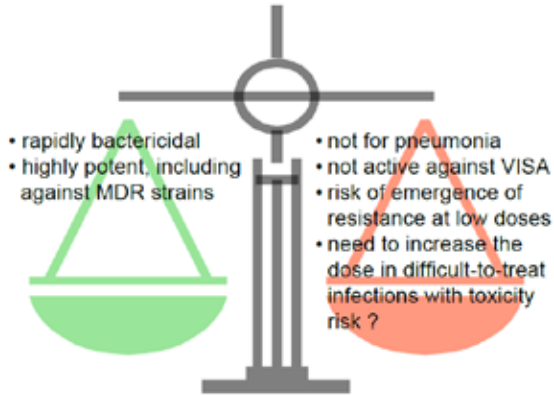
Jacqueline C et al JID 2014

No qui vol sinó qui pot...

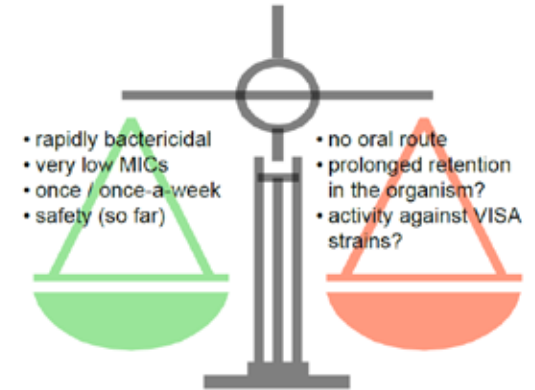
Lower antibody levels to *S.aureus* exotoxins are associated with sepsis in hospitalized adults.

Adhikari RP et al. J Infect Dis 2012

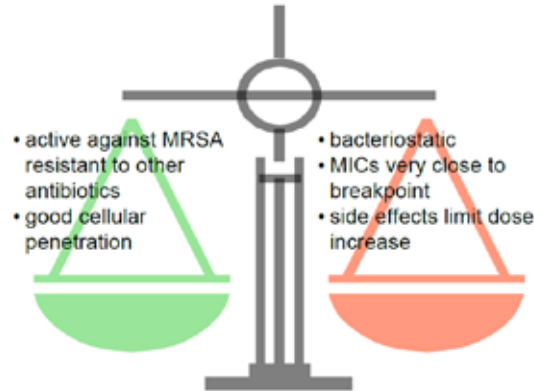
Daptomycin: Pros and Cons



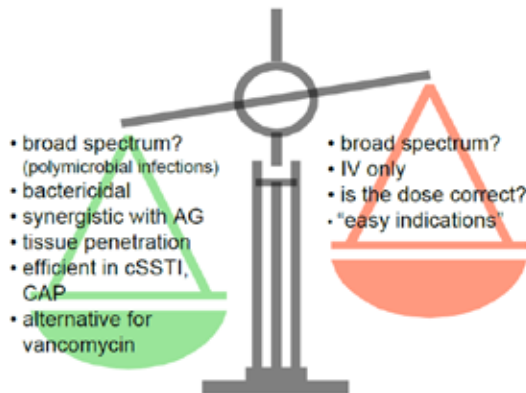
Dalbavancin/Oritavancin: Pros and Cons



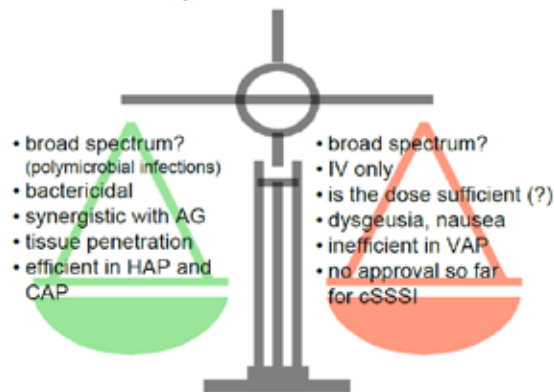
Tigecycline: Pros and Cons



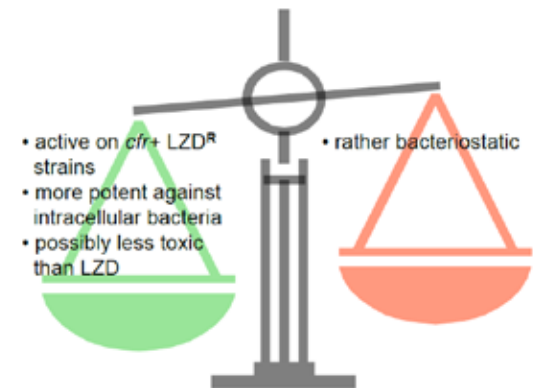
Ceftaroline: Pros and Cons



Ceftobiprole: Pros and Cons



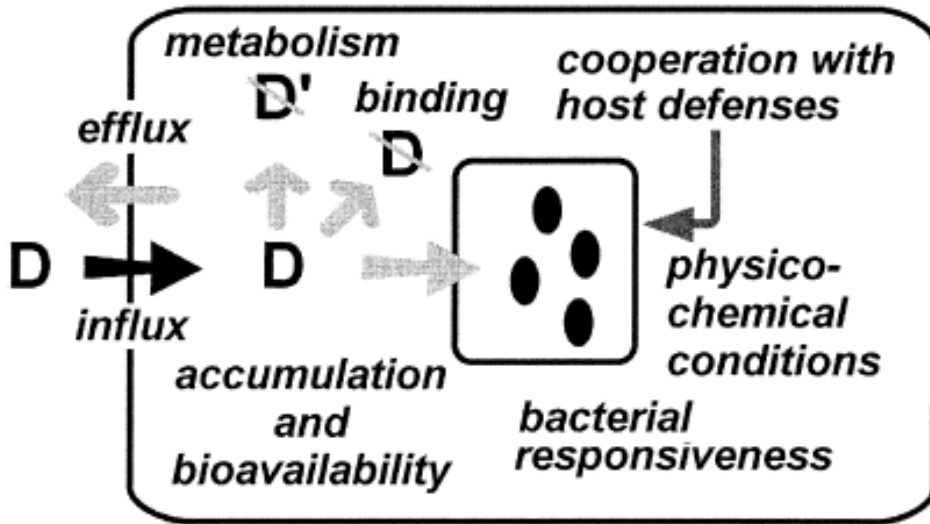
Tedizolid: Pros and Cons



New approaches to antibiotic therapy in Gram-positive infections.

Paul M Tulkens. ECCMID2014

Acció intracel·lular o extracel·lular?



Intracellular pharmacodynamics of antibiotics

Stéphane Carryn, PharmD, PhD,
Hugues Chanteux, PharmD, PhD,
Cristina Seral, PharmD, PhD,
Marie-Paule Mingeot-Leclercq, PharmD, PhD,
Françoise Van Bambeke, PharmD, PhD,
Paul M. Tulkens, MD, PhD*

*Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, Université Catholique de Louvain,
UCL 73.70 Avenue E. Mounier 73, Brussels B-1200, Belgium*

- Diferents **focus simultanis** infecció, extracel·lulari intracel·lular
- estudis **PK/PD** estan basats en concentracions en sèrum
- **concentracions variables a nivell intracel·lular** segons tipus antibiòtic :
beta-lactàmics , aminoglicòsids i vancomicina NO
Macròlids, quinolones, tetraciclins Sí... però no són conceptes absoluts:
- acumulació intracel·lular no és directament proporcional a activitat
- Influència si **temps o dosi dependent** i col·laboració amb defenses hostatger
- canvis metabòlics del microorganisme quiescent, diferent del testat in vitro

Un moment de paral·lisme

Poblacions bacterianes a les lesions tuberculoses



VELOCITAT DE MULTIPLICACIÓ

ALTA

BAIXA

Població A

Bacils extracel·lulars en multiplicació activa
Alt contingut d'oxigen i pH neutre
La població més abundant, 10^8 bacils, possibilitat mutants resistents

Població B

Bacils intracel·lulars (macròfags)
pH àcid
Creixement lent

Població C

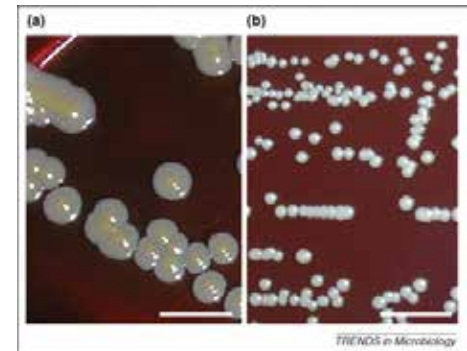
Material caseós
Poc oxigen, pH neutre
Baixa activitat metabòlica
Períodes intermitents de creixement

Població D

Bacils latents

Small colony variants Staphylococcus aureus

Supervivència intracel·lular, metabòlicament quiescent
Sensibilitat als antibiòtics diferent de la testada *in vitro*
Reducció en expressió alpha-toxina



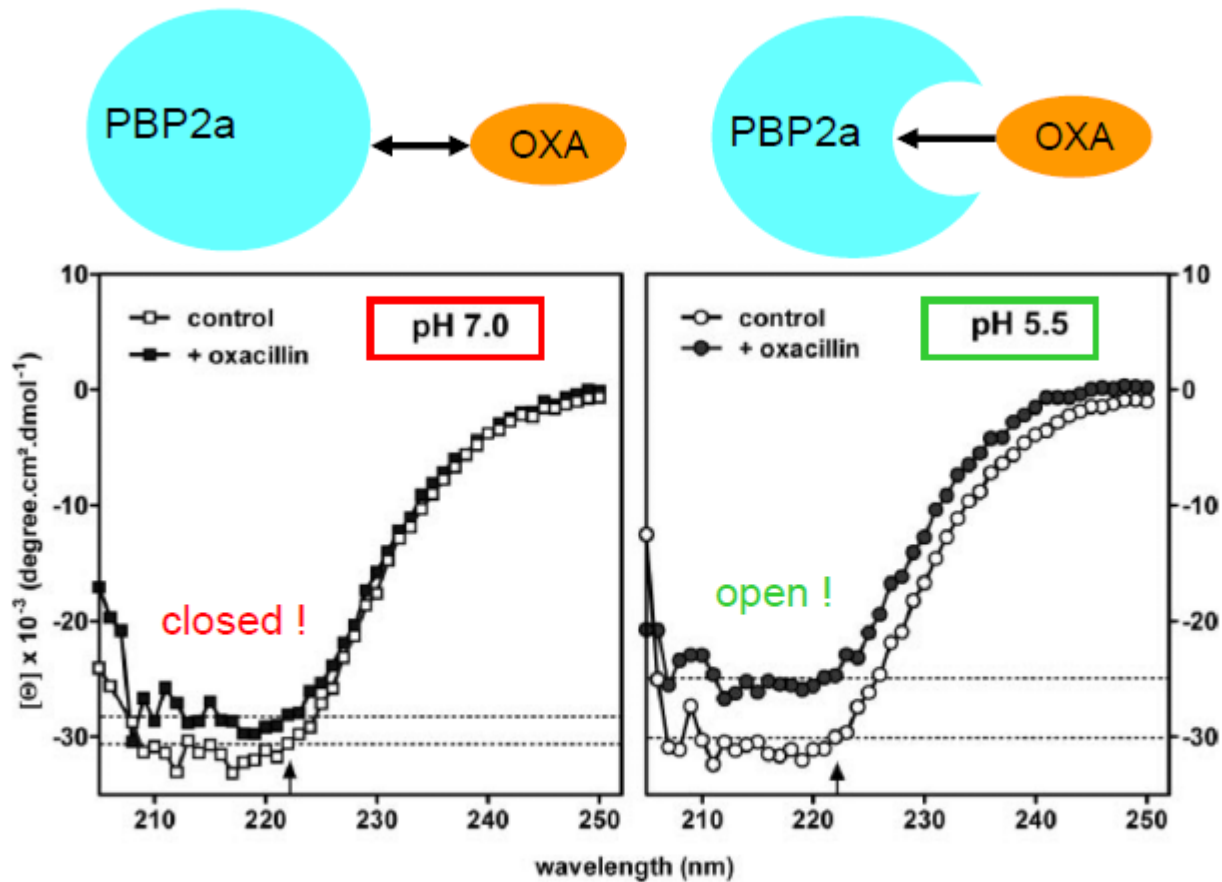


FIGURE 4. Circular dichroic spectra of PBP 2a at pH 7.0 (left panel) and pH 5.5 (right panel) in the absence (open symbols) and in the presence (closed symbols) of oxacillin (30 μ M) for 30 min at 25 °C. The thin dotted lines in each graph represent minima of PBP 2a molar ellipticity at 222 nm (vertical arrow on the abscissa) for each condition. The spectrum of oxacillin has been subtracted from all data points.

Lemaire et al., *J Biol Chem* (2008) 283:12769-76

PBP2a conformation is modified in acidic pH
 MRSA are as susceptible as MSSA in acidic pH
 Lemaire S. AAC 2007

Aproximacions "alternatives"

Combinar antibiòtics?
Combinar antibiòtics i adjuvants?

Fàrmacs anti-factors de virulència i els seus receptors
Adjuvants d'antibiòtics
Pèptids antimicrobians
Teràpia fàgica
Estratègies immunització passiva

nature
chemical biology

Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy

Anne E Clatworthy, Emily Pierson & Deborah T Hung

Review

Nanocarriers for antibiotics: A promising solution to treat intracellular bacterial infections

Nadia Abed, Patrick Couvreur*

INVITED ARTICLE

CLINICAL PRACTICE

Elie J. C. Goldstein, Section Editor

Challenges for a Universal *Staphylococcus aureus* Vaccine

Richard A. Proctor

Departments of Medical Microbiology/Immunology and Medicine, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health School, Madison

Missatges per emportar cap a casa

- ü Múltiples factors de virulència amb funcions redundants
- ü Múltiples mecanismes d'evasió de la immunitat
- ü Cicle de vida parcialment intracel·lular



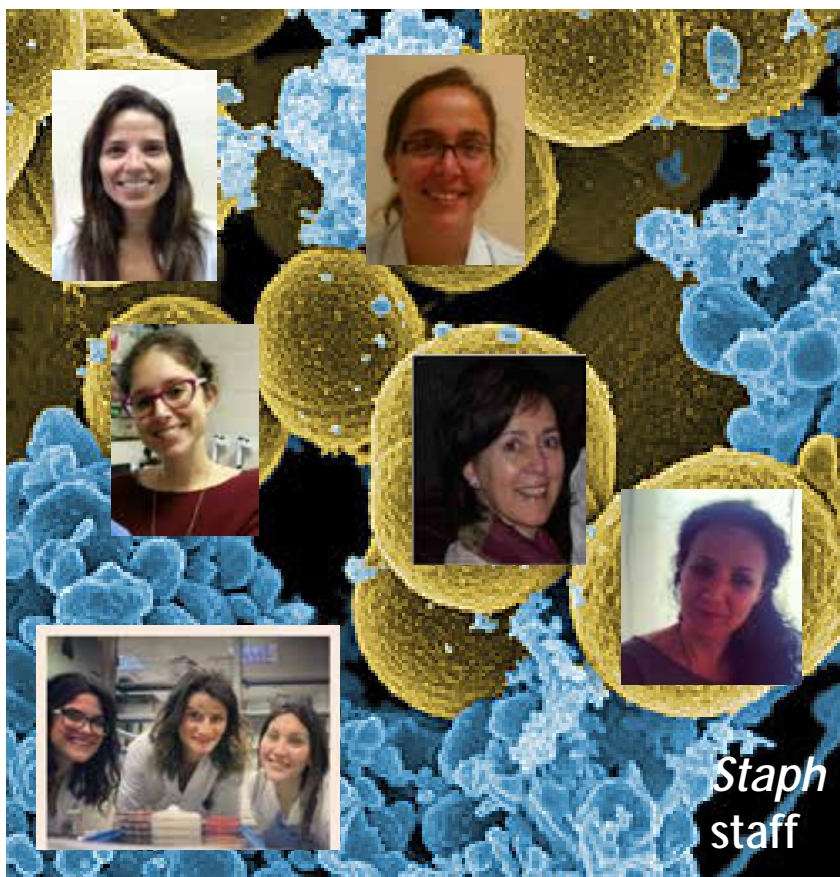
ü No tots els **pacients** són iguals ni totes les **soques** de *S. aureus* són iguals: factors dependents de l'hostatger i factors dependents del microorganisme en la presentació clínica i en l'evolució

ü Acció dels fàrmacs sobre la resposta inflamatòria de l'hostatger i sobre l'**adaptació** del microorganisme, teràpies més selectives?



Més val prevenir...





Gràcies!!
crisprat2010@gmail.com

Combinem....coneixements, experiència i sentit comú

