MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2017, 69: 215 - 221

Przeciwbakteryjna aktywność protegryny-1 w stosunku do szczepów *Staphylococcus pseudintermedius* i *Staphylococcus aureus* pochodzących od zwierząt

Antibacterial activity of protegrin-1 against *Staphylococcus pseudintermedius and Staphylococcus aureus* strains isolated from animals

Małgorzata Jarosiewicz[1], Katarzyna Garbacz[1], Wojciech Kamysz[2]

[1]Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk
[2]Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

Szerząca się obecnie lekooporność gronkowców wywołujących infekcje zarówno u ludzi jak i zwierząt oraz możliwość ich transmisji stanowi światowy problem zdrowia publicznego. Trwają poszukiwania alternatywnych związków przeciwbakteryjnych, dobrym kandydatem wydają się być peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Niniejsza praca miała na celu określenie aktywności przeciwbakteryjnej protegryny-1 wobec szczepów *Staphylococcus pseudintermedius* i *Staphylococcus aureus* pochodzących od zwierząt.

Słowa kluczowe: protegryna-1, PG-1, peptydy przeciwdrobnoustrojowe, AMPs, *S. pseudintermedius*, *S. aureus*

ABSTRACT

Introduction: The bacterial resistance to the most clinically available antimicrobial agents has increased significantly. Frequent use of antibiotics in treatment and prevention of staphylococcal infections results in emerging antibiotic resistance of human and animal isolates. The resistance threat demands an increased effort to search for alternative chemotherapeutic compounds with new mechanisms of action. A good candidate for alternatice to classical antibiotics seems to be naturally produced in all living organisms antimicrobial peptides (AMPs). The aim of the study was to analyze the *in vitro* activity of antimicrobial peptide protegrin-1 (PG-1) against *S. aureus* and *S. pseudintermedius* strains isolated from animal infections.

Materials and methods: The susceptibility of staphylococci strains to antibiotics was tested with the disk diffusion method in line with the EUCAST standards. Protegrin-1 was synthesized by Fmoc method, purified by SPE (Solid-Phase Extraction) or HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) and analyzed by mass spectrometry MALDI-TOF

(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry). The activity of protegrin-1 was examined using the broth dilution method in line with the Clinical Laboratory Standards Insitute (CLSI) guidelines to designated MIC (Minimal inhibitory concentrations) and MBC (Minimal Bactericidal Concentration) values.
Results: Investigated *S. aureus* and *S. pseudintermedius* isolates were susceptible to protegrin-1. MIC_{50} and MIC_{90} for *S. pseudintermedius* equaled respectively 2 µg/mL and 4 µg/mL, while for *S. aureus* equaled 8 µg/mL and 32 µg/mL. All investigated strains *S. aureus* had MBC values the same as MICs. Whereas *S. pseudintermedius* strains had MBC values higher by one rank of MICs measure.
Conclusions: Investigated animal staphylococci strains were susceptible to natural antimicrobial peptide protegrin-1. The activity of PG-1 was irrespective of staphylococcal antibiotic resistance.

Key words: protegrin-1, PG-1, antimicrobial peptides, AMPs, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*

WSTĘP

Transmisja patogenów pomiędzy ludźmi i zwierzętami jest zjawiskiem powszechnym. Jedynie około 3% drobnoustrojów ma rezerwuary wyłącznie ludzkie. Gronkowce są bakteriami, które w toku ewolucji nabyły zdolność przełamywania barier międzygatunkowych i zakażania zarówno ludzi jak i zwierząt (8). Dlatego jednoznaczne rozgraniczenie gronkowców na gatunki zakażające wyłącznie ludzi lub zwierzęta może być niekiedy utrudnione. *Staphylococcus aureus* jest gatunkiem patogennym głównie dla ludzi, ale może zakażać również psy, koty oraz wiele innych zwierząt. Uważa się, że kolonizacja psów przez *S. aureus* ma miejsce poprzez kontakt z człowiekiem. *Staphylococcus pseudintermedius* (niegdyś *S. intermedius*) kolonizuje głównie psy, ale również ich właścicieli (8, 14). Nosicielstwo zwierzęcych gronkowców jest szczególnie niebezpieczne dla osób z obniżoną odpornością. *S. pseudintermedius* był izolowany od ludzi z przypadków infekcyjnego zapalenia wsierdzia, opon mózgowo rdzeniowych, płuc oraz zatok przynosowych (14).

Istotny problem w medycynie i weterynarii stanowią gronkowcowe infekcje wywołane przez szczepy oporne na antybiotyki. Alarmująco rosnąca oporność zarówno wśród *S. aureus* jak i *S. pseudintermedius* niekiedy ogranicza możliwości terapeutyczne i niesie ryzyko transferu genów lekooporności pomiędzy gronkowcami bytującymi u ludzi i zwierząt. Dotyczy to w szczególności zakażeń szczepami metycylinoopornymi, MRSP (Methicillin Resistant *S. pseudintermedius*) i MRSA (Methicillin Resistant *S. aureus*) (6, 13, 19). Skłania to do poszukiwania nowych preparatów przeciwbakteryjnych. Dobrym kandydatem wydają się być peptydy przeciwdrobnoustrojowe (*ang*. AMPs – antimicrobial peptides), wytwarzane powszechnie przez organizmy żywe jako element odporności nieswoistej. Ich zaletą jest szerokie spektrum działania, szybki efekt bakteriobójczy i niska toksyczność. Ze względu na odmienny mechanizm działania w porównaniu do klasycznych antybiotyków istnieje też niewielkie ryzyko wykształcenia oporności. Z tego względu trwają intensywne badania wielu zespołów na całym świecie nad możliwością stosowania ich w terapii zakażeń gronkowcowych (16).

Celem pracy było określenie wartości MIC i MBC protegryny-1 dla szczepów gronkowców *S. pseudintermedius* i *S. aureus* wyizolowanych z zakażeń u zwierząt.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 47 szczepów *S. pseudintermedius* i 6 szczepów *S. aureus* wyizolowanych ze zmian skórnych od psów i kotów, leczonych w 12 gabinetach na terenie województwa pomorskiego. Każdy szczep gronkowca pochodził od innego zwierzęcia. Pobrany materiał posiewano na podłoże Columbia i Chapman agar (Graso Biotech, Starogard Gdański, Polska). Genomowe DNA izolowano przy użyciu zestawu Genomic Mini AX Bacteria (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska). Identyfikację gronkowców prowadzono w oparciu o detekcję genu gatunkowo specyficznej termostabilnej nukleazy (*nuc)* metodą PCR (4). Identyfikację gatunku *S. pseudintemedius* wykonano w oparciu o polimorfizm fragmentów restrykcyjnych zmiennego fragmentu genu acetylotransferazy fosforanowej (*pta*) metodą PCR-RFLP, z użyciem enzymu *Mbo*I (1, 4, 12). Wrażliwość gronkowców na antybiotyki określono metodą dyfuzyjno-krążkową zgodnie z EUCAST (10). W celu określenia metycylinooporności wykrywano gen *mecA* (5). Użyto następujących szczepów wzorcowych: *S. intermedius* PCM 2405, *S. aureus* ATCC 6538 oraz *S. aureus* ATCC 43300.

Protegryna-1 została zsyntezowana na stałym nośniku polimerowym z zastosowaniem metody Fmoc i oczyszczona za pomocą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) metodą gradientową w układzie faz woda-acetonitryl. Czystość peptydu potwierdzono analizą HPLC, a tożsamość spektrometrycznie metodą jonizacyjnej desorpcji laserowej na matrycy (MALDI-TOF) (23).

Aktywność protegryny-1 była badana metodą seryjnych rozcieńczeń w bulionie Mueller-Hinton II Broth (BLT Sp. z o.o., Łódź, Polska) na 96-dołkowych płytkach mikrotitracyjnych (SciencePlast Sp. z. o. o., Gdańsk, Polska) zgodnie ze standardem Clinical Laboratory Standars Institute (CLSI) (9). Dla szczepów *S. pseudintermedius* użyto stężeń peptydu od 0,5 µg/ml do 16 µg/ml, a dla szczepów *S. aureus* - od 1 µg/ml do 64 µg/ml. Bulion z peptydem zaszczepiano 15 µl inokulum bakterii o gęstości 5 x 10^5 CFU/ml. Płytki inkubowano przez 20h w temperaturze 37^{o}C. Wartość MIC (Minimal Inhibitory Concentration) określono jako najniższe stężenie peptydu, w którym nie obserwowano wzrostu bakterii. Wartości MBC (Mininal Bactericidal Concentration) określano wysiewając ze studzienek z wartością MIC i wyższą 10 µl próby na podłoże Triptic Soy Broth (TSB, BD Difco, USA) i inkubując w 37°C przez 48h.

WYNIKI

Protegryna-1 wykazywała aktywność bakteriostatyczną i bakteriobójczą wobec wszystkich badanych gronkowców. Wartości MIC dla *S. pseudintermedius* mieściły się w zakresie 2 µg/ml - 8 µg/ml, a dla *S. aureus* w zakresie 8 µg/ml - 32 µg/ml. MIC_{50} *S. pseudintermedius* wynosił 2 µg/ml, MIC_{90} 4 µg/ml, podczas gdy dla *S. aureus* były to odpowiednio wartości 8 µg/ml i 32 µg/ml. Efekt bakteriobójczy został osiągnięty w stężeniach: 4 µg/ml (MBC_{50}), 8 µg/ml (MBC_{90}) dla *S. pseudintermedius* oraz 8 µg/ml i 32 µg/ml dla *S. aureus*. Wszystkie szczepy *S. aureus* miały jednakowe wartości MIC i MBC, natomiast u *S. pseudintermedius* wartości MBC były o jeden rząd wyższe niż MIC (Tabela I).

Tabela I. Wartości MIC i MCB (μg/ml) protegryny-1 dla szczepów *S. aureus* i *S. pseudintermedius.*

Gatunek	MIC_{zakres}	MIC_{50}	MIC_{90}	MBC_{zakres}	MBC_{50}	MBC_{90}
S. pseudintermedius	2 – 8	2	4	2 – 8	4	8
S. aureus	8 – 32	8	32	8 – 32	8	32

Badane szczepy obu gatunków gronkowców były oporne na klindamycynę (42%), erytromycynę (40%), penicylinę (31%), tetracyklinę (28%), chloramfenikol (28%), netylmycynę (25%), kotrimoksazol (23%), streptomycynę (21%), gentamycynę (10%), ciprofloksacynę (6%), doksycyklinę (6%), kwas fusydowy (6%). W badanej puli nie występowały szczepy oporne na metycylinę. Dominowały szczepy wielolekooporne (oporne na 3 i więcej antybiotyków z różnych grup), które stanowiły aż 45%. Nie zauważono istotnych różnic w wartościach MIC i MBC pomiędzy szczepami opornymi na mniejszą i większą liczbę antybiotyków (Tabela II).

Tabela II. Średnie wartości MIC i MBC (μg/ml) protegryny-1 w odniesieniu do antybiotykooporności obu badanych gatunków gronkowców.

Wrażliwość na antybiotyki	Ilość szczepów	$MIC_{średni}$	$MBC_{średni}$
wrażliwe	23%	4,5	4,7
oporne na 1 antybiotyk	21%	6,1	6,1
oporne na 2 antybiotyki	11%	3	3,7
oporne na 3 i więcej antybiotyków (wielolekooporne), w tym na:	45%	3,83	4,25
▪ 3 antybiotyki	15%	4,25	4,75
▪ 4 antybiotyki	8%	4	4
▪ 5 antybiotyków	9%	2,4	3,2
▪ 6 i więcej antybiotyków	13%	5,4	5,71

DYSKUSJA

Dotychczas odkryto około 2900 peptydów przeciwdrobnoustrojowych pochodzących z różnych źródeł (20). W ostatnich latach dużo uwagi poświęca się protegrynom należącym do katelicydyn wytwarzanych przez neutrofile. Naturalne protegryny występują w pięciu wariantach od PG-1 do PG-5. Są zbudowane z 16-18 aminokwasów, a obecność dwóch mostków di-siarczkowych nadaje im budowę cykliczną. Najlepiej poznana jest protegryna-1 (RGGRLCYCRRRFCVCVGR-NH_2) zbudowana z 18 aminokwasów, która przyjmuje strukturę przeciwrównoległej β-kartki ustabilizowanej dwoma wiązaniami disiarczkowymi pomiędzy cysteinami (pozycje: 6 i 15 oraz 8 i 13). Jej amfipatyczny charakter wynika z hydrofobowości części centralnej i hydrofilowego charakteru części dystalnych. Protegryna-1 ma szerokie spektrum przeciwbakteryjne, dlatego trwają intensywne badania nad jej potencjalnym zastosowaniem zarówno w wersji naturalnej jak i zmodyfikowanej (7, 22).

Zbudowany z 17 aminokwasów (RGGLCYCRGRFCVCVGRHH$_2$) IB-367, nazywamy iseganan, jest syntetycznym analogiem protegryny-1. Różnica pomiędzy protegryną-1 a iseganan dotyczy delecji argininy w pozycji 4 od C-końca oraz zamianie argininy w pozycji 10 na glicynę (18). Dobra aktywność przeciwbakteryjna IB-367 doprowadziła do prób klinicznych na pacjentach. Badano skuteczność IB-367 w formie wodnego roztworu u chorych sztucznie wentylowanych z zapaleniem płuc. Wyniki były częściowo zadowalające, ale wymagały przebadania innych aspektów potencjalnej terapii (15). Iseganan jest również aktualnie w III fazie badań klinicznych jako preparat zapobiegający zapaleniom błony śluzowej jamy ustnej. Badania są prowadzone z udziałem pacjentów onkologicznych z nowotworem szyi lub głowy, u których stosuje się radioterapię (21). Innym analogiem protegryny-1 jest BM-1, złożony z 15 aminokwasów (RGLCYCRGRFCVCVG-NH$_2$), mający dobrą aktywność przeciwdrobnoustrojową i szerokie spektrum działania. W badaniach *in vitro* wykazywał najwyższą skuteczność wobec bakterii gram-dodatnich (18).

Najczęstszą przyczyną stosowania antybiotykoterapii u psów są gronkowcowe, głębokie ropne zapalenia skóry i tkanki podskórnej (*pyodermatitis*). Zakażenia te mają tendencję do nawracania, co powoduje przedłużanie i powtarzanie leczenia antybiotykami, które trwa zwykle od 8 do 12 tygodni. Niepowodzenia w leczeniu ropnych zapaleń skóry u psów wynikają ze złożonej patogenezy choroby, w której dochodzi do powstania nadwrażliwości, indukowanej gronkowcowym peptydoglikanem. Powstałe w odpowiedzi IgE łączą się z receptorami komórek tucznych, co prowadzi do ich aktywacji i egzocytozy ziarnistości oraz uwalniania mediatorów reakcji anafilaktycznej. Przedłużona i powtarzająca się terapia antybiotykami przyczynia się do indukcji oporności u gronkowców i dotyczy najczęściej oporności na makrolidy, linkozamidy, kwas fusydowy, tetracykliny i aminoglikozydy. Dlatego trwają intensywne poszukiwania alternatywnych metod terapii zakażeń gronkowcowych u zwierząt (11).

W odniesieniu do szczepów *S. pseudintermedius* wywołujących pyodermie u psów określano aktywność różnych peptydów m.in. RRIKA, RR, WR-12, IK8 (izomer D), penetratinu, (KFF)$_3$K oraz melityny (17). Zgodnie z najlepszą wiedzą autorów protegryna-1 nie była dotychczas badana. Z prezentowanej pracy wynika, że protegryna wykazuje aktywność przeciwbakteryjną wobec gronkowców izolowanych od zwierząt. Co należy podkreślić, jej aktywność jest większa wobec szczepów z gatunku *S. pseudintermedius* niż *S. aureus*. Zwierzęce szczepy *S. aureus*, które były przedmiotem prezentowanych badań, miały podobną wrażliwość do szczepów izolowanych od ludzi cierpiących na erytrodermię, a uzyskany efekt bakteriostatyczny (MIC) i bakteriobójczy (MBC) był zbliżony, odpowiednio zakresy 1 – 16 µg/ml oraz 2 – 32 µg/ml (2, 3).

Niewątpliwą zaletą działania protegryny-1 jest równie dobra aktywność wobec szczepów gronkowców wysoko i nisko opornych na antybiotyki. Badane szczepy posiadały zróżnicowaną antybiotykooporność, jednak zdecydowanie najwięcej z nich (45%) wykazywało oporność na 3 i więcej antybiotyków (szczepy MDR). Wielolekooporne szczepy były podatne na działanie peptydu w analogicznych stężeniach jak szczepy wrażliwe. Jednakowa aktywność protegryny-1, bez względu na antybiotykooporność gronkowców może wynikać z odmiennego mechanizmu działania AMPs. Podobną zależność w aktywności przeciwgronkowcowej AMPs zauważali inni autorzy (2, 17).

WNIOSKI

Wstępne wyniki aktywności protegryny-1 wobec zwierzęcych gronkowców są zachęcające i wynika z nich, że zarówno zwierzęce gronkowce z gatunku *S. pseudintermedius* jak i *S. aureus* są wrażliwe na protegrynę-1. Aktywność peptydu nie zależy od oporności gronkowców na antybiotyki.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bannoehr J, Franco A, Iurescia M* i inni. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. J Clin Microbiol 2009; 47:469–71.
2. *Barańska-Rybak W, Cirioni O, Dawgul M* i inni. Activity of antimicrobial peptides and conventional antibiotics against superantigen positive *Staphylococcus aureus* isolated from the patients with neoplastic and inflammatory erythrodermia. Chemother Res Pract. 2011; 2011: 270932.
3. *Barańska–Rybak W, Pikula M, Dawgul M* i inni. Safety profile of antimicrobial peptides: camel, citropin, protegrin, temporin A and lipopeptide on HaCaT keratinocytes. Acta Pol Pharm. 2013; 70: 795–801.
4. *Baron F, Cochet MF, Pellerin JL i inni*. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. J Food Prot., 2004, 67: 2302–5.
5. *Barski P, Piechowicz L, Galiński J, Kur J*. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. Mol Cel Probes, 1996; 10:471-5.
6. *Bierowiec K, Płoneczka-Janeczko K, Rypuła K*. Koty i psy jako rezerwuar *Staphylococcus aureus*. Postepy Hig Med Dosw 2014; 68: 992–7.
7. *Chambers HF, Deleo FR*. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009; 7: 629–41.
8. *Ciszewski M, Czekaj T, Szewczyk EM*. Nowe spojrzenie na bakteryjne patogeny odzwierzęce stanowiące zagrożenie dla człowieka. Medycyna Pracy 2014; 65: 819–29.
9. CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational suplement. Document M100–S22. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne PA 2012.
10. EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical breakpoints. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints . Data dostępu: 27.10.2017.
11. *Ganiere JP, Medaille C, Mangion C*. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2005; 52: 25-31.
12. *Garbacz K, Żarnowska S, Piechowicz L, Haras K*. Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs. Virulence 2013; 4: 255–9.
13. *Garbacz K, Żarnowska S, Piechowicz L, Haras K*. Staphylococci isolated from carriage sites and infected sites of dogs as a reservoir of multidrug resistance and methicillin resistance. Curr Microbiol 2013; 66: 169–73.
14. *Kmieciak W, Szewczyk EM*. Gatunki koagulazododatnie rodzaju *Staphylococcus* – taksonomia, chorobotwórczość. Post. Mikrobiol. 2017; 56: 233–44.

15. *Kollef M, Pittet D, Sanchez Garcia M i inni*. A randomized double-blind trial of iseganan in prevention of ventilator-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2006; 173:91–7.
16. *Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE*. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. Curr Opin in Pharmacol. 2006; 6: 468–72.
17. *Mohamed MF, Hammac GK, Guptill L, Seleem MN*. Antibacterial activity of novel cationic peptides against clinical isolates of multidrug resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from infected dogs. PLoS One 2014; 9: e116259.
18. *Rodziewicz–Motowidło S, Mickiewicz B, Greber K i inni*. Antimicrobial and conformational studies of the active and inactive analogues of the protegrin-1 peptide. FEBS J. 2010; 277: 1010–22.
19. *Steinberg DA, Hurst MA, Fujii CA i inni*. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41: 1738–42.
20. The Antimicrobial Peptide Database. http://aps.unmc.edu/AP/main.php . data dostępu: 4.06.2017.
21. The Clinical Trials Database. https://clinicaltrials.gov/ . data dostępu: 4.06.2017.
22. *Tomasinsig L, Zanetti M*. The cathelicidins - structure, function and evolution. Curr Protein Pept Sci. 2005; 6: 23–34.
23. *Vojkovsky T*. Detection of secondary amines on solid phase. Pept Res 1995; 8: 236–27.

Otrzymano: 6 VII 2017 r.
Adres Autora: 80-204 Gdańsk, ul. Dębowa 25, Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Gdański Uniwersytet Medyczny