

Studiu bibliografic și încercări preliminare pentru stabilirea unor protocoale de lucru pentru identificarea tulpinilor bacteriene și a unor gene de rezistență la antibiotice.

efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a
agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*

(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Colectiv de redacție:

As.dr. Boldura Oana Maria, Prof.dr.Popescu Sorina

Coordonator: **Conf.dr.ing Tulcan Camelia**

**Membri: As.dr. Boldura Oana Maria, Prof.dr.Popescu Sorina, Conf.dr.ing Tulcan
Camelia**

Data finalizării: 04.12.2018

Acknowledgements

Activities under this work were carried out in the *Research Laboratory Complex "Horia Cernescu"* - financed by project *"A bio-economical approach of the antimicrobial agents - use and resistance"*, in the frame of contract PCCDI 7/19.03.2018, code: PN-III P1-1.2-FPRD-2017.

1. Studiu bibliografic

1.1. Bacteria *Escherichia coli*- Serogrupurile enteropatogene

Escherichia coli este o bacterie comună florei intestinale a tuturor speciilor de mamifere și păsări. A fost descoperită în anul 1885, de către Theobald Escherich, fiind numită inițial „*Bacterium coli commune*”. Este specia reprezentativă și, înafara implicațiilor în patologie, constituie principalul instrument de studiu în cercetările fundamentale de bacteriologie și genetică microbială. Apelativul „*coli*” desemnează locul de elecție în care germenii predomină în tubul digestiv, respectiv colonul. Eliminarea se realizează prin materiile fecale, răspândindu-se în mediul exterior, apă, sol, alimente, diferite materiale, constituind surse de infecție cu o importanță deosebită atât pentru oameni cât și pentru animale. Germenii supraviețuiesc în mediul extern săptămâni sau luni de zile. Expunerea la 60° C timp de 30 de minute omoară majoritatea tulpinilor. Sunt sensibili la antiseptic, la acțiunea unor coloranți, N-clorosuccinimida are efect inhibitor bactericid. Colibacilii sunt sensibili la acțiunea fagilor specifici și la o gamă largă de antibiotice de tip streptomicinic, la cele cu spectru larg, sulfamide. Multe tulpini prezintă rezistență la antibiotice. [13]

Majoritatea tulpinilor sunt nepatogene, inofensive la nivelul colonului, dar anumite serotipuri sau clone joacă un rol important în bolile intestinale și extraintestinale. Patogeneza colibacilozei enterice este divizată în cinci etape: infecție, proliferare, producere de toxine, acțiunea toxinelor și dezvoltarea bolii enterice.

Patogenitatea se datorează unor factori de virulență și toxici. Factorii de virulență sunt reprezentați de: factorii de aderență reprezentați de antigenele fimbriale, factorii de colonizare reprezentați de structuri filamentoase, antigenele de suprafață de tip K. Pentru reducerea sensibilității și a acțiunii litice a complementului sunt incriminate structurile polizaharidice. Pe de altă parte acestea favorizează și atașarea celulelor bacteriene la cele epiteliale.

Factorii de toxicitate alcătuiesc un adevărat complex și joacă un rol important în mecanismul patogenetic: antigenul somatic de tip “O”, lipopoliglucidic, reprezintă de fapt endotoxina bacteriilor Gram negative și protejează colibacilii de mecanismele de apărare ale gazdei, având rol și în inducerea fenomenelor șocului endotoxic. Hemolizinele sunt prezente numai la unele tulpini de *E.coli* fiind codificate de plasmidul „Hly”. [1]

Cu privire la enterotoxine, se cunosc două tipuri de enterotoxine: enterotoxina termolabilă, notată LT care are proprietăți antigenice și se aseamănă structural și funcțional cu toxina holerică și enterotoxina termostabilă, notată ST produsă de tulpini de origine umană și porcină. Diferențierea celor două tipuri de toxine se poate face prin teste biologice sau imunologice.

Serogrupurile enteropatogene întâlnite mai des la animale și om sunt: O15, O21, O17, O5, O78, O26, O115 (la viței); O39, O88 (la vaci cu mamită); O8, O11, O41, O84, O117, O138, O139 la porci ; O1, O2, O8, O73, O47, O78, O22, O47 la păsări; iar pentru om O6, O15, O78, O115, O148, O159 și îndeosebi O157H7; din antigenele fimbriale sunt importante: F4 la porci și F5 la viței. [13]

Studiu bibliografic și încercări preliminare pentru stabilirea unor protocoale

În funcție de prezența unor elemente de patogenitate tulpinile de E.coli sunt grupate în cinci categorii [1]:

- E.coli enterotoxigen, notat „ETEC” produce diareea neonatală la toate mamiferele. Patogenitatea este dată de prezența fimbriilor cu care aderă la enterocit, colonizând intestinul subțire cu producere de citotoxine.
- E.coli enteropatogen, notat „EPEC”, colonizează și se multiplică atât în intestinul subțire cât și în intestinul gros. Are proprietatea de aderare la enterocit, dar nu produce toxine. E.coli enteropatogen provoacă episoade diareice atât la oameni, cât și la animalele tinere.
- E.coli enteroinvaziv, notat „EIEC”, colonizează și se multiplică în intestinul gros, fiind agentul cauzal al dizenteriei la om și primate, nefiind raportată izolarea de la animalele domestice. EIEC se aseamănă foarte mult cu Shigella.
- E.coli enterohemoragic/necrotoxic, notat „EHEC/NTEC”, produc aerobactină și citotoxine necrozante; sușele CNF1 produc și o hemolizină de tip alfa, fiind implicate în producerea de afecțiuni enterale și extraenterale la om, bovine, porci, câini în timp ce sușele CNF2 s-au identificat numai la bovine și ovine asociate sau nu cu stări patologice.
- E.coli verotoxigen, notat „VTEC/STEC” produc vero citotoxine sau Shiga toxină (1 și 2) și sunt caracterizate prin capacitatea de a produce, fie una sau ambele citotoxine, antigenic distincte, bacteriofag-mediate (12); produc la om enterită hemoragică sau sindrom uremic hemolitic, dizenterie la bovine (unele din ele) și boala edemelor la porc.

Pe lângă acestea, dar având o însemnătate mai redusă, se mai cunosc și: E.coli cu aderență redusă „DAEC” (sunt definite printr-un tipar distinct de aderență difuză la celulele HEp-2 dar rolul în producerea diareilor este neclar) și E.coli enterogregativ „EaggEC” (se caracterizează printr-un tipar distinct de aderență agregativă la celulele HEp-2 provocând diaree și alte simptome enterice la, iar studiile epidemiologice le sugerează ca și cauză a diareii călătorilor nefiind izolate de la animale).

În timpul secolului al XIX-lea, infecțiile reprezentau principala cauză de deces în rândul oamenilor. Pneumonia, tuberculoza, diareea și difteria au fost considerate principalele cauze ale decesului la copii și adulți. Numai la sfârșitul secolului al XIX-lea a devenit posibilă corelarea existenței agenților patogeni microscopici cu dezvoltarea diferitelor boli. În câțiva ani, introducerea procedurilor antiseptice a început să reducă mortalitatea datorată minimalizării infecțiilor postoperatorii. Salubritatea și igiena au jucat un rol semnificativ în reducerea mortalității cauzate de boli infecțioase. Introducerea primilor compuși cu activitate antimicrobiană a reușit să remită multe din bolile mai sus menționate. [9]

Antibioticele, odată descoperite, au reprezentat un progres fantastic în medicină, practicienii puteau acum să stopeze proliferarea microorganismelor. Denumirea de antibiotic îi este atribuit francezului Vuillemin, dar termenul este utilizat pentru o gamă vastă de produse atât naturale cât și semisintetice, care în general au un efect antibacterian.

Benzilpenicilina a fost primul antibiotic activ, descoperire atribuită lui Fleming în 1926. În anul 1940 Chain și Florey, după o prealabilă izolare sub forma pură a penicilinei cristalizate au reușit să-i studieze beneficiile. Dezvoltarea domeniului a dus la apariția de noi antibiotice cu o potență crescută. În 1944 a fost descoperită streptomycina de către

Studiu bibliografic și încercări preliminare pentru stabilirea unor protocoale

Waksman, în 1947 cloramfenicolul, un an mai târziu clortetraciclina, în 1958 penicilinele semisintetice, la doi ani distanță sunt introduse cefalosporinele, fluorchinonele în anul 1980 etc.

Bacteriile au dovedit abilitați adaptative remarcabile, depășind așteptările cercetătorilor. În anul 1969 au apărut primele studii referitoare la rezistența la antibiotic. Agravarea situației a fost produsă și de către gestionarea defectuoasă și abuzivă a acestor compuși. În prezent se cunosc o multitudine de cazuri în care bacteriile au dobândit o antibioretistență solidă și se pare că în viitor va fi nevoie de sintetizarea unor antibiotice noi pentru a face față acestor bacterii. [4]

1.2. Clasificarea și structura bacteriilor

Dupa afinitatea tinctorială, prin metoda de colorare Gram, bacteriile se clasifică în bacterii Gram pozitive, respectiv Gram negative. Aceste proprietăți se datorează structurii chimice a peretelui celular bacterian. Bacteriile Gram pozitive fac parte din grupul bacteriilor ce înglobează colorantul albastru violet, păstrându-și culoarea după imersia în alcool, în timp ce bacteriile Gram negative se colorează în roșu după spălarea cu alcool. Componenta internă bacteriilor Gram pozitive și Gram negative este aproximativ similară, dar structurile externe prezintă diferențe majore. Citoplasma bacteriană conține AND-ul cromozomial, ARN-ul mesager, proteine, ribozomi, metaboliți. Mai frecvent la bacteriile Gram negative, se întâlnesc niște formațiuni sferice, extracromozomiale numite plasmide cu rol în rezistența la antibiotic. Absența membranei nucleare facilitează mecanismele de control pentru sinteza proteinelor, astfel transcripția și traducerea vor fi cuplate. Ribozomul bacterian este diferit de ribozomul celulelor eucariote fiind o țintă pentru antibiotice. Membrana citoplasmatică are rol de membrană semipermeabilă selectivă, este sediul enzimelor implicate în procesul de respirație, contribuie la transportul de electroni și producerea de energie, funcții care în mod normal sunt realizate în mitocondrii la eucariote. Alte componente membranare sunt proteinele de transport, pompele ionice pentru menținerea potențialului membranar. Mezosomul este o membrană citoplasmatică cu forma și funcția unui "tirbușon". Rolul mezosomului este de a se lega de viitorii cromozomi în timpul diviziunii celulare și de a-i trage în afară. [6]

Structurile externe ale celor două tipuri de bacterii prezintă diferențe majore. Peretele celular la bacteriile Gram pozitive este multistratificat, alcătuit în marea lui majoritate din peptidoglicani, cu rol în replicarea bacteriană. Alte componente ale peretelui celular sunt reprezentate de acizii teichoici și lipoteichoici, proteine, polizaharide. Bacteriile Gram negative posedă un perete celular cu o structură mult mai complexă decât la bacteriile Gram pozitive, fiind alcătuit din două straturi între care se găsește spațiul periplasmic. Primul strat, aderă intim la membrana citoplasmatică, fiind alcătuit dintr-un strat subțire de peptidoglicani, învelit la rândul său de membrana exterioară. Între stratul de peptidoglicani și suprafața internă a membranei exterioare se găsește spațiul periplasmic. Acest spațiu conține peptidoglican, lipoproteine, proteine de transport și enzime de degradare. Dintre enzime amintim: lipazele, proteazele, nucleazele, fosfatazele, enzime de degradare a carbohidraților, enzime litice: colagenazele, beta lactamazele, proteaze, hialuronidaze. [8]

Membrana exterioară are puncte de contact cu membrana citoplasmatică; prin aceste zone de adeziune se atașează de peptidoglicani cu ajutorul lipoproteinelor. Stratul exterior este alcătuit dintr-o moleculă bipolară denumită LPS lipopolizaharidă, care mai poartă denumirea de endotoxină fiind un activator al răspunsului imun. [4]

Studiu bibliografic și încercări preliminare pentru stabilirea unor protocoale

Membrana exterioră a Gram negativilor conține un grup de proteine cu un rol major în transportul transmembranar. Aceste proteine au fost denumite „porine” datorită abilităților de a forma pori, care permit difuzia transmembranară a moleculelor hidrofobe cu masa mai mică de 700 de daltoni. [11]

1.3. Caracterizarea antibioticelor și modul de acțiune al acestora

Antibioticele se împart în două mari grupe: bacteriostaticele, respectiv bactericidele. Bacteriostaticele sistează creșterea bacteriilor, acestea confruntându-se cu mecanismele de apărare ale organismului gazdă, eficacitatea lor depinzând de statusul fiziologic al animalului, vârstă, starea generală. Reprezentanții acestui grup sunt: tetraciclinele, cloramfenicolii, macrolidele, lincosamidele, novobiocina și tiamulinele.

Bactericidele în urma administrării duc la moartea celulelor bacteriene, neavând nevoie de intervenție din partea organismului gazdă, fiind indicate mai ales în cazul animalelor caectice, epuizate, vârstnice, cu un sistem imunitar deficitar. Din această categorie amintim aminoglicozidele, polipeptidele, neomicinele, sinergistinele, betalactaminele, framomicina, colistina, etc. [9]

În ceea ce privește modul de acțiune al antibioticelor, acestea sunt grupate în funcție de ținta pe care o au asupra bacteriei. Penicilina, cefalosporina, vancomicina, gramicidina, bacitracina sunt inhibitori ai sintezei peretelui celular. Inhibitori ai sintezei proteice sunt: tetraciclina, lincomicina, aminoglicozidele, fenicolii, etc. Inhibitori direcți ai sintezei acizilor nucleici: chinonele, rifampicina, trimetoprim, etc. Afectarea permeabilității membranare: nistatina, anfotericina B. [9]

1.4. Antibiorezistența bacteriană

Antibiorezistența reprezintă capacitatea bacteriilor de a se dezvolta și prolifera în prezența antibioticelor, care în mod obișnuit le-ar ucide, dacă ne referim la bactericide, sau le-ar inhiba procesele specifice de creștere, fenomen caracteristic bacteriostaticele. Rezistența este consecință a tratamentelor inoportune și de durată cu același grup de antibiotice, bacteriile dobândind o capacitate adaptativă remarcabilă. [6]

Sunt cunoscute multiple moduri prin care o bacterie poate dobândi rezistența la antibiotice și anume: adaptarea genetică, achiziționarea genetică, adaptarea epigenetică sau antibioresistența naturală, acumularea redusă a antibioticelor în celule, alterarea structurii enzimatică. [6]

Adaptarea genetică se referă la mutațiile codului genetic, care apar în timpul replicării ADN-ului, ca urmare a prezenței radiațiilor ionizante sau a unor substanțe chimice. Unele antibiotice sunt mai predispuse decât altele să devină mai puțin eficiente ca urmare a mutațiilor genetice în bacteriile țintă.

Ca urmare a acestor mutații genetice din interiorul bacteriilor țintă, unele antibiotice își vor diminua potența, devenind mai puțin eficiente. De pildă antibioticele care se leagă de enzima bacteriană ADN-giraza, inhibând replicarea ADN-ului bacterian, nu sunt recomandate utilizării îndelungate, deoarece o singură mutație în enzimă, poate sista efectul antibioticului, rezultând bacterii rezistente la acel antibiotic. [9]

Studiu bibliografic și încercări preliminare pentru stabilirea unor protocoale

Achiziționarea genetică, face referire la capacitatea bacteriilor de a-și însuși bucăți de dimensiuni variabile de ADN, provenite de la alte bacterii sau chiar viruși din mediul înconjurător.

Însușirea acestor bucăți de ADN se face în mai multe moduri. Plasmidele sunt fragmente mobile de ADN, de cele mai multe ori având o formă circulară, care pot fi schimbate între bacterii sau pot fi dobândite din mediu. Majoritatea bacteriilor posedă plasmide multiple, care pot avea în componența lor gene care să inactiveze un antibiotic. Transpozonii sunt fragmente de ADN care pot migra dintr-un loc în altul în codul genetic, putând fi înglobați în codul genetic al altui organism. [9]

Conjugarea este întâlnită în cazul bacteriilor alăturate, care prin crearea unei conexiuni directe își împart ADN-ul liber. ADN-ul liber denumit și ADN Naked, provine din mediul înconjurător, cu preponderență de la bacterii moarte sau structuri din biofilm știind faptul că unele bacterii folosesc ADN-ul pentru a se ancora de suprafețe. [4]

1.5. Mecanismele dobândirii antibioretistenței

După cum a fost enunțat mai sus, rezistența la antibiotice a bacteriilor poate fi naturală, atunci când este o proprietate specifică unor bacterii și achiziționată, atunci când bacteria dobândește o plasmidă de rezistență, adică o piesă mobilă de ADN ce transportă gene extracromozomiale, capabilă să modifice rezistența la antibiotice. Informația genetică prezentă în plasmide reprezintă un factor important în patogenitatea și invazivitatea bacteriilor, în viteza de apariție a unor tulpini patogene invazive rezistente la medicamentele antimicrobiene și în debutul simptomelor. [11]

Modificarea sau inactivarea antibioticului este mecanismul cel mai comun al rezistenței dobândite și este determinată în mare măsură de producția enzimelor betalactamaze. Betalactamazele reprezintă un grup de enzime produse de bacteriile Gram pozitive, Gram negative aere și anaerobe capabile să hidrolizeze inelului beta-lactamic și astfel să inactiveze antibioticul corespunzător. [11]

Modificările locului de acțiune pentru antibiotice, se referă la modificările produse în structura sau etapele metabolismului pentru care medicamentele își exercită acțiunea. Aceasta se realizează fie prin creșterea concentrației unei substanțe competitive, fie prin modificarea unor structuri alternative bacteriene. [8]

Toleranța, nu este considerată un mecanism clasic de rezistență în practică putându-se comporta ca atare. Ea este atribuită selecției de mutații deficitare în sisteme autolitice.

Principalele antibiotice folosite în tratamentul mastitei bovine sunt Streptomicina, Gentamicina și Cefalosporine, iar pentru acestea bacteriile au acumulat gene de rezistență:

- aadA1 (aminoglycoside adenyltransferase) conferă bacteriei E.coli rezistență la Streptomicină;
- aac(3)-IV (3-N-acetiltransferaza aminoglicozidică) din E. coli prezintă o specificitate foarte largă a aminoglicozidelor, determinând rezistența la un număr mare de aminoglicozide, inclusiv Gentamicina;
- blaSHV este una dintre cele mai răspândite gene care conferă rezistență la lactamele cu spectru extins în Enterobacteriaceae, diseminând în interiorul și între rezervoare, în principal prin transferul de gene orizontale mediate de plasmidă.

2. Raport de încercări preliminare

În perioada premergătoare colectării tulpinilor bacteriene ce vor fi analizate în cadrul acestui proiect au fost demarate analize de laborator care au avut drept scop alegerea celor mai bune protocoale și metode de lucru, adaptate cerințelor proiectului.

Primul pas a constat în achiziționarea unor perechi de primeri menționați în literatura de specialitate ca și fiind potriviți pentru a fi folosiți în astfel de studii.

Primerii folosiți în acest studiu au fost selectați din literatura de specialitate și sintetizați de către firma Eurogentec, Belgia sunt redați în Tabelul 1.

Tabelul 1. Secvențele primerilor achiziționați inițial

	Specificitate	Markeri moleculari	Secvență primeri 5'.... 3'
1.	Streptomicina	aadA1	(F)TATCCAGCTAAGCGGAACT (R) ATTTGCCGACTACCTTGGTC
2.	Gentamicina	aac(3)-IV	(F)CTTCAGGATGGCAAGTTGGT (R) TCATCTCGTTCTCCGCTCAT
3.	Cefalospor ine/ beta- lactams	bla_SHV	(F) TCGCCTGTGTATTATCTCCC (R)CGCAGATAAATCACCACAATG
4.	Identificar e E.coli patogen	uspA	(F) CCGATACGCTGCCAATCAGT (R) ACGCAGACCGTAGGCCAGAT
5.	Identificar e E.coli	27 F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
		U1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT
6.	Diversitate mecanisme de rezistență	ERIC 1	ATGTAAGCTCCTGGGGAT
7.		ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGGGTGAGC

Studiu bibliografic și încercări preliminare pentru stabilirea unor protocoale

Pentru această etapă nu au fost folosite culturi bacteriene, probele fiind constituite din lapte proaspăt prelevat din diferite ferme de bovine, după cum urmează:

Din fiecare proba de lapte s-au prelevat aproximativ 15ml în câte două tuburi de centrifugă de tip Grainer, acestea au fost supuse centrifugării în vederea sedimentării celulelor somatice, supernatantul a fost eliminat iar sedimentul a fost supus spălărilor repetate urmate de centrifugare cu 5 ml soluție tampon fosfat, astfel ca la final ADN a fost izolat din celule recoltate din aproximativ 30 ml de lapte mastitic.

Din fiecare proba a fost extras ADN, a cărui concentrație a fost determinată prin metoda spectrofotometrică. În același timp s-a determinat și raportul absorbantelor A_{260/230} care este un indicator al calității amplificabile a ADN (Tabel). Raportul absorbantei A_{260/280} fiind măsura remanentei moleculelor de natură proteică în probele analizate fiind în primul rând indicatorul cantității de ADN obținute. Rezultatele obținute în această etapă sunt sumarizate în Tabelul 1

Tabelul 1. Concentrația și calitatea ADN extrase din probele de lapte mastitic

	Produsul analizat	Concentrația ng/ μl	A _{260/280}	A _{260/230}
1	Proba A	41,25	2,06	1,51
2	Proba B	48,46	2,07	1,42
3	Proba C	42,90	1,82	1,53
4	Proba D	38,94	1,99	1,32
5	Proba E	54,67	1,91	1,52

Izolarea ADN din probe de lapte proaspăt

Extracție ADN din culturile celulare cu ajutorul kitului „innuPREP DNA mini”:

Pași recomandați înainte de începerea procedurii:

- încălzirea mixerului termal sau a băii de apă la 50 °C
- prepararea Proteinazei K, soluției de spălare HS și MS conform instrucțiunilor

1. Materie primă: maxim 5 x 10⁶ celule

2. Centrifugare:

- 5000 x g (~5000 rpm): 10 min
- înlăturare supernatant

3. Liza:

- adăugare 400 μl TLS și 25 μl Proteinaza K
- vortexare 5 secunde
- incubare la 50 °C până la lizarea probei

4. Legarea ADN:

- adăugare 400 μl TLS
- vortexare 15 secunde
- adăugare filtru de centrifugare la tubul colector
- adăugarea probei la filtru de centrifugare
- 11000 x g (~11000 rpm): 2 min

Studiu bibliografic și încercări preliminare pentru stabilirea unor protocoale

5. Spălarea în tub colector nou:

- adăugarea 500 μ l HS
- 11000 x g (~11000 rpm): 1 min
- adăugarea 750 μ l MS
- 11000 x g (~11000 rpm): 1 min

6. Îndepărtarea Etanolului în tub colector nou:

- înlăturarea filtratului
- adăugare filtru de centrifugare la tubul colector
- 11000 x g (~11000 rpm): 2 min

7. Eluare:

- adăugare filtru de centrifugare la tubul de eluare
- adăugarea 200 μ l tampon de eluție
- incubare 1 minut la temperatura camerei
- 11000 x g (~11000 rpm): 1 min

Analizele de tip PCR

Reacțiile de tip PCR s-au efectuat cu ajutorul Termociclorului Surecyclor a Gilent Technologies. Reactivii care au alcătuit amestecul de amplificare au fost următorii: kitul PCR: KapaRobust Hot Start 2X (KapaBiosystems, U.S.A)- 12.5 μ l, 20 pmol din fiecare primer, ADN matriță – 1 μ l, ajustat cu apă distilată până la 25 μ l. Condițiile de amplificare au fost conform cu datele din literatură și sunt listate mai jos. Programe PCR pentru amplificarea cu primerii au fost descriși mai sus, în tabelul 2.

Tabelul 2. Condițiile de amplificare PCR

	Etapă	Temperatură	Timp
	Denaturare inițială	95oC	3 min
Nr. de cicluri 35	Denaturare	95oC	20 sec
	Legarea primerilor	55-60oC	20 sec
	Sinteza ADN	72oC	60 sec
	Extensie finală	72oC	3 min

Analiza rezultatelor PCR prin electroforeză în gel de agaroză

Electroforeza este o metodă analitică de separare a particulelor încărcate electric sub acțiunea unui câmp electric uniform aplicat din exterior. Separarea acizilor nucleici prin electroforeză în gel de agaroză este cea mai avantajoasă metodă de analiză atât pentru ADN cât și pentru ARN.

1.1.1. Identificarea bacteriei E.coli in probele de lapte mastitic luate în studiu.

Studiul a continuat cu etapa de identificarea bacteriei E.coli din probele analizate. Aceasta identificare s-a facut prin amplificarea unei secvențe de ADN specifice acestei bacterii care este marker molecular pentru gena USpA (Fig. 1).

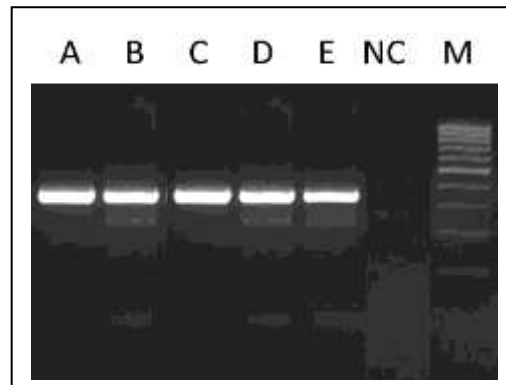


Fig.1. Analiza prin electroforeza in gel de agaroză a produsilor de amplificare specifici genei UspA: A- ADN izolat din proba A; B- ADN izolat din proba B; C- ADN izolat din proba C; D- ADN izolat din proba D; E- ADN izolat din proba E; NC- Controlul negativ de reacție; M – Marcator de greutate moleculară(PCRSizer 100bp DNA Ladder, Norgen)

Din analiza gelului de agaroză rezulta ca bacteria E.coli este prezenta in fiecare dintre probele luate in studiu, identificarea fiind marcata de prezența ampliconului de aproximativ 360 pb in fiecare dintre cele cinci probe.

Urmatorul pas al acestei etape a acestui studiu a fost identificarea nivelului de patogenitate a bacteriilor din probele analizate. Pentru aceasta s-a identificat markerul molecular specific genei afa a carei prezența indică potențialul patogen al tulpinilor de E.coli.

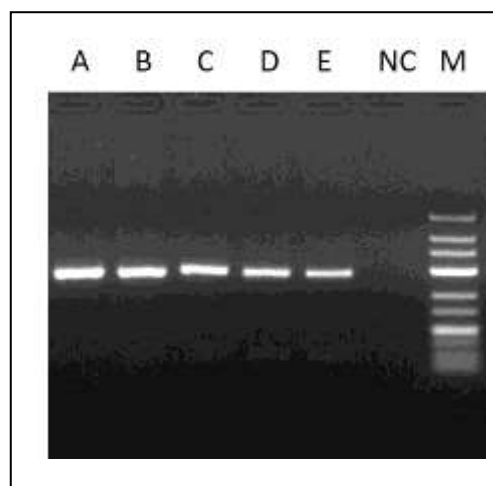


Fig.2. Analiza prin electroforeza in gel de agaroză a produsilor de amplificare specifici genei afa: A- ADN izolat din proba A; B- ADN izolat din proba B; C- ADN izolat din proba C; D- ADN izolat din proba D; E- ADN izolat din proba E; NC- Controlul negativ de reacție; M – Marcator de greutate moleculară(PCRSizer 100bp DNA Ladder, Norgen)

Ampliconul specific genei care indică patogenitatea tulpinilor E. coli luate în studiu este o secvență de ADN de aproximativ 420 pb. Analizand Figura 2 se observa ca toate tulpinile de E.coli analizate sunt pozitive pentru gena afa, ceea ce inseamna ca toate tulpinile analizate au un ridicat potențial patogen, tipul de patogenitate neputând fi decelat în acest moment

1.1.2. Identificarea tulpinilor E.coli prin secvențiere ADN.

Pentru identificarea tulpinilor de E.coli s-a folosit metoda de secvențiere a ADN-ului, mai precis, a unui marker molecular specific pentru gena ARN ribozomal 16S. Aceasta etapă presupune amplificarea PCR a fragmentului specific genei, analiza acestuia prin migrarea într-un gel de agaroză, izolarea fragmentului de interes din gel și secvențierea acestuia folosind primeri specifici pentru identificarea tulpinilor E.coli, 27F.

Fragmentele de ADN folosite la identificarea tulpinilor de E.coli patogen au fost migrate în gel de agaroză pentru confirmarea prezenței lor din gelul de agaroză au fost izolate folosind kitul Monarch DNA Gel Extraction, New England BioLabs.

Pas recomandat înainte de începerea procedurii: se adaugă 4 volume de etanol la un volum de soluție tampon de spălare ADN. Toate etapele ce includ centrifugare trebuie realizate la 16,000 x g (~13000 rpm)

Pașii protocolului:

1. Se excizează fragmentul ADN din gelul de agaroză, cu înlăturarea excesului de agaroză. Se transferă fragmentul de ADN într-un tub de centrifugare de 1.5 ml cântărind felia de gel. Reduceți expunerea la lumină UV.
2. Se adaugă 4 volume de tampon gel de dizolvare la felia de gel.
3. Se incubează proba la o temperatură cuprinsă între 37-55 °C, vortexând periodic până când felia de gel e complet dizolvată. În general durează 5-10 minute.
4. Se inseră coloana în tubul colector și se încarcă proba în coloană. Se centrifughează 1 minut înlăturând lichidul.
5. Se reinseră coloana în tubul colector. Se adaugă 200 μl tampon de spălare ADN urmând a se centrifuga 1 min.
6. Repetarea pasului 5.
7. Se transferă coloana într-un tub curat de centrifugare de 1.5 ml
8. Se adaugă 6 μl tampon de eluție ADN în centrul matricii. Se așteaptă un minut după care se centrifughează un minut pentru eluarea ADN.
9. ADN aflat în suspensie a fost trimis pentru secvențiere la laboratoarele Macrogen, Amsterdam, Olanda. Secvențele obținute au fost primite în format electronic iar identificarea tulpinilor a fost efectuată prin analize in silico având drept etalon secvențele specifice pentru tulpini E.coli patogene aflate în baza de date NCBI.

Fragmentul ADN specific identificării E. coli are dimensiunea de 886 pb și conține secvențe de nucleotide specifice tulpinilor E.coli. Astfel, este permisă identificarea cu acuratețe a acestora prin analiza succesiunii nucleotidelor în segmentul ADN analizat.

Ampliconul obținut în urma reacției PCR a fost identificat prin migrare în gel de agaroză (Figura 3). Odată stabilită prezența lui, acesta a fost izolat din gel, excluzând astfel secvențierea unor fragmente nespecifice de dimensiuni reduse care apar în cazul probei B și slab vizibil în cazul probei A și C.

În urma secvențierii au fost obținute fragmente la diferite dimensiuni – între 1002 și 1560 de pb, dar care conțineau și secvența de interes cu dimensiunea de 886 perechi de baze. Secvențele obținute pentru fiecare din cele cinci tulpini E.coli luate în studiu au fost încărcate în baza de date NCBI și analizate folosind funcția blastn. Aceasta funcție permite identificarea in silico a secvențelor asemănătoare cu secvența de analizat, care sunt stocate în această bază de date. Pentru acest studiu căutarea a fost restricționată la secvențele de referință recunoscute specifice organismului E.coli.

Studiu bibliografic și încercări preliminare pentru stabilirea unor protocoale

În urma analizelor folosind baza de date NCBI, s-a constatat că cel mai ridicat procent de similaritate a secvențelor analizate a fost cu tulpina enterohemoragică *E. coli* O157_H7, de aceea aceasta a fost introdusă ca secvență de referință în aliniamentul celor cinci secvențe obținute în acest studiu, pe baza căreia s-a construit o dendrogramă a filogeniei. Secvențele au fost aliate folosind softul T-Coffee a organizației EMBL folosind funcția ALIGN two or more DNA sequences.

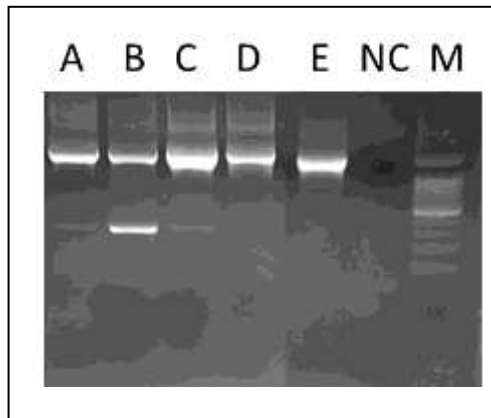


Fig. 3 Analiza prin electroforeza în gel de agaroză a produsilor de amplificare specifici genei ARNr 16S: : A- ADN izolat din proba A; B- ADN izolat din proba B; C- ADN izolat din proba C; D- ADN izolat din proba D; E- ADN izolat din proba E; NC- Controlul negativ de reacție; M – Marcator de greutate moleculară(PCRSizer 100bp DNA Ladder, Norgen).

Din analiza aliniamentului celor cinci secvențe obținute în acest studiu alături de secvența de referință a *E. coli* enterohemoragică se evidențiază secvențele nucleotidice comune tuturor celor șase fragmente analizate, marcate cu „*”, pot fi identificate și secvențe care sunt diferite, dar și porțiunile care lipsesc din secvențele analizate (denumite gaps), acestea fiind evidențiate prin notarea cu „ - ”. Acestea din urmă pot apărea datorită elementelor transpozabile care pot să apară sau să dispară pe parcursul evoluției individuale ale tulpinilor bacteriene cel mai probabil făcând parte din mecanismele de adaptare la mediu a acestora. Aceste elemente alături de mutațiile punctiforme, denumite generic SNP (Single Nucleotide Polimorphism) permit identificarea de noi subtipuri care au evoluat dintr-o origine comună.

```

Ec_A_27F      TGTGGTGGACGGGTGATTAACAAGTGGGAACGTGCCTTTAAGTTCGGAGT
Ec_B_27F      -GCGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGCCTTTTTGAGTTCTGGTTTGAAT
Ec_C_27F      AGCGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCTTCTGGTCTGGAAT
Ec_D_27F      AGCGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCTTCTGGTCTGGAAT
Ec_E_27F      AGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCCGATGGAGGGGGAT
Ec_O157_H7    -----TA-----
                **
    
```

Studiu bibliografic și încercări preliminare pentru stabilirea unor protocoale

Ec_A_27F AACTCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGAATG-TGCC-----CTTC-GG
 Ec_B_27F AACCTGGGAAACTAGGGCTCATACCGGATA-CGCC-----CTTT-TG
 Ec_C_27F AACCTGGGAAACTAGGGCTAATACCGGATA-CGCC-----CTTT-TG
 Ec_D_27F AACCTGGGAAACTAGGGCTAATACCGGATA-CGCC-----CTTT-TG
 Ec_E_27F AACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAG
 Ec_O157_H7 -----

Ec_A_27F GGGAA-----AGATTTATCGCCTTTAGAGCGGCCCGCGTCTGAATATCTA
 Ec_B_27F GGGAA-----AGGTTTACTGCCGGAAGATCGGCCCGCGTCTGATTAGCTA
 Ec_C_27F GGGAA-----AGGTTTACTGCCGGAAGATCGGCCCGCGTCTGATTAGCTA
 Ec_D_27F GGGAA-----AGGTTTACTGCCGGAAGATCGGCCCGCGTCTGATTAGCTA
 Ec_E_27F GGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTA
 Ec_O157_H7 -----GCTA

Ec_A_27F GTTGGGGAGGGAAAGGCTCACCTAGGCGACGATG-GTGACTGGTGTGACA
 Ec_B_27F GTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGA
 Ec_C_27F GTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGA
 Ec_D_27F GTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGA
 Ec_E_27F GTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA
 Ec_O157_H7 GTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA

** ** *

Ec_A_27F CGATGATCACCCACATTGGGACTGAGACACAGCCAAACTCCTACGGGAG
 Ec_B_27F GGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG
 Ec_C_27F GGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG
 Ec_D_27F GGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG
 Ec_E_27F GGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGGACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG
 Ec_O157_H7 GGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGGACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG

***** ** ***** *

Ec_A_27F GACTGAGTGGGGAATCTTGCGC-TTGGGCGAAAGCCTGACG--GACCTGC
 Ec_B_27F GCAGCACTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGC
 Ec_C_27F GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGC
 Ec_D_27F GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGC
 Ec_E_27F GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGC
 Ec_O157_H7 GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGC

* * ***** *

Ec_A_27F CGCGTGAATGATGAAGGG-ATAGGATTGTAAAATTCTTTCAACGGGGACC
 Ec_B_27F CGCGTGAATGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTATCCGGGACC
 Ec_C_27F CGCGTGAATGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTATCCGGGACC
 Ec_D_27F CGCGTGAATGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTATCCGGGACC
 Ec_E_27F CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGAGGAGG
 Ec_O157_H7 CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGG

***** ** *

Studiu bibliografic și încercări preliminare pentru stabilirea unor protocoale

Ec_A_27F A-----TA-----ATGACGGTACCCGGAGAAGAAG
 Ec_B_27F A-----TA-----ATGACGGTACCCGGAGGAATAAG
 Ec_C_27F A-----TA-----ATGACGGTACCCGGAGGAATAAG
 Ec_D_27F A-----TA-----ATGACGGTACCCGGAGGAATAAG
 Ec_E_27F AAGGTGTTGTGGTTAATAACCCGAGTGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAG
 Ec_O157_H7 AAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAG
 * ** ***** ** * ** *

Ec_A_27F CCCC GGCTAACTTCTTGCCGTACCCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAACG
 Ec_B_27F CCCC GGCTAACTTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCG
 Ec_C_27F CCCC GGCTAACTTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCG
 Ec_D_27F CCCC GGCTAACTTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCG
 Ec_E_27F CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
 Ec_O157_H7 CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
 * ***** * **** ***** ***** ** * ** *

Ec_A_27F TTGCTCCGAATTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTACGCTGACCTTTAATATT
 Ec_B_27F TTGCTCTGAATCACTGGGCGTAAC-GGCGGTATGCGGCGTTT-AGTCG
 Ec_C_27F TTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGGCGTTTAAAGTCG
 Ec_D_27F TTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGGTATGCGGCGTTTAAAGTCG
 Ec_E_27F TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCG
 Ec_O157_H7 TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCA
 ** ** ***** ***** * ** * ** * ** *

Ec_A_27F GGGGTGAAATACCTGGGCTCCACCTCGGAATTGCCGTTGATACTGGCTGA
 Ec_B_27F G-GGCGAAAGCCTGTGGCTCA-CCACA-AATGGGCTT-CCTACTGGGACG
 Ec_C_27F GGGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACCACAGAATGGCCTTCGATACTGGGACG
 Ec_D_27F GGGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACCACAGAATGGCCTTCGATACTGGGACG
 Ec_E_27F GATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCGAAACTGGCAGG
 Ec_O157_H7 GATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAG
 * ***** * ***** ** * ** *****

Ec_A_27F CGTGAGTATGACAGACTTGTGTGGAACCTCCGCGTGTTAAAGTGAAATTCG
 Ec_B_27F CTTGAGTATGG-AGAGGTT-GTGGAACCTGCCA-TGTAA-AGTGAAAT-CT
 Ec_C_27F CTTGAGTATGGTAGAGGTTGGTGGAACTGCCAGTGTAGAGGTGAAATTCG
 Ec_D_27F CTTGAGTATGGTAGAGGTTGGTGGAACTGCCAGTGTAGAGGTGAAATTCG
 Ec_E_27F CTAGAGTCTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG
 Ec_O157_H7 CTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG
 * ***** ** * ** * ** * ** ***** *

Ec_A_27F TAAATATGCAGATCATGGTGTATGGCGGAAGTGACACACTGTCTCGATGC
 Ec_B_27F TAGATATTC-AAGAAAACC-GTGGTGAA-GCGGCC-ACTGGACA-C-TA
 Ec_C_27F TA-----
 Ec_D_27F TAGATATTCGCAAGAACCCGGTGGCGAAAGCGGCCAACTGGACCATTAC
 Ec_E_27F TAGAGATCTGGAGGAATACCCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGAC
 Ec_O157_H7 TAGAGATCTGGAGGAATACCCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGAC
 **

Studiu bibliografic și încercări preliminare pentru stabilirea unor protocoale

```

Ec_A_27F   TGACCCTTAGGCTCGGCAGATCGCTGAGCAAACACTGATACATACCCTGG
Ec_B_27F   TGACGCTGAGG-GCGAAAGC-CGGGGAGCAAACCG--ATAGATACCCTGG
Ec_C_27F   -----
Ec_D_27F   TGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
Ec_E_27F   TGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTG GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
Ec_O157_H7 TGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTG GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
    
```

Fig.4 Secvența nucleotidică a genei ARNr16S a izolatelor de E.coli din acest studiu și Ec_0157_H7.

În ceea ce privește materialul luat în studiu se observă că tulpinile analizate prezintă un grad ridicat de similitudine deși au fost izolate din locații diferite ceea ce evidențiază rolul mediului în evoluția acestora. Totuși dintre acestea se remarcă izolatul E la care se constata gradul cel mai înalt de similitudine cu tulpina enterohemoragică Ec_0157_H7. Pe baza secvențelor a fost întocmită o dendrogramă care arată înrudirea filogenetică între aceste secvențe. Aceasta dendrogramă s-a construit folosind neighbor-joining algorithm a secvențelor nucleotidice ale genei ARNr 16S.

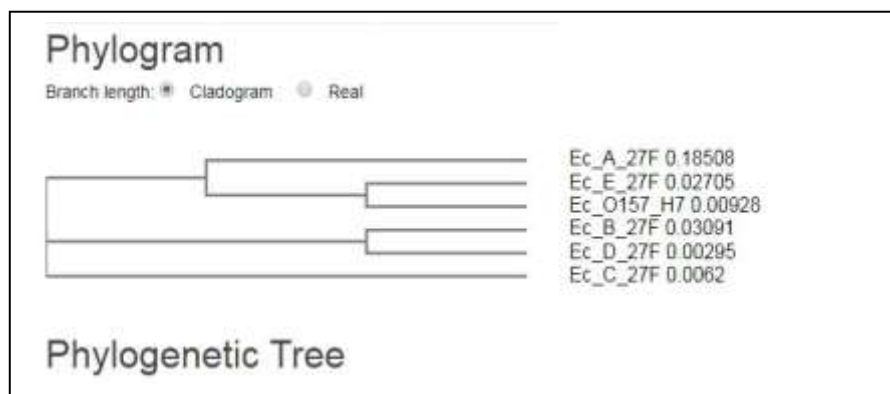


Fig.5 Dendrogramă neighbor-joining algorithm a secvențelor nucleotidice ale genei ARNr16S

Secvențele introduse în softul pentru aliniere au fost grupate pornind de la origine comună. Astfel, cele șase izolate au fost grupate în trei cluster distincte, primul cluster conținând izolatele A și E alături de tulpina enterohemoragică de referință. Acest prim cluster este divizionat în două subcluster, dintre care cel de al doilea conține izolatul E care este identificat ca fiind foarte asemănător cu tulpina de referință E. coli O157_H7. Cel de al doilea cluster conține izolatele B și D, care sunt foarte asemănătoare. Acestea provin de la ferme aflate în locații învecinate, din aceeași localitate.

Cel de al treilea cluster conține doar izolatul C, ceea ce denotă o formă de evoluție diferită de restul izolatelor acesta putând fi o subtulpină distinctă de restul izolatelor din acest studiu.

Sumarizând datele obținute în urma identificării prin secvențiere, se poate concluziona că prezența bacteriei E. coli a fost evidențiată în fiecare dintre probele recoltate, acestea fiind identificate ca și tulpini cu potențial patogen. Mai mult, în urma analizei in silico a datelor obținute, acestea au demonstrat un indice ridicat de similaritate cu tulpina E.coli enterohemoragică, aceasta fiind folosită ca și secvență de referință în stabilirea

Studiu bibliografic și încercări preliminare pentru stabilirea unor protocoale

relațiilor de filogenie în ceea ce privește caracterul patogen a celor cinci izolate bacteriene luate în studiu. Având în vedere toate acestea, următoarea etapă a studiului a vizat identificarea genelor de rezistență a acestor izolate bacteriene la antibiotice. Pentru aceasta au fost alese genele de rezistență caracteristice antibioticelor folosite în mod uzual în tratarea mastitelor la bovine, cum ar fi streptomycină, gentamicina și grupul cefalosporinelor - penicilina (Beta-lactams, genotip rezistent – bla_{CMY}).

1.1.3. Identificarea genelor de rezistență la antibiotice

Pentru această etapă a studiului s-a folosit ADN izolat din probele de lapte mastitic, care a fost matrită pentru reacțiile de tip PCR, folosind primeri specifici pentru fiecare dintre cele trei gene de rezistență abordate (Tabelul 1).

Gentamicina este o substanță cu acțiune antibiotică (antibiotic aminoglicozid) utilizată frecvent în tratamentul mastitelor la bovine. Ca răspuns la acțiunea acesteia s-a constatat că bacteriile au dezvoltat o genă de rezistență care poartă denumirea de genă aac(3)-IV. Aceasta genă are localizare plasmidică și codifică o enzimă cu denumirea aminoglicozid acetiltransferază în bacterii precum *E. coli*, care acționează prin inactivarea antibioticului. Ampliconi rezultați în urma reacției PCR au fost migrați în gel de agaroză și apoi vizualizați în lumina UV. Segmentul pentru markerul molecular care servește la identificarea genei aac(3)-IV are o dimensiune de aproximativ 250 pb. Din analiza efectuată se constată că secvența țintă a acestei identificări este prezentă doar în izolatele *E. coli* prezente în proba de lapte notată cu D.

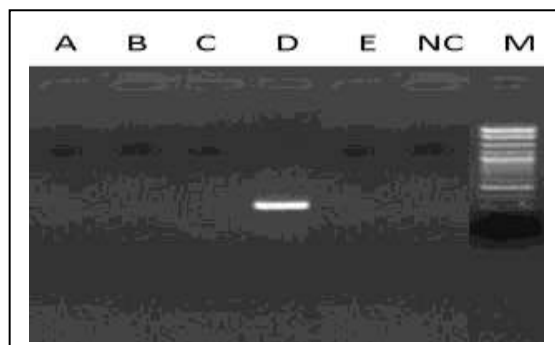


Fig.6 Identificarea izolatelor *E.coli* care detin gena de rezistență la gentamicina (aac(3)-IV)
 A- ADN izolat din proba A; B- ADN izolat din proba B; C- ADN izolat din proba C; D- ADN izolat din proba D; E- ADN izolat din proba E; NC- Controlul negativ de reacție; M – Marcator de greutate moleculară (PCRSizer 100bp DNA Ladder, Norgen)

Deși analiza efectuată nu este o analiză cantitativă, intensitatea imaginii ampliconului prin comparație cu marcatorul de greutate moleculară, indică faptul că gena de rezistență la gentamicină este prezentă în copii multiple în genoamele analizate ceea ce denotă o rezistență puternică a bacteriilor la antibioticul gentamicină.

Streptomycină este un antibiotic care se folosește sub formă de sulfat de streptomycină, în asociație pentru tratamentul mastitelor produse de agenți infecțioși Gram-pozitivi și Gram-negativi, făcând parte din grupa aminoglicozidelor și fiind eficient inclusiv împotriva bacteriei *E.coli*.

Studiu bibliografic și încercări preliminare pentru stabilirea unor protocoale

Pentru a contracara acțiunea streptomisinei, bacteriile au dezvoltat o genă de rezistență denumită gena *aadA1*, acesta fiind o genă cu localizare plasmidică, dar poate fi regăsită și pe transpozomi și integroni, codificând o enzimă cu denumirea aminoglicozid nucleotidiltransferaza în bacterii precum *E. coli*, mecanismul de rezistență fiind prin inactivarea antibioticului.

Produsul reacției PCR au fost analizat prin electroforeză în gel de agaroză iar imaginea a fost preluată în lumina UV. Ampliconul specific pentru markerul molecular care servește la identificarea genei *aadA1* are o dimensiune de aproximativ 450 pb. Prezența genei de rezistență se constată în izolatele *E. coli* prezente în proba de lapte notată cu A, D și E.

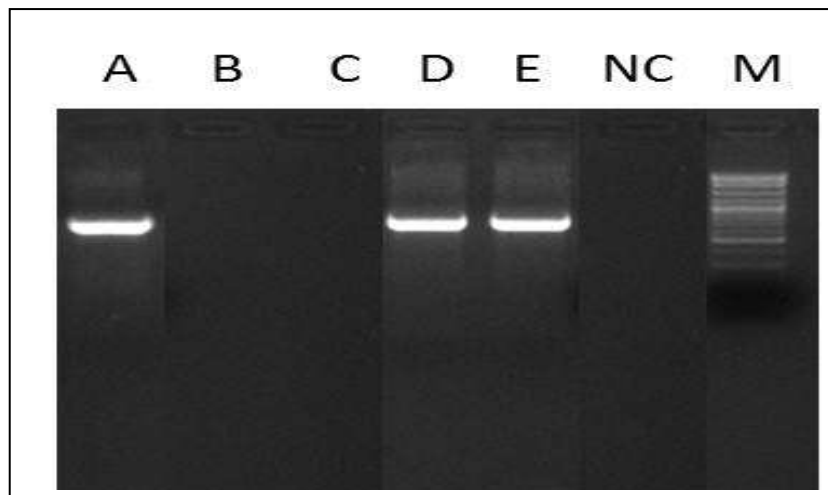


Fig.7 Identificarea izolatelor *E. coli* care detin gena de rezistentă la streptomicina (*aadA1*)
 A- ADN izolat din proba A; B- ADN izolat din proba B; C- ADN izolat din proba C; D- ADN izolat din proba D; E- ADN izolat din proba E; NC- Controlul negativ de reacție; M – Marcator de greutate moleculară (PCRSizer 100bp DNA Ladder, Norgen)

Spre deosebire de genotipurile rezistente la gentamicină, în cazul rezistenței la streptomycină au fost identificate trei dintre izolatele bacteriene analizate. În plus se constată că, izolatul din proba D deține o dublă rezistență pentru antibioticele streptomycină dar și gentamicină. Cefalosporinele sunt o clasă de antibiotice aparținând clasei beta-lactamide fiind un antibiotic care acționează prin inhibarea sintezei peretelui celulei bacteriene, inclusiv a celor Gram-negative.

Pentru a contracara acțiunea cefalosporinelor, bacteriile au dezvoltat o serie de gene de rezistență denumite generic bla rezistance genes, acestea fiind o genă plasmidică, dar poate fi regăsită și pe integroni, codificând o enzimă cu denumirea de beta-lactamază în bacterii precum *E. coli*, mecanismul de rezistență fiind prin inactivarea antibioticului. Din grupa genelor de rezistență pentru acest studiu a fost aleasă gena de rezistență la peniciline *bla_{CMY}*

Secvența ADN țintă a fost amplificată prin reacția PCR, produsul reacției fiind analizat prin electroforeză în gel de agaroză iar imaginea a fost preluată în lumina UV. Ampliconul specific pentru markerul molecular care servește la identificarea genei *bla_{CMY}* are o dimensiune de aproximativ 460 pb. Prezența genei de rezistență la peniciline se constată în izolatele *E. coli* prezente în proba de lapte notată cu A, B, C și E.

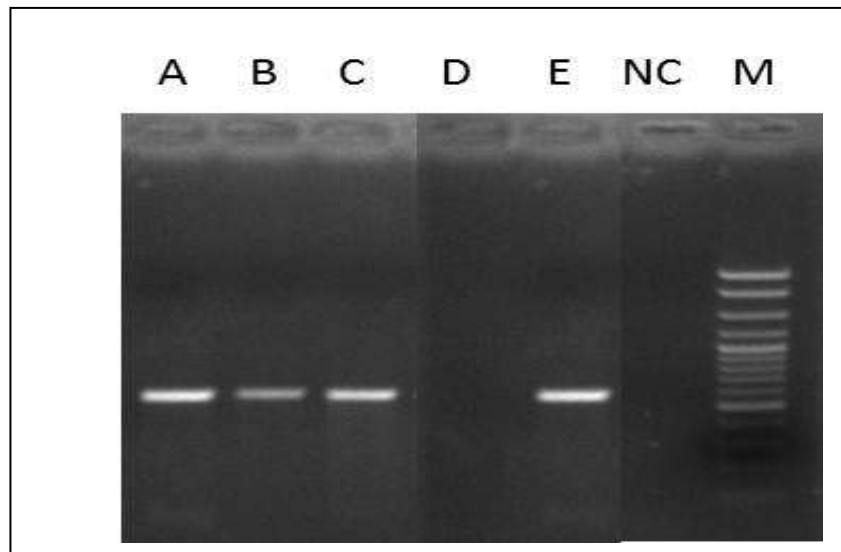


Fig.8 Identificarea izolatelor E.coli care detin gena de rezistenta la cefalosporine (bla_{CMY}): A- ADN izolat din proba A; B- ADN izolat din proba B; C- ADN izolat din proba C; D- ADN izolat din proba D; E- ADN izolat din proba E; NC- Controlul negativ de reactie; M – Marcator de greutate moleculara(PCRSizer 100bp DNA Ladder, Norgen).

Spre deosebire de primele cazuri prezentate mai sus, în cazul rezistenței la penicilină se constată ca patru dintre cele cinci izolate luate în studiu prezintă gena de rezistență, fapt ce era de anticipat, deoarece se cunoaște că majoritatea tulpinilor de E. coli au dezvoltat acest caracter. Izolatele bacteriene din proba C, deține doar rezistența la peniciline, pe când în cazul izolatului din proba D, aceasta lipsește. Izolatul bacterian din proba D a fost identificat cu rezistență dublă la antibioticele streptomycină și gentamicină, lipsindu-i tocmai rezistența cea mai des întâlnită. Este foarte posibil ca acest genotip să fi evoluat în lipsa tratamentelor antibiotice pe bază de penicilină.

1.1.4. Identificarea diferentelor între mecanismele de dezvoltare a rezistenței la antibiotice

A patra etapa a studiului a constat în identificarea diversității genetice a izolatelor studiate din punctul de vedere al dezvoltării acestor mecanisme de rezistență. Este cunoscut faptul că există câteva tipuri de mecanisme de dezvoltare a rezistenței la antibiotice în populațiile bacteriene. În cele mai multe cazuri dezvoltarea acestor mecanisme pornesc de la modificări ale genelor poziționate la nivelul integronilor, aceștia fiind definiți ca și cele mai versatile sisteme de achiziționare a genelor ai bacteriilor. Integronii fac parte din grupa elementelor genetice mobile (MGEs) prin intermediul cărora are loc transferul orizontal de gene, fiind contributory la apariția, recombinația și diseminarea caracterului multidrug resistance printre bacteriile patogene.

Tocmai de aceea regiuni ADN specifice care fac parte din acești integroni pot fi folosite în identificarea diversității genetice a tulpinilor bacteriene, acesta fiind un fenomen important pentru evidențierea diferitelor mecanisme de rezistență la antibiotice.

Pentru acest tip de analiză a fost folosit sistemul de markeri moleculari ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) prin analize de tip PCR. În urma analizei au fost obținute amprente moleculare pentru cei doi primeri utilizați (Fig.9).

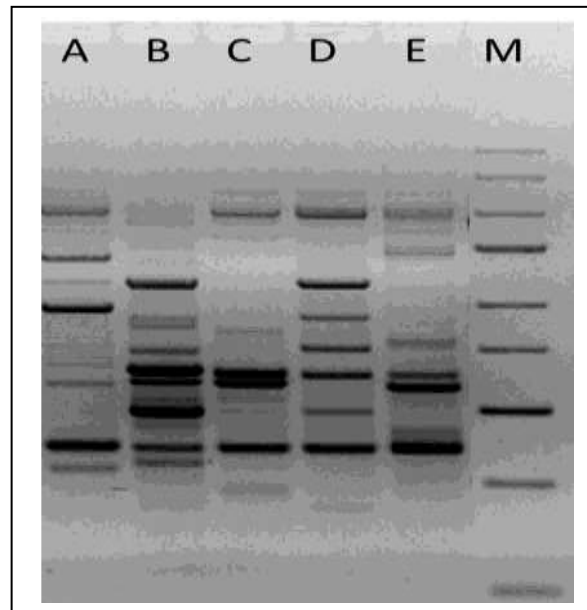


Fig. 9 Amprenta moleculară a izolatelor E.coli pentru markerul molecular ERIC 1: A- ADN izolat din proba A; B- ADN izolat din proba B; C- ADN izolat din proba C; D- ADN izolat din proba D; E- ADN izolat din proba E; M – Marcator de greutate moleculară (PCRSizer 100bp DNA Ladder, Norgen).

Prin analiza amprentelor moleculare obținute pentru markerii moleculari ERIC, se evidențiază faptul că diversitatea genetică între populațiile bacteriene este la un nivel ridicat, ceea ce sugerează capacitatea tulpinilor bacteriene de a-și dezvolta mecanisme de rezistență variate care au ca rezulta final acumularea de noi gene de rezistență la antibiotice.

Ampretele moleculare obținute au fost analizate folosind softul VisionWorksLC, care identifică secvențele similar grupându-le în funcție de greutatea moleculară (Fig.). Datele colectate din aceste analize au fost folosite în dezvoltarea unei matrice binare cu 84 de alele care au fost înregistrate, dintre care 39 au evidențiat polimorfism. Această matrice a fost compusă din scoruri („1;” pentru prezent și „0,” pentru absent) pentru ampretele moleculare ale fiecăreia dintre cele cinci izolate E. coli luate în studiu, obținute cu cei doi marker moleculari.

Această matrice a fost încărcată în softul de analiză sub formă de un set complet de variabile. Cu ajutorul acestui soft, folosind coeficientul de corelație Pearson au fost dezvoltate matricele de similaritate genetică și cea de distanță genetică (Table 4, Table 5).

Distanțele genetice sunt utilizate pentru a aproxima divergența genetică dintre probele analizate. Astfel, o valoare de „0,” înseamnă lipsa divergenței genetice, obținută doar în cazul în care se compară un individ cu el însuși, și valoarea „1,” care este un prag teoretic maxim. Valoarea medie este de aproximativ 0,5. Analizând matricea obținută se poate observa că distanța genetică între izolatele E.coli este puțin peste valoarea medie. Valoarea minimă de 0,513 a fost obținută în acest caz între izolatele A și E. Valoarea cea mai mare, 0,750 este înregistrată între izolatele B și E. ”.

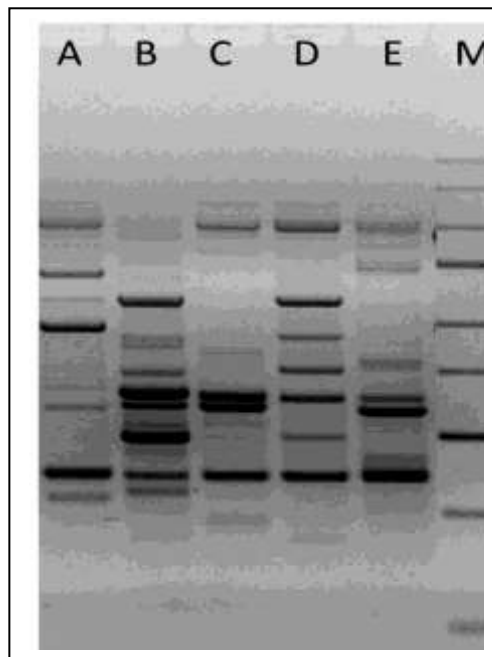


Fig. 10 Amprenta moleculară a izolatelor E.coli pentru markerul molecular ERIC 2: A- ADN izolat din proba A; B- ADN izolat din proba B; C- ADN izolat din proba C; D- ADN izolat din proba D; E- ADN izolat din proba E; M – Marcator de greutate moleculară (PCRSizer 100bp DNA Ladder, Norgen).

Coeficienții de similaritate reprezintă gradul de înrudire dintre izolatele studiate și sunt exprimați cu valori de la 0 la 1. Similaritatea cea mai ridicată este teoretic reprezentată de valoarea 1. Lipsa similarității genetice fiind reprezentată cu valoarea 0. La fel ca și în cazul diversității genetice, valoarea de 0,5 este considerată o valoare medie, datele fiind interpretate în funcție de apartenența la intervalele menționate.

Analizând matricea obținută se poate observa că similaritatea genetică între izolatele E.coli este sub valoarea medie. Astfel, valoarea minimă de 0,250 a fost obținută în acest caz între izolatele B și E dar și între izolatele C și D. Valoarea cea mai mare, 0,487 este înregistrată între izolatele A și E. "

Tabel.3. Matricea de distanță genetică a izolatelor E.coli

	EcA	EcB	EcC	EcD	EcE
EcA	0	0,641	0,667	0,564	0,513
EcB		0	0,674	0,675	0,750
EcC			0	0,75	0,681
EcD				0	0,651
EcE					0

Tabel.4. Matricea de similaritate genetică a izolatelor E.coli

	EcA	EcB	EcC	EcD	EcE
EcA	1	0,359	0,333	0,436	0,487
EcB		1	0,326	0,325	0,25
EcC			1	0,25	0,319
EcD				1	0,349
EcE					1

Pe baza celor două matricelor rezultate a fost proiectată dendrogramă UPGMA (Figura 11). Coeficienții de similaritate sunt utilizați pentru a grupa izolatele E.coli în cluster, pe când lungimea clusterelor este dictată de coeficienții de distanță genetică. Dendrograma construită ilustrează relația genetică dintre izolatele E.coli în ceea ce privește mecanismele de dezvoltare a rezistenței la antibiotice.

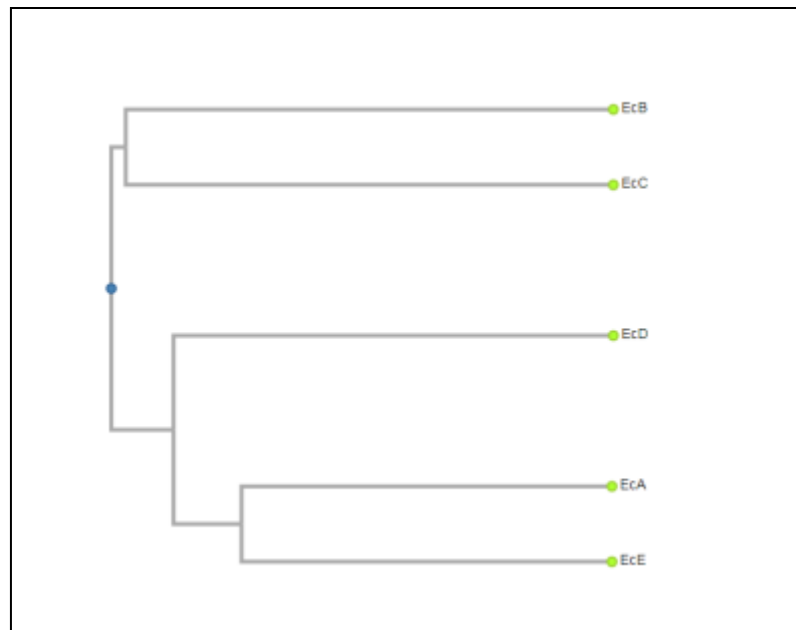


Fig. 11. Dendrograma UPGMA de înrudire genetică pentru cele cinci izolate bacteriene luate în studiu.

Analiza dendrogramei arată că cele cinci izolate E.coli sunt grupate în două cluster diferite. Primul grup conține izolatele B și C dar, se poate observa că lungimea clusterelor este destul de mare în comparație cu dimensiunea celui alt cluster, ceea ce înseamnă că deși sunt strâns înrudite diversitatea genetică pentru caracterul studiat este pronunțată. În cel de-al doilea grup major, cel mai distinct izolat este D, care este înregistrat separat în interiorul clusterului, acesta fiind și singurul dintre izolatele analizate care nu deține gena de rezistență la penicilină. Strâns înrudite sunt izolatele A și E, după cum rezultă din analiza dendrogramei, acestea fiind grupate într-un sub-cluster particular. În ansamblu, datele obținute sugerează, un grad mediu de similitudine între indivizii analizați, demonstrând încă odată diversitatea genetică a mecanismelor de rezistență la antibiotice a bacteriilor patogene.

3. Bibliografie:

Cărți, articole din reviste de specialitate

1. Berg, H. C., E.coli in motion, 2004, editura Springer, New York, ISBN 9780387008882.
2. Biggs, A., 2009, Mastitis in cattle, editura Crowood Press, Marlborough, UK, ISBN 9781847970718.
3. Donnenberg, M., E. coli: Genomics, Evolution and Pathogenesis, 2002, editura Academic Press, New York, ISBN 9780122207518.
4. Keyes K., Lee M.D., Maurer J.J., Antibiotics: Mode of Action, Mechanisms of Resistance and Transfer. Microbial Food Safety in Animal Agriculture Current Topics, 2003, editura Iowa State Press, Ames, USA, ISBN 9780813814957.

Acte normative

5. Ordinul nr. 682/2006 privind aprobarea Grilei de parametri pentru negocierea prețului de livrare al laptelui de vacă materie primă, stabilită de reprezentanții producătorilor și ai cumpărătorilor

Documente ale unor organizatii, la care s-a avut acces direct sau on-line:

6. Aarestrup F.M., Wegener H.C., Collignon P., Resistance in Bacteria of the food chain epidemiology and control strategies, 2008, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18847409>.
7. Bradley, A.J., 2002, Bovine mastitis: an evolving disease, University of Bristol, 2002, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359466>.
8. Bogaard A.E.V.D., Stobberingh E.E., Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans, 2000, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794955>.
9. Chopra I, Roberts M., Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology and Epidemiology of Bacterial Resistance, 2001, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11381101>.
10. Erskine, R.J., 2003, Mastitis in large animals, Michigan State University, <https://www.msdevetmanual.com/reproductive-system/mastitis-in-large-animals/overview-of-mastitis-in-large-animals>.
11. Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayshi G.S., Pfaller M.A., Medical Microbiology, 2002, Missouri, Mosby, USA, <http://micro.digitalproteus.com/cited.php>.
12. Scheutz, F. and Strockbine, N.A. and Genus, I. (2005) Escherichia Castellani and Chalmers in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Brenner, D. J., et al., Eds., Springer Inc., New York, 607-623.

Web site-uri

13. <https://www.merckvetmanual.com/reproductive-system/mastitis-in-large-animals/overview-of-mastitis-in-large-animals>, Accesat 07.04.2018.
14. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Escherichia_coli, Accesat 13.05.2018.

Responsabil proiect component 4

Conf.dr.ing. Tulcan

Responsabil etapa 4.2.

As.dr.ing. Boldura Oana Maria

Responsabil activitate 4.2.1.

Prof.dr. Popescu Sorina