

Raport/Studiu

Alcătuirea biobancă probe.

Stabilirea unor culturi dedicate în condiții standardizate și reproductibile

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

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

Colectiv de redacție:

Coordonator: Prof. dr. Gabriela Tănăsie

Membri: Asist.univ. dr. Csilla Zambori, Conf. Dr. Carmen Tatu, Biolog dr. Simona Anghel

Data finalizării: 03.12.2018

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. Alcătuire biobancă probe

Studiul de față a avut ca **scop principal** alcătuirea biobancii de probe, folosind ca sursă a materialului biologic, probele prelevate de la pacienții cu diferite infecții microbiene care s-au adresat spitalului nostru.

Obiectivul specific l-a reprezentat monitorizarea frecvenței izolării și identificării unor specii bacteriene din diferite probe biologice recoltate de la pacienții cu infecții microbiene, respectiv a tulpinilor din genurile: *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*, *Providencia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Morganella* care au fost identificate mai frecvent.

1.1. Metode folosite

S-au utilizat **metode moderne** de izolare, identificare și fenotipare a agenților microbieni pentru a putea pune în evidență rezistența antimicrobiană a speciilor de bacterii recoltate din diferite probe biologice. În acest scop s-au recoltat probe de sânge, spută, aspirat bronșic, urină și din diverse plăgi. Recoltarea s-a făcut cu acordul pacientului prin semnarea formularului de exprimare a acordului, fiecare pacient având alocat un cod unic de identificare.

1.1.1. Hemocultura

Pentru **hemocultură** care este un test calitativ pentru detectarea microorganismelor prezente în sânge, acesta a fost prelevat în condiții de strictă asepsie și însămânțat în flaconul de hemocultură a cărui compoziție favorizează dezvoltarea germenilor aerobi, anaerobi și microaerofili. Principalii factori de îmbogățire încorporați în mediul care favorizează dezvoltarea germenilor au fost:

- asociere de peptone, cazeina și gelatina pentru aportul de aminoacizi;
- extract de levuri pentru aportul de vitamine;
- hemine și NAD care permit dezvoltarea *Haemophilus* și favorizează creșterea unor germeni pretențioși nutritiv cum sunt *Actinobacillus spp*, *Cardiobacterium spp*, *Eikenella spp* și alți anaerobi;
- vitamina B6, element indispensabil în dezvoltarea streptococului deficient întâlnit în endocardite și a stafilococului;
- CO₂ element important pentru creșterea germenilor din speciile: *Neisseria*, *Brucella*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Campylobacter*.

1.1.2. Sputa și aspiratele

Sputa și aspiratele s-au recoltat în recipiente sterile iar însămânțarea s-a făcut în bulion.

1.1.3. Plăgi

Recoltarea probelor din **plăgi** s-a făcut prin puncționarea și aspirarea cu seringă sau cu tamponul din profunzimea plăgii. Procedul prelevării probelor din plăgi a fost diferit în funcție de localizarea leziunilor, de acesta depinzând stabilirea unui diagnostic microbiologic corect.

Alcătuirea biobancii de probe - stabilirea unor culturi dedicate în condiții standardizate

Astfel s-a recurs la următoarele metode:

- recoltarea aseptică prin biopsie, cu debridare;
- abraziunea dermică, cu obținerea de mostre tisulare, fără a fi la fel de invazivă ca biopsia;
- recoltarea prin punționare și aspirare cu seringă sterilă – în cazul plăgilor profunde insuficient drenate sau fistulizate (în special cele de la nivelul ganglionilor);
- recoltarea cu tampon steril. S-au recoltat 2 tampoane sterile: unul fără mediu pentru efectuarea frotiurilor colorate **Gram** și **Giensa**, celălalt pentru însămânțări pe mediile de cultură;

Prezența unui volum mare de lichid a necesitat recoltarea prin aspirare cu seringă sterilă, metodă recomandată și în cazul lichidului din abces.

Recoltarea probelor de **urină** s-a realizat în recipiente sterile, cu închidere etanșă.

1.2. Transportul

Transportul probelor care a fost urmat de procesarea lor s-a făcut în maxim 2 ore.

1.3. Examenul microbiologic

Ulterior, probele au fost supuse **examenului microbiologic**. Pentru izolarea și identificarea bacteriilor recoltate din probele biologice au fost folosite medii de cultură uzuale, diferențiale și selective.

- Mediile de cultură **uzuale** sunt mediile pe care se dezvoltă majoritatea germenilor patogeni aerobi și anaerobi.
- Mediile **diferențiale** conțin substratul pentru o anumită enzimă sau citotoxină bacteriană și un indicator care atestă atacarea acestui substrat.
- Mediile **selective** favorizează, prin compoziția lor chimică, dezvoltarea anumitor germeni de interes, inhibând în același timp dezvoltarea altora, prezenți în număr mult mai redus.

Mediile de cultură **uzuale** folosite au fost agarul nutritiv (geloza) (Oxoid); cel **diferențial** agarul cu sânge (Oxoid) (pentru diferențierea bacteriilor hemolitice de cele nehemolitice); Urichrom II (EliTechGroup), mediu cromogen în flacoane pentru cultivarea și identificarea germenilor din ITU, bacili Gram negativi, coci Gram pozitivi și *Candida* spp.; mediul Chapmann (Oxoid) **selectiv - diferențial** (selectiv = conține NaCl 7.5%, permite creșterea exclusivă a stafilococilor, care tolerează sarea, nu necesită prezența sării, dar o tolerează, celelalte bacterii nu o tolerează, diferențial = conține un zahăr numit manita, pe care stafilococii îl fermentează sau nu).

Însămânțarea probelor s-a realizat direct pe mediile de cultură. Epuizarea inoculului s-a făcut cu tamponul exudat sau cu anșa de însămânțare, pe mediul solid adecvat ales.

1.4. Examenul bacterioscopic

Examenul bacterioscopic este necesar pentru a pune în evidență microorganismele prezente în probele recoltate și pentru alegerea mediilor de cultură adecvate. Etapele de lucru au inclus executarea frotiului, colorarea și examinarea morfologiei bacteriene. După 24 de ore de la incubare s-a realizat examenul bacterioscopic direct. Pentru a pune în evidență bacteriile de interes din probele recoltate s-au folosit metodele de colorare **Gram** și **Giensa**. Evaluarea caracterelor morfologice (forma, dimensiunea, modul de grupare,

Alcătuirea biobancii de probe - stabilirea unor culturi dedicate în condiții standardizate

prezența sau absența unor structuri) s-a realizat prin examinarea la microscopul optic cu obiectivul cu imersie x100.

În funcție de interpretarea caracterelor morfologice ale bacteriilor de interes la microscopul optic, s-au realizat însămânțări ulterioare pentru izolarea bacteriilor amintite anterior, în vederea efectuării examenelor culturale și biochimice pentru confirmarea genului bacterian.

1.5. Evaluarea caracterelor culturale, morfologice și biochimice

Pentru obținerea de culturi pure și identificarea exactă a speciilor bacteriene de interes s-au realizat în paralel examenele morfologice, culturale și biochimice.

Evaluarea caracterelor culturale s-a realizat prin însămânțarea bacteriilor pe medii lichide urmărind turbiditatea mediului de cultură, tipul depozitului, prezența sau absența formațiunilor de suprafață și pe medii solide urmărind tipul coloniei formate (aderența, forma, dimensiunea, marginile, suprafața, opacitatea), prezența sau absența pigmentilor.

La examenul **caracterelor morfologice** s-a urmărit modul de grupare al bacteriilor, forma, dimensiunea, prezența sau absența unor structuri respectiv afinitatea tinctorială.

Pentru examenul **caracterelor biochimice** s-au folosit testele catalazei, oxidazei, ureazei, indolului, pentru nitrați și hidrogen sulfurat.

1.6. Identificarea speciilor

Identificarea speciilor bacteriene izolate s-a realizat ajutorul echipamentului Vitek – 2 (BioMérieux, Franța) și a testelor API (BioMérieux, Franța).

Vitek - 2 compact este un sistem automat, care identifică și testează sensibilitatea la antibiotice a bacteriilor, folosind carduri disponibile sistemului Vitek - 2, și anume pentru identificarea bacteriilor și a fungilor și a sensibilității la antibiotice a bacteriilor. Pentru identificare sistemul funcționează cu carduri colorimetrice de identificare care conțin 64 de microcelule. În fiecare microcelulă se găsește substratul biochimic specific deshidratat. Fiecare card are preinserat un tub de transfer folosit pentru inocularea culturii. Cardurile au coduri de bare care conțin informații despre tipul produsului, numărul lotului, data de expirare și un identificator unic care poate fi asociat probei înainte sau după ce cardul a fost introdus în sistem.

Testele API au fost utilizate pentru identificarea bacteriilor **Gram** negative și **Gram** pozitive. Stripurile de testare API sunt alcătuite din microtuburi care conțin substraturi deshidratate pentru a detecta activitatea enzimatică sau asimilarea / fermentarea zaharurilor de către organismele inoculate. În timpul incubării, metabolismul determină modificări de culoare care sunt fie spontane, fie identificate prin adăugarea de reactivi suplimentari. Când carbohidrații sunt fermentați, pH-ul din microtuburi se modifică și este identificat printr-un indicator. Testele de asimilare sunt inoculate cu un mediu (mediu API AUX) bacteriile crescând în momentul utilizării substratului corespunzător: dacă bacteriile au crescut rezultatul este pozitiv. Rezultatele testelor sunt introduse într-o bază de date on-line pentru a identifica specia bacteriană.

Studiul **sensibilității la acțiunea substanțelor antimicrobiene** a fost efectuat tot cu ajutorul echipamentului Vitek - 2 (BioMérieux, Franța), stabilindu-se concentrația minimă inhibitoare a diverselor substanțe antimicrobiene față de tuplinile bacteriene izolate și prin metoda difuzimetrică – tehnica microcomprimatelor. Echipamentul Vitek - 2 (BioMérieux,

Alcătuirea biobancii de probe - stabilirea unor culturi dedicate în condiții standardizate

Franța) utilizat pentru testarea rezistenței la substanțe antimicrobiene este format dintr-un sistem de analiză, numit “Advanced Expert System (AES)”, capabil să recunoască și să clasifice tulpinile testate după anumite tipare de sensibilitate la acțiunea substanțelor antimicrobiene care indică un fenotip specific și care ulterior este interpretat.

Pentru testarea sensibilității la substanțele antimicrobiene au fost folosite carduri care conțin diluții variate de agenți antimicrobieni specifici. Metoda de creștere se bazează pe tehnica concentrației minime inhibitorii prin tehnica diluțiilor. Fiecare celulă din card conține, în afară de agenți antimicrobieni specifici, și mediu de cultură, iar condițiile de creștere sunt microaerofile. Pentru testarea sensibilității la antibiotic au fost folosite carduri care conțin diluții variate de agenți antimicrobieni specifici. Cardurile de identificare, împreună cu suspensia de microorganisme, au fost introduse în camera de presurizare (tip vacuum). Tubul cu suspensia de microorganisme este introdus într-un locaș special al casei de identificare al echipamentului iar cardul de identificare în imediata vecinătate. După ce caseta cu cardul și suspensia bacteriană au fost introduse în camera vacuum, suspensiile de microorganisme au fost transferate la nivelul cardului. După inocularea cardului, se întrerupe transferul de la nivelul tuburilor și acesta se sigilează înainte să fie introdus în incubatorul sistemului. Cardul a fost preluat și incubat la temperatura de 35,5°C. În timpul incubării fiecare godeu al cardului a fost periodic analizat de un spectrofotometru integrat în echipament, fiecare reacție fiind citită tot la 15 minute pentru a măsura turbiditatea sau colorarea rezultată în urma metabolizării substratului. Valorile concentrației minime inhibitorii sunt determinate pentru fiecare antibiotic din card. După un interval de timp, cuprins între 8 și 24, de ore sistemul de analiză AES a făcut interpretarea citirilor și a afișat rezultatele. În ultima etapă s-a realizat interpretarea rezultatelor cu citirea codului de bare pentru identificare și a datelor obținute, transferate în calculatorul atașat echipamentului. Tulpina bacteriană testată a fost clasificată în categorii de sensibilitate: sensibilă, moderat sensibilă (intermediar în termenii utilizați de echipamentul Vitek - 2) sau rezistentă.

În completare s-a realizat **antibiograma** pentru anumite specii bacteriene prin metoda difuzimetrică clasică cu microcomprimate.

După identificare, tulpinile izolate au fost **stocate la congelator**, în criotuburi (Microbank™) la -50°C.

2. Stabilirea culturilor

Ne-am propus realizarea unei biobănci cu probe care să conțină anumite culturi de germeni cunoscuți în condiții standardizate și reproductibile.

În acest scop am inclus în banca noastră un număr de 83 de culturi din probe biologice a căror antibiogramă arată rezistență la antibiotice, provenind de la pacienții Spitalului Clinic Județean de Urgență Timișoara care au fost incluși în baza noastră de date. Fiecare probă a primit un cod unic de identificare. În baza de date mai apar: tipul produsului biologic recoltat, tipul de germene identificat și fenotipul de rezistență la antibiotice. Toate tulpinile identificate și izolate au fost stocate la congelator și reprezintă o parte a biobăncii noastre de probe.

Rezultatele noastre arată faptul ca din cele 83 de probe biologice analizate, 54 (65%) provin de la pacienți de sex masculin și restul de 29 (35%) de la femei (figura 1).

Alcătuirea biobancii de probe - stabilirea unor culturi dedicate în condiții standardizate

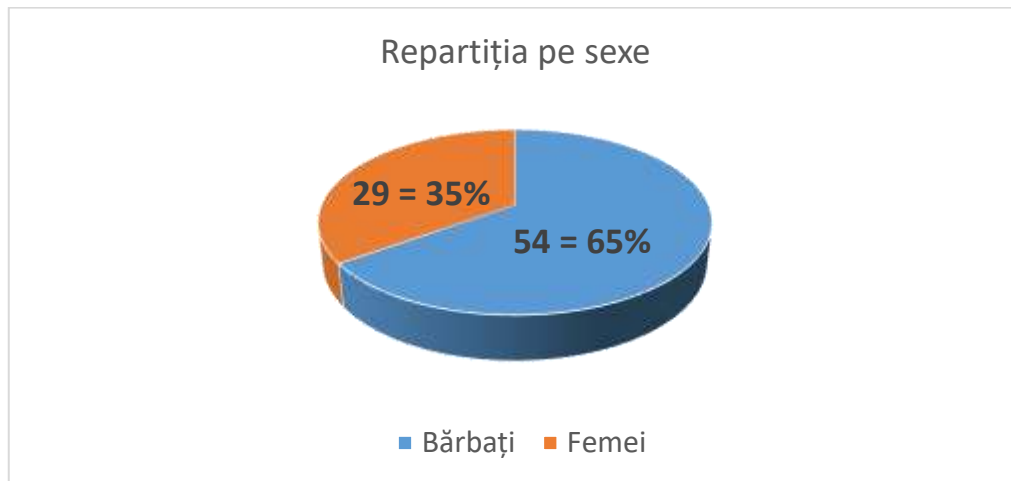


Figura 1 - Repartiția pe sexe a probelor biologice

Datele referitoare la tipul produsului biologic recoltat arată următoarea pondere (figura 2):

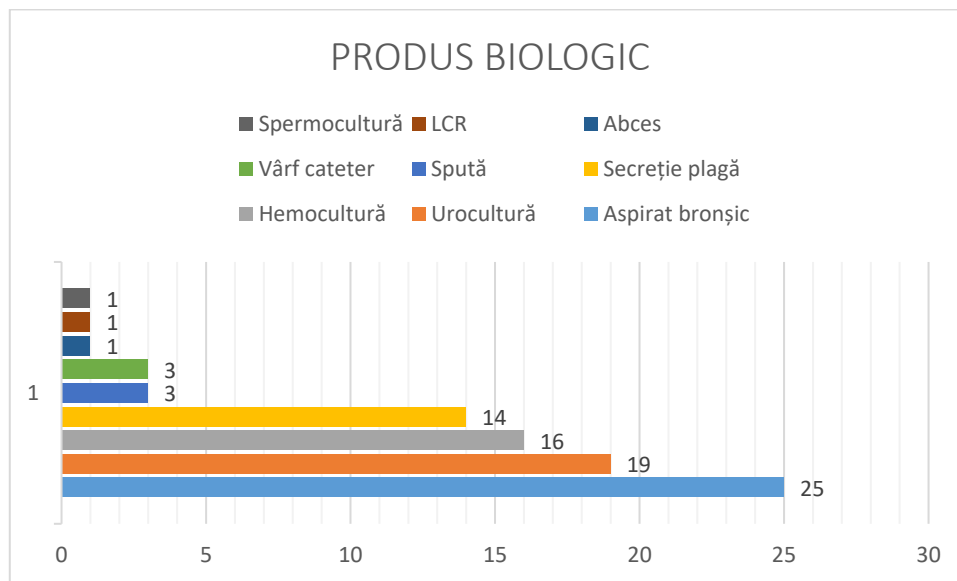


Figura 2 – Ponderea produsului biologic analizat

Se poate observa că produsul biologic cel mai frecvent recoltat este din aspirat bronșic – 25 de cazuri ceea ce reprezintă 30% din total. Urmează apoi uroculturi – 19 cazuri (22,89%), hemoculturi – 16 cazuri (19,27%), secreții din diferite plăgi – 14 cazuri (16,86%), spută și vârf de cateter – câte 3 cazuri (fiecare câte 3,61%), abces, LCR și hemocultură – câte 1 caz (1,20% fiecare).

Statistica privind tipul germenului identificat arată următoarea repartiție (figura 3):

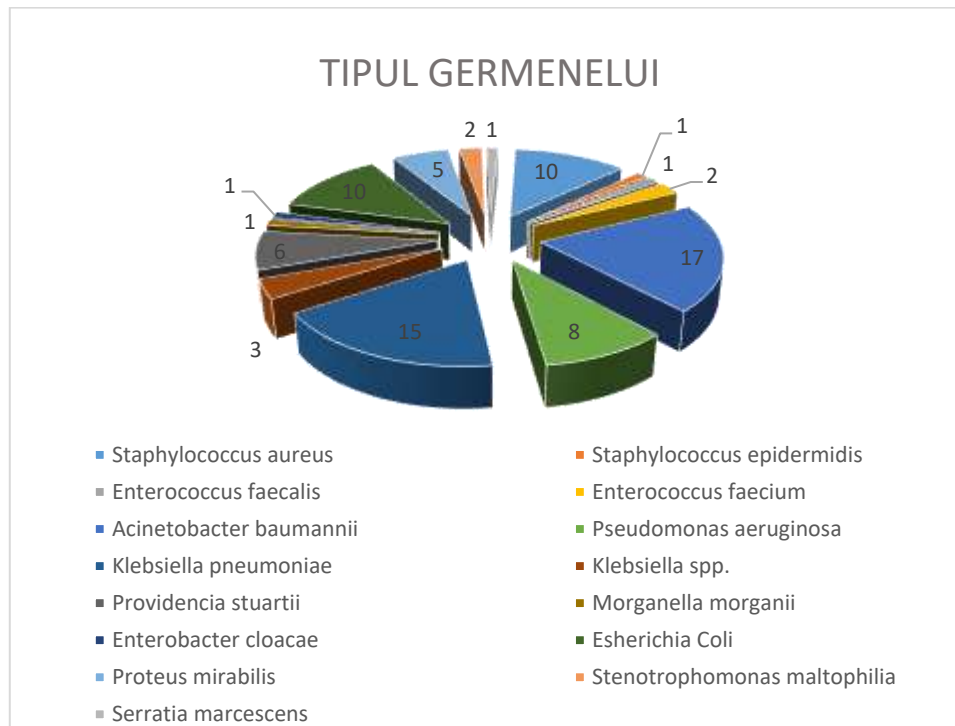


Figura 3 – Tipurile de germeni identificați

Analizând acest grafic se poate observa că germele cel mai des întâlnit este *Acinetobacter baumannii* – în 17 din cele 83 de culturi (20,4%), urmat de *Klebsiella pneumoniae* – 15 cazuri (18%), *Staphylococcus aureus* și *Esherichia Coli* – câte 10 cazuri (12% fiecare), *Pseudomonas aeruginosa* – 8 cazuri (9,6%), *Providencia stuartii* – 6 cazuri (7,2%), *Proteus mirabilis* – 5 cazuri (6%) și de restul germenilor în proporții mai reduse.

Referitor la fenotipul de rezistență observat, majoritatea microorganismelor prezintă un cumul de mecanisme: 61 de astfel de situații din totalul de 83 de germeni identificați. La restul germenilor am observat unul până la patru tipuri de mecanisme implicate. Este vorba mai ales despre: rezistență la sulfamide, MRSA (stafilococ rezistent la meticilină), BLSE (beta-lactamaze cu spectru extins), FQ (rezistență la fluoroquinolone), fenotip secretor de penicilinază, MLSBi (rezistență la macrolide, lincosamide), AG (rezistență la aminoglicozide).

Concluzie: La ora actuală în biobanca noastră de probe se află o serie de culturi de germeni rezultați din diferite produse biologice identificate prin coduri unice și la care s-a stabilit fenotipul de rezistență care cel mai frecvent este realizat prin cumul de mecanisme. Ne propunem să suplimentăm acest număr de culturi pe durata desfășurării proiectului.