

Studiu privind distribuția, populația, biochimia și rezistența la agenți antimicrobieni

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: 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. Definiții

Potrivit OMS, un microb rezistent este unul care nu este ucis de un agent antimicrobian după aplicarea unui tratament standard. Rezistența la antibiotice se dobândește în cadrul unui proces de selecție naturală. Folosirea antibioticelor pentru combaterea infecției, forțează bacteriile fie să se adapteze, fie să moară, indiferent de doză sau de durata aplicării tratamentului. Bacteriile supraviețuitoare poartă gena care le conferă rezistență, și care poate fi apoi transferată fie în cadrul speciei sau genului, fie chiar la specii neînrudite (Maimoona A., 2012). Rezistența clinică la antibiotice este un fenomen complex a cărui manifestare depinde de tipul de bacterie, de locul infectării, de distribuția antibioticului în organism, de concentrația antibioticului la locul infecției și nu în ultimul rând de statusul imun al pacientului (Hawkey, 1998).

2. Scurt istoric al rezistenței la agenții antimicrobieni

Rezistența la medicamente, în special rezistența la antibiotice, reprezintă o amenințare tot mai mare pentru sănătatea umană. Era modernă a antibioticelor a început cu **descoperirea penicilinei** de către Sir Alexander Fleming în 1928 (Ventola, 2015). De atunci, antibioticele au transformat medicina modernă și au salvat milioane de vieți, anihilând foarte rapid bolile infecțioase grave de pe Pământ (Walsh, 2014). Antibioticele au fost prescrise pentru prima dată în tratarea infecțiilor grave în anii 40 (Gould, 2013; Antibiotic resistance threats in the United States, 2013). Tratamentul cu penicilină a fost un real succes, controlând infecțiile bacteriene în timpul celui de-al II-lea război mondial. Cu toate acestea, la scurt timp, **rezistența la penicilină** a devenit o problemă clinică esențială, astfel încât, în anii 50, multe dintre progresele realizate în deceniul anterior au fost real amenințate. Ca răspuns la noua situație creată, noi antibiotice din categoria betalactamine au fost descoperite și dezvoltate, restabilind astfel încrederea că antibioticele vor putea fi folosite în continuare (Sengupta, 2013).

Cu toate acestea, rezistența a apărut în continuare și în anul 1962 a fost raportat în Marea Britanie primul caz de rezistență la meticilină a stafilococului auriu iar mai târziu, în 1968 și în Statele Unite ale Americii. În perioada ce a urmat, din păcate rezistența a fost văzută în cele din urmă la aproape toate antibioticele care au fost dezvoltate (Ventola, 2015) Ca exemplu se poate aminti introducerea vancomicinei în practica clinică în anul 1972 pentru tratamentul rezistenței la meticilină atât în cazul stafilococului auriu cât și a stafilococilor coagulazo-negativi. Rezistența la vancomicină a fost atât de dificil de indus, așa încât un timp s-a crezut că este puțin probabil ca ea să apară într-un cadru clinic (Sengupta 2013). Din păcate acest lucru s-a întâmplat și în anul 1979 s-au raportat cazuri de rezistență la vancomicină pentru stafilococi coagulazo-negativi (Ventola, 2015). În perioada 1970-1980 industria farmaceutică a introdus multe noi antibiotice pentru a rezolva problema rezistenței, apoi numărul a scăzut. Ca urmare, începând cu anul 2015 la multe decenii după primii pacienți tratați cu antibiotice, infecțiile bacteriene au devenit din nou o amenințare (Ventola, 2015).

3. Distribuția actuală și cauzele rezistenței la agenții antimicrobieni

Infecțiile rezistente la antibiotice la sunt larg răspândite în întreaga lume (Ventola 2015; Golcar 2014). În SUA un sondaj național printre specialiștii în boli infecțioase, efectuat în anul 2011, a constatat că mai mult de 60% dintre participanți au avut cel puțin un pacient cu o infecție bacteriană pan-rezistentă, netratabilă în anul anterior sondajului (Spelberg, 2014). Multe organizații de sănătate publică au descris apariția rapidă a bacteriilor rezistente ca o "criză" sau "scenariu de coșmar" care ar putea avea "consecințe catastrofale". Centrul pentru controlul și prevenirea bolilor din SUA - CDC (The Centers for Disease Control and Prevention) a declarat în anul 2013 că rasa umană se află acum în "epoca post-antibiotică", iar în anul 2014, Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a avertizat despre evoluția alarmantă a crizei rezistenței la antibiotice.

Printre **agenții patogeni gram-pozitivi**, o pandemie globală de rezistență a speciilor de *S. aureus* și *Enterococcus* ar reprezenta în prezent cea mai mare amenințare (Rossolini, 2014). O statistică realizată în SUA arată faptul că MRSA (Stafilococul rezistent la Meticilină) ucide mai mulți americani în fiecare an decât infecția cu HIV, boala Parkinson, emfizem și omuciderile la un loc.

În SUA situația **agenților patogeni gram-negativi** este deosebit de îngrijorătoare deoarece aceste bacterii devin rezistente la aproape toate antibioticele disponibile. Apariția bacililor gram-negativi multirezistenți a afectat practica medicală în toate domeniile medicinei. Infecțiile cu germeni gram-negativi în unitățile spitalicești sunt cel mai frecvent cauzate de *Enterobacteriaceae* (în special *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* și *Acinetobacter*. Agenții patogeni gram negativi multirezistenți sunt, de asemenea, prezenți și în afara spitalelor. Aceștia includ: *Escherichia coli* care produce beta-lactamază *Neisseria gonorrhoeae* (Rossolini, 2014).

Centrul pentru controlul și prevenirea bolilor din SUA - CDC a evaluat infecțiile bacteriene rezistente la antibiotice în funcție de șapte factori: impactul clinic, impactul economic, incidența, proiecția pe 10 ani a incidenței, transmisibilitatea, disponibilitatea unor antibiotice eficiente și barierele în calea prevenirii.

În România un raport din anul 2013 însușește principalele date accesibile privind consumul de antibiotice, rezistența bacteriană și infecțiile nosocomiale (Popescu, 2013). Consumul de antibiotice în România în anul 2013 este definit de două fenomene negative: volumul extrem de mare și utilizarea preferențială a antibioticelor cu risc de a selecta rezistență bacteriană și de a induce infecții. În ceea ce privește rezistența bacteriană, rezultatele au fost obținute prin analiza tulpinilor izolate de la pacienți cu infecții invazive (hemoculturi și culturi LCR), îngrijiiți în 17 spitale din România și s-au constatat următoarele:

- nivelul MRSA (Stafilococ rezistent la Meticilină) a fost de 63,6%, cel mai ridicat din statele UE
- România este singurul stat cu trend crescător al acestei probleme deoarece nu se adoptă măsuri eficiente de control al infecțiilor
- pentru bacilii Gram-negativi rezistența extinsă este extrem de frecventă.

Același raport arată că infecțiile nosocomiale rămân și în 2013 o patologie mult subestimată în România. Concluziile studiului remarcă faptul că nivelul ridicat al rezistenței bacteriene la antibiotice și emergența infecțiilor determinate de *Clostridium difficile* sunt consecințe majore ale consumului excesiv de antibiotice, alături de care contribuie și ineficiența măsurilor de limitare a transmiterii interumane de bacterii (multi)rezistente. Aceste fenomene nu sunt limitate geografic, ci se regăsesc în diverse regiuni ale țării. Ele pot fi limitate doar prin aplicarea unor programe de utilizare rațională a antibioticelor și de control al infecțiilor nosocomiale care să fie eficiente și care să fie replicate la nivel național.

Printre **cauzele** frecvente care duc la rezistență la antibiotice se pot enumera: consumul excesiv fie prin prescriere inutilă, fie prin automedicație în țările în care acest lucru nu este reglementat, consumul de carne de animal tratat cu antibiotice, administrarea de antibiotice fără a cunoaște germele patogen și fără efectuarea antibiogrammei.

Rezistența la antibiotice în Statele Unite ale Americii a fost atribuită pe de o parte abuzului de utilizare a acestor medicamente, pe de altă parte, lipsei de dezvoltare de noi antibiotice de către firmele farmaceutice ca urmare a reducerii stimulentele economice și a reglementărilor în domeniu (Ventola, 2015).

În țara noastră se incriminează o serie de factori dintre care: consumul excesiv de antibiotice este principalul determinant al apariției de noi mecanisme de rezistență microbiană, apoi lupta cu infecțiile nosocomiale întrucât ele sunt cel mai adesea determinate de germeni cu rezistență la antibiotice de prima linie și tot mai frecvent se apelează la antibiotice de rezervă ce amplifică astfel nivelul rezistenței microbiene față de acestea (Popescu, 2013).

Atât în țările dezvoltate, cât și în cele în curs de dezvoltare, antibioticele sunt utilizate pe scară largă ca suplimente de creștere în efectivele de animale (1, 23). Se estimează că 80% din antibioticele vândute în S.U.A. sunt utilizate la animale, în primul rând pentru a promova creșterea și a preveni infecția (Gross, 2003; Bartlett, 2013). Tratarea efectivelor de animale cu agenți antimicrobieni se pare că îmbunătățește sănătatea generală a animalelor, producând randamente mai mari și produse de înaltă calitate (Golkar, 2014). Dar inconvenientul acestei situații îl reprezintă faptul că antibioticele utilizate în efectivele de animale sunt ingerate de oameni atunci când aceștia consumă carnea. Transferul de bacterii rezistente de la animalele de fermă la oameni a fost observat cu mai bine de 35 de ani în urmă. Recent, prin metodele de detectare moleculară s-a demonstrat că bacteriile rezistente de la animalele de fermă ajung la consumatori prin produsele din carne ingerate de aceștia (Bartlett, 2013). Acest lucru se întâmplă în următoarea secvență: a) utilizarea antibioticelor la animalele de la care se obține carnea, fie ucide bacteriile, fie supresează bacteriile susceptibile, permițându-le să prospere; b) bacteriile cele mai rezistente sunt transmise oamenilor odată cu carnea ingerată; c) aceste bacterii pot provoca infecții la oameni și pot duce la consecințe negative asupra sănătății (Antibiotic resistance threats in the United States, 2013).

Apariția rapidă a bacteriilor rezistente se produce la nivel mondial, punând în pericol eficacitatea antibioticelor, care au transformat medicina și au salvat milioane de vieți umane. Multe decenii după ce primii pacienți au fost tratați cu antibiotice, infecțiile bacteriene au devenit din nou a amenințare.

4. Biochimia rezistenței la agenții antimicrobieni

Rezistența la medicamente, în special rezistența la antibiotice, se înrăutățește și se agravează. Genele responsabile de rezistența la antibiotice reprezintă suma dintre genele intrinseci și genele dobândite pe parcurs. Toate aceste gene împreună desemnează conceptul care a primit denumirea de **rezistom** (Ogawara, 2018; Cox, 2013). Aceste gene se interconectează între ele foarte strâns prin transfer orizontal și prin mutații adaptative. Rezistomul este mai nou identificat în aproape fiecare comunitate microbiană, inclusiv solul, nămolul activat, intestinul uman și intestinalele animalelor (Ogawara, 2018; Hu, 2017).

S-a pus problema găsirii unui antibiotic eficient împotriva bacteriilor patogene rezistente. Sigur că acest lucru este foarte dificil, dar unul dintre primii pași în rezolvarea acestei probleme este încercarea de cunoaștere a mecanismelor implicate în declanșarea rezistenței la antibiotice.

4.1. Mecanismele de obținere a rezistenței la antibiotice

1. Mutații spontane

Mutațiile spontane sau mutațiile dependente de creștere apar din cauza erorilor de replicare sau a reparării incorecte a ADN-ului deteriorat în cursul diviziunii celulare. Acestea pot fi considerate responsabile pentru generarea rezistenței

la antibiotice (Kasovec, 2003). Exemple:

a) fenotipul de rezistență la chinolonă din *Escherichia coli* se datorează mutațiilor din șapte poziții în gena *gyrA* și trei poziții în gena *parC* (Hooper, 1999).

b) genele care codifică țintele rifamicinelor și fluoroquinolonelor, adică *RpoB* și, respectiv, ADN-topoizomerase, conduc la rezistență la acești compuși (Martinez, 2000).

c) mutația genei *mexR*, la *P. aeruginosa* a dus la up-regularea operonului *mexA-mexB-oprM*, care a fost asociată cu rezistența la fluorochinolone, tetraciline, cloramfenicol și macrolide (Adewoye, 2002).

d) mutațiile în gena de *E. coli* determină up-regularea *AcrAB*, implicată în efluxul fluoroquinolone, tetracilinele, cloramfenicolul din celula bacteriană (Barbosa, 2000).

2. Hipermutații

Studiile realizate în ultimii ani, s-au concentrat asupra asocierii între hipermutație și rezistența la antibiotice. În cazul administrării prelungite a unui antibiotic neletal pentru bacterii, o mică populație dintre acestea intră într-o stare caracterizată printr-o ridicată rată de mutație. Atunci când o celulă din această stare dobândește o mutație, crește, se reproduce și apoi iese din starea cu rată de mutație înaltă. Rezultatele studiilor care au încercat să elucideze mecanismele hipermutațiilor au sugerat că declanșarea acestei stări este deocamdată neclară, în timp ce realizarea ei este dependentă de o ADN polimerază (*pol*) IV (Maimona, 2012; Bjedov, 2003). Hipermutații au fost descrise în populațiile de *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *P. aeruginosa* cu frecvențe cuprinse între 0,1 până la peste 60% (Denamur, 2002).

Aprofundarea acestor studii a dus la concluzia că hipermutațiile constatate în experimentele efectuate în laborator, precum și cele observate în natură sunt cauzate în egală măsură de un defect al sistemelor de reparare genică determinat de inactivarea unor gene cu ar fi: mutS sau mutL (Maimoona, 2012). În condiții normale sistemele de reparare genică au rolul de a elimina erorile biosintetice în replicarea ADN, de a susține integritatea structurală a cromozomului și de a preveni recombinarea între secvențe non-identice de ADN (Rayssiguier, 1989).

În concluzie, se poate afirma faptul că hipermutațiile joacă un rol semnificativ în evoluția rezistenței la antibiotice și pot de asemenea, să fie responsabile pentru fenotipul multirezistent (Martinez, 2000; Chopra, 2003; Blazquez, 2003; Macia, 2005).

3. Transferul genelor orizontale - transferul de material genetic între bacterii, cunoscut sub numele de transferul orizontal al genei este responsabil pentru răspândirea rezistenței la antibiotice. Genele responsabile pentru rezistență, constând dintr-o mutație unică sau multiplă, pot fi transferate între bacterii prin conjugare, transformare sau transducție. Simjee și Gill (1997) au demonstrat un nivel înalt de rezistență la gentamicină și alte aminoglicozide (cu excepția streptomisinei) la enterococi.

4. Mutageneza adaptativă - Studii recente au demonstrat că pe lângă mutațiile spontane, acestea apar în plus și în celulele care nu se divid sau se divid lent. Aceste mutații, cunoscute ca mutații adaptative, au fost asociate cu evoluția mutațiilor rezistente la antibiotice în condiții naturale (Krasovec, 2003; Bjedov, 2003). Mutageneza adaptativă este reglată de către ADN-ul predispus la erori de stres (Maimoona, 2012).

5. Aterarea țintei - modificări structurale în zona țintă a antibioticelor, împiedică interacțiunea antibioticului cu microorganismul, inhibând astfel activitatea biologică a antibioticului. Acest lucru este exemplificat de rezistența la penicilină din cauza proteinelor care leagă penicilina (PBP). Modificări ale PBP, care au ca rezultat reducerea afinității PBP la penicilină, generează gene care conduc la rezistență la penicilină (Zapun, 2008).

6. Producerea de ținte alternative - bacteriile se pot proteja de antibiotice, prin producerea unei ținte alternative rezistente la inhibiție pe lângă ținta originală sensibilă. Ținta alternativă elimină efectul antibioticului și permite supraviețuirea bacteriilor. Pentru *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA) se produce suplimentar o a doua proteină de legare la penicilină (PBP2a) pe lângă proteina de legare originală (PPP). Deoarece PBP2a nu este inhibată de antibiotice, celula continuă să sintetizeze peptidoglicanul și are un perete celular solid din punct de vedere structural. A fost sugerat că evoluția enterococilor rezistenți la vancomicină poate duce la transferul de gene către *S. aureus* având ca rezultat MRSA rezistent la vancomicină (Michel, 1997; Maimoona, 2012).

5. Excluderea din mediul intern - modificări în permeabilitatea membranei externe a bacteriilor le conferă acestora rezistență la antibiotice. Acest lucru este frecvent observat la bacteriile gram negative, cum ar fi *Pseudomonas aeruginosa* și *Bacteroides fragilis* (Maimoona, 2012).

6. Inactivarea antibiotică - ar putea fi rezultatul fie a inhibării de activare *in vivo*, fie a modificării compusului antibiotic. Pierderea enzimelor implicate în activarea medicamentului este un mecanism nou de rezistență (Maimoona, 2012).

5. Concluzii

Rezistența la medicamente, în special rezistența la antibiotice, se înrăutățește și se agravează în ultimul timp. Genele responsabile de rezistența la antibiotice sunt amestecuri complexe dintre genele rezistenței intrinseci la antibiotice și genele dobândite. Aceste gene se interconectează între ele foarte strâns prin transfer orizontal și mutații adaptative. În plus, rezistența este identificată acum în aproape fiecare comunitate microbiană. Pe de altă parte, este extrem de dificil de a găsi un antibiotic eficient împotriva bacteriilor patogene rezistente, deși se întreprind eforturi mari pentru a descoperi noi antibiotice. Unul dintre pașii imoportanți în rezolvarea acestei probleme îl reprezintă cunoașterea mecanismelor de dobândire a rezistenței la antibiotice.

6. Bibliografie

- Adewoye L, Sutherland A, Srikumar R and Poole K. The mexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Characterization of mutations compromising activity. *J. Bacteriol.* 2002, 184, 4308–4312.
- Barbosa TM and Levy SB, Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 3467–3474.
- Bartlett JG, Gilbert DN, Spellberg B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin Infect Dis* 2013;56(10):1445–1450.
- Bjedov I, Tenaillon O, Gerard B, Souza V, Denamur E, Radman M, Taddei F and Matic I, Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science.* 2003, 300, 1404–1409
- Blazquez J, Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance, *Clin. Infect. Dis.* 2003, 37, 1201–1209
- Centers for Disease Control and Prevention, Office of Infectious Disease. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Available at: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>.
- Chopra I, O'Neill AJ and Miller K, The role of mutators in the emergence of antibiotic resistant bacteria. *Drug Resist. Update*, 2003, 6, 137–145
- Cox, G.; Wright, G.D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int. J. Med. Microbiol.* 2013, 303, 287–292
- Denamur E, Bonacorsi S, Giraud A, Duriez P, Hilali F, Amorin C, Bingen E, Andremont A, Picard B, Taddei F and Matic I, High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J. Bacteriol.*, 2002, 184, 605–609
- Golkar Z, Bagazra O, Pace DG. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries*, 2014;13;8(2):129–136.
- Gould IM, Bal AM. New antibiotic agents in the pipeline and how they can overcome microbial resistance. *Virulence* 2013;4(2):185–191.
- Gross M. Antibiotics in crisis. *Curr Biol* 2013;23(24):R1063–R1065
- Hawkey, P.M., The origins and the molecular basis of antibiotic resistance, *British Medical Journal* 1998; 317: 657 – 660
- Hooper DC, Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist. Update.*, 1999, 2, 38–55.

Studiu privind distribuția, populația, biochimia și rezistența la agenți antimicrobieni

- Hu, Y.; Gao, G.F.; Zhu, B. The antibiotic resistome: Gene flow in environments, animals and human beings. *Front. Med.* 2017, 11, 161–168.
- Krasovec R and Jerman I, Bacterial multicellularity as a possible source of antibiotic resistance. *Med. Hypotheses.* 2003, 60, 484–488.
- Macia MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Perez JL and Oliver A, Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49, 3382–3386.
- Maimoona A, Antibiotic Resistance: An Emerging Global Headache – chapter in *Antibiotic Resistant Bacteria – A Continuous Challenge in the New Millennium*, Edited by Marina Pana, 2012
- Martinez JL and Baquero F, Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44, 1771–1777.
- Michael CA, Dominey-Howes D, Labbate M. The antibiotic resistance crisis: causes, consequences, and management. *Front Public Health* 2014;2:145.
- Michel M, Guttman L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin resistant enterococci: therapeutic realities and possibilities. *Lancet*, 1997, 349: 1901 – 1906.
- Ogawara H, Comparison of Strategies to Overcome Drug Resistance: Learning from Various Kingdom, *Molecules* 2018, 23, 1476; doi:10.3390/molecules23061476
- Popescu GA, Șerban R, Consumul de antibiotice, Rezistența microbiană și Infecțiile Nosocomiale în România – 2013, București 2015, ISSN 2537-1541
- Rayssiguier C, Thaler DS and Radman M, The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature.* 1989, 342, 396–401.
- Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Clin Opin Pharmacol* 2014;18:56-60.
- Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol* 2013;4:47.
- Spellberg B, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clin Infect Dis* 2014;59 suppl 2:S71–S75 the antibiotic alarm. *Nature* 2013;495(7440):141.
- Ventola CL, The Antibiotic Resistance Crisis, *P&T*, vol 40, no 4, 2015
- Walsh, C.T.; Wencewicz, T.A. Prospects for new antibiotics: A molecule-centered perspective. *J. Antibiot.* 2014, 67, 7–22
- Zapun A, Conters-Martel C and Vernet T, Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32, 361–385.