

Raport privind determinantii infecției: indicatori genetici (genetical criterion cut-off in AMR)

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: Conf. dr. Călin Mircu

Membri: Brzoska Hortensja, Ioan Huțu, Otavă Gabriel, Simona Marc, Irina Patraș,
Oana Gavriliuc.

Data finalizării: 21.11.2019.

Raport: 3.2.1.

Versiunea 1.0

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.

1.1. Introducere

1.1.1. Conceptul rezistenței antimicrobiene

Rezistența la antibiotice este în prezent una dintre cele mai mari provocări din profesia medicală și veterinară. Are un impact imens asupra alegerii abordării tratamentului bolilor infecțioase transmise strict de bacterii și asupra tratamentului infecțiilor bacteriene secundare care se dezvoltă ca urmare a infecțiilor virale și fungice. Acest fenomen de rezistență a fost raportat nu numai împotriva antibioticelor naturale și semisintetice, ci și a celor sintetice și a celor care nu pătrund nici măcar în celule. Răspândirea rapidă a rezistenței la antibiotice este facilitată prin transferul orizontal de gene. Ritmul de descoperire a noilor compuși antibiotici nu este încă proporțional cu rezistența la antibiotice emergente. Percepția actuală a antibioticelor este mai mult ca surse de nutriție pentru bacterii sau, în egală măsură, acestea sunt privite ca agenți de semnalizare intermicrobiană, mai degrabă decât ca arme utilizate împotriva infecțiilor bacteriene.

De la introducerea antibioticelor ca instrument terapeutic, antibioticele au reușit să reducă mortalitatea, dar nu și persistența bolilor infecțioase. Utilizarea exagerată și utilizarea necorespunzătoare a antibioticelor sunt principalele cauze ale dezvoltării rezistenței și este considerat un mecanism în care bacteriile se adaptează mediului, de multe ori nou. Mutațiile cromozomiale și genele importate prin recombinare genetică s-au dovedit a fi implicate și în mecanismul rezistenței antimicrobiene (El-Halfawy și Valvano, 2012, Tavares și colab., 2013).

Fenomenul rezistenței antimicrobiene are o importanță semnificativă pentru sănătatea publică. S-a arătat anterior că bacteriile pot dobândi rezistență într-un mediu natural precum solurile (Josephson, 2006; Wright, 2007). Cadrul pentru înțelegerea ecologiei rezistenței la scară globală poate fi descris prin conceptul de "resistom" antibiotic. "Resistomul" poate fi definit ca ansamblul tuturor genelor de rezistență la antibiotice, inclusiv a celor care circulă în bacteriile patogene, producătorii de antibiotice și organismele benigne non-patogene, găsite fie libere în mediu, fie comensale ale altor organisme (D'Costa, 2006). Acești așa-numiți producători de antibiotice trăiesc în soluri și sunt responsabili de uciderea majorității bacteriilor care trăiesc în vecinătatea lor. Cu toate acestea, unele dintre bacterii încep să dezvolte rezistență la aceste produse naturale (Wright, 2010).

Mai multe strategii diferite sunt cunoscute a fi folosite de bacterii pentru inducerea rezistenței la antibiotice. Aceasta poate fi dobândită prin mutație spontană în gena codificatoare a proteinei țintă. Rezultatul acestor acțiuni este reducerea sau blocarea afinității față de antibiotice. De asemenea, este posibil transferul orizontal al genelor de rezistență la antibiotice de la alte bacterii (Hassan și colab., 2012).

Mecanismele în care un produs genic cu rezistență la antibiotice poate acționa includ degradarea enzimatică a antibioticului, modificarea situsului țintă al antibioticului sau pomparea antibioticului care intră din celulă printr-un mecanism de transport. Toate aceste procese contribuie la producerea unei infecții care este foarte greu de tratat, deoarece produce bacterii foarte rezistente, cum ar fi *Escherichia coli* sau *Staphylococcus aureus* rezistent la metilicilină (MRSA) (Overbye și Barrett, 2005; Reynolds și colab., 2004).

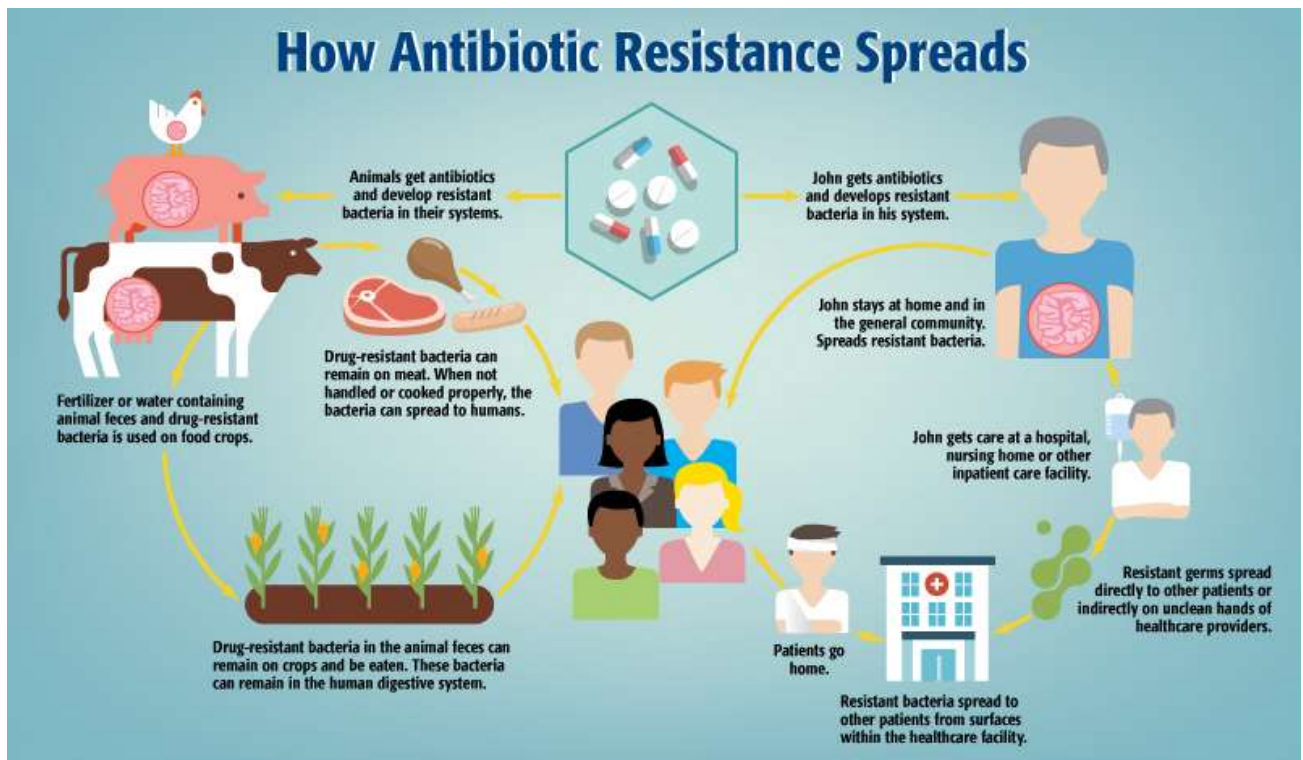


Figura 1. Reprezentarea schematică a răspândirii rezistenței antimicrobiene.

(<https://www.biomerieuxconnection.com/2018/07/12/explain-antimicrobial-resistance-friends-family-infographics>).

Mecanismul de inactivare a antibioticelor de către bacteriile care conțin enzime speciale este bine documentat și cel mai bun exemplu este β -lactamază. Această enzimă scindează inelele β -lactamice și, prin urmare, inactivează antibiotice β -lactam. Dezvoltarea rezistenței la fluorochinolone, aminoglicozide și penicilină duce la capacitatea redusă de a intra în celulă, dar poate fi depășită prin creșterea concentrației de medicament. Bacteriile care conțin gene rezistente la tetraciline produc o eliminare crescută a acestui antibiotic. De asemenea, eritromicina, cloramfenicolul și ciprofloxacina au dezvoltat mecanisme similare de rezistență. Activitatea unor antibiotice poate fi blocată de modificări structurale la unele bacterii, de ex. proteinele responsabile de sinteza peretelui celular al enterococilor au afinitate scăzută pentru cefalosporine. Genele de rezistență purtate pe plasmide pot fi, de asemenea, implicate în eliminarea situsului de legare, ceea ce duce la rezistența la macrolidă și lincosamidă. În plus, pot fi produse situsuri alternative de cuplare care fac ca bacteriile să fie rezistente la acțiunea antibioticelor (Levy, 2002).

Un grup de molecule care poate fi utilizat pentru a intensifica lupta cu rezistența la antimicrobiene include peptidele antimicrobiene (AMP). În organismele multicelulare, AMP sunt implicate în prima linie de apărare împotriva microorganismelor dăunătoare, iar în bacterii sunt mediatori în procesul de anihilare a altor bacterii. Există un număr mare de microorganisme, inclusiv bacterii Gram-pozitive și Gram-negative, ciuperci și viruși, care pot fi eliminate cu succes folosind AMP. De asemenea, multe AMP-uri au demonstrat activitate împotriva bacteriilor rezistente la mai multe medicamente, iar tendința de

Raport privind determinantii infecției: indicatori genetici.

dezvoltare a rezistenței antimicrobiene este diminuată atunci când se utilizează AMP (Hassan și colab., 2012)..

Cu toate acestea, efectul peptidelor antimicrobiene pot rezista mai mulți agenți patogeni microbieni. Aceste sisteme de rezistență includ distrugerea peptidelor antimicrobiene prin digestia proteolitică, schimbarea țintei peptidelor antimicrobiene precum membrana microbială și îndepărtarea peptidelor antimicrobiene de la locul lor de acțiune folosind pompe de eflux sau prin modificarea compoziției suprafeței celulare (Rio-Alvarez și colab., 2012; Tavares și colab., 2013).

Importanța rezistenței antimicrobiene în mastita bovină

Mastita bovină constituie una dintre cele mai importante boli bacteriene din punct de vedere economic în fermele de lapte. Boala în sine implică inflamația glandelor mamare indusă cel mai frecvent de o infecție intramamară bacteriană cauzată de diverse tulpini bacteriene, inclusiv Streptococcus, Staphylococcus și Escherichia. Apariția infecțiilor cu mastită necontrolată crește costul tratamentului și provoacă pierderi în producția de lapte datorită creșterii numărului de celule somatice și a numărului total de germeni. Utilizarea antibioticelor în tratamentul mastitei bovine este implicată în crearea de bacterii rezistente în lanțul alimentar și poate duce la reziduuri de medicamente în lapte. Laptele este apoi consumat de om și se pot observa efecte adverse asupra sănătății acestuia. Reacțiile de hipersensibilizare pot fi produse persoanelor sensibile prin prezența reziduurilor de medicamente și poate fi, de asemenea, indusă rezistența la antibiotice. Un alt aspect important al prezenței reziduurilor de medicamente implică schimbarea calităților laptelui crud, în special atunci când se utilizează culturi starter pentru producția de brânză și iaurt (Oliver și colab., 2012).

Tratamentul de pasteurizare ultra-înalt este important în procesul de distrugere a bacteriilor patologice; cu toate acestea, nu reduce sau îndepărtează medicamentele reziduale. Pentru protecția oamenilor împotriva efectelor nocive ale reziduurilor de antibiotice din lapte, Organizația pentru alimentație și agricultură (FAO) și Uniunea Europeană (UE) au stabilit niveluri maxime de reziduuri (LMR) de 1,5, 0,2 și 4,0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ pentru reziduurile din lapte de neomicină, streptomycină și penicilină G (Babapour și colab., 2012; Park și colab., 2016).

Unele dintre cele mai des utilizate antibiotice utilizate în tratamentul mastitei bovine includ:

- i) penicilina G, care suprimă proliferarea bacteriană prin interferarea cu ansamblul peretelui celular,
- ii) streptomycină, care inhibă creșterea bacteriană prin interferarea cu sistemele de sinteză peptidică a bacteriilor,
- iii) neomicina, care acționează prin legarea regiunii pentru traducerea mRNA și citirea mesajelor și perturbarea funcțiilor acestuia (Park și colab., 2016).

Prin urmare, este foarte important să controlăm modul în care sunt utilizate antibioticele în tratamentul mastitei bovine, pentru a proteja atât animalele, cât și oamenii. Mai mult, se poate întâmpla adesea ca alegerea aleatorie a antibioticelor utilizate pentru tratament fără

Raport privind determinantii infecției: indicatori genetici.

teste adecvate să nu reducă severitatea infecției și să crească doar cantitatea de reziduuri de medicamente din lapte.

Din punctul de vedere al unui fermier, producția și livrarea cantităților maxime de lapte de înaltă calitate este un obiectiv foarte important. Mastita bovină este factorul cel mai agresiv care duce la pierderea calității laptelui. S-a demonstrat anterior că ugerile sunt mai sensibile la noile infecții intramamare în repausul mamar timpuriu (când nu există lactație). Un alt punct critic, cu o susceptibilitate crescută la mastită, este localizat în perioada apropiată de fătare. Se presupune că aceasta se referă la modificările fiziologice care apar la nivelul glandei mamare. Prin urmare, perioadele timpurii și târzii ale repausului mamar sunt considerate cele mai importante perioade pentru controlul mastitei bovine (Ruegg, 2013).

Se recomandă ca toate sferturile mamare ale tuturor vacilor întreținute împreună să fie tratate cu antibiotice aprobate pentru utilizare la după ultima mulsoare a lactației. Acest proces este aplicat pentru eradicarea infecțiilor prezente în perioada de lactație târzie și pentru prevenirea noilor infecții în repaus mamar timpuriu, moment cu cea mai mare susceptibilitate la noile infecții. Controlul mastitei în repaus mamar se realizează și prin terapia cu antibiotice la momentul înțărării (Ruegg, 2013).

Antibioticele care sunt cele mai frecvent utilizate în fermele de vaci lactante includ penicilină, cefalosporină, streptomycină și tetraciclină. Administrarea de antibiotice la întregul efectiv este adesea practică ca strategie de prevenire. Avantajele generale ale utilizării antibioticelor în fermele de vaci lactante implică vaci mai sănătoase și mai productive, incidența scăzută a bolilor, reducerea mortalității, scăderea cantității de agenți patogeni și producerea de cantități mari de lapte de înaltă calitate destinate consumului uman. Deși există multe beneficii ale utilizării antibioticelor în fermele de lapte, într-o mare măsură această abordare este responsabilă pentru apariția rezistenței antimicrobiene (Oliver și colab., 2012).

Ca o abordare alternativă, a fost propusă o încetare completă a consumului de antibiotice în gestionarea organică a fermelor de vaci lactante. Cu toate acestea, această metodă poate duce la creșterea incidenței mastitei clinice și la creșterea costurilor pe termen lung. În plus, poate dura ani buni până la reducerea numărului de bacterii rezistente în mediu. Având în vedere produsele lactate, siguranța alimentară și sănătatea animalelor, utilizarea antibioticelor în prevenirea infecțiilor bacteriene poate fi considerată etică din cauza lipsei de opțiuni alternative la fel de eficiente. Îmbunătățirea metodelor de adăpostire, a sistemelor de administrare și a rațiilor furajere permit obținerea unui control mai mare asupra incidenței mastitei. Vaccinurile, probioticele și alte mijloace terapeutice veterinare consacrate, inclusiv măsurile de biosecuritate, carantinele și practicile de creștere a animalelor sunt utilizate pentru a preveni și a restricționa apariția bolii (Tikofsky și colab., 2003).

Ipotezele proiectului sunt:

- de a verifica dacă probele de lapte de la vacile cu mastită confirmată vor transporta plasmide bacteriene care conțin gene de rezistență la antimicrobiană la cele mai utilizate antibiotice,

Raport privind determinantii infecției: indicatori genetici.

- corelarea rezultatelor cu tratamentul utilizat în prezent în fermele de lapte din România, iar rezultatul cercetării ar putea oferi sfaturi fermierilor cu privire la antibiotice care trebuie evitate atunci când se tratează mastita bovină,
- să stabilească un model experimental de mastită (de exemplu, la șoarecii de laborator), care ar putea fi utilizat apoi pentru a testa opțiuni alternative de tratament.

1.2. Materiale și metode

1.1.2. Colectarea probelor bacteriene

Probele au fost colectate de la vaci din canalul mamelonar cu eSwab și au fost cultivate pe mediu de cultură cu sânge - Columbia blood agar și incubate la 37 ° C timp de 24 de ore. După perioada de incubație, coloniile bacteriene au fost izolate, bacteriile Gram pozitive au fost repicate pe medii de agar cu sânge (5% sânge de berbec) - Columbia blood agar și bacteriile Gram negative pe agar MacConkey. Plăcile au fost incubate timp de 24 de ore la 37 ° C. Colonia bacteriană a fost introdusă în tuburi Eppendorf cu 0,5 ml de bulion.

1.1.3. Extracția ADN-ului

ADN-ul a fost extras folosind kitul de extracție pentru sânge și țesut QIAGEN DNeasy. 1,5 ml culturi de celule bacteriene au fost centrifugate timp de 10 minute la 7500 rpm. Supernatantul a fost aruncat și peletul a fost resuspendat în 180 μl de Buffer ALT. S-au adăugat 20 μl de proteina K și proba s-a amestecat prin vortexare și s-a incubat la 56 ° C până când țesutul a fost complet lizat (timp de cel puțin 30 de minute). Eșantionul a fost vortexat ocazional în timpul incubării pentru a dispersa proba. După terminarea incubării, proba a fost din nou vortexată timp de 15 secunde. După aceea, 200 μl de Buffer AL s-au adăugat la probă și s-au amestecat bine prin vortexare. Apoi, s-au adăugat 200 μl de etanol și proba s-a amestecat bine, din nou. Amestecul a fost pipetat în DNeasy Mini spin column plasată într-un tub de colectare de 2 ml.

Proba a fost centrifugată la 8000 rpm timp de 1 minut. Tubul de colectare cu fluxul a fost aruncat. Coloana de centrifugare DNeasy Mini a fost plasată într-un nou tub de colectare de 2 ml, s-au adăugat 500 μl de Buffer AW1, iar proba a fost centrifugată la 8000 rpm timp de 1 min. S-a aruncat din nou tubul de colectare împreună cu lichidul. Coloana de centrifugare DNeasy Mini a fost plasată într-un nou tub de colectare de 2 ml, s-au adăugat 500 μl de Buffer AW2 și s-a centrifugat proba la 14000 rpm pentru a usca membrana DNeasy. Coloana de centrifugare DNeasy Mini a fost plasată într-un tub Eppendorf curat de 1,5 ml și 200 μl de DNase free water a fost pipetată direct pe membrana DNeasy. Proba a fost incubată la temperatura camerei timp de 1min, apoi centrifugată timp de 1 min la 8000 rpm pentru a se exprima. Probele au fost păstrate la -20°C. Concentrația de ADN a fost cuantificată folosind o placă NanoQuant (Tecan) și absorbția la 260nm / 280 nm a fost măsurată pentru a indica puritatea ADN-ului (1,6-1,8 indică ADN relativ pur).

1.1.4. Derularea reacției qPCR:

Reacțiile PCR cantitative au fost efectuate cu ajutorul unui termocicler Agilent. Pentru fiecare 20 μl din reacția totală, s-au adăugat 12,5 μl de amestec SYBR Green (Agilent), 1 μl

Raport privind determinantii infecției: indicatori genetici.

din fiecare primeri înainte (FW) și invers (RV) (tabelul 1), 25ng de ADN bacterian și apă. Amestecul principal constituit din primerii SYBR Green, FW și RV a fost realizat pentru fiecare set de primer. Apa a fost ajustată în funcție de concentrația de ADN a probei date. Genele care au fost testate până în prezent au inclus:

- ampC - rezistență la antibiotice beta lactam, cefalosporine,
- blaZ - rezistență la antibiotice beta lactam,
- ermB - rezistență la lincosamidă, macrolidă,
- ermC - rezistență la eritromicină,
- mecA - rezistență la meticilină,
- tetK - rezistență la tetraciclină.

Alte gene de rezistență care vor fi testate în următoarele săptămâni:

- cfr - rezistență la fenicol, lincosamidă,
- aac(6')aph (2'') - rezistență la aminoglicozid,
- msrA - rezistență la meticilină,
- vanA - rezistență la vancomicină.

Tabel 1. Seturi de amorsare a genelor cu rezistență antimicrobiană (AMR) utilizate în proiect.

| Nume | Secvență |
|---------------------|--------------------------|
| cfr_FW | ATGAATTTTAATAATAAAACAAAG |
| cfr_RV | TACACCCAAAATTACATCCG |
| ampC_FW | TGAGTTAGGTTCCGGTCAGCA |
| ampC_RV | AGTATTTTGTTCGGGATCG |
| blaZ_FW | ACTTCAACACCTGCTGCTTTC |
| blaZ_RV | TGACCACTTTTATCAGCAACC |
| aac(6')aph (2'')_FW | GAAGTACGCAGAAGAGA |
| aac(6')aph (2'')_RV | ACATGGCAAGCTCTAGGA |
| tetK_FW | GTAGCGACAATAGGTAATAGT |
| tetK_RV | GTAGTGACAATAAACCTCCTA |
| msrA_FW | GCAAATGGTGTAGGTAAGACAAC |
| msrA_RV | ATCATGTGATGTAAACAAAAT |
| ermC_FW | ATCTTTGAAATCCGGCTCAGG |
| ermC_RV | CAAACCCGTATTCCACGATT |
| ermB_FW | CATTTAACGACGAAACTGGC |
| ermB_RV | GGAACATCTGTGGTATGGCG |
| mecA_FW | CTGATGGTATGCAACAAGTCG |
| mecA_RV | TGAGTTCTGCAGTACCGGATT |
| vanA_FW | ATAAAGCGCTCGGCTGTAGA |
| vanA_RV | GAAACCGGGCAGAGTATTGA |

Raport privind determinantii infecției: indicatori genetici.

În stadiul actual al proiectului, probele sunt prelucrate doar pentru identificarea secvențelor de gene cu rezistență antimicrobiană. Cu toate că, tehnica cantitativă de biologie moleculară PCR este utilizată, în această etapă ne concentrăm asupra faptului că eșantioanele sunt doar genele de rezistență AMR pozitive sau negative. După finalizarea screeningului inițial al probelor pentru prezența genelor AMR, se vor realiza analize suplimentare ale genomului *S. aureus* și *E.coli* folosind sistemul microarray cu țintele care conțin cel mai mare număr de gene AMR.

1.3. Rezultate

Primele etape ale proiectului au implicat crearea de protocoale pentru tehnicile de biologie moleculară care urmau să fie utilizate.

Pașii esențiali au inclus:

- extragerea cu succes a ADN-ului bacterian dintr-un volum relativ mic de probă,
- pregătirea echipamentelor pentru evaluarea concentrației și calității ADN-ului,
- obținerea unui volum suficient de ADN și ADN de calitate acceptabilă,
- testarea primelor pentru genele de rezistență antimicrobiană,
- testarea protocolului qPCR.

După efectuarea extracției de ADN bacterian, pentru a verifica randamentul și calitatea probelor analizate în proiect, spectrofotometrul Tecan NanoQuant a fost testat folosind probe de ADN cu concentrații cunoscute, măsurate anterior de NanoDrop în alt laborator. Calibrarea aparatului a fost confirmată de citirile similare ale concentrației de ADN și a calității ADN-ului.

Testarea amplificării qPCR a fost efectuată utilizând proba de ADN standard de *Staphylococcus aureus* (furnizat de compania ATCC) cu primerii genei cu rezistență la aminoglicozide (aac (6 ") aph (2")). S-a arătat anterior că *Staphylococcus aureus* este rezistent la medicația aminoglicozidică, acesta fiind motivul alegerii acestei tehnici pentru validarea protocolului.

După efectuarea reacției qPCR, curba de amplificare a ADN-ului începând cu cel de-al 12-lea ciclu în timpul etapei de normalizare a reacției PCR a confirmat acuratețea și corectitudinea setării experimentale (figura 2.).

După testarea inițială a protocolului, ADN-ul bacterian a fost extras din culturile de probe prelevate din canalul mamelonar, iar concentrația de ADN obținută a fost satisfăcătoare în scopul stabilirii reacției cantitative în lanț a polimerazei. Orice probă cu amplificare începând cu cel de-al 40-lea ciclu al etapei de normalizare a reacției PCR au fost considerate negative (Figura 3.).

Raport privind determinarea infecției: indicatori genetici.

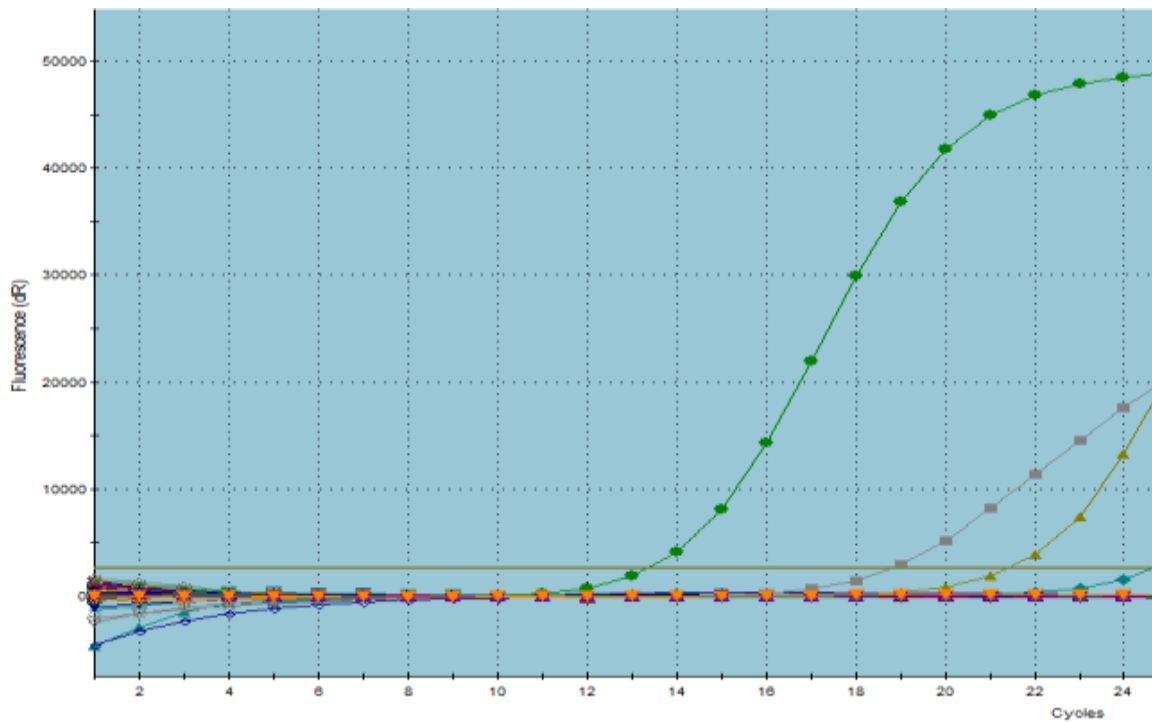


Figura 2. Testarea protocolului qPCR folosind ADN-ul *Staphylococcus aureus* (ADN-ul bacterian standard furnizat de compania ATCC) cu ajutorul unui set de primeri aac (6 ") aph (2"). A avut loc și amplificarea prevăzută a genei cu rezistență la aminoglicozide prezentată anterior în literatura de specialitate publicată.

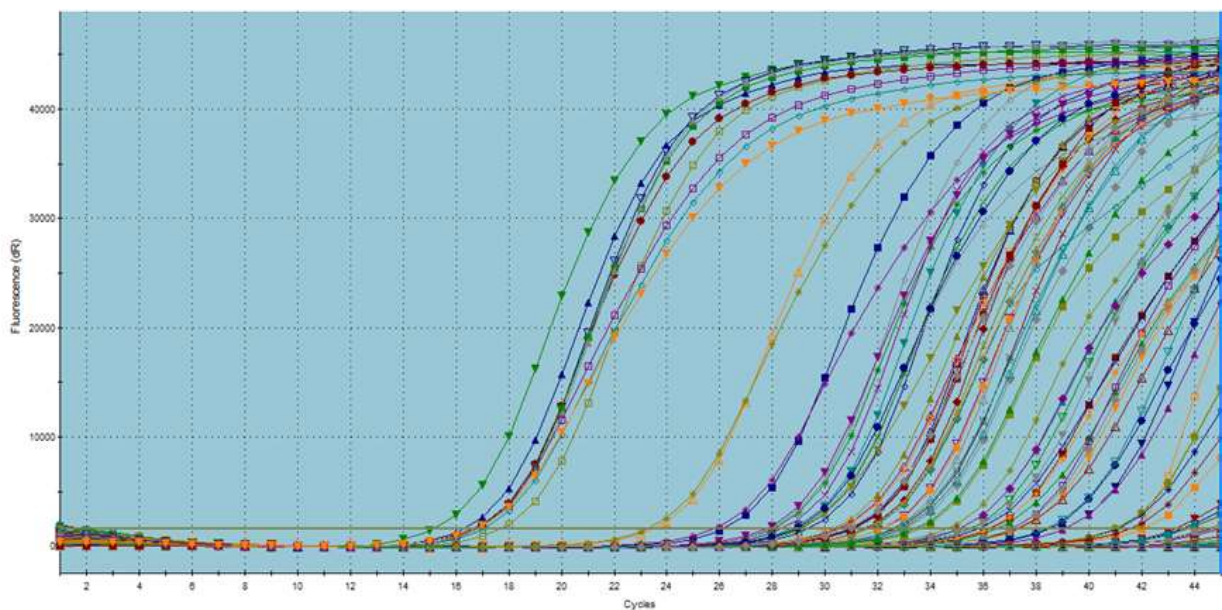


Figura 3. Graficul de amplificare reprezentativ al probelor testate pentru prezența următoarelor gene AMR (ampC- beta lactam, cefalosporine, blaZ-beta lactam, ermB - lincosamidă, macrolidă, ermC - eritromicină, mecA - rezistență la meticilină, tetK - rezistență la tetraciclină).

În majoritatea probelor testate până în prezent ($n = 42$, de la trei ferme lactante diferite), genele de rezistență ampC (36 din 42) și blaZ (40 din 42) au evidențiat rezistența la tratamentul cu antibiotice beta lactam și cefalosporine. A fost evidențiată o prezență variabilă a altor gene AMR testate inclusiv ermB, care arată rezistență la lincosamidă și macrolidă (15 din 42), ermC (12 din 42), mecA rezistent la meticilină (18 din 42) și tetK, rezistent la tetraciclină (33 din 42) (figura 4.).

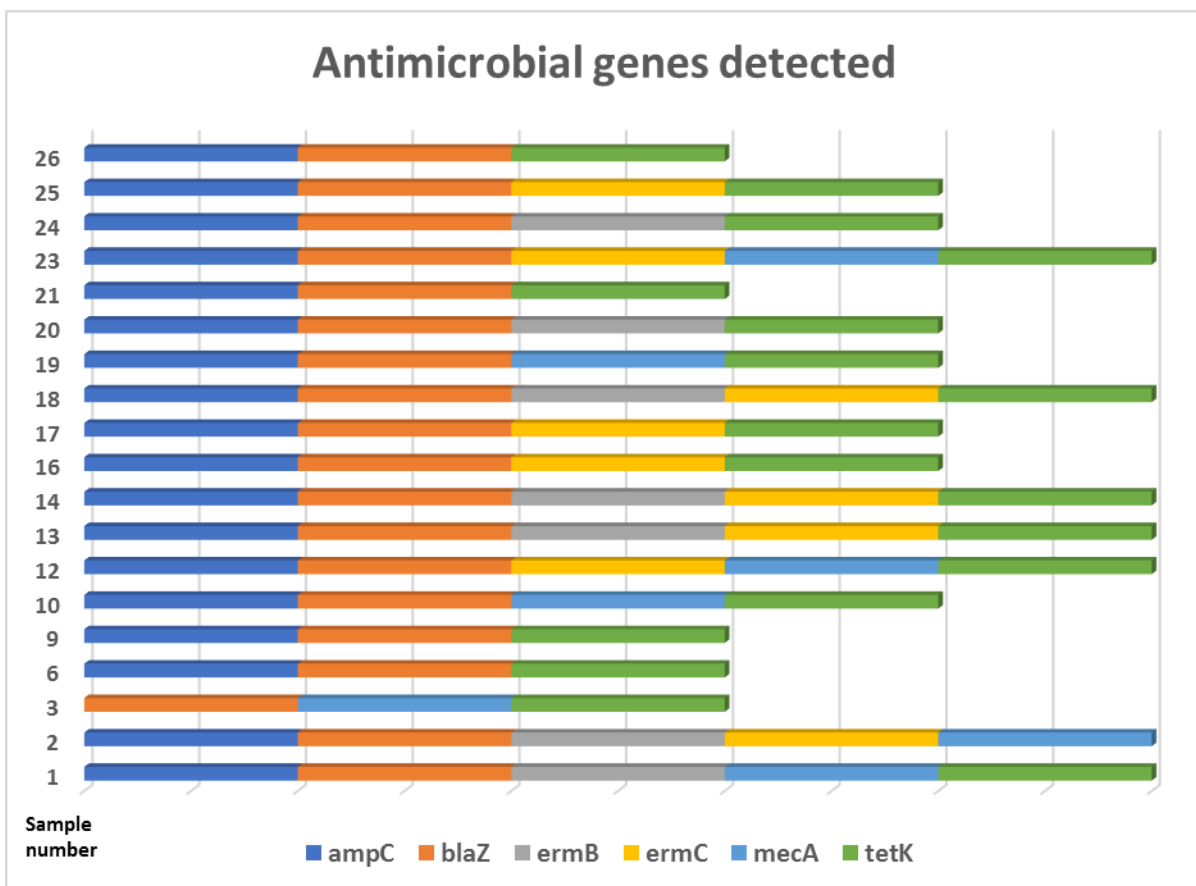


Figura 4. Imagine reprezentativă a genelor AMR detectate în primul lot de identificare a genei AMR a culturilor de lapte mastitic.

În această etapă a proiectului, nu includem analiza statistică a rezultatelor noastre, deoarece va fi adăugat un număr semnificativ de probe și acest lucru ar putea provoca concluzii eronate. Cu toate acestea, putem confirma acum că fenomenul de rezistență antimicrobiană este foarte prezent la vacile lactante și în laptele lor, reprezentând o amenințare semnificativă pentru sănătatea umană.

1.4. Concluzii și activități viitoare

Având în vedere că proiectul este încă în desfășurare, nu putem trage concluzii definitive în acest moment. Cu toate acestea, ceea ce am confirmat până acum este faptul că fenomenul de rezistență antimicrobiană este foarte prezent în fermele de vaci lactante din România și că se regăsesc în număr foarte mare genele de rezistență antimicrobiană în probele deja testate. Mai mult decât atât, rezistența la antibiotice beta lactam și cefalosporine este cel mai frecvent întâlnită în probele noastre.

În următoarea etapă a studiului nostru de cercetare, vom crește numărul de vaci cu cazuri de mastită testate și vom crește numărul de ferme de unde sunt colectate probele. De asemenea, vom testa gene suplimentare de rezistență antimicrobiană care au fost anterior validate în alte studii publicate în literatură. Probele cu cel mai mare număr de gene de rezistență prezente vor fi selectate pentru analiza microarray de rezistență antimicrobiană unde mult mai multe gene pot fi testate simultan.

Una dintre cele mai mari provocări ale proiectului nostru implică dificultatea de a include controale pozitive și negative la fiecare pas al analizei. Prin urmare, este extrem de important ca tehnicile utilizate în proiect să fie realizate la cel mai înalt nivel de acuratețe și cu cel mai mic risc de contaminare încrucișată între probe.

Un alt obstacol este acela că s-a dovedit dificil să se găsească probe de ADN standard cu rezistență confirmată la toate antibioticele selectate. Prin urmare, un procent din determinări sunt neconfirmate până când se găsesc sau sunt disponibile metode mai bune de validare a tehnicilor noastre. De asemenea, suntem încă în fazele incipiente de a realiza contacte internaționale și de a dezvolta colaborări de cercetare cu alți oameni de știință, aici, în România și în străinătate și, odată acestea stabilite, este posibil să putem obține câteva probe de control care au fost utilizate în rezultatele publicate de alte laboratoare de cercetare.

Cu toate acestea, etapele parcurse până în prezent demonstrează că suntem capabili să generăm date de înaltă calitate și noi și, odată încheiat studiul nostru, putem oferi indicații și îndrumări fermierilor în ceea ce privește alegerea celor mai bune opțiuni de tratament și prevenire a mastitei.

Experimentul suplimentar la care suntem în prezent în procesul de proiectare include stabilirea modelului de mastită de șoarece. Acest model s-ar dovedi util în situația în care sunt încercate noi abordări terapeutice și de diagnostic ale mastitei bovine precum și atunci când testarea acestora la vaci lactante este imposibilă din punct de vedere fizic și economic.

Modelul experimental presupune administrarea unui agent care induce mastita la glanda mamară atunci când un șoarece alăptează. Evoluția bolii va fi observată împreună cu examinarea gazdă- răspuns imun.

Pot exista unele dificultăți tehnice asociate cu crearea modelului, în special în ceea ce privește mărimea șoarecilor, manipularea țesutului și prelevarea de probe, în mod deosebit cu asigurarea accesului la canalul mamelonar și inocularea bacteriilor pentru a induce

Raport privind determinantii infecției: indicatori genetici.

experimental mastita. Aceste potențiale obstacole pot fi depășite cu ajutorul unui număr suficient de mare de repetări.

Un alt avantaj al creării acestui model la șoareci este eficientizarea costurilor și reducerea timpului în comparație cu celelalte animale mai mari. Utilizarea tulpinilor consangvinizate cu profilul lor genetic identic ajută la furnizarea de rezultate semnificative statistic cu un număr mai mic de animale (Ingman și colab., 2015).

Datorită faptului că modelele de boală sunt deseori configurate la șoareci, există un număr mare de anticorpi disponibili împotriva antigenelor de șoarece precum și tehnici de imunohistochimie / imunofluorescență pentru a studia expresia diferitelor proteine asociate glandei mamare. Există mai multe protocoale disponibile atunci când se iau în considerare modelele experimentale de șoareci folosite pentru a studia mastita. În unele dintre acestea, înțărirea descendenților are ca rezultat involuția glandei mamare. Mai mult, unele protocoale necesită administrarea de produse bacteriene care stimulează inflamația fără a provoca infecția activă, în timp ce altele administrează agenți patogeni vii (Catalani și colab., 2013; Thompson și colab., 2013).

Există anumite cerințe ale modelului experimental al mastitei la murine care trebuie îndeplinite pentru a avea succes. Puii trebuie îndepărtați de la femela care alăptează în momentul inducerii mastitei, deoarece suptul lor poate provoca o inducție variabilă a bolii dacă agentul care induce mastita este inclus într-o soluție apoasă.

O altă abordare experimentală pentru studierea procesului de involuție implică înțărirea forțată care presupune îndepărtarea permanentă a progeniturilor de la mama care alăptează. Această acțiune provoacă o acumulare rapidă de lapte în glanda mamară, care la rândul său produce moartea celulelor epiteliale alveolare.

Prin inducerea proceselor intense de remodelare a țesuturilor, arhitectura glandei mamare revine la starea anterioară lactației și se pot observa creșteri ale nivelului de molecule precum kappa B și oxidul nitric, împreună cu infiltrarea macrofagelor. Totuși, această înțărirea forțată poate fi considerată o complicație serioasă a analizei inducției mastitei din cauza încetării lactației. Atunci când laptele nu mai este produs, nu este posibilă studierea evoluției sau rezolvării bolii (Ingman și colab., 2015).

De asemenea, evaluarea funcționalității glandei mamare împreună cu evaluarea impactului bolii asupra alimentației cu lapte nu mai sunt posibile.

Cu toate acestea, există și multiple beneficii ale înțării forțate. Odată cu îndepărtarea bruscă a descendenților de la mamă, există o acumulare de lapte în canalele galactofore, iar acest lapte reținut poate fi un factor predispozant la mastită (Amir, 2014).

Există un număr mare de bacterii care pot fi utilizate pentru a induce experimental mastita la murine incluzând *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*, care sunt tulpinile de interes din proiectul nostru. Metodologia obișnuită aplicată la modelele de mastită la șoareci necesită administrarea de bacterii vii în glanda mamară și studierea răspunsului acut peste 24 până la 48 de ore după infecție. Utilizarea bacteriilor vii pentru a induce mastita la șoareci necesită o monitorizare foarte atentă a stării de sănătate, deoarece starea generală a unui animal poate fi rapid compromisă de infecția în curs de dezvoltare. Șocul septic a fost raportat anterior într-o infecție experimentală cu tulpini de *S. aureus*. S-a raportat o

Raport privind determinantii infecției: indicatori genetici.

scădere bruscă a temperaturii corpului (chiar o scădere de 8°C) în primele 24 de ore după infecție, împreună cu un răspuns inflamator sistemic urmat de o stare de suprimare a răspunsului imun (Doi și colab., 2009; Ingman și colab., 2015).

Administrarea produselor generate de către bacterii, spre deosebire de utilizarea bacteriilor vii, nu prezintă același risc de reacție sistemică și nu ar compromite sănătatea șoarecilor, dar nu este posibilă studiarea reacției sistemului imunitar la infecția cu bacterii active. Această abordare experimentală poate fi de mare ajutor în studiarea răspunsului inflamator al gazdei care include modificări ale comportamentului celular și în expresia citokinelor și a mediatorilor inflamatori intracelulari. În plus, noi strategii terapeutice pot fi studiate folosind această abordare (Amir, 2014).

Un alt aspect important al infecției cu mastită experimentală este alegerea unei substanțe purtătoare în care sunt incluse bacteriile. Când se utilizează un diluant apos (de exemplu, ser fiziologic), răspândirea acestei substanțe în glanda mamară produce un răspuns imun acut care poate provoca o reacție sistemică sau septicemie. Utilizarea Matrigel (amestec gelatinos de proteine, care este lichid la 4°C și devine solid la temperatura corpului) ca agent de inducere a mastitei a prezentat mai multe avantaje în comparație cu soluțiile apoase. Matrigel rămâne localizat în regiunea specifică glandei mamare, deoarece formează un dop solid în canalul mamelonar. Cu această substanță nu este nevoie de înțărirea forțată a puilor, deoarece aceștia pot continua să sugă. Un alt beneficiu al utilizării Matrigel este posibilitatea de a studia întregul curs al bolii, de la infecție până la rezoluție, fără încetarea lactației și inducerea remodelării glandei mamare (Glynn și colab., 2014).

Stabilirea cu succes a generării unui model experimental de mastită la murine în laboratorul nostru s-ar dovedi utilă, nu numai în caracterizarea răspunsului imun la diverși germeni care induc mastita, ci și în scopul dezvoltării unor opțiuni alternative de tratament, de ex. cu bacteriofagi. Sunt câteva moduri de testare a eficacității modelului pornind de la evaluarea tulpinilor bacteriene utilizate în această infecție experimentală. Bacteriile trebuie evaluate pentru capacitatea lor de a forma biofilm și pentru capacitatea lor de motilitate.

Toate procedurile efectuate pe animale, planificate în acest proiect, vor fi efectuate cu aprobarea Comitetului etic și în conformitate cu Directiva UE 2010/63 / UE „privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice”. Infecția experimentală va fi realizată cu atenție, cu concentrații minime de cultură bacteriană descrise în lucrări științifice publicate anterior și fără a depăși limitele de gravitate prevăzute în Directiva UE. Sănătatea animalelor va fi monitorizată constant pentru a evita compromiterea bunăstării lor. În cazul oricăror semne de reacție sistemică la infecție sau suferință severă, animalele vor fi sacrificate înainte de încheierea experimentului.

Una dintre propunerile experimentale ale modelului de mastită la șoareci poate implica utilizarea tulpinii de șoarece Balb/c (consangvinizat). În acest protocol, șoarecii care alăptează sunt aneșteziați cu ketamină 10% și xilazină 2% și se practică ulterior o operație chirurgicală a mamelei prin tăierea canalelor mamelonare ale ultimelor două glande mamare abdominale (cele mai caudale, stânga și dreapta) (Duarte și colab., 2018).

Evaluarea răspunsului imun se va face prin măsurarea nivelurilor de citokine implicate în mastită în glandele mamare recoltate prin procedeul mai sus menționat (de exemplu IL-6, TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 și IL-17) (Duarte și colab., 2018).

Raport privind determinantii infecției: indicatori genetici.

Un alt pas foarte important al proiectului nostru va fi utilizarea tehnologiei ADN microarray. Această tehnică de biologie moleculară va facilita testarea prezenței sau absenței genelor de rezistență simultan, în timp ce se utilizează marcaje multiple. Cel mai mare avantaj al acestei tehnici este reprezentată de faptul că o cantitate semnificativă de date privind rezistența la antimicrobiene pot fi obținute într-un timp relativ scurt.

Cu toate acestea, este o tehnică destul de costisitoare în special datorită prețului cipurilor de ADN, iar orice eroare din timpul derulării experimentale poate genera rezultate fals pozitive sau fals negative. În plus, fiecare cip ADN poate fi utilizat o singură dată, ceea ce face imposibilă corectarea eventualelor erori.

Pentru această parte a proiectului, căutăm oportunități de instruire a cercetătorilor în laboratoare cu experiență în tehnologia microarray, astfel încât nici o greșeală să nu intervină în timpul instalării experimentale și odată ce protocolul de lucru este stabilit, acesta poate fi repetat fără erori.

Cel mai important obiectiv al studiilor care încorporează tehnologia microarray ADN este reprezentat de evaluarea structurii populației, a modelelor de rezistență fenotipice și genotipice și a profilurilor genice de virulență și rezistență ale izolatelor bacteriene din laptele bovinelor cu mastită pentru a furniza datele necesare în scopul adecvării tratamentului și prevenirii mastitei bovine.

În principiu, tehnologia microarray ADN este o colecție de secvențe microscopice de ADN atașate pe o suprafață solidă care constituie un cip ADN (sau biocip). ADN Microarray măsoară nivelurile de exprimare ale unui număr mare de gene simultan sau genotipează mai multe regiuni ale unui genom. Fiecare secvență ADN de pe un cip conține picomoli ai unei secvențe specifice de ADN, cunoscuți sub numele de markeri (numite și reporteri sau oligonucleotide). Acesti markeri conțin o secțiune scurtă a unei gene sau a unui alt element ADN care sunt utilizate pentru hibridizarea eșantionului țintă de ADN în condiții foarte stricte (Shafee și Lowe, 2017).

Concentrația relativă a secvențelor de acizi nucleici în celulele țintă se stabilește pe baza hibridizării markerului din celulele țintă și este detectată și cuantificată în mod curent prin înregistrarea intensității emisiei de fluoroflor, argint sau a chemiluninescenței celulelor marcate.

Tehnologia microarray ADN a fost utilizată pe larg în studiul rezistenței antimicrobiene. Tehnica amplificării liniare multiple a ADN-ului și hibridizarea microarray permite caracterizarea markerilor specifici speciilor, genele conferind rezistență la substanțele antimicrobiene, împreună cu determinanți de virulență, cum ar fi genele care codifică enterotoxine, leukocidine, hemolizine și componente de suprafață microbială care recunosc molecule de matrice adezive. Profilurile de microarray ADN obținute sunt de obicei convertite în șiruri asemănătoare secvenței “și programe de computer speciale sunt disponibile pentru a prezenta datele” de secvență moleculară sub formă de rețele filogenetice (Käppeli și colab., 2019).

Protocolul detaliat pentru configurarea microarray ADN în laboratorul nostru va fi finalizat în următoarele luni și vom putea utiliza această tehnică de ultimă generație pentru analiza probelor care deja s-au dovedit că au gene de rezistență în urma parcurgerii reacției în lanț a polimerazei cu seturi de primeri AMR.

1.5. Observații finale

Rezistența antimicrobiană reprezintă o amenințare reală pentru sănătatea oamenilor și a animalelor. De asemenea, industria produselor lactate suferă pierderi economice considerabile datorită creșterii rezistenței și erorile pot apărea la alegerea protocoalelor de tratament și prevenire potrivite. Prevalența mastitelor la bovine este asociată cu deficiențele în mulș și igiena mediului de viață a vacilor. Infecțiile cauzate de tulpini extrem de patogene, cum ar fi *S. aureus* sau *E. coli*, sunt greu de tratat și sunt foarte dificile din cauza cronicizării și a tendinței lor de a reapărea. Utilizarea de rutină a tratamentului cu antibiotic în mastită este destul de controversată și discutabilă din punct de vedere economic (Peton și Le Loir, 2014).

În căutarea opțiunilor alternative de tratament, eforturile sporite sunt acum concentrate pe vaccinuri. Unele studii sugerează că descrierea extinsă a fondului genetic al germenilor izolați din mastita bovină ar putea fi de ajutor în identificarea proteinelor esențiale pentru colonizare și infecție care ar putea servi drept biomarkeri în identificarea țintelor vaccinului (Fluit, 2012; Klein și colab., 2012).

Tulpinile bacteriene strâns înrudite împărtășesc frecvent tiparele genelor de rezistență și s-a arătat că buna cunoaștere a epidemiologiei locale este esențială și pentru alegerea tratamentului antimicrobian în absența datelor de sensibilitate bacteriană la acțiunea antibioticelor (Sakwinska și colab., 2011).

Importanța dezvoltării strategiei de tratament pentru mastita bovină este relevantă în contextul

intoxicației bacteriene transmise prin alimente către oameni. Mai ales când infecția este cauzată de bacteriile producătoare de enterotoxine, care duc la simptome clinice violente. Se impune luarea în considerare a multor aspecte legate de igienă atunci când ne propunem îmbunătățirea strategiilor de control al mastitelor la vaci (Käppeli și colab., 2019).

În proiectul nostru de cercetare, profităm de o multitudine de tehnici de biologie moleculară care pot fi utilizate în studiul rezistenței antimicrobiene. Combinarea demersurilor bazate pe tehnici de laborator cu stabilirea unui model experimental in-vivo pe șoarece va genera un progres semnificativ al demersului nostru.

Cu toate că aceste tehnici sunt utilizate pe scară largă de laboratoarele din întreaga lume, este foarte important pentru noi să stabilim protocoale fiabile și reproductibile pentru utilizarea lor în unitatea noastră de cercetare. S-ar putea apoi realiza colaborări între diverse departamente și oameni de știință din diferite medii care s-ar familiariza cu tehnicile disponibile.

Un alt avantaj al strategiei noastre de cercetare este accesul la mai multe site-uri (ferme) de unde sunt colectate probele și prin includerea unui număr mai mare de animale, vom putea furniza date valide cu privire la distribuția pe scară largă a genelor de rezistență antimicrobiană la fermele de vaci de lapte din România.

Raport privind determinantii infecției: indicatori genetici.

În ciuda faptului că multe unități mici și tradiționale producătoare de lapte ar putea să nu fie foarte deschise să primească îndrumări cu privire la tratamentul mastitei pe baza datelor obținute din cercetările noastre și ar putea fi sceptice atunci când sunt sugerate abordări alternative și noi ale tratamentului, este obligația noastră să încercăm să consolidăm abordări moderne pentru păstrarea sănătății umane și animale.

Prin acest studiu, avem o ocazie excelentă de a sprijini progresul exploatării vacilor de lapte precum și creșterea numărului de ferme de vaci de lapte în România și, în consecință, de a crește bunăstarea animalelor. Aceste modificări ar contribui, de asemenea, la furnizarea de lapte și produse lactate mai sănătoase și la reducerea riscului zoonotic pentru fermieri și îngrijitori care pot determina răspândirea în rândul populației.

Vom urmări utilizarea tuturor opțiunilor oferite în cadrul acestui proiect de cercetare pentru a obține rezultate de cea mai înaltă calitate posibilă. În etapa finală a proiectului, vom corobora toate datele și vom efectua o analiză extinsă a datelor cu scopul publicării manuscrise într-o publicație ISI.

Bibliografie

1. Amir LH, (2014). Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee. ABM clinical protocol #4: Mastitis, revised March 2014. *Breastfeed Med.*;9(5):239–43.
2. Babapour, A., Azami, L., Fartashmehr, J. (2012). Overview of antibiotic residues in beef and mutton in Ardebil, North West of Iran. *World Appl Sci J*, 19, 1417-1422.
3. Catalani, E., Amadori, M., Vitali, A., Lacetera, N. (2013). Short communication: Lymphoproliferative response to lipopolysaccharide and incidence of infections in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* ;96(11):7077–81.
4. D’Costa, V., McGrann, K.M., Hughes, D.W., Wright, G.D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311, 374.doi:10.1126/science.1120800
5. Doi, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P.S., Star, R.A. (2009). Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest.*;119(10):2868–78.
6. Codex Alimentarius Commission. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. Updated as at the 38th session of the Codex Alimentarius Commission (July 2015). pp. 6-28, Food and Agriculture Organization in the United Nations, Rome, 2015.
7. El-Halfawy, O.M., and Valvano, M.A. (2012). Non-genetic mechanisms communicating antibiotic resistance: rethinking strategies for antimicrobial drug design. *Expert Opin. Drug Discov.* 7, 923–933.doi:10.1517/17460441.2012.712512
8. European Union. Commission regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *OJEU* 2010, 53, L 15/1-77.
9. Fluit, A. C. (2012). Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:735–744. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03846.x>.

10. Glynn, D.J., Hutchinson, M.R., Ingman, W.V. (2014). Toll-like receptor 4 regulates lipopolysaccharide-induced inflammation and lactation insufficiency in a mouse model of mastitis. *Biol Reprod.*; 90(5):91.
11. Hassan, M., Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B., Lotfipour, F. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* 113, 723–736. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x
12. Ingman, W.V., Glynn, D.J., Hutchinson, M.R. (2015). Mouse models of mastitis – how physiological are they? *Int Breastfeed J* 10, 12 doi:10.1186/s13006-015-0038-5
13. Josephson, J. (2006). The microbial resistome. *Environ.Sci.Technol.* 11, 6531–6534. doi: 10.1021/es063006i
14. Klein, R. C., Fabres-Klein, M.H., Brito, M.A.V.P., Fietto, L.G., Ribon, A.D.O.B. (2012). *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin encoding genes. *Vet. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.025>
15. Käppeli, N., Morach, M., Corti, S., Eicher, C., Stephan, R., Johler, S. (2018). *Staphylococcus aureus* related to bovine mastitis in Switzerland: Clonal diversity, virulence gene profiles, and antimicrobial resistance of isolates collected throughout 2017. *J. Dairy Sci.* 102:1–8 <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15317>
16. Levy, S. (2002). *The Antibiotic Paradox* 2nd Edition. Perseus Publishing 15-56.
17. Oliver, S.P., Murinda, S.E. (2012). Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens. *Vet Clin Food Anim* 28 165–185 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.005>
18. Overbye, K.M., Barrett, J.F. (2005). Antibiotics: where did we go wrong. *Drug Discov. Today* 10, 45–52. doi:10.1016/S1359-6446(04)03285-4
19. Park, E.K, Ryu, Y.J., Cha, C.N., Yoo, C.Y., Kim, S., Lee, H.J. (2016). Analysis of antibiotic residues in milk from healthy dairy cows treated with bovine mastitis ointment using ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Korean J Vet Res* 56(4):233~239 <https://doi.org/10.14405/kjvr.2016.56.4.233>
20. Peton, V., Le Loir, Y. (2014). *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect. Genet. Evol.* 21:602–615. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.011>.
21. Ruegg, P. (2013). Antimicrobial Residues and Resistance: Understanding and Managing Drug Usage on Dairy Farms. *Antimicrobial Residues and Resistance: Understanding and Managing Drug Usage on Dairy Farms - Engormix*
22. Reynolds, R., Potz, N., Colman, M., Williams, A., Livermore, D., MacGowan, A. (2004). Antimicrobial susceptibility of the pathogens of bacteraemia in the UK and Ireland 2001–2002: the BSAC Bacteraemia Resistance Surveillance Programme. *J. Antimicrob.Chem.* 53, 1018–1032. doi:10.1093/jac/dkh232
23. Rio-Alvarez, I., Rodríguez-Herva, J.J., Cuartas-Lanza, R., Toth, I., Pritchard, L., Rodríguez-Palenzuela, P. (2012). Genome-wide analysis of the response of *Dickeya dadantii* 3937 to plant antimicrobial peptides. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 523–533. doi:10.1094/MPMI-09-11-0247

24. Sakwinska, O., Morisset, D., Madec, J.-Y., Waldvogel, A., Moreillon, P., Haenni, M. (2011). Link between genotype and antimicrobial resistance in bovine mastitis-related *Staphylococcus aureus* strains, determined by comparing Swiss and French isolates from the Rhône Valley. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3428–3432. <https://doi.org/10.1128/AEM.02468-10>.
25. Silva Duarte, V., Dias, R.S., Kropinski, A.M. (2018). Genomic analysis and immune response in a murine mastitis model of vB_EcoM-UFV13, a potential biocontrol agent for use in dairy cows. *Sci Rep* 8, 6845 doi:10.1038/s41598-018-24896-w
26. Shafee, T., Lowe, R. (2017). Eukaryotic and prokaryotic gene structure. *WikiJournal of Medicine.* 4 (1). doi:10.15347/wjm/2017.002
27. Tavares, L.S., Silva, C.S.F., deSouza, V.C., daSilva, V.L., Diniz, C.G., Santos, M.O. (2013). Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. *Front. Microbiol.*, Vol.4, Article 412, doi.org/10.3389/fmicb.2013.00412
28. Tikofsky, L.L., Barlow, J.W., Santisteban, C., Schukken, Y. H. (2003). A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. *Microbial Drug Resistance* 9: supplement 1, 39-45.
29. Thompson-Crispi, K.A., Miglior, F., Mallard B.A. (2013). Incidence rates of clinical mastitis among Canadian Holsteins classified as high, average, or low immune responders. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(1):106–12.
30. Wright, G.D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 175–186. doi: 10.1038/nrmicro1614
31. *** <https://www.biomerieuxconnection.com/2018/07/12/explain-antimicrobial-resistance-friends-family-infographics>