

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

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 Tanasie

Membri: Conf. Dr. Carmen Tatu, doctorand Alina Simina, conf. dr. Călin Mircu

Data finalizării: 22.11.2019

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. Introducere

În ultimii ani se remarcă pe plan mondial o incidență tot mai ridicată a infecțiilor bacteriene soldate cu eșec terapeutic. Printre posibile explicații se pot enumera câștigarea unui număr tot mai mare de factori de virulență de către tulpinile bacteriene, utilizarea nejustificată a antibioticelor și diseminarea factorilor de antibioretistență, utilizarea metodelor de investigație invazive, creșterea numărului de pacienți imunocompromiși, răspândirea rapidă a microorganismelor în mediul ambient.

Spre exemplu infecțiile actuale cu *Staphylococcus aureus* par a fi produse de un agent patogen microbial multirezistent la o gamă foarte largă de antibiotice utilizate în mediul spitalicesc (tulpini MRSA și VRSA). În România, în 2014, s-a raportat că 50% din tulpinile de *S.aureus* izolate din hemoculturi și LCR prezentau fenotipul MRSA, multirezistent la antibiotice, dar se consideră de fapt că numărul infecțiilor intraspitalicești era mult mai mare decât cel raportat. (Merezeanu, 2016).

Datele colectate în anii 2011-2014 de Reteaua europeană de supraveghere a rezistenței antimicrobiene (EARS-Net) au aratat creșterea mai pregnantă a rezistenței în cazul bacililor gram negative. Creșterea ponderii tulpinilor producătoare de ESBL (Extended Spectrum P-Lactamases) a fost mai mare la *Escherichia coli* și *Klebsiella pneumoniae*. Frecvența tulpinilor MRSA a fost constantă sau a scăzut în multe țări europene rămânând semnificativă în sudul și estul Europei. (Raport anual EARS-NET, 2017, 2018)

2. Evaluarea rezistenței la antibiotice a culturilor de E. Coli și Stafilococ stocate în biobanca de probe generată în proiectul BIO-AMR

În etapa anterioară a proiectului am pus bazele unei biobănci cu probe care să conțină anumite culturi de germeni cunoscuți în condiții standardizate și reproductibile. Am inclus în bancă diferite culturi bacteriene izolate 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. Toate tulpinile identificate și izolate au fost stocate la congelator (vezi Raportul R.2.2.1)

În cadrul actualei etape de lucru am testat culturi de *Escherichia Coli*, respectiv culturi de Stafilococ.

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

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

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 microorganism, au fost introduse în camera de presurizare (tip vacuum). Tubul cu suspensia de microorganism este introdus într-un locaș special al casetei 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 microorganism 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.

Au fost testate următoarele chimioterapice antimicrobiene (conform CLSI 2019):

Specia testată	Preparat antimicrobian	Clasa
E. Coli	Amikacina	Aminoglicozide
	Gentamicina	Aminoglicozide
	Cefazolin	Cefalosporine
	Cefepim	Cefalosporine
	Ceftazidim	Cefalosporine
	Cefuroxim	Cefalosporine
	Ceftriaxon	Cefalosporine
	Imipenem	Carbapeneme
	Meropenem	Carbapeneme
	Levofloxacină	Chinolone
	Ciprofloxacina	Chinolone

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

	Piperacilin-tazobactam	Peniciline+inhibitor β lactamaza
	Piperacilina	Peniciline
	Ampicilina-Sulbactam	Peniciline+inhibitor β lactamaza
	Trimetoprim-sulfametoxazol	Sulfamide
Stafilococ	Clindamicina	Lincozamide
	Ciprofloxacin	Chinolone
	Cefoxitin	Cefalosporine
	Linezolid	Oxazolidinone
	Gentamicina	Aminoglicozide
	Penicilina	Peniciline
	Teicoplanina	Glicopeptide
	Eritromicina	Macrolide
	Trimetoprim-sulfametoxazol	Sulfamide

Tulpinile de E. Coli izolate la nivelul biobăncii au provenit din următoarele produse biologice: sânge, urina, sperma, aspirat bronsic, secreție plaga, așa cum reiese din graficul de mai jos.

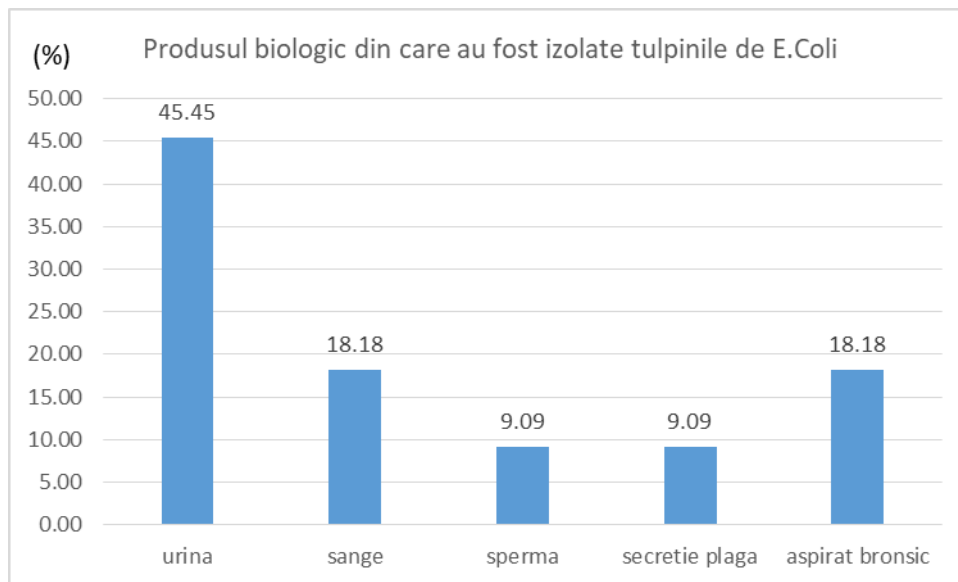


Fig. 1 Distribuția procentuală a probelor de E. Coli în funcție de produsul biologic recoltat

Tulpinile de Stafilococ izolate la nivelul biobăncii au provenit din următoarele produse biologice: sânge, secreție plaga, lichid pleural, LCR. Distribuția procentuală a probelor în funcție de lichidul biologic recoltat este redată în graficul din figura 2. Dintre tulpinile de stafilococ stocate la nivelul băncii, 8% au fost identificate ca fiind Staphylococcus hominis, 8% Staphylococcus letus, 8% Staphylococcus epidermidis și 76% Staphylococcus aureus.

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

Având în vedere ponderea mare a tulpinilor de *Stafilococ aureus*, acestea sunt cele care au fost evaluate în studiul nostru.

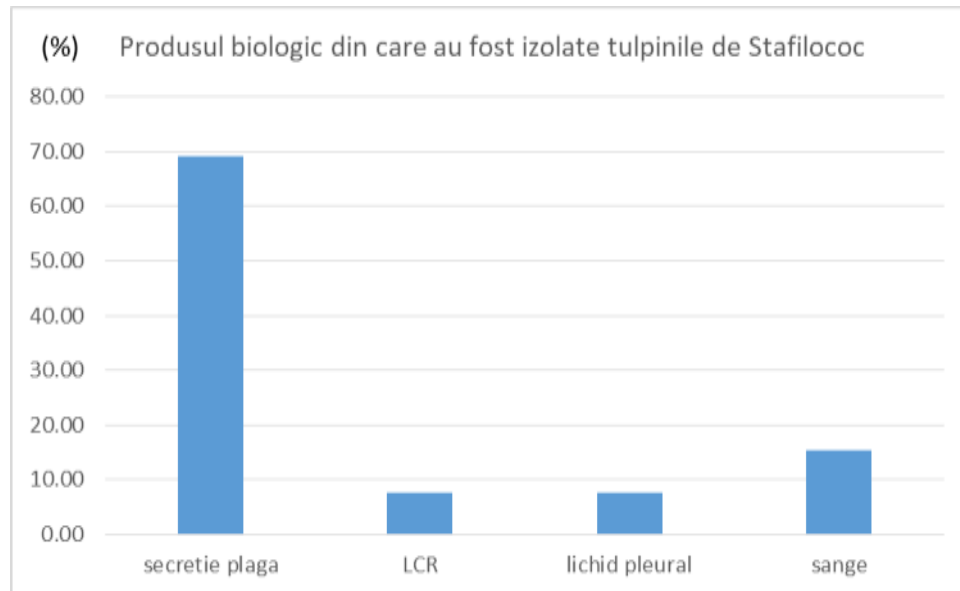


Fig. 2 Distribuția procentuală a probelor de *Stafilococ* în funcție de produsul biologic recoltat

Rezultatele obținute la testarea rezistenței la antibiotic arată:

- Pentru tulpinile de **E. Coli**:
 - Producție de beta-lactamază: 100%
 - Dintre care producție de penicilinază: 45%
 - Rezistență la sulfamide: 91%
 - Rezistență la chinolone: 73%
 - Rezistență la aminoglicozide: 37%

Cele mai multe dintre tulpinile *E. Coli* testate au prezentat mai multe mecanisme de rezistență asociate, astfel:

- 5 mecanisme – 45% dintre tulpini
 - 4 mecanisme – 9 % dintre tulpini
 - 3 mecanisme – 27 % dintre tulpini
 - 2 mecanisme – 18% dintre tulpini
 - un singur mecanism - 9 % dintre tulpini
- Pentru tulpinile de **Stafilococ aureus**:
 - Producție de beta-lactamază: 100%

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

- Rezistență la sulfamide: 50%
- Rezistență la macrolide: 40%
- Rezistență la lincozamide: 40%
- Rezistență la aminoglicozide: 30%

Cele mai multe dintre tulpinile testate au prezentat mai multe mecanisme de rezistență asociate, astfel:

- 5 mecanisme – 30% dintre tulpini
- 4 mecanisme – 10 % dintre tulpini
- 2 mecanisme – 10% dintre tulpini
- un singur mecanism - 50 % dintre tulpini

Se poate constata astfel ca toate tulpinile izolate in biobanca noastra au prezentat diferite grade de rezistenta la antibiotice. Comparativ, tulpinile de E. Coli din colectia noastra prezinta un grad mai mare de multirezistență față de tulpinile de Stafilococ auriu analizate.

3. Evaluarea și cuantificarea unor markeri de rezistență a culturilor bacteriene din biobancă

Pornind de la datele analizate anterior și pe baza studiului bibliografic a fost evaluată prezența unor gene de rezistență pentru tulpinile izolate din biobanca noastră.

3.1. Metodologia de lucru

Cuantificarea prezenței unor markeri de rezistență s-a făcut prin metode de biologie moleculară utilizând tehnica PCR.

Într-o etapă inițială am ales cea mai eficientă metodă de extragere a ADN bacterian, atât din culturile de E. Coli și Stafilococ auriu luate în lucru cât și din biofilmele generate din aceste specii bacteriene. Metodologia de izolare și evaluare a probelor de ADN bacterian este descrisă pe larg în Raportul 2.4.3.

Reactia PCR (reacția de amplificare genică)

Pentru reacția de amplificare genică tip PCR s-a utilizat enzima TaqPolimeraza (Fermentas), mixtura de nucleotide (dNTPmix) și primerii specifici secvențelor de gene căutate. Pentru amplificarea genică am utilizat primeri ale căror secvențe au fost generate și verificate în banca de gene (GENEBANK). În Tabelul 2 sunt redate secvențele primerilor utilizați pentru amplificare.

A fost utilizat un termocycler tip GeneAmp, cu posibilitatea de controlare automată a ciclurilor termice. Ciclurile termice su fost adaptate pentru fiecare primer.

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

Pentru analiza datelor, produșii de amplificare au fost supuși unei electroforeze în gel de agar 1,5% marcat cu Ethidium Bromide, iar rezultatele au fost vizualizate în lumina UV la transluminator UV tip BioRad și analizate cu ajutorul softului GelDoc. Acesta permite și o apreciere semicantitativă a rezultatelor obținute.

Genele de rezistență evaluate au fost:

- Pentru E. Coli
 - Genele de rezistență la betalactami, responsabile de fenotipul ESBL (extended spectrum beta lactamase):
 - Gene pentru beta lactamaze clasa A (penicilinaze):
 - blaSHV, blaTEM, blaCTX-M
 - Gene pentru beta lactamaze clasa B (metalobetalactamaze): blaVIM
 - Gene pentru beta lactamaze clasa D (carbapenemaze): OXA-48, blaKPC
 - Gena de rezistență la chinolone - gyrA
- Pentru Streptococul auriu
 - Gena de rezistență la meticilină - mecA
 - Gena de rezistență la oxacilină - OXA-48
 - Genele de rezistență la macrolide: ermA, și ermC

Tabel 2. Secvența primerilor utilizați în reacția PCR

Primer	Secvența	Produs de reacție
blaSHV	F: 5'-GGTTATGCGTTATATTCGCC-3' R: 5'-TTAGCTTTGCCAGTGCTC-3'	865bp
blaTEM	F: 5'-ATGAGTATTCAACATTTTC CG -3' R: 5'-CTGACAGTTACCAATGCTTA-3'	867bp
blaCTX-M	F: 5'-GCT GTT GTTAGG AAG TGT GC-3' R: 5'-CCA TTG CCCGAG GTG AAG-3'	480bp
blaVIM	F: 5'-GTTTGGTTCGCATATCGCAAC-3' R: 5'-AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'	382bp
OXA-48	F: 5'-AACGGGCGAACCAAGCATTTT-3' R: 5'-TGAGCACTTCTTTTGTGATGGCT-3'	590bp
blaKPC	F: 5'-TGTTGCTGAAGGAGTTGGGC-3' R: 5'-ACGACGGCATAGTCATTTGC-3'	340 bp
gyrA5	F: 5'-GGC CTG AAG CCG GTG CAC-3' R: 5'-CAC GGC GAT ACC GCT GGA-3'	410bp
mecA	F: 5'-ACGAGTAGATGCTCAATATAA- 3' R: 5'-CTTAGTTCTTTAGCGATTGC- 3'	263 bp
ermA	F: 5'-AAG CGG TAA ACC CCT CTG A-3'	190 bp

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

	R: 5'-TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC-3'	
ermC	F: 5'-AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT-3' R: 5'-TAA TCG TGG AAT ACG GGT TTG-3'	299 bp
GAPDH	F: 5'-TCAACGATTTAACAGATGACGCA-3' R: 5'-TTCGTCTTTGAAACGACCTTGTG-3'	77bp

Analiza Real-time PCR cantitativ (qRT-PCR)

Am realizat acest test doar pentru acele gene la care am avut un procent mare de răspunsuri pozitive în reacția simplă PCR: mecA, blaCTX-M. Scopul a fost de a compara cantitativ expresia genică la nivelul ADN recoltat din tulpinile izolate comparativ cu expresia genică la nivelul ADN recoltat din biofilmele realizate din aceste tulpini. Produsul biologic din care au fost izolate tulpinile testate a fost reprezentat atât pentru E. Coli cât și pentru Stafilococ de secreția recoltată din plagă. În plus, în cazul E. Coli am testat și probe izolate din urină.

Principiu: Probele de ADN sunt amplificate și simultan se realizează cantitația ADN. În proba de ADN se adaugă un compus cu potențial fluorescent (SYBR Green I dye). Există o specificitate structurală între catena compusului fluorescent și un segment genic. În momentul cuplării dintre SYBR Green I dye și catena complementară de ADN se creează o emisie fluorescentă, în acest fel realizându-se o reacție direct proporțională între gradul de expresie genică și intensitatea fluorescenței. Astfel există o cuplare inițială între segmentele existente în probă și catenele complementare fluorescente, pe măsură ce reacția de amplificare progresează se realizează cuplări specifice cu copiile ADN rezultate. În consecință, cu cât semnalul fluorescent debutează la un număr mai mic de cicluri cu atât expresia a fost mai puternică în proba inițială. Ulterior este generată o curbă standard care indică intensitatea fluorescenței raportat la numărul de cicluri.

Probele de ADN (10 ng template/ reacție) au fost analizate prin real-time PCR cantitativ, folosind LightCycler480 SYBR Green I Master system (Roche, Florence, SC, USA) și primerii mai sus menționați. Cuantificarea valorii absolute a fost efectuată folosind metoda Fit Points, cu o curbă standard externă, iar expresia markerilor moleculari a fost exprimată ca număr de copii/probă.

Tabel 3. Probele folosite pentru determinarea expresiei genice cantitative

Proba	ADN (ng/ml)
S. aureus CP7107	330,2
S.aureus CN3606	456,2
S. aureus CP7107 - biofilm	1200
S.aureus CN3606 - biofilm	1832

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

E. Coli CO1453	594,4
E. Coli CO1453 - biofilm	1466
E. Coli CT9376	360,5
E. Coli CT9376 - biofilm	1543

3.2. Rezultate

3.2.1. Genele de rezistență detectate în tulpinile de E. Coli

Au fost testate unele dintre cele mai frecvente gene de rezistență la antibioticele din clasa beta lactami și la antibioticele din clasa chinolone.

În Figura 3 și tabelul 4 sunt redate rezultatele evaluării markerilor de rezistență în E. Coli.

Dintre genele care codifică penicilinazele, 100% dintre tulpini au prezentat expresia bla CTX-M, 18% dintre reacțiile PCR au fost pozitive pentru blaSHV și nu s-a detectat în nici una dintre probe gena blaTEM.

De asemenea nu am găsit decât 9% tulpini E. Coli pozitive pentru metalobetalactamaze blaVIM; acestea au fost dublu pozitive și pentru blaCTX-M.

Dintre genele de rezistență la carapeneme expresia OXA-48 a fost identificată în 45% din cazuri iar expresia blaKPC nu a fost găsită pentru nici una dintre probele luate în studiu.

Gena de rezistență la chinolone gyrA a fost identificată în 54% din probele studiate.

Tabel 4. Expresia genelor de rezistență în tulpinile de E. Coli evaluate

cod	provine din	bla SHV	bla TEM	bla CTX-M	bla VIM	OXA-48	bla KPC	gyrA
CP7921	urina	-	-	+	-	+	-	+
CO1165	urina	-	-	+	-	+	-	-
CO1320	urina	+	-	+	-	+	-	+
CT9376	urina	-	-	+	+	-	-	+
CV1876	urina	-	-	+	-	-	-	-
CP9286	sperma	-	-	+	-	+	-	-
CO1453	secretie plaga	-	-	+	-	-	-	+

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

CT8272	sange	-	-	+	-	-	-	-
DK1034	sange	+	-	+	-	-	-	-
CT6950	aspirat bronsic	-	-	+	-	-	-	+
CU0181	aspirat bronsic	-	-	+	-	+	-	+

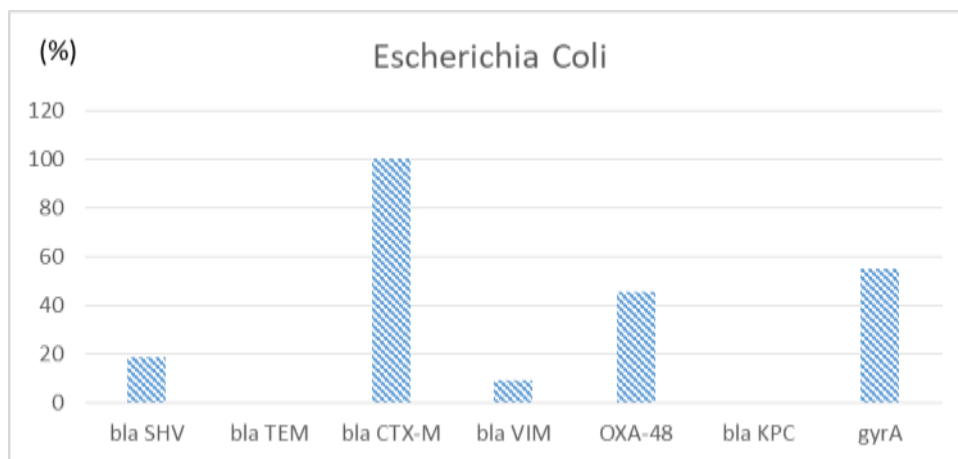


Fig. 3 Distribuția procentuală a genelor de rezistență în tulpinile de E. Coli studiate

Mai jos, ilustrăm cu imagini caracteristice detecția markerilor de rezistența a E. Coli prin tehnici de biologie moleculară.

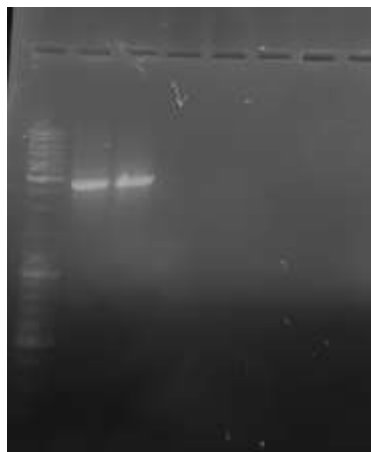


Fig. 4 Expresia genei blaSHV in probele de E. Coli



Fig. 5 Expresia genei bla CTX-M in probele de E. Coli

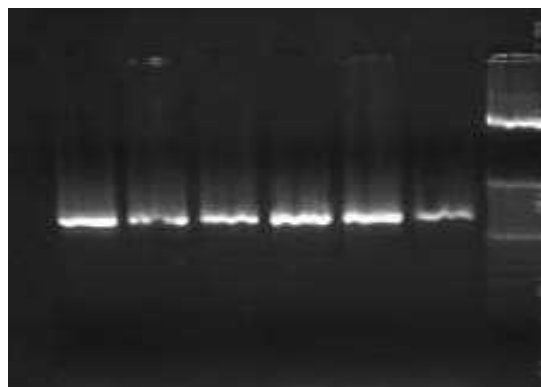


Fig. 6 Probele E. Coli pozitive pentru expresia genei gyrA

3.2.2. Genele de rezistență detectate în tulpinile de Stafilococ auriu

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

Au fost testate gena *mecA* ce specifică sinteza proteinei PBP2a care va determina un pattern diferit de legare la peniciline și care reprezintă o genă caracteristică rezistenței la meticilină. De asemenea au fost testate gene de rezistență la macrolide și oxacilină.

În Figura 7 și tabelul 5 sunt redate rezultatele evaluării markerilor de rezistență în *E. Coli*.

Deși toate tulpinile de stafilococ auriu au fost de tip MRSA (meticilin rezistente), gena *mecA* a fost exprimată doar în 80% din cazuri, probabil celelalte tulpini exprimă gena *mecC* care nu a fost evaluată în studiul de față.

Prezența genei OXA-48 care specifică sinteza unei carbapenemaze a fost identificată doar la jumătate dintre probele analizate

Rezistență la antibiotice din clasa macrolidelor a fost evaluată prin detecția genelor *erm*. Gena *ermA* a fost detectată la 30% din cazuri, iar gena *ermC* la alte 40% din cazuri. De remarcat că pentru nici una dintre probele analizate nu am găsit coexpresia genelor *ermA* și *ermC*. 30% dintre probe au fost negative pentru ambii markeri, ceea ce corespunde de altfel cu fenotipul de rezistență al culturilor evaluate. Nu trebuie însă exclusă deocamdată nici posibilitatea ca și aceste probe să prezinte alte gene de rezistență față de macrolide, netestate de către echipa noastră (*ermB*, *mrsA*, etc.)

Probele de stafilococ auriu evaluate au fost izolate din secreția recoltată de la nivelul plăgilor și doar o singură probă a fost izolată din LCR. Această probă a prezentat expresie pozitivă doar pentru markerul *mecA*, fiind negativă pentru ceilalți markeri moleculari luați în lucru.

Dintre probele recoltate din secreție plagă, 4 au prezentat 3 gene de rezistență, *mecA*, OXA-48 și *erm* (2 *ermA*, alte 2 *ermC*), o probă a fost pozitivă doar pentru *mecA* și OXA-48 și de asemenea câte o probă au fost identificate ca pozitive doar pentru expresia unei singure gene de rezistență *ermA* sau *ermC*.

Nici una dintre probele evaluate nu au fost negative pentru toși markerii analizați.

Tabel 5. Expresia genelor de rezistență în tulpinile de Stafilococ auriu evaluate

cod	provine din	mecA	OXA-48	ermA	ermC
CL9002	Secretie plaga	+	+	-	+
CN4099	Secretie plaga	+	-	-	+
CN3606	Secretie plaga	+	-	-	-
CN4099	Secretie plaga	-	-	+	-
CP7483	Secretie plaga	+	+	+	-
CP8150	Secretie plaga	+	+	+	-

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

CP7107	Secretie plaga	+	+	-	+
C00587	Secretie plaga	+	+	-	-
C01438	Secretie plaga	-	-	-	+
CN7897	LCR	+	-	-	-

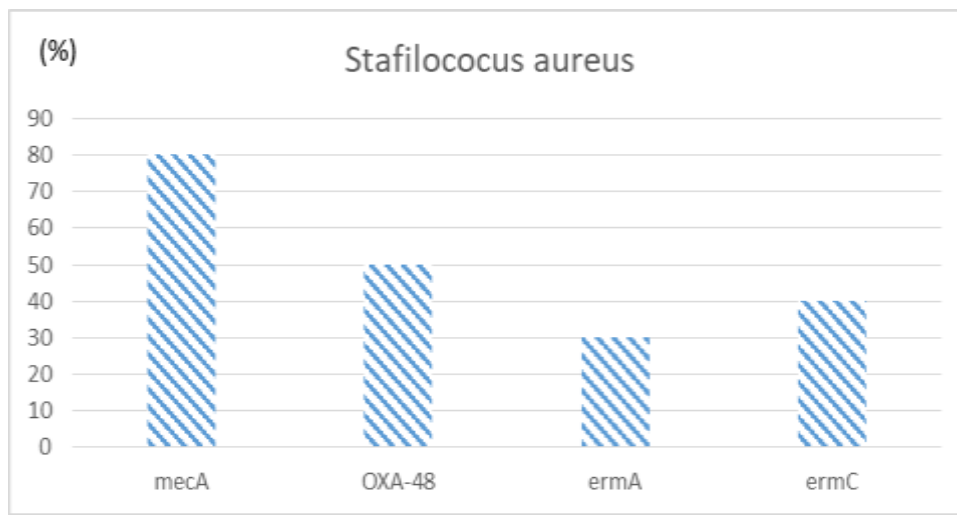


Fig. 7 Distribuția procentuală a genelor de rezistență în tulpinile de Stafilococ auriu

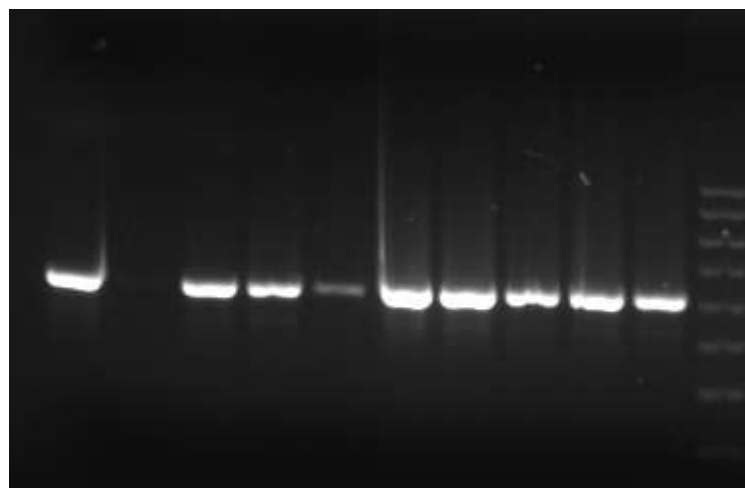


Fig. 8 Expresia genei mecA in probele de Stafilococ auriu

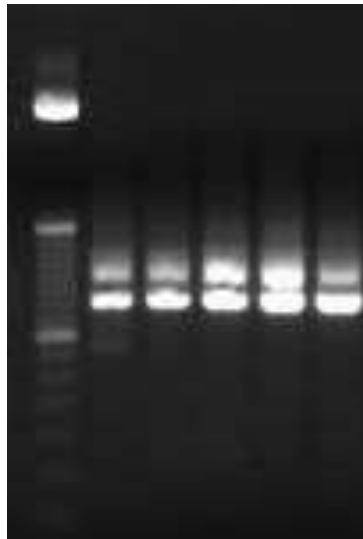


Fig. 9 Probele de Stafilococ auriu OXA-48 pozitive

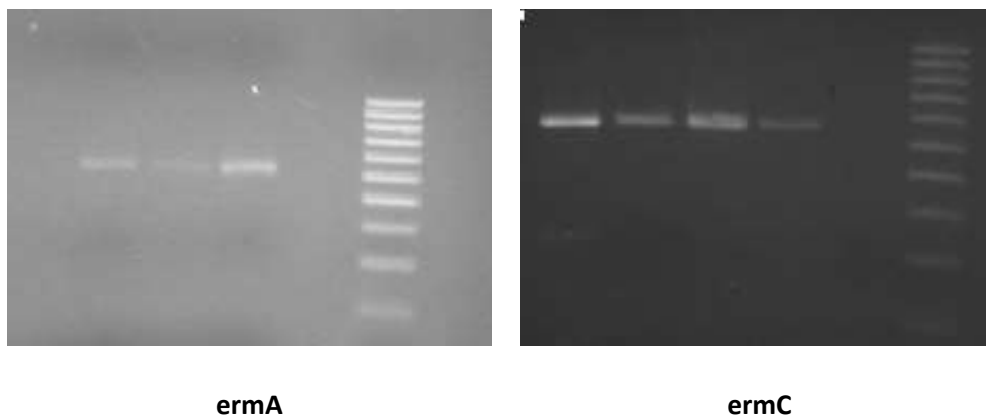


Fig. 10 Probele de Stafilococ auriu pozitive pentru genele de rezistență la macrolide

3.2.3. Analiza Real-time PCR cantitativ (qRT-PCR)

Pentru unele dintre tulpinile izolate și conservate în biobancă am realizat și cultivarea în biofilme mono și plurimicrobiene. În studiul de față am căutat expresia markerilor moleculari cu cea mai mare frecvență, comparativ în culturile bacteriene ca atare sau în biofilmele monomicrobiene.

Rezultatele obținute au confirmat ipotezele generate de noi după cantitația ADN unde am obținut de 2-3 ori mai mari concentrații ale probelor ADN dacă acestea au fost izolate din biofilme (tabel 3).

După cum se observă în imaginile din figurile 11 și 12, atunci când tulpinile bacteriene au fost cultivate în biofilme, expresia genelor de rezistență a fost mai puternic exprimată față de situația culturilor bacteriene simple.

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

Probabil asocierea bacteriilor la nivel populațional așa cum se întâmplă în biofilme favorizează supraexpresia genelor de luptă și apărare care favorizează supraviețuirea în medii așa zis ostile. Biofilmele sunt grupuri de celule microbiene atașate la suprafață și încorporate într-o matrice extracelulară care sunt semnificativ mai puțin sensibile la agenții antimicrobieni decât celulele planctonice neaderente. O gamă largă de mecanisme moleculare contribuie la gradul ridicat de recalcitrantă caracteristică comunităților de biofilm. Aceste mecanisme includ, printre altele, interacțiunea antimicrobienei cu componentele matricei biofilmului, rate de creștere reduse și diferitele acțiuni ale determinantilor genetici specifici de rezistență la antibiotice și toleranță. Singur, fiecare dintre aceste mecanisme contabilizează parțial doar recalcitranta antimicrobiană crescută observată în biofilme. Acționând însă împreună, toate acestea ajută la asigurarea supraviețuirii celulelor din biofilm în fața chiar și a celor mai agresive regimuri de tratament antimicrobiene. (Hall și Mah, 2017)

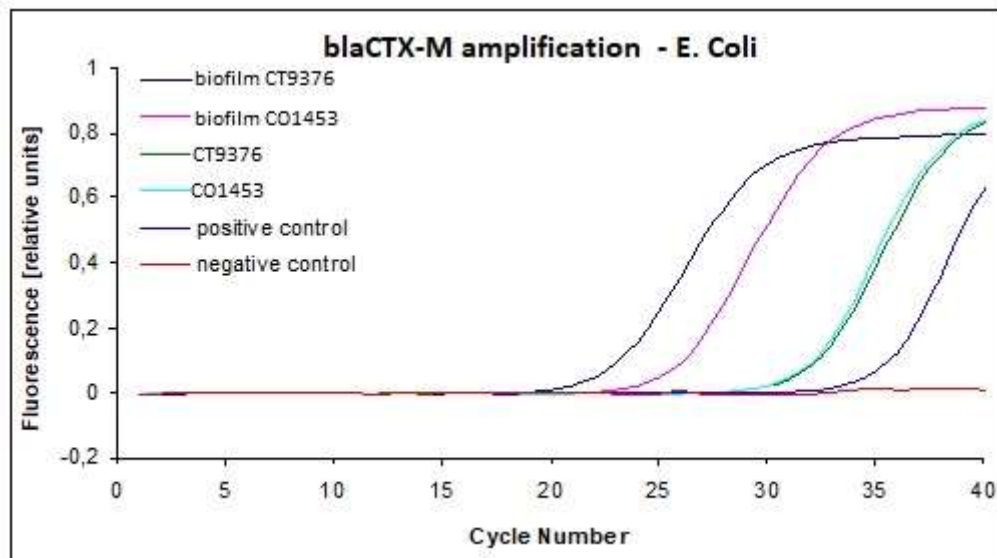


Fig. 11 Amplificarea qRT-PCR pentru gena blaCTX-M exprimată în culturi de E. Coli

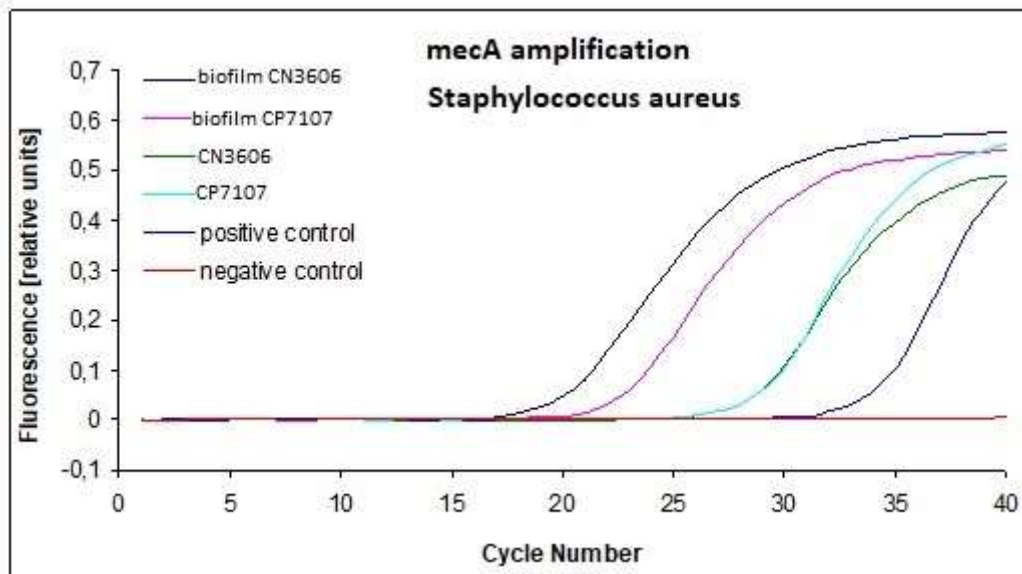


Fig. 12 Amplificarea qRT-PCR pentru gena *mecA* exprimată în culturi de *Stafilococ auriiu*

4. Discutii

În literatură există o multitudine de studii care evaluează expresia markerilor de rezistență la specii bacteriene variate, izolate fie din diferite produse biologice recoltate de la pacienti umani fie din alimente cu potențial contaminant.

Un studiu efectuat de către o echipă din Turcia ([Duzgun et. al. 2019](#)) a analizat nouăzeci de izolate de *E. coli*. Rata de pozitivitate a betalactamazelor cu spectru extins a fost de 18,9%. Toate cele 90 de tulpini au fost izolate din probe de urină. Rezultatele testului de sensibilitate la antibiotice a relevat faptul că aceste izolate au o rată a rezistenței scăzută pentru fosfomicină (2,7%), imipenem (3,2%) și meropenem (3,2%). Cu toate acestea, ratele de rezistență pentru ciprofloxacină (62,2%), trimetoprim sulfametoxazol (75,6%) și ampicilină (61,1%) erau înalte. Ratele de rezistență împotriva amikacinei, nitrofurantoiniei, ceftriaxonă, ceftazidime, gentamicină, amoxicilină cu acidul clavulanic, aztreonamul, cefazolina și cefepimina s-a dovedit a fi 9,9%, 8,9%, 22,2%, 21,1%, 27,8%, 27,8%, 18,9%, 18,9%, respectiv 20%. Genele de rezistență *qnrA*, *qnrB*, și *qnrS* la chinolonă - prezente pe plasmidă - au fost în procent de 26,6% (24/90), 6,7% (6/90) și, respectiv, 3,3% (3/90) din izolate. *AFA* și genele *cnf1* au fost detectate în 16,6% dintre izolate și *hly* a fost găsită doar în trei (3,3%) din cele 90 de izolate. *SFA* și genele *pap* nu au fost detectate. În plus, s-a găsit gena *aer* în 33 (36,6%) din izolate. Rezultatele PCR au relevat că 63% (57/90) din tulpinile au transportat casete de genă integronă de clasa 1. Noi a observat, de asemenea, o prevalență ridicată a ESBL, cu 52 de tulpini (57%) purtând un CTX-M-2 și 52 izolate (57%) purtând un CTX-M-1 grupă β-lactamază. Nu există alte gene care codifică β-lactamază (*bla* IMP, au fost identificate *bla* VIM, *bla* NDM, *bla* GES, *bla* SIM, *bla* AmpC sau *bla* SPM). De asemenea, studiul a demonstrat că *qnrA*, *qnrB*, și *qnrS* gene de rezistență la chinolone -

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

prezente pe plasmidă - au fost prezente în 26,6% (24/90), 6,7% (6/90) și, respectiv, 3,3% (3/90) din izolate. Nu s-au găsit gene de rezistență la fosfomicină (*fosA*, *fosC2* sau *fosA3*).

Genele cu rezistență la chinolone (PMQR) mediate de plasmide se găsesc de obicei în asociere cu genele ESBL. Genele CTX-M au fost identificate atât în spital, cât și în comunitate și aparțin unui grup de ESBL-uri. Co-expresia genelor *bla* CTXM și PMQR a fost raportată în izolate de *E. coli* care sunt asociate cu infecțiile tractului urinar. În acest studiu, însă, această asociere nu a fost găsită în izolatele *E. coli* care rețin Genele PMQR 36.

Pe de altă parte, analiza unor izolate patogene *E. Coli* prevalente în populația din Japonia (Nukui et.al., 2019) cu ajutorul secvențierii întregului genom al tulpinii EC129, au indicat prezența a 90 de gene ARNt, 22 de gene rARN și 5.022 de secvențe de codificare a proteinelor, identificarea acestora realizându-se cu ajutorul serverului DFAST. Tipizarea secvenței multilocus a relevat faptul că EC129 aparține ST167. Mai mult, genomul conține două secvențe CRISPR. Următoarele gene de rezistență au fost identificate la aminoglicozide *aph* (4) -Ia, *aph* (3') -Ia și *rmtB*, la beta-lactam *bla*CTX-M-14, *bla*NDM-5, *bla*OXA-10; la colistin *mcr-1*; la fluorochinolona *aac* (6') -Ib-cr; la fosfomicina *fosA3*; la macrolidă, lincosamidă și streptogramin B *mph* (A); la rifampicină *ARR-6*; gena de rezistență la sulfonamide *sul1* și *sul2*; la tetraciclină rezistența genei *tet* (A); și gena de rezistență a trimetoprimului *dfrA14* și *dfrA27*. Mai mult, gena de rezistență la colistină *mcr-1* și β -lactamază extinsă (ESBL) gena *bla*CTX-M-14 au fost localizate pe aceeași plasmidă *Inc* HI2 de tip 211.718-bp în timp ce *bla*NDM-5 a fost prezent într-o plasmidă de 28,649 bp cu replici *IncR* și *IncX3*. Genomul EC129 a avut un grad de omologie ridicat (99,87%) în *rmtB*, care este asociat cu o rezistență ridicată la aminoglicozide. EC129 a înregistrat mutații cromozomiale pentru giraza ADN și genele topoizomerazei IV; S83L și D87N în *gyrA*, S80I în *parC* și S458A în *parE*, care sunt corelate cu rezistența la chinolone. Disponibilitatea acestei secvențe genomice poate facilita realizarea unor analize genomice comparative suplimentare printre tulpinile de *E. coli* și oferă informații despre fondul genetic al rezistenței la antibiotice.

O alta cercetare recentă efectuată pe un număr de peste 100 izolate de *E. Coli* (Hong și Lee, 2019) la nivelul cărora au fost evaluate genele de rezistență arată că opt izolate au fost identificate ca tulpini producătoare de ESBL și toate acestea aveau gene ESBL de tip TEM. Zece tulpini izolate de *E. coli* au fost rezistente la acidul nalidixic și au avut mutații raportate anterior în *gyrA*, *parC*, și *parE*, dar nu în *gyrB*. Genele *qnr* și *aac* (6') -Ib-cr nu au fost detectate în tulpinile izolate rezistente la acid nalidixic. Rezultatele acestui studiu au arătat diferite modele de rezistență antimicrobiene ale izolatelor de la copii și profesori. De exemplu, izolatele de la copii erau mai rezistente la cefalosporine, în timp ce izolatele de la profesori erau mai rezistente la chinolone. Acest model se poate datora diferitelor feluri de antimicrobiene prescrise copiilor și adulților. Rezistența la nalidixic acid, care nu mai este prescris în clinică, nu a fost observată la copii. Aceste rezultate susțin ipoteza că o utilizare mai mare a agenților antimicrobieni provoacă mai multă rezistență (McEwen și Fedorka, 2002; Chong și Lee, 2000).

În ceea ce privește genele de rezistență identificate la Stafilococ, o serie dintre acestea au fost validate și corelate cu virulența și epidemiologia izolatelor cu ajutorul tehnicii de

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

microarray (Spence et al., 2008). O listă inițială de 89 de gene țintă, inclusiv determinanți pentru rezistență la antibiotice, toxine, adevine, proteaze, și alte gene de virulență, a fost selectată pe baza semnificației acestor gene în boala clinică și epidemiologică. Toate izolatele au fost identificate corect ca *S. aureus* bazat pe prezența *cap*, *coa*, *cpn60*, *femA*, *nuc*, și a genelor *tpi*. Zece din zece izolate au fost identificate corect ca MSSA, iar 30 din 38 (78,9%) izolate au fost corect identificate ca MRSA. Cu toate acestea, au fost obținute pentru opt izolate MRSA rezultate fals-negative pentru gena *mecA*. Șase din cele opt izolate s-a confirmat prin PCR ca pozitive pentru gena *mecA*. Analiza rezultatelor microarray a relevat faptul că 36/84 gene țintă au fost prezente în toate cele 64 de izolate analizate, în timp ce 12 gene țintă au fost absente în toate izolatele examinate.

Bibliografie

1. Byun JY. 2012. Update of research on aminoglycoside ototoxicity. Korean J. Otorhinolaryngol-Head Neck Surg. 55: 1-7.
2. Chong Y, Lee K. 2000. Present situation of antimicrobial resistance in Korea. J. Infect. Chemother. 6: 189-195.
3. Düzgün Azer Özad, Okumuş Funda, Saral Ayşegül, Çiçek Ayşegül Çopur, Sedanur Cinemre, Determination of antibiotic resistance genes and virulence factors in *Escherichia coli* isolated from Turkish patients with urinary tract infection, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine, 2019 Vol.:52;
4. Harris PNA, Tambyah PA, Lye DC, et al; MERINO Trial Investigators and the Australasian Society for Infectious Disease Clinical Research Network (ASIDCRN). Effect of piperacillin-tazobactam vs meropenem on 30-day mortality for patients with *E coli* or *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection and ceftriaxone resistance: a randomized clinical trial. JAMA **2018**; 320:984–94.
5. Hall CW, Mah TF, Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41, 3: 276–301
6. Hong Hyunjin, Lee Yeonhee, Transfer of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* and Resistance Genes in a Child Care Center, 2019, J. Microbiol. Biotechnol. (2019), 29(3), 465–472.
7. Jacoby GA. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin. Infect. Dis. 41: S120-S126.
8. Jung Y , Hong H , Nam H , Lee Y. 2002. Isolation of norfloxacin resistant *Escherichia coli* from the Han-river and characterization of resistance mechanism. J. Microbiol. 40: 63-69.
9. McEwen SA, Fedorka-Cray PJ. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. Clin. Infect. Dis. 34: S93-S106.

Evaluarea, cuantificarea și caracterizarea markerilor de rezistență

- Merezeanu Nicoleta, Studiul fenotipic și molecular al factorilor de virulență de natură enzimatică la tulpini microbiene gram pozitive, gram negative și levuri de interes clinic, teză de doctorat, 2016, Universitatea Petrol-Gaze Ploiești
- Moon DC, Seol SY, Gurung M, Jin JS, Choi CH, Kim J, et al. 2010. Emergence of a new mutation and its accumulation in the topoisomerase IV gene confers high levels of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 35: 76-79.
- Nukui Y, Ayibieke A, Taniguchi M, Aiso Y, Shibuya Y, Sonobe K, Nakajima J, Kanehira S, Hadano Y, Tohda S, Koike R, Saito R, Whole-genome analysis of EC129, an NDM-5-, CTX-M-14-, OXA-10-, and *mcr-1*-co-producing *Escherichia coli* ST167 strain isolated from Japan, *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (2019)
- Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. 2006. Prevalence in the United States of *aac(6')*-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 3953-3955.
- Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hopper DC. 2006. *qnr* prevalence in cefazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2872-2874.
- Shin SH. 2008. Once daily dosing of aminoglycoside in children. *Korean J. Pediatr.* 51: 1038-1041.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS - Net) 2016. Stockholm : ECDC ; 2017.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS - Net) 2017. Stockholm : ECDC ; 2018.