



# Raport/Studiu

## Selectarea unor organisme - model optime de studiu *in vivo* a rezistenței

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

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

Colectiv de redacție:

Coordonatori: Prof. dr. Gabriela Tănasie, Prof. dr. Carmen Panaitescu

Membri: Doctorand Gaspar Cristina, Asist. Dr. Csilla Zambori, Dr. Ioan Huțu.

Data finalizării: 15.11.2020

### **Acknowledgements**

Activities under this work were carried out in the *Oncogen Research Center* - 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

**Modelele animale** au fost utilizate începând cu secolul al 19-lea pentru a studia transmiterea unor boli și patogeneza unor bacterii și produse bacteriene. Mai recent, modelele animale au fost des folosite pentru testarea eficacității agenților antibacterieni. Studii de patogeneză cum ar fi funcționarea unor receptori de atașare bacteriană sau implicarea diferitelor componente ale sistemului imun, ar fi fost de altfel imposibile în absența unor modele animale specifice.

Modelele animale sunt clasificate uzual (Knudsen și Frimodt-Moller, 2001) în modele de screening, modele mono sau poliparametrice, modele *ex vivo* și modele discriminatorii.

- **Modelele de screening** sunt utilizate în testarea primară a acțiunii antibacteriene a unor noi chimioterapice. Acestea ar trebui să fie rapid și simplu de efectuat și să aibe criterii de evaluare finală de tipul deces/supraviețuire sau prezența/absența simptomelor specifice la animalele din loturile experimentale. Asemenea experimente se desfășoară adesea sub forma unor studii doză-răspuns la șoareci outbred generând valori pentru doza protectivă, doza eficientă, PD50 și ED50.
- **Modelele mono și poliparametrice** sunt de obicei modele simple în care se măsoară de-a lungul timpului o serie de parametri cum ar fi numărul de celule bacteriene sau diverși parametri imunologici. Aceste modele sunt utilizate pentru a studia corelația dintre efect și diferite alte modificări apărute pe parcursul procesului infecțios, iar datele furnizate pot fi, într-o anumită măsură, extrapolate la om.
- **Modelele *ex vivo*** simulează problematica specială a infecțiilor la om, cum ar fi corpii străini, formarea camerelor subcutane sau cheagurile de fibrină.
- **Modelele discriminatorii** sunt cele mai sofisticate și încearcă să simuleze cât mai îndeaproape condițiile din corpul uman. Acestea se folosesc atât pentru testarea unor preparate antibacteriene cât și pentru studiul patogenezei infecțioase. Se utilizează animale nemodificate genetic sau animale care au suferit modificări chirurgicale sau implantarea unor corpi străini.

Infecțiile bacteriene și bacteriile rezistente la antibiotice au devenit o problemă în creștere în ultimul deceniu. Ca rezultat, Centrele pentru Controlul Bolilor prezic mai multe decese rezultate din microorganisme decât toate cazurile de cancer combinate până în 2050. În prezent, multe modele tradiționale utilizate pentru a studia infecțiile bacteriene nu reușesc să relice cu precizie mediul bacterian *in vivo*. Aceste modele nu reușesc adesea să încorporeze fluxul de fluid, indicii bio-mecanice, interacțiuni intercelulare, interacțiuni gazdă-bacterii și chiar simpla includere a unor proteine fiziologice relevante în mediile de cultură. Ca urmare a inadecvării acestor modele există adesea o slabă corelație între teste *in vitro* și *in vivo*, limitând potențialul terapeutic. Astfel, urgența de a stabili sisteme *in vitro*, *in vivo* și *ex vivo* să investigheze mecanismele care stau la baza infecțiilor bacteriene și să descopere terapii împotriva noii ere infecțiile este extrem de serioasă.

La ora actuală remarcăm dezvoltarea unui nou val de modele sofisticate *in vivo* concepute pentru a reprezenta mai bine fiziopatologic condițiile de la om. Acestea variază de la modele non-mamifere care permit screening-ul de mare viteză până la modele sofisticate de mamifere.

## 2. Date generale despre modelele animale

### Modelele non-mamifere

Pentru a depăși costurile ridicate și preocupările etice asociate cu modelele la mamifere, modele non-mamifere precum *Drosophila melanogaster* (musca fructelor) și *Danio rerio* (peștele zebură) sunt din ce în ce mai utilizat în studierea colonizării bacteriene și a mai ales a dezvoltării biofilmelor bacteriene în prezența sistemelor imune ale gazdei (Fu și colab., 2017). Aceste modele sunt avantajoase în comparație cu modelele de mamifere având cost redus, fiind ușor de întreținut și cu capacitatea de transfer ridicat. La ora actuală există modele non-mamifere importante pentru recunoașterea importanței comunicațiilor interspecifice în timpul dezvoltării biofilmelor, fiind chiar adaptate pentru a studia infecțiile polimicrobiene (Murray și colab., 2014). Constituie un avantaj faptul că genomul majorității acestor sisteme a fost deja complet secvențiat și pot fi create cu ușurință manipulări genetice, cum ar fi modelele knock-in și knock-out, pentru a studia baza genetică a dezvoltării biofilmului și a virulenței bacteriene. În ciuda acestor avantaje, gazdele non-mamifere au asemănări limitate cu oamenii și durata de viață limitată (și, prin urmare limitează durata experimentului), ceea ce poate avea un impact negativ asupra traductibilității lor clinice. În acest context, mamiferele sunt superioare deoarece oferă cel mai apropiat mediu la cea a gazdelor umane.

### Modelele mamifere

Au fost depuse eforturi extraordinare să se dezvolte modele de mamifere care să reflecte cu adevărat infecțiile cu biofilm la animale, variind de la rozătoare la specii mai mari, cum ar fi oile, porcii și chiar bovinele. În consecință, un număr mare de modele de infecții *in vivo* sunt disponibile acum pentru vizarea unei game largi de infecții specifice țesuturilor (moi și dure) precum și infecții asociate unor dispozitive implantabile.

Cu toate acestea, utilizarea modelelor *in vivo* de mamifere este restricționată în unele cazuri din considerente etice. Proiectele care implică utilizarea modelelor de mamifere trebuie mai întâi evaluate pe baza "regulii celor 3 R":

- modelele de animale mamifere ar trebui utilizate numai atunci când modelele *in vitro* sau modelele non-mamifere nu sunt capabile să abordeze o întrebare științifică specifică;
- experimentele *in vivo* trebuie astfel proiectate pentru:
  - o a minimiza numărul animalelor necesare obținerii informațiilor dorite;
  - o a atenua durerea sau suferința potențială pentru aceste animale ori de câte ori este posibil.

În plus, există diferențe de specie, în special în ceea ce privește răspunsurile lor imune, și există încă diferențe între modelele de mamifere *in vivo* și oameni, mai ales atunci când ne referim la modelele murine.

#### R. 2.6.1 Selectarea unor organisme - model optime de studiu *in vivo* a rezistentei

Comparativ cu majoritatea sistemelor *in vitro*, modelele *in vivo* pot suferi, de asemenea, de o variabilitate mare între experimente și animale, deoarece parametrii experimentali sunt adesea mai puțin controlați. În cele din urmă, modelele de mamifere sunt adesea limitate la o durată experimentală acută sau subcronică. Este cazul, de exemplu, unor modele de șobolan cu mărgele de alginat care imită infecțiile pulmonare cronice au durată de viață limitată de 1-3 săptămâni (Pedersen S. și colab., 1990). Deși această problemă ar putea fi parțial atenuată de expunerea repetată la bacterii, rezistența gazdei la re-infecție împiedică această opțiune. Deși multe modele animale integrează interacțiunea între sistemele imune ale gazdei și cele patogene de la bacterii, lipsa de cronicitate, pe lângă diferențele dintre specii, poate explica ratele ridicate de eșec în trecerea de la modele animale la clinică.

Capacitatea de a prezice eficiența *in vivo* a antibioticelor prin intermediul datelor microbiologice și farmacologice este unul dintre principalele obiective ale celor implicați în chimioterapia antibacteriană. În ultimul deceniu au fost făcute mai multe încercări de a determina corelațiile dintre activitățile *in vitro* și eficacitățile *in vivo* ale antibioticelor. Ca o consecință a multor studii clinice și pe animale, s-a acceptat că, pentru antibioticele beta lactamice, timpul în care nivelurile din ser depășesc concentrația minimă inhibitorie (CMI) este cel mai semnificativ parametru care determină eficacitatea lor *in vivo* (Soriano și colab., 1996). Cu toate acestea, este bine cunoscut faptul că CMI în cazul antibioticelor beta-lactamice pentru unele organisme pot varia în funcție de rezultatele lor metodice utilizate în mod determinat. Acest efect a fost recunoscut ca având implicații terapeutice forblactamice în tratarea infecțiilor cauzate de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* și *Haemophilus influenzae* (Tannock, 2005), dar și infecții cauzate de bacterii gram-negative enterice.

Pentru a demonstra **relevanța terapeutică a efectului de inoculum**, a fost dezvoltat un model experimental de infecție intraperitoneală cauzat de *E. Coli* la șoareci neutropenici și non-neutropenici (Poulsen LK, 1995). În acest model, animalele au fost tratate cu doze diferite dintr-o serie de antibiotice. Eficiențele medicamentelor a fost corelată cu datele farmacologice și CMI pentru a determina care parametri farmacodinamici au fost mai predictivi pentru succesul terapeutic. Au fost folosiți șoareci albinoși masculi

păstrați în cuști, cu 10 șoareci în fiecare cușcă, cu acces liber la alimente și apă. Din fiecare preparat testat au fost pregătite serii de diluții descrescânde decimal. După injectarea intraperitoneală animalele au fost observate timp de 7 zile și a fost cuantificat numărul de supraviețuitori pentru fiecare diluție. A existat și un lot de control, injectat doar cu adjuvant. Un grup de șase animale neinfectate au primit mucină singură pentru a se asigura că decesele nu au fost cauzate de efectele stresante ale acestui adjuvant. Inoculele au fost confirmate în fiecare experiment prin studii de diluare directă. După inducerea infecției s-au administrat subcutanat antibioticele în diferite doze, prima administrare la 1 h postinfecție respectiv a doua doză a fost administrată 6 ore mai târziu. Șoarecii au fost observați până la 48 de ore. Dozele de antibiotice au fost alese pentru a obține concentrații în ser similare cu cele obținute la oameni după administrarea dozelor terapeutice. După notarea rezultatelor terapeutice obținute cu o astfel de doză, a doua și a treia doză au fost calculate și alese pentru a obține rate de supraviețuire diferite prin creșterea sau scăderea dozei.

### **Modele *in vivo* în mamifere pentru dezvoltarea infecțiilor în biofilme**

Dovezi arată că o serie de modele animale *in vivo* produc biofilme foarte asemănătoare cu cele găsite în infecțiile umane, agregatele bacteriene fiind segregate de gazdă. Din punct de vedere istoric, procedurile utilizate pentru inspectarea dezvoltării biofilmului în aceste sisteme au necesitat recuperarea țesuturilor infectate sau dispozitive sofisticate pentru analiza. Acest lucru face să fie extrem de dificil de studiat etapele timpurii ale formării biofilmului și cinetica de dezvoltare a acestuia. Progresele recente ale tehnicilor de imagistică, care au devenit extrem de sensibile combinat cu capacitatea de a genera tulpini de bacterii bioluminescente au început să permită monitorizarea continuă a infecțiilor cu biofilm *in vivo*. În general, modelele *in vivo* sunt avantajoase pe măsură ce oferă oportunități de a răspunde la întrebări importante referitoare la patogeneză biofilmelor, ținând cont de importanța interacțiunilor gazdă-microb care sunt foarte greu de modelat în modelele *in vitro*. Prin urmare, acestea permit cea mai bună transferabilitate în comparație cu modelele *in vitro* fie ele chiar sofisticate de tipul "organ-on-chip".

Deși s-au imaginat modele ale biofilmelor într-o serie de specii animale, **modelele porcine** oferă un potențial mult mai bun decât modelele murine datorită asemănării lor anatomice, fiziologice și imunologice cu oamenii. De exemplu, țesutul dermic prezintă similarități de proprietăți și procese de vindecare a rănilor, cum ar fi reepitelizarea, cicatrizarea și granulara țesuturilor ceea ce face ca modelele porcine să fie preferabile pentru studiul infecțiilor cronice ale plăgilor. Vindecarea întârziată a rănilor a fost cu succes legată de dezvoltarea de tip biofilm a infecției plăgii într-un model porcine ([Shi D. și colab, 2019](#)). Pe de altă parte modelele porcine sunt mai scumpe și mai puțin accesibile decât modelele murine.

## **3. Modelele animale în rozătoare**

Cele mai multe studii în ceea ce privește bacteriile patogene și mecanismul transferului *in vivo* al genelor de rezistență, între acestea, au folosit ca model animal rozătoarele, în special **șoarecii**. Rozătoarele sunt preferate ca și model animal de studiu datorită prolificității ridicate, gestației de scurtă durată și a faptului că nu necesită condiții speciale de îngrijire și adăpostire, ceea ce implică și costuri reduse ([Schjorring S și Krogfelt KA, 2011](#)).

Tractul digestiv al acestora este similar cu cel al omului, din punct de vedere histologic, al secreției mucoase și al straturilor epiteliale. Studiile efectuate pe șoareci, au vizat mecanismele de colonizare bacteriană a intestinului, transferul orizontal al genelor de rezistență, expresia factorilor de virulență și distribuția spațială a speciilor bacteriene. Întrucât microbiomul intestinal acționează în mod fiziologic în scopul împiedicării colonizării intestinului de către alte microorganisme, în astfel de experimente au fost folosite preponderent animale libere de germeni și/sau animale care au fost supuse tratamentului cu antibiotice.

### **- Animale libere de germeni**

Aceste animale sunt inoculate doar cu cele două tulpini de interes (donorul și receptorul), creându-se astfel un model disociat, foarte predictibil și ușor de controlat. Reinocularea necontrolată, prin coprofagie, poate fi minimalizată prin cazarea în cuști individuale, cu pardoseală tip grătar. În lipsa florei intestinale autohtone, multiplicarea tulpinilor de interes se desfășoară până la concentrații foarte mari, de  $10^9$ - $10^{10}$  ufc (unități formatoare de colonii)/gram de fecale, ceea ce crește posibilitatea contactului dintre celulele bacteriene și astfel, a transferului orizontal de material genetic (Ducluzeau, 1984). Cu toate acestea, modelul disociat nu este foarte agreat, întrucât s-a demonstrat că aceste animale sunt deficiente din punct de vedere imunologic, nodulii limfatici, splina și plăcile Peyer fiind relativ inactiv.

### **- Animale libere de germeni inoculate cu floră intestinală umană**

S-a demonstrat că în urma inoculării, în unele cazuri, s-au produs modificări în rândul speciilor dominante din cadrul populației microbiene (Kibe și colab., 2005). Aceste modificări s-ar putea datora diferențelor genetice dintre oameni și șoareci, dar și particularităților alimentare, întrucât nutrienții consumați pot stimula multiplicarea anumitor specii bacteriene, în timp ce altele sunt inhibate. Astfel, specia care predomină în inoculul de origine umană, s-ar putea să nu fie cea care și colonizează cu succes intestinul rozătoarelor (Hirayama, 1999).

### **- Animale tratate cu antibiotice**

La astfel de modele, funcția de apărare a microorganismelor intestinale este alterată, prin administrarea orală (în apa de băut) a antibioticului. Anumite specii sunt eliminate, permițând astfel tulpinilor de interes să colonizeze intestinul. Antibiotice precum ampicilina, clindamicina, kanamicina, metronidazolul și streptomina, administrate oral, s-au dovedit utile în crearea unor astfel de modele. Metronidazolul a fost cel mai puțin eficient, în timp ce clindamicina a avut efect asupra bacteriilor anaerobe, kanamicina și streptomina, asupra celor facultativ anaerobe, iar ampicilina a avut un spectru mai larg de acțiune. Hentges și colaboratorii afirmă că streptomina elimină majoritatea enterobacteriaceelor, în timp ce anaerobii și populația totală de bacterii aerobe, nu sunt afectate. Streptomina determină creșterea pH-ului intestinal și a vâscozității mucusului, crescând astfel susceptibilitatea gazdei la infecțiile cu bacterii patogene (Poulsen și colab., 1995).

Toate aceste modele prezintă avantajul că diferențele în compoziția florei bacteriene, în cadrul loturilor de animale, sunt foarte mici, datorită standardelor de adăpostire și hrănire, spre deosebire de oameni, la care variațiile individuale sunt foarte mari (Eckburg și colab., 2005). Studiile *in vitro* și *in vivo* privind transferul orizontal al genelor de rezistență nu sunt comparabile și nu oferă întotdeauna aceleași rezultate, la fel cum nici diferitele tipuri de modele *in vivo*, nu pot fi comparate. Modelul disociat (șoarecii germ-free), comparativ cu folosirea șoarecilor tratați cu antibiotice, care totuși dețin o barieră intestinală complexă, este considerat prea simplist, întrucât nu surprinde totalitatea factorilor implicați în transferul orizontal al genelor de rezistență, în mediul intestinal. În cadrul modelului disociat, se poate observa doar faptul că transferul are loc, dată fiind rata de multiplicare intensă a donatorului și receptorului, în lipsa florei concurente.

#### R. 2.6.1 Selectarea unor organisme - model optime de studiu *in vivo* a rezistenței

Comparând cele două modele, șoarecii germ-free și cei convenționali, s-au constatat diferențe de ordin biochimic, fiziologic și imunologic (Tannock, 2005), iar influența acestor factori asupra interacțiunii dintre celulele bacteriene și implicit, asupra transferului de material genetic, nu este pe deplin elucidată. Folosirea șoarecilor tratați cu antibiotice, cu bariera intestinală și sistemul imunitar nealterate, prezintă avantajul de a reproduce mai fidel condițiile din tractul intestinal al omului. Acest model are și unele dezavantaje, între care acelea că transferul poate avea loc și către alte specii bacteriene din intestin, în afara receptorului care se investighează sau că numărul bacteriilor transconjugate ar putea să nu atingă limita de detecție. Astfel, trebuie fixat clar obiectivul studiului – se urmărește doar evidențierea existenței transferului de material genetic între tulpinile vizate sau se dorește și cuantificarea tulpinilor transconjugate și răspândirea lor ulterioară.

### 3.1. Modele murine

#### 1. Modele murine de infecție cutanată

Modelele pe șoareci mai frecvent utilizate pentru testarea tratamentului local al infecțiilor cutanate sunt modelul de arsură cutanată și modelul de sutură a unei leziuni tegumentare. Bacteriile sunt fie introduse în piele prin injecție într-o zonă lezată, ca în modelul de arsură, fie un fir de sutură de nailon impregnat de bacterie este implantat într-o plagă artificială (o incizie a bisturiului prin straturi de piele), care este apoi cusută sau capsată. Zona de infecție în aceste modele este de obicei localizată dorsal pentru a împiedica animalul să atingă locul leziunii. Frecvent, produsele antibacteriene dizolvate în cremă sau unguent sunt aplicate pe rană pe parcursul experimentării. La finalul experimentului animalul este sacrificat iar zona infectată a pielii este excizată și se evaluează numărul de bacterii din probă. Aceste modele de infecție tegumentară topică au unele dezavantaje în raport cu infecțiile generale. Modelul de arsură tegumentară a fost dezvoltat pentru studierea problemelor legate de infecții la pacienții arși nu este aplicabil din punct de vedere etic (din perspectiva bunăstării animalelor) pentru studiul infecțiilor localizate ale pielii, cum ar fi impetigo andersipela.

Modelul de sutură a unei leziuni tegumentare implică tăierea în straturile mai adânci ale pielii și, prin urmare, nu este relevant din punct de vedere clinic pentru condițiile pur topice. Kugelberg și colaboratorii descriu în 2005 un nou model pentru infecții superficiale, modelul cu decupare în bandă. În acest model, este creată o poartă de intrare pentru agentul infecțios prin decuparea blănii și a epidermei într-o regiune dorsală reslizată prin aplicații succesive ale unui bandaj adeziv. În dezvoltarea acestui model, s-au folosit *S. aureus* și *S. pyogenes* ca agenți infecțioși. Ambele bacterii sunt populații endemice la om și sunt considerate bacterii oportuniste, cauzând de obicei infecții la copii, pacienți imunocompromiși sau pacienți care suferă intervenții chirurgicale. *S. aureus* poate fi izolat din exudat faringian sau nazal la aproximativ o treime din populație și se găsește, de asemenea, în flora cutanată, împreună cu specii înrudite, cum ar fi *Staphylococcus epidermidis*. Infecții topice datorate *S. aureus* și *S. pyogenes* sunt relevante din punct de vedere clinic și provoacă o varietate de simptome grave, inclusiv sindromul șocului toxic și leziuni cutanate care pot evolua către sepsis și șoc sistemic dacă sunt lăsate netratate. Aceste specii bacteriene sunt, de asemenea, cele mai frecvente cauze ale impetigo la om. Antibioticul utilizat pentru a testa modelul a fost 2% acid fusidic în unguent (Kugelberg E. și colab., 2005).



## R. 2.6.1 Selectarea unor organisme - model optime de studiu *in vivo* a rezistenței

---

Modelul este simplu și reproductibil și poate fi utilizat pentru evaluarea tratamentelor cu noi variante chimioterapeutice pentru infecții superficiale ale pielii. Modelul poate fi, de asemenea, avantajos pentru studiile mecanismelor implicate în infecțiile superficiale ale pielii.

### **2. Model murin de de infecție a coapsei.**

Inițial a fost indusă animalelor neutropenie prin injectarea de ciclofosamidă în zilele 0 și respectiv 3 și infecția a fost indusă în ziua 4 ([Dartois și colab., 2005](#)). Coapsele stângi ale șoarecilor au fost injectate cu *E. coli* 25922 (aproximativ  $5 \times 10^5$  UFC / coapsă). Grupul experimental a fost tratat apoi imediat cu preparatul antibacterian prin injectare subcutanată. Șoarecii din grupul de control au fost lăsași netratași. La 16 h postinoculare, șoarecii au fost sacrificați prin asfixiere cu CO<sub>2</sub>, iar coapsele au fost recoltate. După cântărire, coapsele s-au omogenizat cu un omogenizator microelectric în tampon salin. Pentru a determina încărcătura bacteriană în coapse, omogenatul a fost diluat în serie (diluții de 10 ori) în bulion LB și alicoturi din fiecare diluție au fost plasate pe plăci de agar LB care au fost incubate 18 ore la 37 ° C, iar apoi au fost numărate coloniile bacteriene. ([Sheng-An și colab., 2012](#)).

### **3. Model murin de infecție pulmonară cu Stafilococ MRSA**

Modelul folosește șoareci BALB/c, la care în prima etapă s-a indus neutropenie prin tratare cu ciclofosamidă administrată intraperitoneal cu 4 și 2 zile înainte la infecție. Fiecare animal a fost infectat prin plasarea unei cantități de inocul bacterian conținând aproximativ  $2,7 \times 10^6$  CFU de MRSA pe vârful nării. Animalelor li s-a permis să inhaleze inoculul ca niște picături mici și au fost apoi plasate înapoi în cuștile lor pentru recuperare și observare. Preparatul antibacterian a fost administrat pe cale intravenoasă la grupurile prealocate. Pe aceeași cale au fost administrați doar excipienții preparatului antibacterian, cu un volum similar cu grupul de studiu. A existat și un grup de control pozitiv căruia i s-a administrat antibiotic standard i.v.. Șoarecii au fost eutanasiați la 48 h postinfecție și plămânii lor colectați pentru numărarea bacteriilor inseminate ([Mahajan și colab., 2013](#)).

### **4. Modelul murin de osteomielite acută și cronică**

Modelul inițial ([Funao și colab., 2012](#)) s-a bazat pe utilizarea unui implant femural și monitorizarea ulterioară a infecției printr-un sistem de bioluminescență. În ultimii ani, șoarecii au reprezentat o frecventă alegere pentru a stabili modele care utilizează imagini bioluminescente. Având în vedere cunoștințele detaliate privind funcția și reglarea sistemului lor imunitar, alegerea utilizării unui model de șoarece nu este surprinzătoare. Avantaje reprezintă de asemenea dimensiunile reduse, ușurința de manipulare și costul general mai redus și devine evident de ce modelele de șoareci devin rapid un model utilizat pentru studiul osteomielitei. În timp ce dimensiunea șoarecilor oferă multe avantaje, este demn de remarcat faptul că dimensiunea mai mică face ca schemele de lucru în două etape și procedurile multiple la un singur animal să fie mai dificile. Cu toate acestea, odată cu apariția imaginii bioluminescente, modelele de șoareci abundă.

#### R. 2.6.1 Selectarea unor organisme - model optime de studiu *in vivo* a rezistentei

Deoarece imagistica bioluminiscentă permite evaluarea în timp real a gradului de infecție la un singur animal, longitudinal, fără a sacrifica animalul, numărul de animale necesare într-un experiment este redus; și, mai important, cercetătorii sunt capabili să examineze răspunsul bacteriilor la o intervenție la același animal în timpul procedurilor experimentale, adică nu trebuie să se compare gradul de infecție la șoarecele "a" la momentul "t" cu gradul de infecție la șoarecele "b" la momentul "t + 1." În consecință, fiecare animal poate servi drept control propriu, iar variabilitatea experimentală este foarte redusă (Reizner și colab., 2005). În ceea ce privește modelele experimentale folosite, nu există referințe despre modele cu fixare externă, doar modele cu fixare internă respectiv modelul periprostetic.

### 5. Model murin de infecție oculară

Șoarecii femele A/J s-au acomodată cu mediul înconjurător timp de o săptămână înainte de infecție. Pentru toate vaccinările, examinările, tratamentele și colecțiile de probe, șoarecii au fost aneșteziați cu izofluran. Ochii dreپți au fost examinați microscopic înainte de infecție pentru defecte ale corneei și cei cu defecte au fost eliminați din studiu. Șoarecii rămași au fost apoi repartizați aleatoriu în grupuri. Sub aneștezie, s-au făcut șase până la zece zgârieturi care formează un model de grilă încrucișată pe corneea folosind un ac cu ecartament 30 având grijă să nu se puncționeze corneea. Un inocul de de *S. aureus* ( $7,5 \times 10^9$  CFU) a fost aplicat pe corneea scarificată, iar pleoapele au fost închise manual de două ori peste corneea.

Pentru analgezie, șoarecii au fost injectați subcutanat cu Buprenorfină cu eliberare prelungită chiar înainte de scarificarea corneei. Pentru tratament a fost aplicat antibioticul în picături pe corneea ochiului infectat, începând cu 4 ore după infecție la intervale de 2 ore pentru un total de 5 tratamente pe zi timp de 4 zile. Au fost colectate lichidele de spălătură oculară și au fost determinate numărul de celule bacteriene viabile din acestea. În zilele 1, 2 și 3 post-infecție, au fost colectate probe de film lacrimal și s-a determinat numărul de celule viabile *S. aureus*. Corneele infectate au fost spălate cu L de PBS și lichidul de spălătură a fost menținut pe gheață până când probele au fost diluate în serie și răspândite pe plăci de agar incubate la 37 ° C. După o perioadă de incubare de 24 de ore au fost numărate coloniile formate pe placă. Evaluarea severității bolii: în zilele 1 și 3 postinfecție, severitatea bolii oculare a fost notată pe baza a trei parametri ai bolii - blefarită, neovascularizație și keratite stromale (Berdugo și colab., 2012).

Pe scurt, blefarita sau umflarea pleoapei a fost marcată: 1+, pleoape umflate; 2+, pleoape umflate, cu unele cruste; 3+, ochiul umflat închis cu cruste severe; și 4+, ochiul complet umflat și înghesuit. Neovascularizarea, creșterea vaselor de sânge în corneea, a fost marcată: 1+, <25% din corneea implicată; 2+, 25% până la 50% implicarea corneei; și 3+,> 50% implicarea corneei. Keratita stromală a fost marcată: 1+, tulbure, unele detalii ale irisului vizibile; 2+, detaliu iris ascuns; 3+, corneea total opacă; și 4+, perforația corneei. Toate animalele au fost eutanasiate în ziua 3 după infecție. Globii oculari enucleați au fost fixați în parafină secționați, colorați hematoxilină-eozină și examinați la microscop (Broekema și colab., 2016)

## 6. Modele murine de rezistență la peptidele antimicrobiene (AMP).

Peptidele antimicrobiene sunt peptide mici, amfipatice, care atacă invadatorii microbieni ai gazdelor eucariote. Sunt considerate „antibiotice gazdă” deoarece sunt componente critice ale răspunsului înăscut al gazdei la infecție. Mai mult, pentru că pot exercita acțiune antimicrobiană directă și / sau indirectă, au fost de asemenea denumite peptide de apărare a gazdei datorită capacității lor de a lega imunitatea înăscută la sistemele imune adaptive. Eficacitatea acțiunii AMP *in vivo* cuplată cu capacitatea microbilor de a rezista la acțiunea lor poate influența nivelul populației microbiene înainte ca răspunsurile imune adaptive să devină disponibile. Pentru a supraviețui în gazdele eucariote, agenții patogeni bacterieni au evoluat dobândind mecanisme pentru a depăși activitatea antimicrobiană a AMP-urilor. Bacteriile folosesc adesea sisteme similare mecanismelor identificate pentru rezistență la antibiotice clasice. Studii *in vitro* utilizând o varietate de teste de sensibilitate la AMP și instrumentele genetice bacteriene au elucidat o serie din mecanismele folosite de bacterii pentru a contracara activitatea AMP (Bauer și Shafer, 2015).

Exemple de sisteme de rezistență bacteriană la AMP includ degradarea, modificarea țintei, importul scăzut și transportul dependent de energie. O înțelegere deplină a modului în care bacteriile depășesc atacul mediat de AMP în timpul infecției necesită o combinație de studii *in vitro* și *in vivo*. Cel mai răspândit animal folosit pentru a studia mecanismele de rezistență AMP *in vivo* a fost șoarecele. Un avantaj al utilizării șoarecilor e reprezentat de posibilitatea de a utiliza diferite căi de inoculare pentru a examina diferite stadii ale bolii. Cel mai utilizat sistem *in vivo* pentru studierea mecanismelor bacteriene de rezistență la AMP au fost infecțiile murine cu *S. Typhimurium*, care provoacă gastroenterită la om și o boală asemănătoare febrei tifoide la șoareci. Acest agent patogen poate fi utilizat la șoareci pentru a modela febra tifoidă, în care *S. Typhimurium* este ingerat și colonizează intestinul subțire, inclusiv plăcile Peyer, din care agentul infecțios traversează bariera epitelială a intestinului, este preluată de macrofage și se diseminează către sistemul reticuloendotelial. Bacteriile locuiesc și se înmulțesc în ganglionii limfatici mezenterici și în ficat și splină. Un alt avantaj al modelelor de șoarece este abilitatea de a utiliza gazdă definită genetic. În ceea ce privește căile de inoculare, genetica gazdei poate fi modificată pentru a examina diferite stadii ale bolii. De exemplu, multe strain-uri de șoareci utilizate la modelele de infecție cu *S. Typhimurium* poartă o mutație (Nramp1) care face șoarecii extrem de sensibili la infecție; prin urmare, acești șoareci cedează de obicei la infecție înainte să se poată dezvolta răspunsuri imune adaptive. În schimb, la șoarecii cu o genă Nramp1 de tip sălbatic se poate reproduce infecția persistentă cu *S. Typhimurium*, dar cu simptomatologie minimă sau absentă (Bordsky și colab., 2005).

Disponibilitatea șoarecilor knockout care nu au gene specifice este un instrument de o valoare neprețuită pentru înțelegerea relației gazdă-agent patogen. Sunt disponibile două tulpini de șoarece knockout care afectează repertoriul de AMP-uri murine. Șoarecii CRAMP<sup>-/-</sup> sunt hipersensibili la mai multe infecții bacteriene, permițând inclusiv obținerea unui model subcutanat de infecție cu antrax și infecții streptococice ale pielii și țesuturilor moi (Nizet, 2001). Un alt model utilizat este al șoarecilor MMP7<sup>-/-</sup> care nu pot activa criptdinele intracelulare; în orice caz, criptdinele secretate în lumenul intestinal sunt activate de alte proteaze luminale. Șoarecii MMP7<sup>-/-</sup> sunt colonizați într-o măsură mai mare de *E. coli* și sunt mai susceptibile la efectele letale ale infecției cu *S. Typhimurium*.

#### R. 2.6.1 Selectarea unor organisme - model optime de studiu *in vivo* a rezistentei

Un alt instrument disponibil pentru studii *in vivo* la șoareci sunt animale transgenice care exprimă gene umane. De exemplu, șoarecii transgenici care exprimă  $\alpha$ -defensina HD-5 umană au ajutat la înțelegerea importanței acesteia în combaterea infecției cu *S. Typhimurium* și contribuțiile mecanismelor de rezistență la progresia bolii [24]. Cu siguranță, în viitor vor fi dezvoltate tulpini suplimentare de șoareci pentru testarea factorilor care țin atât de bacterii cât și de gazdă care modulează eficacitatea mecanismelor de apărare înăscute, care includ și AMP-uri (Salzman și colab., 2003).

### 3.2. Modele la șobolan

#### • Modele de infecție a țesutului osos

Utilizarea șobolanilor pentru realizarea unor modele de osteomielită prezintă o serie de argumente pro și contra. Oasele de șobolan au o dimensiune suficientă pentru a reproduce modelele de fractură și pentru a efectua foraje și fixări, precum și pentru manevre intramedulare. Canalul medular este suficient de mare pentru a implanta obiecte străine și, în ciuda dimensiunilor mici, fixarea șurubului și a plăcii a fost bine documentată (Holt și colab., 2011). Ca alternativă la animalele mai mari, cum ar fi iepurele sau oaia, șobolanii sunt ieftini, ușor de aprovizionat și sunt ușor de adăpostit și întreținut pentru perioade prelungite de timp în timpul experimentului. Șobolanii necesită doze de inoculare cuprinse între  $10^3$ - $10^6$  CFU, cu mai multe modele de fracturi deschise raportând doze de inoculare de până la  $10^2$  CFU (Reizner și colab., 2015) La fel ca în cazul modelelor pe iepure și aici sunt descrise o serie de modele cum ar fi: modelul bazat pe fixatoare interne, modelul bazat pe fixatoare externe, modelul periprostetic, modelul fracturii deschise, modelul hematogen.

### 3.3. Modele la iepure

#### • Modele de infecție a țesutului osos

Iepurii sunt utilizați într-o mare parte din experimentele descrise în literatură, mai ales pentru modele de infecție a țesutului osos. Ca animal de dimensiuni intermediare, iepurele posedă o versatilitate distinctă și este relativ ușor de manipulat și întreținut. În plus, iepurii sunt relativ ieftini. În timp ce dimensiunea lor se pretează la o întreținere ușoară, oasele lor rămân suficient de mari pentru a putea realiza fixarea plăcilor și a șuruburilor. Canalul medular atât al tibiei cât și al femurului poate găzdui cu ușurință o structură modificată și este suficient de mare pentru a adăuga implanturi, pe care un investigator le poate îndepărta și înlocui într-un mod reproductibil în mai multe etape. În mod obișnuit, în studiile efectuate pe iepure sunt necesare doze mai mari atunci când se acoperă manual implanturile cu bacterii, spre deosebire de inocularea directă, pentru a iniția cu succes o infecție. În literatură sunt descrise o serie de modele de infecție osteomielitică la iepure folosind tulpini de stafilococ multirezistent. Acestea includ (Reizner și colab., 2015):

- Modelul de fixare internă a tibiei descris de Schemen și modificat de Norden, care utilizează un agent sclerozant (moruat de sodiu) pentru a produce osteomielita

#### R. 2.6.1 Selectarea unor organisme - model optime de studiu *in vivo* a rezistenței

- cronică a tibiei. Îmbunătățirile modelului urmăresc înlăturarea agentului sclerosant a cărui utilizare este controversată.
- Modelul fracturii deschise, se adresează de asemenea osului tibial, a fost descris inițial de Ashhurst și a suferit o serie de îmbunătățiri în ceea ce privește sistemele de fixare. Este discutată doza minimă necesară de inocul pentru a produce o infecție consistentă, aceasta fiind mult superioară față de modelele de infecție a unor țesuturi moi, cum ar fi peritonita.
  - Modelul periprostetic, implică iepurele ca cel mai mic animal la care este aplicat acesta. Sunt folosite o serie de materiale protetice, cel mai frecvent silicon, combinat sau nu cu elastomeri și cu adaosuri de cement în diferite proporții.
  - Modelul hematogen, cu afectarea traumatică a epifizei tibiale a fost descris inițial de Whalen și apoi de Morrissy și Haynes. Modelul are o slabă rată de multiplicare a infecției și implică un nivel crescut de mortalitate a animalelor. Aplicarea unei concentrații mari de inocul induce o mortalitate aproape de 100% a animalelor datorită șocului septic, iar reducerea concentrației inoculului nu produce în mod sistematic infecție. Acest lucru întărește dificultatea de a injecta cea mai mică sarcină pentru a asigura infecția fără a copleși sistemul imunitar al animalelor.

## 4. Modelele animale în rumegătoare

### 4.1. Modele la bovine

Un studiu efectuat de Kester și colaboratorii în 2015 a folosit un **model experimental de mastită la bovine**. Au fost folosite vaci din rasa Holstein cu lactație târzie provenite din același adăpost. Animalele au fost grupate câte două în perechi. O vacă din fiecare pereche a fost experimental infectată în glanda mamară frontală dreaptă cu o tulpină de Streptococ. Vaca rămasă din fiecare pereche a fost considerată control. S-au efectuat tratamentul și creșterea vacilor într-un mod care să evite disconfortul inutil al animalelor prin utilizarea unor proceduri experimentale și de management adecvate. Agentul infecțios a fost administrat pentru toate animalele din lotul infectat în aceeași zi, la 3 ore după muls, dimineața, folosind bacterii preparate din același inocul provocator.

Tulpina bacteriană utilizată a fost o tulpină comercială inițial izolat din mastita clinică și care a fost cultivată în prealabil în bulion la 37 ° C pentru 18 ore într-un incubator cu agitare. Bacteriile au fost apoi centrifugate și pelletul a fost diluat în PBS steril la concentrația necesară. La 4 zile după administrarea inoculului folosind o canulă sterilă au apărut primele semne clinice de mastită. Au fost recoltate probe biologice în ziua 4, 5 și 6 iar apoi s-a instituit tratamentul antibiotic corespunzător. Probele de lapte recoltate (înainte și în timpul procedurii) au fost însămânțate pe medii de cultură specifice folosind diluții seriate (Kester și coab., 2015). În paralel s-a evaluat și cantitatea și calitatea laptelui recoltat, precum și activitatea fizică a animalelor.

## Bibliografie

1. Knudsen JD, Frimodt-Moller N. (2001) Animal models in bacteriology, in Animal testing in infectiology, Karger ed., 2001, vol. 9: 1-14
2. J.L. Murray, J.L. Connell, A. Stacy, K.H. Turner, M. Whiteley, (2014) Mechanisms of synergy in polymicrobial infections, J. Microbiol. 52 188–199,
3. Fu J, Yang D, Jin M, Liu W, Zhao X, Li C, Zhao T, Wang J, Gao Z, Shen Z, Qiu Z, Li JW. (2017) Aquatic animals promote antibiotic resistance gene dissemination in water via conjugation: Role of different regions within the zebra fish intestinal tract, and impact on fish intestinal microbiota. Mol Ecol. 26(19):5318-5333.
4. S.S. Pedersen, G.H. Shand, B.L. Hansen, G.N. Hansen (1990) Induction of experimental chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection with P. aeruginosa entrapped in alginate microspheres, APMIS 98: 203–211
5. Schjørring S, Krogfelt KA. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. Int J Microbiol. 2011:312956.
6. Ducluzeau R. Microbial Interactions in the digestive tract. In: Coates M, Gustafsson BE, editors. The Germ-Free Animal in Biomedical Research. Laboratory Animal; 1984;9:141–154.
7. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN et al. Microbiology: diversity of the human intestinal microbial flora. Science. 2005;308(5728):1635–1638.
8. Freter R. Mechanisms that control the microflora in the large intestine. In: Hentges DJ, editor. Human Intestinal Microflora in Health and Disease. 1983:33–54.
9. Gordon HA, Pesti L. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. Bacteriological Reviews. 1971;35(4):390–429.
10. Hentges DJ. The Influence of streptomycin on colonization resistance in mice. Microecology and Therapy. 1984;14:53–62.
11. Hentges DJ, Stein AJ, Casey SW, Que JU. Protective role of intestinal flora against infection with Pseudomonas aeruginosa in mice: influence of antibiotics on colonization resistance. Infection and Immunity. 1985;47(1):118–122.
12. Hirayama K. Ex-germfree mice harboring intestinal microbiota derived from other animal species as an experimental model for ecology and metabolism of intestinal bacteria. Experimental Animals. 1999;48(4):219–227.
13. Kibe R, Sakamoto M, Yokota H et al. Movement and fixation of intestinal microbiota after administration of human feces to germfree mice. Applied and Environmental Microbiology. 2005;71(6):3171–3178.
14. Pollard M, Sharon N. Responses of the Peyer's patches in germ-free mice to antigenic stimulation. Infection and Immunity. 1970; 2(1):96–100.
15. Poulsen LK, Licht TR, Rang C, Krogfelt KA, Molin S. Physiological state of Escherichia coli BJ4 growing in the large intestines of streptomycin-treated mice. Journal of Bacteriology. 1995;177(20):5840–5845.
16. Que JU, Hentges DJ. Effect of streptomycin administration on colonization resistance to Salmonella typhimurium in mice. Infection and Immunity. 1985;48(1):169–174.
17. Schackelford CC, Elwell MR. Small and large intestine, and mesentery. In: Maronpot RR, editor. Pathology of the Mouse. St. Louis, Mo, USA: Cache River Press; 1999:81-118. 47
18. Tannock GW. Microbiota of mucosal surfaces in the gut of monogastric animals. In: Nataro JP, Cohen PS, Mobley HLT, Weiser JN, editors. Colonization of Mucosal Surfaces. Washington, DC, USA: 163–178, ASM Press. 2005:163-178.
19. Reizner W, Hunter JG, O'Malley NT, Southgate RD, Schwarz EM, Kates SL. (2015). A systematic review of animal models for Staphylococcus aureus osteomyelitis. Eur Cell Mater. ; 27: 196–212.

### R. 2.6.1 Selectarea unor organisme - model optime de studiu *in vivo* a rezistentei

20. Funao H, Ishii K, Nagai S, Sasaki A, Hoshikawa T, Aizawa M, Okada Y, Chiba K, Koyasu S, Toyama Y, Matsumoto M. Establishment of a real-time, quantitative, and reproducible mouse model of Staphylococcus osteomyelitis using bioluminescence imaging. *Infect Immun.* 2012; 80:733–741.
21. Kugelberg E., Nostrom T., Petersen TK., Duvold T., Andersson DI., Hughes D. (2005) Establishment of a Superficial Skin Infection Model in Mice by Using *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 3435–3441
22. Soriano F, Garcia-Corbeira P, Ponte C, Fernandez-Roblas R, Gadea I. (1996). Correlation of Pharmacodynamic Parameters of Fiveβ-Lactam Antibiotics with Therapeutic Efficacies in an Animal Model. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 40, 12: 2686–2690
23. I.E. Brodsky, N. Ghoris, S. Falkow, D. Monack (2005) Mig-14 is an inner membrane associated protein that promotes *Salmonella typhimurium* resistance to CRAMP, survival within activated macrophages and persistent infection, *Mol. Microbiol.* 55: 954–972.
24. V. Nizet, T. Ohtake, X. Lauth, J. Trowbridge, J. Rudisill, R.A. Dorschner, V. Pestonjamas, J. Piraino, K. Huttner, R.L. Gallo (2001) Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection, *Nature* 414: 454–457.
25. Bauer ME, Shafer WM (2015) On the *in vivo* significance of bacterial resistance to antimicrobial peptides, *Biochimica et Biophysica Acta* 1848: 3101–3111
26. N.H. Salzman, D. Ghosh, K.M. Huttner, Y. Paterson, C.L. Bevins (2003) Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin, *Nature* 422: 522–526.
27. Dartois V, et al. (2005). Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3302–3310.
28. Sheng-An l, Wen-Hui L., Yun Z. (2012) Efficacy of OH-CATH30 and Its Analogs against Drug-Resistant Bacteria *In Vitro* and in Mouse Models, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, 6: 3309–3317
29. Mahajan G, B. Thomas, R. Parab, ZE. Patel, S. Kuldharan, V. Yemparala, PD Mishra, P. Ranadive, L D'Souza, K Pari, H. Sivaramkrishnana (2013). *In Vitro* and *In Vivo* Activities of Antibiotic PM181104. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 11: 5315–5319
30. Berdugo M, Larsen IV, Abadie C, Deloche C, Kowalczyk L, et al. (2012) Ocular distribution, spectrum of activity, and *in vivo* viral neutralization of a fully humanized anti-herpes simplex virus IgG Fab fragment following topical application. *Antimicrobial Agents Chemother.*; 56:1390–1402.
31. Broekema NM, Larsen IV, Naruzawa ES, Filutowicz M, Kolb AW, Teixeira LBC, Brandt CR. (2016) A Mouse Model of Multi-Drug Resistant *Staphylococcus aureus*-induced Ocular Disease. *Ocul Biol.* 2016 November ; 4(2): 1-11
32. Shi D., Mi G., Wang M, Webster TJ. (2019) *In vitro* and *ex vivo* systems at the forefront of infection modeling and drug discovery. *Biomaterials* 198 : 228–249
33. Holt J, Hertzberg B, Weinhold P, Storm W, Schoenfisch M, Dahners L. Decreasing bacterial colonization of external fixation pins through nitric oxide release coatings. *J Orthop Trauma.* 2011; 25:432–437.
34. Kester HJ, Sorter DE, Hogan JS. (2015) Activity and milk compositional changes following experimentally induced *Streptococcus uberis* bovine mastitis, *J. Dairy Sci.* 98: 999-1004