

Raport/Studiu

Obținerea unor modele animale ale infecțiilor studiate

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 Tănăsie, Prof. dr. Carmen Panaitescu

Membri: Doctorand Gaspar Cristina, Conf. Dr. Carmen Tatu, Conf. 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. Modelul *gastrointestinal* murin utilizat în studierea transferului orizontal al genelor de rezistență

Răspândirea fenomenului de rezistență la antibiotice în populațiile bacteriene și apariția germenilor multiplu-rezistenți (MDR), limitează drastic opțiunile terapeutice în bolile infecțioase, constituind astfel o amenințare majoră pentru sănătatea oamenilor și animalelor.

Principalul mecanism care stă la baza acestui fenomen este transferul orizontal al genelor de rezistență, între bacterii (Stecher B., et al., 2012). Transferul genelor, precum și transferul factorilor de virulență, se realizează în special prin intermediul plasmidelor conjugative (Johnson T.J., et al., 2009; Norman A., et al., 2008).

Transferul plasmidic al genelor de rezistență a fost îndelung studiat *in vitro*, folosind sisteme nu foarte complexe (Sørensen S.J., et al., 2005), iar o serie de rapoarte atestă evoluția acestui fenomen în intestinul mamiferelor (Licht T.R., et al., 2005). Comparativ, puține studii au evaluat factorii care pot influența transferul plasmidic într-un mediu mai complex, cum este tractul gastro-intestinal, atestat ca rezervor al genelor de rezistență (Penders J., et al., 2013; Rolain J.M., 2013).

Cele mai multe studii în ceea ce privește mecanismele de transfer *in vivo* a genelor de rezistență, între bacterii, au folosit **modelul murin gastro-intestinal**. Șoarecii sunt preferați 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 (Schjørring S. et al., 2011). Tractul GI al acestora este similar cu cel al omului, din punct de vedere histologic, al secreției mucoase și al straturilor epiteliale (Schackelford C.C. et al., 1999).

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 sau animale care au fost supuse tratamentului cu antibiotice (Schjørring S. et al., 2011).

Comparând cele două modele, șoarecii germ-free și cei convenționali, expuși tratamentului cu antibiotice, s-au constatat diferențe de ordin biochimic, fiziologic și imunologic, iar influența acestor factori asupra interacțiunii dintre celulele bacteriene și implicit, asupra transferului de material genetic, a rămas multă vreme neelucidată (Tannock G.W., 2005; Gordon H.A. et al., 1971).

1.1. Dezavantaje

R. 2.6.2. Obținerea unor modele animale ale infecțiilor studiate

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 acela că transferul poate avea loc și către alte specii bacteriene din intestin, în afara receptorului care se investighează și astfel, numărul bacteriilor transconjugate urmărite ar putea să nu atingă limita de detecție (10 ufc/g fecale). De aceea, se impune fixarea clară a obiectivelor – se urmărește doar evidențierea existenței transferului de material genetic între tulpinile vizate sau se dorește și cuantificarea tulpinilor transconjugate și răspândirea lor ulterioară ([Schjørring S. et al., 2011](#)).

De asemenea, tratamentul cu antibiotice și co-existența proceselor inflamatorii, par a favoriza transferul plasmidic al genelor de rezistență în tractul gastro-intestinal ([Modi S.R., et al., 2013](#); [Stecher B., et al., 2012](#)). Chiar și tratamentul cu streptomycină (administrată în apa de băut), îndelung utilizată în crearea unor astfel de modele, cu scopul de a reduce populația de bacterii facultativ anaerobe și de a permite astfel o mai bună colonizare a tractului gastro-intestinal cu tulpinile de interes, poate favoriza inflamațiile intestinale ([Spees A.M., et al., 2013](#)).

Un studiu de dată recentă atestă faptul că transferul plasmidic al genelor de rezistență, *in vivo*, este influențat de complexitatea microbiotei și de zestrea genetică a modelului, dar nu și de existența statusului inflamator. Comparând șoarecii din linia 129S6/SvEv ASF deficienți în interleukina-10 (mediu proinflamator) cu cei nedeficienți, nu s-au constatat diferențe în ceea ce privește numărul bacteriilor transconjugate (ufc/g fecale). În schimb, s-a remarcat faptul că la animalele cu floră convențională, spre deosebire de cele din liniile ASF (altered Schaedler flora – microbiotă bine definită), nu s-a realizat colonizarea corespunzătoare a donorului și receptorului și implicit, nici transferul plasmidic nu a avut loc. De asemenea, numărul transconjugatelor a fost semnificativ mai scăzut în fecalele șoarecilor din linia C3H/HeN ASF decât în ale celor din linia 129S6/SvEv ASF ([Ott L.C. et al., 2020](#)).

Date fiind cele expuse mai sus, referitoare la dezavantajele modelului murin gastro-intestinal și anume:

- Dificultatea de colonizare și de monitorizare a transconjugatelor la șoarecii convenționali;
- Necesitatea pretratării cu streptomycină;
- Neajunsurile modelului germ-free (se poate observa doar faptul că transferul are loc, dată fiind rata de multiplicare intensă a donorului și receptorului, în lipsa florei concurente) și dificultatea de manipulare (menținerea lor germ-free);
- Costul ridicat al șoarecilor ASF;

Ne-am propus evaluarea modelului murin utilizat în studierea mamitelor, ca și potențial model pentru studierea *in vivo* a transmiterii orizontale a antibioretistenței.

2. Modelul *mamar* murin – potențial model pentru studierea transferului orizontal al genelor de rezistență

Din necesitatea reducerii costurilor și a problemelor de management, în studiul mamitelor la speciile de interes economic (vacă, oaie, capră etc), încă din anii 1970, a început dezvoltarea unui model murin. Acesta a fost perfecționat de-a lungul timpului, servind atât elucidării mecanismelor implicate în declanșarea mamitelor, cât și investigării noilor terapii antimicrobiene sau protocoale de prevenție (Brouillette E. et al. 2004; Notebaert S. et al., 2006; Notebaert S. et al., 2008; Chen F. et al., 2014; Breyne K. et al., 2015; Camperio C. et al., 2017; da Silva Duarte V. et al., 2018; Laskey A. et al., 2020).

În urma cercetărilor bibliografice efectuate, nu am reușit identificarea niciunei tentative de utilizare a modelului *mamar* murin, în studiul tranferului orizontal al genelor de rezistență.

Față de modelul gastro-intestinal, acesta ar putea prezenta multiple avantaje:

- Întrucât flora bacteriană (normală) *mamară* nu este atât de abundentă și de diversificată precum cea intestinală, s-ar putea folosi șoareci convenționali;
- În lipsa microbiotei locale abundente, colonizarea speciilor bacteriene de interes (donorul și receptorul) ar fi mai facilă; din aceleași rațiuni, identificarea, dar și cuantificarea transconjugatelor s-ar realiza mai ușor;
- Posibilitatea de recoltare a întregii glande *mamare* și de evidențiere a eventualelor modificări celulare și histologice;
- Posibilitatea de recoltare doar a laptelui (mai greu, dar există soluții - Notebaert S. et al., 2006);
- În lipsa microbiotei concurente, eventualul transfer s-ar desfășura mai rapid (timp redus de așteptare de la inoculare până la evidențierea transconjugatelor);
- După inocularea speciilor bacteriene de interes, procesul de transfer al genelor de rezistență ar putea fi urmărit și cuantificat în continuare, la nivelul tractului gastro-intestinal al puilor;
- Demonstrarea transferului genelor de rezistență la nivelul glandei *mamare* / în interiorul glandei *mamare* (cu siguranță a fost intuit, dar nu și validat științific...cel puțin, noi nu am găsit studii) ar fi un subiect de real interes în contextul sănătății publice + principiul „One Health”.

2.1. Particularitățile glandei *mamare* la șoareci

Femelele prezintă cinci perechi de glande *mamare*, două localizate în regiunea inghinală și trei perechi, în regiunea toracică (Notebaert S. et al., 2006); după alți autori, o pereche este localizată în regiunea inghinală, una în regiunea abdominală, două în regiunea toracică și una, în regiunea cervicală (Truchet S., et al., 2015) (Figura 1).

R. 2.6.2. Obținerea unor modele animale ale infecțiilor studiate

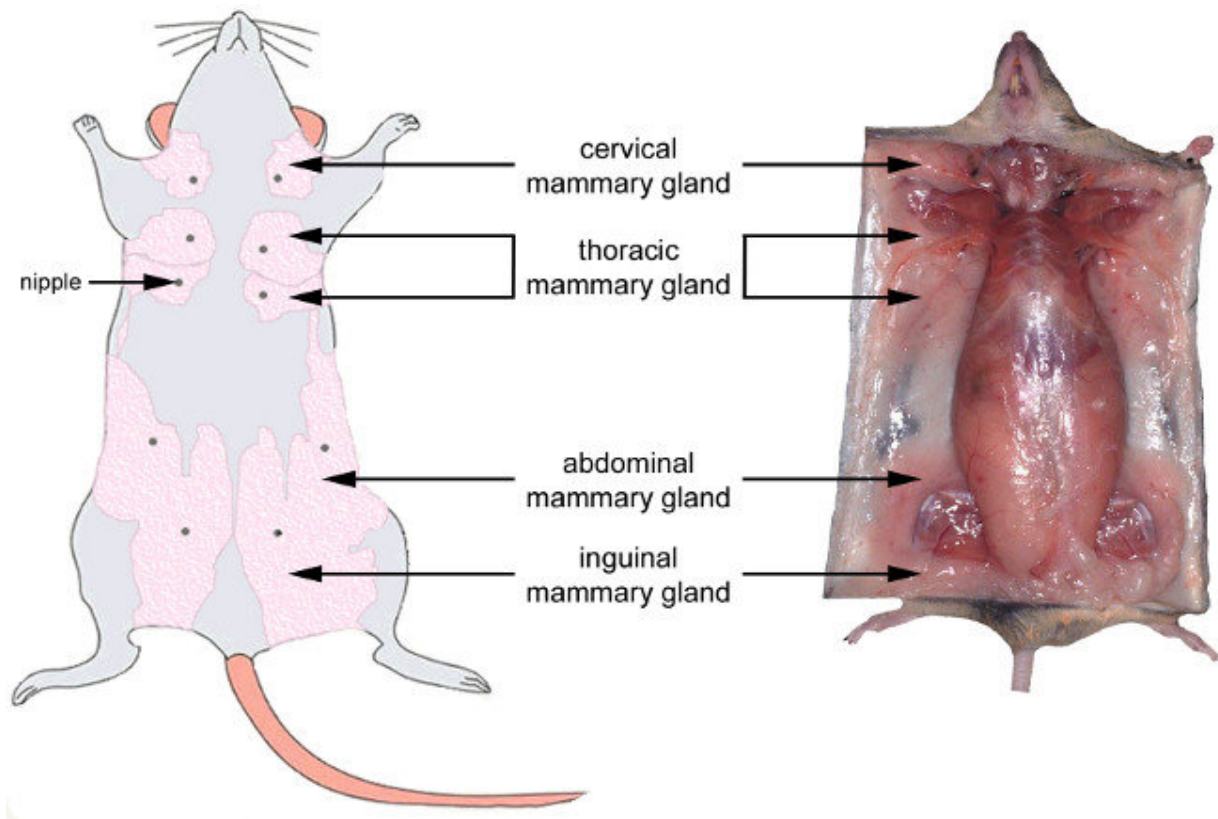


Figura 1. Localizarea glandelor mamare la șoarece (Truchet S., et al., 2015)

Fiecare glandă mamară are un singur mamelon, străbătut de un singur conduct papilar principal, care se deschide la exterior printr-un singur orificiu papilar. Glandele mamare sunt independente una de cealaltă, din punct de vedere anatomo-funcțional (Notebaert S. et al., 2006).

Deși compoziția laptelui în proteine, grăsimi și glucide diferă semnificativ față de laptele de vacă, iar în ugerul bovinelor se găsesc, în mod normal, mai multe fagocite decât în glanda mamară a șoarecilor, modelul murin pentru mastite asigură un mediu prielnic dezvoltării microorganismelor patogene, precum și interacțiunii dintre acestea și componentele sistemului imun al gazdei (Notebaert S. et al., 2006).

Nu s-au găsit date în literatura de specialitate cu privire la numărul de celulele somatice din laptele de șoarece. Există însă studii care descriu modul de realizare și funcționare al unui **aparat de muls pentru animale de laborator** (șobolani), cu rezultate satisfăcătoare (până la 1.5 ml lapte), sub anestezie și în urma administrării de oxitocină (Temple PL et al., 1937; Hoffmann FA et al., 1982; Nagasawa H., 1979).

2.2. Tehnica de inoculare intramamară

Indiferent de metodă, inocularea se face sub anestezie intraperitoneală sau inhalatorie (Notebaert S. et al., 2006; Breyne K. et al., 2015).

O primă metodă descrisă în literatură este aceea a **depunerii unei picături de suspensie bacteriană pe vârful mamelonului**, la nivelul orificiului papilar (Anderson JC, 1979). Suspensia trebuie să fie mult mai concentrată decât în cazul inoculării intramamare propriu-zise, întrucât doar un număr redus de microorganisme vor pătrunde în canalul papilar. În această situație, șansele de instalare a mamitei depind de: cantitatea de germeni care reușesc să pătrundă în canalul papilar, patogenitatea agentului bacterian de interes, existența / absența leziunilor la nivelul mameloanelor și desfășurarea sau nu a suptului.

O a doua metodă constă în **inocularea agentului bacterian în canalul papilar, cu ajutorul unui ac cu vârf bont**, cu diametru mai mic de 75 micrometri (30 gauge) (ex. 32G - Breyne K. et al., 2015 sau 33G - Camperio C. et al., 2017). Această tehnică presupune adesea utilizarea unui micromanipulator și se realizează sub microscop și cu o sursă de lumină adecvată (iluminator fibră optică). În cazul animalelor lactante, canalul papilar este ușor accesibil, însă la cele nelactante, acesta este acoperit cu un strat de detritusuri celulare, care trebuie în prealabil, îndepărtat (Notebaert S. et al., 2006). Pentru a facilita pătrunderea în canalul mamar, în cazul utilizării acestei tehnici de inoculare, alți autori propun secționarea unei porțiuni foarte fine din vârful mamelonului (Brouillette E. et al., 2005). Prin această tehnică (cu sau fără secționarea mamelonului), incidența de apariție a mamitei poate atinge 100%, chiar și la inocularea unui număr foarte redus de germeni, de doar 10 ufc. Însă în această situație și răspunsul imun al gazdei poate îmbrăca forme variate, astfel că se preferă inocularea unor soluții bacteriene mai concentrate, în jurul valorii de 10^5 ufc / cantitate inoculată. Trebuie menționat faptul că administrarea unui număr mai redus de bacterii, reproduce mai fidel mecanismul natural de apariție a mamitelor la vacă (Notebaert S. et al., 2006).

A treia metodă, neaplicabilă în cazul animalelor lactante sau gestante, constă în **expunerea chirurgicală a glandei mamare și injectarea inoculului (ac cu vârf ascuțit), direct în ductul principal** (Nguyen DA, et al., 2000).

Indiferent de metoda de inoculare, glandele perechii a patra (L₄ „left”/R₄ „right”), din sens antero-posterior, sunt cele mai utilizate, întrucât acestea sunt cele mai mari și drept urmare, cel mai ușor de observat și recoltat. Ca soluție martor, se folosește, de obicei, soluția salină sau PBS. Volumul de inocul tolerat de glanda mamară murină variază cu vârsta animalului și cu gradul de dezvoltare al glandei, dar în mod uzual, nu depășește 100 microlitri. Momentul optim de inoculare este în primele două săptămâni de lactație. Verificarea corectitudinii inoculării se poate face prin adăugarea de soluție sterilă de albastru Evans, la inoculul de cercetat (Krause S, et al., 2013; Notebaert S. et al., 2006).

Bibliografie

2. Anderson JC. The epidemiology and pathogenesis of experimental staphylococcal and coliform mastitis in the mouse. *British Veterinary Journal*. 1979;135:163-171.
3. Breyne K, De Vlieghe S, De Visscher A, Piepers S, Meyer E. Technical note: a pilot study using a mouse mastitis model to study differences between bovine associated coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci*. 2015; 98: 1090–1100. doi: [10.3168/jds.2014-8699](https://doi.org/10.3168/jds.2014-8699)
4. Brouillette E, Grondin G, Lefebvre C, Talbot BG, Malouin F. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol*. 2004;101(4):253-62. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.04.008.
5. Brouillette E, Malouin F. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes and Infection*. 2005;7:560-568.
6. Camperio C, Armas F, Biasibetti E, et al. A mouse mastitis model to study the effects of the intramammary infusion of a food-grade *Lactococcus lactis* strain. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184218. doi:10.1371/journal.pone.0184218
7. Chen F, Liu B, Wang D, Wang L, Deng X, Bi C, Xiong Y, Wu Q, Cui Y, Zhang Y, Li X, Wang Y, Liu B, Cao Y. Role of sortase A in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *FEMS Microbiol Lett*. 2014;351(1):95-103. doi: 10.1111/1574-6968.12354.
8. da Silva Duarte, V., Dias, R.S., Kropinski, A.M. et al. 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*. 2018;8:6845. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24896-w>
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. Hoffmann FA, Sawatzki G, Schmitt H, Kubanek B. A milker for mice. *Lab Anim Sci*. 1982;32(4):387-8. PMID: 7144113.
11. Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009;73:750–774. doi:10.1128/MMBR.00015-09
12. Krause S, Brock A, Ingber DE. Intraductal injection for localized drug delivery to the mouse mammary gland. *J Vis Exp*. 2013;(80):50692. doi:10.3791/50692
13. Laskey A, Ottenbrite M, Devenish J, et al. Mobility of β -Lactam Resistance Under Bacterial Co-infection and Ampicillin Treatment in a Mouse Model. *Front Microbiol*. 2020;11:1591. doi:10.3389/fmicb.2020.01591
14. Licht TR, Wilcks A. Conjugative gene transfer in the gastrointestinal environment. *Adv Appl Microbiol*. 2005;58:77–95. doi:10.1016/S0065-2164(05)58002-X
15. Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*. 2013;499:219–222. doi:10.1038/nature12212.
16. Nagasawa H. A device for milk collection from mice. *Lab Anim Sci*. 1979 Oct;29(5):633-5. PMID: 513632.
17. Nguyen DA, Beeman N, Lewis MT, Schaack J and Neville MC. Intraductal injection into the mouse mammary gland. *Research Methods in Mammary Gland 96. Biology and Breast Cancer*. Edited by M.M. Ip. and B. Asch. Kluwer Academic, New York 2000. 259-270
18. Norman A, Hansen LH, She Q, Sørensen SJ. Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid*. 2008;60:59–74. doi:10.1016/j.plasmid.2008.03.003
19. Notebaert S, Demon D, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Meyer E. Inflammatory mediators in *Escherichia coli*-induced mastitis in mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2008; 31: 551–565. doi: [10.1016/j.cimid.2007.10.004](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.10.004)
20. Notebaert S, Meyer E. Mouse models to study the pathogenesis and control of bovine mastitis. A review. *Vet Q*. 2006;28(1):2-13. doi: 10.1080/01652176.2006.9695201. PMID: 16605156.

R. 2.6.2. Obținerea unor modele animale ale infecțiilor studiate

21. Ott LC, Stromberg ZR, Redweik GAJ, Wannemuehler MJ, Mellata M. Mouse Genetic Background Affects Transfer of an Antibiotic Resistance Plasmid in the Gastrointestinal Tract. *mSphere*. 2020;5(1):e00847-19; DOI: 10.1128/mSphere.00847-19
22. Penders J, Stobberingh EE, Savelkoul PH, Wolfs PF. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Front Microbiol*. 2013;4:87. doi:10.3389/fmicb.2013.00087.
23. Rolain JM. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Front Microbiol*. 2013;4:173. doi:10.3389/fmicb.2013.00173.
24. 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.
25. Schjørring S, Krogfelt KA. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. *Int J Microbiol*. 2011:312956. doi: 10.1155/2011/312956
26. Sørensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N, Wuertz S. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3:700–710. doi:10.1038/nrmicro1232.
27. Spees AM, Wangdi T, Lopez CA, Kingsbury DD, Xavier MN, Winter SE, Tsohis RM, Bäumlner AJ. Streptomycin-induced inflammation enhances *Escherichia coli* gut colonization through nitrate respiration. *mBio*. 2013;4:e00430-13. doi:10.1128/mBio.00430-13.
28. Stecher B, et al. Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:1269–1274. doi:10.1073/pnas.1113246109
29. 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.
30. Temple PL, Kon SA. A simple apparatus for milking small laboratory animals. *Biochem J*. 1937;31(12):2197-2198. doi:10.1042/bj0312197
31. Truchet S, Honvo-Houeto E. Indirect Immunofluorescence on Frozen Sections of Mouse Mammary Gland. *Journal of Visualized Experiments*. 2015;http://www.jove.com/video/53179. 10.3791/53179. DOI: [10.3791/53179](https://doi.org/10.3791/53179)