



Studiu privind rezistența la produse antimicrobiene în lanțul trofic

### **R.1.1.3 Studiu privind rezistența la produse antimicrobiene în lanțul trofic - cercetări privind prevalența tulpinilor de stafilococi meticilin rezistente, izolate de la porcii clinic sănătoși**

efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*  
(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

#### **Coordonatori:**

DÉGI J., CRISTINA R.T.,

#### **Întocmit de:**

DÉGI DIANA MARIA,

MUSELIN F.,

DUMITRESCU CRISTINA

#### **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.

**Data finalizării: 12.11.2020**

## RAPORT

### R.1.3.3 Studiu privind rezistența la produse antimicrobiene în lanțul trofic

#### CERCETĂRI PRIVIND PREVALENȚA TULPINILOR DE STAFILOCOCI METICILIN REZISTENTE, IZOLATE DE LA PORCII CLINIC SĂNĂTOȘI

##### Colectivul de cercetare:

DÉGI J., CRISTINA R.T., DÉGI DIANA MARIA, MUSELIN F., DUMITRESCU CRISTINA

##### Rezumat

**Introducere:** La porci, stafilococii sunt agenți patogeni importanți care se găsesc adesea în componența microflorei pielii și la nivelul suprafețelor mucoasei, căilor respiratorii superioare. De la introducerea antibioticelor în utilizarea clinică umană și veterinară, stafilococii au arătat o dobândire rapidă a rezistenței la aproape toate clasele majore de antibiotice, în special la acele tulpini asociate cu infecții nosocomiale la om. Se știe puțin despre dezvoltarea și răspândirea rezistenței antimicrobiene la stafilococi la porci și îndeosebi la porcii clinic sănătoși.

**Metodologie:** În acest studiu, s-au investigat un total de 187 de probe, provenite de la porci sănătoși, din diferite zone ale pielii (mameloane, peri vulvar, ureche și zona abdominală), pentru depistarea prezenței bacteriei *Staphylococcus spp.*, prin metode standardizate, convenționale, având la bază metode utilizate industrial în laboratoarele clinice. Sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor izolate a fost testată folosind sistemul Vitek 2 AST GP card ((bioMerieux, Franța) și evidențiere prin teste PCR, de prezența genei *mecA*.

**Rezultate:** Stafilococi au fost prezenți în 48 de probe, provenite de la porcii clinic sănătoși (48/187, 25,67%), colonizați la nivelul pielii mameloanelor (9/38; 23,68%) și de pe pieleaperivulvară (3/25; 12,00%) de la scroafele cu purcei; pielea mameloanelor (3/23; 13,04%) și perivulvar (2/22; 9,09%) de la scroafele gestante; pielea de la nivelul urechiilor (13/38; 34,21%), proveniți de la purceii înțărcați și pielea abdominală (18/41; 43,90%) de la porcii grași. Testele de sensibilitate antimicrobiană au evidențiat o populație bacteriană, remarcabil de susceptibilă. Astfel toate izolatele de stafilococi, la nouă din antibioticele testate au manifestat o sensibilitate maximă și au fost evidențiate rezistență la: benzil penicilină (50,00%; 24/48), tetraciclină (37,5%; 18/48), gentamicină (35,41%; 17/48), eritromicină (25,00%; 12/48), ampicilină (22,91%; 11/48) și kanamicină (20,83%; 10/48). Au fost de asemenea identificate opt tulpini izolate, cu rezistență la meticilină (oxacilină, respectiv cefoxitină). Deși 12,5% (6/48) din izolate au fost rezistente la cloramfenicol, 10,41% (5/48) rezistente la trimetoprim / sulfametoxazol și 4,1% (2/48) rezistente la nitrofurantoină. Nu s-a găsit nicio tulpină de stafilococ cu rezistență inducibilă la clindamicină.

**Concluzii:** Identificarea corectă a tulpinilor de stafilococi, este foarte importantă pentru gestionarea corectă a infecțiilor date de aceste bacterii, dar este, de asemenea, esențială pentru o mai bună înțelegere a factorilor fiziopatologici care afectează rezultatul clinic și pentru supravegherea epidemiologică și distribuția acestor bacterii la porci și oameni. Rezultatele noastre au arătat prezența speciilor stafilococice nespecifice gazdei cu rezistență la mai multe antibiotice, inclusiv cea la meticilină (oxacilină și cefoxitină).

**Cuvinte cheie:** Stafilococi, porc, antibiotice, meticilină, rezistență

Tulpinile de stafilococi neexpușe la presiunea exercitată de antibiotice sunt sensibile la aceste substanțe, în schimb tulpinile de stafilococi izolate de la animale și de la oameni, cu diferite afecțiuni,

#### Studiu privind rezistența la produse antimicrobiene în lanțul trofic

fiind supuse presiunii la antibiotice, datorită terapiei neraționale pot să prezinte fenomenul de rezistență multiplă. Rezistența la antibiotice are la bază determinanți genetici situați în plasmidele R și în cromozomi și poate fi transmisă prin conjugare sau prin alte mecanisme, atât intraspecific, cât și inter specific (1, 15).

Dezvoltarea rezistenței față de diferite antibiotice, la stafilococi, este o consecință a utilizării neraționale, în terapie, atât la animale, cât și la oameni, a antibioticelor, fără testarea prealabilă a sensibilității.

Antibioticele utilizate nerațional creează o presiune de selecție a cărei consecință o reprezintă selecția și transmiterea determinanților genetici (gene) prin plasmide de tip R sau prin apariția unor mutații cromozomiale. Antibio rezistența la stafilococi se exercită diferit în funcție de clasele de antibiotice (2, 21).

Colonizare cu tulpini de *Staphylococcus aureus* rezistente la metilicină (MRSA) a fost recent identificat la porci și respectiv la oamenii care lucrează în aceste sectoare iar creșterea îngrijorarea cu privire la rolul porcilor ca rezervoare de MRSA pentru infecțiile la om, au fost relatate tot mai frecvent în literatura de specialitate (1, 2, 15, 24).

Cercetările care fac obiectul acestui studiu au fost efectuate cu scopul:

- de a stabili frecvența tulpinilor de *stafilococi* izolate din efectivele de porci;
- de a caracteriza fenotipic tulpinile izolate;
- de a identifica tulpinile metilicin-rezistente și rezistotipurile.

## MATERIALE ȘI METODE

Cercetările care fac obiectul lucrării de diplomă au fost efectuate în cadrul Laboratorului de Boli bacteriene (B6.a), al Disciplinei de Boli infecțioase și Medicină Preventivă, de la Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara.

Probele au fost prelevate de la porci clinic sănătoși, dintr-o fermă de suine din localitatea Macea, județul Arad, în perioada **ieulie – decembrie 2019**.

### Prelevarea probelor

Probele necesare examenelor bacteriologice au fost prelevate de la un număr **187 de porci** clinic sănătoși (porci grași – figura 1, scroafe gestante, sectorul de reproducție – figura 2, scroafe cu purcei din sectorul de maternitate – figura 3 și purcei înțărcați – figura 4), fiind reprezentate de probe cutanate din diferite zone anatomice: auriculară, mameloane, peri-vulvar și abdomen. Probele au fost prelevate cu ajutorul tampoanelor de vată sterile, fixate pe o tijă de plastic și introduse în eprubete sterile (produs standard). După prelevare, probele au fost păstrate la frigider, până la efectuarea însămânțărilor.

Studiu privind rezistența la produse antimicrobiene în lanțul trofic



Figura 1. Porci grași (original).



Figura 2. Scroafe în boxe individuale (original).

Studiu privind rezistența la produse antimicrobiene în lanțul trofic



Figura 3. Scroafă cu purcei (original).



Figura 4. Purcei întărcați (original).

### Examenul bacteriologic

Materialele patologice au fost însămânțate pe agar cu sânge defibrinat de oaie 5% (Biomedics, Spania (figura 5)).

## Studiu privind rezistența la produse antimicrobiene în lanțul trofic

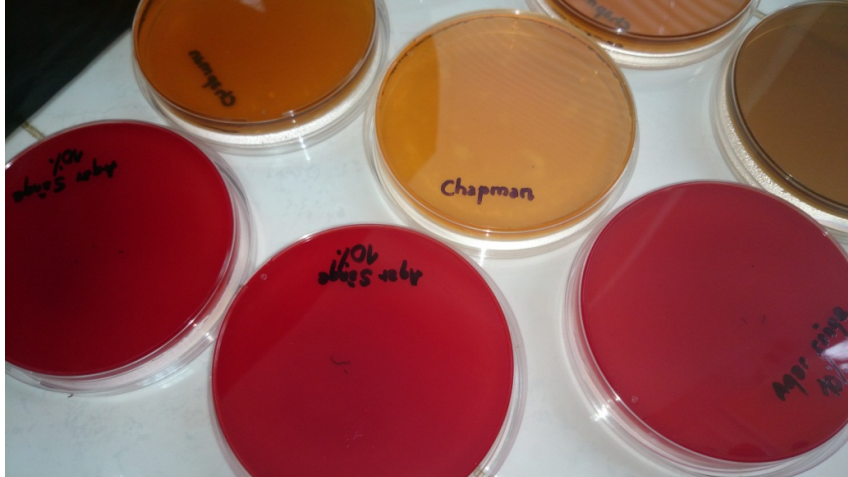


Figura 5. Plăci cu agar cu sânge de berbec 10% și agar Chapmann (original).

După răcirea și uscarea plăcilor, însămânțările au fost făcute prin epuizarea materialului patologic de pe tamponul de vată, pe suprafața agarului. În continuare, plăcile au fost incubate la 37°C, în atmosferă normală, timp de 18 -20 de ore. Însămânțările primare au fost făcute, în acest mod, pentru obținerea coloniilor izolate, în vederea aprecierii caracterelor culturale (figura 6).

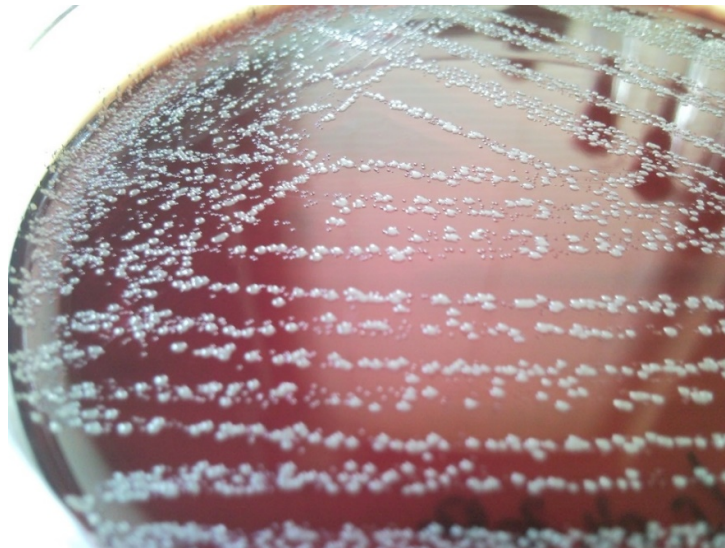


Figura 6. Cultură primară de stafilococi pe agar cu sânge de oaie 5% (original).

După incubație, plăcile au fost examinate cu lupa stereoscopică, iar din fiecare tip de colonie au fost făcute frotiuri colorate Gram. Din coloniile caracteristice morfologic și din care au fost puși în evidență coci Gram pozitivi, sferici, egali și dispuși în grămezi, au fost făcute însămânțări cu ansa bacteriologică, prin epuizare, tot pe agar cu sânge defibrinat de oaie 5% (Biomedics, Spania).

Subculturile obținute au fost controlate bacterioscopic pentru verificarea purității, iar ulterior, din coloniile caracteristice au fost făcute însămânțări pe medii selective (agar Chapman, Biomedics, Spania).

Tulpinile de stafilococi izolate și purificate au fost testate biochimic și în privința unor caractere de patogenitate (Figura 7).

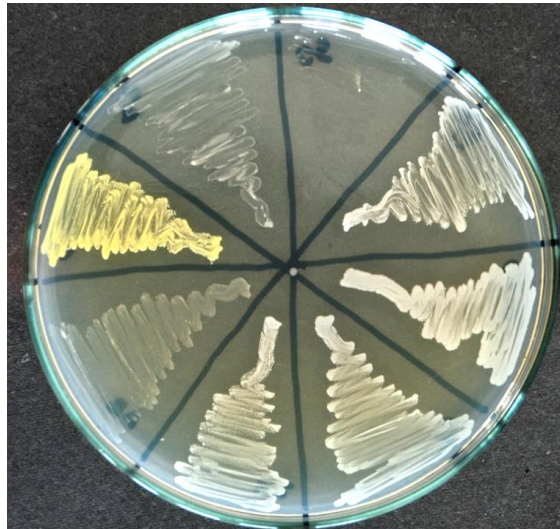


Figura 7. Tulpini de stafilococi purificate, izolate de la porci (original).

Proprietatea biochimică testată prin metode convenționale, a fost, fermentarea manitolului pe mediul Chapman (Biomedics, Spania).

Factorii de patogenitate controlați au fost hemolizinele și prezența celor două tipuri de coagulează.

Pentru aprecierea activității hemolitice, a tulpinilor de stafilococi izolate, a fost folosit agarul cu sânge, folosindu-se patru tipuri de eritrocite: de oaie, de iepure, de câine și de bou. Modul de însămânțare, incubarea plăcilor și examenul coloniilor obținute au fost asemănătoare cu cele descrise anterior.

Evidențierea coagulazei a fost făcută prin cele două tehnici utilizate în acest scop. Pentru evidențierea coagulazei legate, a fost utilizat kitul rapid Prolex Staph Latex Kit (Pro-Lab Diagnostics – Germania). Tulpinile care posedă coagulază legată (clumping factor) sau proteina A, puse în contact cu particulele de latex sensibilizate cu fibrinogen și Ig G, produc aglutinarea amestecului. Pe o lamă de sticlă, se pune câte o picătură din cele două flacoane, care conțin reactivul 1 (dop albastru) și reactivul 2 (dop alb). Reactivul 1 conține particule de latex albastru sensibilizate prin fibrinogen și imunoglobuline de origine bovină, iar reactivul 2 conține particule de latex alb nesensibilizate (martor). În fiecare picătură de reactiv se pune cu ansa bacteriologică cultura tânără (18-20h) de stafilococ și se omogenizează. Apariția unor mici coaguli indică prezența coagulazei legate.

Coagulaza liberă, difuzibilă a fost evidențiată prin tehnica în tuburi folosindu-se patru tipuri de plasmă citratată. Citirea a fost făcută la 30 de minute, 60 de minute, 75 de minute, 120 de minute și 180 de minute. Pentru acest scop, s-a utilizat plasmă de iepure cu EDTA (Bactident Coagulase, Merk, Canada).

### Identificarea tulpinilor/Utilizarea cardului de identificare GP

Toate tulpinile izolate, au fost identificate la nivel de specie, pe baza proprietăților biochimice, utilizând sistemul Vitek 2 (bioMérieux, Franța), cu cardurile de identificare a bacteriilor Gram pozitive, Vitek 2 GP card (bioMérieux, Franța).

Suspensie bacteriană de testat a fost ajustată după standardul McFarland la valoarea de 0,5, în 2,5 ml de soluție de clorură de sodiu 0,45%, cu un instrument al sistemului VITEK 2 (DensiChek; bioMérieux). Durata de timp între pregătirea inoculului și umplerea cardului a fost întotdeauna mai puțin

### Studiu privind rezistența la produse antimicrobiene în lanțul trofic

de 30 minute. Formatul cardului GP cuprinde de 64 de godeuri pe un card de plastic, care conține 43 de teste.

Cardul GP include teste pentru următoarele reacții: fosfatidilinozitol fosfolipaza C, arginina dihidrolază (două teste),  $\beta$ -galactozidază,  $\alpha$ -Glucozidaza, alanin-fenilalanină-prolină arylamidază, L-aspartic acid arylamidază,  $\beta$ -galactozidază,  $\alpha$ -manozidază, fosfatază alcalină, L-leucin arylamidază, prolină arylamidază,  $\beta$ -glucuronidază (două teste),  $\alpha$ -galactozidază, L-pyroglytamic acid arylamidază, alanină arylamidază, tirozină arylamidază și urează. Cardul GP testează, de asemenea, producția de acid de la următoarele tipuri de suport glucidic: amigdalină, xiloză,  $\alpha$ -ciclodextrină, sorbitol, galactoză, riboză, lactat, lactoză, N-acetil-glucozamină, maltoză, manitol, manoză, metil- $\beta$ -D-glucopiranozidă, pollulan, rafinoză, salicină, glucoză și trehaloză.

În cele din urmă, testarea creșterii în mediu cu 6,5% NaCl, precum și a rezistenței la polimixină B, bacitracină, novobiocină, O129 și optochin sunt, de asemenea, incluse în cardul de identificare GP.

Cardul de identificare GP este un sistem complet închis, care nu necesită adaos suplimentar de reactivi. Cardul a fost pus pe caseta special concepută pentru utilizarea cu sistemul VITEK 2, odată amplasată în instrumentul de lucru, este în mod automat dirijat într-o cameră de vid, se sigilează și se incubează la 35,5°C, supusă ulterior în mod automat la măsurări colorimetric (cu un cap de citire nou) la fiecare 15 minute pentru o perioadă maximă de incubație de 8 ore.

La fiecare 15 minute, intervine un al doilea nivel de algoritm care analizează modelul biologic (biopattern) (de exemplu, teste interpretate și neinterpretate) și verifică dacă este suficient pentru a da verdictul de identificare finală. Al doilea algoritm, de asemenea, verifică, cu ajutorul unui calcul specific, că rezultatele ulterioare ale testelor care încă nu au fost interpretate, nu va schimba verdictul de identificare.

Nu scorurile de identificare ( $t$  index, probabilitate, interferența statistică, și valorile de încredere), furnizate de software-ul, ci mai degrabă interpretările oferite de software-ul au fost luate în considerare.

În urma interpretărilor date de software-ul aparatului Vitek 2, au rezultat patru categorii diferite de rezultate: (i) identificare corectă (identificare lipsită de ambiguitate, corectă la nivel de specie), (ii) nivelul scăzut de discriminare (fie de identificare la nivel de gen sau un nivel scăzut de discriminare între două sau mai multe specii, inclusiv specii corecte); (iii) neidentificat și (iv) identificări eronate (speciile identificate cu cardul de identificare GP a fost diferite de cele identificate prin metode de referință).

### Testarea sensibilității la antibiotice

Pentru testarea sensibilității la antibiotice, a tulpinilor de stafilococi izolate, a fost utilizată o metodă automată, rapidă de testare, utilizând cardurile Vitek 2 AST GP69 card (bioMerieux, Franța).

Tulpinile izolate au fost testate față de următoarele clase de substanțe antimicrobiene: antibiotice betalactamice (benzil penicilină, ampicilină, oxacilină și imipenem), cefalosporine (cefoxitin), monobactam (ampicilină/sulbactam), aminoglicozide (gentamicină, kanamicină), fluoroquinolone (enrofloxacină, marbofloxacină), macrolide (eritromicină), lincosamide (clindamicină), glicopeptide (vancomicină), tetraciline (tetracilină) și alte antibiotice (acid fusidic, acid monoxicarboic (mupirocin), amfenicol (cloramfenicol), rufamicin (rifampicină) și sulfonamide (trimetoprim sulfametoxazol și nitrofurantion).

Cardul Vitek 2 AST GP69 card (bioMerieux, Franța), mai are în componență și testarea rezistenței inductibile la clindamicină, respectiv testarea sensibilității față de oxacilină, indicator indirect pentru determinarea rezistenței la meticilină a tulpinilor de *Staphylococcus aureus*, asociat cu prezența genei *mecA*.

Toate tulpinile izolate care au manifestat rezistență pentru oxacilină și cefoxitină au fost testate pentru prezența elementelor genetice specifice a lui *Staphylococcus aureus*, cum ar fi gena *mecA* (533 bp), în concordanță cu metoda descrisă de Reischl și col. (2008). Ampliconii rezultați, au fost etalați și analizați prin difuziunea în gel de agar 1,5%, colorat cu bromură de etidiu, la trans iluminator UV.

## Studiu privind rezistența la produse antimicrobiene în lanțul trofic

Testarea sensibilității față de antibiotice a fost efectuată și cu scopul de a identifica tulpinile metilicilin rezistente și pentru identificarea fenotipurilor de rezistență.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

### Rezultatele examenului bacteriologic

Pe durata studiului au fost izolate un număr de 48 de tulpini (48/187, 25,7%), aparținând genului *Staphylococcus*.

Morfologie. Toate cele 48 de tulpini bacteriene studiate, la colorația Gram au fost încadrate în Gram pozitive și se prezentau sub formă de coci, cu dimensiunea cuprinsă între 0,8 – 1,5 mm în diametru, iar modul de grupare predominantă a fost de ciorchine și ocazional în pereche sau celule bacteriene solitare.

În acest studiu au fost izolate 48 de tulpini de stafilococi, dintre care 30 de tulpini coagulazo pozitive (CoP, reprezentat de *S. hyicus* și *S. aureus*) și respectiv 18 tulpini coagulază negative (CoN, reprezentat de *S. haemolyticus*, *S. sciuri* și respectiv *S. epidermidis*), izolate de la porci din zone anatomice diferite. Rezultatele examenelor bacteriologice sunt redată în tabelul 1 și figura 9.

Tabelul 1.

Distribuția tulpinilor de stafilococi izolate de la porci.

Categoría de vârstă/zona anatomică	Număr probe recoltate	Probe pozitive	Tulpini de stafilococi izolați				
			<i>S. aureus</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. haemolyticus</i>
Scroafe cu porcei							
cutanat-mameloane	38	9 (23.68%)	3	2	2	1	1
perivulvar	25	3 (12.00%)	1	1	-	1	-
Scroafe gestante							
cutanat -perivulvar	22	2 (9.09%)	-	1	-	1	1
Mameloane	23	3 (13.04%)	2	1	-	-	-
Porcei înțărcați							
cutanat-auricular	38	13 (34.21%)	5	2	3	2	1
Porci grași							
cutanat	41	18 (43.90%)	8	4	2	2	2
<b>Total</b>	<b>187</b>	<b>48 (25.67%)</b>	<b>19</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>5</b>

Prin utilizarea sistemului Vitek 2 și a cardurilor Vitek 2 GP, au fost identificate corect, la nivel de specie, toate cele 48 de izolate (tabelul 1), din care, 19 tulpini de *S. aureus* (acuratețe de 99%), 11 tulpini de *S. hyicus* (acuratețe de 98,5%), 7 tulpini de *S. sciuri* (acuratețe de 96,5%), 7 tulpini de *S. epidermidis* (92,7% acuratețe) și respectiv 5 tulpini de *S. haemolyticus* (acuratețe de 96,5%).

### Rezultatele testelor de sensibilitate față de antibiotice

Tulpinile de stafilococi neexpuse la presiunea de antibiotice sunt sensibile la aceste substanțe, în schimb, tulpinile izolate de la porcii clinic sănătoși, supuse presiunii la antibiotice datorită terapiei, au prezentat fenomenul de rezistență multiplă la antibiotice.

Rezultatele obținute în urma testării sensibilității la antibiotice a unor tulpini de stafilococi izolați de la porci, prin utilizarea cardurilor de testare Vitek 2 AST GP 69, sunt redată în tabelele 2 și 3.

Tabelul 2

Rezultatele sensibilității la antibiotice a tulpinilor de *Staphylococcus* izolate de la porcii sănătoși, folosind cardul Vitek 2 ASTGP69

### Studiu privind rezistența la produse antimicrobiene în lanțul trofic

Name of antimicrobial substance	Number of susceptible staphylococcal strains				
	<i>S. aureus</i> (n=19)	<i>S. hycus</i> (n=11)	<i>S. epidermidis</i> (n=7)	<i>S. sciuri</i> (n=7)	<i>S. haemolyticus</i> (n=5)
Benzyl penicillin (P)	9	7	4	3	3
Ampicillin (AM)	14	9	6	5	4
ampicillin/sulbactam (SAM)	19	11	7	7	5
Oxacillin (Ox)	15	7	7	7	5
Imipenem (IPM)	19	11	7	7	5
Gentamicin (GM)	11	10	5	4	3
Kanamycin (K)	15	8	6	6	2
Enrofloxacin (ENR)	19	11	7	7	5
Marbofloxacin (MAR)	19	11	7	7	5
Erythromycin (E)	15	9	4	6	4
Clindamycin (CM)	19	11	7	7	5
Vancomycin (VA)	19	11	7	7	5
Tetracycline (TE)	16	6	3	3	2
Fusidic acid (FA)	19	11	7	7	5
Mupirocin (MUP)	19	11	7	7	5
Chloramphenicol (C)	17	9	5	7	5
Rifampicin (RA)	19	11	7	7	5
Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT)	16	10	6	7	5
Nitrofurantoin (NIF)	17	9	7	7	5
Cefoxitin screen (FOX)	15	7	7	7	5
Inducible Clindamycin resistance	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative

Tabelul 3

#### Tipul de rezistență al speciilor de stafilococi izolați de porci clinic sănătoși

Antimicrobials / <i>Staphylococcus spp.</i> (n=48)	<i>S. aureus</i>	<i>S. hycus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	Total resistant strains (n%)
Benzyl penicillin (P)	10	4	3	4	3	24 (50.00)
Ampicillin (AM)	5	2	1	2	1	11 (22.91)
Oxacillin (Ox)	4	4	0	0	0	8 (16.66)
Gentamicin (GM)	8	2	2	3	2	17 (35.41)
Kanamycin (K)	4	1	1	1	3	10 (20.83)
Erythromycin (E)	4	3	3	1	1	12 (25.00)
Tetracycline (TE)	3	4	4	4	3	18 (37.5)
Chloramphenicol (C)	2	2	2	0	0	6 (12.5)
Trimethoprim /sulfamethoxazole (SXT)	3	1	1	0	0	5 (10.41)
Nitrofurantoin (NIF)	2	0	0	0	0	2 (4.1)
Cefoxitin (FOX)	4	4	0	0	0	8 (16.66)

Prin utilizarea acestor carduri de testare a sensibilității la antibiotice, se obțin informații rapide (în decurs de 18 ore), cu acuratețe mare și relativ ușor de utilizat.

Pe parcursul acestui studiu, au fost monitorizate fenomenele de rezistență multiplă la oxacilină și cefoxitină, în cazul tuturor izolatelor provenite de la porci.

Analizând rezultatele din tabel se poate observa că antibiosensibilitatea a fost variabilă în funcție de grupele de antibiotice.

Rezultatele au arătat, existența unei populații de stafilococi cu un profil al sensibilității la antibiotice variabilă, izolați de la porci clinic sănătoși. Astfel la nouă din antibioticele testate au manifestat o sensibilitate maximă, în cazul celor 48 de tulpini de stafilococi și au manifestat rezistență față de benzil penicilină (50,0%, 24/48, CI 35,43-64,57), tetraciclină (37,5%, 18/48, CI 24,32-52,67), gentamicină (35,4%, 17/48, CI 22,55-50,61), eritromicină (25,0%, 12/48, CI 14,11-39,89), ampicilină (22,9%, 11/48, CI 12,52-37,67) și kanamicină (20,8%, 10/48, CI 10,95-35,4). Au fost de asemenea identificate 8 tulpini meticilin rezistente (la oxacilină și respectiv cefoxitină). Tot conform rezultatelor obținute în urma testărilor, 12,5% (6/48, CI 5,19-25,94) dintre tulpinile izolate, au fost rezistente la

#### Studiu privind rezistența la produse antimicrobiene în lanțul trofic

cloramfenicol, 10,4% (4/48, CI 3,9-23,45), rezistent la trimetoprim sulfametoxazol și respectiv 4,1% dintre tulpinile de stafilococi izolați de la porcii clinic sănătoși (2/48, CI 0,73-15,43) au fost rezistenți la nitrofurantion. Nu au fost decelate tulpini cu rezistență inductibilă la clindamicină.

Toate tulpinile izolate, au fost sensibile față de enrofloxacină și marbofloxacină, ambele făcând parte din clasa fluoroquinolonelor, des utilizate în terapia bolilor infecțioase la suine.

Analizând rezultatele obținute și centralizate în tabelele 2 și 3, putem afirma că, sensibilitatea tulpinilor de stafilococi izolați de la porci, a fost variabilă, în funcție de clasa de antibiotice.

În cazul antibioticelor, ampicilină/sulbactam, imipenem, enrofloxacină, marbofloxacină, clindamicină, vancomicină, acid fusidic, mucopirin și rifampicină, sensibilitatea a fost de 100%, redate în tabelul 2. Aceste antibiotice, nu sunt utilizate în mod normal, obișnuit în managementul bolilor infecțioase la porci.

Toate cele opt tulpini de stafilococi, care au manifestat rezistență față de oxacilină și cefoxitină, și supuse testelor de biologie moleculară, prin tehnica PCR, au fost cu succes amplificate, pentru evidențierea genei *mecA*.

Față de antibioticele din clasa  $\beta$ -lactamicelor utilizate pentru testare (benzil penicilină, ampicilină, oxacilină și imipenem), și a celor din grupa monobactamicelor (ampicilină/sulbactam), antibiosensibilitatea a fost maximă, exceptând 8 tulpini *S. aureus* și *S. hyicus*, care au manifestat rezistență față de oxacilină și cefoxitină. Tulpinile testate au fost în mare parte sensibile față de antibioticele  $\beta$ -lactamice, ca urmare a unor tratamente anterioare făcute corect.

Fenomenul de antibierezistență, în cazul  $\beta$ -lactaminelor, are la bază determinanți genetici de tip plasmidic și cromozomial care guvernează sinteza  $\beta$ -lactamazelor, cu spectru larg, care asigură astfel rezistența stafilococilor. Rezistența față de meticilină este transmisă prin plasmide (factor R) având și un patern comun față de alte  $\beta$ -lactamine. Din acest motiv tulpinile de stafilococi meticilin-rezistente sunt considerate tulpini de stafilococi cu risc zoonotic deosebit, având un circuit complex, respectiv om-animal-om (12, 13, 19, 24, 26).

Dezvoltarea rezistenței stafilococilor, față de diferite antibiotice, este o consecință a utilizării neraționale în terapia unor afecțiuni la porci. Antibioticele utilizate nerațional creează o presiune de selecție, fiind selectați și transmiși determinanții genetici de tip plasmidic și cromozomal. În consecință, apare fenomenul de rezistență multiplă care se transmite intra și interspecific. Prezintă importanță deosebită rezistența la meticilină deoarece poate fi asociată cu rezistența față de  $\beta$ -lactamine și alte grupe de antibiotice (7, 10, 15).

În urma testării tulpinilor de stafilococi izolate de la porci, față de diferite clase de antibiotice au fost identificate tulpini rezistente la oxacilină și cefoxitină și mai multe tipuri de rezistență, față de  $\beta$ -lactamice și alte clase de antibiotice.

Datele privind rezistența la meticilină și rezistotipurile identificate sunt asemănătoare cu rezultatele comunicate de către alți autorii privind fenomenul de rezistență la antibiotice (7, 10, 15).

*S. aureus* este un epifit, un microorganism normal al porcilor, și apare în toate efectivele (2). Prevalența tulpinilor de MRSA în efectivele de porci variază foarte mult (0-50%) în rândul țărilor Europene (1). Prevalența efectivă de MRSA la porcii din America de Nord este incertă, dar apare ca fiind mai redusă decât în multe țări Europene (15, 25). Prevalența MRSA este mare (> 50%), la porcii din efective pozitive, dar are un efect minim asupra sănătății porcilor.

*S. aureus* se găsește în praful și aerul din fermele de porci (7), iar oamenii sănătoși care lucrează în aceste ferme și adăposturi, de multe ori sunt purtători de *S. aureus* provenite de la porci, la nivelul mucoasei nazale (2, 11, 15, 22, 23). MRSA poate fi detectată în cazul a 20 - 80% din lucrătorii clinic sănătoși care își desfășoară activitatea la efectivele de porci MRSA pozitive, mult mai mult decât în cazul altor categorii de oameni (1,5% în SUA; <0,11% în Țările de Jos) (4, 8).

Riscul de expunere la MRSA provenit de la animale este în mare parte limitată la persoanele care au contact direct cu animale și respectiv a familiilor acestora (3, 5, 18).

Capacitatea tulpinilor de *S. aureus*/MRSA de origine animală de a coloniza, răspândii și provoca boli la om rămâne incertă. Se pare că linia ST398 persistă doar pentru scurt timp (ore sau zile)

### Studiu privind rezistența la produse antimicrobiene în lanțul trofic

la majoritatea oamenilor, dar unele pot coloniza luni sau ani de zile omul fără a dezvolta infecții (6, 9, 16, 17, 20). În spitale olandeze a fost identificată linia ST398 răspândită între oameni și a fost o de patru ori mai frecventă decât tulpinile de MRSA cu origine umană (5, 35). Nu au fost descrise epidemii de infecție date de linia ST398 de MRSA până în prezent. Alte linii de MRSA, pot să apară de asemenea la porci (de ex., ST9 în Asia, ST5 în America de Nord), dar implicațiile lor în sănătatea publică nu sunt cunoscute.

## CONCLUZII

Rezultatele studiului, a arătat, izolarea în proporție crescută a cocilor hemolitici Gram pozitivi, catalazo pozitivi și negativi din probele provenite de la porcii clinic sănătoși. Tulpinile au fost identificate ca fiind: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus sciuri* și *Staphylococcus haemolyticus* prin teste biochimice, utilizând cardul de identificare Vitek 2 GP (bioMérieux® SA, Franța), fiind confirmate și prin utilizarea unor teste ce pun în evidență factorii de patogenitate: testul coagulazei libere și legate (Pro-Lab Diagnostics, Marea Britanie și Bactident Coagulase, Merk, Canada).

Din ferma de porci au fost izolate 48 de tulpini de stafilococi, dintre care, 30 de tulpini coagulează pozitive (*S. hyicus* și *S. aureus*) și 18 de tulpini coagulează negative (*S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, respectiv *S. sciuri*), de la porcii clinic sănătoși din diferite zone anatomice.

Toate tulpinile de stafilococi izolate de la porci, au prezentat o sensibilitate de 100% pentru antibioticele: ampicilină / sulbactan, imipenem, enrofloxacină, marbofloxacină, clindamicină, vancomicină, acid fusidic, rifampicină și mupirocină, considerat medicamentul de elecție pentru aceste bacterii.

În comparație, sensibilitatea față de clasa  $\beta$ -lactamicelor (benzil penicilină, ampicilină, oxacilină și imipenem) și monobactam (ampicilină / sulbactan) a fost cea mai mare, cu excepția a opt tulpini de *Staphylococcus aureus* și *S. hyicus*, care au manifestat rezistență la oxacilină și cefoxitină. Majoritatea tulpinilor stafilococice izolate de porci sănătoși au dezvoltat rezistență la mai multe clase de antibiotice. Conform rezultatelor privind sensibilitatea la antibiotice, utilizând metoda gradientului de concentrație (E-Test) (card Vitek 2 AST GP69, bioMérieux, Franța), izolatele de *S. aureus* și *S. hyicus* au manifestat rezistență la oxacilină și cefoxitină, confirmate prin izolarea plasmidei prin amplificarea genei *meCA*, responsabilă pentru rezistența la metilicilină, prin tehnica PCR. Fenotipic, toate izolatele stafilococice au fost rezistente la 11 antibiotice din cele 20 testate, dar sensibile la  $\beta$ -lactame (imipenem), monobactam (ampicilină / sulbactan), fluroquinolonă (enrofloxacină, marbofloxacină), lincosamidă (clindamicină), glicozamide (v) acid monocarboxilic (Mupirocin), rapamicină (rifampicină) și alte substanțe antimicrobiene (acid fusidic).

În concluzie, identificarea corectă a izolatelor stafilococice (coagulează pozitivă și coagulează negativă) este foarte importantă pentru gestionarea corectă a infecțiilor stafilococice, dar este, de asemenea, esențială pentru o mai bună înțelegere a factorilor fiziopatologici care afectează rezultatul clinic și pentru supravegherea și distribuția epidemiologică aceste bacterii la porci și oameni.

Rezultatele noastre au arătat prezența speciilor stafilococice nespecifice pentru gazdă cu rezistență la mai multe medicamente, inclusiv cea la metilicilină (oxacilină și cefoxitină).

## BIBLIOGRAFIE

1. Anon (2009) Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008 [1] - Part A: MRSA prevalence estimates EFSA J 7 (11) 1376.
2. Armand-Lefevre L, Ruimy R, Andreumont A (2005) Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs Emerg Infect Dis 11(5) 711-714.

Studiu privind rezistența la produse antimicrobiene în lanțul trofic

3. Bisdorff B, Scholhölter JL, Claussen K, Pulz M, Nowak D, Radon K (2012) MRSA-ST398 in livestock farmers and neighboring residents in a rural area in Germany *Epidemiol Infect* 140(10), 1800-8.
4. Bode LG, Wertheim HF, Kluytmans JA, Bogaers-Hofman D, Vandenbroucke-Grauls CM (2011) Sustained low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* upon admission to hospital in The Netherlands *J Hosp Infect* 79, 198-201.
5. Cuny C, Nathaus R, Layer F, Strommenger B, Altmann D, Witte W (2009) Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs *PLoS ONE* 4(8) e6800.
6. Frana TS, Beahm AR, Hanson BM, Kinyon JM, Layman LL, Karriker LA, Ramirez A, Smith TC (2013) Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pork farms and visiting veterinary students *PLoS One* 8(1) e53738.
7. Gibbs SG, Green CF, Tarwater PM, Mota LC, Mena KD, Scarpino PV (2006) Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a swine confined or concentrated animal feeding operation *Environ Health Perspect* 114 1032-1037.
8. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, Jensen BJ, Killgore G, Tenover FC, Kuehnert MJ (2008) Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004 *J Infect Dis* 197(9) 1226-1234.
9. Graveland H, Wagenaar JA, Bergs K, Heesterbeek H, Heederik D (2011) Persistence of livestock associated MRSA CC398 in humans is dependent on intensity of animal contact. *PLoS One* 6 e16830.
10. Guardabassi L, Courvalin P (2006) Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance, In: *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin* Ed ASM Press Washington, D.C. 1-18.
11. Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS (2008) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers *Vet Microbiol* 128 298-303.
12. King MD, Humphrey BJ, Wang YF, Kourbatova EV, Ray SM, Blumberg HM (2006) Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections *Ann Intern Med* 144 309-317.
13. Kluytmans-Vandenberg MF, Kluytmans JA (2006) Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives *Clin Microbiol Infect* 12 (suppl. 1) 9-15.
14. Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeier B, Lehn N (2008) Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 38 2429-33.
15. Smith TA, Gebreyes WA, Abley MJ, Bayleyegn M, Harper-Maples A, Forshey BM, Male MJ, Martin HW, Sreevatsan S, Thakur S, Thiruvengadam M, DavieS PR (2013) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA *PLoS One* 8(5) e63704.
16. Sun J, Linhares L, Yang M, Sreevatsan S, Davies P (2013) Longitudinal study of *Staphylococcus aureus* and MRSA colonization of US swine veterinarians *Proceedings, 10th International Conference on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork (SafePork)* Portland ME Sept 10-12 2013.
17. Van Cleef BA, Graveland H, Haenen AP, Van De Giessen AW, Heederik D, Wagenaar JA, Kluytmans JA (2011) Persistence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in field workers after short-term occupational exposure to pigs and veal calves *J Clin Microbiol* 49, 1030-1033.
18. Van Cleef BA, Verkade EJ, Wulf M., Buiting AG, Voss A, Huijsdens XW (2010) Prevalence of livestock-associated MRSA in communities with high pig-densities in The Netherlands *PLoS ONE* 5 e9385.
19. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC (2003) Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Pantón-Valentine leucocidin genes: worldwide emergence *Emerg Infect Dis* 9 978-984.

Studiu privind rezistența la produse antimicrobiene în lanțul trofic

20. Verkade E, Van Benthem B, Den Bergh MK, Van Cleef B, Van Rijen M, Bosch T, Kluytmans A (2013) Dynamics and determinants of *Staphylococcus aureus* carriage in livestock veterinarians: a prospective cohort study J Clin Infect Dis 57(2) e11-7.
21. Voss A, Loeffen F, Bakker J, Wulf M, Klaassen C (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming Emerg Infect Dis 11, 1965–1966.
22. Voss A, Loeffen F, Bakker J, Wulf MW (2006) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming Vet Microbiol 14 65-68.
23. Wan Mintao, Lauderdale TL, Chou Chincheng (2013) Characteristics and virulence factors of livestock associated ST9 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel recombinant staphylocoagulase type Vet Microbiol 162, (24), 779-784.
24. Weese JS, Rousseau J, Deckert A, Gow S, Reid-Smith RJ (2011) Clostridium difficile and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* shedding by slaughter-age pigs BMC Vet Res 7 41.
25. Wertheim HF, Vos MC, Boelens HA (2004) Low prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at hospital admission in the Netherlands: the value of search and destroy and restrictive antibiotic use J Hosp Infect 56, 321–325.
26. Wulf M, Van Nes A, Eikelenboom-Boskamp A (2006) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in veterinary doctors and students The Netherlands Emerg Infect Dis 12, 1939–1941.