



REZUMAT

Cuvinte cheie: *antibiorezistență, Enterobacteriaceae, ESBL, CTX-M,*

Teza de doctorat cu titlul „*Prevalența tulpinilor de Enterobacteriaceae producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) izolate din cecumul puilor de carne și implicațiile acestora asupra sănătății publice*” prezintă un număr de 227 pagini, fiind structurată conform uzanțelor în două părți: prima de studiu bibliografic, iar cea de a doua de cercetări proprii.

Prima parte intitulată „*Stadiul actual al cunoașterii*” cuprinde 57 pagini, și sintetizează pe parcursul a 5 capitole, principalele date bibliografice din literatura de specialitate, privind caracterele generale, biochimice și metabolice ale familiei Enterobacteriaceae, diagnosticul bacteriologic al enterobacteriaceaelor, clasificarea beta-lactamilor și mecanismele de acțiune ale acestora, clasificarea beta-lactamazelor cu spectru extins și descrierea unor tehnici de biologie moleculară, utilizate în identificarea markerilor de rezistență la antibiotice.

Partea a II-a, destinată cercetărilor proprii, însumează 141 pagini și cuprinde 9 capitole care descriu scopul și obiectivele tezei, rezultatele testelor fenotipice și moleculare efectuate pentru identificarea tulpinilor producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins și a genelor implicate în apariția rezistenței la beta-lactami și quinolone precum și diversitatea genetică a tulpinilor identificate. Fiecare capitol de cercetări are în cuprins material și metode de lucru, rezultatele obținute, cu discutarea lor și concluziile parțiale.

Lucrarea este ilustrată cu un număr de 57 figuri, 31 tabele și se bazează pe 196 titluri bibliografice.

Capitolul VI cuprinde Scopul și obiectivele cercetării. Ipoteza principală de testat este dacă puii broiler pot fi considerați o sursă de enterobacterii ESBL-producătoare pentru om, prin intermediul lanțului alimentar.



Obiectivele principale ale acestei cercetări au fost:

- Izolarea și identificarea tulpinilor de Enterobacteriaceae producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL)
- Determinarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor izolate
- Caracterizarea fenotipică a tulpinilor ESBL-producătoare
- Secvențierea probelor pozitive la screening-ul PCR, pentru identificarea tipului de gene prezente în cadrul colecției de tulpini obținute de la puii broiler, de la lucrătorii din abatorul AI și de la cazurile clinice umane
- Identificarea tipurilor de plasmide prezente la tulpinile de Enterobacteriaceae izolate
- Realizarea unor experimente de conjugare bacteriană pentru a vedea dacă genele de tip ESBL sunt cu ușurință transmise cu ajutorul plasmidelor prezente în cadrul tulpinilor bacteriene izolate
- Studiarea diversității genetice a tulpinilor de *Escherichia coli* folosind tehnica RAPD și MLST

Capitolul VII *Cercetări privind izolarea și identificarea tulpinilor de Escherichia coli, Klebsiella spp și Proteus spp.* Pentru izolare tulpinilor de Enterobacteriaceae s-au prelevat 127 eșantioane cecale de la puii broiler sacrificați în cadrul a două abatoare și 55 probe de fecale de la lucrătorii unuia dintre abatoare. Din cele 127 probe prelevate de la broileri s-au izolat 92 tulpini de Enterobacteriaceae, iar din probele prelevate de la lucrători s-au izolat 22 tulpini de Enterobacteriaceae. 38 de tulpini de *Escherichia coli* și *Klebsiella spp*, izolate din cazuri clinice umane au fost de asemenea incluse în acest studiu pentru realizarea investigațiilor moleculare comparative.

Identificarea de certitudine a speciei *Escherichia coli* s-a realizat prin teste moleculare-PCR, gena urmărită fiind *uidA*. Din totalul celor 114 tulpini de Enterobacteriaceae testate pentru gena *uidA*, 109 au fost confirmate ca aparținând speciei *Escherichia coli*. Tulpinile negative pentru gena *uidA*, au fost identificate folosind Sistemul Trek Diagnostic, fiind astfel identificate 2 tulpini de *Proteus mirabilis*, 2 tulpini de *Klebsiella oxytoca* și o tulpină de *Klebsiella pneumoniae*.

Din totalul celor 152 de tulpini ce alcătuiesc colecția de Enterobacteriaceae investigate în acest studiu, cele mai multe au aparținut speciei *Escherichia coli* (89,47%) urmate de 7,23% *Klebsiella pneumoniae*, 1,97% *Klebsiella oxytoca* și 1,37% *Proteus mirabilis*.



Capitolul VIII-Cercetări privind sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor izolate. Cele 152 de tulpini luate în studiu au fost testate pentru stabilirea sensibilității la 14 antibiotice. Acestea au fost: ampicilină (AMP), amoxicilină/acid clavulanic (AMC), cefpodoxim (CPD), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CTX), cefoxitin (FOX), imipenem (IMP), gentamicină (CN), streptomycină (S), tetraciclină (TE), rifampicină (RD), acid nalidixic (NA), ciprofloxacina (CIP).

Stabilirea profilului de rezistență la antibiotice s-a realizat prin metoda difuzimetrică. Procentul tulpinilor cu rezistență multiplă la antibiotice pentru întreaga colecție de tulpini utilizate în acest studiu a fost de 77,63%.

Tulpinile izolate de la puii broiler și cele izolate din cazurile clinice umane au înregistrat un nivel crescut de rezistență la mai multe clase de antibiotice testate 92%, respectiv 100%. La tulpinile izolate de la lucrătorii din unitatea AI, procentul celor cu rezistență multiplă a fost de 40,9%.

Profilele de rezistență înregistrate de tulpinile obținute de la broileri și cele obținute din cazuri clinice au fost foarte asemănătoare, cu excepția rezistenței la cefoxitin. Dintre antibioticele testate, imipenemul(carbapenem) a fost singurul antibiotic la care toate cele 152 de tulpini au fost sensibile.

Capitolul IX-Cercetări privind identificarea fenotipică a Enterobacteriaceaelor producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins. Confirmarea producerii de β -lactamaze cu spectru extins s-a realizat prin metoda discurilor combinate. Această metodă presupune folosirea discurilor de cefalosporine simple și a discurilor de cefalosporine potențate cu acid clavulanic. Cefalosporinele utilizate au fost: cefotaxime 30 μ g, cefotaxime/clavulanat 30 μ g/10 μ g, ceftazidime 30 μ g, ceftazidime/clavulanat 30 μ g/10 μ g, cefpodoxime 10 μ g și cefpodoxime/clavulanat de 10 μ g/1 μ g.

Au fost considerate tulpini ESBL-pozitive, tulpinile unde s-a înregistrat creșterea diametrul zonei de inhibiție de > 5 mm în prezența clavulanatului, comparativ cu discurile de cefalosporină fără clavulanat.

Cele 114 tulpini obținute de la broileri și de la lucrătorii AI, au fost testate, pentru identificarea fenotipurilor ESBL. Prevalența tulpinilor ESBL-producătoare a variat între 42,5% și 7,27%, la broileri, respectiv lucrători, în abatorul AI și 32,5% în abatorul AII.



*Capitolul X-Cercetări privind identificarea genelor de tip AmpC/ESBL, implicate în apariția rezistenței la antibioticele beta-lactamice, a urmărit identificarea a 6 gene de tip AmpC și 4 gene de tip ESBL. Protocolul de lucru a inclus teste PCR simplex și multiplex, precum și secvențierea izolațiilor pozitivi pentru confirmarea genelor identificate. Secvențele obținute au fost ulterior analizate cu ajutorul programelor informatice *preGap* și *gap4* și supuse unei analize *Blast* în vederea stabilirii identității lor, fiind comparate cu secvențe existente în baza de date *GenBank*.*

ANOVA-one way demonstrează că au existat diferențe semnificative statistic între cele trei categorii de probe analizate: $F(2,15)=3,82$, unde $p=0,046$

În cazul tulpinilor izolate de la puii broiler s-au identificat gene aparținând familiilor: TEM (39/92), SHV (30/92), CTX-M GRUP 1(27/92), CTX-M GRUP 9(5/92), CIT-M (48/92) și ACC (1/92).

Pentru tulpinile izolate de la voluntari, genele implicate în apariția rezistenței la beta-lactami identificate, au fost: TEM (8/22), SHV(9/38), ACC(1/22) și OXY-6(2/22).

Genele de rezistență la beta-lactami identificate la tulpinile izolate din cazuri clinice umane au fost: TEM (19/38), SHV(9/38) OXA(24/38) CTX-M GRUP 1(30/38) CTX-M GRUP 9(3/38) și CTX-M GRUP 2(1/38).

S-a putut observa o diferență în ceea ce privește prevalența genelor ESBL în cele două abatoare. Astfel în unitatea AI genele *blaCTX-M-3* au avut o prevalență cea mai ridicată, în timp ce în AII, prevalența ridicată s-a înregistrat pentru gena *blaCTX-M-15*. CTX-M-14, o beta-lactamază din grupul CTX-M-9, a fost identificată la broileri doar în unitatea AI, aceasta având o prevalență de 4,87%.

Dintre beta-lactamazele de tip ESBL, altele decât CTX-M, cea mai mare prevalență a avut-o SHV-12. Pentru beta-lactamazele din familia TEM, cele mai multe rezultate au fost TEM-1, aceasta enzimă nefiind încadrată în grupul beta-lactamazelor cu spectru extins.

La tulpinile izolate de la lucrătorii din unitatea AI, genele de tip ESBL identificate au fost *blaSHV-12* și *blaSHV-108* și *blaOXY-6*.

În cazul izolațiilor proveniți de la cazurile clinice umane, prevalența cea mai mare a înregistrat-o *blaCTX-M-15* 78,94%, urmată de *blaOXA-1* 63,15%,

Capitolul XI-Cercetări privind identificarea genelor mediate plasmidial, qnrA, qnrB, qnrS și aac(6')-ib-cr, implicate în apariția rezistenței la quinolone. Deoarece cel mai adesea tulpinile de Enterobacteriaceae rezistente la antibioticele beta-lactamice, prezintă rezistență și



la fluoroquinolone, pentru această grupă de antibiotice, investigațiile s-au realizat atât difuzimetric, cât și prin tehnici moleculare.

Pentru gena *qnrA* nu am identificat nici o tulpină pozitivă. *QnrB* și *qnrS* au înregistrat și ele prevalențe destul de scăzute, cuprinse între 2,17% și 9,09%.

Gena *aac (6')-Ib-cr* fost identificată la toate cele trei categorii de probe, dar prevalența acesteia a variat de la 3,26 % la broileri, 4,54% la lucrătorii AI, până la 63,15% la izolații din cazuri clinice umane.

Testul ANOVA *one-way* a arătat că nu există diferențe semnificative statistic între categoriile de probe analizate: $F(2,9)=0,77$ unde $p=0,491$.

În cazurile clinice umane, gena *aac-(6')-ib-cr*, a fost asociată cu *blaCTX-M-15*, *blaTEM-1* și *blaOXA-1*, această asociere fiind descrisă și de alte studii similare.

Capitolul XII-Cercetări privind diversitatea plasmidelor prezente la tulpinile izolate. Plasmidele reprezintă principalul mijloc de diseminare a unei mari varietăți de gene responsabile de apariția rezistenței la antibiotice. Bazându-se pe tipul de repliconi, Carattoli A., 2005 a imaginat o metodă de identificare plasmidială- PCR-based replicon typing(PBRT)

Metoda de lucru utilizată pentru identificarea repliconilor plasmidiali se bazează pe tehnica PCR.

Pentru a cerceta dacă genele de tip ESBL sunt cu ușurință transmise cu ajutorul plasmidelor prezente în cadrul tulpinilor bacteriene izolate, am realizat experimente de conjugare, metoda utilizată fiind conjugarea în bulion nutritiv, tulpina receptoare utilizată a fost *E coli Hb 101-streptomycin-rezistentă*.

PBRT a arătat că la cele mai multe dintre tulpinile testate, au fost identificați repliconi multipli. Doisprezece din cei 18 repliconi investigați au fost identificați la tulpinile testate, dintre care P, F, FIA, FIB, I și N au fost identificați la toate cele 3 categorii de probe investigate. Pentru tulpinile izolate de la broileri, cel mai adesea s-au identificat repliconii I1 (64/92)și F (62/92). Pentru tulpinile izolate din cazurile clinice umane, repliconii cu prevalența cea mai mare au fost F, FIA și FIB 55% (21/38), I1 având o prevalență destul de scăzută, de 11% (4/38).

Pentru 7/14 tulpini selectate pentru conjugare, prezența genelor de tip *blaCTX-M* a fost confirmată la conjugăți.Cel mai frecvent implicate în procesul de transfer de gene au fost plasmidele din grupul F și I1



Capitolul XIII-Cercetări privind diversitatea genetică a tulpinilor de E coli ESBL-producătoare. Un protocol rapid, bazat pe tehnica PCR multiplex, a permis încadrarea tulpinilor de *E. coli* în unul dintre cele patru grupuri filogenetice majore; A, B1, B2 și D. Tehnica se bazează pe un triplex PCR care folosește o combinație de două gene *chuA*, *yjaA* și un fragment de ADN cromozomial-*TspE4C2*.

Grupul clonal O25-ST131 a fost identificat la nivel mondial, și se pare ca este responsabil de răspândirea genelor de rezistență *blaCTX-M-15* dar și a genelor de rezistență la fluoroquinolone.(Mora, A. et al., 2010) *E coli* O25-ST131 este responsabilă de apariția diverselor afecțiuni la oameni, recent această clonă fiind identificată și la animale de companie, păsări și produse alimentare (carne de pasăre).(Ewers, C. et al., 2010; Rogers, B. A. et al., 2011) Pentru identificarea tulpinilor de *E. coli* ce aparțin serotipului O25 s-a utilizat o metodă de Simplex PCR, iar pentru ST131 un multiplex PCR.

Pentru analiza diversității genetice a tulpinilor de *E coli* izolate din cele trei surse, am utilizat două metode: RAPD și MLST.

RAPD s-a realizat folosind doi primeri diferiți, în două reacții PCR separate, rezultatele fiind analizate folosind *indicele de diversitate Simpson*.

Analiza MLST se bazează pe determinarea secvențelor nucleotidice pentru un număr de 7 gene de menaj ("*housekeeping genes*") care sunt supuse unor modificări foarte lente și minore din punct de vedere al polimorfismului și diversității. Cele 7 fragmente de interes sunt amplificate prin PCR și apoi secvențiate. După analiza tuturor secvențelor, se obține o combinație de 7 numere corespunzătoare variantelor alelice ale genelor analizate, pe baza căruia se obține *profilul alelic* sau *tipul de secvență (ST)*.

Cele 7 gene urmărite au fost: *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*. (<http://mlst.ucc.ie>) Metoda folosită pentru secvențiere a fost *in-house sequencing*, iar pentru analiza secvențelor s-a utilizat programul *ChromasPro 1.7.5*. Secvențele obținute au fost apoi au fost supuse unei analize prin compararea cu secvențe existente în *Escherichia coli* MLST Database, pentru stabilirea identității lor. (<http://mlst.ucc.ie>)

Filogrupul A a înregistrat cea mai mare prevalență în cadrul colecției noastre de tulpini de *E coli* investigate, de 33, 5%, urmat de filogrupul D 20,9%, B2 19,5% și B1 15,3%.

Escherichia coli O25-ST-131 fost identificată doar printre izolații proveniți din cazuri clinice umane.

Analiza RAPD, a arătat o mare diversitate genetică a tulpinilor de *Escherichia coli* izolate de la broileri, pentru 32 de tulpini analizate, obținându-se 29 de profile diferite. Pentru



tulpinile de *Escherichia coli* izolate din cazuri clinice umane pentru 27 de tulpini investigate s-au obținut 12 profile RAPD, subliniind un grad mai ridicat de înrudirea genetică a tulpinilor patogene circulante în spitalele umane și chiar persistența unor anumite clone care cauzează infecții nosocomiale.

Analiza MLST a confirmat rezultatele RAPD privind diversitatea genetică a tulpinilor de *Escherichia coli* investigate în acest studiu. Astfel pentru tulpinile izolate de la broileri, din 13 tulpini testate obținându-se 12 tipuri de secvență diferite, în timp ce la izolații obținuți din cazurile clinice umane pentru 11 izolați s-au obținut numai 6 tipuri de secvență diferite.

În capitolul XIV - *Concluzii finale. Limitele studiului și perspective de cercetare*, sunt structurate principalele aspecte desprinse în urma cercetărilor efectuate, sub forma a 29 concluzii finale.