

REZUMAT

Cuvinte cheie:

antibiorezistență, antibiotipare, identificare, Pseudomonas aeruginosa, RAPD

Teza de doctorat intitulată ”**Caracterizarea rezistenței la antibiotice a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană și animală în România**” este redactată în 8 capitole și este structurată în două părți distincte.

Prima parte intitulată „**Stadiul actual al cunoașterii**” a fost fundamentată teoretic pe consultarea unor surse bibliografice reprezentative și cuprinde 27 de pagini, reprezentând 18,75 % din volumul tezei. Informațiile au fost sintetizate în 2 capitole și 6 subcapitole cu referire la: ecologia și epidemiologia speciei *Pseudomonas aeruginosa*, implicarea acestei bacterii în patologia umană și animală; rezistența la antibiotice a izolatelor de *Pseudomonas aeruginosa* și mecanismele de acțiune antimicrobiană a acestora; tehnicile fenotipice și moleculare de testare și identificare a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa*, în vederea identificării fenotipurilor rezistente la antibioticele utilizate în terapia specifică.

Partea a II-a, include „**Contribuțiile proprii**”, prezentate în 117 de pagini, reprezentând 81,25% din lucrare și cuprinde 6 capitole și 9 subcapitole, care descriu scopul și obiectivele, cadrul instituțional în care s-au desfășurat cercetările, metodele folosite pentru izolarea și identificarea tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa*, studiul antibiorezistenței la tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană și animală, cu analiza sensibilității la antibiotice a tulpinilor izolate și identificarea tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* producătoare de ESBL și MBL prin metode fenotipice; verificarea existenței unei legături între izolatele de origine umană și animală prin metodă fenotipică (antibiotiparea) și moleculară (RAPD-PCR).

Lucrarea însumează 24 de tabele și 99 de figuri, iar bibliografia cuprinde 94 de titluri bibliografice.

Capitolul 3, cuprinde “**Scopul și obiectivele cercetării**”. Cercetările efectuate au urmărit determinarea sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* la antibioticele folosite în terapie și încadrarea lor în fenotipuri de rezistență și testarea comparativă a metodelor fenotipice de identificare a tulpinilor rezistente la antibiotice, în vederea stabilirii unor metode optime de detectare corectă și precoce a antibiorezistenței în condițiile unui laborator

clinic, având ca scop final antibioterapia țintă în infecțiile cu *Pseudomonas aeruginosa*.

Obiectivele propuse: 1. determinarea profilului de sensibilitate la antibiotice a tulpinilor de *P. aeruginosa* izolate de la animale și de la oameni; 2. recomandarea, pe baza cercetărilor efectuate a unui protocol de identificare și supraveghere a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* multidrog-rezistente; 3. stabilirea unei legături genetice a tulpinilor de origine umană cu cele de origine animală; 4. identificarea și declararea în timp util a infecțiilor cu *Pseudomonas aeruginosa* atât în clinicile veterinare cât și umane pentru a preveni apariția și evoluția focarelor de infecție nosocomială; 5. valorificarea și diseminarea rezultatelor obținute prin prezentarea lor la manifestări naționale și internaționale.

Capitolul 4 prezintă cadrul instituțional în care s-au desfășurat cercetările.

În capitolul 5 intitulat "Izolarea și identificarea tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa*", sunt prezentate etapele examenului bacteriologic desfășurate în vederea identificării și confirmării tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* izolate. În urma investigațiilor efectuate au fost izolate și confirmate molecular 125 de tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de la pacienții umani și 57 de tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de la animale. Tulpinile de origine umană au provenit din aspirate bronșice (15%), aspirate gastrice (12%), lichide pleurale (10%), colecții purulente post-operatorii (21%), secreții auriculare și oculare (20%), probe de spută (10%), probe de urină (12%). Cele de origine animală au fost recoltate din otite (30%), abcese perianale (44%), septicemii (14%), conjunctivite (12%).

Capitolul 6 intitulat "**Studiul antibioresistenței la tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană și animală**". Eficiența unui tratament cu antibiotice este condiționată, în primul rând, de sensibilitatea agentului patogen față de antibioticul respectiv, proprietate care se apreciază "in vitro" prin antibiogramă. Scopul esențial al acestor investigații a fost acela de a ajuta decizia terapeutică, fiind utilă în: supravegherea epidemiologică a rezistenței bacteriene care va orienta ulterior schemele de antibioterapie; compararea fenotipurilor de rezistență a tulpinilor presupus responsabile de infecția nosocomială și verificarea corectitudinii identificării bacteriene, prin punerea în evidență a rezistenței naturale. Toate tulpinile au fost testate față de cele 13 antibiotice care sunt uzual recomandate în patologia infecțioasă produsă de *Pseudomonas aeruginosa*.

Din aspirate bronșice prelevate de la pacienți umani (H-1) s-au izolat 19 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* și dintre acestea 5,27% au fost simultan rezistente la toate cele 13 antibiotice. Un aspect pozitiv este faptul

că 15,78% din tulpinile testate au manifestat sensibilitate față de toate antibioticele testate.

Din aspirate gastrice prelevate de la pacienții umani (H-2), s-au izolat 15 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, 6,66% dintre tulpini fiind simultan rezistente la 11, 8, 7, 3, 2, 1 dintre antibioticele testate, 60% de tulpinile testate au manifestat sensibilitate simultană la toate cele 13 antibiotice testate. Nu s-a izolat nici o tulpină multirezistentă față de antibioticele testate.

Izolatele de *Pseudomonas aeruginosa* din lichidele pleurale (12 tulpini) (H-3), 8,33% au fost simultan rezistente la 9 antibiotice și la 3 antibiotice.

Cele 12 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din spută (H-4), 7,69% au fost simultan rezistente: față de 11 antibiotice; 23,07% tulpini față de 10 antibiotice; 15,34% față de 9 antibiotice; 15,34% tulpini față de 2 antibiotice și 7,69% dintre tulpini au manifestat rezistență la un singur antibiotic; 12 tulpini testate la grupul H-4, 8 tulpini au fost rezistente la IPM, MEM.

Din cele 15 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din probe de urină (H-5), 20% dintre tulpini au prezentat simultan rezistență față de: 11 antibiotice, 13,33% tulpini față de 10 antibiotice; 33,33% dintre tulpini au manifestat rezistență la un singur antibiotic.

Din 25 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din secreții otice de la pacienții umani (H-6), 4% tulpini au fost simultan rezistente față de 10 și respectiv 8 antibiotice.

Tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din colecții purulente (26 tulpini) (H-7), 3,84% au fost rezistente la 13 antibiotice.

Din secrețiile otice provenite de la animale (A-1), s-au izolat 17 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, 11,76% dintre acestea au fost rezistente la 13 antibiotice. Toate cele 17 tulpini testate au fost rezistente la PIP și TAZ.

Din colecțiile purulente perianale provenite de la animale (A-2) s-au izolat 25 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* din care: 36% au fost rezistente la cele 13 antibiotice testate.

Grupul A-3: 8 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din hemoculturi provenite de la animale (A-3), 25% au fost rezistente la 12 antibiotice, 7 tulpini au fost rezistente la PB și ATM, 6 tulpini au fost rezistente la MEM, 5 tulpini au fost rezistente la CIP și IPM, 3 tulpini au fost rezistente la TOB și 2 tulpini au fost rezistente la AK. Toate cele 8 tulpini testate au fost rezistente la TZP, PIP, FEP, CAZ și TAZ.

Din probele de secreții conjunctivale provenite de la animale (A-4) s-au izolat 7 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* din care, 71,42% au fost rezistente la toate antibioticele testate. Toate cele 7 tulpini testate au fost rezistente la TZP, CAZ, FEP, CIP, GN, PB, PIP, ATM.

Utilizarea mediului de cultură Briliance ESBL a permis creșterea și multiplicarea a 68% din tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană și 100% tulpinile de origine animală.

În urma testului de sinergie între două comprimate pentru detectarea ESBL lotul de tulpini testat nu a prezentat zone de inhibiție sugestive/relevante pentru identificarea tulpinilor de ESBL, respectiv creșterea zonei de inhibiție în jurul antibioticului potențat cu inhibitor β -lactamază. Prin metoda discurilor combinate (Oxoid/Becton Dickinson - "Combination Discs" și Mast "MAST DD") s-a evidențiat o creștere a diametrului de inhibiție cu > 5 mm în prezența clavulanatului, ceea ce indică prezența de ESBL.

Metoda discului combinat imipenem-EDTA pentru depistarea metalo- β -lactamazelor, aplicată doar pe tulpinile care au fost rezistente la imipenem (52 tulpini de origine umană și 37 de origine animală) a surprins prin faptul că toate aceste tulpini elaborează enzime metalo-beta-lactamaze. Pentru susținerea rezultatului, aceleași tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, au fost testate și cu E-test MBL. Rezultatele au confirmat faptul că cele 89 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, testate pentru metalo-beta-lactamaze, au fost pozitive la acest test.

În **capitolul 7** intitulat "**Supravegherea epidemiologică a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa***", sunt prezentate datele privind supravegherea epidemiologică a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* obținute prin antibiotipare și teste moleculare.

Antibiotiparea izolatelor s-a realizat cu programul UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) / Quantity One Software (Bio – Rad Laboratories, SUA), lotul studiat a fost împărțit în 2 grupuri, primul cuprinzând 125 tulpini de origine umană și 57 tulpini de origine animală. Conform acestor rezultate; 57 de tulpini de origine animală izolate au fost colectate în 4 grupe principale (A1-A4) pe bază de 70% similitudini. Pe de altă parte, 125 izolatele umane au fost colectate în 7 grupe principale (H1-H7) la 70% similitudine. Antibiotiparea este o metodă prin care se identifică un tipar dintr-un lot total analizat, cu ajutorul lui se poate urmări într-un circuit închis proveniența tulpinilor izolate (ferme, spitale etc.). Antibiotiparea poate fi utilizată ca metodă de supraveghere epidemiologică.

Tulpinile analizate cu tehnica moleculară RAPD prezintă un grad ridicat de înrudire genetică, ceea ce poate concluziona că tulpinile provin din același mediu și informația genetică se transmite de la o tulpină la altă.

Tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* au fost grupate în funcție de proveniența lor: 125 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană, reunite în 7 grupe (H1-H7); 57 de tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de

origine animală, reunite în 4 grupe (A1- A4), izolate din: secreții auriculare, abcese perianale, septicemii și secreții conjunctivale.

Grupul H-1 (aspirate bronșice) a fost alcătuit din 3 cluster, fiecare cluster având coeficient diferit de înrudire genetică: cel mai mare grad este atribuit primului cluster, H1 – RD1, H1 – RD2 și H1 – RD3, respectiv tulpinile 115, 78 și 53, înrudirea profilelor din interiorul lui fiind de 80% - 85 %; al 2-lea cluster are coeficient de similitudine de 71%, H1 – RG1 și H1 – RG2, reprezentat de tulpinile 59 și 52, similar primului cluster cele două tulpini la antibiotipare au făcut parte din același cluster; al 3-lea cluster are un grad de înrudire genetică de la 75% la 84%, acest cluster predomină în grupul analizat. Relaționarea între tulpinile 115 și 53 a fost identificată și la antibiotipare, cele două tulpini aparținând aceluiași cluster, ceea ce confirmă înrudirea lor genetică.

Grupul H-2 (aspirate gastrice) a inclus 14 tipuri de profile genetice din care 4 sunt de tip unic: primul cluster cuprinde 3 tipuri de profile cu grad de înrudire genetic de 84%; cu predominanță în grup este cel de-al 2-lea cluster, cu coeficient de înrudire de 75%, clusterul fiind format din 7 tipuri de profile; un grad înalt de înrudire este reprezentat de perechea de profile H2 – RF6 și H2 – RF7, fiind vorba de tulpinile 23 și 12

Grupul H-3 (lichide pleurale) a inclus 2 cluster: primul având coeficient de similitudine de 77% și este format din 2 tipuri de profile; al 2-lea cluster, ce predomină în grup, are 4 tipuri de profile, astfel grupul are 10 tipuri de profile din care 4 sunt de tip unic. Înrudirea genetică ce depășește procentul de 90% o întâlnim între profilele H3 – RF3 și H3 – RF4, fiind reprezentate de tulpinile 90 și respectiv 87. La antibiotipare cele două tulpini au prezentat un coeficient de similitudine de 0,78, similitudine fiind acum dovedită prin înrudirea genetică de 90%.

Grupul H-4 (spută) a inclus 3 cluster și 4 profile genetice de tip unic: primul cluster are 2 tipuri de profile genetice, coeficientul de înrudire depășește pragul stabilit de 0,70; cel de-al 2-lea cluster este înrudit într-un procent de 72%, fiind format din profilul H4 – RE1 și H4 – RE2, respectiv tulpinile 98 și 97; ultimul cluster este format din 4 tipuri de profile genetice, gradul lor de înrudire variază de la 71% la 76%. Toate tulpinile din acest grup provin de la pacienți cu aceeași patologie de fond, respectiv pacienți diagnosticați cu Fibroză chistică.

Grupul H-5 (uroculturi) a inclus 3 cluster și 3 tipuri unice de profile genetice: primul cluster este format din 2 tipuri de profile genetice, având coeficient de înrudire de 79%. cel de-al 2-lea cluster, cu procentajul de înrudire superior primului, 82%, este format din 2 tipuri de profile, H5 – RE1 și H5 – RE2, fiind vorba de tulpinile 114 și 22 izolate de la pacienți cu patologii

de fond diferite, având în comun mediul de proveniență; ultimul cluster, predominant în acest grup, este format din 7 tipuri de profile cu diferite procente de similitudine, de la 74% până la 92%. Cel mai mare procentaj de înrudire fiind la perechea de profile H5 – RF1 și H5 – RF2, reprezentate de tulpinile 51 și 32, aceste izolate provin de la pacienți diferiți cu patologii diferite.

Grupul H-6 (secreții auriculare) a inclus 4 clusteruri cu 20 de tipuri de profile genetice și 2 profile genetice unice: primul cluster fiind reprezentat de 2 profile ce au coeficient de înrudire de 0,78. Similar primului cluster, al 2-lea și al 3-lea cluster cuprind câte 2 tipuri de profile genetice având coeficient de înrudire inferior primului, respectiv de 0,71 și 0,75, înrudirea lor fiind semnificativă deoarece depășește pragul de 0,70 stabilit prin formulă matematică. Al 4-lea cluster cuprinde 12 tipuri de profile genetice, cu procentaje diferite de înrudire genetică, de la 74% până la 90%. H6 – RF11 și H6 – RF12, reprezentate de tulpinile 112 și 103, 105, 121 care au profilele genetice identice de 90%, ele au fost izolate de la pacienți diferiți, internați în unități diferite deoarece patologii de fond nu au fost similare.

Grupul H-7 (colecții purulente postoperatorii) a inclus 3 clusteruri cu 21 de tipuri de profile genetice și 7 profile de tip unic: primul cluster are coeficient de înrudire de 0,71, în interiorul lui ajungându-se până la 92% înrudirea genetică. Al 2-lea cluster este alcătuit din 5 tipuri de profile, coeficientul de înrudire variază de la 0,74 până la 0,90. H7 – RI1 și H7 – RI2, reprezentate de tulpinile 38 și 26 au profilul genetic înrudit în proporție de 90%, izolatele provin de la pacienți diferiți cu patologii de fond diferite. Al 3-lea cluster analizat este format din 6 tipuri de profile genetic înrudite în procentaj de 73% până la 93%. Profile H7 – RJ5 și H7 – RJ6, reprezentate de tulpinile 107 și 99, au coeficient de înrudire de 0,93. Izolatele provin de la pacienți care provin din același mediu social, cu aceeași vârstă, dar cu patologii de fond diferite de tip cronic.

Grupul A-1 (exsudate otice) a inclus 2 clusteruri cu 9 tipuri de profile genetice: primul cluster cuprinde 3 tipuri de profile cu coeficient de înrudire de 0,73; cel de-al 2-lea cluster este format din 6 tipuri de profile, înrudirea genetică variază de la 72% până la 94%. Profilele A1 – RB5 și A1 – RB6, reprezentate de tulpinile 140 și 131 au gradul superior de înrudire genetic.

Grupul A-2 (colecții purulente perianale) a inclus 3 clusteruri cu 18 tipuri de profile genetice și 5 profile de tip unic: primul cluster este format din 2 profile cu coeficient de înrudire genetic de 0,72. Al 2-lea cluster însumează 3 tipuri de profile cu variații ale coeficientului de înrudire de la 0,71 până la 0,83. Al 3-lea cluster din acest grup, predominant de altfel, cuprinde 7 tipuri de profile genetice, similar celui de-al 2-lea cluster și aici întâlnim variații ale coeficientului de înrudire, de la 0,72 până la 0,86. Tulpinile ce reprezintă

profilele genetice din ultimul cluster au în comun rezultatele la antibiogramă, unde întâlnim o rezistență de aproximativ 100%.

Grupul A-3 (hemoculturi) a inclus un cluster cu 5 tipuri de profile genetice și un singur profil de tip unic. Clusterul are coeficient de înrudire de 0,74. În interiorul lui profilul A3 – RB3, reprezentat de tulpinile 149, 150, 151 și 156 și profilul A3 – RB4 reprezentat de tulpina 139 prezintă 88% înrudire genetică.

Grupul A-4 (secreții conjunctivale) a inclus un cluster cu 3 tipuri de profile genetice și un singur profil de tip unic: coeficientul de înrudire ajunge până la 79%. A4 – RB2 și A4 – RB3. Tulpinile prezintă 79% grad de înrudire iar profilul de rezistență este aproximativ identic la aceste tulpini, care provin de la specii diferite (iepure, pisică, și câine).

Analiza de grup, realizată pe tulpinile reprezentative fiecărui profil a evidențiat un singur cluster și 6 profile de tip unic. Clusterul este format din 5 tipuri de profile genetice, fiecare profil este reprezentat de câte un izolat din grupe diferite: TRG1 – H1 (aspirate bronșice recoltate de la oameni), TRG2 – A4 (secreții otice izolate de la animale de companie), TRG3 – A3 (septicemii de la animale), TRG4 – H7 (izolate din secrețiile purulente postoperatorii de la oameni), TRG5 – A2 (izolate din abcese perianale de origine animală). Cele 6 profile de tip unic sunt: TRA – H4 (izolate din spută), TRB – H6 (izolate din secreții otice), TRC – H3 (izolate din lichide plurale), TRD – A1 (izolate din secreții otice), TRE – H5 (izolate din probe de urină), TRF – H2 (izolate din aspirate gastrice). În interiorul clusterului procentele de înrudire genetică variază de la 73% până la 91%. Profilul cu cel mai mare procentaj de înrudire, respectiv 91%, format din TRG4 – H7 și TRG5 – A2, a fost reprezentat de tulpinile izolate de la oameni din secrețiile postoperatorii și tulpini izolate din abcese perianale de la animale care au 91% procentul de înrudire genetică.

În capitolul 8 intitulat "**Concluzii finale și recomandări**", sunt structurate 9 concluzii principalele și 9 recomandări, desprinse în urma investigațiilor efectuate.