

SEMNIIFICAȚIA TESTELOR  
DE BIOLOGIE MOLECULARĂ  
ÎN DETECTAREA UNOR MARKERI AI  
REZISTENȚEI *E. COLI* LA ANTIBIOTICE

Olga BURDUNIUC<sup>1</sup>,  
Radu COJOCARU<sup>1</sup>, Iurie ROȘCIN<sup>2</sup>, Constantin SPĂNU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centrul Național de Sănătate Publică,

<sup>2</sup>Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

### Summary

#### **Significance tests for detection of molecular biology *E. coli* markers the antibiotic resistance**

*In the current context of rapid increase in the prevalence of resistant strains of Enterobacteriaceae, the need to use methods of molecular biology is becoming increasingly stringent, which is far more sensitive than phenotypic testing and surveillance and epidemiological monitoring of strains producing CTX-M are important in determining treatment tactics for review empirical treatment protocols. Our study is something new for our country by molecular analysis of plasmid genes with great potential for the communities.*

**Key words:** antibiotic resistance, monitoring, phenotype, molecular biology, extended spectrum beta-lactamases, CTX-M.

### Резюме

#### **Значение биолого-молекулярных тестов для определения маркеров резистентности кишечной палочки к антибиотикам**

*В нынешних условиях быстрого роста и распространенности резистентных штаммов Enterobacteriaceae, необходимо использовать методы молекулярной биологии, являющиеся гораздо более чувствительными, чем фенотипическое тестирование. Эпидемиологический мониторинг штаммов, продуцирующих CTX-M, является важным для определения тактики лечения и рассмотрения эмпирических протоколов лечения. Проводимые нами исследования, молекулярный анализ плазмидных генов с большим потенциалом распространения в лечебно-диагностических учреждениях, являются новыми для нашей республики.*

**Ключевые слова:** устойчивость к антибиотикам, мониторинг, фенотип, молекулярная биология, бета-лактамазы расширенного спектра, CTX-M.

### Actualitatea temei

Rezistența microorganismelor la preparatele antibacteriene reprezintă o problemă majoră pentru sistemul de sănătate publică, atât la nivel național, cât și la nivel global. Infecțiile produse de microorganisme rezistente determină nivelul înalt de morbiditate și mortalitate, din cauza eșecurilor terapeutice, și costuri tot mai ridicate pentru îngrijirile medicale. Particularitățile și dimensiunile fenomenului de antibioretistență sunt identificate prin metode de laborator și demonstrate prin evoluția clinic nefavorabilă a pacienților [5, 10, 12].

Principalele cauze ale creșterii rezistenței la antibiotice sunt utilizarea necorespunzătoare și prescrierea neîntemeiată a acestor preparate prin interpretarea greșită a simptomelor, diagnosticul incert și așteptările percepute ale pacientului, durata prea lungă/prea scurtă sau doza nepotrivită de administrare, automedicația; utilizarea antibioticelor în sectorul veterinar; arsenalul sărac de măsuri de diagnostic, medicamente și vaccinuri; supravegherea și controlul insuficiente asupra utilizării medicamentelor [3, 7].

Există două tipuri de rezistență la antibiotice: rezistență naturală și cea dobândită. Rezistența naturală este o rezistență intrinsecă, determinată genetic, a bacteriilor față de anumite antibiotice, fiind transmisă la descendenți [9, 13].

De o importanță clinică și științifică este fenomenul de rezistență dobândită. Rezistența dobândită se referă la tulpinile dintr-o specie sau un gen bacterian, existând prin dobândirea unui mecanism sau a mai multor mecanisme de rezistență, care determină un fenotip de rezistență, diferit de fenotipul sălbatic și caracteristic tulpinilor care au dobândit acest mecanism [6].

Mecanismele rezistenței dobândite au ca suport genetic elemente mobile (plasmide, transpozoni), ele având capacitatea de a fi transmisibile orizontal, uneori între specii diferite. Aceste mecanisme sunt mai bine cunoscute decât mecanismele rezistenței naturale [2].

Mecanismele de rezistență dobândită se împart în trei categorii: scăderea cantității de antibiotic care atinge ținta prin diminuarea permeabilității sau prin apariția sistemelor de eflux, modificarea țintei antibioticului și inactivarea antibioticului [4].

Dificultăți în tratamentul bolilor infecțioase apar mai des în cazul infecțiilor determinate de tulpini producătoare de BLSE (beta-lactamaze cu spectru extins) – enzime ce dezvoltă rezistență la un spectru extins de antibiotice [15]. Apariția tulpinilor de *Enterobacteriaceae* producătoare de BLSE este în prezent o amenințare puternică, din punct de vedere al efica-

cității utilizării antibioticelor în terapia infecțiilor pe care le produc [8].

Analizând datele literaturii de specialitate putem evidenția un șir de metode fenotipice și genotipice pentru determinarea tulpinilor secretorii de BLSE [14, 16]. Tipul exact de beta-lactamază nu poate fi detectat cu ajutorul testelor de rutină (disc-difuzimetrică, teste cromogene etc.). Asocieră mai multor tipuri de beta-lactamaze la același microorganism face și mai dificilă depistarea corectă. Studiile efectuate de alți cercetători demonstrează importanța tehnicilor de biologie moleculară în detectarea BLSE [1, 11].

Detectarea corectă a tulpinilor producătoare de BLSE, CTXM rămâne o provocare pentru laboratorul de microbiologie și este foarte importantă pentru a evita eșecul clinic datorat unei antibioterapii neadecvate.

Scopul studiului propus a fost de a identifica fenotipurile de rezistență circulante printre tulpinile de *E.coli* în arealul nostru geografic și de a dovedi mecanismul molecular determinant al rezistenței, prin detectarea prezenței unor markeri de rezistență (beta-lactamaze), utilizând metodele fenotipice și de biologie moleculară.

### Materiale și metode

Pentru realizarea studiului au fost recoltate 118 probe de urină și mase fecale de la persoanele cu diagnostic de infecții ale tractului urinar (ITU). Studiul a fost organizat în baza Institutului de Cercetări Științifice în Domeniul Ocrotirii Sănătății Mamei și Copilului, Spitalului Clinic Municipal nr. 1, Spitalului *Sfânta Treime*, Centrul de diagnostic „*Modus Vivendi*”. Cercetările au fost realizate în laboratorul Centrului *Epidemiologia bolilor extrem de contagioase și securitate biologică* al Centrului Național de Sănătate Publică, în colaborare cu laboratorul de bacteriologie al Spitalului *Bichat-Claude Bernard*, Paris, Franța.

Probele de urină au fost însămânțate pe mediile de diagnostic diferențial: Endo, geloză sânge, geloză hipersalină cu ou, Enterococ agar, Mueller Hinton, Sabouraud. Pentru cercetare au fost selectate doar tulpinile izolate din uroculturi semnificativ pozitive ( $\geq 10^5$  UFC/ml). Tulpinile de *E. coli* au fost identificate după gen și/sau specie prin teste biochimice clasice (testul Voges-Proskauer, cu indol, uree, citrat, al fenilalanindezaminazei etc.). Testele de confirmare au fost realizate prin utilizarea galeriilor API 20E (*Biomerieux*, Franța). Etapa ulterioară a cercetării a inclus testarea sensibilității tulpinilor de *E. coli* la preparatele antimicrobiene prin metode fenotipice (disc-difuzimetrică Kirby-Bauer, testul de sinergie – difuzarea bidimensională a 2 discuri cu antibiotice)

și de biologie moleculară (reacția de polimerizare în lanț, secvențierea, PCR multiplex, Rep – PCR).

Rezultatele au fost evaluate în conformitate cu recomandările ghidului *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI M100-S20, 2010). Tulpina de *E. coli* ATCC 25922 a fost utilizată ca tulpină de referință pentru testarea sensibilității la antibiotice pe mediile de cultură utilizate.

Testarea sensibilității tulpinilor de *E. coli* la preparatele antimicrobiene a inclus următoarele clase de antibiotice: beta-lactamice – amoxicilină (AMX), ticarcilină (TIC), amoxicilină/clavulanat (AMC), cefotaxim (CTX), ceftazidim (CAZ), ceftoxitin (FOX), cefepim (FEP), ertapenem (ETP); aminoglicozide – gentamicină (GM), ampicilină (AN), kanamicină (K); fluorochinolone – acid nalidix (NA), ofloxacină (OFX), ciprofloxacina (CIP); tetraciline – tetracilină (TE) și sulfamide – cotrimoxazol (trimetropim-sulfametoxazol) (SXT).

### Rezultate obținute și discuții

Rezistența microbiană la antibiotice reprezintă o problemă globală de sănătate publică, fiind datorată, în mare măsură, consumului inadecvat de antibiotice. În Europa fenomenul de antibioretistență este în continuă creștere. Infecțiile tractului urinar se referă la maladiile infecțioase frecvent întâlnite în practica medicală, ce înregistrează o incidență și o prevalență înalte, cu consecințe medicale și economice considerabile. Tulpinile implicate în etiologia ITU sunt parte a studiilor epidemiologice și bacteriologice în ultimii ani [2,18].

Rezultatele unor studii denotă că *E. coli*, germenele ce reprezintă microflora normală a tractului gastrointestinal, în anumite condiții capătă o rezistență semnificativă la preparatele antibacteriene și poate provoca infecții intestinale și extraintestinale (inclusiv urinare) [14, 15].

Conform datelor studiilor referitoare la frecvența și structura etiologică a infecțiilor urinare, în proporție de 95% din cazuri acestea sunt determinate de agenții din familia *Enterobacteriaceae* (dintre care în 80-95% cazuri – *E. coli*, mai rar – *Proteus* spp. sau *Klebsiella* spp.), iar în restul cca 5% cazuri de *Pseudomonas aeruginosa*, stafilococi, levuri din genul *Candida* etc. [7, 9, 14, 15,16].

Rezultatele testelor biochimice de screening și de confirmare a enterobacteriilor au pus în evidență faptul că din totalul de tulpini izolate de la pacienții cu ITU, predominante au fost tulpinile de *E. coli* (92,9%).

Tulpinile de *E. coli* izolate de la pacienții cu ITU au fost testate pentru identificarea gradului de rezistență la 5 clase de antibiotice. Determinarea

rezistenței la antibiotice prin metoda disc-difuzimetrică Kirby-Bauer a evidențiat că tulpinile de *E. coli* studiate posedă un înalt grad de rezistență, inclusiv la preparatele antibacteriene beta-lactamice. Totodată, metoda difuzimetrică nu oferă date suficiente pentru aprecierea nivelului de rezistență și monitorizarea corectă a terapiei antibacteriene.

Au fost utilizate testele de sinergism, prin care s-a putut elucidă unul dintre mecanismele de rezistență la antibiotice a tulpinilor de *E. coli* – prezența beta-lactamazelor. Acest test utilizează un inhibitor de beta-lactamază, de obicei acidul clavulanic, în combinație cu o oximino-cefalosporină, cum ar fi ceftazidimul, cefotaximul, ceftriaxona. Discurile cu antibioticele respective au fost amplasate în așa mod ca să fie posibilă vizualizarea imaginii de sinergie între discurile cu amoxicilină/acid clavulanic și cele cu cefalosporine de generația a III-a (CG3). Succesiunea amplasării discurilor corespunzătoare a fost următoarea: TIC – FOX – FEP – AMX – GM – CAZ – AMC – CTX.

Ca urmare am stabilit că din 118 tulpini de *E. coli*, izolate din uroculturi, 99 tulpini de *E. coli* prezintă rezistență la ticarcilină, 49 – tulpini la amoxicilină, 26 tulpini – la cotrimoxazol, câte 21 tulpini – la acidul nalidixic și ofloxacină, 18 tulpini – la ciprofloxacina și 7 tulpini de *E. coli* – la alte antibiotice (figura 1).

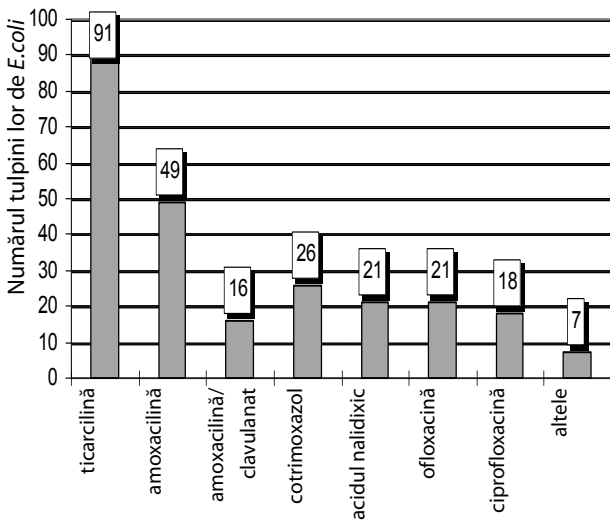


Figura 1. Profilul de rezistență a tulpinilor de *E. coli*.

Tulpinile de *E. coli* producătoare de betalactamaze au fost conservate în mediul ce conține bulion de inimă de bou și 10% de glicerină, apoi au fost stocate prin refrigerare la -80°C, pentru a fi ulterior testate prin tehnicile de biologie moleculară. Conduita terapeutică adecvată necesită identificarea rapidă și corectă a tulpinilor rezistente la antibiotice prin utilizarea acestor tehnici.

Am determinat că tulpinile date prezintă rezistență la următoarele grupe de antibiotice: aminoglicozide în special – gentamicină (72%), fluorchinolone – acidul nalidixic (89%) și sulfamide – cotrimoxazolul (72%). Tulpinile izolate din masele fecale de asemenea sunt poli rezistente. Ele sunt rezistente la aceleași clase de preparate antimicrobiene ca și *E. coli* BLSE izolate din urină: 53% – la aminoglicozide (gentamicină), 56% – la fluorchinolone (ciprofloxacina), 44% – la sulfamide (co-trimoxazol).

Tulpinile de *E. coli* BLSE, izolate din probele de urină, au fost în exclusivitate de tip CTX-M, și anume: o tulpină tip CTX-M-1; 3 tulpini de tip CTX-M-14; alte 3 tulpini – de tip CTX-M-15. Tulpinile de *E. coli* BLSE depistate din probele de mase fecale au fost predominant de tip CTX și doar o enzimă de tip SHV. Spre deosebire de tulpinile urinare, acestea au fost relativ mai variate, și anume: o tulpină CTX-M-1; 2 tulpini CTX-M-3; 8 tulpini CTX-M-14 și 3 tulpini CTX-M-15.

Clonalitatea tulpinilor de *E. coli* BLSE depistate în urină și masele fecale a fost cercetată prin metoda Rep-PCR doar la patru tulpini la care au fost prezente BLSE atât în urină, cât și în masele fecale (U + / F +). La trei din cele patru tulpini a fost prezent un profil Rep-PCR similar.

Determinând grupa filogenetică a tulpinilor urinare, s-a constatat că 58,5% tulpini de *E. coli* BLSE reprezintă grupa B<sub>2</sub>, 27,9% – grupa A, 12,7% – grupa D și 0,9% – alte grupe. Tulpinile depistate din masele fecale au următoarea diversitate filogenetică: 53,4% – grupa A, câte 23,1% – grupa B<sub>2</sub> și grupa D, și 0,4% – alte grupe (figura 2).

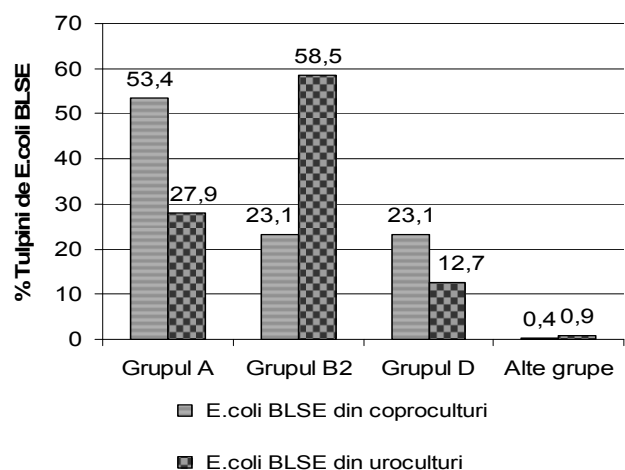


Figura 2. Grupele filogenetice ale tulpinilor *E. coli* BLSE.

Monitorizarea fenotipică și genotipică a markerilor de rezistență la antibiotice în populația umană reprezintă un element constitutiv al unui sistem

național de supraveghere a fenomenului de rezistență antimicrobiană, care urmează să fie dezvoltat în Republica Moldova ca parte componentă a supravegherii de stat a sănătății publice.

### Concluzii

1. Metodele de biologie moleculară utilizate au implicat costuri relativ mari, dar au furnizat rezultate reproductibile în timp foarte scurt, detectând la tulpinile de *E.coli* izolate din uroculturi și coproculturi BLSE – marker de rezistență la antibioticele beta-lactamine.
2. Circulația tulpinilor de *E.coli* secretorii de BLSE tip CTX-M pe teritoriul Republicii Moldova demonstrează complexitatea mecanismelor de rezistență, ceea ce impune măsuri constante de urmărire a răspândirii acestor tulpini, întrucât opțiunile terapeutice sunt reduse și pot duce la evoluții fatale. Este nevoie de o supraveghere permanentă a fenomenului de rezistență și de o analiză moleculară a patogenilor.

### Bibliografie

1. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E., *Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group*. Appl. Environ. Microbiol., 2000, p. 34-39.
2. Coculescu B., Flueraș M., *Mecanismul mutațiilor genice*, Revista de Medicină Militară, 2005, p. 325-333.
3. Decoster A., et al., *Cours de Bactériologie en ligne. Resistance aux antibiotique. Faculté Libre de Médecine, Université Catholique de Lille*, 2008. <http://anne.decoster.free.fr/bindex.html> (vizitat 18.02.2012).
4. Jehl F., et al., *De l'antibiogramme à la prescription*, 2<sup>eme</sup> édition, BioMérieux, 2004, 452 p.
5. Kang C.I., Kim S.H., et al., *Bloodstream infections due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase – producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy*, Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2004, vol. 48, p. 4574-4581.
6. Ladely S., et.al., *23S rRNA Gene Mutations Contributing to Macrolide Resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli*, Foodborne Pathogens and Disease, 2009, p. 19-24.
7. Lepper P., et al., *Consumption of imipenem correlates with beta-lactam resistance in Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrob Agents Chemother, 2002, Sep., p. 2920-2925.
8. Livermore D., et al., *CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, vol. 59, p. 165-174.
9. Mihăescu G., Chifiriuc M., Duțu L., *Antibiotice și substanțe chimioterapeutice antimicrobiene*, București: Editura Academiei Române, 2007, 246 p.
10. Negru C., *Tulpini de enterobacterii secretoare de beta-lactamaze cu spectru extins izolate în infecțiile urinare de ambulatoriu*. Igienă și Sănătate Publică, 2008, p. 10-11.
11. Saladin M., Cao V.T.B., Lambert T., Donay J., Herrmann J., Ould-Hocine Z., et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, nr. 209(2), p. 161-168.
12. Talan D., et al., *Extended-release ciprofloxacin (Cipro XR) for treatment of urinary tract infections*. Int. J. Antimicrob Agents. 2004, p. 54-66.
13. Todar K., *Bacterial Resistance to Antibiotics, Today's Online Textbook of Bacteriology*, University of Wisconsin, 2008 <http://www.textbookofbacteriology.net/> (vizitat 11.01.2012).
14. Сидоренко С.В., *Бета-лактамазы расширенного спектра: клиническое значение и методы детекции*, Инфекции и антимикробная терапия, 2002, Т. 4., № 6, с. 164-169.
15. Страчунский Л.С., *Бета-лактамазы расширенного спектра – быстрорастущая и плохо осознаваемая угроза*, Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2005, Т. 7. № 1, с. 92-96.
16. Эйдельштейн М.В., *Бета-лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования*, Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2001, Т. 3, № 3, с. 223-242.