

MONITORIZAREA FENOTIPICĂ
ȘI GENOTIPICĂ A MARKERILOR
DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE
A *ESCHERICHIA COLI*

Olga BURDUNIUC,
Centrul Național de Sănătate Publică

Summary

Phenotypic and Genotypic Monitoring Markers of Antibiotic Resistance to *Escherichia Coli*.

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. These methods are far more sensitive than phenotypic testing, surveillance and epidemiological monitoring of strains producing CTX-M, and are important in determining treatment tactics for reviewing the empirical treatment protocols. Our study is new for our country thanks to the molecular analysis of plasmid genes that have great potential for communities.

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

Резюме

Фенотипический и генотипический мониторинг маркеров устойчивости к антибиотикам у кишечной палочки

В нынешних условиях быстрого роста и распространения резистентных штаммов Enterobacteriaceae, необходимо использовать методы молекулярной биологии, которые более чувствительные, чем фенотипическое тестирование. Эпидемиологический мониторинг штаммов, продуцирующих CTX-M, играет важную роль для рассмотрения эмпирических протоколов лечения в определении тактики лечения. Проводимые нами исследования являются новшеством для нашей республики, а именно молекулярный анализ генов плазмиды с большим потенциалом распространения в обществе.

Ключевые слова: устойчивость к антибиотикам, мониторинг, фенотип, бета-лактамаз расширенного спектра, CTX-M.

Introducere

Antibiorezistența microorganismelor implicate în etiologia bolilor infecțioase reprezintă o problemă serioasă a sănătății publice. Rezistența la preparatele antimicrobiene determină o evoluție clinică nefavorabilă a bolilor infecțioase, iar particularitățile și dimensiunile fenomenului sunt identificate prin metode de laborator [8, 16].

Emergența rezistenței și multirezistenței la antibiotice a intensificat preocupările pentru descoperirea preparatelor antimicrobiene pentru tratamentul bolilor infecțioase, iar sistemele naționale de sănătate publică sunt implicate în elaborarea unor strategii noi de stopare a dezvoltării fenomenului dat [6].

Întrebuițarea pe scară largă a preparatelor antimicrobiene a dus la apariția tulpinilor multirezistente la antibiotice, creșterea incidenței bolilor infecțioase și agravarea evoluției tabloului clinic. Presiunea de selecție exercitată de antibiotice asupra unei populații bacteriene favorizează persistența tulpinilor rezistente la acțiunea antibioticelor, care proliferază, răspândesc gene de rezistență la tulpinile inițial sensibile [1, 9, 17].

În ultimii ani, autoritățile internaționale (OMS, CDC, ESCMID) au depus eforturi considerabile pentru a îmbunătăți monitorizarea circulației tulpinilor antibioretistente. În prezent, în Europa rețeaua *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS) colectează din 28 de țări date despre circulația tulpinilor de microorganisme rezistente la preparatele antimicrobiene. Nivelul de rezistență a tulpinilor microbiene circulante pe tot globul pământesc este îngrijorător [5].

Cercetătorii avertizează despre apariția tulpinilor de *Escherichia coli* producătoare de enzima beta-lactamaze cu spectru extins (BLSE), ce constituie în prezent o amenințare alarmantă pentru eficacitatea utilizării antibioticelor în terapie. Sunt semnalate eșecuri terapeutice în cazul infecțiilor cauzate de tulpini de microorganisme producătoare de BLSE, deoarece ele dezvoltă rezistență la un spectru extins de antibiotice [10, 11].

Majoritatea microorganismelor BLSE au apărut prin inducerea mutațiilor punctiforme ale beta-lactamazelor cu spectru îngust. După anul 1995, au fost raportate variantele beta-lactamazelor cu spectru extins tip CTX-M, mai ales la pacienții spitalizați, ale căror prevalență crește rapid [3, 12, 13].

Tulpinile rezistente, producătoare de BLSE de tipul CTX-M, sunt endemice în America Latină, unele regiuni ale Europei de Est și sunt atestate ca emergente în Franța, Vestul Europei și SUA [2, 8].

Sistemul de supraveghere a antibioretistenței bacteriene diferă de la o țară la alta, unele au aprobate programe naționale.

În Republica Moldova sunt stringente crearea unui sistem unic de supraveghere a antibioretistenței, unele elemente ca definiții de caz, prioritizarea fenomenului pentru sistemul național de supraveghere. Elementele diagnosticului de laborator sunt elaborate și implementate.

Scopul studiului a fost detectarea unor markeri de rezistență (beta-lactamaze) față de preparatele antibacteriene a *Escherichia coli* (*E. coli*), responsabile de producerea infecțiilor urinare.

Materiale și metode

Pentru realizarea studiului, au fost recoltate 127 de 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 și Spitalul *Sfânta Treime*, Centrului de diagnostic *Modus Vivendi*. Cercetările au fost realizate în laboratorul Centrului de epidemiologie a 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 salină cu gălbenuș de ou, enterococ agar, Mueller Hinton, *Sabou*. 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, testul cu indol, uree, citrat, fenilalanindezaminazei etc). Testele de confirmare au fost realizate prin utilizarea gale-riile API 20E (*Biomerieux*, Franța). Etapa ulterioară a cercetării a inclus testarea sensibilității tulpinilor de *E. coli* la preparatele antimicrobiene, prin utilizarea metodelor 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 cultura 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); *fluorchinolone* – acid nalidix (NA), ofloxacină (OFX), ciprofloxacina (CIP); *tetraciclina* – tetraciclina (TE) și *sulfamide* – cotrimoxazol (trimetropim-sulfameto-xazol) (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 prevalență înaltă, cu consecințe medicale și economice considerabile. Tulpinile implicate în etiologia ICU sunt parte a studiilor epidemiologice și bacteriologice din ultimii ani [2, 18].

Rezultatele unor studii denotă că *E. coli*, germenele ce reprezintă microflora normală a tractului gastrointestinal, în anumite situații 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, circa 95% din cazuri 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 5% – de *Pseudomonas aeruginosa*, stafilococi, micete levuriforme din genul *Candida* etc. [7, 9, 14, 15,16].

Rezultatele testelor biochimice de screening și de confirmare pentru enterobacterii, au demonstrat 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 a putut fi elucidat 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 III (CG3). Succesiunea amplasării discurilor cu antibioticele corespunzătoare a fost următoarea: TIC – FOX – FEP – AMX – GM – CAZ – AMC – CTX.

Producerea de către o tulpină bacteriană a beta-lactamazei este certificată atunci când diametrul

zonei de inhibiție din jurul agenților antimicrobieni ceftazidim, cefotaxim, ceftriaxonă este extins (așa-numita imagine de sinergie „în dop de șampanie”) datorită prezenței acidului clavulanic.

În rezultat s-a stabilit că *E. coli* prezintă cea mai înaltă rezistență la ticarcilină (77%). Profilul desfășurat al rezistenței tulpinilor BLSE depistate în urină poate fi urmărit în figura 1.

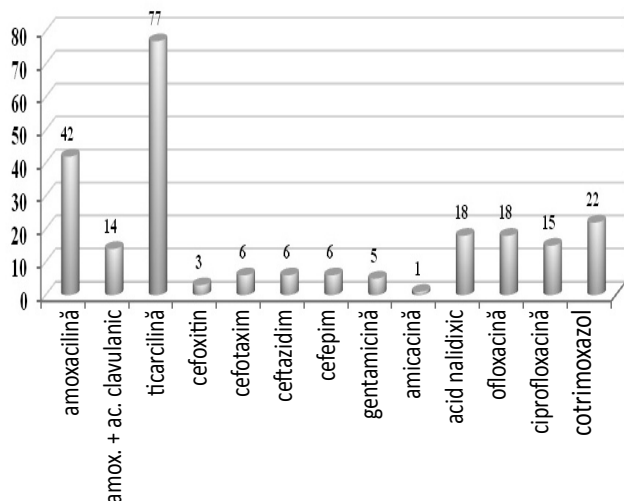


Figura 1. Profilul de rezistență a tulpinilor *E. coli*.

Prevalența infecțiilor căilor urinare cauzate de *E. coli* ce posedă profil de rezistență tip beta-lactamaze cu spectru extins a constituit 5,3%, prevalența portajului intestinal a constituit 15%.

Tulpinile de *E. coli* producătoare de beta-lactamaze 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 tehnicilor de biologie moleculară.

Metodele de biologie moleculară implică costuri relativ mari, personal bine instruit, dar pot furniza rezultate reproductibile în timp foarte scurt. Determinarea profilului de rezistență a evidențiat că tulpinile date sunt rezistente la următoarele grupe de antibiotice: aminoglicozide, în special – gentamicină (72%), fluorchinolone – acid nalidixic (89%) și sulfamide – cotrimoxazol (72%).

Tulpinile identificate din masele fecale de asemenea sunt polirezistente. Ele sunt rezistente la aceleași clase de preparate antimicrobiene ca și *E. coli* BLSE izolată din urină: 53% – la aminoglicozide (gentamicină), 56% – la fluorchinolone (ciprofloxacină), 44% – la sulfamide (cotrimoxazol).

Tulpinile de *E. coli* BLSE, identificate în probele de urină, au fost în exclusivitate de tip CTX-M, și anume: o tulpină tip CTX-M-1; 3 tulpini – de CTX-M-14; alte 3 tulpini sunt de tip CTX-M-15.

Tulpinile de *E. coli* BLSE, depistate în 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 de *E. coli*, la care au fost prezente BLSE în urină și în masele fecale (U + / F +). La trei din patru tulpini testate de *E. coli* BLSE U + / F + a fost prezent un profil Rep-PCR similar.

Determinând grupa filogenetică a tulpinilor urinare, s-a constatat că 58,5% din tulpinile de *E. coli* BLSE reprezintă grupa B2, 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% – grupele B2 și D, 0,4 – alte grupe (figura 2).

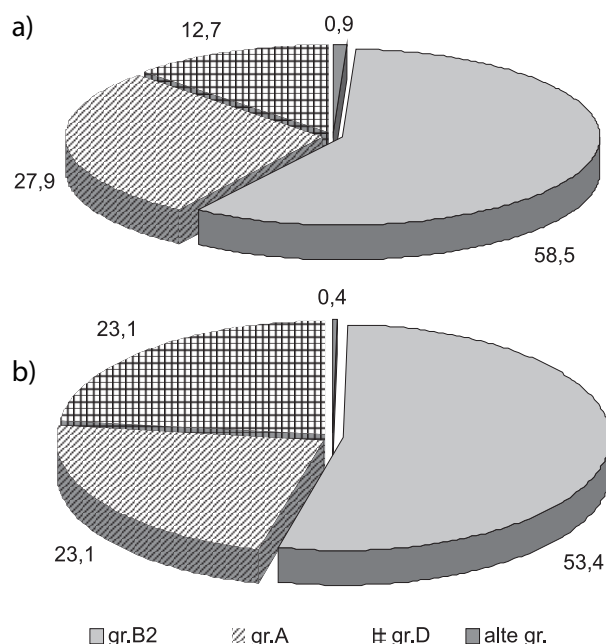


Figura 2. Grupele filogenetice ale tulpinilor *E. coli* BLSE depistate în urină (a) și mase fecale (b).

Tipizarea tulpinilor de *E. coli* BLSE urinare a evidențiat că tulpinile de la diferiți pacienți au avut profiluri BLSE CTX-M similare. Majoritatea tulpinilor au fost de tipul BLSE-CTX-M-14, aparținând grupei filogenetice B2, cu excepția a două tulpini: CTX-M-15 grupă filogenetică B2 și CTX-M-3 grupă filogenetică A (figura 3).

Antibiorezistență constituie o problemă complexă, multifactorială, cu mare semnificație pentru sănătatea publică și necesită o analiză complexă și implementarea unor măsuri specifice, la diferite niveluri. Studiile efectuate privind monitorizarea rezistenței la antibiotice și rezultatele obținute vor

aduce o serie de date importante, pentru a oferi medicului posibilitatea să se orienteze în diagnosticul și terapia pacienților cu ITU, precum și să aplice o strategie eficientă în tratament, din punct de vedere al relației cost-eficiență.

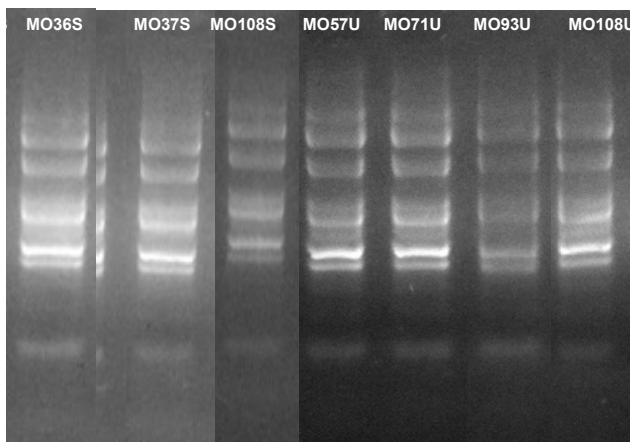


Figura 3: Profiluri similare de BLSE CTX- M la diferite tulpini de *E. coli* BLSE.

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. Detectarea prezenței *E. coli* producătoare de BLSE la pacienții cu ICU prin metode fenotipice și moleculare de detecție a beta-lactamazelor este consecința prescrierii și consumului necontrolat de antibiotice în Republica Moldova.

2. Circulația mai intensă a tulpinilor de *E. coli* tipul CTX-M-14, grupa filogenetică B2, ce au un potențial de diseminare în colectivități pot determina un nivel înalt de rezistență și dificultăți în conduita terapeutică a pacienților cu maladii infecțioase.

3. Datele obținute pe modelul de *E. coli* pot fi extrapolate, pentru evaluarea impactului fenomenului menționat și la alte specii de microorganisme, ceea ce confirmă necesitatea supravegherii rezistenței bacteriene.

Bibliografie

1. Biedenbach D., Moet G., Jones R., *Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002)*. In: *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2004, p. 59-69.

2. Bonnet R., *Growing group of extended spectrum beta-lactamases: CTX – M enzymes*. In: *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, p. 1–14.
3. Coculescu B., Flueraș M., *Mecanismul mutațiilor genice*. În: *Medicină Militară*, 2005, p. 325-333.
4. Donnenberg M., *Escherichia coli: virulence mechanisms of a versatile pathogen*. San Diego, California; Academic Press, 2002, p. 154-162.
5. *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*. RIVM, 2010. <http://www.rivm.nl/earss/database/> (vizitat 14.04.2011).
6. Giske C. et al., *Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need*. In: *J. Antimicrob. Chemother*, 2009, p. 1-4.
7. Gupta K., *Addressing Antibiotic Resistance*. In: *Am. J. Med.*, 2002, p. 29-34.
8. Talan D. et al., *Extended-release ciprofloxacin (Cipro XR) for treatment of urinary tract infections*. In: *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2004, p. 54-66.
9. Hawkey P., Jones A., *The changing epidemiology of resistance*. In: *J. Antimicrob. Chemother*, 2009, Sep., p. 1-10.
10. Hernandez-Burruezo. et al., *Urinary tract infections*. In: *Med. Clin. (Barc.)*, 2007 Nov., p. 707-715.
11. Jacoby G., Munoz-Price L., *The new beta-lactamases*. In: *N. Engl. J. Med.*, 2005, Jan., p. 380-391.
12. Jones C. et al., *Characterization and sequence analysis of extended spectrum beta-lactamase encoding genes from Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Proteus mirabilis isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials*. In: *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2009, vol. 53, p. 465-475;
13. Livermore D. et al., *CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe*. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, vol. 59, p. 165-174.
14. Neal D. et al., *Complicated urinary tract infections*. In: *Urol. Clin. North. Am.*, 2008, Feb., p. 13-22.
15. Negru C., *Tulpini de enterobacterii secretoare de beta-lactamaze cu spectru extins izolate in infecțiile urinare de ambulatoriu*. În: *Igienă și Sănătate Publică*, 2008, p.10-11.
16. Wikipedia, *the free encyclopedia 2011*, http://en.wikipedia.org/wiki/Antibiotic_resistance (vizitat 14.07.2011).
17. Сидоренко С., Иванов Д., *Результаты изучения распространения антибиотикорезистентности среди внебольничных возбудителей инфекций мочевыводящих путей в Москве*. В: *Антибиотики и химиотерапия*, 2005, с. 3-10.
18. Рафальский В. и др., *Резистентность возбудителей амбулаторных инфекций мочевыводящих путей по данным многоцентровых микробиологических исследований УТИАР-I и УТИАР-II*. В: *Урология*, 2004, с. 13-17.

Prezentat la 10.08.2011

Olga Burduniuc, cercetător științific
Centrul Național de Sănătate Publică,
Tel. serv.: (022) 57-47-03; mob.: 079579205
e-mail: oburduniuc@rambler.ru