

TEZĂ DE DOCTORAT-COZMA ANDREEA-PAULA

REZUMAT

Cuvinte cheie: *Enterobacteriaceae*, *E.coli*, ESBL, antibiorezistența, animale de companie, proprietar, RAPD

Teza de doctorat cu titlul "Determinarea riscului de portaj și a direcției de transmitere a *enterobacteriaceelor* producătoare de ESBL la animalele de companie și proprietarii acestora" conține un număr de 174 pagini și este structurată conform uzanțelor în două părți: prima parte care cuprinde "Stadiul actual al cunoașterii" și partea a doua ce cuprinde cercetările proprii pe tema propusă.

Prima parte cuprinde 36 pagini și prezintă sintetic pe parcursul a două capitole principalele date bibliografice necesare pentru o bună înțelegere a subiectului propus fiind descrise informații cu privire la principalele caracteristici ale enzimelor beta-lactamaze cu spectru extins și implicațiile acestor enzime asupra sănătății publice. Cel de al doilea capitol din prima parte cuprinde informații cu privire la metodele fenotipice și genotipice de detecție a tulpinilor bacteriene producătoare de ESBL.

Partea a doua a tezei are 138 pagini și cuprinde informații cu privire la cercetările proprii fiind structurată în 5 capitole principale ce redau scopul și obiectivele subiectului propus, rezultatele obținute în urma investigațiilor fenotipice și moleculare realizate pe tulpinile de enterobacterii producătoare de ESBL izolate din materiile fecale ale animalelor de companie și ale proprietarilor sau personalului sanitar veterinar. De asemenea tot în partea a doua a tezei sunt prezentate rezultatele privind diversitatea și gradul de omologie genetică a tulpinilor bacteriene analizate. De asemenea fiecare capitol descrie materialele și metoda de lucru pentru fiecare investigație realizată și concluziile parțiale aferente.

Lucrarea cuprinde un număr de 30 figuri, 27 tabele și a fost realizată pe baza a 287 de titluri bibliografice.

Capitolul III cuprinde "*Scopul și obiectivele tezei*". Ipoteza principală de testat este dacă animalele de companie pot constitui un rezervor de enterobacterii producătoare de ESBL pentru proprietari sau personalul sanitar veterinar.

Obiectivele principale ale acestei cercetări au fost:

- izolarea și identificarea tulpinilor de enterobacterii producătoare de ESBL izolate de la cele două categorii de subiecți analizați;
- confirmarea fenotipică a izolatelor prezumtiv ESBL prin metoda discurilor combinate;

- caracterizarea fenotipului de rezistență la alte clase de antibiotice ale tulpinilor confirmate fenotipic ca fiind producătoare de ESBL;
- analiza moleculară a probelor pozitive la screening-ul ESBL pentru caracterizarea genelor prezente la tulpinile de origine animală și umană analizate;
- caracterizarea moleculară a tulpinilor producătoare de ESBL izolate în vederea identificării genelor ce determină rezistența la fluorochinolone;
- identificarea tipurilor de plasmide pe care se găsesc genele ce codifică enzimele ESBL;
- analiza diversității genetice a tulpinilor de *Escherichia coli* producătoare de ESBL izolate de la animalele de companie și cele izolate de la proprietari/personal sanitar veterinar folosind tehnica RAPD;
- realizarea unui experiment de conjugare pentru a confirma transmiterea genelor ce codifică enzimele ESBL de către plasmidele identificate.

Capitolul IV „Screening-ul fenotipic pentru detecția tulpinilor de enterobacterii producătoare de ESBL”. Au fost recoltate și prelucrate 279 probe de materii fecale recoltate steril (228 de origine animală și 51 de origine umană). În urma screening-ului ESBL au fost izolate 117 tulpini de enterobacterii prezumtiv ESBL (81 de origine animală și 36 de origine umană). Încadrarea taxonomică a izolatelor s-a realizat prin identificarea genelor *bla_{uidA}* și *bla_{uspA}* pentru *E.coli* și pe baza unor caractere biochimice minime pentru speciile de *Klebsiella pneumoniae* și *Proteus spp.* Investigațiile au arătat că cele 117 tulpini analizate aparțin în proporție de 88,89% speciei *E.coli* , 5,98% speciei *Klebsiella pneumoniae* și 5,13% speciei *Proteus spp.*.

Tot în acest capitol au fost realizate și investigațiile pentru confirmarea fenotipică a izolatelor obținute în urma screening-ului ESBL. Din cele 117 tulpini, 63 (53,84%) au fost confirmate ca fiind ESBL prin metoda discurilor combinate. Restul tulpinilor neconfirmate fenotipic pot prezenta simultan și un alt mecanism de rezistență care să mascheze fenotipul ESBL și să conducă la rezultate fals negative. Pe baza acestor considerente, toate cele 117 izolate prezumtiv ESBL au fost testate în vederea caracterizării substratului molecular de rezistență la antibiotice.

Un ultim subcapitol din capitolul IV a cuprins investigații realizate în vederea determinării fenotipului de rezistență la alte clase de antibiotice pentru tulpinile confirmate fenotipic ca fiind producătoare de ESBL. Testarea sensibilității s-a realizat prin metoda difuzimetrică, fiind determinată sensibilitatea la 9 antibiotice din 7 clase diferite: beta-lactamine, fluorochinolone, aminoglicozide, tetraciclone, sulfonamide, carbapeneme, fencoli. Investigațiile au pus în evidență un grad ridicat de rezistență multiplă la antibiotice (92,85% pentru tulpinile de origine animală și 90,47% pentru izolatele de origine umană). Spre deosebire de tulpinile de origine animală, tulpinile de origine umană au prezentat un nivel crescut al sensibilității la acțiunea amoxicilinei/acid clavulanic. De asemeni toate

cele 63 de tulpini prezumtiv producătoare de ESBL pentru care s-a determinat profilul de rezistență au fost sensibile la acțiunea imipenemului.

Capitolul V "*Identificarea principalelor gene implicate în apariția și transmiterea rezistenței la antibioticele beta-lactamice*" descrie investigațiile moleculare realizate cu scopul de a identifica principalele gene ce codifică enzimele beta-lactamaze cu spectru extins, genele ce codifică enzimele AmpC beta-lactamaze, genele ce determină rezistența la fluorochinolone și colistin.

Investigațiile menționate anterior au fost realizate pe cele 117 tulpini izolate în urma screening-ului ESBL și rezultatele pot fi sintetizate astfel:

- pentru cele 81 de izolate de origine animală, în urma investigațiilor moleculare au fost identificate gene ce codifică enzimele din grupurile: CTX-M-1 (70,59%), CTX-M-9 (26,5%), TEM (27,16%), SHV (16,04%), OXA (1,23%) și CIT-M (1,23%).

- pentru cele 36 tulpini bacteriene de origine umană izolate în urma screening-ului ESBL investigațiile moleculare au pus în evidență prezența genelor ce codifică enzimele din grupurile: CTX-M-1 (64,28%), CTX-M-9 (28,57%), TEM (41,67%), SHV (13,89%) și OXA (8,33%). Pentru izolatele de origine umană nu au fost identificate gene ce codifică enzimele AmpC beta-lactamaze.

- pentru izolatele de la animale, rezultatele secvențierii au indicat ca fiind dominante genele ce codifică enzimele CTX-M-14, CTX-M-15 și CTX-M-1.

- în urma secvențierii izolatelor de origine umană au fost dominante genele ce codifică enzimele din grupul CTX-M-14 și CTX-M-15.

Pentru toate izolatele de origine animală obținute în urma screening-ului ESBL a fost determinat procentul de gene codate plasmidial de tip qnr și aac-(6')-lb-cr ce determină rezistența la Quinolone. Grupul de gene dominant a fost qnrS (13,58%), urmat apoi de qnrB și aac-(6')-lb-cr în proporție de 3,7% și qnrA (1,23%).

Pentru cele 36 de izolate de origine umană, investigațiile pentru izolarea genelor de tip qnr și aac-(6')-lb-cr au arătat o prevalență crescută pentru gena qnrS (13,89%), urmată de aac-(6')-lb-cr (5,56%) și qnrB (2,78%). Gena *bla*_{qnrA} nu a fost identificată la izolatele de origine umană.

De asemeni în capitolul V au fost realizate cercetări cu privire la profilul plasmidial al tulpinilor la care au fost identificate markeri de rezistență. Investigațiile au fost realizate prin tehnica PBRT (PCR based replicon typing) și au pus în evidență prezența a 12 plasmide din cele 18 investigate, fiind izolați cu o frecvență crescută atât pentru tulpinile de origine animală cât și pentru tulpinile de origine umană repliconii IncF, IncI1, IncFIB și IncHi2. Plasmida IncN a fost identificată la tulpini de *Escherichia coli* izolate de la animalele de companie, în literatura de specialitate prezența acestui replicon fiind raportată la animalele de companie doar la speciile de *Klebsiella pneumoniae*.

Pentru a demonstra că plasmidele izolate de noi sunt conjugative a fost realizat un experiment de conjugare. În acest sens au fost selectate 16 tulpini

CTX-M pozitive și sensibile la acidul nalidixic (12 de origine animală și 4 de origine umană). În urma conjugării au fost obținuți 15 transconjugăți, toți fiind testați prin PCR pentru izolarea genelor de tip *bla*_{CTX-M}. Pentru toți transconjugății a fost pusă în evidență gena ce codifică enzimele CTX-M, iar repliconii implicați în procesul de transfer de gene au fost Hi2 și I1.

Capitolul VI intitulat "Determinarea gradului de omologie genetică între tulpinile producătoare de ESBL de origine animală și umană" descrie cercetările realizate cu scopul de a încadra tulpinile de *E.coli* identificate în grupuri filogenetice, de a izola tulpinile ce aparțin grupului clonal ST131-O25 și de asemenea investigațiile realizate prin tehnica RAPD pentru a stabili diversitatea și gradul de omologie genetică a tulpinilor ce au alcătuit colecția luată în studiu. Rezultatele cercetării pentru acest capitol pot fi sintetizate astfel:

- grupul filogenetic predominant pentru tulpinile de *E.coli* izolate de la animale a fost B1 (35,71%);
- pentru tulpinile de *E.coli* izolate de la proprietari sau personalul sanitar veterinar, grupul filogenetic predominant a fost B2 (35,30%). Portajul fecal cu tulpini din acest grup constituie o problemă de sănătate publică, aceste izolate având un caracter de patogenitate ridicat ce rezultă mai ales din asocierea mai multor caractere de virulență;
- majoritatea tulpinilor de *E.coli* CTX-M pozitive au aparținut grupului filogenetic A;
- au fost izolate 3 tulpini de *E.coli* ST131-O25: o tulpină de origine animală, caracterizată molecular prin prezența genei *bla*_{TEM} și două tulpini de origine umană al căror substrat molecular a fost reprezentat de genele *bla*_{OXA}, *bla*_{qnrS}, *bla*_{aac-(6)-Ib-cr} și respectiv *bla*_{CTX-M-9};
- investigațiile RAPD au pus în evidență o mare diversitate genetică între tulpinile de origine animală, tulpinile de origine umană și tulpinile de origine animală și cele de origine umană;
- au fost identificate tulpini de origine animală izolate de la câinii din padocuri sau de la cabinete, caracterizate prin substrat fenotipic și molecular identic sau asemănător ceea ce indică o relație clonală între aceste tulpini și de asemenea că mediul comun al animalelor de la care au fost izolate joacă un rol important în transmiterea acestor tulpini;
- au fost identificate tulpini de *E.coli* izolate de la câine și proprietari, caracterizate prin profiluri fenotipice și genotipice identice (gene ESBL, grup filogenetic identic, același profil RAPD), ceea ce demonstrează că animalele de companie pot constitui un rezervor de bacterii producătoare de ESBL pentru om, genele de rezistență fiind transmise cu ușurință între animale și proprietari prin contactul direct sau indirect.

Capitolul VII „Concluzii finale, limitele studiului și perspective de cercetare” sunt redate principalele aspecte ale cercetării realizate pe tema propusă, aspecte ce sunt sintetizate sub forma a 28 de concluzii.