

RAPORTARE ȘTIINȚIFICĂ

RST – Raport științific și tehnic în extenso

Titlul proiectului: ANTIMICROBIAL RESISTANCE MANURE INTERVENTION STRATEGIES / STRATEGII DE INTERVENȚIE ASUPRA GUNOIULUI DE GRAJD CU PRIVIRE LA REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE

Acronimul proiectului: ARMIS

Cod proiect: COFUND-JPI-EC-AMR-ARMIS

Nr. contract: 40/2018

Durata: 35 luni (01.06.2018 – 30.04.2021)

Director proiect: Prof. Dr. Ana Maria de Roda Husman

Parteneri:

1. Coordonator: National Institute for Public Health and the Environment (RIVM): Prof. Dr. Ana Maria de Roda Husman
2. Partener 1: University of Western Ontario Department of Biology, London, Canada: Dr. Ed Topp
3. University of Guelph, Department of Pathobiology, Guelph, Canada: Dr. Patrick Boerlin
4. Partener 3: Research Institute of the University of Bucharest, Faculty of Biology: Prof. Dr. Mariana Carmen Chifiriuc
5. Partener 4: Justus-Liebig University, Institute for Applied Microbiology Heinrich-Buff-Ring, Gießen Germany: Prof. Dr. Dr.-Ing. P. Kämpfer
6. Partener 5: Wageningen Livestock Research, Wageningen Research, The Netherlands: Ing. Paul Hoeksma

Etapa 1. Realizarea procedurilor operatorii standard

Cuprins		Pagină
1.	Obiective / Activități etapa 2018	2
2.	Rezumatul etapei 2018 (maxim 2 pagini) – gradul de atingere a rezultatelor estimate	2
3.	Descrierea științifică și tehnică, cu punerea în evidență a rezultatelor	3
4.	Diseminarea rezultatelor	3
5.	Bibliografie	13

OBIECTIVE/ACTIVITĂȚI ETAPĂ

Etapa 1. Realizarea procedurilor operatorii standard

Activitate 1.1. Armonizarea procedurilor de prelevare și analiză a probelor de gunoi de grajd/materii fecale/sol

Activitate 1.2. Realizarea unui studiu pilot

Activitate 1.3. Managementul proiectului

REZUMATUL ETAPEI

Prima etapă a proiectului ARMIS a inclus o analiză comparativă a procedurilor de prelevare și analiză a probelor de gunoi de grajd / materii fecale / sol în scopul dezvoltării unui protocol armonizat de analiză pentru detecția și cuantificarea a unor microorganisme țintă cu diferite fenotipuri de rezistență (VRE-*vancomycin resistance enterococci*, MRSA-*methicillin resistant Staphylococcus aureus*, *beta-lactamase producing Enterobacteriaceae*- BLSE și *carbapenemase producing Enterobacteriaceae*- CRE). În acest scop, au fost organizate 4 teleconferințe și un *kick-off meeting* (9-10 iulie), în cadrul căruia au fost discutate aspecte cu privire la protocoalele experimentale dependente de cultivare utilizate în laboratoarele partenerilor proiectului pentru detecția și cuantificarea organismelor țintă ale studiului precum: cantitatea de probă de gunoi de grajd, diluțiile și mediul de diluție; cultivare directă și / sau cultivare cu îmbogățire în prezență sau în absență de agenți selectivi (antibiotice); selecția mediilor de cultivare utilizate în protocoalele de analiză.

Testele comparative aplicate pentru detecția și cuantificarea fenotipurilor de rezistență BLSE, CRE, VRE și MRSA în probe de gunoi de grajd contaminate artificial cu bacterii cu fenotip de rezistență cunoscut prin metode dependente de cultivare directă și îmbogățire în prezența a diferite concentrații de antibiotice au permis selectarea variantelor experimentale optime pentru recuperarea tulpinilor bacteriene Gram pozitive și a celor Gram negative cu fenotipuri de rezistență de interes în cadrul proiectului ARMIS. Identitatea tulpinilor rezistente utilizate pentru contaminare și recuperate în urma realizării protocoalelor a fost confirmată prin PCR.

Analizele comparative privind influența a diferite concentrații de antibiotice (CTX, VA, FOX) asupra gradului de recuperare a tulpinilor BLSE, CRE, MRSA și VRE au evidențiat existența unei relații de directă proporționalitate între cantitatea de antibiotic adăgată în etapa de pre-îmbogățire și gradul de reducere a microbiotei nespecifice pe mediile selective pentru izolarea tulpinilor Gram negative cu fenotipuri de rezistență BLSE și CRE. În schimb, vancomicina și respectiv cefoxitinul nu influențează semnificativ recuperarea tulpinilor Gram pozitive cu fenotipuri de rezistență țintă (VRE, MRSA) comparativ cu cultivarea cu pre-îmbogățire în mediu lichid selectiv (bulion azidă de sodiu pentru VRE și MH cu 6.5% NaCl pentru MRSA).

Analiza comparativă a influenței concentrației de vancomicină în mediul de îmbogățire asupra gradului de recuperare a tulpinii VRE vanA+ din probe de gunoi de grajd contaminate artificial a arătat că antibioticul nu influențează semnificativ recuperarea tulpinilor VRE.

Activitățile propuse pentru prima etapă a proiectului au fost îndeplinite în totalitate.

Introducere

Prevalența crescută a bacteriilor rezistente la antibiotice este una dintre cele mai grave amenințări la adresa sănătății publice din secolul XXI. O cale de diseminare a rezistenței la antibiotice (Fig. 1) o reprezintă poluarea solurilor cu gunoi de grajd provenit de la animale supuse tratamentelor cu antibiotice. Gunoiul din fermele de porci și bovine este frecvent utilizat în agricultură ca înlocuitor pentru îngrășămintele anorganice cu azot și fosfor în întreaga lume, în special în practicile de agricultură ecologică. Studiile au pus în evidență faptul că gunoiul de grajd constituie un rezervor important de rezistență la antibiotice, gene rezistente la antibiotice (colectiv cunoscute ca "rezistom") și agenți patogeni. Deși utilizarea antibioticelor poate crește prevalența bacteriilor rezistente la antibiotice și a genelor de rezistență la antibiotice în gunoiul de grajd, acestea au fost puse în evidență și în gunoiul de grajd provenit de la animale fără antecedente de tratament cu antibiotice, indicând prezența naturală a bacteriilor rezistente intrinsec la antibiotice în microbiota tractului gastrointestinal animal (Udikovic-Kolica et al., 2011; Andersson and Huges, 2014).

Obiectivul primei etape a proiectului ARMIS a fost elaborarea procedurilor operatorii standard de prelevare și analiză a probelor de gunoi de grajd / materii fecale / sol și realizarea unui studiu pilot.

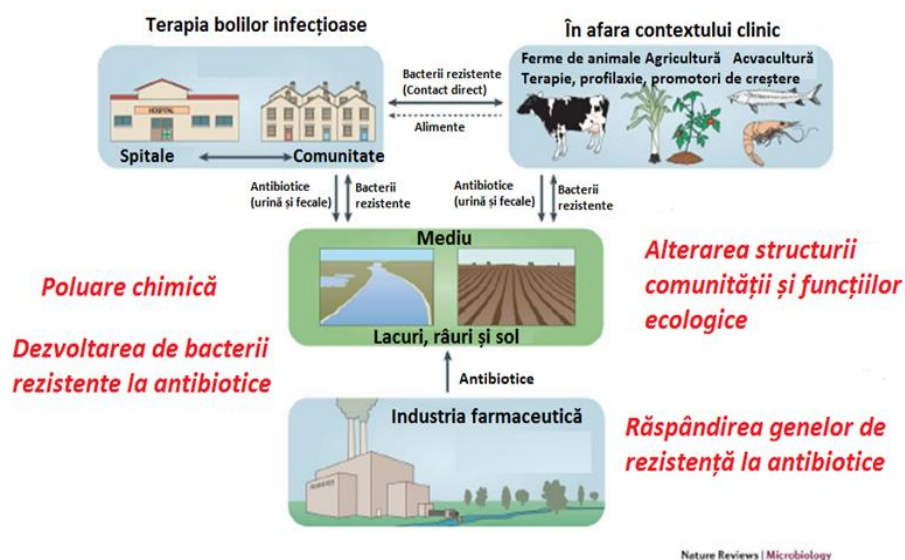


Fig. 1. Căi de diseminare a rezistenței la antibiotice în mediile naturale (Andersson și Huges, 2014).

Activitatea 1.1 Armonizarea procedurilor de prelevare și analiză a probelor de gunoi de grajd / materii fecale / sol

Prima etapă a proiectului ARMIS a inclus o analiză comparativă a procedurilor de prelevare și analiză a probelor de gunoi de grajd / materii fecale / sol (Fig.2 și 3) în scopul dezvoltării unui protocol armonizat de analiză pentru detecția și cuantificarea a unor microorganismețină cu diferite fenotipuri de rezistență (VRE-vancomycin resistance enterococci, MRSA-methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*- BLSE, și carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*- CRE).

În acest scop, au fost organizate 4 teleconferințe și un *kick-off meeting* (9-10 iulie), în cadrul căruia au fost discutate aspecte cu privire la protocoalele experimentale dependente de cultivare utilizate în laboratoarele partenerilor proiectului pentru detecția și cuantificarea organismelor țintă ale studiului precum:

- cantitatea de probă de gunoi de grajd, diluțiile și mediul de diluție;
- cultivare directă și / sau cultivare cu îmbogățire în prezență sau în absență de agenți selectivi (antibiotice);
- selecția mediilor de cultivare utilizate în protocoalele de analiză.

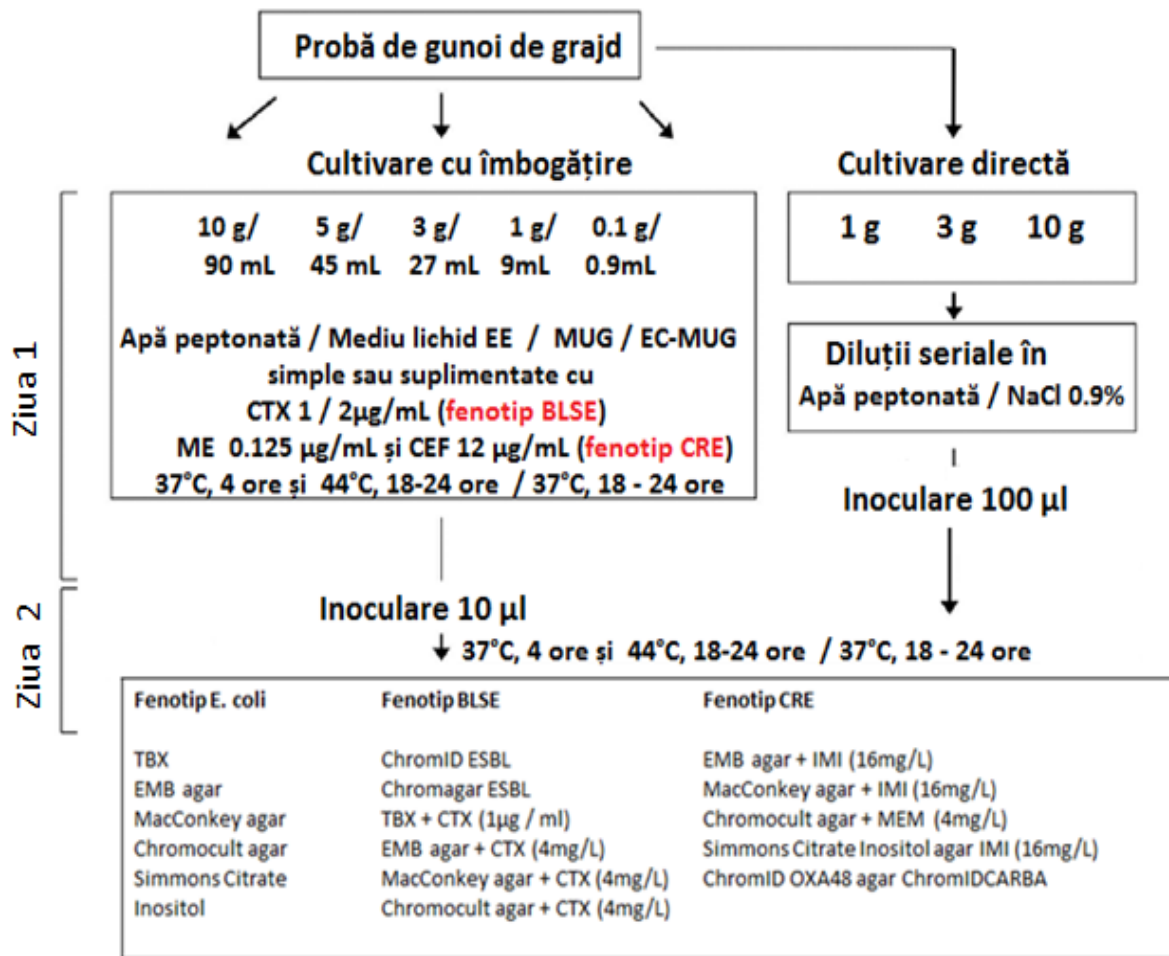


Fig. 2. Schema de lucru pentru detecția dependentă de cultivare a tulpinilor de *E. coli*, *Enterobacteriaceae* BLSE și CPE în probe de gunoi de grajd, ce include metode de analiză utilizate în laboratoarele partenerilor proiectului. În metoda cultivării directe, bacteriile sunt desprinse din probă (1, 3 sau 10g) prin vortexare în tampon fosfat salin / apă peptonată la temperatura camerei. Se realizează diluții seriale ale supernatantului ce sunt inoculate (100 µL) pe medii selective. În metoda de cultivare cu îmbogățire, 0.1, 1, 3, 5 sau 10 g de probă de gunoi de grajd sunt inoculate în diferite medii lichide (apă peptonată, EE, EC, EC-MUG) suplimentate sau nu cu antibiotic (CTX 1g/L sau 2g/L pentru fenotip BLSE și MEM 0.125 g/L) și incubate 24 de ore la 37°C. Apoi un volum de 10 µL este însămânțat pe medii de cultivare selective urmată de incubare la 37°C timp de 4 ore și 18-24 ore la 44°C sau 37°C timp de 24 ore.

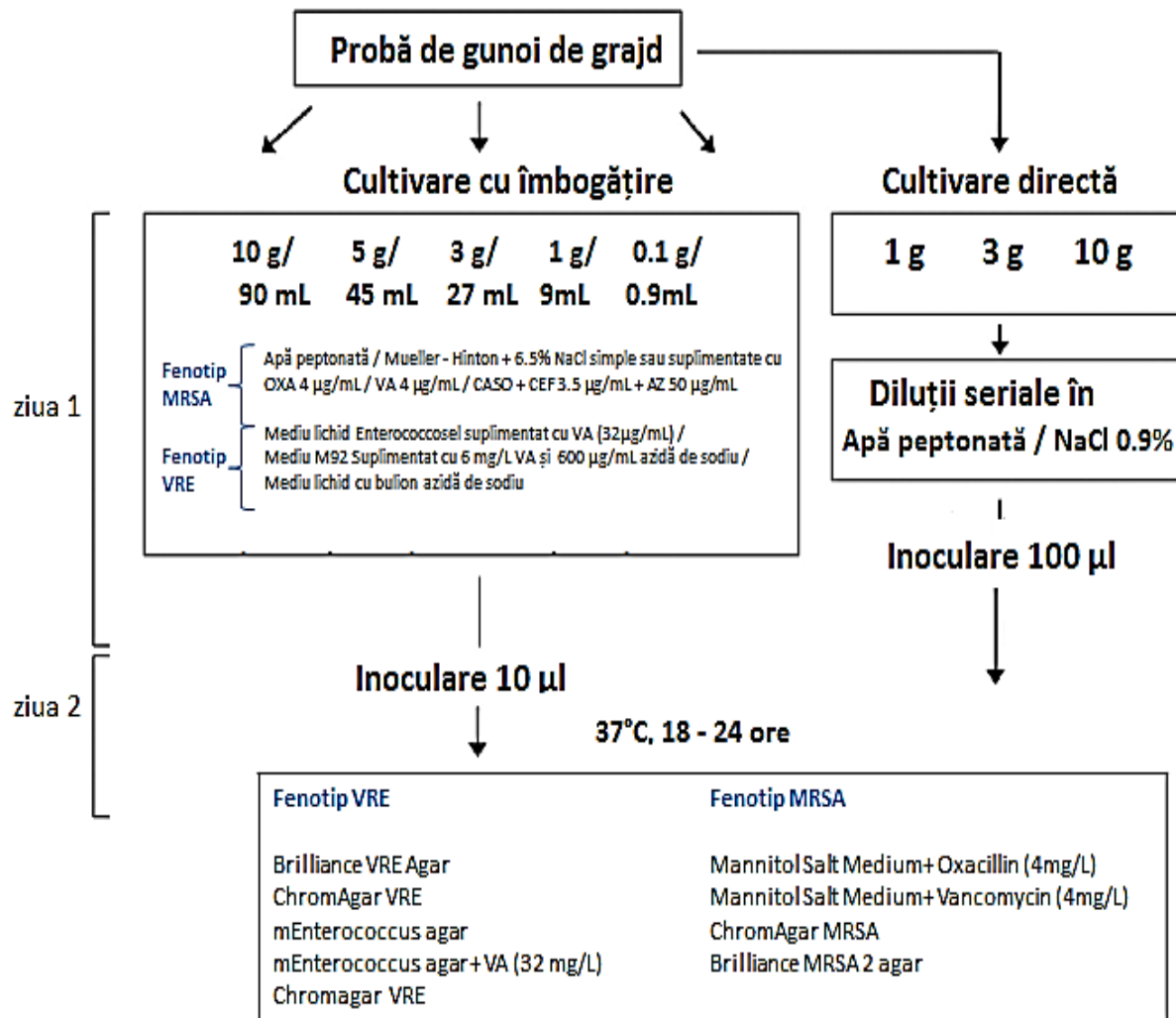


Fig. 3. Schema de lucru pentru detecția dependentă de cultivare a tulpinilor cu fenotipuri MRSA și VRE în probe de gunoi de grajd, ce include metode de analiză utilizate în laboratoarele partenerilor proiectului. În metoda cultivării directe, bacteriile sunt desprinse din probă (1, 3 sau 10g) prin vortexare în tampon fosfat salin / apă peptonată la temperatura camerei. Se realizează diluții seriale ale supernatantului ce sunt inoculate (100 µL) pe medii selective. În metoda de cultivare cu îmbogățire, 0.1, 1, 3, 5 sau 10 g de probă de gunoi de grajd sunt inoculate în diferite medii lichide pentru fenotipul MRSA (apă peptonată, Muller-Hintn + 6.5 % NaCl + OXA 4 µg/ml / VA 4 µg/ml / CASO + CEF 3.5 µg/ml + AZ 50 µg/ml) și fenotipul VRE (Enterococcosel + VA 32µg/mL; M92 + 6 mg/L VA și 600 µg/mL azidă de sodiu; bulion azidă de sodiu) și incubate 24 de ore la 37°C. Apoi un volum de 10 µL este însămânțat pe medii de cultivare selective urmată de incubare la 37°C timp de 24 ore.

Analiza comparativă a diferitelor protocoale experimentale folosite de partenerii proiectului a permis configurarea studiilor pilot pentru compararea diferitelor proceduri în ceea ce privește specificitatea și sensibilitatea de recuperare a bacteriilor rezistente de interes, în raport cu microbiota nespecifică. Pe baza rezultatelor o singură procedură va fi selectată pentru analiza probelor de gunoi de grajd în proiectul ARMIS.

Activitate 1.2 Realizarea unui studiu pilot în vederea optimizării și selecției unor protocoale de analiză ce vor fi aplicate probelor de gunoi de grajd în etapele următoare ale proiectului

Realizarea studiului pilot a avut drept obiective: i) selecția mediilor de cultură pentru detecția și cuantificarea de bacterii cu diferite fenotipuri de rezistență: *Enterobacteriaceae* producătoare de beta-lactamaze de spectru extins (BLSE) și carbapenemaze (CRE), *Enterococcus* rezistent la

vancomicină (VRE), *Staphylococcus aureus* rezistent la meticlină (MRSA) în probe de gunoi de grajd contaminate artificial cu bacterii rezistente la antibiotice; ii) analiza comparativă a eficienței diferitelor concentrații de antibiotice utilizate pentru suplimentarea mediilor de cultură ce vor fi folosite pentru detecția și cuantificarea fenotipurilor de rezistență BLSE, CRE, VRE și MRSA în probe de gunoi de grajd contaminate artificial cu bacterii cu fenotip de rezistență cunoscut prin metode dependente de cultivare directe și respectiv, după îmbogățire.

Materiale și metode:

Proba analizată: gunoi de grajd a fost reprezentată de compost provenit de la o microfermă ecologică de vaci de lapte. Au fost testate trei volume de prob, respectiv: 1 g, 3 g și 10g.

Tulpinile bacteriene rezistente utilizate pentru contaminarea deliberată a probei de compost:

- *Klebsiella pneumoniae* 8 ESBL și CRE + (cu capacitatea de a crește pe ChromID ESBL, ChromID OXA-48 și ChromID CARBA);
- *E. coli* 18007 Oxa-48 + (cu capacitatea de a crește pe ChromID OXA-48);
- *E. faecium* VanA;
- MRSA 388.

Medii selective utilizate: TBX agar, ChromID ESBL, ChromID OXA-48 și ChromID CARBA, Brilliance MRSA, Brilliance VRE (**Tabelul 1**).

Tabelul1. Aspectul caracteristic al coloniilor bacteriene formate de tulpinile rezistente pe mediile cromogene selectate pentru studiul pilot.

Mediu de cultură cromogen	<i>E. coli</i>	KESC
TBX	Albastru/verde	-
ChromID ESBL	Roz - vișiniu	Albastru/verde
ChromID OXA48	Roz- vișiniu	Verde-albastrui
ChromID CARBA	Roz-vișiniu	Verde-albastrui

Tulpinile bacteriene au fost cultivate pe mediul de cultură PCA (*Plate Count Agar*). Câteva colonii bacteriene din cultură de 18-24h au fost suspendate în ser fiziologic steril și densitatea suspensiei a fost ajustată cu ajutorul standardului McFarland 0.5 corespunzând la aproximativ $1,5 \times 10^8$ celule / mL. Probele de compost (1, 3 și 10 g) au fost inoculate cu suspensiile bacteriene astfel pregătite pentru obținerea unui inocul final în proba de analizat de 10^5 UFC/mL și apoi omogenizate prin vortexare. Au fost analizate comparativ și probe de compost necontaminate.

Analizele comparative au cuprins două metode de cultivare: *cultivare directă și cultivare după îmbogățire prealabilă (Fig. 4)*.

Cultivarea cu pre-îmbogățire a probelor de gunoi de grajd artificial contaminate cu bacterii rezistente a fost efectuată în:

- apă peptonată pentru toate microorganismele țintă;
- bulion Mueller-Hinton suplimentat cu 6,5% clorură de sodiu (NaCl) pentru probele contaminate cu MRSA;
- apă peptonată suplimentată cu 1, 2 și 4 μg / ml de cefotaxim (CTX) pentru probele contaminate cu *K. pneumoniae* 8 și, respectiv, cu *E. coli* 18007;
- bulion azidă de sodiu pentru probele contaminate cu *E. faecium* VanA.

Incubarea mediilor inoculate pentru metodele de cultivare directă și respectiv cu preîmbogățire s-a efectuat la 37°C timp de 18-24 ore pentru toate microorganismele țintă, cu excepția probelor contaminate cu tulpini de *Enterobacteriaceae* BLSE și CRE. În acest caz au fost analizate comparativ trei variante de incubare: i) 37°C, 18-24 ore; ii) 4-5 ore la 37 ° C, urmată de 18-24 ore la 44°C; iii) 44 ° C.

Verificarea identității tulpinilor recuperate după contaminare s-a realizat prin PCR.

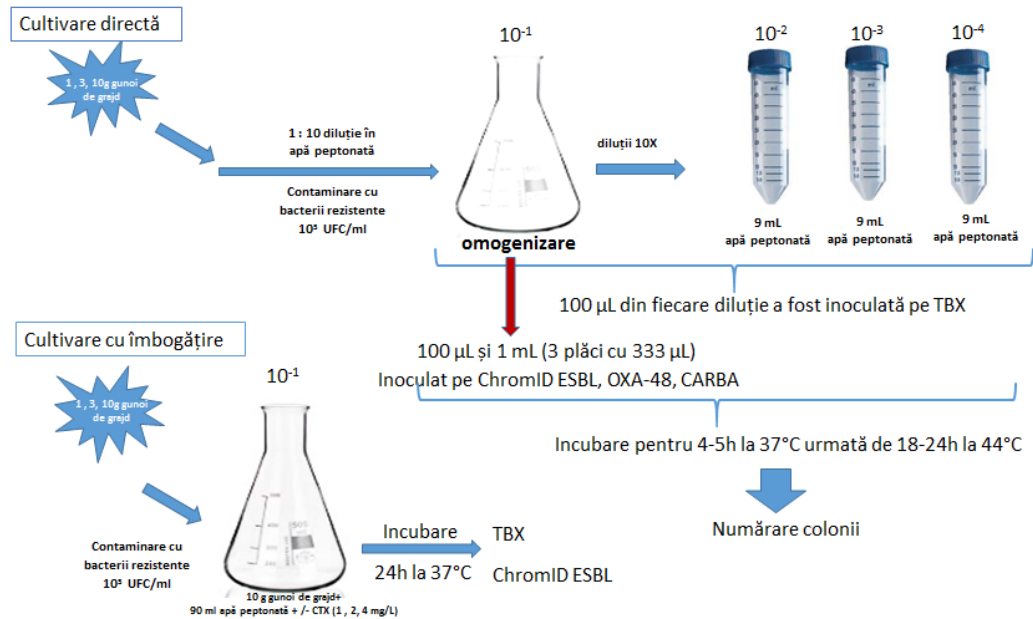


Fig. 4. Schema de analiză pentru detecția dependentă de cultivare a fenotipurilor BLSE, OXA-48 și CARBA în probe de gunoi de grajd artificial contaminate cu bacterii rezistente. În metoda cultivării directe, proba este contaminată artificial cu bacterii rezistente (10^5 UFC/ml) și pregătite diluții în apă peptonată la temperatura camerei. Se realizează diluții seriale ale supernatantului ce sunt inoculate ($100 \mu\text{L}$ și $333 \mu\text{L}$) pe medii selective: ChromID ESBL, OXA-48, CARBA. În metoda de cultivare cu pre-îmbogățire, 1, 3, 10 g de probă de gunoi de grajd contaminată artificial cu bacterii rezistente (10^5 UFC/ml) este inoculată în apă peptonată în prezența sau în absența a diferite concentrații de cefotaxim (1, 2 și 4 g/L) pentru fenotipurile de rezistență *Enterobacteriaceae* BLSE, și CRE și incubate 24 de ore la 37°C . Apoi un volum de $10 \mu\text{L}$ este însămânțat pe medii de cultivare selective urmată de incubare la 37°C timp de 24 ore.

Rezultate:

Detecția și cuantificarea bacteriilor rezistente prin cultivare directă

Analiza plăcilor cu mediu de cultură inoculate direct cu probe de gunoi de grajd contaminate artificial a condus la recuperarea de bacterii rezistente (**Tabelul 2**). În cazul probei de gunoi de grajd necontaminate rezultatele au fost negative, nedetectându-se bacterii rezistente pe mediile de cultură selective utilizate în studiu.

Mediul de cultură TBX a favorizat creșterea predominant a tulpinii de *E. coli*, testele efectuate evidențind un grad mai mare de recuperare comparativ cu cea de *K. pneumoniae*.

Mediul de cultură ChromID ESBL a selectat din probele de compost contaminate artificial cu tulpinile de *E. coli* 18007 OE2 și respectiv *K. pneumoniae* 8, fenotipul de rezistență BLSE corespunzător tulpinii *K. pneumoniae* 8. Gradul de recuperare, respectiv raportul celulelor din inoculul inițial/celule recuperate fiind de 0.693 – 0.728 pentru această tulpină.

Mediul de cultură ChromID OXA-48 a selectat din probele de compost contaminate artificial cu tulpinile de *E. coli* 18007 OE2 și respectiv *K. pneumoniae* 8, care prezintă fenotipul de rezistență OXA-48. Gradul de recuperare a fost de 1 pentru *E. coli* 18007 OE2, 0.465 pentru *K. pneumoniae* 8 și de 0.856 în cazul contaminării artificiale cu ambele tulpini OXA-48 pozitive.

Mediul de cultură ChromID CARBA a selectat din probele de compost contaminate artificial ambele tulpini rezistente, respectiv tulpinile de *E. coli* 18007 OE2 și de *K. pneumoniae* 8, gradul de recuperare fiind de 0.596 pentru *K. pneumoniae* 8 și de 0.856 în cazul contaminării artificiale cu ambele tulpini CRE.

Tabelul 2. Detecția și cuantificarea tulpinilor rezistente în probe de compost contaminate artificial.

Medii de cultură	<i>E. coli</i> 18007 OE2			<i>K. pneumoniae</i> 8			<i>E. coli</i> 18007 OE2 + <i>K. pneumoniae</i> 8			
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
TBX Diluții	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
UFC/mL	409	53	4	72	2	0	confluent	519	7	0
ChromID ESBL Diluții/volume	10 ⁻¹ 100μL	10 ⁻¹ 3 x 333μL		10 ⁻¹ 100μL	10 ⁻¹ 3 x 333μL		10 ⁻¹ 100μL	10 ⁻¹ 3 x 333μL		
UFC/ml	Absență creștere			693	Creștere confluentă		728	Creștere confluentă		
OXA-48	10 ⁻¹ 100μL	10 ⁻¹ 3 x 333μL		10 ⁻¹ 100μL	10 ⁻¹ 3 x 333μL		10 ⁻¹ 100μL	10 ⁻¹ 3 x 333μL		10 ⁻¹ 100μL
UFC/ml	1013	confluent		465	Creștere confluentă		856	Creștere confluentă		
CARBA	100	10 ⁻¹ 3 x 333μL		10 ⁻¹ 100μL	10 ⁻¹ 3 x 333μL		10 ⁻¹ 100μL	10 ⁻¹ 3 x 333μL		10 ⁻¹ 100μL
UFC/ml	Creștere confluentă			596	Creștere confluentă		856	Creștere confluentă		

Detecția și cuantificarea bacteriilor rezistente prin metode de cultivare cu pre-îmbogățire

În cadrul testelor de cultivare cu îmbogățire a fost determinată influența a diferite concentrații de cefotaxim: 1, 2, și 4 μg / ml, precum și a condițiilor de incubare (37°C, 18-24 ore; 4-5 ore la 37 ° C, urmată de 18-24 ore la 44°C; 44 ° C) asupra gradului de recuperare a bacteriilor rezistente din probe de compost de vacă artificial contaminate. Au fost testate două volume de probe de compost: 1 g și 3 g.

Rezultatele experimentelor au arătat că mediul de îmbogățire (apa peptonată) suplimentat cu antibiotic a favorizat creșterea și multiplicarea bacteriilor rezistente comparativ cu mediul de îmbogățire fără adaos de antibiotic. În **fig. 5 și 6** se observă o predominanță a culturii *K. pneumoniae* 8, de culoare verde corespunzător fenotipurilor de rezistență BLSE și CRE, în cazul cultivării cu îmbogățire în prezență de cefotaxim, comparativ cu îmbogățirea în absența antibioticului. De asemenea, rezultatele au arătat o corelație directă între cantitatea de antibiotic adăgată în etapa de pre-îmbogățire și reducerea microbiotei nespecifice pe mediile selective, prin urmare o cantitate crescută de antibiotic inhibă microorganismele sensibile la acest antibiotic și favorizează creșterea și dezvoltarea microorganismelor cu fenotipuri de rezistență BLSE și CRE, metoda de analiză fiind astfel mai specifică.

În privința sensibilității metodei de detecție și cuantificării bacteriilor rezistente (fenotipuri BLSE și CRE) prin metode de cultivare cu pre-îmbogățire în absență și respectiv prezență de antibiotic, testele efectuate au arătat un grad de recuperare mai ridicat în cazul îmbogățirii cu antibiotic comparativ cu îmbogățirea fără antibiotic (**Fig. 7**).

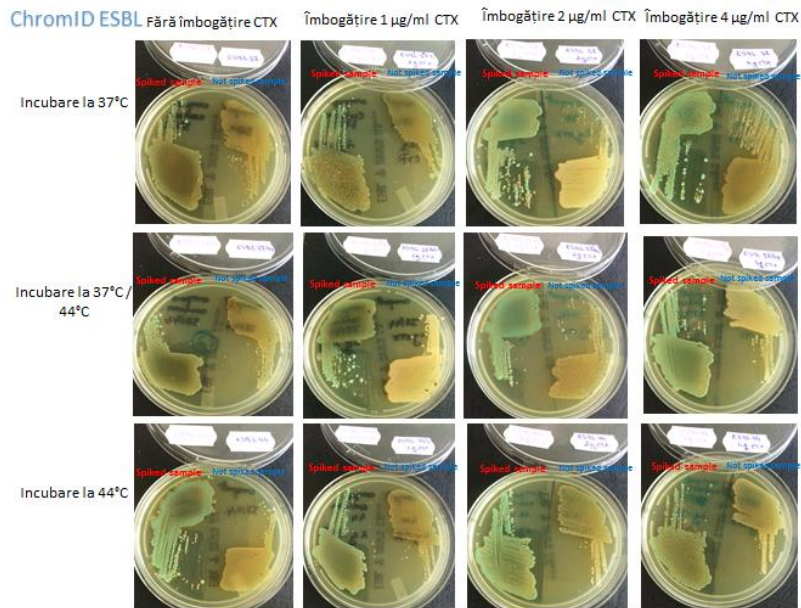


Fig. 5. Rezultatele experimentale privind detecția bacteriilor rezistente la antibiotice (fenotip BLSE) prin metode de cultivare cu pre-îmbogățire în prezența a diferite concentrații de cefotaxim și în diferite condiții de incubare.

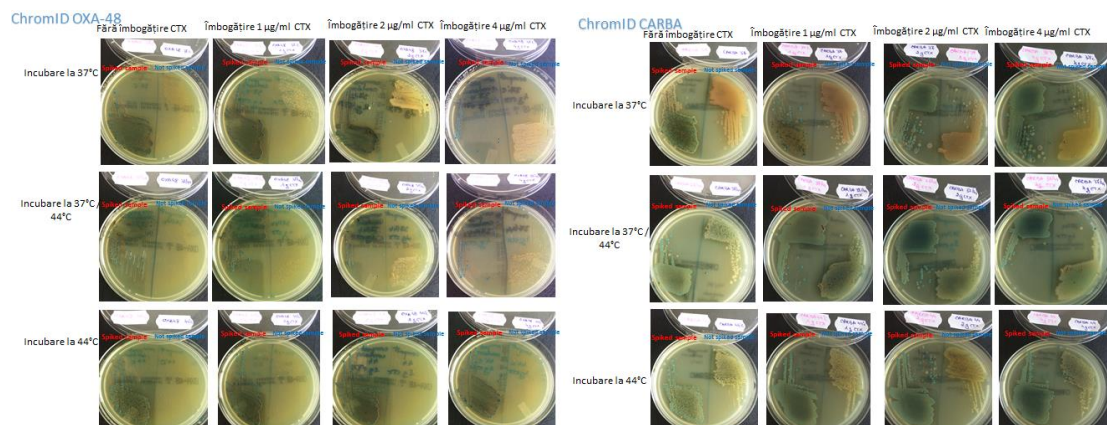


Fig. 6. Rezultatele experimentale privind detecția bacteriilor rezistente la antibiotice (fenotip CRE) prin metode de cultivare cu pre-îmbogățire în prezența a diferite concentrații de cefotaxim și în diferite condiții de incubare.

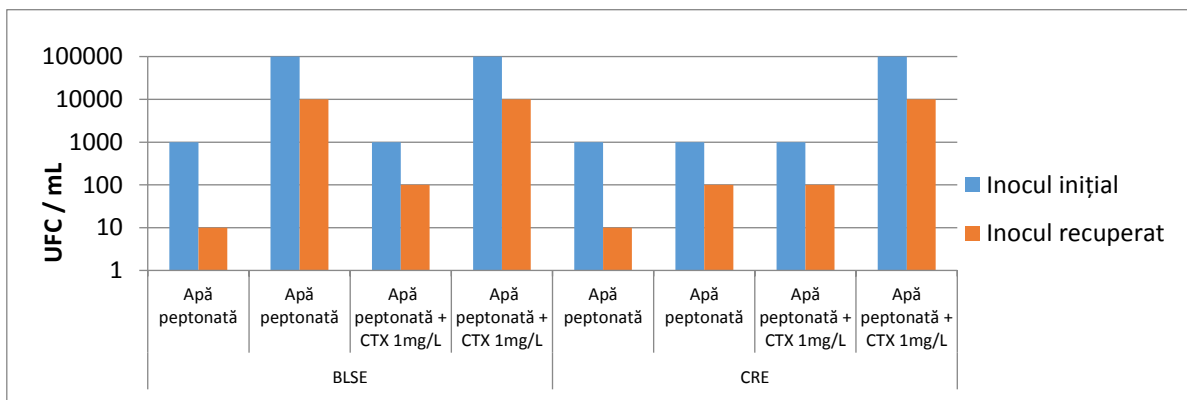


Fig. 7. Rezultatele detecției și cuantificării tulpinilor de *Enterobacteriaceae* cu fenotipuri de rezistență BLSE și CRE prin cultivare în absență și în prezență de antibiotic (CTX 1 mg/L).

Rezultatele privind recuperarea tulpinilor Gram pozitive cu fenotipuri de rezistență VRE și MRSA, după cultivare cu pre-îmbogățire în prezența și în absența de antibiotic au arătat că prezența antibioticului (vancomicină, și respectiv cefoxitin) nu influențează semnificativ recuperarea bacteriilor rezistente țintă comparativ cu cultivarea cu pre-îmbogățire în mediu lichid selectiv (bulion azidă de sodiu pentru VRE și MH cu 6.5% NaCl pentru MRSA) (Fig. 8 - 9).

Analizele comparative privind influența compoziției mediului de îmbogățire asupra recuperării tulpinilor Gram pozitive cu fenotipuri de rezistență VRE și MRSA au arătat că mediile selective conduc la o mai bună recuperare a fenotipului de rezistență țintă comparativ cu mediul general reprezentat de apa peptonată (Fig. 8 - 9).

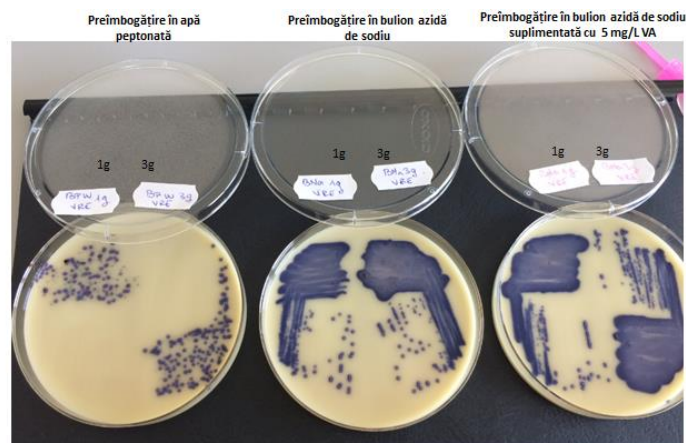


Fig. 8. Rezultatele detecției VRE prin metoda de cultivare cu îmbogățire în apă peptonată / MH suplimentat cu 6.5% NaCl / MH suplimentat cu 5 mg/mL VA în probe de gunoi de grajd contaminate artificial.

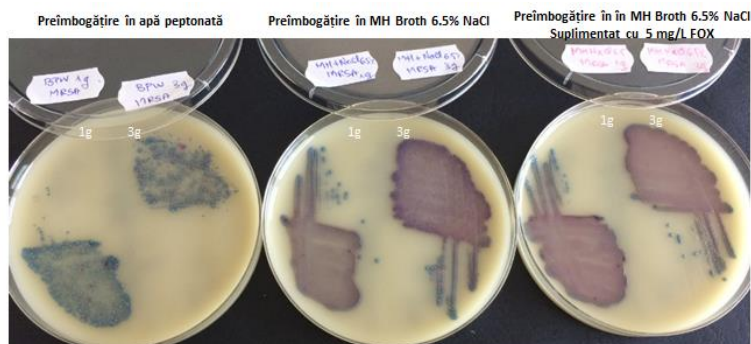


Fig. 9. Rezultatele detecției MRSA prin metoda de cultivare cu îmbogățire în apă peptonată / MH suplimentat cu 6.5% NaCl / MH suplimentat cu 5 mg/mL FOX în probe de gunoi de grajd contaminate artificial.

Având în vedere că valorile *breakpoint* recomandate de CLSI (2018) și respectiv EUCAST (2018) pentru vancomicină la tulpinile de *Enterococcus* spp. sunt diferite, iar partenerii ARMIS utilizează în mod obișnuit diferite concentrații de vancomicină pentru izolarea din probe de gunoi de grajd a tulpinilor de *Enterococcus* rezistente la vancomicină (6- 32 $\mu\text{g} / \text{ml}$), un al doilea obiectiv al studiului pilot a fost evaluarea diferitelor concentrații de vancomicină pentru detecția de tulpini de *Enterococcus* spp. rezistente la vancomicină cu un nivel ridicat de rezistență (genotipul *vanA*) prin metode de cultivare cu îmbogățire.

Tulpinile de *Enterococcus* utilizate în prezentul experiment au fost reprezentate de *E. faecium* 3091vanA+ și *E. faecalis* ATCC 29212, sensibilă la vancomicină. Tulpinile au fost cultivate pe agar Columbia agar suplimentat cu sânge de berbec de 5% la 37 °C.

Antibioticul a fost achiziționat de la Sigma-Aldrich (European Pharmacopoeia (EP) Standard de referință V0045000). Soluția stoc de vancomicină: 100 mg/ml. Soluția de lucru pentru vancomicină: 1

mg/ml. Mediul de cultură utilizat pentru îmbogățire a fost bulion de azidă de sodiu preparat în laborator și ChromID VRE (bioMérieux's) pentru detecție după îmbogățire.

Proba de gunoi de grajd contaminată artificial a fost reprezentată de compost provenit de la o fermă ecologică de vaci de lapte. Au fost pregătite tuburi Falcon de 50 ml, fiecare conținând $3g \pm 0,1$ gunoi de grajd. S-a fost adăugat vancomicină (1 mg/ml) în bulion de azidă Na pentru a se obține următoarele concentrații finale: 4 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$ și 32 $\mu\text{g/ml}$. Probele de gunoi (aproximativ 3 g) au fost omogenizate prin vortexare într-un volum de 27 ml de bulion de azidă fără vancomicină și respectiv suplimentat cu 4 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$ și 32 $\mu\text{g/ml}$ vancomicină.

Suspensii bacteriene standard au fost preparate separat în tampon fosfat salindin culturi de 24 de ore de *Enterococcus spp.* vanA+ și de *E. faecalis* ATCC 29212. Un volum de 300 μl din fiecare suspensie (densitate corespunzătoare standardului McFarland 0.5) a fost utilizat pentru a contamina artificial probele de gunoi de grajd preparate ca mai sus. Ulterior s-a adăugat bulion de azidă fără vancomicină și respectiv suplimentat cu 4 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$ și 32 $\mu\text{g/ml}$ vancomicină. În același timp au fost pregătite probe de gunoi de grajd necontaminate la care s-a adăugat bulion de azidă fără vancomicină și respectiv suplimentat cu 4 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$ și 32 $\mu\text{g/ml}$ vancomicină. Toate probele au fost incubate la 37°C timp de 24 de ore. Testele au fost efectuate în două replici. După pre-îmbogățire timp de 24 de ore, au fost realizate diluții zecimale seriale în tampon fosfat salin: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} și 10^{-6} care au fost inoculate pe ChromID VRE (10 μL în cultivare în picătură) și incubate la 37°C timp de 24 de ore. Numărul de UFC/ml a fost determinat prin numărarea coloniilor cu fenotip de rezistență caracteristic: colonii albastre-verzi: *E. faecalis* și colonii violet: *E. faecium*.

Rezultatele influenței diferitelor concentrații de vancomicină asupra gradului de recuperare a tulpinilor de *Enterococcus* sunt prezentate în **Fig. 10** și în **Tabelul 3**. Probele de compost necontaminate artificial cu tulpini de *Enterococcus* au fost negative pentru VRE în toate variantele de cultivare. În cazul probelor de gunoi de grajd contaminate artificial cu o tulpină de *Enterococcus faecalis* vanA+, rezultatele au arătat că recuperarea acestora din probele de gunoi de grajd nu a fost influențată semnificativ de diferitele concentrații de vancomicină.

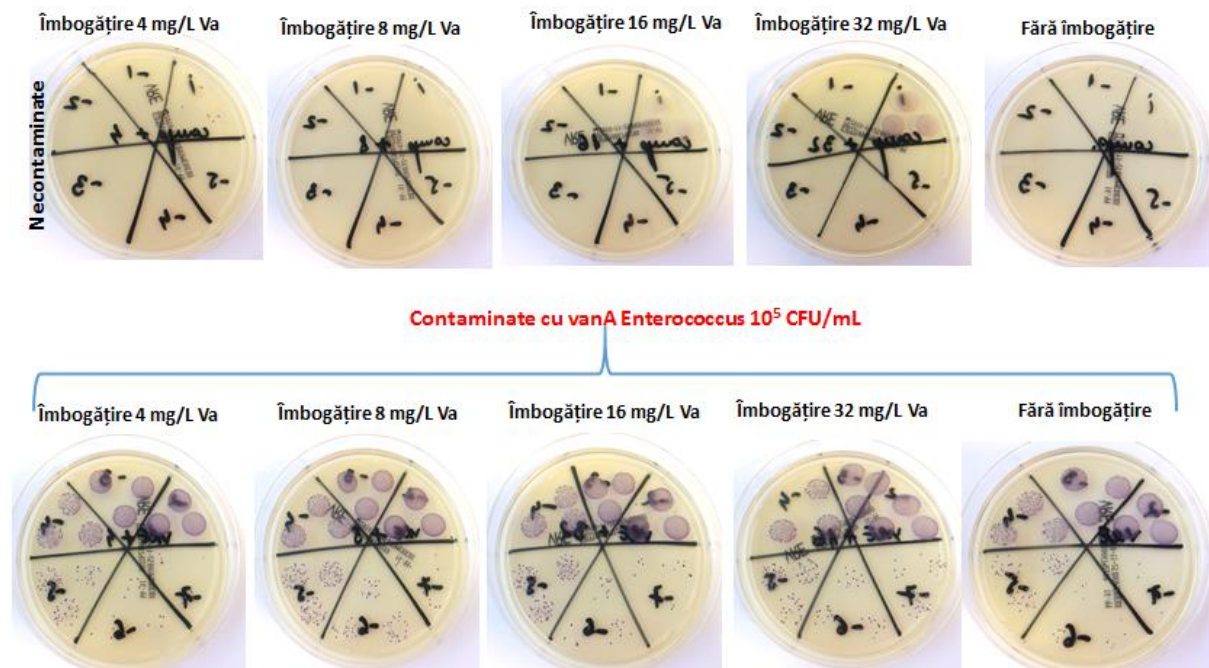


Fig. 10. Rezultatele diferitelor variante de cultivare utilizate pentru recuperarea VRE prin îmbogățire în absența și în prezență de diferite concentrații de vancomicină.

Tabelul. 3. Rezultatele diferitelor variante de cultivare utilizate pentru recuperarea VRE prin îmbogățire în absența și în prezență de diferite concentrații de vancomicină.

<i>vanA</i> Enterococcus	CFU / mL
4 μg/mL	37,33 x 10 ⁷
8 μg/mL	67,67 x 10 ⁷
16 μg/mL	35,66 x 10 ⁷
32 μg/mL	50,33 x 10 ⁷
Fără antibiotic	26,66 x 10 ⁷

Concluzii

Testele comparative aplicate pentru detecția și cuantificarea fenotipurilor de rezistență BLSE, CRE, VRE și MRSA în probe de gunoi de grajd contaminate artificial cu bacterii cu fenotip de rezistență cunoscut prin metode dependente de cultivare directă și îmbogățire în prezența a diferite concentrații de antibiotice au permis selectarea variantelor experimentale optime pentru recuperarea tulpinilor bacteriene Gram pozitive și a celor Gram negative cu fenotipuri de rezistență de interes în cadrul proiectului ARMIS. Identitatea tulpinilor rezistente utilizate pentru contaminare și recuperate în urma realizării protocoalelor a fost confirmată prin PCR.

Analizele comparative privind influența a diferite concentrații de antibiotice (CTX, VA, FOX) asupra gradului de recuperare a tulpinilor BLSE, CRE, MRSA și VRE au evidențiat existența unei relații de directă proporționalitate între cantitatea de antibiotic adăgată în etapa de pre-îmbogățire și gradul de reducere a microbiotei nespecifice pe mediile selective pentru izolarea tulpinilor Gram negative cu fenotipuri de rezistență BLSE și CRE. În schimb, vancomicina și respectiv ceftioxinul nu influențează semnificativ recuperarea tulpinilor Gram pozitive cu fenotipuri de rezistență țintă (VRE, MRSA) comparativ cu cultivarea cu pre-îmbogățire în mediu lichid selectiv (bulion azidă de sodiu pentru VRE și MH cu 6.5% NaCl pentru MRSA).

Analiza comparativă a influenței concentrației de vancomicină în mediul de îmbogățire asupra gradului de recuperare a tulpinii VRE vanA+ din probe de gunoi de grajd contaminate artificial a arătat că antibioticul nu influențează semnificativ recuperarea tulpinilor VRE.

Diseminarea rezultatelor

Prezentare orală- Chifiriuc M.C. - *University of Bucharest participation in the Joint Programme Initiative on Antimicrobial Resistance. Heads- up on Romanian Antimicrobial Resistance working group within RoChemBioNet. Project closure meeting ERANET HCVCYSPROT. February 2018, Bucharest, Romania (<http://www.biochim.ro/events/2018/hcv.php>).*

Bibliografie

1. Udikovic-Kolica N, Fabienne Wichmanna, c,1, Nichole A. Brodericka, and Jo Handelsmana, 2 Udikovic-Kolica 15202–15207 | PNAS | October 21, 2014 | vol. 111 | no. 42 www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1409836111.
2. Andersson D, Hughes. Nat Rev Microbiol. 2014 Jul;12(7):465-78. doi: 10.1038/nrmicro3270. Epub 2014 May 27.

