

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

*Investigarea în timp real a interacțiunii dintre microorganisme și
antibiotice/chimioterapice prin microcalorimetrie izotermă*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. POPA MIRCEA IOAN

Student-doctorand:

MUNTEAN ANDREI-ALEXANDRU

2018

A. Problema fundamentală	4
B. Contribuții personale	6
1. Rezistența la antibiotice într-un spital de pneumologie din România	6
1.1. Ipoteză și obiective specifice	6
1.2. Materiale și metode	6
1.3. Rezultate	6
1.4. Concluzii	9
2. Dezvoltarea unui protocol microcalorimetric de evaluare a interacțiunii în timp real a aminoglicozidelor cu Escherichia coli folosind celule de mixaj	10
2.1. Ipoteză și obiective specifice	10
2.2. Materiale și Metode	10
2.3. Rezultate	12
2.3.1. Anatomia creșterii microcalorimetrice	12
2.3.2. CMI-ul determinat conform protocolului EUCAST și conform protocolului modificat	13
2.3.3. Rezultatele experimentelor microcalorimetrice	14
2.3.4. pH-ul mediului de cultură în momentul adăugării antibioticului	14
2.3.5. Optimizarea protocolului de obținere a unui CMI modificat	15
2.4. Discuții	16
2.5. Concluzii	16
3. Optimizarea și validarea protocolului microcalorimetric de evaluare a interacțiunii în timp real a aminoglicozidelor cu Klebsiella pneumoniae folosind celule de batch	16
3.1. Ipoteză și obiective specifice	16
3.2. Materiale și Metode	17
3.3. Rezultate	17
3.3.1. Determinarea CMI conform protocolului EUCAST și conform protocolului experimental	17
3.3.2. Rezultate microcalorimetrice	18
3.4. Discuții	20
3.5. Concluzii	20
4. Detecția microcalorimetrică a rezistenței la Cefoxitin în S. aureus - discriminarea microcalorimetrică a tulpinilor MRSA-MSSA	21
4.1. Introducere și obiective specifice	21
4.2. Materiale și metode	21
4.3. Rezultate	22
4.4. Discuții	25

4.5. Concluzii	26
5. Detecția rapidă a producției de carbapenemaze	26
5.1. Introducere și obiective specifice	26
5.2. Materiale și metode	26
5.2.1. Metoda Inactivării Carbapenemului (Carbapenem Inactivation Method)	26
5.2.2. Protocol Carbapenem Inactivation Challenge Method (CICM)	27
5.3. Rezultate	28
5.3.1. Definirea unui prag al detecției activității de carbapenemază	28
5.3.2. Validarea timpului de incubare a tulpinilor	28
5.3.3. Optimizări suplimentare	29
5.4. Discuții	30
5.5. Concluzii	30
6. Detecția microcalorimetrică rapidă a rezistenței semnificative clinic la carbapenemi în Enterobacteriaceae	31
6.1. Obiective specifice	31
6.2. Materiale și Metode	31
6.3. Rezultate	31
6.3.1. Determinarea CMI conform protocolului EUCAST	31
6.3.2. Determinarea CMI conform protocolului experimental - determinare microcalorimetrică	32
6.3.3. Procesare secundară în R a creșterii bacteriene	33
6.3.4. Modelarea creșterii bacteriene, prin aplicarea de modele matematice	34
6.3.5. Aplicarea unui model simplu de creștere bacteriană pentru diferențierea în timp real a răspunsului bacterian la antibiotic.	35
6.3.6. Aplicarea unui sistem automat de analiză a creșterii microbiene	36
6.4. Discuții	37
6.5. Concluzii	37
7. Concluzii și Contribuții personale	38
7.1. Concluzii	38
7.2. Contribuții proprii	40

A. Problema fundamentală

În contextul creșterii rezistenței față de antibiotice/chimioterapice antimicrobiene, sunt necesare noi metode rapide de detecție a rezistenței pentru instituirea unor măsuri precoce de igienă și de intervenție terapeutică. La ora actuală sunt descrise o serie de metode fenotipice și genotipice de testare a susceptibilității la antibiotice, metoda microdiluțiilor în bulion fiind considerată standardul de aur.

Printre patogenii cu cel mai important impact clinic și a căror detecție trebuie realizată de urgență se numără *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA) și enterobacteriile rezistente la carbapenemi (prin producția de carbapenemaze sau prin alte mecanisme). În acest context, susceptibilitatea enterobacteriilor față de aminoglicozide este de asemenea importantă, detecția sa precoce putând ghida terapia antibiotică.

Potrivit ghidurilor terapeutice, inițierea antibioterapiei empirice se realizează pe baza mai multor factori, cum ar fi:

- Starea clinică a pacientului, respectiv severitatea bolii
- Factorii de risc individuali ai pacientului ce pot fi asociați cu eșecul terapeutic / existența unei infecții cu germeni rezistenți
- Antibiograma locală, de spital / unitatea clinică în care este tratat pacientul, ținându-se seama de epidemiologia locală (1)

Astfel, una din problemele fundamentale în abordul terapiei antiinfecțioase trebuie să țină seama de nivelul „de fond” al rezistenței în secția unde pacientul este tratat. Spitalele clinice din România nu au o activitate susținută de supraveghere epidemiologică a rezistenței. Însă, prin datele colectate de la „spitale santinelă” care raportează susceptibilitatea antibiotică a infecțiilor invazive, există rapoartări internaționale care prezintă cifre îngrijorătoare. (2)

Urmează izolarea agentului etiologic responsabil de infecție și testarea susceptibilității față de antibiotice și chimioterapice. Metodele fenotipice actuale, propuse de EUCAST și CLSI, necesită cel puțin 18-24 de ore pentru a putea fi interpretate. Foarte recent, EUCAST a publicat un tabel cu praguri interpretative pentru citirea la 4, 6, respectiv 8 ore. (3)

Microcalorimetria diferențială izotermă are la bază efectele Seebeck și Peltier, ce implică convertirea, în cadrul unui termocuplu, a diferenței de temperatură în diferență de potențial și invers. (4,5) „Componentele cele mai importante ale acestui tip de calorimetru sunt elementul de încălzire/răcire care este o pilă Peltier ce transformă energia electrică aplicată în căldură degajată sau absorbită folosind efectul Peltier și senzorul de temperatură care transformă diferența de temperatură în semnal electric folosind efectul Seebeck prin intermediul unei calibrări este transformat de un software în flux de căldură ce este reprezentat grafic în funcție de timp.” (6)

Lucrarea de față propune dezvoltarea unei *antibiograme microcalorimetrice în timp real*, un domeniu încă neexplorat în literatura de specialitate.

Ipoteza de lucru este reprezentată de posibilitatea de exploatare a microcalorimetriei izoterme pentru a obține informații în timp real privind răspunsul metabolic al microorganismului de cercetat în interacțiunea cu un antibiotic/chimioterapic.

Pentru a explora această ipoteză s-au efectuat o serie de studii:

- epidemiologice, pentru descrierea nivelului de rezistență la antibiotice a microorganismelor ESKAPE
- de laborator, îmbinând metode clasice (determinarea concentrației minime inhibitorii conform protocolului EUCAST) și experimentale (monitorizarea în timp real a interacțiunii microorganismului de studiat cu antibiotice/chimioterapice antimicrobiene folosind microcalorimetria izotermă)
- dezvoltarea unui protocol de detecție fenotipică a activității de carbapenemază ce scurtează timpul de necesar pentru interpretarea rezultatului la doar 3 ore (față de 6-8 ore cât a fost raportat inițial), ținând cont de detecția răspunsului tulpinii *E. coli* ATCC 25922 la meropenem.

Studiile, obiectivele specifice fiecărui studiu, metodologia de cercetare individuală se regăsește în secțiunea *Contribuții personale*.

B. Contribuții personale

1. Rezistența la antibiotice într-un spital de pneumologie din România

1.1. Ipoteză și obiective specifice

Ipoteza de lucru a acestui studiu este reprezentată de faptul că un spital terțiar de pneumologie va avea o epidemiologie particulară în ceea ce privește microorganismele cel mai frecvent implicate în patologie și a rezistenței acestora la antibiotice. Microorganismele ESKAPE au fost investigate datorită importanței lor epidemiologice, fiind frecvent implicate în infecții severe și având un risc ridicat de a dezvolta și achiziționa rezistență antimicrobiană.

Obiectivul specific este descrierea nivelului rezistenței la antibiotice a unui centru terțiar de pneumologie din România, obiectiv ce se înscrie în obiectivele generale ale tezei, generând informații legate de nivelul de rezistență locală și stabilind bazele pentru cercetările de laborator întreprinse de doctorand.

1.2. Materiale și metode

Am efectuat un studiu retrospectiv al antibiogramelor microorganismelor ESKAPE (*Enterococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Enterobacter* spp.) izolate între 2010 și 2015 în Institutul Național de Pneumoftiziologie Marius Nasta (INPMN) din București. Toate testele de susceptibilitate la antibiotic au fost efectuate prin metoda Kirby-Bauer pe mediu de agar Müller-Hinton și interpretate conform punctelor de referință ale EUCAST și CLSI din 2016.

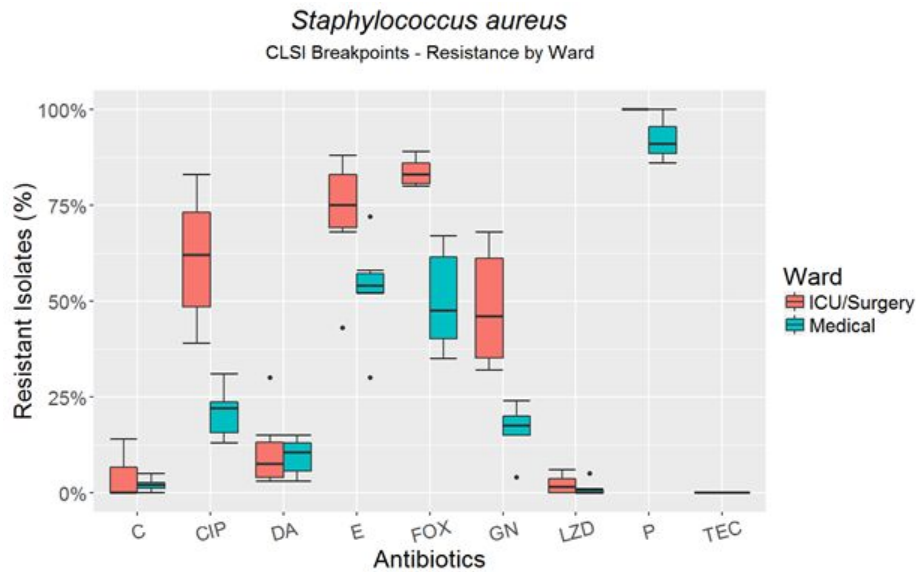
Doar izolatele provenind de la pacienți adulți (> 18 ani) au fost selectate pentru analiză. De asemenea, numai probele izolate din produse patologice respiratorii (spută, spută indusă, aspirat bronșic, lavaj bronșic) au fost incluse în studiu.

1.3. Rezultate

Pe parcursul a 6 ani (2010-2015), laboratorul de microbiologie din INPMN a primit 4683 de tulpini încadrate în genurile ESKAPE. În urma aplicării criteriilor de selecție, au

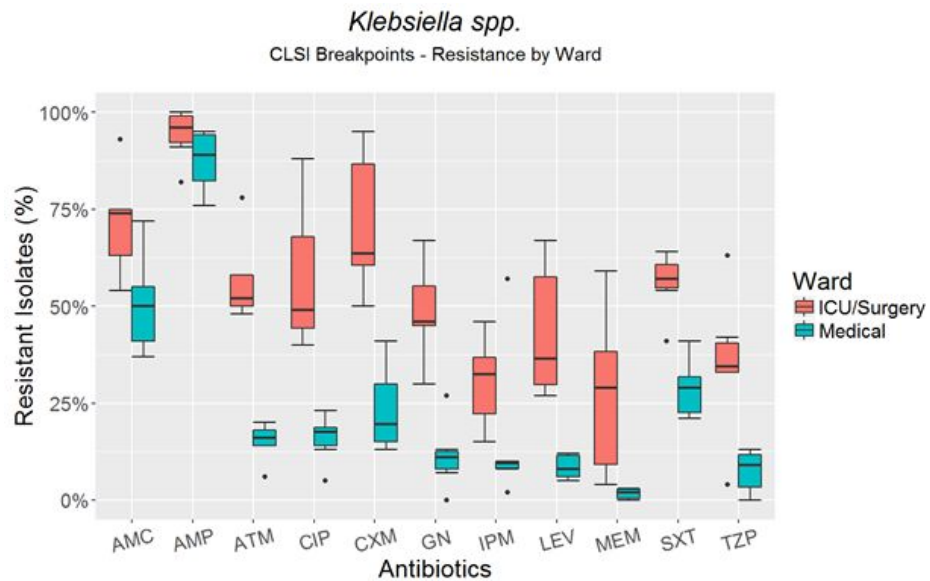
fost analizate 61% dintre acestea (un total de 2859 de tulpini). Numărul mic de tulpini de *Enterobacter* spp. (n=2) a condus la excluderea acestora din studiu. Datorită numărului mic și a faptului că majoritatea tulpinilor au fost izolate din infecții urinare, nici tulpinile de *Enterococcus* spp. nu au fost incluse în analiza finală. În perioada 2010-2015 au fost analizate 573 de tulpini de *S. aureus*, 466 tulpini de *Klebsiella* spp., 503 tulpini de *Acinetobacter baumannii* și 1296 de tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*. Dintre acestea, *Pseudomonas aeruginosa* a fost patogenul cel mai frecvent izolat în timp ce *Acinetobacter baumannii* fost patogenul întâlnit predominant pe secțiile de Anestezie și Terapie Intensivă (ATI).

Din totalul tulpinilor testate la cefoxitin pentru identificarea tulpinilor de MRSA (68.74%, n=394), majoritatea erau rezistente la meticilină (58,12%, n=229), 85% dintre tulpini fiind izolate din secțiile de ATI/Chirurgie (Figura 1.1). În ceea ce privește *Klebsiella* spp., au fost testate de rutină două carbapeneme, imipenem și meropenem, Dintre cele două, rezistența globală față de meropenem s-a dovedit mai redusă (aproximativ 11%). Cu toate acestea, deși rezistența pe Secțiile Medicale s-au menținut la un nivel scăzut și constant, pe secțiile de ATI/Chirurgie rezistența a fost variabilă, depășind uneori și 50%. (Figura 1.2). În cazul *Acinetobacter baumannii*, rezistența față de carbapeneme este de asemenea extrem de ridicată, observându-se nivele de peste 50% atât pe secțiile Medicale cât și pe cele de ATI/Chirurgie. (Figura 1.3) În ceea ce privește tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa*, diferențele între secțiile Medicale și cele de ATI/Chirurgie sunt extrem de importante pentru majoritatea antibioticelor testate cu excepția colistinului, nivelele de rezistență din secțiile de ATI/Chirurgie fiind de două ori mai mari comparativ cu cele Medicale. (Figura 1.4)



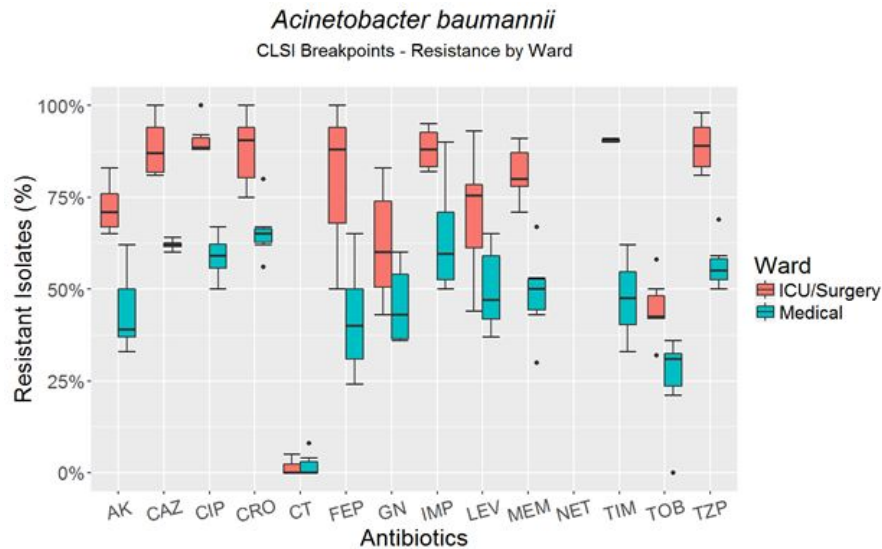
C=Cloramfenicol, CIP=Ciprofloxacin, DA=Clindamicină, E=Eritromicină, FOX=Cefoxitin, GN=Gentamicină, LZD=Linezolid, P=Penicilină, TEC=Teicoplanină

Figura 1.1. Boxplot ce arată variabilitatea rezistenței înregistrate la *S. aureus* între secțiile de ATI/Chirurgie și secțiile medicale



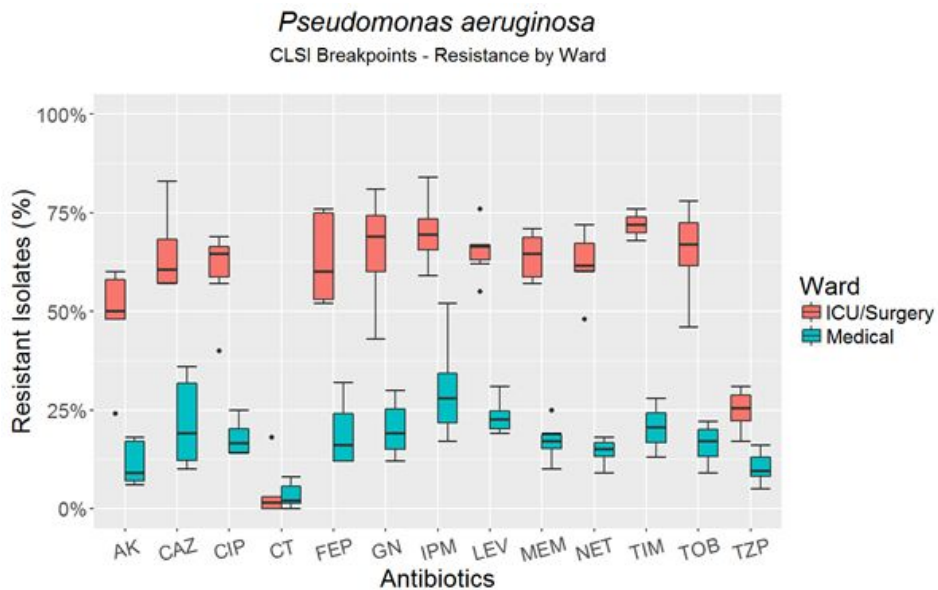
AMP=Ampicilină, AMC=Amoxicilină, ATM=Aztreonam, CXM=Cefuroxim, GN=Gentamicină, CIP=Ciprofloxacin, LEV=Levofloxacin, SXT=Trimethoprim Sulfametoxazol, IPM=Imipenem, MEM=Meropenem, TZP=Piperacilină-Tazobactam

Figura 1.2. Barplot ce prezintă rezistența globală a tulpinilor de *Klebsiella pneumoniae* în funcție de interpretarea limitelor de susceptibilitate conform ghidurilor CLSI și, respectiv, EUCAST



AK=Amikacin, CAZ = Ceftazidime, CIP = Ciprofloxacin, CRO = Ceftriaxone, CT = Colistin, FEP = Cefepime, GN = Gentamicin, IMP = Imipenem, LEV = Levofloxacin, MEM = Meropenem, NET = Netilmicin, TIM = Ticarcillin clavulanic acid, TOB = Tobramycin, TZP = Piperacillin-tazobactam

Figura 1.3. Barplot ce prezintă variabilitatea rezistenței înregistrate între secțiile Medicale și ATI/Chirurgie a tulpinilor de *Acinetobacter baumannii*



AK = Amikacină, CAZ = Ceftazidim, CIP = Ciprofloxacin, CT = Colistin, FEP = Cefepim, GN = Gentamicin, IMP = Imipenem, LEV = Levofloxacin, MEM = Meropenem, NET = Netilmicină, TIM = Ticarcillină- Clavulanat, TOB = Tobramicină, TZP = Piperacilină-tazobactam

Figura 1.4. Barplot ce prezintă variabilitatea rezistenței înregistrate între secțiile Medicale și ATI/Chirurgie a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa*

1.4. Concluzii

Studiul de față certifică datele din literatura de specialitate referitoare la nivelul îngrijorător de ridicat al rezistenței antimicrobiene și ridică întrebări legate de opțiunile

terapeutice disponibile. De asemenea, identifică microorganismele cu importanță epidemiologică maximă și nivelul de rezistență la antibiotice.

2. Dezvoltarea unui protocol microcalorimetric de evaluare a interacțiunii în timp real a aminoglicozidelor cu *Escherichia coli* folosind celule de mixaj

2.1. Ipoteză și obiective specifice

Progresul din ultimii ani a făcut ca domeniul microbiologiei medicale să devină o specialitate practică în timp real, oferind informații prețioase clinicianului, atât prin rezultatele care sunt comunicate secvențial cât și prin consulturile interdisciplinare de diagnostic și terapie. (7) Microcalorimetria izotermă este o metodă neinvazivă, mai sensibilă decât metodele optice uzual utilizate în microbiologie (nefelometria, spectrofotometria, etc). Astfel, microcalorimetria a fost folosită pentru a exploata protocoalele fenotipice clasice de testare a susceptibilității. (8)

Studiul prezintă două obiective specifice:

1. Dezvoltarea unui protocol microcalorimetric preliminar de evaluare a interacțiunii în timp real a aminoglicozidelor cu *Escherichia coli* ATCC 25922.
2. Studiarea factorilor care influențează protocolul și optimizarea parametrilor tehnici.

2.2. Materiale și Metode

Pentru acest studiu s-a folosit tulpina ATCC 25922 de *Escherichia coli*, sensibilă la aminoglicozide, ce prezintă o termogramă bine definită atât în literatura internațională cât și bine cunoscută echipei, ea fiind evaluată în cadrul unor studii anterioare. (9)

Concentrația Minimă Inhibitorie (CMI) a fost determinat folosind standardul ISO 20776-1 prin tehnica micro-/macro-diluțiilor (10) și interpretat conform pragurilor EUCAST. (11)

CMI-ul modificat a fost determinat folosind tehnica macrodiluțiilor și interpretat „pereche” cu concentrația minimă inhibitorie obținută prin metoda clasică. Mediul folosit a fost TSB. Tulpina investigată a fost crescută peste noapte la 37 °C pe mediu TSA. O

colonie izolată a fost resuspendată în 2500 μL de mediu TSB la o densitate de 0,1 McFarland, urmând apoi ca suspensia să fie diluată 1/100. Cultura a fost incubată, cu monitorizare nefelometrică din oră în oră până la atingerea pragului de 0,5 McFarland (Figura 2.1). Într-un mod similar, s-a recurs la evaluarea unui CMI modificat folosind bulion Müller-Hinton (*Müller Hinton Broth*, MHB).

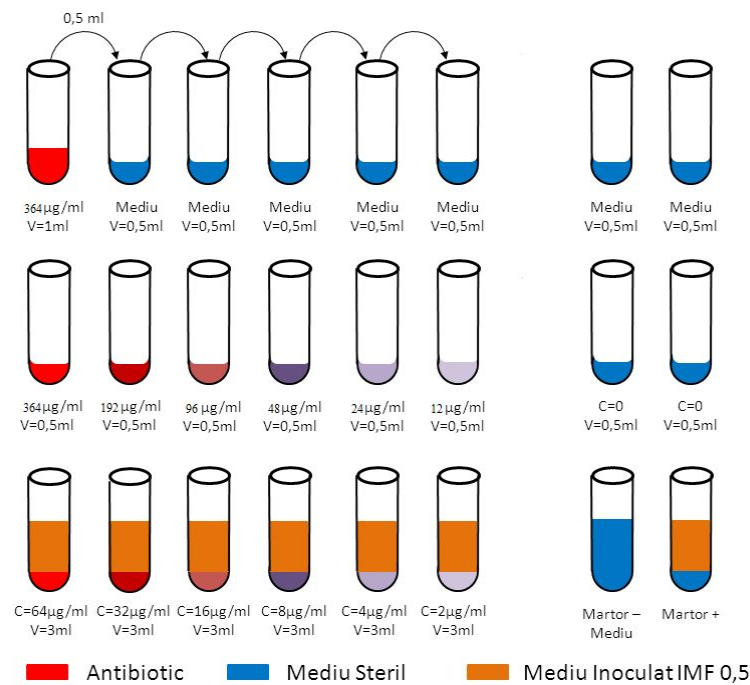


Figura 2.1. Schemă privind modul de pregătire a antibioticului în vederea determinării susceptibilității la antibiotice conform protocolului experimental. IMF - indice McFarland

Într-o încercare de optimizare a timpului de obținere a rezultatelor tulpina investigată a fost crescută peste noapte la 37 °C pe mediu TSA. Pentru optimizare, deși s-au efectuat teste preliminare folosind mediul TSB, s-a decis efectuarea înregistrărilor microcalorimetrice exclusiv cu mediu MHB - pentru mai buna standardizare a metodei și eliminarea unor variabile suplimentare ale sistemului experimental. În cazul experimentelor microcalorimetrice, tip *mixing*, în momentul obiectivării nefelometrice a creșterii (martor de creștere incubat în paralel cu experimentul microcalorimetric), se recurge la adaosul de antibiotic prin acționarea pistonului.

În acest studiu au fost utilizate două microcalorimetre diferențiale, cu un canal de înregistrare și un canal referință, modele Setaram micro-DSC III și micro-DSC 7 Evo,

pentru înregistrarea semnalului microcalorimetric. Aparatele au fost echilibrate termic prin deschidere cu cel puțin o oră înainte de debutul experimentului.



Figura 2.2. Microcalorimetru Setaram MicroDSC III



Figura 2.3. Microcalorimetru Setaram MicroDSC 7 Evo

2.3. Rezultate

2.3.1. Anatomia creșterii microcalorimetrice

Termogramă tipică a culturii de *Escherichia coli* ce prezintă un model creștere cu două maxime de intensitate (vârfuri, *peaks*) este prezentată în Figura 2.4.(6)

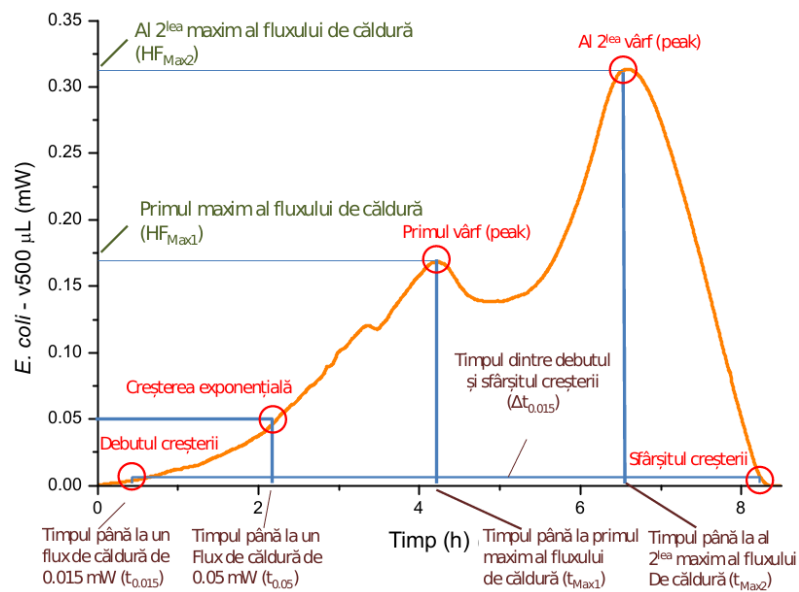


Figura 2.4. Grafic de evoluție al fluxului de căldură a unei culturi de *Escherichia coli*, neinhibate. Raportul dintre intensitatea primului și celui de-al doilea flux de căldură este dependentă de volumul de cultură din cuva microcalorimetrică. (9)

2.3.2. CMI-ul determinat conform protocolului EUCAST și conform protocolului modificat

În urma experimentelor efectuate în mediul Mueller Hinton cu gentamicină, CMI-ul a fost determinat a fi 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Acest fapt a fost susținut și de alte articole care au raportat rezultate similare folosind protocolul standard - Figura 2.5. (8,12)

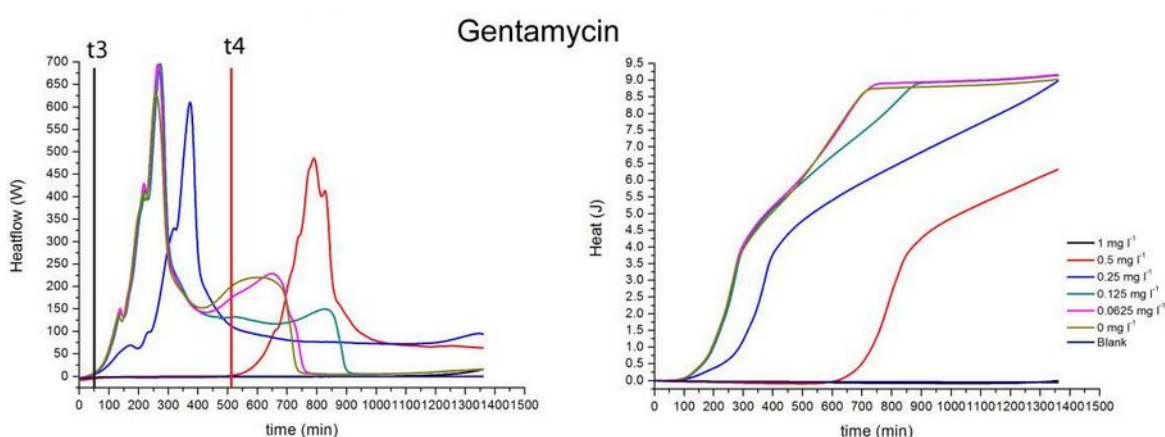


Figura 2.5. Grafic adaptat după studiul semnat de von Ah și colaboratori, cu privire la protocolul CLSI clasic, adaptat microcalorimetric. (8)

În cazul protocolului modificat, rezultatele obținute arată o diferență importantă a concentrației minime inhibitorii determinate în funcție de mediul folosit și de modul de obținere a densității de 0,5 unități McFarland (Tabel II.1).

Tabel II.1. Rezultate ale determinărilor CMI, luând în calcul două medii de cultură și două metode de pregătire ale inoculului testat.

Condiții experimentale	Mediu folosit	Concentrația de antibiotic	Concentrația de antibiotic în cuva calorimetrică
Creștere de la 0,1 unități McFarland, diluție 1/100	TSB	400 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$	100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$
Creștere de la 0,3 unități McFarland	TSB	200 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$	50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$
Creștere de la 0,1 unități McFarland,	MHB	100 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$	20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$

diluție 1/100			
Creștere de la 0,3 unități McFarland	MHB	50 μg/0,5 mL	10 μg/100 μL

2.3.3. Rezultatele experimentelor microcalorimetrice

Rezultatele creșterii nefelometrice au fost replicate și prin înregistrări microcalorimetrice. Nu s-a identificat o diferență semnificativă a timpului necesar până la obținerea aceleiași densități optice în cele două sisteme de creștere ($p > 0,05$). Evoluția termică a culturii de *Escherichia coli* ATCC 25922 a putut fi urmărită în timp real, după adăugarea și omogenizarea mediului cu antibiotic - Figura 2.6.

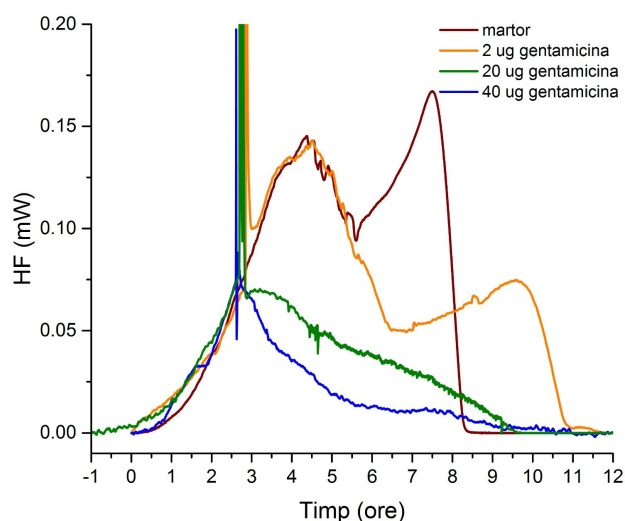


Figura 2.6. Suprapunerea experimentelor de tip *mixing*. Creștere neinhibată a unei culturi cu densitate inițială de 0,1 unități McFarland, diluată 1/100. Supraveghere nefelometrică paralelă până la o densitate optică de 0,5 unități McFarland. Se observă evoluția diferită în funcție de concentrația antibioticului cu care s-a efectuat amestecarea. Ilustrația a fost raportată inițial în teza de doctorat a dr. Zaharia Dragoș Cosmin și reprezintă efortul comun de cercetare-dezvoltare în cadrul laboratorului, fiind folosită cu acordul său. (6)

2.3.4. pH-ul mediului de cultură în momentul adăugării antibioticului

Modificările pH-ului sunt datorate metabolismului fermentativ al microorganismelor. Scăderea pH-ului este direct proporțională cu creșterea bacteriană, descriind un model liniar - Figura 2.7.

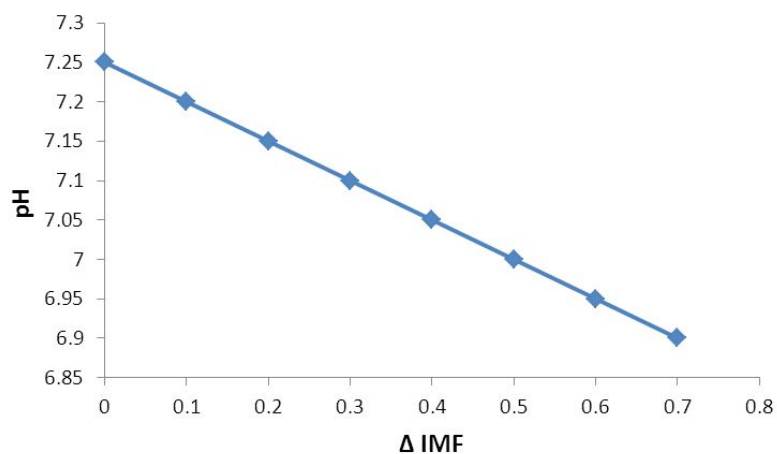


Figura 2.7. Scădere liniară a pH-ului culturii bacteriene datorată metabolismului fermentativ. Se observă faptul că, la atingerea densității optice de 0,5 unități McFarland, pH-ul mediului a scăzut cu mai mult de 0,25 de unități.

2.3.5. Optimizarea protocolului de obținere a unui CMI modificat

În etapa următoare, s-a testat posibilitatea de creștere a microorganismelor folosind sistemul de celule tip *mixing* cu inocul de pornire de 0,3 unități McFarland, obținut prin resuspensie directă a microorganismelor. Aceste rezultate se sprijină pe modificările pH-ului documentate în secțiunea 2.3.4 și urmăresc „administrarea” antibioticului în intervalul 7.2 - 7.4, conform recomandărilor CLSI și EUCAST.

În Figura 2.8, se observă suprapunerea a două termograme - curba de culoare albastră reprezintă o creștere neinhibată cu inocul resuspendat la o densitate de 0,3 unități McFarland. O termogramă a interacțiunii tulpinii *E. coli* ATCC 25922 în MHB cu antibiotic într-o concentrație egală cu CMI este reprezentată cu culoarea verde.

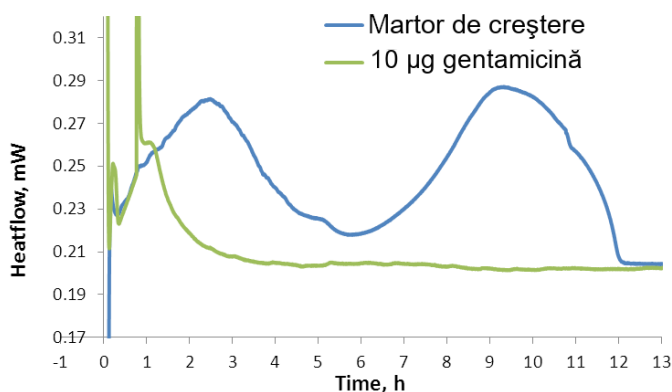


Figura 2.8. Comparație a termogramelor microcalorimetrice obținute prin înregistrarea unei creșteri de *Escherichia coli* fără *mixing* (traseu albastru - Martor de creștere) și cu *mixing* al unei cantități de antibiotic egală cu CMI (traseu verde - 10 μg gentamicină).

2.4. Discuții

În acest prim studiu microcalorimetric s-au trasat unele dintre principiile fundamentale pentru efectuarea și optimizarea protocolului experimental de investigare rapidă a susceptibilității la antimicrobiene și a monitorizării în timp real a interacțiunii microorganismelor cu antibiotice / chimioterapice. Microcalorimetria izotermă permite detecția rapidă a creșterii microorganismelor, dar, actualmente, timpul necesar până la detecția CMI variază între 4 și 15 ore pentru microorganismele uzuale. (8,13,14) Folosirea microcalorimetrelor multicanal permite evaluarea simultană a unor doze multiple de antibiotic, oferind un rezultat fiabil al CMI, „sacrificând” timpul de detecție.

Noutatea protocolului constă în două elemente:

- **testarea unui inocul bogat de microorganisme** ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) față de cel standardul EUCAST (5×10^5 CFU/mL).
- **interpretarea rezultatelor se face prin analiza în timp real a fluxului de căldură** (a activității metabolice) a microorganismelor, prin comparație cu metoda standard: aceea de evalua timpul necesar până la detecția creșterii.

2.5. Concluzii

Microcalorimetria izotermă reprezintă o metodă de monitorizare în timp real a creșterii microbiene și a răspunsului în timp real a culturii bacteriene.

3. Optimizarea și validarea protocolului microcalorimetric de evaluare a interacțiunii în timp real a aminoglicozidelor cu *Klebsiella pneumoniae* folosind celule de *batch*

3.1. Ipoteză și obiective specifice

În baza experimentelor inițiale cu *Escherichia coli* și gentamicină, dar și a limitelor identificate în cadrul acelor experimente, s-a întreprins un studiu pentru a testa ipoteza

posibilității de optimizare a protocolului microcalorimetric pentru obținerea unor rezultate rapide, fără a folosi celulele de tip *mixing*.

Obiectivul studiului este evaluarea protocolului experimental pe un model de *Klebsiella pneumoniae* în interacțiunea în timp real cu gentamicină. Optimizarea protocolului microcalorimetric de evaluare a interacțiunii în timp real a aminoglicozidelor cu *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, o tulpină cu susceptibilitate intermediară la gentamicină.

3.2. Materiale și Metode

În cadrul studiului s-a utilizat o tulpină de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, producătoare de SHV-18, o beta-lactamază cu spectru extins (*Extended Spectrum Beta Lactamase*, ESBL).

Determinarea CMI conform protocolului EUCAST a fost făcută prin macrodiluții, după protocolul descris anterior. Conform protocolului experimental, determinarea CMI a fost făcută prin macrodiluții, cu determinare nefelometrică, după protocolul descris anterior, cu modificări: tulpina de investigat, crescută 24 de ore pe mediu solid, a fost resuspendată în mediu lichid, spălată cu mediu MHB proaspăt și resuspendată la o densitate de 0,5 unități McFarland.

3.3. Rezultate

3.3.1. Determinarea CMI conform protocolului EUCAST și conform protocolului experimental

În urma investigării conform protocolului și interpretării EUCAST, rezultă că *K. pneumoniae* ATCC 700603 prezintă o concentrație minimă inhibitorie de 4-8 µg/mL la gentamicină - susceptibilitate intermediară / rezistent. În urma investigării conform protocolului experimental, *K. pneumoniae* ATCC 700603 prezintă o concentrație minimă inhibitorie de 128 µg/mL la gentamicină.

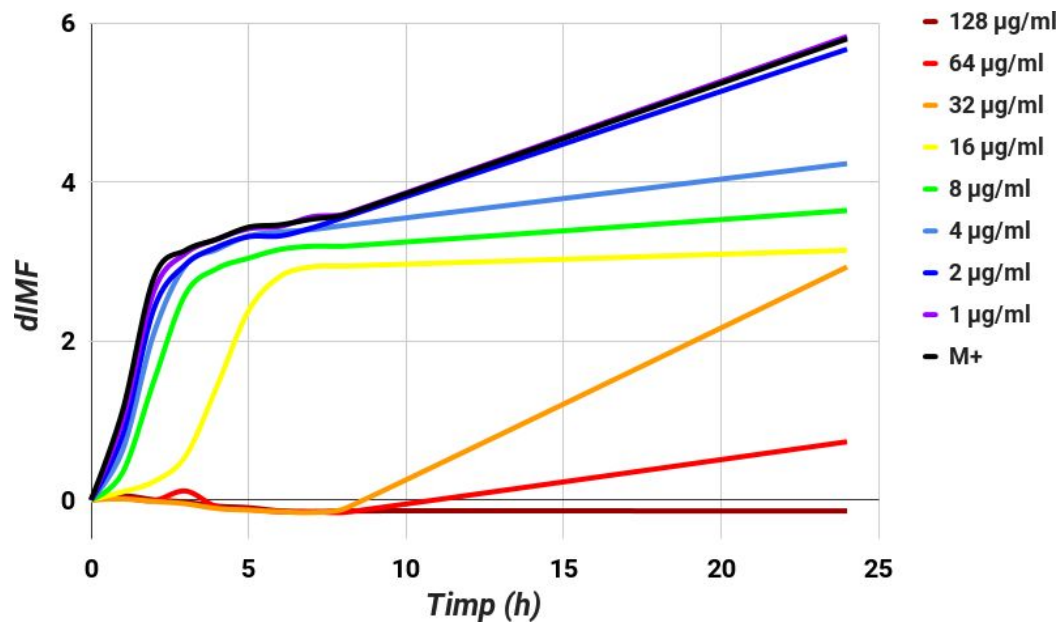


Figura 3.1. Înregistrare nefelometrică în dinamică a interacțiunii *Klebsiella pneumoniae* - gentamicină, conform protocolului experimental.

3.3.2. Rezultate microcalorimetrice

3.3.2.1. Anatomia creșterii *K. pneumoniae* conform protocolului EUCAST

Creșterea microcalorimetrică a tulpinii ATCC 700603 de *Klebsiella pneumoniae* este asemănătoare în foarte multe aspecte cu cea a tulpinii ATCC 25922 de *Escherichia coli*, având același model cu două vârfuri (Figura 3.2)

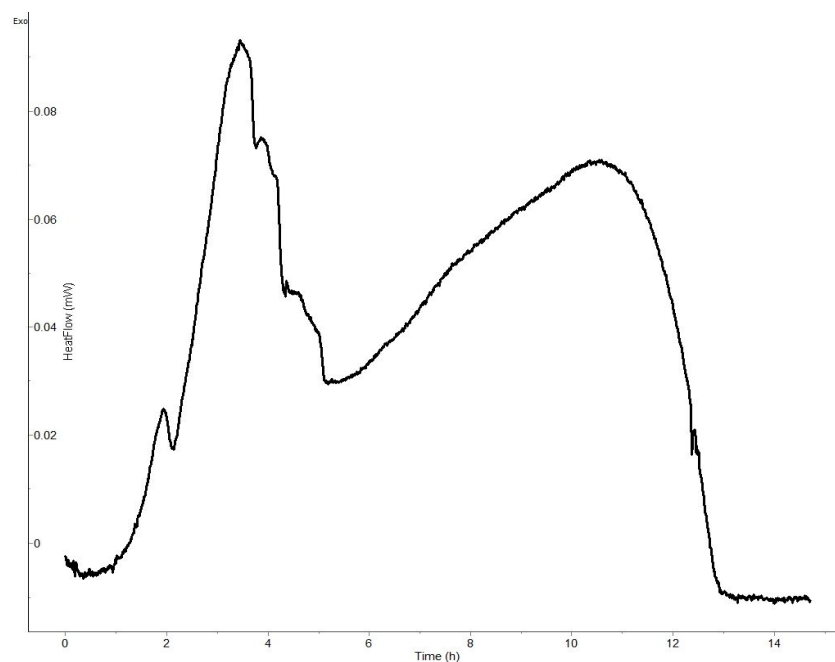


Figura 3.2. Termogramă de creștere a tulpinii de *K. pneumoniae* ATCC 700603 în mediu Müller Hinton, pregătită conform protocolului EUCAST.

3.3.2.2. Anatomia creșterii *K. pneumoniae* conform protocolului optimizat

Creșterea microcalorimetrică a tulpinii ATCC 700603 de *Klebsiella pneumoniae* atunci când microorganismul este resuspendat la o densitate nefelometrică de 0,5 unități McFarland (Figura 3.3).

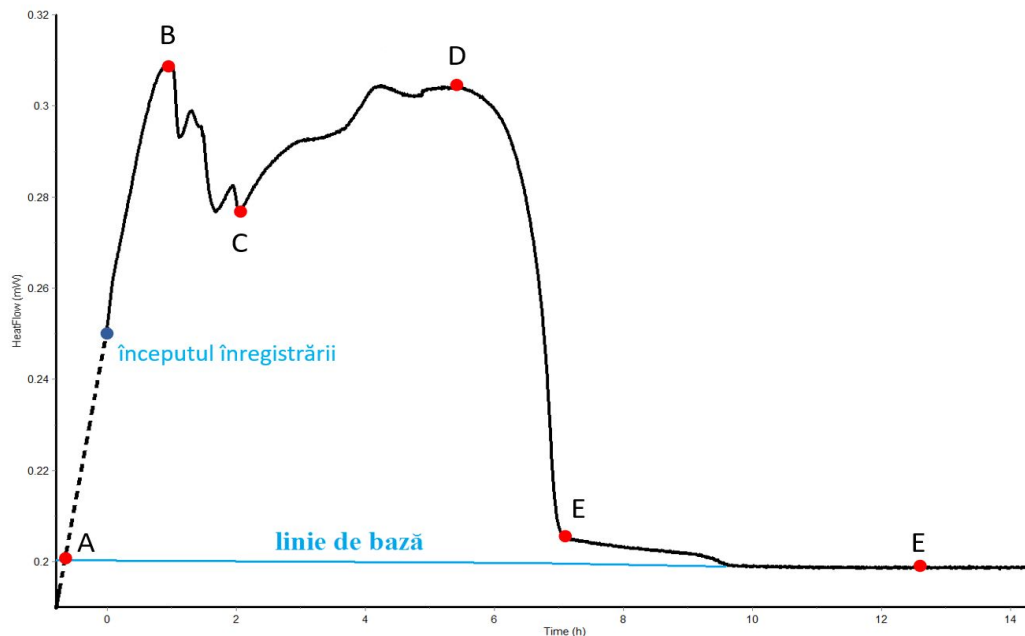


Figura 3.3. Termogramă de creștere a tulpinii de *K. pneumoniae* în mediu Müller Hinton, pregătită conform protocolului experimental.

Se observă debutul precoce al creșterii, din primele minute ale echilibrării microcalorimetrului. Intensitatea primului vârf este mai intens, iar timpul total de creștere este mai scurt (aproximativ 7 ore, cu o creștere reziduală, de nivel scăzut, până la 10 ore).

3.3.2.2. Rezultate ale interacțiunii *K. pneumoniae* conform protocolului optimizat

Interacțiunea ATCC 700603 de *Klebsiella pneumoniae* resuspendat la o densitate de 0,5 unități McFarland cu diferite concentrații de gentamicină (Figura 3.4).

Pentru plaja de concentrații de antibiotic 0 - 16 $\mu\text{g/mL}$ creșterea microcalorimetrică poate fi identificată imediat. Pentru concentrația de 32 $\mu\text{g/mL}$, este evidențiable în prima oră de monitorizare. Creșterea este evidențiable la concentrația de 64 $\mu\text{g/mL}$ după aproximativ 7,5 ore. Pentru 128 $\mu\text{g/mL}$, nu se evidențiază creștere pe perioada de 24 de ore.

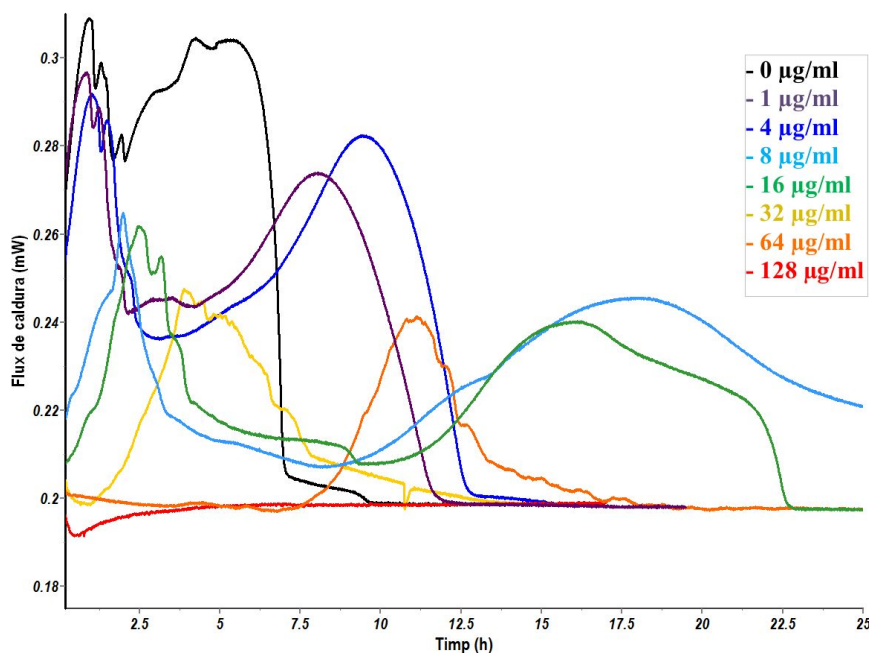


Figura 3.4. Termogramă de creștere a tulpinii de *K. pneumoniae* în mediu Mueller Hinton, pregătită conform protocolului optimizat.

3.4. Discuții

Există o serie de asemănări ale acestor experimente, cu cele de *E. coli* ATCC 25922, prezentate în capitolul 2, și oferă posibilitatea de urmărire imediată a interacțiunii microorganism-antibiotic/chimioterapic antibacterian.

Este păstrat modelul de creștere cu două vârfuri și se reduce considerabil timpul total de creștere față de protocolul de pregătire a suspensiei bacteriene conform EUCAST.

Protocolul optimizat oferă posibilitatea de detecție directă a creșterii microbiene, imediat după echilibrarea microcalorimetrului.

Cantitatea de antibiotic necesară pentru optimizarea antibioticului este modificată de suspensia bacteriană mai mare. Spre deosebire de tulpina ATCC 25922 de *E. coli*, o tulpină sensibilă, concentrația de antibiotic trebuie adaptată pentru a investiga efectul bactericid al unei tulpini intermediar/rezistente la gentamicină.

3.5. Concluzii

Protocolul modificat permite depistarea unei concentrații prag de rezistență la aminoglicozide. Microcalorimetria izotermă conduce la o depistare mai rapidă a creșterii microbiene decât nefelometria, iar protocolul optimizat poate fi adaptat astfel încât să se

poată depista creșterea specifică rezistenței la antibiotice în timp real (dectecția creșterii la o oră de la momentul monitorizării interacțiunii microorganism-antibiotic/chimioterapic).

4. Dectecția microcalorimetrică a rezistenței la Cefoxitin în *S. aureus* - discriminarea microcalorimetrică a tulpinilor MRSA-MSSA

4.1. Introducere și obiective specifice

Staphylococcus aureus reprezintă unul dintre microorganismele cel mai frecvent implicate în patologia umană.

Obiectivul specific al studiului este dezvoltarea unui protocol microcalorimetric de discriminare a tulpinilor de *Staphylococcus aureus* rezistente la meticilină (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) de cele susceptibile la meticilină MSSA (*Methicillin Susceptible Staphylococcus aureus*) urmărind interacțiunea în timp real a tulpinilor de *S. aureus* cu cefoxitină.

4.2. Materiale și metode

Tulpinile folosite au fost reprezentate de 2 tulpini de colecție (ATCC 29213 - producător de betalactamază, susceptibil la cefoxitin și ATCC 43300 - mutație PBP2a, rezistent la cefoxitin), recomandate de către EUCAST pentru validarea metodelor de laborator și un izolat clinic (187721 - MSSA, susceptibil la cefoxitin) de *Staphylococcus aureus* al cărui CMI a fost identificat a fi apropiat de nivelul prag de rezistență.

Determinarea CMI-ului s-a efectuat conform protocolului EUCAST descris anterior, folosind cefoxitin în loc de gentamicină. Mediul de cultură folosit a fost MHB, iar diluția antibioticului s-a practicat cu apă distilată. În cazul protocolului experimental, inoculul a fost pregătit prin resuspensie directă la densitate de 0,5 unități McFarland, fără diluție suplimentară. pH-ul mediului a fost evaluat pentru a asigura faptul că este prezent în intervalul de referință 7,2 - 7,4.

Protocolul microcalorimetric a efectuat în modul detaliat anterior.

4.3. Rezultate

CMI-ul determinat conform protocolului EUCAST și conform protocolului experimental

Pentru evaluarea CMI-ului obținut conform protocolului experimental, s-a evaluat creșterea în tuburi la 24 de ore - a se vedea Tabelul IV.1.

Tabel IV.1. Rezultatele testării CMI-ului la cefoxitin a celor 3 tulpini de *S. aureus* în urma testării protocolului experimental.

Tulpină	Clasificare	CMI Cefoxitin cf. EUCAST	CMI Cefoxitin cf. protocol experimental
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	MRSA	8 μg/mL	128 μg/mL
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	MSSA	1 μg/mL	4 μg/mL
<i>S. aureus</i> 187721	MSSA	4 μg/mL	4 μg/mL

Suplimentar, pentru tulpina *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, s-a practicat urmărirea nefelometrică în dinamică, pe o durată de 18 ore - Figura 4.1.

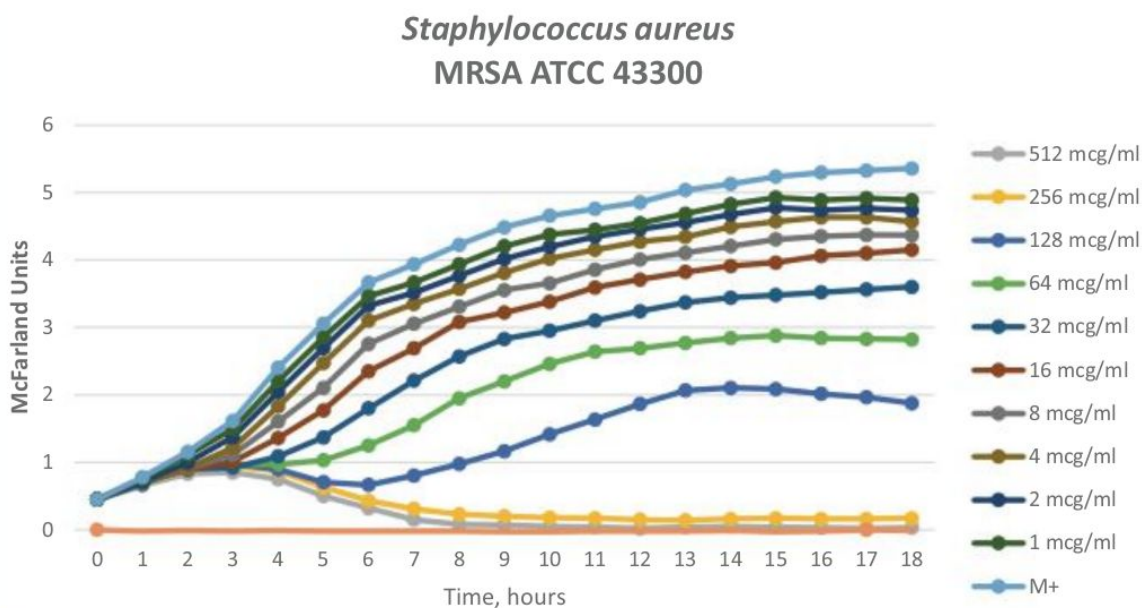


Figura 4.1. Urmărire nefelometrică în dinamică a tulpinii ATCC 43300 de *S. aureus* conform protocolului experimental.

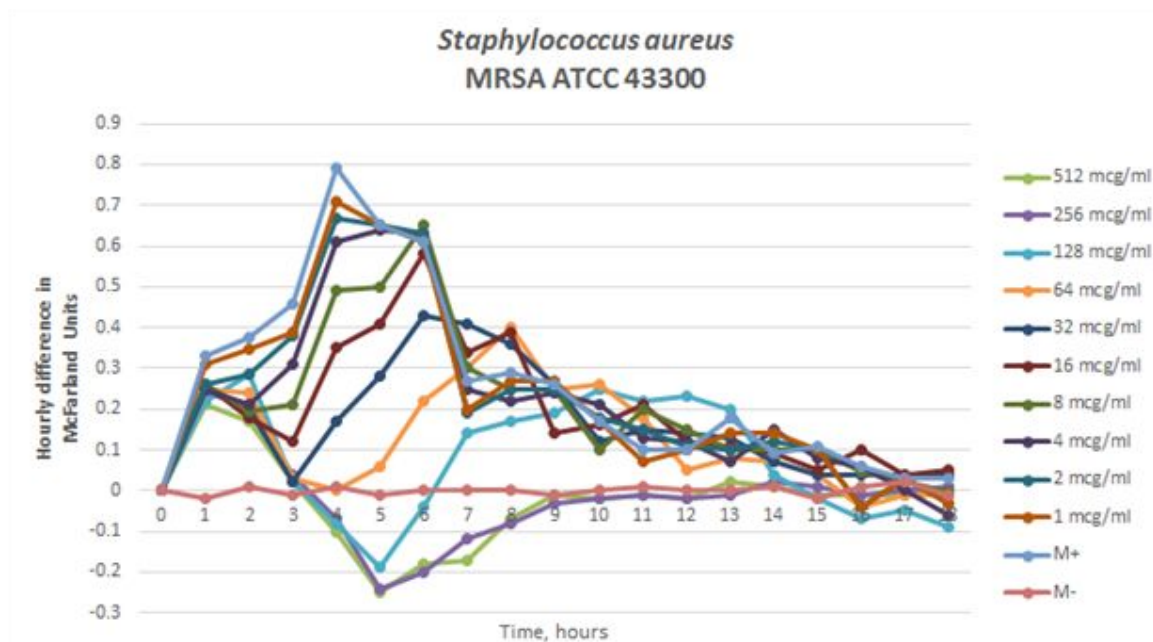


Figura 4.2. Urmărire nefelometrică în dinamică a tulpinii ATCC 43300 de *S. aureus*, folosind tehnica de monitorizare a diferenței de indice McFarland de la oră la oră.

În primele două ore de supraveghere a interacțiunii tulpinii ATCC 43300 de *S. aureus* și cefoxitin nu se pot decela diferențe a răspunsului microorganismului. În plaja de concentrații 1 $\mu\text{g/mL}$ - 32 $\mu\text{g/mL}$, nu se observă, practic, inhibarea creșterii *S. aureus*. Concentrația de 64 $\mu\text{g/mL}$ prezintă un platou în perioada 2-5 ore. În cazul concentrației de 128 $\mu\text{g/mL}$, există o scădere inițială a densității nefelometrice, urmată de o reluare a creșterii după ora 6 de monitorizare. Pentru concentrațiile de 256 și 512 $\mu\text{g/mL}$, scăderea nefelometrică este susținută și nu se mai înregistrează creștere nefelometrică.

O metodă alternativă a urmării nefelometrice, este urmărirea diferenței de indice nefelometric de la oră la oră. Această monitorizare, redată în Figura 4.2., permite decelarea mai fină a dinamicii interacțiunii tulpinii ATCC 43300 cu antibioticul și permite o etalare mai bună a rezultatelor. Astfel, se poate defini un prag de creștere semnificativă și se poate identifica mai ușor momentul în care se reia creșterea.

Rezultatele microcalorimetrice conform protocolului experimental

În ceea ce privește monitorizarea microcalorimetrică pe o durată de 18 ore a tulpinilor de *S. aureus*, în interacțiunea cu Cefoxitină, tulpina de MRSA, ATCC 43300, a prezentat o concentrație de inhibare a creșterii precoce (mai puțin de 4 ore) de 16 $\mu\text{g/mL}$, și

o creștere tardivă chiar și în cazul utilizării de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, demonstrând prezența unei subpopulații rezistente la această concentrație - Figura 4.3.

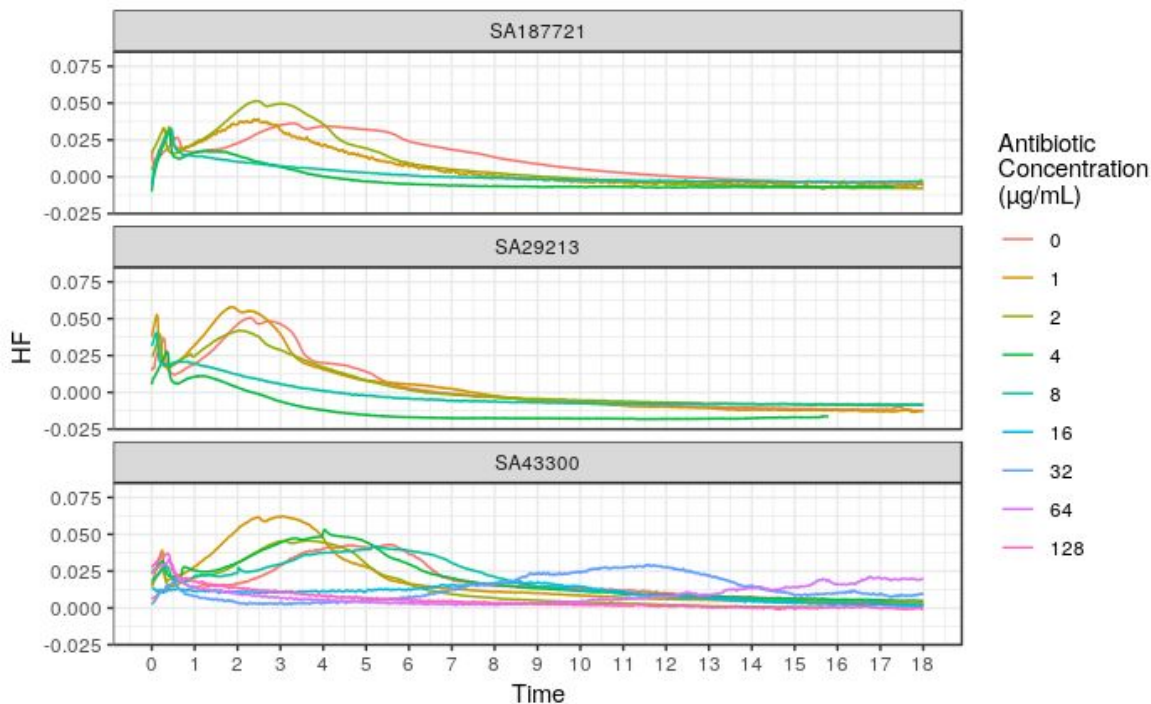


Figura 4.3. Înregistrare microcalorimetrică a interacțiunii microorganism-antibiotic a tulpinilor de ATCC 29213, 43300 și a izolatului clinic 187721 la diferite concentrații de Cefoxitină pe o perioadă de 18 ore.

Scopul secundar al experimentelor este de a observa dacă se poate obține o diferențiere între tulpinile de *S. aureus* susceptibile respectiv rezistente la meticilină înainte de 8 ore de monitorizare (perioada raportată de Baldoni et al. folosind aceeași tulpină de referință - ATCC 43300). (14)

Acest deziderat este posibil și se poate observa în Figura 4.5.

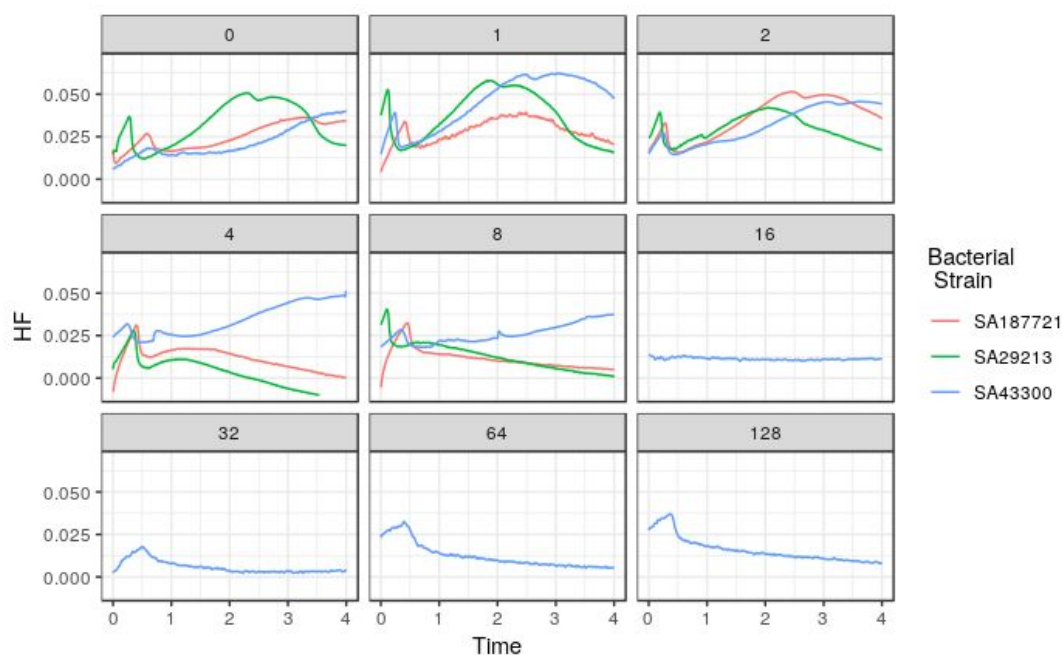


Figura 4.4. Separarea înregistrărilor microcalorimetrice în funcție de concentrația de antibiotic (înscrisă în panoul gri de-asupra fiecărui cadran), exprimată în $\mu\text{g/mL}$.

În figura 4.4 se poate observa că la concentrațiile de 4, respectiv 8 $\mu\text{g/mL}$ de cefoxitină, există o inhibare semnificativă a creșterii pentru tulpinile MSSA, în timp ce creșterea este evidentă în primele 2 ore pentru tulpina ATCC 43300. Cele trei tulpini de *S. aureus* prezintă o cinetică de creștere diferită în absența presiunii antibiotice. La concentrația de 2 $\mu\text{g/mL}$ de antibiotic cele 3 tulpini au aproximativ aceeași cinetică de creștere. Diferențele devin evidente la concentrația de 4 $\mu\text{g/mL}$, la care tulpinile susceptibile prezintă o inhibare precoce semnificativă.

4.4. Discuții

În cadrul acestui studiu s-a propus găsirea unei metode prin care tehnica microcalorimetrică să fie exploatată pentru a obține o discriminare între tulpinile de *Staphylococcus aureus* susceptibile la meticilină și cele rezistente la meticilină. Acest lucru a fost realizat prin modificări aduse metodei clasice de testare a susceptibilității la antibiotice în mediu lichid.

Mediul de cultură a fost însămânțat cu un număr mai mare de microorganisme decât recomandat, în mod normal, de ghidurile EUCAST și CLSI - aproximativ $1,5 \times 10^8$ microorganisme/mL (aproximativ 0,5 unități McFarland), pentru monitorizarea în timp real

a interacțiunii dintre *S. aureus* și cefoxitină. Întrucât, pragurile de susceptibilitate au fost selectate ținând cont de inoculul recomandat de societățile internaționale - $0,5 \times 10^6$ CFU/mL - este lesne de înțeles că există o necesitate de adaptare a concentrațiilor definatorii ale rezistenței.

4.5. Concluzii

Studiul de față prezintă o metodă microcalorimetrică rapidă de discriminare a susceptibilității la meticilină în cadrul tulpinilor de *Staphylococcus aureus*. Microcalorimetria izotermă reprezintă o metodă de monitorizare în timp real a creșterii microbiene și a răspunsului în timp real a culturii bacteriene.

5. Detecția rapidă a producției de carbapenemaze

5.1. Introducere și obiective specifice

În ultimii ani, emergența enterobacteriilor producătoare de carbapenemaze reprezintă o problemă în creștere la nivel global ce impune identificarea rapidă atât a pacienților infectați cât și a portorilor sănătoși. Genele codificante ale celor mai întâlnite carbapenemaze, sunt frecvent localizate plasmidic, putând fi transferate de la o tulpină la alta dar și între două specii apropiate. Din această cauză, identificarea bacteriilor care prezintă acest mecanism transferabil de rezistență trebuie realizată cât mai precoce posibil dar și datorită faptului că acestea pot forma rezervoare ecologice ce pot sta la sursa persistenței lor în mediu și transmiterea lor continuă în lipsa unor măsuri riguroase de igienă. Studiul dorește descrierea unui nou protocol rapid de detecție a producției de carbapenemaze în *Enterobacterales (Enterobacteriaceae)*, folosind ca model *Klebsiella pneumoniae* (15).

5.2. Materiale și metode

5.2.1. Metoda Inactivării Carbapenemului (*Carbapenem Inactivation Method*)

Tehnica de lucru constă în incubarea timp de 2 ore a unei suspensii bacteriene a tulpinii de cercetat în apă distilată (400 μ L), cu un disc standard de antibiogramă, de meropenem (cantitatea standard a discului este de 10 μ g). După 2 ore, discul se

recuperează folosind o pensă/ansă bacteriologică. Discul de antibiotic se așează pe o placă Petri însămânțată în prealabil cu *Escherichia coli* ATCC 25922, folosit ca indicator de creștere, după protocolul unei antibiograme difuzimetrice standard. (16) În cazul în care tulpina de cercetat este producătoare de carbapenemaze, discul de meropenem este inactivat. Asta conduce la creșterea tulpinii indicatoare de *Escherichia coli* până la marginea discul de antibiotic (absența inhibării bacteriene în jurul discului).

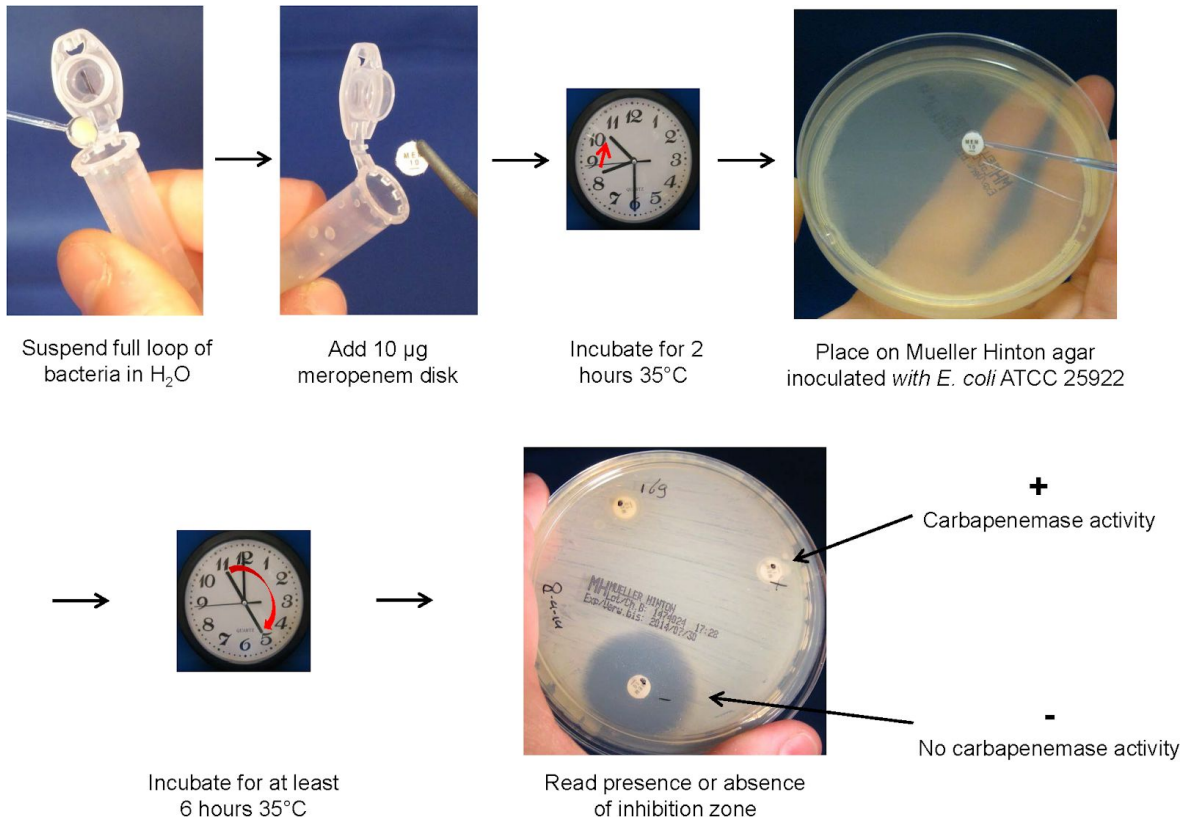


Figura 5.1. Protocolul de lucru pentru CIM. (16)

5.2.2. Protocol *Carbapenem Inactivation Challenge Method* (CICM)

Carbapenem Inactivation Challenge Method este o metodă nouă, derivată din CIM. ((15,17) Diferențele principale constau în folosirea de pudră de meropenem, resuspendat la o concentrație de 1 µg/mL și folosirea, ca indicator de creștere biologic a unei tulpini de *Escherichia coli* ATCC 25922 în mediu de creștere lichid (Müller Hinton), la o turbiditate de 0,5 McFarland. Indicatorul biologic de creștere a fost evaluat nefelometric la fiecare jumătate de oră pe o perioadă de 3 ore.

Pentru studiul actual s-au folosit 3 tulpini de *Klebsiella pneumoniae* producătoare de carbapenemaze (KPC-2, NDM-1 și OXA-48), oferite de către INC „Cantacuzino”. (18) O tulpină de *K. pneumoniae* producătoare de ESBL (SHV-18) - ATCC 700603 a fost folosită drept control negativ, neavând activitate de carbapenemază. (19,20) Analiza datelor a fost făcută cu R software package (v 3.3.3). (21)

5.3. Rezultate

5.3.1. Definirea unui prag al detecției activității de carbapenemază

În primă fază s-a evaluat creșterea neinhibată a culturii de *Escherichia coli*, cu inocul inițial de 0.3 și 0.5 McFarland, o concentrație de meropenem de 1 μg/mL și incubare inițială de 1 oră.

În baza experimentelor inițiale, s-a stabilit un prag de 0.5 McFarland la 1 oră, 1.5 ore și 2 ore.

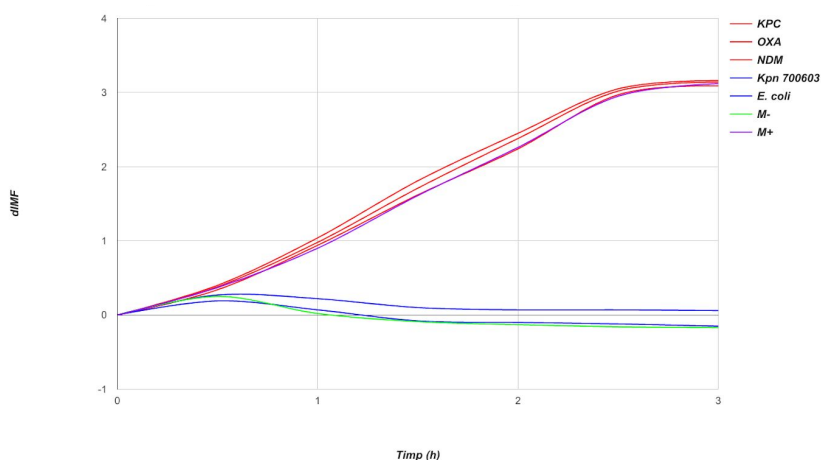


Figura 5.2. Evoluția curbei de creștere a indicatorului biologic *Escherichia coli* într-un experiment de creștere neinhibat și în cazul incubării cu tulpini de *Klebsiella pneumoniae* producătoare de carbapenemaze (KPC, NDM, OXA). Pe abscisă este înscris timpul, exprimat în ore de urmărire nefelometrică. Pe ordonată este înscris indicele McFarland, după scăderea liniei de bază

5.3.2. Validarea timpului de incubare a tulpinilor

S-au efectuat experimente în care s-a folosit incubarea de 30 de minute, o oră și două ore. În prima oră, nu se notează o diferență semnificativă statistic între indicatorul

biologic de creștere. Nu a existat diferență statistică atunci când s-a incubat jumătate de oră versus o oră.

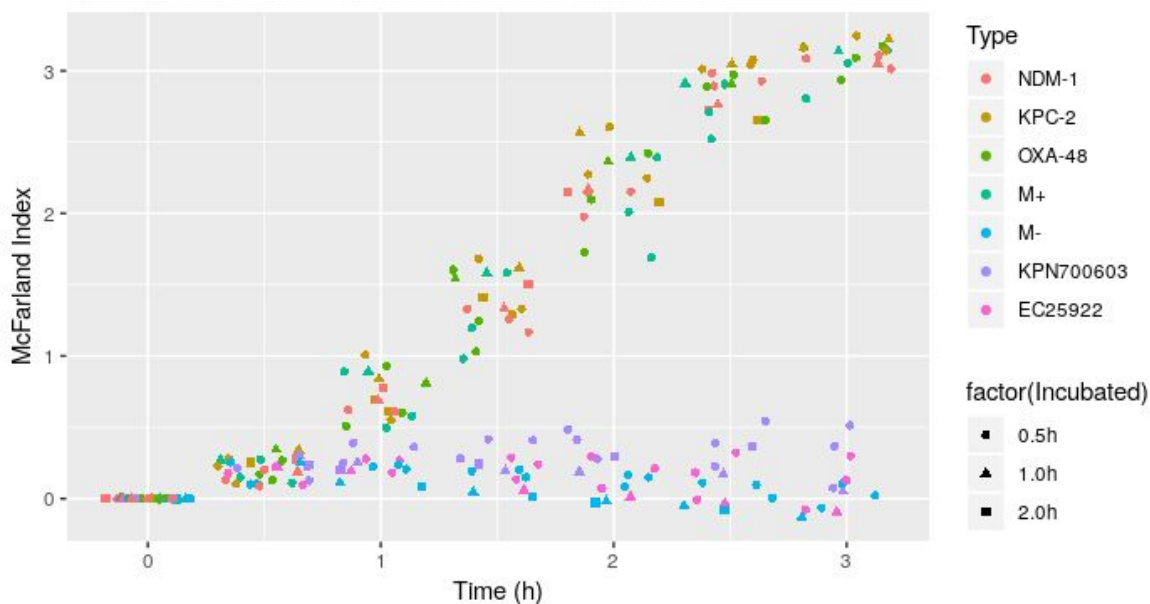


Figura 5.3. Evoluția curbei de creștere a indicatorului biologic *Escherichia coli* în urma incubărilor cu tulpini de *Klebsiella pneumoniae* producătoare (KPC, NDM, OXA) și neproducătoare (KPN700603) de carbapenemaze. Pe abscisă este înscris timpul, exprimat în ore de urmărire nefelometrică. Pe ordonată este înscris indicele McFarland, după scăderea liniei de bază

5.3.3. Optimizări suplimentare

Pentru optimizarea experimentelor, s-a încercat obținerea unei discriminări cât mai bune între tulpinile producătoare de carbapenemaze și cele fără carbapenemaze, prin experimente succesive folosind turbidități inițiale ale indicatorului de creștere biologic și concentrații diferite de antibiotic.

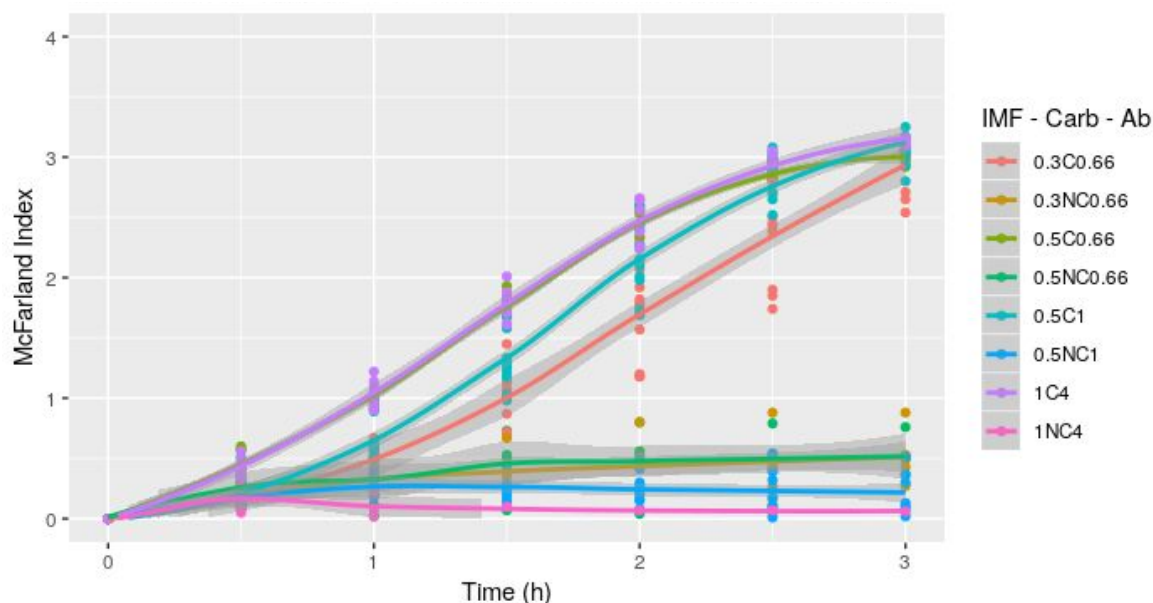


Figura 5.4.. Evoluția curbei de creștere a indicatorului biologic *Escherichia coli*, în funcție de turbiditatea inițială, în urma incubării (timp de jumătate de oră) cu tulpini de *Klebsiella pneumoniae* producătoare (KPC, NDM, OXA) și neproducătoare (KPN700603) de carbapenemaze și în funcție de concentrația de antibiotic folosită. Pe abscisă este înscris timpul, exprimat în ore de urmărire nefelometrică. Pe ordonată este înscris indicele McFarland, după scăderea liniei de bază. Cea mai bună discriminare s-a obținut folosind o turbiditate inițială de 1 McFarland și o concentrație de Meropenem de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5.4. Discuții

Rezultatele prezentate aici reprezintă studiul pilot al unui nou protocol utilizat pentru detectarea rapidă a tulpinilor de enterobacterii producătoare de carbapenemază. Din punct de vedere metodologic, acest studiu se bazează pe două concepte diferite: utilizarea unei doze mici de carbapenem și utilizarea unei tulpini indicatoare de creștere aflată în faza exponențială a creșterii, disponibilă tuturor laboratoarelor (*Escherichia coli* ATCC 25922).

5.5. Concluzii

Noua metodă dezvoltată, Carbapenem Inactivation Challenge Method (CICM) reprezintă un test ieftin și ușor disponibil tuturor laboratoarelor.

6. Detecția microcalorimetrică rapidă a rezistenței semnificative clinic la carbapenemi în *Enterobacteriaceae*

6.1. Obiective specifice

Descrierea unui protocol de detecție rapidă, în timp real, a rezistenței semnificative clinic la meropenem a unor tulpini bacteriene de *Klebsiella pneumoniae*.

6.2. Materiale și Metode

Pentru studiul actual s-au folosit 3 tulpini de *Klebsiella pneumoniae* rezistente la carbapenemi, producătoare de carbapenemaze și o tulpină susceptibilă la carbapenemi, producătoare ESBL (SHV-18). Determinarea CMI conform protocolului EUCAST s-a realizat conform protocolului descris anterior. Tulpinile au fost urmărite în paralel atât nefelometric cât și microcalorimetric. Procesarea secundară și analiza datelor a fost efectuată cu R (v 3.5.0) și Rstudio server (v 1.1.456) folosind un *script* creat de doctorand, realizând:

- citirea parametrilor experimentali și integrarea automată a rezultatelor în baza de date
- determinarea liniei de bază a unei curbe de creștere
- generarea curbelor de căldură totală (creștere totală) prin integrarea curbei de flux instantanee
- generarea modelelor de creștere și calcularea ratei de creștere

6.3. Rezultate

6.3.1. Determinarea CMI conform protocolului EUCAST

Rezultatele testării susceptibilității la antibiotice sunt sumarizate în Tabelul VI.1. Tulpinile producătoare de carbapenemaze au CMI conform protocolului EUCAST cuprins în intervalul 4 - 16 $\mu\text{g/mL}$. Astfel, tulpina producătoare de OXA-48 și NDM-1 sunt considerate intermediar-susceptibile (CMI de 4 și 8 $\mu\text{g/mL}$), în timp ce tulpina producătoare de KPC-2 este clasificată ca rezistentă la Meropenem. Tulpina ATCC 700603

nu este producătoare de carbapenemază, ci de o enzimă ESBL (SHV-18) și este clasificată ca susceptibilă.

Tabelul VI.1. Rezultate ale determinării concentrației minime inhibitorii la meropenem, conform protocolului EUCAST și a protocolului experimental.

Tulpină	Clasificare	CMI Meropenem cf. EUCAST	CMI Meropenem cf. protocol experimental
<i>K. pneumoniae</i> KPC-2	R	16 μg/mL	> 320 μg/mL
<i>K. pneumoniae</i> NDM-1	I	8 μg/mL	320 μg/mL
<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	I	4 μg/mL	160 μg/mL
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	S	< 0.625 μg/mL	< 20 μg/mL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	S	< 0.625 μg/mL	< 20 μg/mL

6.3.2. Determinarea CMI conform protocolului experimental - determinare microcalorimetrică

Determinările microcalorimetrice au fost realizate conform precizărilor din Materiale și metode. Rezultatele sunt redate în Figura 6.3 și sintetizate în Tabelul IX.1.

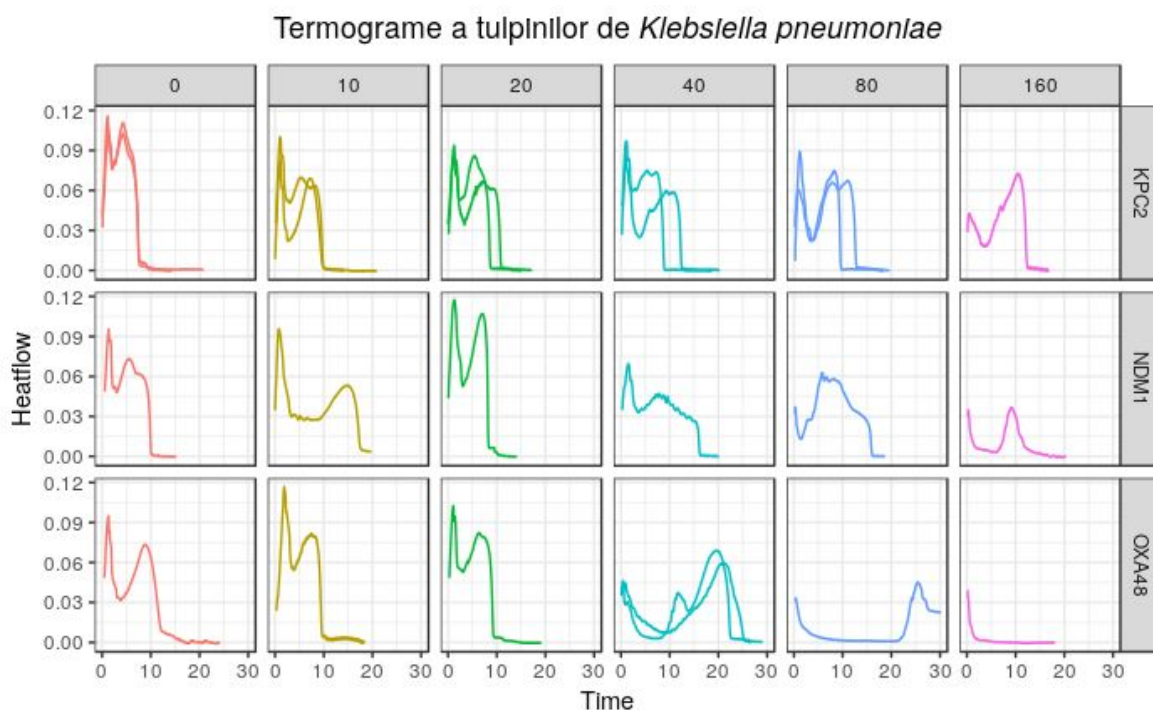


Figura 6.3. Termograme ale creșterii microcalorimetrice, după procesare manuală și generarea de grafice folosind R și ggplot2

Pentru tulpina producătoare de OXA-48 având o concentrație minimă inhibitorie de 4 $\mu\text{g/mL}$, este de remarcă că la concentrația de 80 $\mu\text{g/mL}$ de meropenem prezintă creștere întârziată după aproximativ 22 de ore. (Figura 6.3.)

6.3.3. Procesare secundară în R a creșterii bacteriene

Pentru procesarea secundară folosind limbajul R, s-a creat o interfață accesibilă prin browser, pentru inspectarea și analiza termogramelor. Selecția experimentelor se face în funcție de parametrii experimentali (tip de enzimă produsă, concentrația de antibiotic folosită și numărul de experiment în cadrul unei serii). (Figura 6.4.)

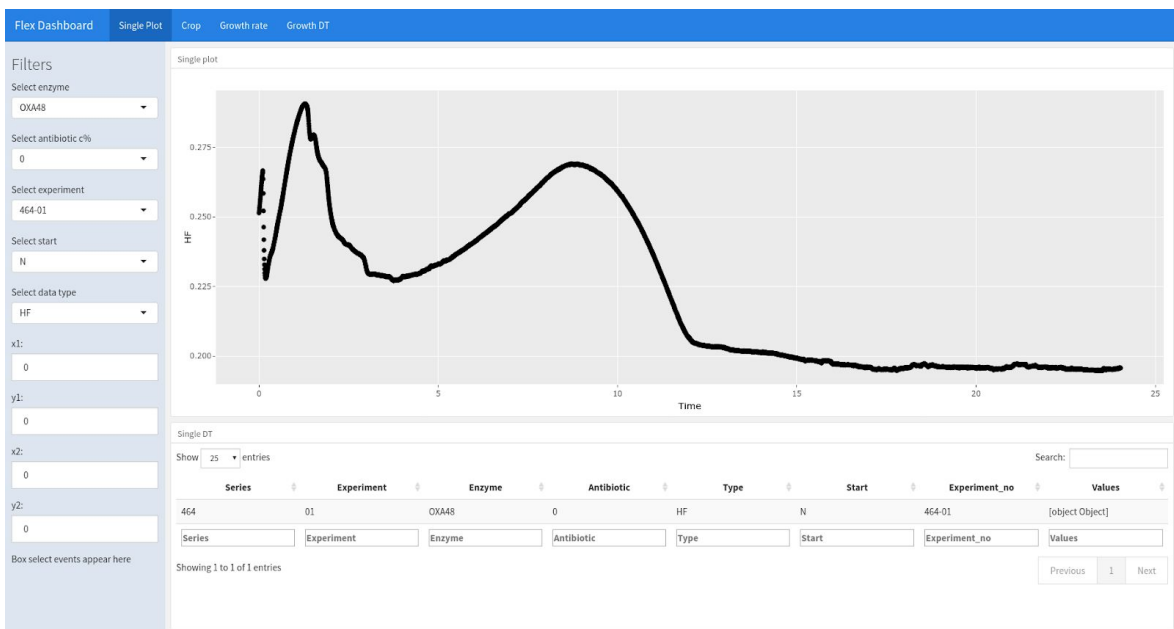


Figura 6.4. Termogramă de creștere a *K. pneumoniae* (OXA-48, fără inhibiție de antibiotic), prezentată în interfața de analiză dezvoltată în cadrul acestei teze demonstrând partea inițială de echilibrare termică a calorimetrului

În graficul prezentat în Figura 6.4., se poate interacționa cu figura, putându-se selecta porțiunea de interes a termogramei. În Figura 6.5., porțiunea din stânga a imaginii, figura superioară, este prezentată termograma nemodificată. În figurile pereche din porțiunea inferioară, se observă partea selectată a termogramei, respectiv normalizarea cu debutul creșterii de la un flux de căldură 0. Imaginile din porțiunea dreaptă reprezintă figuri diagnostice, arătând diferența instantanee în funcție de timp în porțiunea superioară

și distribuția diferențelor instantanee în porțiunea inferioară. În roșu se observă porțiunea selectată.

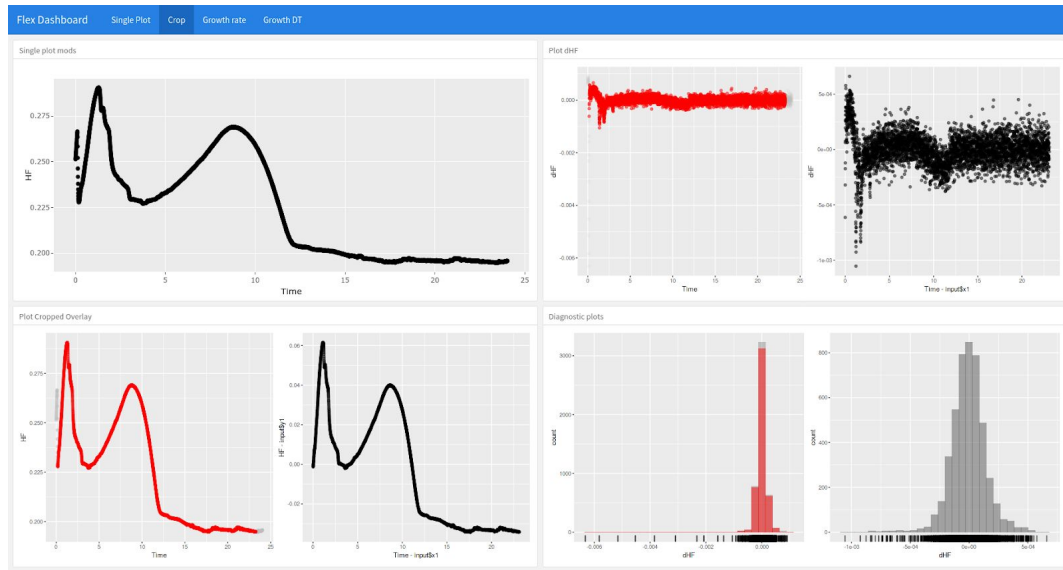


Figura 6.5. Procesarea termogramei cu eliminarea porțiunii inițiale de echilibrare termică

6.3.4. Modelarea creșterii bacteriene, prin aplicarea de modele matematice

Aplicarea de modele de creștere s-a efectuat atât cu posibilitatea de vizualizare a creșterii bacteriene și a potrivirii (*fit*) modelului, aplicat pe modelul de creștere. Inițial, se aleg o serie de parametri cât mai apropiați, în conformitate cu analiza vizuală a curbei. Apoi, se lasă algoritmul să genereze cel mai potrivit model de creștere, pornind de la acei parametri.

Se generează cel mai potrivit model (linia roșie) care se aplică curbei de creștere (linia neagră), iar parametrii, sunt redați în porțiunea inferioară a ecranului.

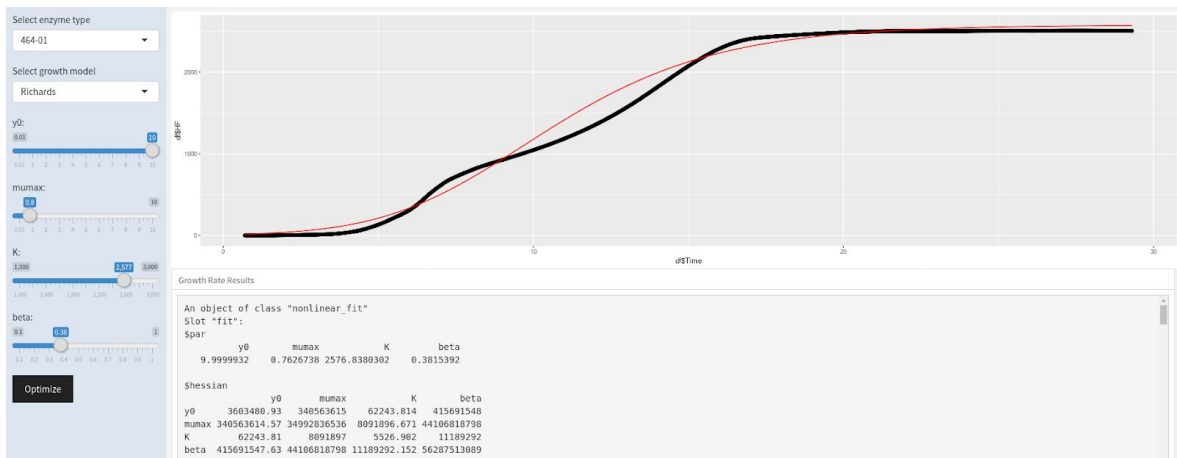


Figura 6.7. Fereastră de selectare a modelului de creștere, creșterea termică totală, modelul aplicat (Richards) și parametrii de creștere.

6.3.5. Aplicarea unui model simplu de creștere bacteriană pentru diferențierea în timp real a răspunsului bacterian la antibiotic.

După analiza manuală a termogramei pentru fiecare experiment în parte, s-a practicat:

- eliminarea porțiunii inițiale a termogramei reprezentând porțiunea de echilibrare termică
- normalizarea tuturor curbelor:
 - aducerea timpului de debut al creșterii la momentul 0
 - debutul creșterii debutează de la un flux de căldură 0

Fluxul de căldură normalizat demonstrează un răspuns diferențiat în funcție de concentrația de antibiotic într-o scurtă perioadă de timp (o oră) - Figura 6.8.

Termograme a tulpinilor de *Klebsiella pneumoniae*

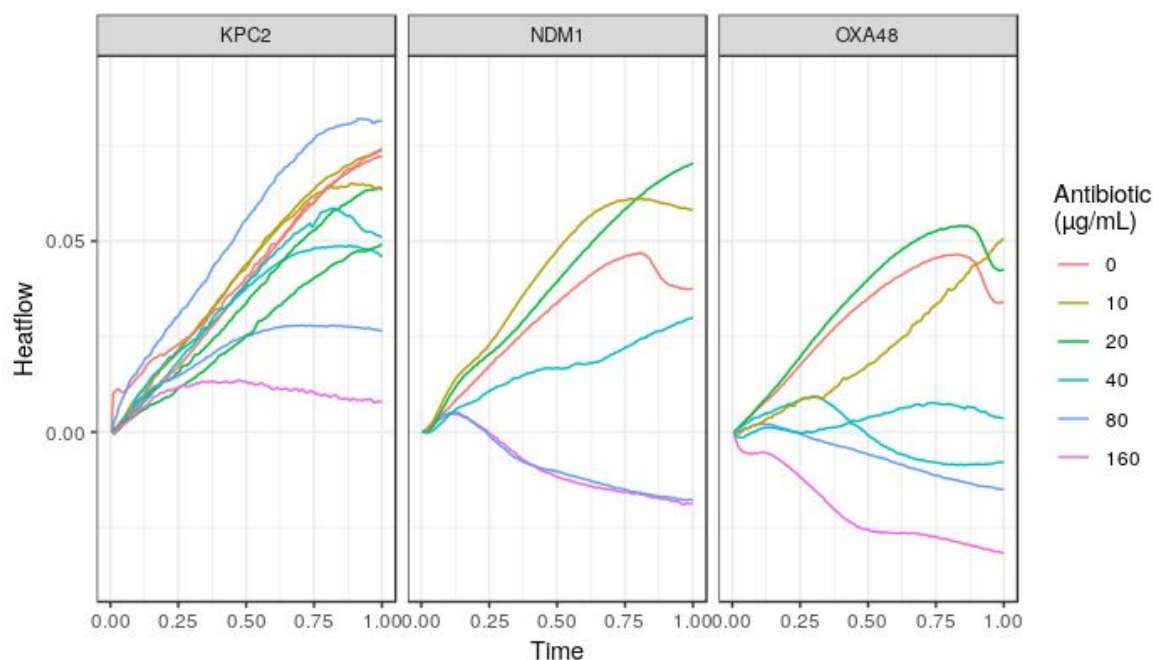


Figura 6.8. Flux de căldură normalizat în funcție de concentrația de antibiotic

6.3.6. Aplicarea unui sistem automat de analiză a creșterii microbiene

În această secțiune, s-a explorat posibilitatea de a obține o analiză automată a termogramelor, pentru decelarea tulpinilor rezistente de cele susceptibile. (Figura 6.9.)

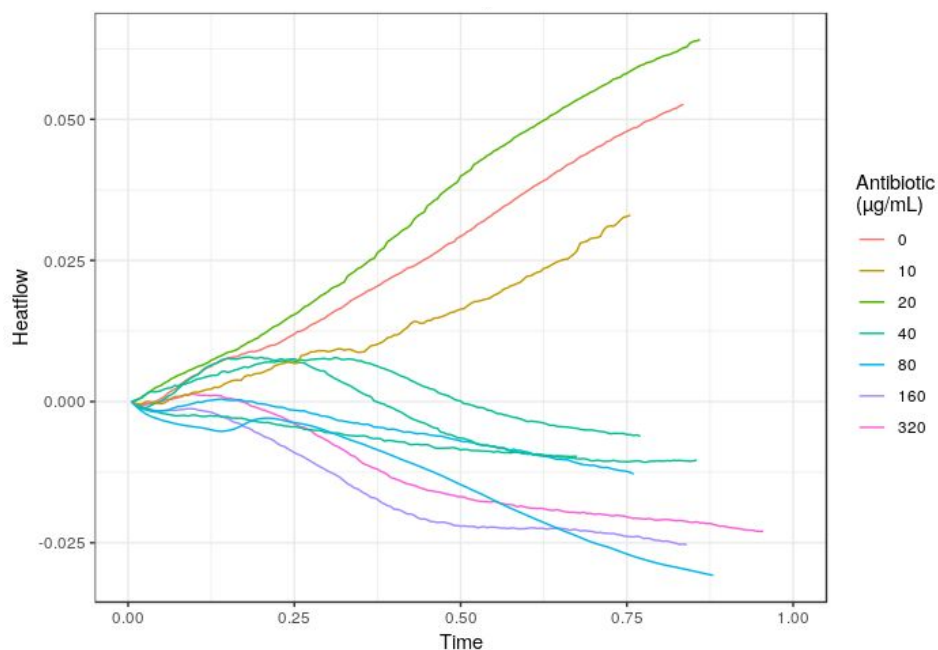


Figura 6.9. Flux de căldură instantaneu, normalizat. Monitorizare pe durată de o oră, demonstrând răspunsul diferențiat în funcție de concentrația de antibiotic folosită.

În Figura 6.9. se poate observa fluxul de căldură instantaneu înregistrat timp de o oră, după ce a fost filtrat conform algoritmului dezvoltat. Această metodă de filtrare a fluxului de căldură răspunde necesarului unui mod de interpretare în timp real a rezultatelor microcalorimetrice, fără a fi necesară înregistrarea întregii termograme pentru a fi procesată.

6.4. Discuții

Pragul actual propus de EUCAST pentru carbapenemi (ertapenem, meropenem, imipenem, doripenem), în cadrul testării susceptibilității enterobacteriilor, detectează toate mecanismele de rezistență cu importanță clinică (inclusiv majoritatea producătorilor de carbapenemaze). Unele izolate care produc carbapenemaze sunt clasificate drept susceptibile folosind actualele limite (praguri) propuse. Astfel, prezența unei carbapenemaze trebuie raportată separat, ca fiind testată, iar prezența sau absența unei carbapenemaze nu influențează ea însăși clasificarea sensibilității. Detectarea și caracterizarea carbapenemazelor este recomandată în scop de sănătate publică și de control al infecțiilor. Pentru screening-ul (depistarea) producției de carbapenemază este recomandată folosirea unei concentrații de meropenem de 0,125 mg/L (diametrul zonei de inhibiție <28 mm).

6.5. Concluzii

Studiul de față prezintă mai multe elemente de noutate:

- validarea conceptului (*proof of concept*) de antibiogramă în timp real, exemplificând posibilitatea de investigare în timp real a susceptibilității tulpinilor de *Klebsiella pneumoniae* față de carbapenemi (meropenem)
- stabilirea protocolului și a concentrației de antibiotic ce poate fi folosită pentru depistarea tulpinilor rezistente
- crearea cadrului de analiză a datelor, generând un algoritm și un *site* web la care se pot accesa datele pentru a fi prelucrate

7. Concluzii și Contribuții personale

7.1. Concluzii

Teza a avut ca scop principal, investigarea, folosind microcalorimetria izotermă, a interacțiunii în timp real dintre microorganisme și antibiotice/chimioterapice. Scopul evaluării acestei interacțiuni a fost obținerea a ceea ce, dr. Dragoș Cosmin Zaharia, a numit în teza susținută în anul 2014, *antibiograma microcalorimetrică în timp real*.

Obiectivele cercetării științifice au fost atinse întrucât:

- s-a elaborat, în etape, un protocol de lucru care permite evaluarea microcalorimetrică din primele minute de înregistrare, explorând și ținând cont de factorii care au fost identificați ca modificând rezultatele de interacțiune a microorganismelor cu antibiotice/chimioterapice
 - folosind cuve microcalorimetrice de mixaj
 - optimizarea protocolului, folosind cuve microcalorimetrice închise
- s-a demonstrat posibilitatea de urmărire microcalorimetrică a activității metabolice a microorganismelor, astfel încât să se deceleze într-o perioadă foarte scurtă - se poate spune *în timp real* - dacă tulpina investigată prezintă rezistență semnificativă clinic la antibioticul investigat. În cadrul tezei s-au evaluat următoarele perechi de microorganism-antibiotic
 - *Escherichia coli* - Gentamicină
 - *Klebsiella pneumoniae* - Gentamicină
 - *Staphylococcus aureus* - Cefoxitină
 - *Klebsiella pneumoniae* - Meropenem
- s-a efectuat o supraveghere epidemiologică a rezistenței la antibiotice în cadrul INP „Marius Nasta”, care a ghidat alegerea perechilor microorganism-antibiotic, demonstrând necesitatea reală de a demara studii aplicate în domeniul antibioretistenței.
- folosind experiența câștigată în urma urmăririi creșterii tulpinii *E. coli* ATCC 25922, s-a adaptat un protocol de detecție fenotipică a activității de carbapenemază pentru a scurta timpul de necesar pentru interpretarea rezultatului după doar 3 ore (față de 6-8 ore cât a fost raportat inițial).

Avantajele tehnico-economice sunt reprezentate de descrierea în premieră a unei metode care poate decela, în aproximativ o oră de monitorizare, statusul de susceptibilitate a unui germene la anumite clase de antibiotic. Costurile curente de efectuare a investigațiilor microcalorimetrice sunt minime.

Așa cum a fost detaliat în secțiunea respectivă, dezvoltarea metodei Carbapenem Inactivation Challenge Method (CICM) a permis scurtarea timpului necesar pentru obținerea rezultatelor, prezintă costuri mai reduse față de teste similare și poate fi efectuat în laboratoare cu echipate minimal, folosind consumabile de uz cotidian pentru un laborator clinic.

Limitele tezei sunt legate de folosirea unui instrument de înaltă precizie, care nu este disponibil în clinicile de specialitate din țară și care a fost oferit prin parteneriatul cu Institutul de Chimie-Fizică „Ilie Murgulescu”, Institut al Academiei Române. Microcalorimetrele necesită o investiție inițială considerabilă.

Pentru obținerea unor rezultate mai rapide, este necesară adaptarea tehnicilor folosite în clinică. În cadrul studiilor desfășurate și discutate, una dintre concluziile la care s-a ajuns este că este necesară adaptarea inoculului de microorganism testat, a concentrațiilor de antibiotic folosite și a pragurilor de interpretare, alături de folosirea de tehnologii cu sensibilitate ridicată de detecție a susceptibilității. Acest lucru este în perfectă concordanță cu strategia EUCAST, care de curând a publicat o metodă rapidă de evaluare a susceptibilității, în baza tehnicii difuzimetrice, care permite decelarea susceptibilității/rezistenței în 4 - 8 ore.

Cercetarea pornită în cadrul acestei teze poate continuată prin următoarele activități:

- Continuarea urmării profilului de rezistență la antibiotice în cadrul INP „Marius Nasta”, adăugarea de date clinice ale pacienților
- Validarea protocoalelor microcalorimetrice descrise în cadrul prezentei teze prin investigarea unui număr suficient de izolate clinice bine caracterizate. Această activitate implică obținerea de tulpini a căror nivel de rezistență este corespunzător investigat și pentru care sunt descrise mecanismele care conduc la apariția rezistenței.
- Studiul actual s-a concentrat cel mai mult asupra identificării unei concentrații prag care poate decela rapid statusul de susceptibilitate/rezistență. Folosind tulpini

suplimentare și, preferabil, calorimetre multicanal, se pot dezvolta tehnici pentru precizarea în timp real a concentrației minime inhibitorii.

- Se pot extinde metodele cinetice evaluate folosind alte tehnici de măsurare a creșterii totale (de exemplu spectrofotometrie) și
- Dezvoltarea tehnicii CICM, prin validare externă și optimizarea protocolului, compararea cu caracteristicile tehnice (sensibilitate și specificitate) a altor teste fenotipice.

7.2. Contribuții proprii

Teza prezintă o serie de studii care au abordat multidisciplinar problema rezistenței la antibiotice în România. Efortul coordonat de efectuare de studii a condus la:

Un studiu de recenzie a nivelului de rezistență la antibiotice în cadrul Institutului Național de Pneumoftiziologie „Marius Nasta”, București. Acesta a relevat prezența unui nivel crescut de rezistență la antibiotice la bolnavii cu boli respiratorii pulmonare, atât în secțiile medicale, cât și în secțiile de Chirurgie/Terapie Intensivă. Astfel, a fost investigată rezistența la antibiotice a tulpinilor ESKAPE (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.). Acesta reprezintă unul dintre singurele studii de acest gen publicate în ultimii ani în România și reprezintă o activitate esențială de supraveghere ce orientează posibilitățile terapeutice și nevoile de dezvoltare în domeniul rezistenței la antibiotice.

Dezvoltarea protocolului de evaluare în timp real a interacțiunii microorganism-antibiotic/chimioterapic antimicrobian. Spre deosebire de studiile deja existente în domeniul microcalorimetriei izoterme, abordarea reprezintă o noutate în domeniu. Pentru stabilirea unui mod de lucru facil, s-a realizat investigarea a multiple protocele microcalorimetrice de studiu, optimizând pe parcurs metodologia de lucru.

Astfel, studiul a debutat folosind un protocol care necesită monitorizarea creșterii microcalorimetrice folosind ca model de studiu perechea *Escherichia coli* - Gentamicină. S-a realizat evaluarea unui CMI modificat folosind atât bulion triptică soia cât și bulion Müller-Hinton. Sunt descrise rezultatele nefelometrice și microcalorimetrice (termograme ale interacțiunii în timp real dintre *Escherichia coli* ATCC 25922 și gentamicină).

S-a efectuat evaluarea factorilor care conduc la modificarea interacțiunii microorganism-antibiotic pentru a fi folosite la optimizarea protocolului de lucru.

Studiile asupra aminoglicozidelor au fost extinse, folosind o tulpina ATCC 700603 de *K. pneumoniae* intermediar-rezistentă (CMI conform EUCAST de 4 - 8 µg/mL). Termogramele reprezentând interacțiunea tulpinii ATCC 700603, *K. pneumoniae*, conform protocolului optimizat. CMI, conform protocolului microcalorimetric, este de 128 µg/mL (aproximativ 16x față de CMI EUCAST).

Diferențierea microcalorimetrică rapidă a tulpinilor de MSSA de MRSA este redată prin urmărirea interacțiunii microorganism-cefoxitină. Timpul necesar pentru decelarea statusului MSSA - MRSA se poate face în maxim două ore.

În ultima parte a tezei s-a abordat o problemă de actualitate - producția de carbapenemaze de către enterobacterii și rezistența acestora la carbapenemi. Astfel, este descris protocolul Carbapenem Inactivation Challenge Method (CICM) - metodă ce permite obținerea rezultatelor derivate din tehnica CIM în 3 ore. Rezultatele, validarea metodei și optimizarea tehnicii este descrisă.

În ultima porțiune a tezei, s-a efectuat un studiu microcalorimetric al răspunsului în timp real a tulpinilor de *K. pneumoniae* față de meropenem. Pentru evaluarea rezultatelor, s-a dezvoltat un algoritm pentru analiza rezultatelor în timp real. În urma acestei analize, s-a stabilit concentrația de antibiotic (20 µg/mL) ce poate fi folosită pentru depistarea tulpinilor de *K. pneumoniae* rezistente la Meropenem (CMI conform protocolului EUCAST de > 2 µg/mL).

Bibliografie (selectivă)

1. Torres A, Niederman MS, Chastre J, Ewig S, Fernandez-Vandellos P, Hanberger H, et al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: Guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia (VAP). Eur Respir J. 2017 Sep 10;50(3).
2. ECDC. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2016 [Internet]. 2017 [cited 2018 Feb 8]. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>
3. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Zone diameter breakpoints for rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from

- blood culture bottles. Version 1.0 [Internet]. EUCAST; 2018 [cited 2018 Nov 28]. Available from: <http://www.eucast.org>
4. Seebeck TJ. Ueber die magnetische Polarisierung der Metalle und Erze durch Temperaturdifferenz. *Ann Phys.* 1826;82(3):253–86.
 5. Jordan FW. The Thomson and Peltier effects. *Nature.* 1911 May;86(2168):380–380.
 6. Zaharia DC. Microcalorimetria – metodă de caracterizare a unor germeni implicați în patologia respiratorie [Doctoral dissertation]. Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București; 2014.
 7. Akpan MR, Ahmad R, Shebl NA, Ashiru-Oredope D. A review of quality measures for assessing the impact of antimicrobial stewardship programs in hospitals. *Antibiotics (Basel).* 2016 Jan 13;5(1).
 8. von Ah U, Wirz D, Daniels AU. Isothermal micro calorimetry--a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *E. coli* and *S. aureus*. *BMC Microbiol.* 2009 May 26;9:106.
 9. Zaharia DC, Muntean AA, Popa MG, Steriade AT, Balint O, Micut R, et al. Comparative analysis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* microcalorimetric growth. *BMC Microbiol.* 2013 Jul 24;13:171.
 10. ISO 20776-1. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1. ISO. 2006 Oct 27;
 11. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1 [Internet]. 2018 [cited 2018 Mar 22]. Available from: <http://www.eucast.org>
 12. Domínguez MC, de La Rosa M, Borobio MV. Application of a spectrophotometric method for the determination of post-antibiotic effect and comparison with viable counts in agar. *J Antimicrob Chemother.* 2001 Apr;47(4):391–8.
 13. von Ah U, Wirz D, Daniels AU. Rapid differentiation of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from methicillin-resistant *S. aureus* and MIC determinations by isothermal microcalorimetry. *J Clin Microbiol.* 2008 Jun;46(6):2083–7.
 14. Baldoni D, Hermann H, Frei R, Trampuz A, Steinhuber A. Performance of microcalorimetry for early detection of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2009 Mar;47(3):774–6.
 15. Muntean A-A, Poenaru AD, Neagu A, Caracoti C, Muntean M-M, Zaharia DC, et al. Carbapenemase Inhibition Challenge Method: a novel method for evaluating the presence of carbapenemases – a pilot study. *Infectio.ro.* 2017;50(2):18–21.
 16. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative

- for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. PLoS ONE. 2015 Mar 23;10(3):e0123690.
17. Muntean A-A, Poenaru A, Neagu A, Caracoti C, Muntean M-M, Zaharia DC, et al. Studiu pilot privind o nouă metodă de evaluare a prezenței carbapenemazelor. Infectio.ro. 2017 Jul 11;50(2):18–21.
 18. Lixandru BE, Cotar AI, Straut M, Usein CR, Cristea D, Ciontea S, et al. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Romania: A Six-Month Survey. PLoS ONE. 2015 Nov 23;10(11):e0143214.
 19. Elliott AG, Ganesamoorthy D, Coin L, Cooper MA, Cao MD. Complete Genome Sequence of *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* Strain ATCC 700603. Genome Announc. 2016 May 26;4(3).
 20. Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, Queenan AM, Doménech-Sánchez A, Swenson JM, et al. Characterization of the extended-spectrum beta-lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Sep;44(9):2382–8.
 21. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Internet]. 2013 [cited 2017 Feb 2]. Available from: <http://www.R-project.org/>