

REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE A TULPINILOR DE ENTEROBACTERIACEAE CONDIȚIONAT PATOGENE CARE PROVOACĂ BOLI DIAREICE ACUTE

CZU:577.181:616.34-008.314.4

DOI: <https://doi.org/10.52673/18570461.23.4-71.06>Doctorandă **Nadejda GUȚU**¹E-mail: nadejdagutu3@gmail.comORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0010-7700>Academician **Valeriu RUDIC**²E-mail: acadrudic@yahoo.comORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8090-3004>¹Instituția Medicală Sănătate Publică AMT Buiucani, Chișinău

Universitatea de Stat din Moldova

²Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „N. Testemițanu”

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, UTM

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF CONDITIONALLY PATHOGENIC ENTEROBACTERIACEAE STRAINS CAUSING ACUTE DIARRHOEA DISEASES

Summary. Acute diarrheal disease presents a major public health problem, and the identification of pathogens serves both to identify the sources of spread of infections and to establish the correct treatment. In this context, the aim of this research was to detect the conditionally pathogenic agents from the Enterobacteriaceae family, which cause more frequently acute diarrheal diseases, and to test their sensitivity to antibiotics. The research was carried out during 2019–2022 within the Public Health Medical Institution TMA Buiucani, mun. Chișinău. 537 strains were isolated and eight conditionally pathogenic agents from the Enterobacteriaceae family were identified. During the study period, a slow decrease in the values of the quantitative indices of the conditional pathogenic agents was observed, the etiological spectrum was dominated by *Klebsiella* spp. (43,58 %). Conditionally pathogenic agents have registered a different degree of resistance to antibiotics, which underlines the importance of an antibiogram for the effectiveness of the therapy.

A very high resistance was recorded to the penicillin. The results obtained during the study period reveal the importance of monitoring the antibiotic resistance, which is very significant in the treatment of acute diarrheal diseases.

Keywords: conditionally pathogenic agents, Enterobacteriaceae, acute diarrheal diseases, antibiotic resistance.

Rezumat. Boala diareică acută prezintă o problemă majoră de sănătate publică, iar identificarea agenților patogeni servește atât la depistarea surselor de răspândire a infecției, cât și la stabilirea tratamentului corect. În contextul dat, scopul cercetării în cauză a constat în identificarea agenților condiționat patogeni din familia Enterobacteriaceae care provoacă mai frecvent boli diareice acute și evaluarea sensibilității lor la antibiotice. Cercetările au fost efectuate în anii 2019–2022 în Instituția Medicală Sănătate Publică AMT Buiucani, mun. Chișinău. Au fost izolate 537 de tulpini și identificați opt agenți condiționat patogeni din familia Enterobacteriaceae. Pe perioada studiului s-a constatat o scădere lentă a valorilor indicilor cantitativi ai agenților condiționat patogeni, spectrul etiologic a fost dominat de *Klebsiella* spp. (43,58 %). Agenții condiționat patogeni au înregistrat un grad diferit de rezistență la antibiotice, ceea ce confirmă importanța efectuării antibiogramei pentru o terapie eficientă. O rezistență foarte înaltă s-a determinat la peniciline. Rezultatele obținute pe perioada de studiu relevă rolul monitorizării dezvoltării rezistenței la antibiotice, care este foarte importantă în tratarea bolilor diareice acute.

Cuvinte-cheie: agenți condiționat patogeni, Enterobacteriaceae, boli diareice acute, rezistență la antibiotice.

INTRODUCERE

Boala diareică acută (BDA), inclusiv dizenteria (shigelloza), salmonelloza etc., este provocată de enterobacterii patogene și condiționat patogene, fiind o problemă majoră de sănătate publică, iar identificarea agenților patogeni servește atât pentru depistarea sur-

selor de răspândire a infecției, cât și pentru un tratament corect. Familia Enterobacteriaceae este foarte numeroasă, cu diverse particularități și reprezintă cea mai vastă unitate taxonomică care numără 44 de genuri, inclusiv 25 sunt implicate în patologia umană. Ele habitează în intestinul omului și animalelor, fiind răspândite cu fecale pretutindeni în mediul ambiant,

cauzând toxiinfecții alimentare și boală diareică acută. Dintre enterobacteriile condiționat patogene fac parte *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* și *Escherichia coli* cu proprietăți hemolizante, unele dintre care sunt implicate frecvent și în Infecțiile Asociate Asistenței Medicale. Cel mai frecvent provoacă boli diareice acute microorganismele din genul *Klebsiella*, care sunt omniprezente în etiologia bolilor diareice acute [1; 2; 3; 4]. Bacteriile din genul *Klebsiella* se găsesc în mod normal în tractul intestinal. Un impact semnificativ în patologia umană îl au speciile *K. pneumoniae* și *K. oxytoca* [5].

Speciile din genul *Enterobacter* au legătură în principal cu infecțiile asociate asistenței medicale. Dintre cele 22 de specii ale genului *Enterobacter* mai semnificative clinic sunt speciile *E. cloacae* și *E. aerogenes*. Acești agenți condiționat patogeni provoacă boli gastrointestinale care se transmit pe cale hidrică sau alimentară [6]. Capacitatea genului *Enterobacter* de a supraviețui într-o gamă largă de condiții de mediu duce la izbucnirea diferitor infecții în instituțiile medicale [7].

La nivel global, anual, circa 10 % din populație este afectată de boală diareică acută, ceea ce duce la peste 420.000 de decese. Potrivit Organizației Mondiale a Sănătății și UNICEF, în întreaga lume anual se înregistrează aproximativ 2 miliarde de cazuri de boli diareice, iar 1,9 milioane de copii sub 5 ani mor din cauza BDA, mai ales în țările în curs de dezvoltare [8].

În Republica Moldova, incidența morbidității sumare prin BDA în anul 2022 a constituit 450,6 la 100 de mii de locuitori (malul drept), fiind în creștere de 2,7 ori comparativ cu anul 2021, când s-au înregistrat 170,1 cazuri la 100 de mii de locuitori (în anul 2020 acest indice a fost de 113,5, în anul 2019 – de 509,4 cazuri). Indicii morbidității sumare prin BDA la fel sunt în creștere și au constituit: în anul 2022 – 490,5 cazuri la 100 de mii de locuitori, de 2,4 ori mai mult față de anul precedent (în anul 2021 acest indice a constituit 203,6 cazuri, în 2020 – 144,2 cazuri). Pe parcursul anului 2022 au fost raportate 21 de izbucniri de BDA, fiind afectate 310 persoane, inclusiv 235 de copii (în anul 2021 – 8 izbucniri cu 117 bolnavi, în anul 2020 – 7 izbucniri cu 140 de bolnavi, în anul 2019 – 34 de izbucniri cu 590 de bolnavi). În anul 2022 au fost înregistrate 446 de focare multiple de BDA cu 2-4 cazuri, fiind un indicator în creștere față de anii precedenți (anul 2021 – 220 de cazuri, anul 2020 – 132 de cazuri), fapt ce demonstrează un risc potențial sporit de apariție a izbucnirilor [9].

Descoperirea antibioticelor este apreciată ca un moment revoluționar în controlul unui șir mare de boli infecțioase. Actualmente antibioticele reprezintă

cea mai numeroasă grupă de preparate medicamentoase și cele mai prescrise preparate farmaceutice. În ultimii ani, un șir de microorganisme au devenit multirezistente, fie prin achiziționarea unor β -lactamaze, fie prin prezența concomitentă a altor mecanisme de rezistență [10; 11]. Reprezentanții familiei Enterobacteriaceae se caracterizează prin rezistență la antibiotice, în special la cele beta-lactamice (peniciline, cefalosporine, cefamicine și carbapeneme), fapt determinat de producerea de către aceste microorganisme a beta-lactamazelor. Antibioticele sunt medicamente importante, însă unele antibiotice, care în trecut constituiau tratamentul standard pentru infecțiile bacteriene, sunt acum mai puțin eficiente sau nu mai funcționează deloc. Când un antibiotic nu mai are efect asupra unei anumite bacterii, acea bacterie se numește bacterie rezistentă la antibiotic.

Antibioticorezistența microorganismelor, implicate în etiologia maladiilor infecțioase, reprezintă o prioritate pentru sistemul de sănătate publică atât la nivel național, cât și global. Utilizarea clinică a agenților antimicrobieni trebuie să se bazeze pe principii care să asigure eficiența și siguranța în administrare [10; 11]. Datele despre rezistența agenților la antibiotice sunt importante, în primul rând, pentru alegerea terapiei empirice adecvate. Se consideră că dacă nivelul de rezistență a tulpinilor microbiene la antibiotic constituie mai mult de 10-20 %, acesta este un reper pentru restricția folosirii preparatului respectiv ca preparat de selecție [10; 12; 13]. Apariția rezistenței multiple la medicamente la multe dintre microorganismele patogene devine o problemă din ce în ce mai stringentă, care compromite în mod serios terapiile bazate pe antibiotice. Rezistența la antibiotice are ca rezultat reducerea gradului de eficacitate a medicamentelor antibacteriene, ceea ce face ca tratamentul maladiilor infecțioase să fie complicat, costisitor sau în anumite cazuri chiar imposibil.

Scopul lucrării a fost identificarea și analiza rezistenței la antibiotice a agenților condiționat patogeni din familia Enterobacteriaceae cel mai frecvent implicați în bolile diareice acute.

MATERIALE ȘI METODE

Cercetările au fost efectuate în anii 2019–2022. În total au fost izolate și identificate 537 de tulpini de enterobacterii condiționat patogene din cele 2.579 de probe clinice recepționate în Laboratorul microbiologic din Instituția Medicală Sănătate Publică AMT Buiucani, mun. Chișinău, pentru diagnosticul epizoadelor de boală diareică acută. Confirmarea etiologică a bolii a fost efectuată pe baza coproculturii, conform

indicației metodice „Diagnosticul microbiologic al infecțiilor intestinale” recomandate de Ministerul Sănătății al Republicii Moldova [14].

Înainte de a fi inoculată, fiecare probă de materii fecale se omogenizează 1 g cu 2 ml soluție salină sterilă NaCl 0,9 %. Ansa se încarcă cu biomaterial și apoi se descarcă pe suprafața plăcii cu geloză sub formă de striuri perpendiculare.

Însămânțarea primară a biomaterialului s-a efectuat pe plăci cu mediu de cultură Columbia agar + 5 % sânge, Endo agar, Chromatic Detection, Bismut sulfat agar, SS agar și se termostatează la 36 ± 1 °C timp de 24 de ore. După perioada de incubare plăcile s-au examinat macroscopic.

Identificarea preliminară a microorganismelor s-a efectuat după caracterele culturale (tipurile de colonii S, M sau R). Repicarea coloniilor lactozo-negative s-a efectuat pe mediul Kligler Iron agar, care este un mediu dizaharat, utilizat pentru diferențierea microorganismelor din familia Enterobacteriaceae pe baza proprietăților de a fermenta dextroza, lactoza și de a produce H_2S .

Identificarea finală s-a realizat pe baza testelor bi-chimice, prin API teste EnteroPluri-Test, care conțin: glucoză (scindarea până la acid sau acid/gaz); decarboxilarea lizinei, ornitinei, producția de hidrogen sulfurat sau indol; fermentarea adonitolului, lactozei, arabinozei, sorbitolului, Voges-Proskauer (producție de acetoină), dulcitol/PA (dezaminarea fenilalaninei); hidroliza ureei; utilizarea citratului de natriu.

Sensibilitatea tulpinilor a fost determinată prin metode fenotipice (disc-difuzimetrică Kirby-Bauer și CMI – automatizat) cu utilizarea setului de antimicrobiene, selectat conform recomandărilor EUCAST și protocoalelor naționale.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pe parcursul perioadei de studiu, din numărul total de probe prelevate (2.579) de la pacienții cu boli diareice acute au fost izolate 537 (20,8 %) de tulpini de microorganisme din familia Enterobacteriaceae și identificați opt agenți condiționat patogeni – *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Escherichia coli* cu proprietăți hemolizante, *Morganella* spp., *Serratia* spp. și *Providencia* spp. Spectrul etiologic a fost dominat de *Klebsiella* spp. (43,58 %), urmat, cu un procent mai mic, de *Enterobacter* spp. (17,32 %), *Escherichia coli* cu proprietăți hemolizante (13,97 %) și *Citrobacter* spp. (12,48 %). Cea mai mică pondere a avut-o *Providencia* spp. – 0,19 % (figura 1).

Indicii cantitativi ai agenților condiționat patogeni din familia Enterobacteriaceae arată că boala diareică acută a fost provocată mai frecvent de *Klebsiella* spp., iar cei mai înalți indici au fost înregistrați în anul 2020 – 48,91 % (figura 2).

Ponderea indicilor cantitativi ai agenților condiționat patogeni pe perioada de studiu a înregistrat o scădere lentă a valorilor, cu excepția *Citrobacter* spp., care a înregistrat valori maxime în anul 2022. Genurile *Enterobacter* (19,57 %) și *Serratia* (4,35 %) au înregistrat cei mai înalți indici în anul 2020, cu toate că în anul 2019 *Serratia* spp. n-a fost identificată. Pentru tulpinile de *Citrobacter* spp. (20,33 %) și *E. coli* cu proprietăți hemolizante cei mai înalți indici au fost înregistrați în anul 2022 (15,93 %), pentru *Proteus* spp. – în anul 2019 (16,07 %) și pentru *Morganella* spp. – în anul 2021 (3,73 %). Genul *Providencia* n-a fost identificat în perioada 2019–2021, iar în anul 2022 a avut o pondere de 0,55 %.

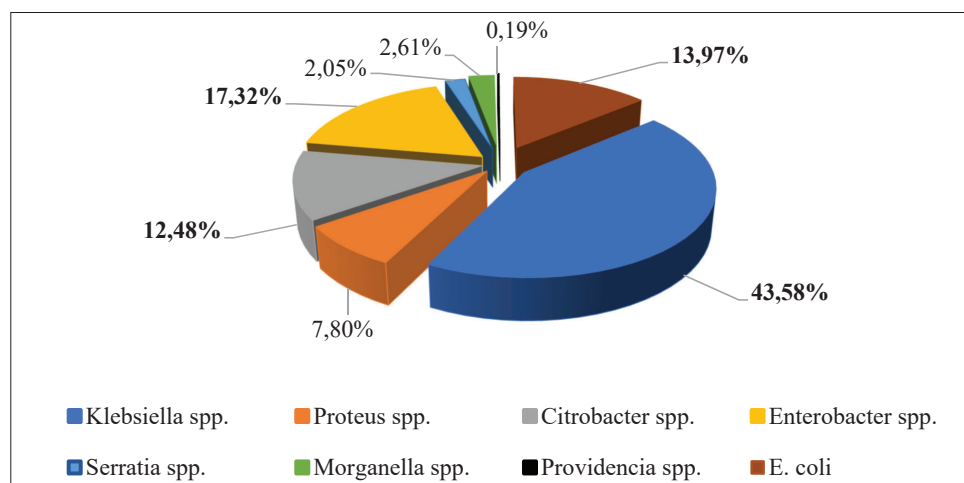


Figura 1. Structura etiologică a enterobacteriilor condiționat patologice izolate în perioada de studiu.

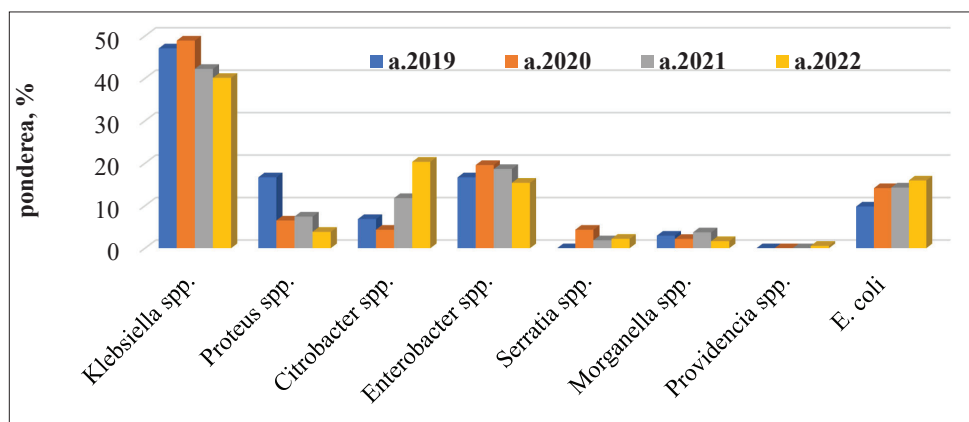


Figura 2. Pondere indicatorilor cantitativi ai reprezentanților din familia Enterobacteriaceae condiționat patogeni identificați în perioada de studiu.

În Republica Moldova, incidența morbidității sumare prin BDA în perioada 2002–2022 a fost în creștere cu excepția anilor 2020 și 2021, când a fost cea mai scăzută. În anul 2022 aceasta a constituit 450,6 cazuri la 100 de mii de locuitori, fiind în creștere de 2,7 ori comparativ cu anul 2021, când s-au atestat 170,1 cazuri la 100 de mii de locuitori. Precizăm că în anul 2020 s-au înregistrat 113,5 cazuri, iar în anul 2019 – 509,4 cazuri la 100 de mii de locuitori) [9]. Aceasta poate fi explicat prin faptul că în perioada 2020–2021 au fost înăsprite regulile sanitaro-epidemiologice în instituții și în transportul public pe fundalul pandemiei, când s-au utilizat diverse soluții dezinfectante. Respectarea regulilor de igienă personală este condiția sigură de evitare a îmbolnăvirii.

Testarea rezistenței enterobacteriilor condiționat patogene la preparatele antimicrobiene a inclus următoarele clase de antibiotice: peniciline, cefalosporine, carbapeneme, aminoglicozide, fluorochinolone, fosfomicină și trimetoprim-sulfametoxazol. În consecință, s-a stabilit că în perioada de studiu enterobacteriile izolate

au prezentat un grad diferit de rezistență la toate clasele de antibiotice. O rezistență foarte înaltă a fost înregistrată la peniciline: *Citrobacter spp.* – 87,8 %, *Serratia spp.* – 60,87 %, *Enterobacter spp.* – 59,65 %, *Morganella spp.* – 56,25 %, *Klebsiella spp.* – 46,6 %, *E. coli coli* cu proprietăți hemolizante – 41,89 % (figura 3).

Rezistența înaltă la peniciline reprezintă un fenomen alarmant și confirmă faptul că antibioticele din această clasă sunt cel mai des utilizate în tratarea diferitor patologii infecțioase.

E. coli cu proprietăți hemolizante și *Proteus spp.* au manifestat o rezistență de 29,73 % și 27,1 %, respectiv, la fluorochinolone. O rezistență moderată a fost înregistrată la carbapeneme și aminoglicozide. La celelalte clase de antibiotice în perioada de studiu a fost înregistrată o rezistență scăzută.

Providencia spp. în perioada de studiu a fost identificată doar în anul 2022 cu o pondere foarte mică (0,55 %), ceea ce face imposibilă o analiză plauzibilă a datelor și expunerea asupra sensibilității la antibiotice.

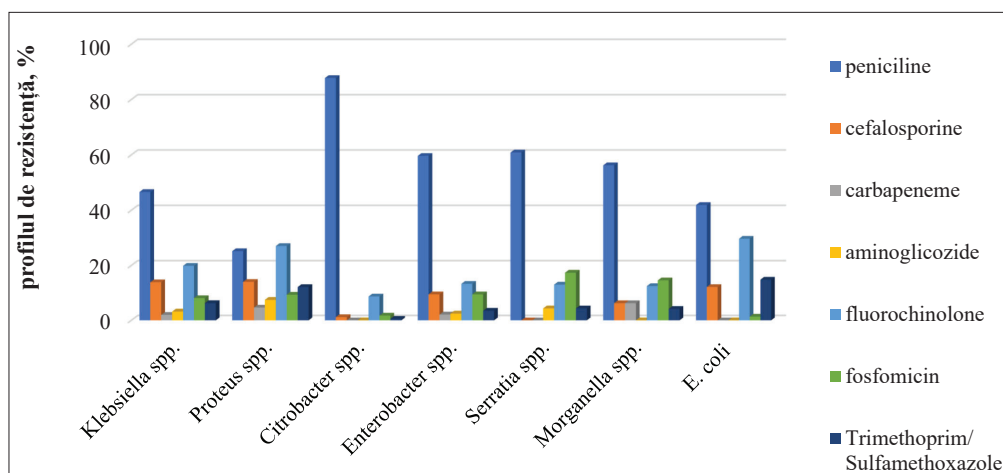


Figura 3. Profilurile de rezistență (%) la diverse clase de antibiotice ale enterobacteriilor condiționat patogene izolate în perioada de studiu.

Ca urmare, s-a stabilit că agenții condiționat patogeni din familia Enterobacteriaceae au înregistrat un grad diferit de rezistență la antibiotice, ceea ce confirmă importanța efectuării antibiogrammei pentru o terapie eficientă. Rezistența la antimicrobiene este o amenințare din ce în ce mai mare pentru sănătatea publică la nivel mondial, iar utilizarea nerațională a antibioticelor este principala cauză a apariției de noi mecanisme de rezistență la antimicrobiene. În cazul când sunt folosite pe scară largă multe clase de antibiotice apare rezistența multiplă la antibiotice, care este o realitate tot mai prezentă a zilelor noastre. O importanță deosebită au programele de informare a populației privind măsurile de prevenire a BDA și necesitatea solicitării asistenței medicale în caz de boală, care pot contribui semnificativ la reducerea surselor de infecție și limitarea răspândirii cazurilor noi de boală.

CONCLUZII

În perioada de studiu s-a constatat o scădere lentă a valorilor indicilor cantitativi ai agenților condiționat patogeni din familia Enterobacteriaceae, spectrul etiologic a fost dominat de *Klebsiella* spp. (43,58 %).

Agenții condiționat patogeni din familia Enterobacteriaceae au înregistrat un grad diferit de rezistență la antibiotice, ceea ce subliniază importanța efectuării antibiogrammei pentru o terapie eficientă.

O rezistență foarte înaltă a fost înregistrată la peniciline, la celelalte clase de antibiotice s-a constatat o rezistență scăzută.

Rezultatele obținute în perioada de studiu relevă rolul monitorizării rezistenței la antibiotice, care este foarte importantă în tratarea bolilor diareice acute.

BIBLIOGRAFIE

1. Evtodienco V., Cojocaru R., Burduniuc O., Buzatu A., Coteș O., Șevciuc S. Boala diareică acută: probleme și perspective. În: Curierul medical, 2010, nr 3. (315), 185-189.
2. Galetchi P., Buiuc D., Plugaru Ș. Ghid practic de microbiologie medicală. Chișinău: I.E.P. Știința, București: Editura Tehnică, 1997. 471 p.
3. Guzman-Otazo J, Gonzales-Siles L, Poma V, Bengtson-Palme J, Thorell K, Flach C-F, et al. Diarrheal bacterial pathogens and multiresistant enterobacteria in the Choqueyapu River in La Paz, Bolivia. In: PLoS ONE, 2019, 14(1): e0210735, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210735>
4. Lu B., Zhou H., Xin Z., Qu M., Huang Y., Wang Q. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolates from stool specimens of outpatients in sentinel hospitals Beijing, China, 2010–2015. In: Gut Pathog, 2017, 9, p. 39, doi: 10.1186/s13099-017-0188-7
5. Rusu G., Juravliov T., Vămășescu A., et. al. Boala diareică acută la copil. Protocol clinic național. Elab.: Chișinău. Ediția – I „T-PAR” SRL, 2009. 68 p.
6. Rebedea I. Diagnosticul de laborator în bolile infecțioase. Boli Infecțioase. București: Editura Medicală, 2000, 21-32.
7. Chavda KD., Chen LI., Fouts DE., et al. Comprehensive genome analysis of carbapenemase-producing *Enterobacter* spp.: new insights into phylogeny population structure, and resistance mechanisms, mBio. 2016, p. 7. Pii: e02093-16.
8. Grimont F, Grimont P. A. D. “The Genus *Enterobacter*”. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer and E. Stackebrandt, Eds., *The Prokaryotes*, Vol. 6, Proteobacteria: Gamma Subclass, Springer, Berlin, 2006, 197-214.
9. Jelamschi N., Guștiuc V., Șalaru I., Cumpănă M., et al. Supravegherea de stat a sănătății publice în Republica Moldova: (Raport național, 2022). Chișinău: Agenția Națională pentru Sănătate Publică, (ANSP), 2023 (acces:www.ansp.md), 88-91.
10. Balan G., Rotaru C., Caragă-Lupașco C., Crivenco A. Rezistența la antibiotice a tulpinilor de enterobacteriaceae responsabile de infecții ale tractului urinar. În: Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”, 2013, nr. 2(14), 41-45.
11. Jehl F. De la antibiogramă la prescripție. București, 2004, p. 12.
12. Eryilmaz M, Bozkurt ME. Antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* isolates. In: Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2010, 9(2), 205- 209.
13. Yilmaz N., Agus N. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* in outpatient urinary isolates in Izmir, Turkey. In: Medical Science Monitor. 2009, 15(11), 161-165.
14. Evtodienco V., Burduniuc O., Cojocaru R., et al. Diagnosticul microbiologic al infecțiilor intestinale: (Indicații metodice). Chișinău: Print-Caro, 2013. 90 p.

NOTĂ. Cercetarea a fost realizată în cadrul proiectului doctoral pe tema *Agenții patogeni ai bolilor diareice acute – particularități morfo-culturale, metode de identificare, antibioticorezistența și dinamica răspândirii în municipiul Chișinău.*