

Alexa-Mihaela PREDA¹, Iulia Adelina DINU¹, Mădălina Diana GĂBOREANU¹, Irina GHEORGHE-BARBU^{1,2}

¹Facultatea de Biologie, Universitatea din București

²Institutul de Cercetare al Universității din București

INTRODUCERE

Escherichia coli este o bacterie Gram negativă, prezentă în mod obișnuit în microbiota comensală a tractului intestinal uman, dar și agent patogen major al infecțiilor urinare și sistemice. Tulpinile patogene prezintă frecvent rezistență crescută la aminopeniciline, fluoroquinolone, aminoglicozide și cefalosporine de generația a III-a (1).

În România, sistemul de nămol activ al stațiilor de epurare (SEAU) reprezintă un mediu propice ce favorizează transferul genelor de rezistență la antibiotice (ARG), întrucât SEAU nu sunt concepute pentru a elimina ARG și bacteriile rezistente la antibiotice (ARB) (2).

SCOP
Evaluarea markerilor fenotipici și genotipici de rezistență și de virulență, precum și analiza filogenetică a tulpinilor de *E. coli* izolate dintr-o stație de epurare a apelor uzate situată în Sinaia, județul Prahova, România.

REZULTATE

Analiza comparativă a încărcăturii microbiene corespunzătoare speciei *E. coli* a evidențiat o predominanță a tulpinilor izolate din efluent (n=21, 48.8%), comparativ cu influentul și emisarul, (25.6%, câte 11 tulpini) SEAU (Figura 2).

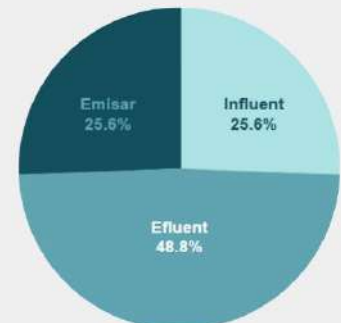


Figura 2. Distribuția tulpinilor de *E. coli* din Stația de Epurare Sinaia

Cele mai ridicate niveluri de rezistență au corespuns AMP, IMP și AMC, sugerând prezența tulpinilor multirezistente (MDR). La polul opus, cel mai ridicat nivel de sensibilitate a fost înregistrat la MEM și ETP (Figura 3).

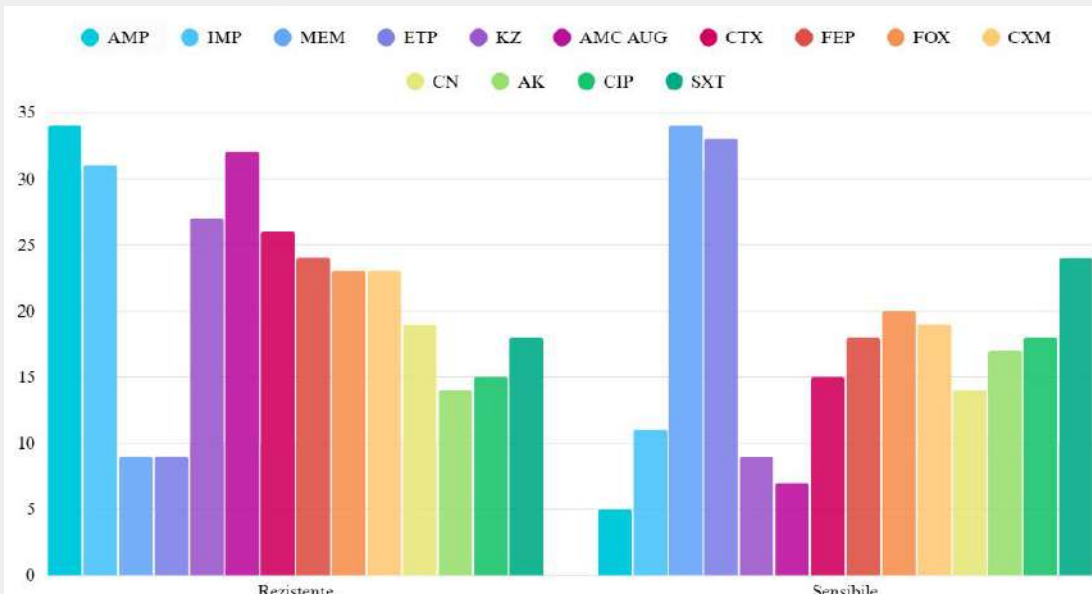


Figura 3. Distribuția rezistenței la antibiotice la tulpini de *E. coli*

Cele mai rezistente tulpini au fost izolate din efluentul SEAU, indicând că sistemul actual de tratare nu elimină eficient ARG și ARB, facilitând astfel diseminarea acestora în mediu (Figura 4).

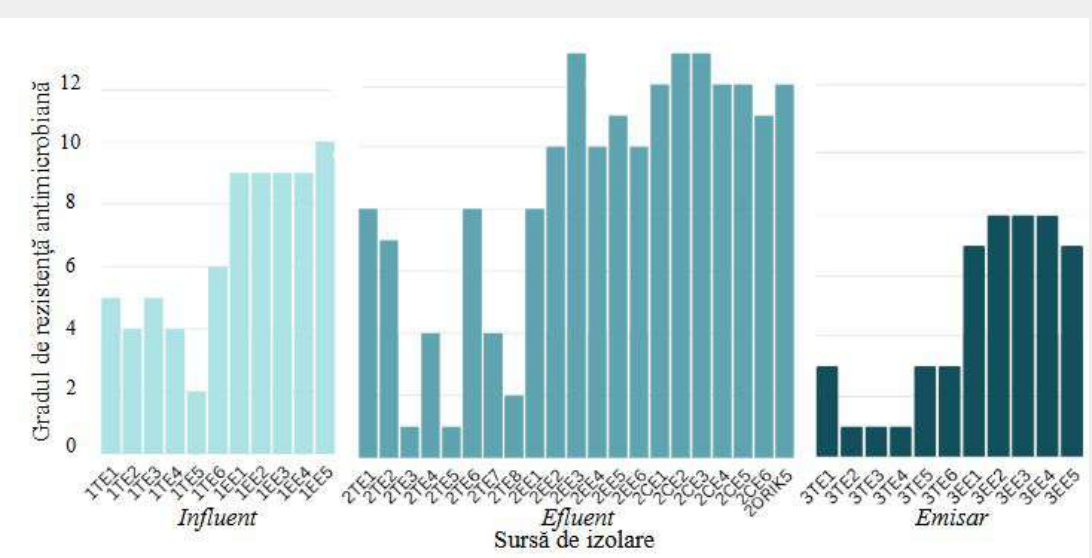


Figura 4. Distribuția rezistenței la antibiotice pe surse de izolare

Distribuția genelor de rezistență la antibiotice arată că cele mai frecvente gene identificate au fost *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM} și *bla*_{TEM} mai ales în efluentul SEAU, evidențiind acumularea și persistența ARG în sistemul de epurare (Figura 5).

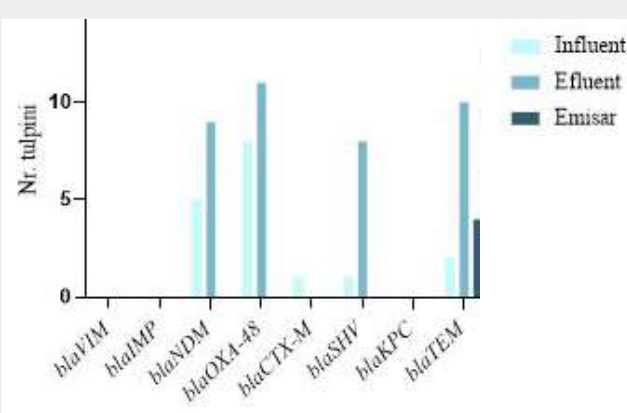
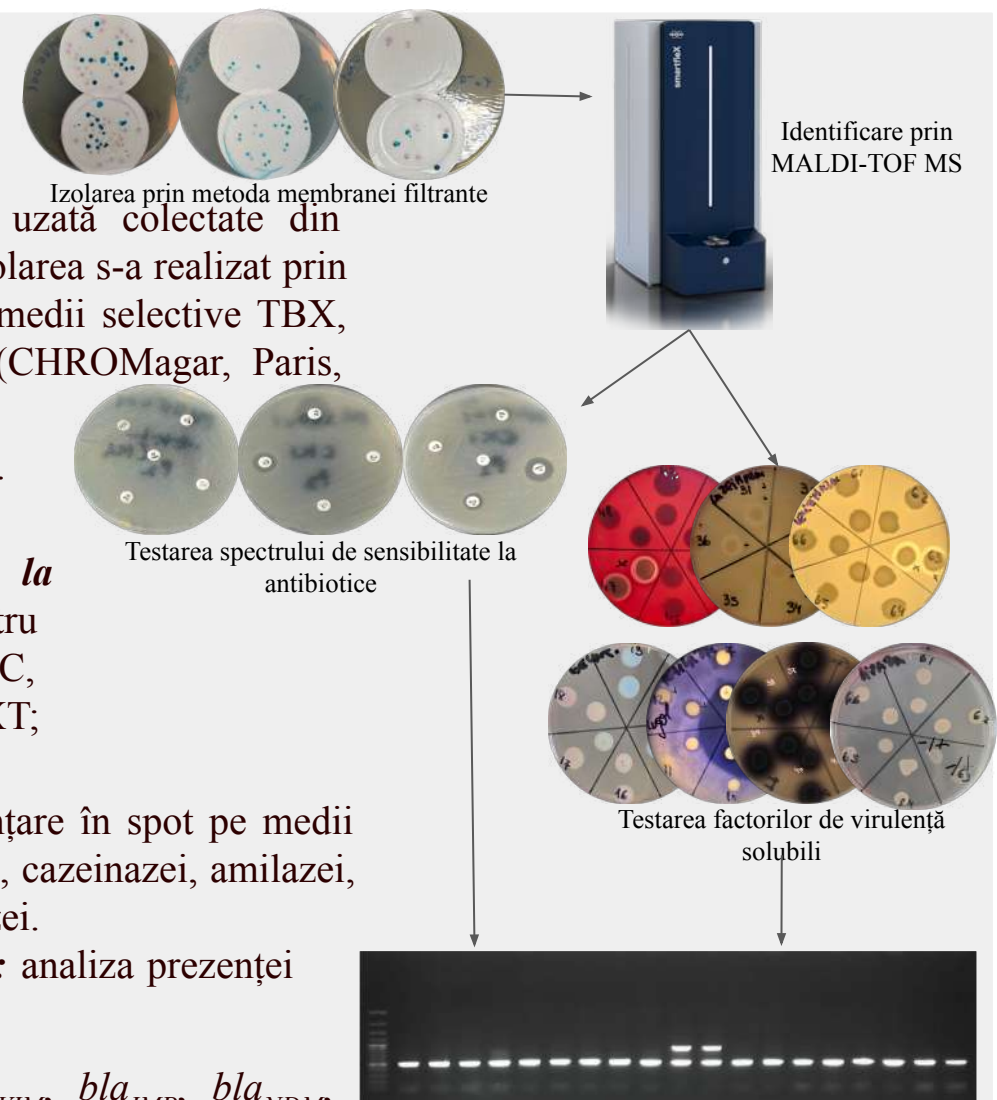


Figura 5. Distribuția genelor de rezistență după sursa de izolare

Genele *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM} și *bla*_{TEM} identificate sunt asociate cu producerea carbapenemazelor și β-lactamazelor de spectru extins (ESBL).

MATERIALE ȘI METODE

- **Izolarea tulpinilor bacteriene:** probe de apă uzată colectate din influentul, efluentul și emisarul SEAU Sinaia. Izolarea s-a realizat prin metoda membranei filtrante și însămânțarea pe medii selective TBX, CHROMagar ESB/BL și CHROMagar CARBA (CHROMagar, Paris, Franța).
- **Identificare:** prin spectrometrie MALDI-TOF MS.
- **Determinarea profilurilor de rezistență la antibiotice:** pe mediu Mueller-Hinton, pentru antibioticele: AMP, IMP, MEM, ETP, KZ, AMC, CTX, FEP, FOX, CXM, CN, AK, CIP, SXT; interpretare conform CLSI, 2024.
- **Studiul factorilor de virulență solubili:** însămânțare în spot pe medii specifice pentru determinarea prezenței hemolizei, cazeinazei, amilazei, hidrolizei esculinei, lipazei, lecitinazei și gelatinazei.
- **Investigarea relațiilor filogenetice dintre tulpini:** analiza prezenței genelor *chuA*, *yjaA* și a fragmentului *TspE4C2*.
- **Detecția markerilor genotipici:** rezistență (*bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}) și de virulență (*hlyA*, *sfaDE*, *fimH*, *hlyD*, *kpsMII*, *cnf1*, *afaBC*, *papC*) (Figura 1).



Amplificarea genelor de rezistență, virulență și filogenetic prin PCR și analiza ampliconilor prin electroforeză
Figura 1. Diagrama generală a metodelor

REZULTATE

Tulpinile de *E. coli* izolate din efluent au prezentat un profil variat de factori de virulență solubili, în special cazeinază, lipază și hidroliza esculinei (Figura 6) corelat cu prezența unor gene de virulență: *fimH* (cel mai frecvent detectată, cu valori maxime în efluent), *hlyA*, *sfaDE* și *hlyD* (identificate sporadic).

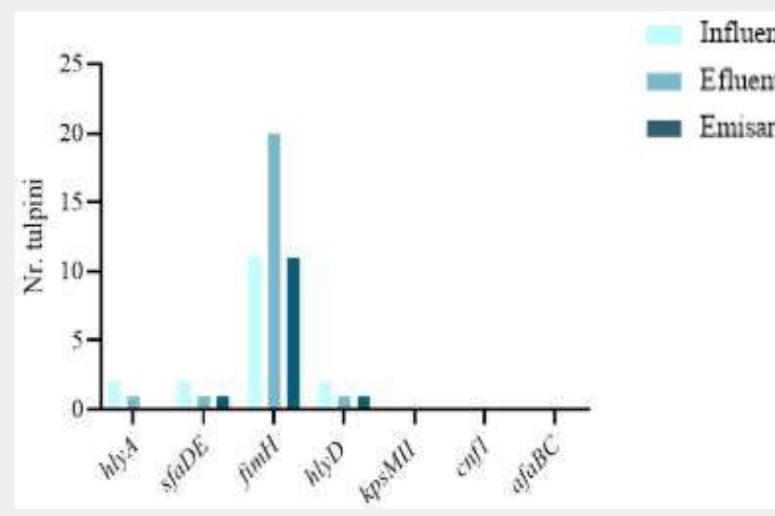


Figura 7. Distribuția genelor de virulență la tulpinile de *E. coli* pe surse de izolare

Din 43 de tulpini de *E. coli*, 41.8% tulpini (n=18) au fost încadrate în grupul B2 și 10 în grupul D, asociate cu un nivel de virulență crescut (Figura 8).

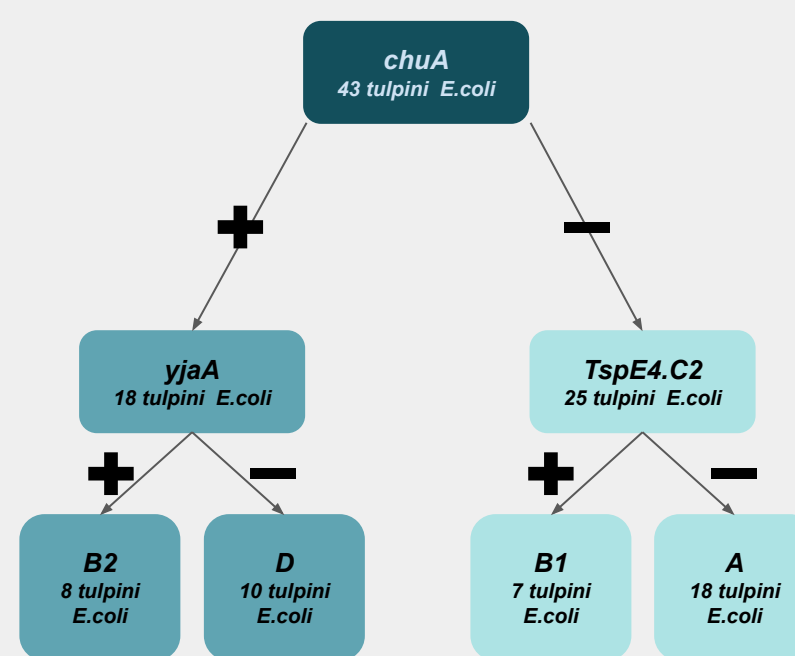


Figura 8. Distribuția tulpinilor *E. coli* pe grupele filogenetice

Două tulpini, 1EE3 și 1EE4, provenite din influentul SEAU Sinaia, îndeplinesc simultan toate aceste criterii, indicând un potențial ridicat de patogenitate și importanță epidemiologică.

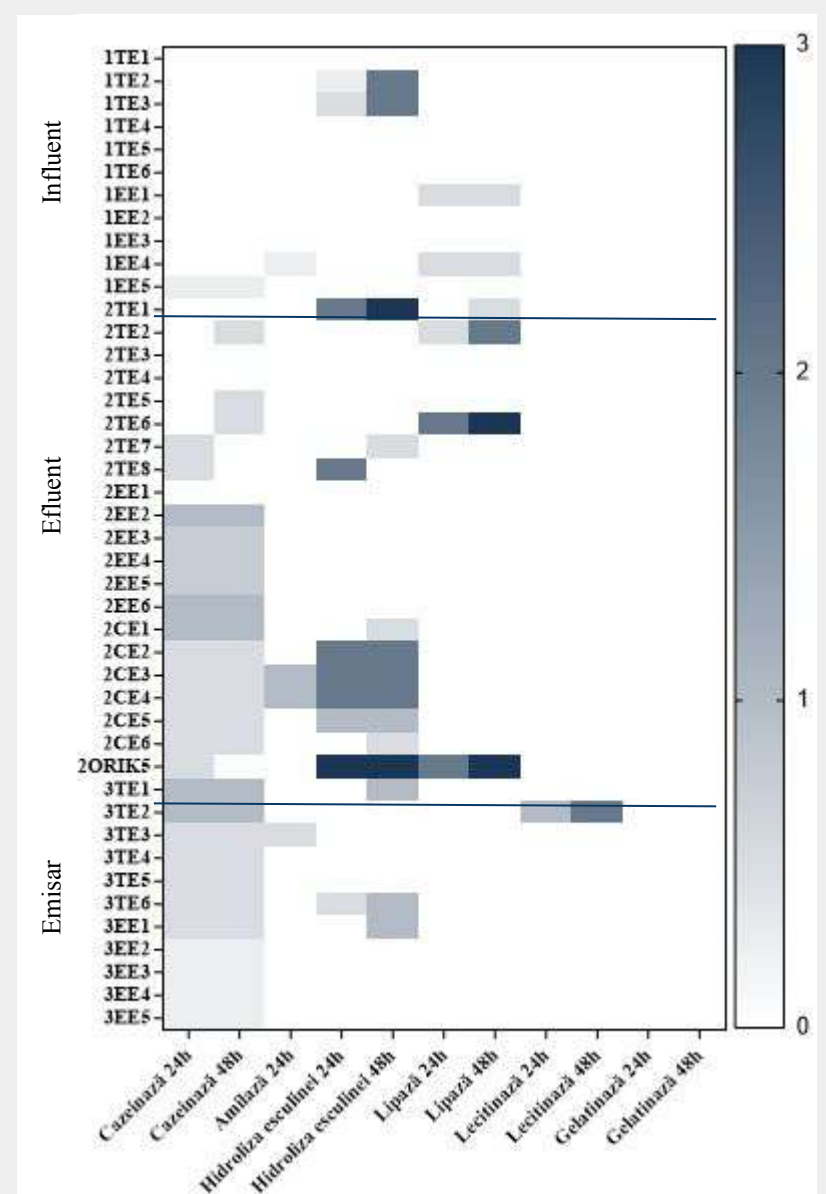


Figura 6. Distribuția factorilor de virulență fenotipici la tulpini de *E. coli* pe surse de izolare și în funcție de intervalul de timp analizat.

Figura 9 ilustrează suprapunerea tulpinilor *E. coli* MDR, cele care prezintă mai mult de două ARG, > două gene de virulență și cele aparținând grupurilor filogenetice B2 sau D.

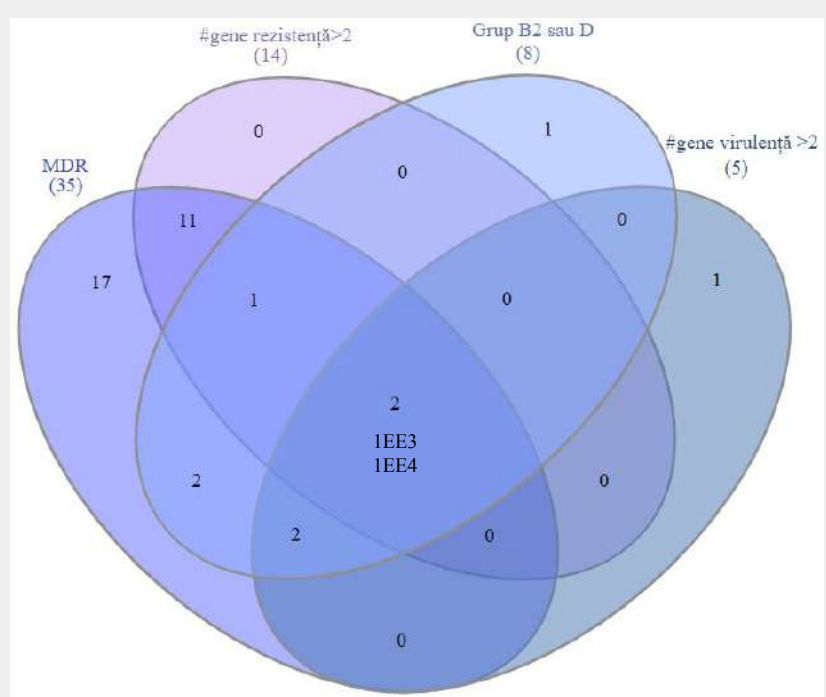


Figura 9. Asocierea markerilor de rezistență și virulență cu grupurile filogenetice B2 și D

CONCLUZII

Analiza comparativă a evidențiat un nivel ridicat de tulpini *E. coli* în efluentul SEAU, unde s-au înregistrat și cele mai ridicate niveluri de rezistență la antibiotice și de factori de virulență solubili. Genele de rezistență *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM} și *bla*_{TEM} au fost cel mai frecvent identificate, indicând acumularea și persistența ARG în sistemul de tratare al apelor uzate. Două tulpini (1EE3 și 1EE4), provenite din influent, au îndeplinit simultan trăsături de rezistență, virulență și apartenență filogenetică, fiind de interes pentru studii viitoare privind potențialul de patogenitate și rolul în diseminarea genelor de rezistență.

1. De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 33(3), e00181-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>

2. Alexander, J., Hembach, N., & Schwartz, T. (2020). Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany. *Scientific reports*, 10(1), 8952. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65635-4>