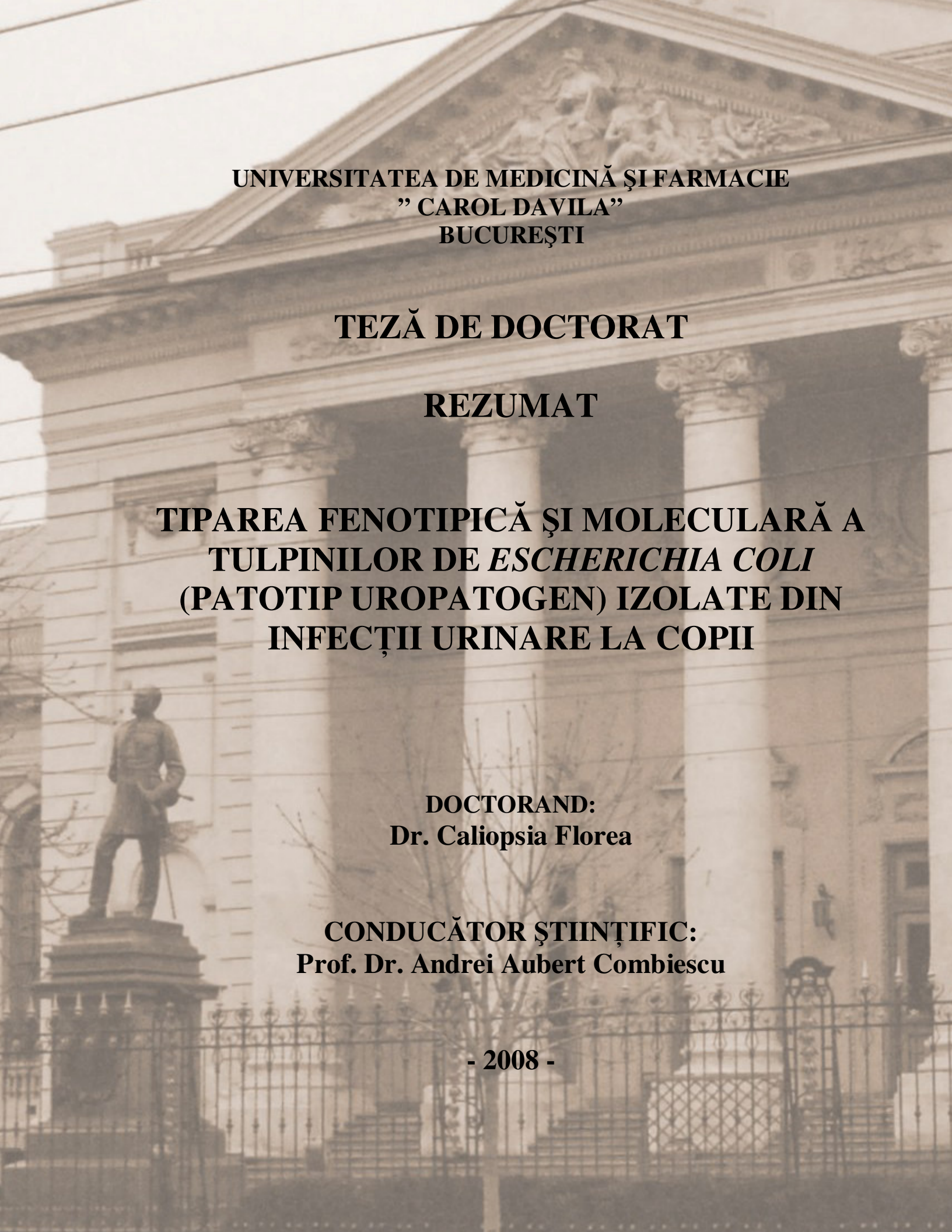




**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
” CAROL DAVILA”
BUCUREȘTI**

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

**TIPAREA FENOTIPICĂ ȘI MOLECULARĂ A
TULPINILOR DE *ESCHERICHIA COLI*
(PATOTIP UROPATOGEN) IZOLATE DIN
INFECȚII URINARE LA COPII**

**DOCTORAND:
Dr. Caliopsia Florea**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
Prof. Dr. Andrei Aubert Combiescu**

- 2008 -

CUPRINS

1. Introducere.....	2
2. Obiectivele principale ale studiului.....	4
3. Rezultate și discuții.....	5
3.1 Testarea sensibilității la antibiotice.....	9
3.2 Testarea caracterului hemolitic.....	14
3.3 Testarea factorilor de urovirulență.....	15
3.4 Grupurile filogenetice la Escherichia coli.....	23
4. Concluzii.....	28

TIPAREA FENOTIPICĂ ȘI MOLECULARĂ A TULPINILOR DE *ESCHERICHIA COLI* (PATOTIP UROPATOGEN) IZOLATE DIN INFECȚII URINARE LA COPII

1. Introducere

Această lucrare și-a propus să analizeze cauzele, particularitățile anatomice și funcționale, factorii de virulență și grupurile filogenetice ale infecțiilor urinare cu *Escherichia coli* la copii.

Studierea infecției urinare la copii am considerat-o interesantă întrucât reprezintă a treia cauză de morbiditate, după infecțiile respiratorii și digestive.

Dintre formele infecției de tract urinar (ITU) la copii, pielonefrita acută (PNA) reprezintă cea mai gravă formă de infecție, care produce nu numai o morbiditate mare, mai ales la copilul mic, dar și un potențial de a genera leziuni ireversibile precum: cicatrice renale, hipertensiune arterială înainte de 30 ani și complicații importante în timpul sarcinii.

Din punct de vedere al etiologiei în ITU, sunt pe prim plan bacteriile Gram negative în proporție de 60-70%, reprezentate de: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Haemophilus influenzae*, *Citrobacter* spp., *Chlamydii*. Mai rar (în proporție de 15-20%) se întâlnesc ITU produse de bacterii Gram pozitive: *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophiticus*, de asociații microbiene sau de alți agenți: micelii (*Candida*), protozoare

(Trichomonas), paraziți (Bilharzia), virusuri (Adenovirusurile serotip 11 și 21, care pot da cistita acută hemoragică abacteriană).

Infecțiile urinare repetate produse de germenii care produc urează (speciile de Proteus, Staphylococcus aureus, Klebsiella, Serratia marcescens, Pseudomonas, Ureaplasma urealyticum, unele specii de Candida, Cryptococcus) pot să producă "Struvite stones", calculi legați de infecție, mai ales la copiii care au malformații sau obstrucții ale tractului urinar. Caracteristica acestor calculi este că sunt mari și neregulați (calculi în formă de coarne de cerb "staghorn calculi") și ocupă integral bazinetul. Coexistența acestor calculi și infecția agravează funcția renală și de aceea evaluarea urologică a acestor pacienți este obligatorie.

Dintre ITU cca. 80% sunt date de Escherichia coli. Această bacterie care în mod normal este un comensal al intestinului, atunci când dispune de prezența de factori de virulență specializați, determină fenotipul uropatogen la Escherichia coli și anume tulpinile UPEC/ExPEC. Important este faptul că factorii de virulență pe care îi exprimă aceste tulpini sunt codificați cromozomial, spre deosebire de cei ai patotipurilor intestinale de Escherichia coli, ai căror determinanți genetici sunt prezenți mai ales pe plasmide.

Acești factori de virulență care determină patotipul uropatogen sunt: proprietățile speciale de aderență la celulele uroepiteliale (adezine fimbriale sau afimbriale), toxine (hemolizina, factorul citotoxic necrotizant), sisteme de achiziționare a fierului (enterobactinul, aerobactinul), alți factori potențiali de virulență (unele dintre antigenele somatice "O" și unele dintre antigenele capsulare "K").

Din punct de vedere al factorilor favorizanți, important pentru ITU, sunt:

- Malformațiile anatomice ale aparatului reno-urinar, dintre cele mai importante menționez: hipoplazia renală, agenezia renală unilaterală, rinichi multipli, rinichi

dedublați, anomalii de rotație sau sediu, malformații tumorale (benigne sau maligne), malformații ureterale (cel mai important este refluxul vezico-ureteral, care are patru grade și pentru care se recomandă tratament medicamentos în gradele 1 și 2 și chirurgical pentru gradele 3 și 4), anomalii vezicale, malformațiile uretrei. Toate aceste malformații se complică cu infecții urinare.

- Factori favorizanți generali: infecții sistemice, deficite imunologice primare sau secundare, tulburări metabolice congenitale sau câștigate, boli neoplazice, tratament imunosupresiv.

Formele clinice de ITU cele mai întâlnite la copii sunt: pielonefrita, pionefrita, pionefroza și uretrocistita (care este o formă de ITU frecvent întâlnită mai ales la fete).

2. Obiectivele principale ale studiului

i. Sensibilitatea la un număr de 20 de antibiotice și chimioterapice, a unui număr de 135 de tulpini de *Escherichia coli* care au provenit de la copii internați pentru ITU, stări febrile sau alte diagnostice în Spitalul Clinic de Urgență pentru Copii "Sfântul Ioan" Galați, într-un interval de doi ani 2005-2006.

ii. Studiul factorilor de virulență ai tulpinilor *Escherichia coli* care au produs ITU; pentru această parte au fost selectați: un lot de copii care au avut ITU în 2005 și un lot de copii sănătoși din creșa nr. 36 Galați. Factorii de virulență studiați au fost: adezinele fimbriale (fimbriile P, S/F1C), adezine afimbriale (adezina AFA), toxinele (hemolizina și factorul citotoxic necrotizant – CNF). Aceștia au fost fenotipați (gen, specie, hemolizină) prin tehnicile clasice și genotipați (factorii descriși mai sus) prin PCR (reacția de polimerizare în lanț).

iii. Studiarea apartenenței la grupurile filogenetice a tulpinilor de *Escherichia coli* care au provenit din cele două loturi de copii, s-a realizat cu ajutorul unui protocol bazat pe PCR.

3. Rezultate și discuții

În acest studiu au fost studiate următoarele entități patologice:

- bacteriuria asimptomatică (BA),
- pielonefrita acută (PNA),
- pielonefrita cronică (PNC),
- cistita (C).

Condiția de malformație a tractului urinar a fost considerată ca entitate distinctă pentru a se sublinia prezența și importanța ei, fără ca pentru copiii respectivi să se definească localizarea ITU. În cei doi ani s-au prezentat opt copii cu malformații ale tractului genito-urinar: șase au fost în 2005 (patru renale și două ale tractului genital), iar în 2006 două malformații (una renală și una genito-urinară).

Numărul bolnavilor, repartizarea lor pe grupe de vârstă, sex, formele de ITU pe care le-au prezentat copii internați în spitalul din Galați, precum și criteriile clinice și paraclinice pe baza cărora au fost diagnosticați le prezint în tabelele 1, 2 și 3.

Tabel 1. Distribuția pacienților cu diferite tipuri de ITU pe sexe și grupe de vârstă

Anul/vârsta	Tip de ITU	Distribuția pacienților pe grupe de vârstă și sex								
		0-1 an		1-3 ani		3-10 ani		10-17 ani		
2005		F	B	F	B	F	B	F	B	Total
	BA	2	4	2	1	-	-	1	-	10
	C	1	1	1	1	4	2	5	2	17
	PNA	9	6		3	4	1	8		31
	PNC	-	-	-		2	-	-	-	2
	Total	12	11	3	5	10	3	14	2	60
2006	BA	2	4	-	1	2	2	1	-	12
	C	-	-	-	2	9	6	6	1	24
	PNA	8	6	1	2	5	3	4	2	31
	PNC	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Total		10	10	1	5	16	11	11	3	67

Legendă : **BA** = bacteriurie asimptomatică; **C** = cistită;

PNA = pielonefrită acută; **PNC** = pielonefrită cronică.

Tabel Nr. 2 Semne și simptome clinice ale cazurilor de ITU în anii 2005 și 2006

Criterii Forma clinică	Nr. pacienți cu semne clinice				Nr. pacienți cu simptome urinare locale	
	Febră	Dureri abdominale	Dureri lombare	HTA	Disurie	Polakiurie
BA	6	-	-	-	-	
C	41	41	12	-	41	41
PNA	62	40	15	-	42	62
PNC	2	2	2	2	2	2
Total	110	82	29	2	85	105

Legendă: BA = bacteriurie asimptomatică,

C = cistită,

PNA = pielonefrită acută,

PNC = pielonefrită cronică,

HTA = hipertensiune arterială.

Tabel Nr. 3 Date paraclinice ale cazurilor de ITU în anii 2005 și 2006

Criterii Forma clinică	Nr. pacienți cu VSH >20 mm/h	Nr. pacienți cu proteina "C" reactivă > 20mg %	Nr. pacienți cu # piurie > 10 leuc/mm ³	Nr. pacienți cu clearance creatinină < 45ml/min	Nr. pacienți cu retenție azotată: uree↑ creatinină↑ acid uric↑	Nr. pacienți cu Rx. reno-urinară modificată	Nr. pacienți cu leucocite crescute în sânge
BA	20	20	14	-	-	-	20
C	41	41	41	-	-	10*	41
PNA	62	62	62	4	4	40	62
PNC	2	2	2	2	2	2	2
Total	125	125	119	6	6	52	125

Legendă: # = din urina necentrifugată,

* = îngroșarea mucoasei vezicale

Tulpinile de *Escherichia coli* au provenit de la copii internați în anii 2005 (66 tulpini) și în 2006 (69 tulpini), din uroculturi semnificativ pozitive $\geq 10^5$ UFC/ml, care au fost recoltate prin metodele: ”jet mijlociu” și cateterizare. Iar tehnica de însămânțare a fost cu ”ansa calibrată”.

Tulpinile de *Escherichia coli* care au provenit din lotul sănătos, au fost tulpini fecale, recoltate din scaun emis spontan de la copii care nu au prezentat afecțiuni digestive sau de altă natură, care nu au primit tratament antibacterian cel puțin o săptămână înainte de recoltă și au fost prelevate de la copii din creșa nr. 36 din Galați.

Diagnosticul bacteriologic de gen și specie pentru *Escherichia coli* l-am pus prin însămânțarea tulpinilor pe medii selective pentru enterobacterii (Mac Conkey), iar proprietățile exoenzimatice au fost evidențiate prin teste biochimice convenționale.

Aceste tulpini de *Escherichia coli* au fost însămânțate pe geloza semisolidă, recomandată de O.M.S. și au constituit ”colecția de tulpini” pentru acest studiu. Ea a fost stocată în dublu: la temperatura camerei, dar și refrigerată.

3.1 Testarea sensibilității la antibiotice

Metoda folosită pentru testarea sensibilității la substanțe antibacteriene a fost ”disc-difuzimetrică” pe agarul Müller-Hinton. Discurile pentru antibiogramă au fost de la ABTEK BIOLOGICALS LTD-MAREA BRITANIE, citirea și interpretarea s-au făcut după instrucțiunile producătorului, respectând standardul CLSI fost NCCLS.

Mediile de cultură au fost controlate cu tulpina de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Antibioticele folosite au făcut parte din următoarele familii (s-a ținut cont că pacienții au fost copii).

1. β -lactamine: amoxicilină (Amx); augmentin (Aug) - amoxicilină + acid clavulanic; piperacilină (Pip); piperacilină + tazobactam (Tzp).
2. Cefalosporine: cephalotin (Cit) gen.1; cefoxitin (Cxt) gen. 2; cefotaxim (Ctx); cefoperazonă (Cpz) și ceftazidim (Caz) din generația 3 de cefalosporine.
3. Carbapeneme: Imipenem (Imp).
4. Aminoglicozide: gentamicină (Gen); tobramicină (Tab); amikacină (Amk).
5. Polimixine: colimicină (Co).
6. Chinolone și fluoroquinolone: acid nalidixic (Nal), ciprofloxacin (Cip) și norfloxacin (Nor).
7. Altele: Trimetoprim + sulfametoxazol (Cot); fosfomicină (Fos); cloramfenicol (Chi).

După cum era de așteptat s-a înregistrat o sensibilitate scăzută la penicilină de sinteză (amoxicilină): 24,3% respectiv 15,9% pentru cei doi ani, aceasta pentru că tratamentele pentru infecții la copii se fac folosind mai întâi peniciline, de aceea bacteriile au dobândit rezistențe cromozomiale sau extracromozomiale (plasmidiale).

O situație asemănătoare se înregistrează și la asocierile penicinelor cu inhibitori de β -lactamază, tulpinile au avut o sensibilitate la augmentin de 28,8% respectiv 17,3% înregistrându-se o scădere a sensibilității în anul 2006 față de 2005.

La piperacilină tulpinile au avut o sensibilitate scăzută: 12,1% în 2005 și 11,4% în 2006.

O situație asemănătoare a fost pentru piperacilină-tazobactam la care scăderea sensibilității a fost mai serioasă în cei doi ani: de la 75,7% în 2005 la 29% în 2006.

În ceea ce privesc aminoglicozidele, se înregistrează o menținere crescută a sensibilității atât pentru gentamicină, cât și pentru amikacină și tobramicină, sensibilitatea este între 86,5% (gentamicină) până la 91,3% (tobramicină), menținerea crescută a sensibilității se datorează pe de o parte concentrării și

eliminării renale a acestor medicamente, iar pe de altă parte, tratamentului limitat la copii cu aceste medicamente datorită efectelor toxice asupra rinichilor și a nervilor cranieni (perechea a VIII a).

O situație interesantă este în cazul cefalosporinelor, care nu au efecte toxice la copii și pot fi folosite chiar atunci când ei prezintă alergie la peniciline.

La cephalotin se înregistrează o sensibilitate scăzută și diferențe între cei doi ani: 31,8% în 2005 și 14,5% în 2006, această cefalosporină cu administrare parenterală este de primă generație și bacteria a dobândit factori de rezistență.

La cefoxitin (cefalosporină gen. 2) se înregistrează încă o sensibilitate crescută: 96,7% respectiv 89,9% .

Pentru cefalosporinele de generația 3 : cefotaximul la care s-a înregistrat scăderea sensibilității de la 57,6% la 10,1%, în schimb se înregistrează o sensibilitate mai mare la cefoperazonă și în special la ceftazidim 84,8% în 2005 la 81,2% în 2006.

La poliene (colistin) se înregistrează o sensibilitate foarte bună 93,9% respectiv 98,6%, fiind o alternativă de tratament injectabil pentru copii mici și pentru sugari.

La imipenem se constată o sensibilitate constant crescută 98,5% în cei doi ani, aceasta pentru că medicamentul a intrat în uz din anul 2000 și costul tratamentului este ridicat.

La chinolone și fluoroquinolone se constată o sensibilitate crescută, mai ales la fluoroquinolone (între 78,8 și 97,1%). La copii se recomandă cu precauții pentru că pot avea efecte adverse asupra articulațiilor. În acest studiu s-au înregistrat 4 cazuri în 2005 și 2 cazuri în 2006 de rezistență totală la chinolone și la fluoroquinolone.

Acest aspect al rezistenței totale la toate medicamentele din această grupă este un aspect interesant care face obiectul de studiu la nivel molecular al factorilor de rezistență, acum nu se cunosc prea multe date.

Din grupa sulfamidelor am testat comportamentul la trimetoprim-sulfametoxazol, este un chimioterapic care a fost folosit intensiv, ca medicație unică sau în asociere cu β -lactamine, costul tratamentului este convenabil, iar modul de administrare oral (sub formă de tablete sau siropuri) de aceea s-a constatat o scădere a sensibilității importantă, de la 31,9% în 2005 la 21,7% în 2006, situație care este oarecum inversată la adulți unde datorită renunțării în ultimii ani la acest medicament și din această cauză se constată o creștere a sensibilității.

A mai fost testată sensibilitatea și la cloramfenicol, cu toate că acest medicament nu este folosit în mod normal la copii din cauza efectului supresor asupra măduvei.

Astfel în 2005 sensibilitatea la cloramfenicol a fost de 78,8%, iar în 2006 a fost de 76,8%, o sensibilitate încă bună.

Fosfomicina, un antibiotic care acționează asupra peretelui bacterian, a fost descoperit de curând și de aceea este mai activ pe E. coli, 72,7% respectiv 79,1% în cei doi ani. Nu se recomandă acest antibiotic decât la copii mai mari de 5 ani.

Am sintetizat în tabelul nr. 4 situația testărilor la cele 20 de antibiotice și chimioterapice cu sensibilitățile, rezistențele dar și sensibilitățile intermediare pentru tulpinile testate în cei doi ani.

Din acest tabel se observă că sensibilitatea la substanțele antibacteriene, studiate, a scăzut, la unele mai mult la altele mai puțin. Chiar dacă acest studiu s-a desfășurat în acest scurt interval de numai doi ani, acest fapt reprezintă un semnal important de alarmă pentru folosirea judicioasă a tratamentului cu substanțe antibacteriene, numai în situațiile care se impun atât prin forma de infecție bacteriană cât și al dozei, ritmului și căii de administrare.

**Tabelul Nr. 4 Testarea sensibilității la antibiotice și chimioterapice a tulpinilor de E.coli
(66 tulpini urinare din 2005 și 69 tulpini urinare din 2006)**

Anul	%	Amx	Aug	Pip	Tzp	Caz	Cit	Cpz	Ctx	Cxt	Amk	Gen	Tab	Imp	Co	Nal	Cip	Nor	Cot	Chi	Fos
2005	S	24,3	28,8	12,1	75,7	84,8	31,8	54,5	57,6	96,7	90,9	86,4	86,4	98,5	93,9	78,8	86,4	86,4	31,9	78,8	72,7
	I	1,5	39,4	10,6	21,3	9,1	30,3	36,4	34,8	3,3	1,5	0	10,4	1,5	4,6	6,1	6,1	4,5	4,5	0	16,7
	R	72,2	31,8	77,3	3	6,1	37,9	9,1	7,6	0	7,6	13,6	3	0	1,5	15,1	7,5	9,1	63,6	21,2	10,6
2006	S	15,9	17,3	11,4	29	81,2	14,5	51,5	10,1	89,8	85,5	86,5	91,3	98,5	98,6	91,7	97,1	97,1	21,7	76,8	79,1
	I	0	62,3	8,6	63,8	10,1	50,7	40	85,5	8,7	13,1	3,5	4,4	1,5	0	2,5	0	0	2,9	1,5	15,9
	R	84,1	20,4	80	7,2	8,7	34,8	8,5	4,4	1,5	1,4	10	4,3	0	1,4	5,8	2,9	2,9	75,4	21,7	5

Legendă: S = sensibil; I = intermediar; R = rezistent

3.2 Testarea caracterului hemolitic

Pentru testarea caracterului hemolitic (prezența hemolizinei) am folosit două loturi:

- un lot de 54 de copii cu ITU internați în spital (au fost 55 de tulpini de *E. coli*, două tulpini au provenit de la același bolnav, care au făcut parte din colecția de tulpini) în anul 2005;

- un lot de 35 de copii sănătoși din creșa nr. 36 din Galați (tulpinile de *Escherichia coli* au făcut și ele parte din colecția de tulpini).

Am studiat fenotipul hemolitic pe geloză Columbia 5% hematii de oaie și prin PCR am identificat operonul *hly* de pe cromozomul bacterian. Expresia genei *hly* a fost de 100% . În tabelul nr. 5 sunt redată rezultatele privind prezența și frecvența acestui caracter .

Tabelul Nr. 5 Nr. (%) tulpini care au prezentat caracterul hemolitic (fenotipic și genotipic) din cele două loturi

Tulpini	Nr. (%) tulpini hemolitice fenotipic/genotipic(hly+)	Nr. (%) tulpini nehemolitice fenotipic/genotipic(hly-)	Nr.total tulpini
Lot de bolnavi	34 (61,8)/34(61,8)	21 (38,2)/21 (38,2)	55
Lot sănătoși	12 (34,3)/12(34,3)	23 (65,7)/23 (65,7)	35
Total	46 (51,2)/46(51,2)	44 (48,8)/44 (48,8)	90

După cum se observă numărul de tulpini care posedă capacitate hemolitică provenite de la pacienți este aproape dublă față de cele care reprezintă lotul de sănătoși.

Prevalența acestui caracter de hemoliză este în concordanță cu datele din literatura de specialitate.

3.3 Testarea factorilor de urovirulență

Au fost testate aceleași tulpini pentru care s-a analizat fenotipul hemolitic.

După cum am precizat în prima parte a studiului am testat prezența la tulpinile din colecția de *E. coli* a genelor codante pentru următorii factori de virulență: fimbriile P (*pap*), fimbriile S/F1C (*sfa/foc*), adezina afimbrială AFA (*afa*) și pentru toxinele: hemolizina (*hly*), și factorul citotoxic necrotizant 1 (*cnf*).

Prezența acestor gene a fost testată prin protocolul bazat pe tehnica PCR (reacția de polimerizare în lanț), varianta PCR multiplex pentru operonii *pap*, *sfa/foc*, *afa* și PCR individuale pentru *hly* și *cnf*.

Această analiză a fost realizată în laboratorul de Microbiologie Moleculară din I.N.C.D.M.I. "Cantacuzino".

Tehnica PCR

Reacțiile PCR au fost optimizate pentru fiecare genă în parte.

Amplificarea enzimatică a ADN genomic a fost realizată într-un volum final de 50 μ l, folosind:

- 10 μ l lizat bacterian (modul de obținere l-am descris pe larg în lucrare),
- 1,25 U/ μ l de ADN Taq polimerază (Roche Boehringer);
- 5 μ l tampon 10x, care conține $MgCl_2$ 1,5 mM;
- un amestec de 200 μ M din fiecare deoxinucleozid trifosfat (dATP, dCTP, dTTP, dGTP);
- câte 30 pmoli din fiecare primer.

S-a lucrat pe un termocycler tip MyCycler BioRad, care are opțiunea de folosire cu capacul încălzit, eliminându-se astfel necesitatea acoperirii amestecului de reacție cu ulei mineral, pentru a preveni evaporarea în timpul ciclurilor de PCR.

Programul de amplificare a constă din:

- etapa de denaturare inițială la 94⁰ C timp de 5 min, urmată de ;

- 25 cicluri cuprinzând:

- 1) denaturarea la 94⁰ C timp de 30 secunde,
- 2) aliniere la temperatura specifică fiecărei perechi de primeri,
- 3) elongație la 72⁰ C, timp de 1 min, cu prelungire de 2 secunde la fiecare ciclu.

Controlul prezenței produsului de amplificare s-a făcut prin electroforeza în gel de agaroză 1,5% în tampon TBE 0,5x (Tris-borat 0,089 M; EDTA 0,002 M) a 10 µl din produsul PCR.

Migrarea s-a făcut în tampon TBE 0,5x, la 80 V, timp de 1 h.

Evaluarea mărimii ampliconului s-a făcut prin comparare cu un marker de greutate moleculară de 100 pb (Gibco BRL), care s-a migrat concomitent cu probele.

După migrare, gelul a fost colorat într-o soluție de bromură de etidium (concentrație finală de 1 µg/ml) timp de 20 min și vizualizat prin fluorescență indusă de radiațiile UV, urmată de fotografiere cu sistem Polaroid.

În tabelul nr. 6 sunt prezentate secvențele perechilor de primeri corespunzători genelor codante pentru factorii de virulență analizați, dimensiunile ampliconilor exprimați în perechi de baze nucleotidice (pb), precum și temperatura lor de aliniere.

Tabel Nr. 6 Detalii privind reacțiile de amplificare enzimatică a genelor de virulență (secvență primeri, dimensiuni amplicon, temperatură de aliniere)

Factor de virulență	Gena țintă	Denumire primer	Secvență primer (5'→3')	Mărime amplicon (pb)	Temp. de aliniere(°C)	Referință
Fimbrii P	<i>pap C</i>	pap1	gACggCTgTACTgCTgggTgTggCg	328	65	Le Bouguénec C., 1992
		pap2	ATATCCTTTCTgCAgggATgCAAT A			
Fimbrii S/ F1C	<i>sfa/foc</i>	sfa/foc1	CTCCggAgAACTgggTgCATCTTA C	410	65	Le Bouguénec C., 1992
		sfa/foc2	CggAggAgTAATTACAAACCTggC A			
hemolizină	<i>hly</i>	hly1	AgATTCTTgggCATgTATCCT	556	55	Bingen E.,1998
		hly2	TTgCTTTgCAgACTgTAgtgT			
CNF	<i>cnf</i>	cnf1	TTATATAgTCgTCAAgATggA	693	50	Oswald E.
		cnf2	CACTAAgCTTTACAATATTgA			
Adezina AFA	<i>afa C</i>	afa1	CggCTTTTCTgCTgAACTggCaggC	672	65	Le Bouguénec C., 1993
		afa2	CCgTCAgCCCCCACggCAGACC			

Legendă: A = adenină, C = citozină, g = guanină, T = timină.

Factorii de virulență au fost identificați atât în tulpinile urinare de *E. coli* de la copiii cu ITU cât și în tulpinile comensale de *E. coli* de la copii sănătoși. În reacție au fost tulpini martori (+) pentru factorii de virulență: *E. coli* J 96 pentru adezinele fimbriale P, S/F1C, hemolizină și factorul citotoxic necrotizant; *E. coli* A 30 pentru adezina afimbrială AFA și martor negativ, tulpina de *E. coli* HB 101.

Analiza moleculară s-a realizat pentru o parte din tulpinile care au format "colecția de tulpini" potențial virulente a acestui studiu și anume 55 tulpini de *E. coli* care au fost recoltate de la 54 copii bolnavi (două tulpini au fost de la același bolnav). Acest lot a fost format din 35 fete și 19 băieți, cu vârste cuprinse între 3 săptămâni și 17 ani cu o medie de 5 ani și 7 luni.

Ei au fost împărțiți în patru grupe de vârstă; 0-1 an, 1-3 ani, 3-10 ani și 10-17 ani. Din punct de vedere al alimentației: 24 au fost alimentați natural, 26 au fost alimentați artificial, iar la 4 bolnavi, întrucât au fost abandonați nu s-a cunoscut felul alimentației.

Pe afecțiuni au fost diagnosticate următoarele afecțiuni: PNA (26), C (18), BA (9), PNC (1). În cadrul acestor afecțiuni 4 cazuri au avut malformații [două au fost cu malformații renale (unul cu bazinet dublu și un pacient cu ureter dublu) și două cu malformații genito-urinare(fimoză și un hipospadias)].

Lotului de copii sănătoși li s-au realizat coproculturi și s-au identificat *Escherichia coli*, după procedura expusă anterior. Aceste izolate au alcătuit colecția de tulpini intestinale, comensale, de *Escherichia coli*.

Acest lot a fost compus din 14 fete și 21 de băieți cu vârste cuprinse între 28 zile și 3 ani cu o medie de 1 an și 7 luni.

În privința alimentației 19 copii au fost alimentați natural și 16 artificial. În acest lot se observă o ușoară preferință pentru alimentația naturală, situație benefică pentru starea de sănătate a copilului.

În tabelul nr. 7 este prezentată prevalența genelor codante pentru factorii de virulență pentru tulpinile de *E. coli* aparținând celor două loturi.

Tabelul Nr. 7 Prevalența genelor codante pentru factorilor de virulență la tulpinile urinare și comensale de *E. coli*

Loturi/tulpini <i>E. coli</i>	Nr (%) tulpini PCR+ pentru				
	<i>pap</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>afa</i>	<i>hly</i>	<i>cnf</i>
Lot	29	25	4	31	19
bolnavi/55	(52,7)	(45,4)	(7,3)	(56,4)	(34,5)
Lot	11	4	3	6	4
sănătoși/35	(31,4)	(11,4)	(8,6)	(17,1)	(11,4)

După cum se observă în acest tabel, prevalența tulpinilor purtătoare de gene codante pentru fimbriile P (*pap*), fimbriile S/F1C (*sfa/foc*), adezina afimbrială AFA (*afa*) precum și pentru toxinele hemolizina (*hly*) și factorul citotoxic necrotizant (*cnf*) este mai mare în lotul de copii bolnavi față de lotul de copii sănătoși.

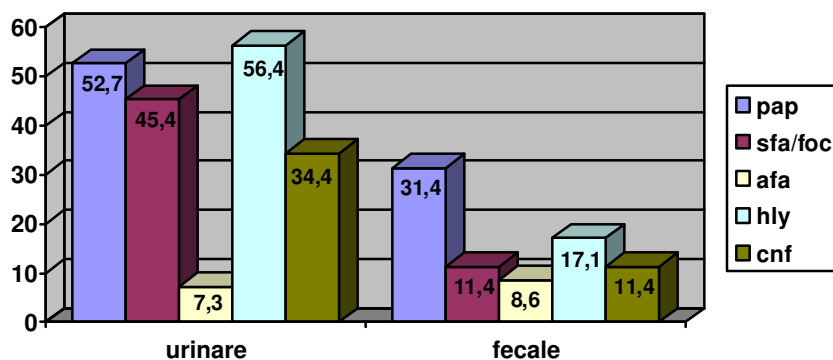
Prezența fimbriilor P și a toxinelor hemolizina și factorul citotoxic necrotizant este recunoscută în literatura de specialitate ca fiind asociată cu declanșarea de ITU înalte (pielonefrită), dar și ITU joase.

Prevalența mai crescută a acestor factori de virulență în lotul de bolnavi față de cel de subiecți sănătoși este în concordanță cu datele raportate anterior în literatura de specialitate.

De asemenea este cunoscut că tulpinile care conțin gena codantă pentru hemoliză (*hly*), conțin și operon pentru factor citotoxic necrotizant (*cnf*) în proporție de 60-70%, situație care crește patogenitatea tulpinii de *E.coli*.

În figura nr. 1 voi prezenta grafic prevalența factorilor de urovirulență pentru cele două loturi.

Figura nr. 1 Prevalența factorilor de virulență pentru cele 2 loturi



Profilul genotipului de urovirulență al tulpinilor urinare și fecale

Genotipul de urovirulență detectat la screeningul prin PCR al tulpinilor de proveniență urinară și intestinală, a evidențiat prezența în aceeași tulpină de E.coli a uneia sau a mai multor gene codante pentru un factor sau mai mulți factori de virulență.

Tulpinile urinare

Din acest studiu se observă că majoritatea tulpinilor urinare (cele mai multe sunt cele care au produs ITU înalte și în mai mică măsură decât cele care au dat ITU joase) posedă mai multe gene de virulență:

- 12 tulpini au patru gene de virulență (*pap+sfa/foc+hly+cnf*);
- 15 tulpini au trei gene de virulență (*pap+sfa/foc+hly* sau *sfa/foc+hly+cnf* sau *pap+hly+cnf*);
- 3 tulpini au două gene de virulență (*pap+hly*);
- 10 tulpini o genă de virulență (*afa* sau *pap* sau *hly*);
- 15 tulpini sunt lipsite de factori de virulență.

Tulpini fecale

În urma screeningului factorilor de virulență pentru tulpinile fecale (din coproculturile de la copii sănătoși) se observă că cele mai multe tulpini nu au factori de virulență sau îi au în număr foarte mic.

Situația generală se prezintă astfel:

- 20 tulpini nu au gene codante pentru factorii de virulență studiați;
- 10 tulpini au câte un factor de virulență (*hly* sau *pap* sau *afa*);
- 2 tulpini au câte trei factori de virulență (*pap+sfa/foc+hly* sau *pap+hly+cnf*);
- 3 tulpini au câte patru factori de virulență (*pap+sfa/foc+hly+cnf*).

Profilul genotipului de urovirulență este prezentat succint în tabelul nr. 8

Tabelul Nr. 8 Profilul genetic de urovirulență identificat la tulpinile de E. coli urinare și fecale

Nr. gene detectate în aceeași tulpină	Profilul de asociere a genelor identificate prin PCR (profilul genomic de urovirulență)	Tulpini de E. coli purtătoare ale genotipului izolate de la	
		Tulpini urinare (55)	Tulpini fecale (35)
1	<i>pap</i>	4	5
	<i>afa</i>	5	3
	<i>hly</i>	1	2
2	<i>pap+hly</i>	3	-
3	<i>pap+hly, cnf</i>	2	1
	<i>pap+sfa/foc+hly</i>	8	1
	<i>sfa/foc+hly+cnf</i>	5	-
4	<i>pap+sfa/foc+hly+cnf</i>	12	3
0	Fără gene codante pentru factori de virulență	15	20
Total		55	35

3.4 Grupurile filogenetice la *Escherichia coli*

În acest ultim capitol al cercetării personale am considerat că ar fi util să arăt apartenența tulpinilor urinare (provenite de la copii cu ITU) precum și tulpini comensale (intestinale) la grupurile filogenetice majore de *E. coli*.

La *Escherichia coli* diversitatea actuală a clonelor patogene pare a fi rezultatul captării constante, uneori în paralel, a diferiți factori de virulență.

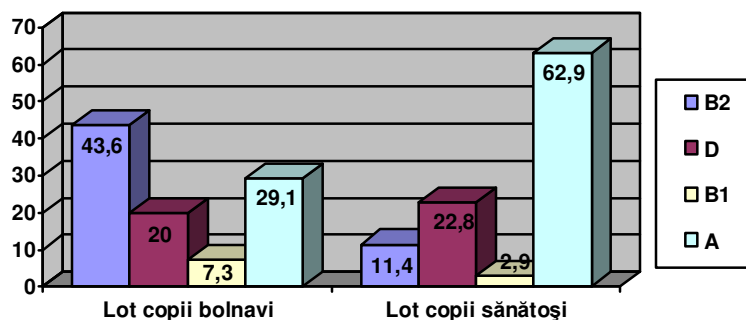
Acești factori de virulență sunt de obicei transportați pe plasmide, insule de patogenitate de pe cromozomi (PAI) sau fagi și se presupune că sunt intens schimbate între tulpinile bacteriene prin transfer pe orizontală.

Patru grupuri filogenetice: A, B1, B2 și D au fost descrise de Herzer et al. (1990), folosind electroforeza *multilocus* enzimatică cu cele 72 de tulpini ale colecției de referință de *E. coli* (ECOR). Această descoperire a fost confirmată ulterior de către Desjardins et al. (1995), prin compararea mai multor markeri genetici. Tehnica se bazează pe un triplex PCR care a folosit o combinație de două gene (*chu A* și *yjaA*) și un fragment de ADN cromozomial-*TspE4C2*. Rezultatele obținute au fost corelate cu cele obținute prin electroforeza *multilocus* enzimatică și prin ribotipie.

Determinarea grupurilor filogenetice în colecția acestui studiu s-a realizat prin tehnica PCR triplex în laboratorul de Microbiologie Moleculară din Institutul "Cantacuzino" București.

În figura nr. 2 voi expune prevalența grupurilor filogenetice constatate la cele două loturi de tulpini de *E. coli* analizate.

Figura nr. 2 Prevalența grupurilor filogenetice pentru cele două loturi



După cum se observă, prevalența grupei B2 și în mai mică măsură D, recunoscute ca generatoare de ExPEC, în cele două loturi (bolnavi și sănătoși) au fost de 43,6%, respectiv 11,4% și 20% respectiv 11,4%; prevalența în grupurilor B1 și A în cele două loturi au fost de: 7,3% respectiv 2,9% și 29,1% respectiv 62,9%.

Concluzionând, grupurile filogenetice B2 și D care grupează în special la tulpinile de E. coli ExPEC se găsesc în procentaj mare în lotul de bolnavi, iar grupurile filogenetice A și B1 din care derivă în principal tulpinile comensale (intestinale) de E. coli, au fost identificate mai ales în lotul de copii sănătoși.

Rezultatele pe care le-am obținut în acest studiu sunt în concordanță cu cele din literatura de specialitate. În tabelul nr. 9 este exemplificată legătura dintre: tipurile ITU și grupurile filogenetice în lotul de copii bolnavi.

După cum se observă, ponderea grupurilor filogenetice care includ tulpinile de E. coli cu potențial patogen extraintestinal, ExPEC, (B2 și D) este crescută în formele de manifestare a ITU, pe când grupurile filogenetice, recunoscute ca sursă de tulpini de E. coli comensale (A și B1) au o pondere mică în formele de manifestare a ITU.

Tabel Nr. 9 Distribuția tipurilor de ITU și a grupurilor filogenetice

Tipuri de ITU	Grupurile filogenetice				
	B2	D	A	B1	Total
PNA	18	6	2	-	26
C	6	5	6	1	18
PNC	1	-	-	-	1
BA	4	1	4	1	10
Total	29	12	12	2	55

Legendă:

PNA = pielonefrită acută;

C = cistită;

BA = bacteriurie asimptomatică;

PNC = pielonefrită cronică.

În tabelul nr. 10 este exemplificată corespondența dintre grupurile filogenetice și numărul factorilor de virulență corespunzătoare tulpinilor urinare de E. coli din lotul de copii bolnavi.

Tabel Nr. 10 Corespondența dintre grupurile filogenetice și nr. factorilor de virulență ale tulpinilor de E. coli urinare

Nr. FV	Grupuri filogenetice				
	B2	D	A	B1	Total
4	12	4	-	-	16
3	11	3	-	1	15
2	1	-	1	-	2
1	-	3	7	-	10
0	-	1	8	3	12
Total	24	11	16	4	55

Legendă: FV = factori de virulență (*pap*; *sfa/foc*; *afa*; *hly*; *cnf*)

În tabelul nr. 11 este arătată această corespondență la tulpinile de E. coli intestinale, din lotul sănătos.

Se observă predominanța grupurilor filogenetice intestinale de E. coli fără factori de virulență testați sau cu un număr foarte mic de factori de virulență, în concordanță cu proveniența acestor tulpini de E. coli (din coproculturile lotului de copii sănătoși).

Tabelul Nr. 11 Corespondența dintre grupurile filogenetice și numărul de factori de virulență din tulpinile de E. coli intestinale.

Nr. FV	Grupe filogenetice				
	B2	D	A	B1	Total
4	3	1	-	-	4
3	1	1	-	-	2
2	-	-	-	-	0
1	-	4	5	1	10
0	-	2	17	-	19
Total	4	8	22	1	35

Legendă: FV = factori de virulență (*pap*; *sfa/foc*; *afa*; *hly*; *cnf*)

Rezultatele sunt concordante cu studiile internaționale realizate pe tulpini de *Escherichia coli* de la copii bolnavi și sănătoși.

Prezența și frecvența factorilor de virulență studiați și legătura cu aceste grupuri filogenetice a fost, arătată în tabele 10 și 11.

Dintre tulpinile de *Escherichia coli* urinare au fost 24 tulpini cu 4-2 factori de virulență care au aparținut grupului B2, 10 tulpini care au avut între 4 și 1 factori de virulență au fost în grupul D; în grupul A au fost 8 tulpini cu 1-2 factori de virulență, iar 8 tulpini nu au prezentat nici unul din factorii de virulență studiați; grupul B1 a prezentat o tulpină cu un factor de virulență și 4 tulpini nu a avut nici un factor.

În lotul de tulpini intestinale, patru tulpini au fost încadrate în grupul B2 cu 3-4 factori de virulență, șase tulpini în grupul D cu 4-1 factori de virulență, iar

majoritatea tulpinilor, 22, au fost încadrate în grupul filogenetic A cu un factor de virulență 5 tulpini și fără nici un factor de virulență 17 tulpini, iar în grupul B1 a fost o tulpină cu un factor de virulență.

Observând aceste rezultate se poate afirma că deși evoluția patogenității la *E. coli* este în mare parte rezultatul apariției de factori de virulență în populație, reținerea și exprimarea acestor factori este rezultatul unei interacțiuni între fondul genetic bacterian și genele nou-sosite.

4. CONCLUZII

Acest studiu a fost întreprins din dorința de a se realiza o analiză epidemiologică a sensibilității la antibiotice pentru tulpinile de *Escherichia coli* din infecțiile urinare (care se consideră a fi cea mai importantă infecție în copilărie) precum și o evaluare a circulației factorilor de virulență care configurează patotipul uropatogen tulpinilor de *Escherichia coli*, și a grupurilor filogenetice și compararea cu datele din literatura internațională.

Consider că studiul și-a atins scopul și cel puțin în județul Galați avem aceste date pentru infecțiile de tract urinar la copii.

Pe baza datelor expuse în acest studiu se pot trage următoarele concluzii:

1. *Escherichia coli* rămâne unul din principalii agenți etiologici pentru ITU la copii, cu o prevalență de 80 % din totalul ITU.

2. Sensibilitatea la antibiotice, chiar dacă a fost analizată numai pe doi ani, a permis înregistrarea unor ușoare scăderi pentru unele din antibiotice (β -lactamine, simple sau în asociere cu inhibitori de β -lactamază); această situație se datorează probabil unei utilizări incorecte a acestor medicamente care a condus astfel la dobândirea de către *Escherichia coli* a caracterelor de rezistență; o scădere a sensibilității mai importantă a înregistrat combinația trimetoprim-sulfametoxazol.

3. Totuși rămân medicamente active asupra tulpinilor urinare de *Escherichia coli* cum ar fi: colistinul, aminoglicozidele, cefalosporinele (mai ales generația 3), fosfomicina, imipenemul.

4. Oportunitatea studierii factorilor de virulență a tulpinilor de *Escherichia coli* care au provocat ITU, prin metode moleculare, la copiii din județul Galați, a permis abordarea acestui studiu la nivel european.

5. Din totalul de tulpini de *Escherichia coli* implicate în ITU, 74,5% (41 din 55 de tulpini studiate) poartă gene unice sau asocieri de gene care codifică unul sau mai mulți din cei cinci factori de virulență țintiți.

Prezența acestor factori de virulență permite încadrarea acestor tulpini de *Escherichia coli* în patotipul ExPEC.

Consider că acest studiu pe tulpini care au provenit de la copii bolnavi este unic în țara noastră și comparându-ne cu datele din literatura internațională pot afirma că situația se dovedește asemănătoare.

6. Prevalența factorilor de virulență studiați în lotul de copii sănătoși a fost de 42,8%, inferioară celei înregistrate pentru tulpinile urinare.

7. Detectarea unei ITU persistente sau recurente cu tulpini urovirulente la un copil obligă la căutarea unor eventuale malformații ale căilor urinare în vederea corectării lor chirurgicale la timp.

8. Studiarea grupurilor filogenetice a confirmat concordanța acestui studiu cu datele găsite în literatura internațională și anume: prevalența semnificativ crescută a grupurilor filogenetice care grupează tulpinile de *Escherichia coli* ExPEC(B2 și D) în lotul de copii cu ITU, respectiv 63,6%, față de 34,2% în lotul de copii sănătoși.

Situația grupurilor filogenetice care sunt recunoscute ca sursă de tulpini nepatogene de *Escherichia coli* (A și B1) a fost aproape inversată: respectiv 36,3 % pentru lotul de copii bolnavi și 65,7 % pentru lotul de copii sănătoși.

Aceste date sunt și ele concordante cu cele din literatura internațională.

Partea experimentală a fost realizată în Spitalul de Urgență pentru Copii "Sf. Ioan" Galați și în Laboratorul de Microbiologie Moleculară din I.N.C.D.M.I "Cantacuzino" București care mi-a pus la dispoziție posibilitățile materiale și sprijinul moral pentru acest studiu.

-//-