

CARACTERIZAREA TULPINILOR DE *ENTEROCOCCUS FAECIUM* PRIN STUDIUL POLIMORFISMULUI GENETIC AL LOCILOR VNTR

ENTEROCOCCUS FAECIUM STRAINS CHARACTERIZATION THROUGH POLYMORPHISM STUDY OF VNTR LOCI

F. Pastramă¹, Virgilia Popa¹, C. Stoica¹, Irina Codită², Vasilica Ungureanu², Monica Ghiță², N. Catană³, Daniela Botuș¹, C. Belteghi¹, G. Răpunțean⁴

¹Societatea Națională Institutul PASTEUR S.A.; ²Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie CANTACUZINO; ³Facultatea de Medicina Veterinară Timișoara; ⁴Facultatea de Medicină Veterinară Cluj-Napoca

Cuvinte cheie: SSR, MLVA, *Enterococcus faecium*, PCR, VNTR

Key words: SSR, MLVA, *Enterococcus faecium*, PCR, VNTR

Rezumat

Enterococii sunt comensali ai tubului gastro-intestinal și ai tractului genital femel la om și unele mamifere și păsări, și una din cauzele semnificative ale infecțiilor nosocomiale, în special la pacienții imuno-compromiși (6). Amprentarea genetică (DNA fingerprinting) este un instrument de identificare, trasare și prevenire a diseminării agenților infecțioși. Motivele repetitive cu secvență scurtă (SSR) sunt cunoscute ca suferind variații frecvente ale numărului de unități repetitive. MLVA (multiple locus variable number tandem repeats analysis), este o variantă de amprentare genetică, în studiile epidemiologice privind *Enterococcus faecium* patogen. Studiul nostru a inclus tulpini de *Enterococcus faecium* de colecție sau izolate din cazuri clinice și din mediu (2003–2008). Toate tulpinile de *Enterococcus faecium* analizate au fost sensibile la vancomicină cu excepția BM4147, și rezistente la oxacilină. Tulpinile izolate din probe recoltate de la păsări au prezentat un profil de rezistență mai restrâns decât cele de la om. Prin amplificările PCR au fost analizate 33 de tulpini de *Enterococcus faecium*. Au fost obținute 27 MT (profile VNTR): 6 în cazul tulpinilor izolate de la păsări, 15 în cazul tulpinilor izolate de la om, 4 în cazul tulpinilor de colecție și 2 în cazul tulpinilor izolate din probe de apă. Nu s-au înregistrat profile identice între tulpinile izolate de la om și cele izolate de la animale. În cazul tulpinilor izolate din cazuri clinice, dar și în cadrul celor izolate de la găini, s-au înregistrat genotipuri circulante, care pot fi considerate epidemice. Tulpinile utilizate ca probiotice s-au dovedit diferite de cele circulante la păsări. La înscrierea on-line a profilelor MLVA codificate, toate s-au dovedit diferite față de cele existente în baza de date UMC Utrecht. Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu susțin utilitatea pe care analiza polimorfismului VNTR, considerat ca marker genetic, o are în investigațiile epidemiologice.

Abstract

Enterococci are commensally bacteria of the gastrointestinal and female genital tract in humans and some mammals and birds, and one of the significant causes of hospital-acquired infections, especially in immuno-compromised patients. Genetic fingerprinting (DNA fingerprinting) is a tool for identifying, marking and prevention of infectious agents dissemination. SSR (short sequence repeat) are known to suffer frequent variations in the number of repetitive units. MLVA (multiple locus variable number tandem repeats analysis) is a variant of genetic fingerprinting, in epidemiological studies on the pathogenetic *Enterococcus faecium*. Our study included laboratory *Enterococcus faecium* strains or isolated from clinical cases or from the environment (2003-2008). All analyzed strains of *Enterococcus faecium* were sensitive to vancomycin, except BM4147, and resistant to oxacilin. Strains isolated from the birds' samples have shown a smaller resistance profile than those of human origin. 33 *Enterococcus faecium* strains were analyzed by PCR amplification. 27 MT (VNTR profiles) were obtained: six in the case of the strains isolated from birds, 15 in the case of the strains isolated from humans, 4 in the case of the collection strains and 2 in the case of the strains isolated from water samples. Among the strains isolated from humans and those isolated from animals, identical profiles were not recorded. Within the strains isolated from clinical cases, and those isolated from birds, circulating genotypes were noted, which can be considered as epidemical. The strains used as probiotics proved to be different from those circulating in birds. All MLVA profiles codes compared with those published on line in the UMC Utrecht database proved to be different. Results obtained in this study support the usefulness of the polymorphic VNTR analysis, as genetic marker, in epidemiological investigations.

Enterococii sunt comensali ai tubului gastro-intestinal și ai tractului genital femel la om și unele mamifere și păsări, dar în același timp reprezintă al treilea patogen cel mai frecvent izolat din infecțiile septicemice și una din cauzele semnificative ale infecțiilor nosocomiale, în special la pacienți imuno-compromiși [7].

Problema infecțiilor nosocomiale enterococice este dată în primul rând de rezistența multiplă la antibiotice. Vancomicina reprezintă de multe ori ultimul agent terapeutic disponibil în cazul

enterococilor multiplu rezistenți, iar creșterea rapidă a rezistenței la vancomicină indică faptul că infecțiile enterococice vor reprezenta o provocare terapeutică din ce în ce mai mare. Pacienții cu bacteriemie enterococală prezintă risc dublu de a muri, în condițiile infecției cu un izolat bacterian rezistent la vancomicină. Există numeroase date de referitoare la multipla rezistență la antibiotice a *E. faecalis*

și *E. faecium*. Rezistența la ampicilină și vancomicină este relativ restrânsă în cazul *E. faecalis* (mai puțin de 2 % dintre izolatele testate), în schimb foarte răspândită în cazul izolatelor de *E. faecium* (83% pentru ampicilină, 52% pentru vancomicină) [1].

Rezistența la antibiotice luată ca atare nu explică totuși persistența și universalitatea enterococilor în infecțiile nosocomiale; una dintre explicații ar putea fi abundența acestora în medii în care alte bacterii nu ar putea să crească, în intestinul animalelor și oamenilor, în sol și apele de suprafață.

Tulpinile de enterococi de la animale pot coloniza intestinul uman și au fost izolate de la pacienți spitalizați cu infecții enterococice severe [4, 6].

Amprentarea genetică (DNA fingerprinting) a atras un interes considerabil ca instrument de identificare, trasare și prevenire a diseminării agenților infecțioși. Diferite metode au fost dezvoltate pentru tipizarea bacteriilor patogene, metode care diferă prin puterea de discriminare, reproductibilitate și ușurință de interpretare. În ultimii ani o metodă care se bazează pe informația furnizată de secvențierea întregului genom al speciilor bacteriene a câștigat teren.

Motivele repetitive cu secvență scurtă (Short Sequence Repeat = SSR) sunt cunoscute ca suferind variații frecvente ale numărului de unități repetitive prin intermediul mecanismelor celulare active în timpul replicării cromozomale [2, 3, 8, 9, 10].

O clasă de SSR (Short Sequence Repeat = Motive Repetitive cu Secvență Scurtă), denumită număr variabil de repetiții în tandem (VNTR = Variable Number Tandem Repeats) s-a dovedit a fi cea mai adecvată ca țintă pentru studiul polimorfismului genetic, MLVA (Multiple Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis), ca variantă de amprentare genetică, în studiile epidemiologice privind *Enterococcus faecium* patogen. MLVA este axată pe 6 loci VNTR, specifici, ale căror secvențe sunt cunoscute, nu anonime, așa cum este în cazul benzilor obținute la tipizarea prin PFGE sau RAPD, cu produși PCR estimați la 416-1012bp, ceea ce îi face adecvați pentru discriminare prin gel-electroforeză.

În scopul identificării, trasării și prevenirii diseminării *Enterococcus faecium* patogen, în cadrul rețelei PatGenNet a fost adoptată metodologia de tipizare prin VNTR [5].

MATERIALE ȘI METODE

Tulpinile sălbatice de *Enterococcus faecium* provin din colecții bacteriene sau din izolările realizate de laboratoarele incluse în **rețeaua PatGenNet**, din probe prelevate din mediu spitalicesc (cazuri clinice, hemoculturi, spută) și mediu ambiant; originea acestora fiind redată în tabelul 3.

Tulpina BM4147 VanA^r (furnizată de Dr. Guido Werner, Robert Koch Institute, Germania) a fost utilizată ca standard pentru amplificările VNTR.

Izolarea tulpinilor. A fost realizată prin însămânțări primare pe mediu BHI cu NaCl 6.5‰, geloză simplă sau Columbia cu sânge de oaie 7-10% (I.Pasteur / I.Cantacuzino / Oxoid), geloza BBL ori Difco m-Enterococcus Agar (Becton Dickinson) sau geloza BEA (Bilă-Esculină-Azidă) (BioRad), urmate apoi de dispersii pe geloză UriSelect 4 (BioRad), toate incubate la 37°C, în aerobioză.

Identificarea biochimică. A fost realizată prin teste API 20 Strep sau API Rapid ID32 Strep (BioMerieux), cu test suplimentar pe geloza Columbia cu telurit de potasiu (0,04%), iar profilul de rezistență la antibiotice / chimioterapice a fost stabilit conform metodologiilor adoptate în laboratoarele PatGenNet (CLSI/SFM/EARSS).

Crioconservarea tulpinilor. A fost realizată la -80°C din culturi de 18 ore în mediu BHI în amestec cu 20% glicerol (Sigma)

Amplificările PCR. Au fost realizate pe ADN brut, obținut prin liză termică și enzimatică, sau prin suspendarea coloniilor bacteriene direct în amestecul de amplificare. Protocolul pentru obținerea ADN brut prin liză termică și enzimatică, cu mici modificări față de cel publicat de către UMC Utrecht, a fost:

- 1,5ml cultură în mediu lichid centrifugată la 17310g, la 4°C, timp de 10 min.;
- depozit reluat în 200 μl tampon Tris-EDTA pH 8.0, și 50 μl lizozim, 50 mg/ml;
- incubare 15 min. la 37°C; adăugare de 30 μl soluție SDS 10% și 20μl proteinaza K, 20 mg/ml;
- incubare 1h la 65°C; adăugare 100 μl de soluție de neutralizare (Promega A713C),
- centrifugare la 17310g, 4°C, 10'; precipitarea supernatantului cu alcool etilic absolut la -80°C, 1h; spălare depozit cu alcool etilic absolut;
- rehidratarea depozitului în 100 μl apă ultrapură sau în funcție de cantitatea de depozit; stocare la -20°C; 1μl din preparat a fost utilizat în reacția de amplificare.

Celălalt protocol de obținere a eșantioanelor de ADN brut s-a realizat prin transferul unei colonii de pe mediul solid direct în tubul de amplificare PCR, în care au fost prezenți toți reagenții necesari pentru reacție; amestecul a fost tratat termic 15 min. la 4°C (pe gheață), după care a urmat programul de amplificare fig. 1, 2).



Figura 9. *Enterococcus faecium*. Pregătirea reacțiilor de amplificare VNTR.



Figura 10. *Enterococcus faecium*. Gel - electroforeza TBE1x post -amplificare VNTR.

Secvența amorselor utilizate pentru tipizarea VNTR, caracteristicile locilor, talia estimată a ampliconilor și concentrația gelurilor de agaroză indicată pentru controlul post amplificare sunt prezentate în tabelul 1, așa cum au fost publicate de UMC Utrecht [11].

Tabel 1.

Caracteristicile VNTR și amorsele specifice
(după Top *et al.* 2004)

Denumire locus	Lungimea repetiției (bp)	Număr repetiții	Număr de alele	% Conservare	Secvența amorsei	Program PCR	Talia estimată (bp)	Gel agaroză%
VNTR-1	123	0-8	8	95	F: CTGTGATTTGGAGTTAGATGG R: CATTGTCCAGTAGAATTAGATTTG	30 cicluri 52C	250-1012	2
VNTR-2	279	1-14	13	96	F: GATGCTTATTTCCACTGCTTGTG R: GTTTTACCCTCTCTTTTAAGGTCAATG	TD 70-60	724-4351	1
VNTR-7	121	1-7	7	98	F: CTATCAGTTTCAGCTATTCCATC R: CTGGTACGAATCAAATCAAGTG	TD 65-55	416-1021	2
VNTR-8	121	1-7	7	96	F: GGGGAGTGGCAAAAATAGTGTG R: CAGATCATCAACTATCAACCGCTG	TD 65-55	237-963	2
VNTR-9	121	1-3	3	93	F: CTGCATCTAATAACAAGGCCATG R: ACATTCCGATTACGCGAAATAAG	TD 65-55	205-447	2
VNTR-10	121	0-3	4	96	F: CCTACAGAAAATCCAGACGG R: TTTTTCCATCCTCT TGAATTG	TD 65-55	174-474	2

În tabelul 2 sunt prezentate programele de amplificare așa cum au fost validate în laboratorul de biologie moleculară din Institutul Pasteur, pe amplificatorul PE GeneAmp 9600 PCR System (Applied Biosystem)

concentrația amorselor și mixurile enzimice comerciale utilizate (PuRe Taq Ready to Go PCR beads, GE Healthcare 27-9557-01). Exemple de ampliconi obținuți pentru fiecare VNTR sunt redate în figurile 1-6.

Tabel 2.

Enterococcus faecium Programe de amplificare pentru tipizare VNTR

Nr. crt.	Gena	Program	Volum reacție	Concentrația amorselor și tipul de ADN polimerază
1.	VNTR 7 VNTR 8 VNTR 9 VNTR 10	95°C, 15', 1x; 94°C, 30", TD60°C – 50°C, 30", 72°C, 1' – 10x; 94°C, 1.5'+50°C, 1.5'+72°C, 5', 30x; 72°C, 10', 1x; 4°C, fe PE GeneAmp 9600 PCR System		
2.	VNTR 1	95°C, 15', 1x; 94°C, 1'+52°C, 1'+72°C, 1'-30x; 72°C, 10', 1x; 4°C, fe PE GeneAmp 9600 PCR System	25 µl	50 pmole fiecare (Generi Biotech), PuRe Taq Ready to Go PCR beads (GE Healthcare 27-9557-01)
3.	VNTR 2	95°C, 15', 1x; 94°C, 30"+65°C, 30"+72°C, 4'-10x; 94°C, 30", TD65°C– 55°C, 30", 72°C, 1' – 10x; 94°C, 1.5'+55°C, 2'+72°C, 5'-30x; 72°C, 10', 1x; 4°C, fe PE GeneAmp 9600 PCR System		

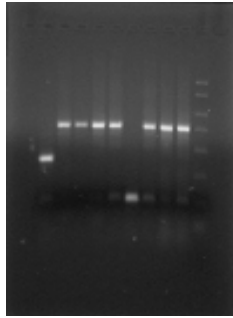


Figura 1. *Enterococcus faecium*

Profil VNTR 1. Gel agaroză 2%, TBE 1x. Godeu 1: 105/2006; godeu 2: 106/2006; godeu 3: 113/2006; godeu 4: 129/2006; godeu 5: 156/2006; godeu 6: 176/2003; godeu 7: 40/2007; godeu 8: VL43/2007; godeu 9: VL43 (beads RAPD); godeu 10: PCR Marker (Sigma)

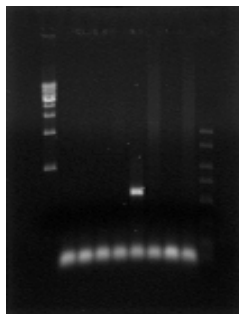


Figura 2. *Enterococcus faecium*

Profil VNTR 2. Gel electroforeză TBE 1x. Godeu 1: 1kbDNA Ladder (Promega), godeu 2: 105; godeu 3: 106 godeu 4: 113; godeu 5: 129; godeu 6: 156; godeu 7: 176; godeu 8: 40; godeu 9: VL43; godeu 10: PCR Marker (Sigma).

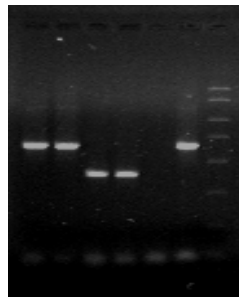


Figura 3. *Enterococcus faecium*

Profil VNTR 7. Gel agaroză 2%, TBE 1x. Godeu 1: 160/2006 (Inst. Cantacuzino); godeu 2: 916/2007 (Inst. Cantacuzino); godeu 3: 805/2007; godeu 4: 685/2006; godeu 5: EP05/2007 (Inst. Ig. Publică); godeu 6: BM4147; godeu 7: PCR Marker (Sigma)

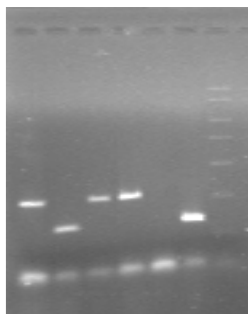


Figura 4. *Enterococcus faecium*

Profil VNTR 8. Gel agaroză 2%, TBE 1x. Godeu 1: G 2-2 (Timisoara); godeu 2: G 3-2 (Timisoara); godeu 3: G 5-2 (Timisoara); godeu 4: G 9-1 (Timisoara); godeu 5: G 10-2 (Timisoara); godeu 6: BM4147; godeu 7: PCR Marker (Sigma)

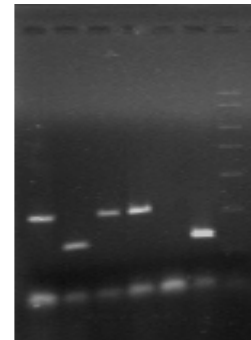


Figura 5. *Enterococcus faecium*

Profil VNTR 9. Gel agaroză 2%, TBE 1x. Godeu 1: 160/2006 (Inst. Cantacuzino); godeu 2: 916/2007 (Inst. Cantacuzino); godeu 3: 805/2007; godeu 4: 685/2006; godeu 5: EP05/2007 (Inst. Ig. Publică); godeu 6: BM4147; godeu 7: PCR Marker (Sigma)

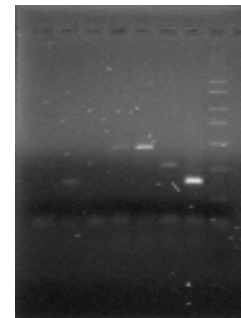


Figura 6. *Enterococcus faecium*

Profil VNTR 10. Gel agaroză 2%, TBE 1x. Godeu1: G 3-3/2007 (Cluj); godeu 2: G 4-1/2007 (Cluj); godeu 3: G 9-2 (Cluj); godeu 4: 19/2006 (Inst. Ig. Publică); godeu 5: 283/2007 (Inst. Ig. Publică); godeu 6: 284/2007 (Inst. Ig. Publică); godeu 7: BM4147; godeu 8: PCR Marker (Sigma)

Specificitatea amorselor / reacțiilor de amplificare a fost controlată pe tulpini de *Enterococcus faecalis*, in aceleași condiții de amplificare ca cele pentru *E. faecium*.

Digitalizarea imaginilor post - electroforeză in gel de agaroză TBE, colorat cu bromură de etidium 0.2%, a fost realizată prin intermediul Easy RH si a programului logic image 2WinPC v.5.0.1.- Herolab GmbH). (fig. 7).



Figura 7. *Enterococcus faecium*

Prelucrarea digitală a imaginilor gel-electroforezelor profilului VNTR prin programul logic UnScanIt (Silk Sci.Co.1998) pentru stabilirea taliei ampliconilor obținuți.

Talia ampliconilor a fost stabilită față de marmorul de electroforeză (100bp DNA Ladder, Promega G2101, sau PCR Marker, Sigma P9577) prin intermediul programului logic Un Scan It v.5.1 (SilkSci.Co)

Codificarea profilelor VNTR (profile MLVA sau tipuri MLVA sau MT), prin prelucrarea amplificărilor pentru toți locii VNTR la fiecare tulpină analizată, s-a realizat manual, prin compararea datelor obținute cu datele publicate de UMC Utrecht; numărul este dat de numărul de repetiții dat de talia ampliconului.

Inregistrarea și compararea MT din baza de date s-a realizat on-line (fig.8).

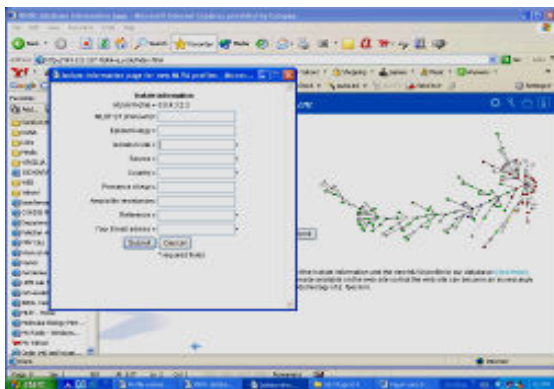


Figura 8. *Enterococcus faecium*.
Analiza on-line a profilelor VNTR obținute.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Toate tulpinile *Enterococcus faecium* analizate au fost sensibile la vancomicină, cu excepția BM4147, și rezistente la oxacilină.

Tulpinile rezultate de la păsările din fermele din Timiș (G2-2 și G3-2 au rezistență și la clindamicină) au rezistență la mai puține antibiotice decât cele din fermele din Cluj (G3-3 și G4-1 au rezistență și la gentamicină, cloranfenicol și eritromicină, respectiv la kanamicină, și rezistență comună la teicoplanină și norfloxacină), iar profilul de rezistență al acestor tulpini este mai restrâns decât cel al a tulpinilor de *E. faecium* de la om.

Rezistența multiplă la tulpinile de la om se regăsește în special pentru norfloxacină, ampicilină, kanamicină, teicoplanină, eritromicină și rifampicină.

Profilul de rezistență al tulpinilor din apă este intermediar față de cel de la păsări și om. La testele API 20 Strep, tulpinile au înregistrat ID 5157510, 7157510, 7157511,

7357510, 7357511, 7357530, 7357711, 5757511, 7307510, 7357510, 7177510, 7357410, 7317510 și 7117510, cu procente de identificare situate între 87,5 și 99,3.

La controlul privind specificitatea amorselor/reacțiilor de amplificare realizat pe tulpini de *Enterococcus faecalis*, rezultatele au fost negative, ceea ce a demonstrat specificitatea acestora pentru *E. faecium* (date nepublicate).

Prin amplificările PCR au fost analizate 33 de tulpini de *Enterococcus faecium*: 7 izolate de la animale, 20 de la om, 2 din apă; de la animale, din probe de materii fecale de la ferme din județele Timiș (5) și Cluj (2), iar de la om, din probe de hemocultură (9), sânge (5), secreție plagă (3), lichid peritoneal (2) și spută (1).

În studiu s-au folosit 4 tulpini de colecție (VL43, GM8, ATCC5667 și BM4147).

Au fost obținute 27 profile VNTR în cazul celor 33 tulpini. Cele 6 profile VNTR de la păsări, 15 de la om, 4 din colecția de tulpini și 2 din apă sunt diferite.

Profiluri VNTR identice au fost înregistrate după cum urmează: la păsări, profilul 404211 s-a regăsit la 2 tulpini (G3-2 și G9-1), iar la om profilul 563323 s-a regăsit la 2 tulpini (117 și 316), și profilul 504001 s-a regăsit la 5 tulpini (106, 113, 129, 156 și 40).

Protocoalele de lucru s-au validat prin obținerea profilului VNTR așteptat în cazul tulpinii BM4147 (523211).

Ampliconii obținuți au fost de talii diferite față de datele estimate, cu foarte mici excepții (tulpinile 160, 916, 805 și 685 au avut profil incert în cazul VNTR1).

În urma analizelor pe VNTR1 s-au obținut ampliconi cu dimensiuni de 397pb, 520pb, 643pb, 766pb, 889pb și 1012pb, aparținând codurilor 2, 3, 4, 5, 6, respectiv 7; ampliconul de 274pb nu a fost găsit, cel de 766pb s-a regăsit la cele mai multe tulpini, iar lipsa ampliconilor a fost constatată la 2 tulpini de la om (176 și 43).

Tulpinile de la om (160 și 916) prezintă câte 3 ampliconi identici, iar 805 și 685 au câte 2 ampliconi diferiți; la cele 4 tulpini s-a observat prezența unor ampliconi identici nespecifici cu dimensiuni mari.

Pentru VNTR2 s-a observat prezența doar a ampliconului de 1003pb la tulpina BM4147 și cel de 2119pb la tulpinile 117,

197 și 316, aparținând codurilor 2, respectiv 6.

În cazul **VNTR7** s-au obținut ampliconi cu dimensiunile de 416pb, 658pb și 779pb, aparținând codurilor 1, 3, respectiv 4; ampliconul de 537pb nu a fost găsit, cel de 779pb s-a regăsit la mai multe tulpini, iar lipsa ampliconilor a fost constatată la 5 tulpini.

În cazul **VNTR8** s-au obținut ampliconi cu dimensiunile de 237pb, 358pb și 479pb, aparținând codurilor 1, 2, respectiv 3; ceilalți 4 ampliconi cu dimensiuni mai mari nu au fost găsiți, iar lipsa ampliconilor a fost constatată la cele mai multe tulpini.

În cazul **VNTR9** s-au obținut ampliconi cu dimensiunile de 205pb, 326pb și 447pb aparținând codurilor 1, 2, respectiv 3; ampliconul de 568pb nu a fost găsit, iar lipsa ampliconilor a fost constatată la multe tulpini.

În cazul **VNTR10** s-au obținut ampliconi cu dimensiunile de 234pb, 354pb 474pb și 594pb aparținând codurilor 1, 2, 3, respectiv 4; ampliconii de 234pb și 447pb s-au regăsit la cele mai multe tulpini, iar lipsa ampliconilor a fost constatată la 6 tulpini.

Tulpinile de *Enterococcus faecium* rezultate din probele de la animale au fost izolate din materiile fecale ale efectivelor de găini de la fermele din județele Timiș (G2-2, G3-2, G5-2, G9-1 și G10-2) și Cluj (G3-3 și G4-1).

S-au găsit 4 profile VNTR (504201, 404211, 504011 și 504210) pentru materiile fecale de la găini (Timiș); profiul 404211 obținut este identic pentru 2 tulpini (G3-2 și G9-1). Ampliconii rezultați pentru VNTR 1, 8, 9 și 10 sunt diferiți, pentru VNTR7 sunt identici, iar în cazul VNTR2 nu s-a observat niciun amplicon la cele 5 tulpini.

În cazul materiilor fecale de la găini (Cluj), s-au înregistrat 2 profile VNTR (402012 și 502001).

Ampliconii rezultați pentru VNTR 1, 9 și 10 sunt diferiți, pentru VNTR7 sunt identici, iar în cazul VNTR 2 și 8 nu s-a observat niciun amplicon la cele 2 tulpini.

Ampliconii rezultați în cazul tulpinilor de la Timiș au fost diferiți față de cei din tulpinile de la Cluj în ceea ce privește VNTR 1, 7, 8, 9 și 10, și lipsesc la VNTR2 pentru ambele efective.

Profilurile VNTR la tulpinile de om au fost diferite chiar și pentru aceeași probă din

care s-a analizat (hemocultură, sânge, secreție plagă, lichid peritoneal și spută), cu 2 excepții (563323 și 504001).

Lipsa ampliconilor a fost constatată și la unele tulpini de la om. Tulpinile VL43 și GM8 folosite ca probiotice au avut profile VNTR diferite (404314 și 400034).

Ampliconii rezultați pentru VNTR 7, 8 și 9 au fost diferiți, pentru VNTR 1 și 10 au fost identici, iar în cazul VNTR 2 nu s-a observat niciun amplicon la cele 2 tulpini.

Tulpinile din apă (176 și EP05) au avut profile VNTR diferite (004323 și 400000). În cazul tulpinii EP05 s-a observat amplicon doar la VNTR1, iar la tulpina 176 absența ampliconilor s-a constat la VNTR 1 și 2.

Codificarea profilelor VNTR obținute este redată în tabelul 3. Tulpinile s-au clasificat în 27 MT (profile VNTR diferite). La înscrierea on-line a profilelor MLVA codificate, toate s-au dovedit diferite față de cele existente în baza de date UMC Utrecht.

CONCLUZII

1. Prin studiul polimorfismului genetic prin MLVA a 33 de tulpini de *Enterococcus faecium* s-au obținut 27 de profile VNTR diferite: 6 la păsări, 15 la om, 4 din colecția de tulpini și 2 din apă.
2. Nu au fost înregistrate profile identice între tulpinile izolate de la om și cele izolate de la animale.
3. În cazul tulpinilor izolate din cazuri clinice, dar și în cadrul celor izolate de la găini, s-au înregistrat genotipuri circulante, care pot fi considerate epidemice.
4. Tulpinile utilizate ca probiotice s-au dovedit diferite de cele circulante la animale.
5. Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu susțin utilitatea pe care analiza polimorfismului VNTR, considerat ca marker genetic, o are în investigațiile epidemiologice.

Mulțumiri

Aceste studii au fost finanțate de MECT prin Contractul CEEX Viasan 5725-28/2005. Adresăm de asemenea mulțumirile noastre Dr. Guido Werner, Robert Koch Institute, pentru furnizarea tulpinii de referință, și Dr. Janetta Top, UMC Utrecht, pentru marea sollicititudine și ajutorul acordat în analiza on-line a profilelor MT.

BIBLIOGRAFIE

- CAMARGO I.L.B.C., M.S. GILMORE, A.L.C. DARINI. (2006)** Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brasil, *Clinical Microbiology and Infections* **12**: 1123-1130.
- HOMAN W. L., TRIBE D., POZNANSKI S., MEI L., HOGG G., SPALBURG E., VAN EMBDEN J.D.A., WILLEMS R.J.L. (2002)** Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*, *Journal of Clinical Microbiology*, **40** (6):1963 – 1971.
- LINDSTEDT B.A. (2005)** Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria, *Electrophoresis*. **26** (13):2567-82.
- NOVAIS C., COQUE T.M., BOERLIN P., HERRERO I., MORENO M.A., DOMINGUEZ L., PEIXE L. (2005)** Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clone in swine, Europe, *Emerging Infectious Diseases*, **11**(12).
- POPA VIRGILIA, IRINA NICA, C. STOICA, IRINA CODTA, VASILICA UNGUREANU, MONICA GHITA, N.CATANA, DANIELA BOTUS, CORINA ROMAN, F. PASTRAMA, G. RAPUNTEAN (2007)**. Caracterizarea tulpinilor de *Enterococcus faecium* prin studiiul polimorfismului genetic al locilor VNTR, Revista Romana de Medicina Veterinara **17**(4): 129-136.
- SIMJEE S., WHITE D.G., MCDERMOTT P.F., WAGNER D.D., ZERVOS M.J., DONABEDIAN S.M., ENGLISH L.L., HAYES J.R., WALKER R.D. (2002)**. Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci, *Journal of Clinical Microbiology* **40** (12):4659-65.
- TEIXEIRA L.M, FACKLAM R.R. (2005)** *Enterococcus*, in *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, Bacteriology* vol.2, Hodder Arnold ASM Press, 882-897.
- TOP JANETTA, SCHOULS L. M., BONTEN M.J.M., WILLEMS R.J.L. (2004)**. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates, *Journal of Clinical Microbiology* **42**(10):4503-4511.
- WERNER G., INGO K., WITTE W (2007)**. Current MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital adapted clonal types, *BioMed Central Microbiology* **7**:28.
- *** Ulti Locus Sequence Typing, Url: <http://www.umcutrecht.nl/subsite/MLVA/> (accesat 28.11.2008)
- *** UMC Utrecht, VNTR Url: <http://www.umcutrecht.nl/subsite/MLVA/Method/VNTR-characteristics.htm> (accesat 28.11.2008)

Tabel 3.

Enterococcus faecium. Codificare profile VNTR (MLVA)

Cod tulpină	Origine tulpini			Rezistotip	Profile VNTR					
	Sursa	An	Proba		1	2	7	8	9	10
176	București	2003	apă	TEC, OX, K, E, RA, NOR	0	0	4	3	2	3
105	București	2006	HC	AM, TEC, OX, K, E, CM, NOR	2	0	0	0	0	0
106	București	2006	HC	AM,GM,TEC, OX, P,K,C,E,CM,RA,NOR						
113	București	2006	HC	AM, GM, TEC, OX, P, K, E, RA, NOR						
129	București	2006	HC	AM,GM,VA, TEC, OX, K, C, E, RA,NOR	5	0	4	0	0	1
156	București	2006	HC	AM, TEC, OX, P, K, C, TE, E, NOR						
40	București	2007	HC	AM, TEC, OX, P, TE, E,CM, RA, NOR						
41	Timișoara	2006	HC	AM, GM, TEC, OX, P, K, C, E, NOR	4	0	3	0	2	0
18	Cluj	2006	HC	AM, OX, P, C, RA, NOR	4	0	3	0	2	2
43	București	2007	spută	VA, TEC, OX, K, TE, CM, NOR	0	0	0	0	0	0
47	București	2007	HC	/	4	0	3	0	1	0
VL43	colecție	-	-	FT, VA, TEC, OX, E, NOR	4	0	4	3	1	4
GM 8	colecție	-	-	FT, VA, TEC, OX, K, E, CM, NOR	4	0	0	0	3	4
ATCC 5667	colecție	-	-	TEC, OX, RA, NOR	6	0	4	0	0	3
BM4147	colecție	-	-	VA, TEC, OX, P, TE, CM	5	2	3	2	1	1
G2-2	Timișoara	2007	Găină/materii fecale	OX,CM	5	0	4	2	0	1
G3-2	Timișoara	2007	Găină/materii fecale	OX,CM	4	0	4	2	1	1
G9-1	Timișoara	2007	Găină/materii fecale	OX	5	0	4	0	1	1
G5-2	Timișoara	2007	Găină/materii fecale	OX	5	0	4	2	1	0
G10-2	Timișoara	2007	Găină/materii fecale	OX	5	0	4	2	1	0
G3-3	Cluj	2007	Găină/materii fecale	GM, OX, C, TE, E, NOR	4	0	2	0	1	2
G4-1	Cluj	2007	Găină/materii fecale	OX, K, TE, NOR	5	0	2	0	0	1
19	Baia Mare	2006	secreție plagă	AM, TEC, OX, P, K, TE, E, CM, NOR	4	0	1	0	0	3
283	Cluj	2007	sânge	AM, GM, OX, P, K, E, CM, NOR	5	0	1	0	0	3
284	Cluj	2007	sânge	AM,GM,TEC,OX, P, K, TE, E, CM, NOR	5	0	3	0	1	2
EPO5	Cluj	2007	apă	OX, CM, NOR	4	0	0	0	0	0
160	Baia Mare	2006	sânge	AM, OX, P, K, C, E, RA, NOR	7;5;3	0	3	3	2	2
916	Baia Mare	2007	sânge	AM, GM, OX, P, K, TE, E, CM, NOR	7;5;3	0	3	3	1	2
805	Baia Mare	2007	sânge	AM, GM, OX, P, K, E, CM, NOR	5;3	0	1	1	2	3
685	Baia Mare	2006	secreție plagă	AM, OX, P, K, TE, E, CM, RA, NOR	4;3	0	1	1	2	3
117	Cluj	2008	secreție plagă	/						
316	Cluj	2008	lichid peritoneal	/	5	6	3	3	2	3
197	Cluj	2008	lichid peritoneal	/	5	6	0	0	1	2