

TEZĂ DE DOCTORAT

Rezistența la antibiotice a tulpinilor de *Enterococcus* izolate din spital și implicarea lor în formarea de biofilme

Doctorand: Dan-Alexandru ȚOC

Conducător de doctorat: Prof.dr. Lia Monica JUNIE

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Genul *Enterococcus*

1.1. Caractere generale, taxonomie și diagnostic

1.2. Factori de virulență

1.2.1. Citolizina

1.2.2. Gelatinaza

1.2.3. Proteinele ancorate de peretele celular de tipul LPxTG

1.2.3.1. Proteina de suprafață a enterococilor (Esp)

1.2.3.2. Substanța de agregare (SA)

1.2.3.3. Pili

1.2.3.4. Componentele suprafeței microbiene care recunosc moleculele de

adeziune ale matricei extracelulare (MSCRAMM)

1.2.4. Sistemul de fosfotransferaze (PTS)

1.3. Infecții produse de reprezentanții genului *Enterococcus*

1.3.1. Bacteriemia

1.3.2. Endocardita infecțioasă

1.3.3. Infecțiile de tract urinar (ITU)

2. Rezistența la antibiotice a genului *Enterococcus*

2.1. Fenotipurile de rezistență așteptate

2.2. Rezistența dobândită la antibiotice

2.2.1. Rezistența la β -lactamine

2.2.2. Rezistența la aminoglicozide

2.2.3. Rezistența la daptomicină

2.2.4. Rezistența la fluoroquinolone

2.2.5. Rezistența la glicopeptide

- 2.2.6. Rezistența la linezolid
 - 2.2.7. Rezistența la rifampicină
 - 2.2.8. Rezistența la tetracicline
 - 2.2.9. Rezistența la macrolide, lincosamide și streptogramine
3. Genul *Enterococcus* și producerea de biofilme
- 3.1. Biofilmul bacterian – scurtă introducere
 - 3.2. Etapele formării unui biofilm
 - 3.3. Biofilmul produs de *Enterococcus faecalis*
 - 3.4. Biofilmul produs de *Enterococcus faecium*
 - 3.5. Biofilmul și rezistența la antibiotice
 - 3.6. Metode de studiere a formării de biofilme

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru/obiective

2. Studiu 1. *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus durans* și *Enterococcus avium* izolați într-un centru terțiar din România – Studiu retrospectiv și recenzie a literaturii

- 2.1. Introducere
- 2.2. Ipoteza de lucru
- 2.3. Material și metodă
- 2.4. Rezultate
- 2.5. Discuții
- 2.6. Concluzii

3. Studiu 2. Analiză descriptivă a genelor de rezistență la antibiotice circulante la enterococii rezistenți la vancomicină (VRE) în timpul pandemiei de COVID-19

- 3.1. Introducere
- 3.2. Ipoteza de lucru
- 3.3. Material și metodă
- 3.4. Rezultate
- 3.5. Discuții
- 3.6. Concluzii

4. Studiu 3. Analiza celor două pandemii: tiparele de rezistență ale enterococilor în timpul pandemiei de COVID-19.

- 4.1. Introducere
- 4.2. Ipoteza de lucru
- 4.3. Material și metodă
- 4.4. Rezultate
- 4.5. Discuții
- 4.6. Concluzii

5. Studiu 4. Ușor și accesibil: o nouă metodă de studiere a formării biofilmului bacterian

- 5.1. Introducere
- 5.2. Ipoteza de lucru
- 5.3. Material și metodă
- 5.4. Rezultate
- 5.5. Discuții
- 5.6. Concluzii

6. Concluzii generale

7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

REFERINȚE

ABREVIERI UTILIZATE IN TEXT

VRE	Enterococcus rezistent la vancomicină
PYR	Pirolidonil- α -naftilamidă
NAATs	Teste de amplificare a acizilor nucleici
PCR	Reacția de polimerizare în lanț
PTS	Sistem de fosfotransferaze
GBAP	Feromon activator al biosintezei gelatinazei
Esp	Proteina de suprafață a enterococilor
SA	Substanța de agregare
MSCRAMM	Componentele suprafeței microbiene care recunosc moleculele de adeziune ale matricei extracelulare
Ace	Adezina colagenului produsă de <i>Enterococcus faecalis</i>
Acm	Adezina colagenului produsă de <i>Enterococcus faecium</i>
Scm	A doua adezină a colagenului produsă de <i>Enterococcus faecium</i>
OE	Alți enterococi (non- <i>faecalis</i> non- <i>faecium</i>)
ITU	Infecție de tract urinar
ITUC	Infecție de tract urinar asociată cu utilizarea de catetere urinare
PLP	Proteină de legare a penicilinei
THF	Acid tetrahidrofollic
EMA	Enzimă care modifică structura aminoglicozidelor
AAC	Aminoamid acetiltransferază
ANT	Aminoamid nucleotidiltransferază
APH	Aminoamid fosfotransferază
ARN _r	ARN ribozomal
SPE	Substanță polimerică extracelulară
BE	Biofilmul produs de enterococi
ADNe	ADN extracelular
LTA	Acid lipoteicoic
DR	Dispozitiv Robbins
DR _m	Dispozitiv Robbins modificat
OMS	Organizația Mondială a Sănătății
CMI	Concentrația minimă inhibitorie
MDR	Multidrog-rezistență
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> rezistent la meticilină
ESBL	β -lactamază cu spectru extins
CRE	Enterobacterii rezistente la carbapeneme
LBA	Lavaj bronhoalveolar
STR	Streptomicină
LNZ	Linezolid

TET	Tetraciclină
AST	Testarea sensibilității la antibiotice
TGC	Tigecilină
AMP	Ampicilină
CN	Gentamicină
CIP	Ciprofloxacină
E	Eritromicină
TEI	Teicoplanină
VAN	Vancomicină
LCR	Lichid cerebrospinal
BBF	Formarea biofilmului bacterian
PLA	Acid polilactic
OCT	Tomografia în Coerență Optică
SEM	Microscopia Electronică de Baleiaj
FTIR	Spectroscopia în Infraroșu cu Transformare Fourier

INTRODUCERE

O dată ce genul *Enterococcus* a fost dovedit ca fiind implicat în infecții umane, o cursă contra cronometru a început pentru a putea oferi un tratament adecvat pacienților afectați de aceste infecții. Astfel, nu este de mirare că rezistența la antibiotice a devenit o problemă tot mai presantă pentru sistemul medical. Datele existente au arătat o asociere temporară între introducerea unui nou antibiotic în tratamentul infecțiilor produse de enterococi și dobândirea rezistenței la acest antibiotic. Astfel, în momentul de față, problema cea mai mare o reprezintă tulpinile rezistente la vancomicină care, asociat, prezintă și alte gene de rezistență, transformând gestionarea acestor tulpini în adevărate probleme de sănătate publică cu implicații epidemiologice profunde. Tratamentul infecțiilor cu enterococi rezistenți la vancomicină implică utilizarea de antibiotice de rezervă precum linezolid, tigecicină sau daptomicină. Din păcate, rezistența la aceste antibiotice a fost de asemenea raportată. Astfel, în lipsa unor măsuri concrete, eficiente și în lipsa complianței întregului sistem sanitar, ne îndreptăm spre rezistență la toate clasele de antibiotice și în cazul enterococilor.

Pandemia de COVID-19 a adus cu sine foarte multe complicații pentru sistemul sanitar. Unul dintre cele mai importante consecințe constă în creșterea fenomenului de rezistență la antibiotice. Utilizarea de antibiotice într-o manieră abuzivă a adus cu sine creșterea fenomenului de rezistență la antibiotice. Nu este de mirare, astfel, interesul crescut pentru analiza consecințelor pandemiei. Lucrarea de față abordează retrospectiv situația rezistenței la antibiotice a enterococilor din România în timpul pandemiei de COVID-19. În plus, analizează și epidemiologia moleculară a principalelor gene de rezistență prezente la tulpinile de *Enterococcus* rezistente la vancomicină, izolate în perioada pandemiei de COVID-19.

Genul *Enterococcus* cuprinde multiple specii de interes pentru patologia umană. Pe lângă speciile consacrate, prezentate anterior, acest gen bacterian prezintă alte câteva specii cu importanță particulară, precum cele cu rezistență intrinsecă la glicopeptide de tipul vanC (*Enterococcus gallinarum* și *Enterococcus casseliflavus*). Un alt grup particular

de enterococi este reprezentat de OE, fără fenotip sau genotip vanC. Epidemiologia, rezistența la antibiotice și implicarea exactă a acestor izolate rare în infecții umane este puțin cunoscută. Eforturi globale recente își propun să aducă lumină în ceea ce privește aceste necunoscute. Lucrarea actuală își dorește să analizeze în particular și situația izolatelor de *Enterococcus durans*, *Enterococcus raffinosus* și *Enterococcus avium* din România.

Formarea de biofilm este o caracteristică a multor genuri bacteriene. Din momentul în care importanța clinică a acestora a devenit cunoscută, cercetarea în această direcție a cunoscut o dezvoltare aproape fără precedent. Biofilmul bacterian prezintă multiple necunoscute iar scopul central al cercetărilor actuale este de a încerca să deslușească fiziologia acestei structuri. Cu toate acestea, studiarea formării biofilmului bacterian într-o manieră dinamică se realizează cu multiple dificultăți. Cea din urmă direcție de cercetare a acestei lucrări își propune dezvoltarea unui sistem microfluidic, printat 3D, dintr-un material biodegradabil, care poate să fie folosit pentru a facilita studiarea în dinamică a formării de biofilm.

Studiu 1. *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus durans* și *Enterococcus avium* izolați într-un centru terțiar din România – Studiu retrospectiv și recenzie a literaturii

În acest studiu retrospectiv, se analizează enterococi non-faecalis non-faecium izolați din produse patologice într-un centru terțiar din Cluj-Napoca, pe parcursul unui an. De asemenea, se realizează o recenzie critică a literaturii de specialitate pentru a obține informații suplimentare despre implicarea în patologia umană a speciilor *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium* și *Enterococcus raffinosus*.

Analiza retrospectivă dezvăluie că, într-un an, 58 de izolate clinice aparțin grupului de enterococi non-faecalis non-faecium, reprezentând 17,1% din totalul izolatelor de enterococi. Dintre acestea, s-au identificat 3 izolate de *Enterococcus casseliflavus*, 36 de *Enterococcus gallinarum*, 3 de *Enterococcus raffinosus*, 7 de *Enterococcus durans* și 9 de *Enterococcus avium*. Majoritatea izolatelor au fost obținute din produse patologice precum puroi, bilă și alte secreții de puncție.

Analiza ulterioară a datelor subliniază caracterul polimicrobian al infecțiilor în care se găsesc enterococii non-faecalis non-faecium. Cel mai frecvent agent izolat din aceste infecții a fost *Enterococcus faecium* în rândul bacteriilor Gram-pozitive, iar *Escherichia coli* și *Klebsiella pneumoniae* în rândul bacteriilor Gram-negative.

În ceea ce privește rezistența la antibiotice, speciile *Enterococcus durans* și *Enterococcus avium* au menținut sensibilitatea la antibiotice. În schimb, *Enterococcus raffinosus* a prezentat fenotipuri de rezistență extinsă la antibiotice, unele izolate manifestând rezistență ridicată la glicopeptide precum vancomicina și teicoplanina.

Recenzia literaturii de specialitate a inclus 10 cazuri de *Enterococcus raffinosus*, 16 cazuri de *Enterococcus avium* și 13 cazuri de *Enterococcus durans*. În ceea ce privește *Enterococcus raffinosus*, s-a observat o variație semnificativă a produselor patologice în care a fost izolat. Alte studii publicate în literatura de specialitate au evidențiat implicarea acestei specii în infecții nosocomiale, identificând gena *vanA* responsabilă de rezistența la glicopeptide în aceste izolate.

Enterococcus avium a fost descris ca agent etiologic într-un număr neașteptat de infecții ale sistemului nervos central, cum ar fi abces cerebral, abces cerebelos și meningoencefalită bacteriană. Sursa acestui patogen pare să fie infecțiile din zona ORL.

Enterococcus durans a fost asociat cu endocardită infecțioasă, fiind descrise 8 cazuri în literatura de specialitate. Endocardita poate afecta diverse valvule cardiace, inclusiv valva aortică și cea pulmonară, atât bicuspidă, cât și tricuspidă.

Studiu 2. Analiză descriptivă a genelor de rezistență la antibiotice circulante la enterococii rezistenți la vancomicină (VRE) în timpul pandemiei de COVID-19.

În acest studiu scopul este analizarea genelor de rezistență la antibiotice găsite în tulpinile de *Enterococcus* rezistent la vancomicină, izolate în timpul pandemiei de COVID-19. În perioada 1 ianuarie 2021 - 1 iulie 2021, au fost izolate 79 de tulpini de *Enterococcus* rezistent la vancomicină din tampoane rectale recoltate de la pacienții internați în Spitalul Clinic Județean de Urgență din Cluj-Napoca. Aceste izolate au fost apoi identificate la nivel de specie, iar identificarea genelor de rezistență la antibiotice s-a realizat prin tehnica PCR. Genele testate în acest studiu au inclus *vanA*, *vanB*, *tet(M)*, *tet(L)*, *ermB*, *msrA* și *mefA*. În plus, datorită situației epidemiologice specifice aceluși moment și presiunii generate de consumul de antibiotice, s-au testat și alte gene precum *sul1*, *sul2*, *sul3* și *NDM-1*.

Analiza datelor a evidențiat faptul că majoritatea cazurilor de portaj al *Enterococcus* rezistent la vancomicină au implicat specia *Enterococcus faecium*, cu 68 din cele 79 de izolate. *Enterococcus faecalis* a fost prezent în 11 izolate. Distribuția genelor de rezistență la glicopeptide a arătat o frecvență ridicată a genei *vanA* în aceste izolate, semnalând un risc epidemiologic crescut în România în ceea ce privește existența izolatelor cu rezistență crescută.

O analiză a asocierilor de gene prezente în aceste izolate a arătat un tipar comun întâlnit în ambele specii de *Enterococcus* izolate în acest studiu. Asocierile de gene *vanA-ermB* și *vanA-tet(M)-ermB* au fost cele mai frecvent întâlnite, atât pentru *Enterococcus faecalis*, cât și pentru *Enterococcus faecium*. Fenotipic, aceste tulpini arată o rezistență la multiple clase de antibiotice. O particularitate descoperită în acest studiu este asocierea genelor *tet(M)* și *tet(L)* la ambele specii, ceea ce ar putea indica o rezistență la tigeciclină la nivel fenotipic. Acest antibiotic este unul de rezervă, utilizat în special în tratarea infecțiilor abdominale. Astfel, rezistența la tigeciclină reprezintă o problemă majoră în tratarea infecțiilor cauzate de aceste bacterii rezistente.

Acest articol evidențiază situația dificilă din România în ceea ce privește rezistența la antibiotice. De asemenea, este cel mai mare studiu molecular din România care analizează prezența genelor de rezistență la *Enterococcus*. Perioada particulară în care s-a realizat acest studiu, pandemia de COVID-19, oferă o perspectivă suplimentară asupra rezistenței la antibiotice în țara noastră, în contextul creșterii accelerate a acestui fenomen la nivel global.

Studiu 3. Analiza celor două pandemii: tiparele de rezistență ale enterococilor în timpul pandemiei de COVID-19.

Studiul 3 analizează rezistența la antibiotice a genului *Enterococcus* într-o perioadă de 18 luni, cuprinsă între 1 noiembrie 2020 și 30 aprilie 2022. Această perioadă capturează în mod excelent accentuarea fenomenului de rezistență în timpul pandemiei de COVID-19 în România, iar rezultatele obținute se aliniază cu datele publicate în alte centre din lume.

Pentru a evidenția mai bine acest fenomen, perioada de timp a fost împărțită în trei perioade de câte 6 luni fiecare. Au fost incluse în studiu un număr de 98 de izolate ale genului *Enterococcus*. Analiza datelor obținute atrage atenția asupra creșterii rezistenței la aproape toate antibioticele testate: ampicilină, gentamicină, streptomycină, ciprofloxacina, eritromicină, linezolid, teicoplanină, vancomicină, tetraciclină și tigeciclină.

Comparând rezistența la antibiotice, determinată prin concentrația minimă inhibitorie, între izolatele de *Enterococcus faecalis* și *Enterococcus faecium*, s-a observat o diferență semnificativă statistic în ceea ce privește rezistența la ampicilină, streptomycină, ciprofloxacina, teicoplanină și vancomicină. O situație particulară a fost întâlnită în cazul rezistenței la linezolid. Cele mai multe tulpini cu acest fenotip de rezistență au fost identificate în cea de-a doua perioadă a studiului. Această situație ar putea fi explicată prin prezența unei clone circulante cu această rezistență în acea perioadă, dar, din cauza caracterului retrospectiv al studiului, acest lucru nu a putut fi demonstrat. Aceste rezultate evidențiază din nou faptul că *Enterococcus faecium* este o specie bacteriană mult mai rezistentă, care necesită o atenție deosebită în viitor.

Studiu 4. Ușor și accesibil: o nouă metodă de studiere a formării biofilmului bacterian

Ultimul studiu a reușit să realizeze o idee extrem de ambițioasă, și anume dezvoltarea unui sistem microfluidic printat 3D utilizat pentru studierea formării biofilmului bacterian. Materialul ales pentru printarea sistemului este acidul polilactic, datorită caracteristicilor sale biochimice, costului redus și disponibilității pe scară largă.

Protocolul dezvoltat implică utilizarea unei soluții bacteriene de 3 McF care este introdusă printr-un furtun microfluidic în canalul central al sistemului microfluidic printat 3D. Apoi, soluția este colectată într-o eprubetă la capătul distal al sistemului. Această abordare permite studierea biofilmului într-un mod dinamic. De asemenea, datorită versatilității sale, protocolul poate fi adaptat pentru o gamă largă de studii, în funcție de analiza dorită. Tulpinile bacteriene analizate în acest studiu sunt *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa*.

Formarea biofilmului bacterian în cadrul sistemului microfluidic a fost demonstrată atât din punct de vedere cantitativ, cât și calitativ. Pentru analiza cantitativă s-a utilizat o tehnică modificată de colorare cu violet de gențiană 1%. Analiza calitativă a fost realizată prin microscopie electronică de baleiaj, tomografie în coerență optică și spectroscopie în infraroșu cu transformare Fourier (FTIR). Prin utilizarea mai multor metode, s-a demonstrat prezența și caracteristicile morfologice ale biofilmului bacterian. Astfel, importanța dispozitivului microfluidic a căpătat o dimensiune nouă, devenind

adaptabil pentru o varietate mare de laboratoare specializate, în funcție de echipamentele disponibile.

Concluzii Generale

Genul *Enterococcus* este cunoscut în special în domeniul medical datorită capacității sale de a cauza diverse infecții și creșterii continue a rezistenței la antibiotice. *Enterococcus faecalis* și *Enterococcus faecium* sunt cele mai frecvent izolate specii din diverse produse patologice. Interesul pentru alte specii ale genului a crescut în ultimul timp, fie datorită infecțiilor grave pe care le cauzează, cum ar fi *Enterococcus avium*, fie datorită preferinței lor pentru anumite zone anatomice, precum *Enterococcus durans*, sau datorită rezistenței dobândite la antibiotice, cum ar fi *Enterococcus raffinosus*. Această nișă a microbiologiei prezintă un interes în creștere, iar recenzia literaturii relevă observații pertinente despre fiziopatologia infecțiilor cauzate de acești patogeni enigmatici. Totuși, aceasta ridică și noi întrebări și provocări care trebuie abordate pentru a înțelege pe deplin modul în care acești patogeni intervin în infecțiile umane.

Pandemia de COVID-19 a reprezentat o nouă provocare pentru sistemul medical, afectând rezistența la antibiotice într-un mod fără precedent. Creșterea rezistenței la antibiotice în timpul pandemiei se datorează utilizării neadecvate a antibioticelor și presiunii sporite asupra sistemului medical. Analiza genelor de rezistență la antibiotice și a tulpinilor de *Enterococcus faecalis* și *Enterococcus faecium* izolate în România a demonstrat dominanța genei *vanA* de rezistență la glicopeptide, precum și a genelor *tet(M)* și *ermB* asociate cu rezistența la tetraciclină și grupul MLS, respectiv. Această dominanță a genelor este comună pentru ambele specii de *Enterococcus*.

Aceste asocieri de gene de rezistență evidențiază existența de clone circulante foarte rezistente, pentru care puține alternative terapeutice rămân disponibile. Asocierile de tip *vanA-tet(M)-ermB* conferă rezistență la glicopeptide, tetraciclină și antibioticele din grupul MLS. Printre alternativele terapeutice notabile împotriva acestor tulpini se numără linezolidul și tigeciclina. Cu toate acestea, s-au raportat rezistențe chiar și la aceste antibiotice la nivel global, așa că suntem într-o cursă contra cronometru până la apariția panrezistenței în cadrul genului *Enterococcus*.

Analiza retrospectivă a tiparelor de rezistență la antibiotice ale genului *Enterococcus* în timpul pandemiei de COVID-19 a relevat o creștere a numărului de tulpini izolate din infecții invazive în ultimele 6 luni ale studiului. *Enterococcus faecium* a fost specia izolată cel mai frecvent în infecțiile invazive și s-a constatat că pacienții cu pneumonie COVID-19 au avut o frecvență semnificativ mai mare de izolare a *Enterococcus faecium* decât a *Enterococcus faecalis*. De asemenea, pacienții cu COVID-19 și infecție cu *Enterococcus faecium* au avut o evoluție nefavorabilă și un risc mai mare de deces decât cei cu alte specii de enterococi.

Analiza comparativă a tiparelor de rezistență arată că izolatele clinice de *Enterococcus faecium* sunt semnificativ mai rezistente decât cele de *Enterococcus faecalis* la glicopeptide, ampicilină, ciprofloxacină și streptomycină. În plus, s-a observat o creștere semnificativă a rezistenței la ampicilină și vancomicină la izolatele de *Enterococcus* în cazul pacienților cu COVID-19.

Studiul formării biofilmului bacterian este un subiect de interes crescut în comunitatea științifică, deoarece implicarea biofilmului în diferite tipuri de infecții umane a fost extensiv studiată. Totuși, există limitări în modalitățile de studiu in vitro a formării biofilmului. Metodele utilizate în principal sunt statice și dinamice, care oferă informații utile pentru înțelegerea fiziologiei biofilmului bacterian, dar trebuie luate în considerare limitările acestora. Studiul formării biofilmului bacterian într-o manieră dinamică oferă informații valoroase, dar necesită resurse speciale și implică costuri ridicate. Pentru a depăși aceste neajunsuri, s-a dezvoltat un dispozitiv microfluidic printat 3D din acid polilactic, care poate simula formarea biofilmului bacterian într-un mod dinamic în laborator.

Interacțiunea bacteriilor cu suprafața de acid polilactic a fost studiată anterior folosind plăcuțe printate 3D, demonstrându-se că biofilmul bacterian poate fi cultivat cu succes pe această suprafață. Utilizând dispozitivul microfluidic printat 3D, s-a reușit cultivarea biofilmului bacterian într-un mod dinamic. Prezența biofilmului bacterian a fost confirmată prin diverse metode, cum ar fi OCT, SEM, FTIR și colorarea cantitativă cu violet de gențiană 1%. Analiza comparativă a cantității de biofilm format în dispozitivul microfluidic a arătat că *Enterococcus faecalis* produce cel mai mult biofilm dintre bacteriile Gram-pozitive analizate, în timp ce *Pseudomonas aeruginosa* produce cel mai mult biofilm bacterian dintre bacteriile Gram-negative.

PhD Thesis

Antibiotic Resistance of *Enterococcus* Strains Isolated from Hospitals and Their Implication in Biofilm Formation

PhD candidate: Dan-Alexandru ȚOC

Phd coordinator: Prof.dr. Lia Monica JUNIE

CONTENT

INTRODUCTION

CURRENT STATE OF KNOWLEGDE

1. Genus *Enterococcus*

1.1. General Characteristics, Taxonomy, and Diagnosis

1.2. Virulence Factors

1.2.1. Cytolysin

1.2.2. Gelatinase

1.2.3. LPxTG-Anchored Cell Wall Proteins

1.2.3.1. Enterococcal Surface Protein (Esp)

1.2.3.2. Aggregation Substance (AS)

1.2.3.3. Pili

1.2.3.4. Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM)

1.2.4. Phosphotransferase System (PTS)

1.3. Infections Caused by Enterococcus Representatives

1.3.1. Bacteremia

1.3.2. Infective Endocarditis

1.3.3. Urinary Tract Infections (UTIs)

2. Antibiotic Resistance of the Genus *Enterococcus*

2.1. Expected Resistance Phenotypes

2.2. Acquired Antibiotic Resistance

2.2.1. β -Lactam Resistance

2.2.2. Aminoglycoside Resistance

2.2.3. Daptomycin Resistance

2.2.4. Fluoroquinolone Resistance

2.2.5. Glycopeptide Resistance

2.2.6. Linezolid Resistance

2.2.7. Rifampicin Resistance

2.2.8. Tetracycline Resistance

2.2.9. Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin Resistance

3. Genus *Enterococcus* and Biofilm Production

3.1. Bacterial Biofilm - Brief Introduction

3.2. Stages of Biofilm Formation

3.3. Biofilm Produced by *Enterococcus faecalis*

3.4. Biofilm Produced by *Enterococcus faecium*

3.5. Biofilm and Antibiotic Resistance

3.6. Methods for Studying Biofilm Formation

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Hypothesis/Objectives

2. Study 1: *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus durans* and *Enterococcus avium* Isolated from a Tertiary Center in Romania - Retrospective Study and Brief Review of the Literature

2.1. Introduction

2.2. Hypothesis

2.3. Materials and Methods

2.4. Results

2.5. Discussions

2.6. Conclusions

3. Study 2: Descriptive Analysis of Circulating Antibiotic Resistance Genes in Vancomycin-Resistant *Enterococcus* (VRE) during the COVID-19 Pandemic

3.1. Introduction

3.2. Hypothesis

3.3. Materials and Methods

3.4. Results

3.5. Discussions

3.6. Conclusions

4. Study 3: A Tale of Two Pandemics: Antimicrobial Resistance Patterns of *Enterococcus* during the COVID-19 Pandemic

4.1. Introduction

4.2. Hypothesis

4.3. Materials and Methods

4.4. Results

4.5. Discussions

4.6. Conclusions

5. Study 4: Easy and Affordable: A New Method for the Studying of Bacterial Biofilm Formation

5.1. Introduction

5.2. Hypothesis

5.3. Materials and Methods

5.4. Results

5.5. Discussions

5.6. Conclusions

6. General Conclusions

7. Originality and Innovative Contributions of the Thesis

REFERENCES

ABBREVIATIONS USED IN TEXT

VRE - Vancomycin-Resistant *Enterococcus*

PYR - Pyrrolidonyl- α -naphthylamide

NAATs - Nucleic Acid Amplification Tests

PCR - Polymerase Chain Reaction

PTS - Phosphotransferase System

GBAP - Gelatinase Biosynthesis-Activating Pheromone

Esp - Enterococcal Surface Protein

SA - Aggregation Substance

MSCRAMM - Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules

Ace - Collagen Adhesin produced by *Enterococcus faecalis*

Acm - Collagen Adhesin produced by *Enterococcus faecium*
Scm - Second Collagen Adhesin produced by *Enterococcus faecium*
OE - Other Enterococci (non-faecalis, non-faecium)
ITU - Urinary Tract Infection
CAUTI - Catheter-Associated Urinary Tract Infection
PLP - Penicillin-Binding Protein
THF - Tetrahydrofolic Acid
EMA - Enzyme Modifying Aminoglycoside Structure
AAC - Aminoglycoside Acetyltransferase
ANT - Aminoglycoside Nucleotidyltransferase
APH - Aminoglycoside Phosphotransferase
rRNA - Ribosomal RNA
SPE - Extracellular Polymeric Substance
BE - Enterococcal Biofilm
eDNA - Extracellular DNA
LTA - Lipoteichoic Acid
DR - Robbins Device
Modified DR - Modified Robbins Device
WHO - World Health Organization
MIC - Minimum Inhibitory Concentration
MDR - Multidrug-Resistant
MRSA - Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
ESBL - Extended-Spectrum Beta-Lactamase
CRE - Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae
BAL - Bronchoalveolar Lavage
STR - Streptomycin
LNZ - Linezolid
TET - Tetracycline
AST - Antibiotic Susceptibility Testing
TGC - Tigecycline
AMP - Ampicillin
CN - Gentamicin
CIP - Ciprofloxacin
E - Erythromycin
TEI - Teicoplanin
VAN - Vancomycin
CSF - Cerebrospinal Fluid
BBF - Bacterial Biofilm Formation
PLA - Polylactic Acid
OCT - Optical Coherence Tomography
SEM - Scanning Electron Microscopy
FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy

INTRODUCTION

As soon as *Enterococcus Spp.* was proven to be involved in human infections, a race against time begun, in order to provide the proper treatment for the patients affected by these infections. Thus, it is no wonder that antimicrobial resistance has become an increasingly pressing issue for the medical system. Existing data showed a temporary association between the introduction of a new antibiotic in the treatment of infections caused by *Enterococcus* and the resistance acquired to this antibiotic. Currently, the main problem are vancomycin-resistant strains that, associated, have other resistance genes, making the management of this strains a real public health issue with deep epidemiological implications. The treatment of the infections caused by vancomycin resistant *Enterococcus* strains involves last resort antibiotics as linezolid, tigecycline or daptomycin. Unfortunately, resistance to these antibiotics has been reported. Thereby, without some real, effective measures and the lack of compliance of the entire medical system we are heading towards resistance to all classes of antibiotics regarding enterococci.

COVID-19 pandemic brought many complications for the healthcare system. One of the most important consequences is the increase of antimicrobial resistance phenomenon. Therefore, it is not surprising, the increased interest in the consequences of the pandemic.

The present paper retrospectively approaches the antimicrobial resistance situation of enterococci in Romania during the COVID-19 pandemic. Furthermore, it also analyzes the molecular epidemiology of the main resistance genes of vancomycin-resistant *Enterococcus* strains isolated during the COVID-19 pandemic.

Enterococcus Spp. includes many species of interest for human pathology. Besides noted species, previously presented, this bacterial genus has several other particular important species such as those with intrinsic resistance to glycopeptides, as vanC type (*E.Gallinarum* and *E.Casseliflavus*). another particular group of enterococci is represented by OE without vanC phenotype or genotype. The epidemiology, antimicrobial resistance and exact involvement of these rare isolates in human infections is poorly known. Recent global efforts aim to shed light on these unknowns. The current paper wants to analyze in particular the situation of isolates of *Enterococcus durans*, *Enterococcus raffinosus* and *Enterococcus avium* from Romania.

Biofilm formation is a characteristic of many bacterial generes. Since their clinical importance became known, research in this direction has seen an almost unprecedented development. The bacterial biofilm presents multiple unknowns and the main goal of current research is to try to unravel the physiology of this structure. However, studying bacterial biofilm formation in a dynamic manner is accomplished with many difficulties. The last research direction of this work proposes the development of a microfluidic system, 3D printed, from a biodegradable material, which can be used to facilitate studying the dynamics of biofilm formation.

Study 1: *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus durans* and *Enterococcus avium* Isolated from a Tertiary Center in Romania - Retrospective Study and Brief Review

In this retrospective study, non-faecalis non-faecium enterococci isolated from pathological products in a tertiary center in Cluj-Napoca, during one year, are analyzed. A critical literature review is also performed to obtain additional information on the involvement of *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium* and *Enterococcus raffinosus* species in human pathology.

The retrospective analysis reveals that, in one year, 58 clinical isolates belong to the non-faecalis non-faecium enterococci group, representing 17.1% of the total enterococci isolates. Of these, 3 isolates of *Enterococcus casseliflavus*, 36 of *Enterococcus gallinarum*, 3 of *Enterococcus raffinosus*, 7 of *Enterococcus durans* and 9 of *Enterococcus avium* were identified. Most isolates were obtained from pathological products such as pus, bile and other puncture secretions.

Further analysis of the data emphasizes the polymicrobial character of infections in which non-faecalis non-faecium enterococci are found. The most common agent isolated from these infections was *Enterococcus faecium* among Gram-positive bacteria, and *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among Gram-negative bacteria. Regarding antimicrobial resistance, *Enterococcus durans* and *Enterococcus avium* species maintained sensitivity to antibiotics. In contrast, *Enterococcus raffinosus* showed extensive antimicrobial resistance phenotypes, with some isolates showing high resistance to glycopeptides such as vancomycin and teicoplanin.

The literature review included 10 cases of *Enterococcus raffinosus*, 16 cases of *Enterococcus avium*, and 13 cases of *Enterococcus durans*. Regarding *Enterococcus raffinosus*, a significant variation was observed in the pathological products in which it was isolated. Other studies published in the specialized literature highlighted the involvement of these species in nosocomial infections, identifying the *vanA* gene responsible for resistance to glycopeptides in these isolates.

Enterococcus avium has been described as the etiologic agent in an unexpected number of central nervous system infections, such as brain abscess, cerebellar abscess, and bacterial meningoenzephalitis. The source of this pathogen seems to be the infections in the ENT area.

Enterococcus durans has been associated with infective endocarditis, 8 cases being described in the specialized literature. Endocarditis can affect various heart valves, including the aortic and pulmonary valves, bicuspid and tricuspid.

Study 2: Descriptive Analysis of Circulating Antibiotic Resistance Genes in Vancomycin-Resistant *Enterococcus* (VRE) during the COVID-19 Pandemic

In this study, the aim is to analyze the antimicrobial resistance genes found in vancomycin-resistant *Enterococcus* strains isolated during the COVID-19 pandemic. Between January 1, 2021 and July 1, 2021, 79 vancomycin-resistant *Enterococcus* strains were isolated from rectal swabs collected from patients admitted to the Emergency County Clinical Hospital in Cluj-Napoca. These isolates were then identified at the species level, and the identification of antibiotic resistance genes was carried out by the PCR technique. The genes tested in this study included *vanA*, *vanB*, *tet(M)*, *tet(L)*, *ermB*, *msrA*,

and *mefA*. In addition, due to the epidemiological situation, specific to that time, and the pressure generated by the consumption of antibiotics, other genes such as *sul1*, *sul2*, *sul3* and NDM-1 were also tested.

Data analysis revealed that the majority of vancomycin-resistant *Enterococcus* carriage cases involved *Enterococcus faecium* species, with 68 out of 79 isolates. *Enterococcus faecalis* was present in 11 isolates. The distribution of glycopeptide resistance genes showed a high frequency of the *vanA* gene in these isolates, signaling an increased epidemiological risk in Romania regarding the existence of isolates with increased resistance.

An analysis of the gene associations, present in these isolates, showed a common pattern found in both *Enterococcus* species isolated in this study. The gene associations *vanA-ermB* and *vanA-tet(M)-ermB* were the most frequently encountered, both for *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. Phenotypically, these strains show resistance to multiple classes of antibiotics. A peculiarity discovered in this study is the association of the *tet(M)* and *tet(L)* genes in both species, which could indicate a resistance to tigecycline at the phenotypic level. This antibiotic is a backup one, used especially in the treatment of abdominal infections. Thus, resistance to tigecycline is a major problem in treating infections caused by these resistant bacteria.

This article highlights the difficult situation in Romania regarding antimicrobial resistance. It is also the largest molecular study in Romania that analyzes the presence of *Enterococcus* resistance genes. The particular period in which this study was made, the COVID-19 pandemic, offers an additional perspective on antibiotic resistance in our country, in the context of the accelerated growth of this phenomenon at the global level.

Study 3: A Tale of Two Pandemics: Antimicrobial Resistance Patterns of *Enterococcus* during the COVID-19 Pandemic

Study 3 analyzes the antimicrobial resistance of the *Enterococcus* genus over an 18-month period, between November 1, 2020, and April 30, 2022. This period perfectly captures the increasing resistance phenomenon during the COVID-19 pandemic in Romania, and the results obtained aligns with data published in other centers around the world.

To better highlight this phenomenon, the time period was divided into three periods of 6 months each. A number of 98 isolates of the genus *Enterococcus* were included in the study. The analysis of the obtained data draws attention to the increase of resistance to almost all tested antibiotics: ampicillin, gentamicin, streptomycin, ciprofloxacin, erythromycin, linezolid, teicoplanin, vancomycin, tetracycline and tigecycline.

Comparing the antimicrobial resistance, determined by minimum inhibitory concentration, between *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates, a statistically significant difference was observed regarding the resistance to ampicillin, streptomycin, ciprofloxacin, teicoplanin and vancomycin. A particular situation was encountered with linezolid resistance. Most strains with this resistance phenotype were identified in the second period of the study. This situation could be explained by the presence of a circulating clone with this resistance at that time, but due to the

retrospective nature of the study, this could not be demonstrated. These results again highlight that *Enterococcus faecium* is a much more resistant bacterial species that requires special attention in the future.

Study 4: Easy and Affordable: A New Method for the Studying of Bacterial Biofilm Formation

The latter study succeeded in realizing an extremely ambitious idea, namely the development of a 3D printed microfluidic system used to study bacterial biofilm formation. The material of choice for printing the system is polylactic acid, due to its biochemical characteristics, low cost and widespread availability.

The developed protocol involves the use of a 3 McF bacterial solution that is introduced through a microfluidic hose into the central channel of the 3D printed microfluidic system. The solution is then collected in a tube at the distal end of the system. This approach allows studying the biofilm in a dynamic way. Also, due to its versatility, the protocol can be adapted for a wide range of studies, depending on the desired analysis. The bacterial strains analyzed in this study are *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Bacterial biofilm formation within the microfluidic system was demonstrated both quantitatively and qualitatively. A modified 1% crystal violet staining technique was used for quantitative analysis. Qualitative analysis was performed by scanning electron microscopy, optical coherence tomography and Fourier transform infrared spectroscopy(FTIR). By using several methods, the presence and morphological characteristics of the bacterial biofilm have been demonstrated.

Thus, the importance of the microfluidic device has taken on a new dimension, becoming adaptable to a wide variety of specialized laboratories, depending on the available equipment.

General conclusions

The *Enterococcus* genus is particularly known in the medical field due to its ability to cause various infections and the continuous increase in antimicrobial resistance. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are the most frequently isolated species from various pathological products. The interest in other species of the genus has recently increased, either because of the serious infections they cause, such as *Enterococcus avium*, or because of their preference for certain anatomical areas, such as *Enterococcus durans*, or because of the acquired antimicrobial resistance, such as *Enterococcus raffinosus*. This

niche of microbiology is of growing interest, and literature review reveals pertinent observations about the physiopathology of infections caused by these enigmatic pathogens. However, this also raises new questions and challenges that must be addressed to fully understand how these pathogens intervene in human infections.

The COVID-19 pandemic has presented a new challenge to the healthcare system, affecting antimicrobial resistance in an unprecedented way. The rise of antimicrobial resistance during the pandemic is due to the inappropriate use of antibiotics and increased pressure on the medical system. Analysis of antimicrobial resistance genes and strains of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated in Romania demonstrated the dominance of the glycopeptide resistance gene *vanA*, as well as the *tet(M)* and *ermB* genes associated with tetracycline resistance and the MLS group, respectively. This gene dominance is common to both *Enterococcus* species.

These resistance gene associations highlight the existence of highly resistant circulating clones, for which few therapeutic alternatives remain available. *vanA-tet(M)-ermB* associations confer resistance to glycopeptides, tetracycline and MLS group antibiotics. Notable therapeutic alternatives against these strains include linezolid and tigecycline. However, resistance to even these antibiotics has been reported globally, so we are in a race against time until pan-resistance occurs within the *Enterococcus* genus.

The retrospective analysis of *Enterococcus* antimicrobial resistance patterns during the COVID 19 pandemic revealed an increase in the number of strains isolated from invasive infections during the last 6 months of the study. *Enterococcus faecium* was the most frequently isolated species in invasive infections, and patients with COVID-19 pneumonia were found to have a significantly higher frequency of isolation of *Enterococcus faecium* than *Enterococcus faecalis*. Also, patients with COVID-19 and *Enterococcus faecium* infection had an unfavorable outcome and a higher risk of death than those with other enterococcal species.

The comparative analysis of resistance patterns shows that *Enterococcus faecium* clinical isolates are significantly more resistant than *Enterococcus faecalis* to glycopeptides, ampicillin, ciprofloxacin and streptomycin. In addition, a significant increase in resistance to ampicillin and vancomycin was observed in *Enterococcus* isolates from patients with COVID-19.

The study of bacterial biofilm formation is a topic of increased interest in the scientific community, as the involvement of biofilm in various types of human infections has been extensively studied. However, there are limitations regarding the ways of studying biofilm formation in vitro. The mainly used methods are static and dynamic, which provide useful information for understanding bacterial biofilm physiology, but their limitations must be considered. Studying bacterial biofilm formation in a dynamic manner

provides valuable information, but requires special resources and involves high costs. To overcome these shortcomings, a 3D-printed polylactic acid microfluidic device was developed that can simulate bacterial biofilm formation in a dynamic manner in the laboratory.

The interaction of bacteria with the polylactic acid surface has previously been studied using 3D printed plates, demonstrating that bacterial biofilm can be successfully grown on this surface. Using the 3D printed microfluidic device, bacterial biofilm cultivation in a dynamic manner was achieved. The presence of bacterial biofilm was confirmed by various methods such as OCT, SEM, FTIR and quantitative crystal violet 1% staining. The comparative analysis of the amount of biofilm formed in the microfluidic device showed that *Enterococcus faecalis* produces the most biofilm among the analyzed Gram-positive bacteria, while *Pseudomonas aeruginosa* produces the most bacterial biofilm among the Gram-negative bacteria.