

ȘCOALA DOCTORALĂ

**Rezistența la chimioterapice a  
tulpinilor din genul  
*Staphylococcus* izolate de la  
pacienții din ambulator și din  
spital**

Laura-Mihaela Simon-Doctorand

Prof. Dr. Lia-Monica Junie-Conducator de doctorat

Cluj-Napoca  
2012

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	12
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Genul <i>Staphylococcus</i></b>	17
1.1. Istoric	17
1.2. Taxonomie	18
1.3. Caractere generale	18
1.4. Habitat și reprezentanți ai genului	19
<b>2. Patogenia infecțiilor cu <i>S. aureus</i></b>	20
2.1. Factorii de patogenitate de suprafață	20
2.1.1. Polizaharidele capsulare	20
2.1.2. Peptidoglicanul și acizii teichoici	20
2.1.3. Proteina A	21
2.2. Enzimele	21
2.3. Toxinele	24
2.4. Superantigenele	25
2.5. Biofilmele	26
2.6. Etapele invaziei țesuturilor	29
2.7. Imunitatea umorală și celulară în infecțiile stafilococice	31
<b>3. Infecții produse</b>	32
3.1. Infecții produse de <i>S. aureus</i>	32
3.2. Infecții produse de CNS	36
3.3. Factorii predispozani ai infecțiilor cu <i>S. aureus</i>	37
<b>4. Rezistența stafilococilor la antibiotice</b>	39
4.1. Rezistența la $\beta$ lactamine	39
4.2. Rezistența la Aminoizide	40
4.3. Rezistența la Tetraciline	41
4.4. Rezistența la Macrolide, Lincosamide, Streptogramine și Ketolide	41
4.5. Rezistența la Trimetoprim-Sulfametoxazol	42
4.6. Rezistența la Quinolone	42
4.7. Rezistența la Fosfomicină	42

4.8. Rezistența la Acid fusidic	42
4.9. Rezistența la Rifampicină	42
4.10. Rezistența la Glicopeptide	42
4.11. Rezistența la Oxazolidinone	43
4.12. Rezistența asociată	43
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Studiul 1 – Rezistența la antibiotice a tulpinilor din genul <i>Staphylococcus</i></b>	47
1.1. Introducere	47
1.2. Material și metodă	48
1.3. Rezultate	57
1.3.1. Rezistența la antibiotice a tulpinilor de stafilococi izolate de la pacienții din Clinica de Pneumoftiziologie	57
1.3.1.1. Specii bacteriene izolate	57
1.3.1.2. Repartiția pe grupe de vârstă	57
1.3.1.3. Repartiția pe sexe	58
1.3.1.4. Repartiția pe produse patologice	59
1.3.1.5. Pattern-uri de rezistență	60
1.3.2. Rezistența la antibiotice a tulpinilor de stafilococi izolate de la pacienții din Clinica de Pediatrie	62
1.3.2.1. Specii bacteriene izolate	62
1.3.2.2. Repartiția pe grupe de vârstă	63
1.3.2.3. Repartiția pe sexe	63
1.3.2.4. Repartiția pe produse patologice	64
1.3.2.5. Pattern-uri de rezistență	65
1.3.3. Rezistența la antibiotice a tulpinilor de stafilococi izolate de la pacienții din Clinica Medicală III	69
1.3.3.1. Specii bacteriene izolate	69
1.3.3.2. Repartiția pe sexe	70
1.3.3.3. Repartiția pe produse patologice	70
1.3.3.4. Pattern-uri de rezistență	71
1.3.4. Rezistența la antibiotice a tulpinilor de stafilococi izolate de la pacienții din ambulator	77
1.3.4.1. Specii bacteriene izolate	77
1.3.4.2. Repartiția pe grupe de vârstă	77
1.3.4.3. Repartiția pe sexe	78
1.3.4.4. Repartiția pe produse patologice	78
1.3.4.5. Pattern-uri de rezistență	80
1.3.5. Compararea rezultatelor obținute din cele patru unități spitalicești	82
1.3.5.1. Specii bacteriene izolate	82
1.3.5.2. Repartiția pe grupe de vârstă	83

1.3.5.3. Repartiția pe sexe	83
1.3.5.4. Repartiția pe produse patologice	84
1.3.5.5. Pattern-uri de rezistență	85
1.4. Discuții	88
1.5. Concluzii	92
<b>2. Studiul 2 – Efectul antibacterian al unor extracte de plante asupra tulpinilor de <i>S. aureus</i></b>	94
2.1. Introducere	94
2.2. Material și metodă	97
2.3. Rezultate	100
2.4. Discuții	107
2.5. Concluzii	109
<b>3. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	110
<b>REFERINȚE</b>	111
<b>ABREVIERI</b>	10

**Cuvinte cheie:** Rezistența; Chimioterapice; MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*); *Staphylococcus*; Extracte de plante.

## INTRODUCERE

Dezvoltarea rezistenței la antibiotice printre tulpinile de *S. aureus* este una dintre marile provocări cu care se confruntă microbiologii. În primii 4 ani de la introducerea Penicilinei G în practica clinică, a fost raportată rezistența la Penicilină, mediată de  $\beta$ -lactamaza.

În ultimii ani, procentul stafilococilor izolați care au rezistență la meticilină, a crescut substanțial, tendința provocată și de folosirea nediscriminatorie a antibioticelor.

Infecțiile nosocomiale cauzate de *S. aureus* reprezintă o problemă importantă de sănătate publică, fiind o cauză importantă de morbiditate și mortalitate.

## I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

### 1. Genul *Staphylococcus*

Genul *Staphylococcus* face parte din familia *Staphylococaceae* împreună cu genurile *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, și *Salinicoccus*

Genul *Staphylococcus* este în prezent alcătuit din 38 specii, 18 putând fi izolate de la om și 17 subspecii.

Dintre cele 38 de specii, 3 sunt importante în patologia umană: *S. aureus* responsabil de producerea celor mai multe infecții umane cu stafilococi, *S. epidermidis* și *S. saprophyticus*, numiți și stafilococi albi, sunt considerați germeni oportuniști.

Membrii genului *Staphylococcus* sunt coci Gram pozitivi, având 0,5-1,5 μm diametru, dispuși izolați, în perechi, tetrade, lanțuri scurte (trei sau patru celule bacteriene) sau în ciorchini, celulele fiind dispuse în trei planuri, fără a avea o configurație bine definită.

Stafilococii sunt imobili, nesporulați, catalazo-pozitivi și sunt în general necapsulați sau au capacități limitate de formare a capsulei.

Stafilococii sunt bacterii ubiquitare, larg răspândite în natură, întâlnite în organismul uman și animal. Spectrul gazdelor și al habitatului poate fi îngust sau larg, în funcție de specie.

### 2. Patogenia infecțiilor cu *S. aureus*

Patogenitatea infecțiilor datorate *S. aureus* este influențată de diferite componente bacteriene de suprafață (polizaharidul capsular, proteina A), factori de adeziune (clumping factor, fibronectin binding protein) și proteine extracelulare (coagulază, hemolizine, enterotoxine, TSST, exfoliatine, PVL).

Enterotoxinele stafilococice aparțin unui grup de toxine numite colectiv superantigene pirogenice care include și toxina șocului toxic (TSST-1), exotoxinele pirogenice streptococice (SPE A, B, C, F, G, H și J) și superantigenul streptococic.

*S. aureus* formează biofilme pe suprafața cateterelor și a protezelor producând infecții grave și dificil de tratat, dat fiind faptul că biofilmele de *S. aureus* sunt mai rezistente la acțiunea antibioticelor comparativ cu formele planctonice, ceea ce impune introducerea de noi antibiotice care să inhibe enzimele specifice produse de biofilme.

### 3. Infecții produse

Cele mai frecvente infecții cauzate de *S. aureus* implică pielea și au un caracter supurativ, stafilococul fiind prototipul de bacterie piogenă. Aceste infecții superficiale

se pot extinde prin continuitate pe cale limfatică sau hematogenă cauzând o mare varietate de infecții viscerale.

Sursele de infecție sunt chiar propriii stafilococi de pe tegumente, din cavitatea nazală, din căile respiratorii sau din intestin. De la aceste nivele, pot pătrunde prin leziunile tegumentare sau prin foliculii piloși, glande sebacee sau sudoripare. Gradul de extindere al infecției depinde de doza infectantă, de virulență bacteriană dar și de statusul imun al gazdei.

Infecțiile tegumentare și ale țesutului subcutanat sunt caracterizate printr-o supurație intensă, necroza locală și formarea de abcese locale.

Leziunea anatomică de bază indusă de *S. aureus* este reprezentată de un exudat piogenic sau de un abces. În plus, în anumite circumstanțe, activarea exotoxinei de către limfocite poate domina tabloul clinic (toxiinfecții alimentare, TSS).

CNS sunt agenți etiologici ai infecțiilor nosocomiale, rata infecțiilor fiind corelată cu creșterea utilizării protezelor și dispozitivelor invazive și cu creșterea numărului de pacienți imunodeprimați din spitale. În ultimii ani au devenit tot mai implicați în apariția stărilor septică la om.

## 4. Rezistența stafilococilor la antibiotice

Creșterea numărului de chimioterapice antibacteriene, utilizarea lor empirică și abuzivă au avut ca rezultat apariția unor "supergermeni" cu multirezistență la chimioterapicele antiinfecțioase, capabile să producă episoade nosocomiale în secții cu profil chirurgical, de terapie intensivă sau în orice secție în care sunt internați pacienți imunocompromiși.

Schemele de tratament antibacterian sunt în continuă schimbare, acest fapt având o contribuție majoră la schimbarea sensibilității florei bacteriene la chimioterapicele utilizate.

Rezistența la Meticilină a *S. aureus* se asociază cu alte mecanisme de rezistență care determină inactivarea altor familii de antibiotice.

## II. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### Studiu 1. Rezistența la antibiotice a tulpinilor din genul *Staphylococcus*

Scopul studiului a fost de a evidenția distribuția fenotipurilor de rezistență la antibiotice a tulpinilor de stafilococi izolate din diverse clinici din Cluj-Napoca în perioada martie 2009-martie 2011.

Obiectivele studiului au fost:

1. Izolarea și identificarea tulpinilor din genul *Staphylococcus*

2. Testarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor izolate
3. Detectarea principalelor fenotipuri de rezistență la antibiotice
4. Interpretarea rezultatelor obținute prin compararea lor cu datele din

literatura de specialitate.

## 1.2. Material și metodă

Recoltarea produselor patologice s-a realizat în funcție de localizarea infecției: puroi, urină, spută, secreție otică, nazală, conjunctivală, LCR.

Speciile din genul *Staphylococcus* au fost identificate pe baza aspectului morfologic, a proprietăților de cultură, a producerii coagulazei, a prezenței hemolizinelor, a activității enzimatică și a producerii de acid ca urmare a fermentării unor zaharuri.

Testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase a germenilor izolați s-a efectuat folosind tehnica difuzimetrică pe subcultura standardizată prin metoda Kirby-Bauer cu citire manuală și cu ajutorul sistemului automat de testare a sensibilității la antibiotice Vitek 2 Compact (bioMérieux).

## 1.3. Rezultate

Am inclus în studiu un număr total de 908 tulpini izolate de la pacienți internați în Clinicile de Pneumoftiziologie (287 de tulpini), Pediatrie I, II și III (315 tulpini), Medicală III (96 tulpini) precum și de la pacienți din ambulator (210 tulpini).

Din totalul tulpinilor izolate, 74% au fost tulpini de *S. aureus* (672 tulpini), iar 26% (236 tulpini) de SCN. Remarcăm procentul crescut al *S. aureus* (74%) în comparație cu SCN (26%).

Luând în considerare speciile de SCN izolate de la pacienții din cele 3 clinici universitare și din ambulator, cele mai multe tulpini au fost izolate din Clinica Medicală III (37,5%), urmată de clinicile de Pediatrie (30,5%) și Clinica de Pneumoftiziologie (13,6%).

Din totalul tulpinilor de stafilococi (908 tulpini), 554 (61,01%) tulpini au fost izolate de la pacienții de sex masculin, iar 354 tulpini (38,98%) au fost izolate de la pacienții de sex feminin.

În cadrul Clinicii de Pneumoftiziologie și Pediatrie, majoritatea tulpinilor de *S. aureus* au fost izolate din sputa, iar în Clinica Medicală III și ambulator majoritatea tulpinilor au fost izolate din abcese, plăgi, lichide de puncție și puroi.

În cadrul Clinicii de Pneumoftiziologie majoritatea tulpinilor de SCN au fost izolate din uroculturi iar în Clinica Medicală III și ambulator majoritatea tulpinilor au fost izolate din abcese bronșice, secreții traheale, sonde, CVC. În cadrul Clinicii de Pediatrie, SCN au fost izolați predominant din uroculturi și sonde.

Comparativ cu tulpinile SCN, tulpinile de *S. aureus* izolate de la pacienții pediatrici au prezentat rate mai mari de rezistență la Penicilină- 210 tulpini (66,66%),

Eritromicină- 145 tulpini (46,03%) și Clindamicină- 77 (24,44 %). Tulpinile de SCN au fost rezistente la Penicilină- 87 tulpini (27,61%), Eritromicină- 64 tulpini (20,31%) și Clindamicină- 47 tulpini (14,92%). Tulpinile de SCN au prezentat rate mai mari de rezistență la Gentamicină- 44 tulpini (13,96%), Ciprofloxacina- 40 tulpini (12,69%), Nitrofurantoin- 26 tulpini (8,25%) și Biseptol- 59 tulpini (18,73%).

Tulpinile de *S. aureus* izolate de la pacienții din Clinica Medicală III au prezentat rate mai mari de rezistență la Penicilină- 58 tulpini (60,41%), Eritromicină- 38 tulpini (39,58), Clindamicină- 32 (33,33 %), Gentamicină- 34 tulpini (35,41%), Ciprofloxacina- 34 tulpini (35,41%), Imipenem- 34 tulpini (35,41%), Moxifloxacina- 34 tulpini (35,41%) și la Rifampicina- 34 tulpini (35,41%). Tulpinile de SCN au prezentat rate mari de rezistență la Penicilină- 24 tulpini (25 %), Eritromicină- 22 (22,91%) tulpini, Imipenem- 16 tulpini și Rifampicina- 10 tulpini (10,41%).

Tulpinile de *S. aureus* izolate de la pacienții din ambulator au prezentat rate mai mari de rezistență la Penicilină -110 tulpini (52,38%), Eritromicină- 120 tulpini (57,14%). SCN izolați din ambulator au fost mai rezistenți la Clindamicină- 31 (14,76%), Gentamicină- 12 tulpini (5,71%), Ciprofloxacina- 12 tulpini (5,71%), Nitrofurantoin- 8 tulpini (3,8 %) și Biseptol- 12 tulpini (5,71%).

Din totalul tulpinilor metilicilin-rezistente izolate de la pacienții din Clinica Medicală III, Pediatrie și din ambulator, majoritatea- 166 (59,28%) au fost de *S. aureus* și au provenit din Clinica de Pediatrie. Dintre tulpinile SCN metilicilin-rezistente, majoritatea au fost de *S. epidermidis*- 35 tulpini (11.11%) și au provenit din Clinica de Pediatrie și Medicală III.

## 1.5. Concluzii

1. Au fost luate în studiu 908 tulpini de stafilococi izolate de la 763 de pacienți (84%) internați în 3 clinici universitare și 145 de pacienți (16%) din ambulator. *S. aureus* rămâne cel mai important reprezentant al genului *Staphylococcus* care produce infecții la adulți și copii, 74% din totalul tulpinilor de stafilococi izolate aparținând speciei *S. aureus* (672 tulpini).

2. Majoritatea tulpinilor de stafilococi, 554 (61,01%) tulpini au fost izolate de la pacienții de sex masculin.

3. Din totalul de 672 de tulpini de *S. aureus* izolate din cele patru unitati, cele mai multe au fost izolate din abcese, plăgi, puroi, lichide de puncție- 187 tulpini (27,82%), spută (24,7%)- 166 tulpini, lavaj bronșic (6,25%)- 42 tulpini, aspirate bronșice (5,35%)- 36 tulpini, exudate faringiene- 74 tulpini (11%).

4. Cele 236 de tulpini de SCN au fost izolate preponderent din plăgi, puroi, escare- 69 tulpini (29,23%), uroculturi- 69 tulpini (29,23%), sonde, CVC- 32 tulpini (13,55%), secreții traheale, aspirate bronșice- 14 tulpini (5,93%), secreții conjunctivale, otice- 17 (9.18%) tulpini, hemoculturi- 2



tulpini (1,08%). Cele mai multe tulpini de SCN au fost izolate din Clinica de Pediatrie- 96 tulpini (40,67%) și din ambulator- 65 tulpini (27,54%).

5. Tulpinile de *S. aureus* izolate de la pacienții din Clinica Medicală III au prezentat rate mai mari de rezistență la Penicilină, Eritromicină- 38 tulpini (39,58%), Clindamicină- 32 (33,33 %), Gentamicină- 34 tulpini (35,41%), Ciprofloxacin- 34 tulpini (35,41%), Imipenem- 34 tulpini (35,41%), Moxifloxacin- 34 tulpini (35,41%), și Rifampicină- 34 tulpini (35,41%). Tulpinile de SCN au prezentat rate mari de rezistență la Penicilină - 24 tulpini (25%), Eritromicină- 22 tulpini (22,91%), Imipenem- 16 tulpini și Rifampicină- 10 tulpini (10,41%).

6. Comparativ cu tulpinile SCN, tulpinile de *S. aureus* izolate de la pacienții pediatrici au prezentat rate mai mari de rezistență la Penicilină - 210 tulpini (66,66%), Eritromicină- 145 tulpini (46,03%) și Clindamicină- 77 (24,44 %). Tulpinile de SCN au prezentat rate mai mari de rezistență la Gentamicină- 44 tulpini (13,96%), Ciprofloxacin- 40 tulpini (12,69%), Nitrofurantoin- 26 tulpini (8,25%) și Biseptol- 59 tulpini (18,73%).

7. Din totalul tulpinilor metilino-rezistente izolate de la pacienții din Clinicile Medicală III, Pediatrie și din ambulator, 166 tulpini (59,28%) au aparținut speciei *S. aureus*. Cel mai mare procent de tulpini MRSA a fost semnalat în Clinica Medicală III- 41,66% (40 tulpini), urmată de Clinica de Pediatrie- 26,03% (82 tulpini), de ambulator 20,95% (44 tulpini) și de Clinica de Pneumoftiziologie- 13,31% (35 tulpini).

8. Dintre tulpinile de SCN metilino-rezistente, în toate unitățile spitalicești a predominat *S. epidermidis*, urmat de *S. haemolyticus* și *S. saprophyticus*. Cel mai mare procent de tulpini SCN metilino-rezistente a fost înregistrat pentru specia *S. epidermidis*- 18,75% din Clinica Medicală III.

9. Nu s-au izolat tulpini VISA sau VRSA.

10. Rata de rezistență la antimicrobiene cât și răspândirea MRSA în comunitate sunt în creștere.

11. Pentru alegerea unei terapii antiinfecțioase adecvate optimizată prin renunțarea la antibioticele devenite ineficiente și nu în ultimă instanță a unei supravegheri corecte a infecțiilor stafilococice este importantă cunoașterea fenotipurilor circulante în arealul nostru geografic cu scopul îmbunătățirii calității asistenței medicale.

12. Rezultatele obținute în urma studiilor efectuate sunt concordante cu datele din literatura de specialitate și subliniază încă o dată faptul că apariția, răspândirea și selecția bacteriilor rezistente la antibiotice reprezintă o problemă importantă de sănătate publică. Apariția tulpinilor rezistente este un fenomen ce nu poate fi oprit, dar transformarea tulpinilor rezistente în populații rezistente este favorizată de antibioticoterapia nerațională.

## Studiu 2. Efectul antibacterian al unor extracte de plante asupra tulpinilor de *S. aureus*

În ciuda faptului că industria farmaceutică produce antibiotice noi, în ultimii ani rezistența la chimioterapice este în creștere. Această problemă pune semne grave de întrebare asupra utilizării în viitor a chimioterapicelor, fapt ce impune luarea unor măsuri care să vizeze controlul utilizării antibioticelor, efectuarea de noi cercetări în scopul identificării mijloacelor moleculare de dobândire a rezistenței la antibiotice precum și găsirea de noi substanțe antibacteriene, sintetice sau naturale.

La ora actuală sunt evaluate diverse extracte de plante și bioconstituenți în vederea posibilelor efecte antibacteriene. Sunt vizate multe specii bacteriene, printre care și cele responsabile de producerea infecțiilor nosocomiale, un loc important ocupându-l și *S. aureus*.

Scopul acestui studiului a fost acela de a investiga proprietățile antibacteriene ale unor extracte alcoolice și uleiuri esențiale obținute din plante față de tulpini de *S. aureus* izolate de pacienții din ambulator și din spital.

### 2.2. Material și metodă

Am inclus în studiu 50 de tulpini de *S. aureus* izolate din diferite clinici din Cluj-Napoca precum și din ambulator.

Identificarea tulpinilor s-a făcut pe baza caracterelor morfologice, de cultură și biochimice și a testelor antigenice, conform descrierii din Studiul I, capitoul Material și Metodă. Pentru fiecare tulpină s-a efectuat testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase folosind metoda difuzimetrică pe subcultura standardizată prin metoda Kirby-Bauer cu citire manuală (conform CLSI).

Produsele naturale testate au fost :

- A. tinctura de gălbenele (*Callendulae flos*) de la firma Hofigal
- B. tinctura de păducel (*Folium crataegi cum flore*) de la firma Fares
- C. ulei esențial de *Melissa officinalis* de la firma Fares
- D. tinctură de salvie (*Salviae folium*) de la firma Fares
- E. tinctură de propolis
- F. Biosept forte (antibiotic natural) de la firma Fares cu conținut de 80% ulei esențial de cimbru (*Thymi aetheroleum*) și 20% ulei esențial de cuișoare (*Caryophyllorum aetheroleum*)

Activitatea antibacteriană în vitro a produselor naturale a fost testată pe medii de cultură solide Muller Hinton repartizate în plăci Petri (90mm).

### 2.3. Rezultate

Pentru tinctura de gălbenele (*Callendulae flos*), diametrele zonelor de inhibiție pentru stafilococii MSSA au fost cuprinse între 5-18 mm, iar 4 tulpini MSSA au fost rezistente. În cazul stafilococilor MRSA, diametrele zonelor de inhibiție au fost cuprinse între 7-14 mm.

Pentru tinctura de păducel (*Folium crataegi* cum flore) diametrele zonelor de inhibiție pentru stafilococii MSSA au fost cuprinse între 5-17 mm. În cazul stafilococilor MRSA, diametrele zonelor de inhibiție au fost cuprinse între 5-14 mm, 9 tulpini fiind rezistente.

Pentru uleiul esențial de *Melissa officinalis*, diametrele zonelor de inhibiție pentru stafilococii MSSA au fost cuprinse între 12-25 mm. În cazul stafilococilor MRSA diametrele zonelor de inhibiție au fost cuprinse între 12-22 mm.

În cazul tincturii de salvie (*Salviae folium*), diametrele zonelor de inhibiție pentru stafilococii MSSA au fost cuprinse între 9-27 mm. În cazul stafilococilor MRSA diametrele zonelor de inhibiție au fost cuprinse între 8-18 mm, 9 tulpini fiind rezistente.

Pentru tinctura de propolis, diametrele zonelor de inhibiție pentru stafilococii MSSA au fost cuprinse între 9-26 mm. În cazul stafilococilor MRSA, diametrele zonelor de inhibiție au fost cuprinse între 16-24 mm

În cazul produsului Biosept forte, diametrele zonelor de inhibiție pentru stafilococii MSSA au fost cuprinse între 51-61 mm. În cazul stafilococilor MRSA, diametrele zonelor de inhibiție au fost cuprinse între 40-65 mm.

Tulpinile MSSA au prezentat diametre ale zonelor de inhibiție  $\geq 10$  mm, pentru uleiul de *Melissa officinalis* în proporție de 100%, pentru tinctura de propolis în proporție de 93,33%, pentru *Salviae folium* în proporție de 86,66% și în proporție de 46,66%, atât pentru tinctura de gălbenele cât și pentru cea de păducel.

Tulpinile MRSA au prezentat diametre ale zonelor de inhibiție  $\geq 10$  mm, pentru uleiul de *Melissa officinalis* și tinctura de propolis în proporție de 100%, pentru *Salviae folium* în proporție de 97,14%, în proporție de 28,57% pentru tinctura de păducel și în proporție de 14,28% pentru tinctura de gălbenele.

## 2.5. Concluzii

1. Toate cele șase extracte de plante testate pe tulpinile de *S. aureus* au avut efecte antibacteriene.
2. Cele mai bune efecte antibacteriene au fost observate în cazul produsului Biosept forte.
3. Efect antibacterian important au prezentat uleiul esențial de *Melissa officinalis* și propolisul.
4. Efect antibacterian moderat au prezentat tinctura de salvie (*Salviae folium*), păducel (*Folium crataegi*) și gălbenele (*Callendulae flos*).

---

**“IULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND  
PHARMACY**

**PhD Thesis**

**Resistance to  
chemotherapeutic agents of  
*Staphylococcus* strains isolated  
from outpatients and  
hospitalized patients**

**Ph.D. Candidate:** Laura-Mihaela Simon

**Scientific Coordinator:** Prof. Dr. Lia-Monica Junie

Cluj-Napoca  
2012

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	12
<b>CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Genus <i>Staphylococcus</i></b>	17
1.1. Historic	17
1.2. Taxonomy	18
1.3. General characteres	18
1.4. Habitat and representatives of the genus	19
<b>2. Pathogenesis of <i>S. aureus</i> infections</b>	20
2.1. Surface pathogenicity factors	20
2.1.1. Capsular polysaccharide	20
2.1.2. Peptidoglycan and teichoic acids	20
2.1.3. Protein A	21
2.2. Enzymes	21
2.3. Toxins	24
2.4. Superantigenes	25
2.5. Biofilms	26
2.6. Tissue Invasion Stages	29
2.7. Humoral and cellular immunity in staphylococcal infections	31
<b>3. Infections</b>	32
3.1. Infections caused by <i>S. aureus</i>	32
3.2. Infections of CNS	36
3.3. Predisposing factors for <i>S. aureus</i> infections	37
<b>4. Resistance of staphylococci to antibiotics</b>	39
4.1. Resistance to $\beta$ lactams	39
4.2. Resistance to aminozides	40
4.3. Resistance to tetracyclines	41
4.4. Resistance to macrolides, lincosamides, streptogramines and ketolides	41
4.5. Resistance to trimetoprim-sulfametoxazol	42
4.6. Resistance to quinolones	42
4.7. Resistance to fosfomicine	42
4.8. Resistance to fusidic acid	42
4.9. Resistance to rifampine	42

4.10. Resistance to glycopeptides	42
4.11. Resistance to oxazolidinones	43
4.12. Associated Resistance	43
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Study 1 - Antibiotic resistance of strains of the genus <i>Staphylococcus</i></b>	47
1.1. Introduction	47
1.2. Materials and methods	48
1.3. Results	57
1.3.1. Antibiotic resistance of staphylococci strains isolated from patients from the Pneumology Clinic	57
1.3.1.1. Bacterial species isolated	57
1.3.1.2. Distribution by age	57
1.3.1.3. Distribution by gender	58
1.3.1.4. Distribution by pathological products	59
1.3.1.5. Patterns of resistance	60
1.3.2. Antibiotic resistance of staphylococci strains isolated from patients from Pediatric Clinic	62
1.3.2.1. Bacterial species isolated	62
1.3.2.2. Distribution by age	63
1.3.2.3. Distribution by gender	63
1.3.2.4. The distribution by pathological products	64
1.3.2.5. Patterns of resistance	65
1.3.3. Antibiotic resistance of staphylococci strains isolated from patients from Medicala III Clinic	69
1.3.3.1. Bacterial species isolated	69
1.3.3.2. Distribution by gender	70
1.3.3.3. The distribution by pathological products	70
1.3.3.4. Patterns of resistance	71
1.3.4. Antibiotic resistance of strains of staphylococci isolated from outpatients	77
1.3.4.1. Bacterial species isolated	77
1.3.4.2. Distribution by age	77
1.3.4.3. Distribution by gender	78
1.3.4.4. The distribution by pathological products	78
1.3.4.5. Patterns of resistance	80
1.3.5. Comparing the results obtained from the four medical units	82
1.3.5.1. Bacterial species isolated	82
1.3.5.2. Distribution by age	83
1.3.5.3. Distribution by gender	83
1.3.5.4. The distribution by pathological products	84

---

1.3.5.5. Patterns of resistance	85
1.4. Discussions	88
1.5. Conclusions	92
<b>2. Study 2 - Effect of antibacterial plant extracts on <i>S. aureus</i> strains</b>	94
2.1. Introduction	94
2.2. Materials and methods	97
2.3. Results	100
2.4. Discussions	107
2.5. Conclusions	109
<b>3. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	110
<b>REFERENCES</b>	111
<b>ABBREVIATIONS</b>	10

**Keywords:** Resistance; Chemoterapic agents; MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*); *Staphylococcus*; Plant extracts.

## INTRODUCTION

The development of antibiotic resistance among *S. aureus* strains is one of the greatest challenges facing microbiologists. The penicillin resistance mediated by  $\beta$ -lactamase was reported in the first 4 years after introducing penicillin G in clinical practice.

In recent years, the percentage of methicillin resistance staphylococci increased substantially, probably because of the indiscriminate use of antibiotics.

Nosocomial infections caused by *S. aureus* represent an important public health problem, being an important cause of morbidity and mortality.

## I. CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE

### 1. Genus *Staphylococcus*

Genus *Staphylococcus* is a part of *Staphylococaceae* Family, together with genus *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, and *Salinicoccus*.

**Genus *Staphylococcus*** is currently composed of 38 species (18 species can be isolated from humans) and 17 subspecies.

Of the 38 species, 3 are important in human pathology: *S. aureus* which is responsible for producing most human infections with staphylococci, *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*, also called white staphylococci, which are considered opportunistic.

Members of *Staphylococcus* genus are Gram positive cocci, measuring 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  in diameter, disposed isolated, in pairs, tetrad, short chains (three to four bacterial cells) or in clusters, the bacterial cells being arranged in three planes, with no well defined configuration.

Staphylococci are immobile, non-sporulated, catalase-positive and generally enveloped or have limited forming capsule capacities.

Staphylococci are ubiquitous bacteria, widespread in nature, found in humans and animals. Host and habitat range may be narrow or wide, depending on the species.

### 2. Pathogenesis of *S. aureus* infections

Pathogenesis of *S. aureus* infections is influenced by various bacterial surface components (capsular polysaccharide, protein A), adhesion factors (clumping factor, fibronectin binding protein) and extracellular proteins (coagulase, hemolizine, enterotoxins, TSST, exfoliatine, PVL).

Staphylococcal enterotoxins belong to superantigen pyrogenic toxins which include toxic shock toxin (TSST-1), streptococcal pyrogenic exotoxins (SPE A, B, C, F, G, H and J) and streptococcal superantigen.

*S. aureus* forms biofilms on the surface of catheters and prostheses and produce serious infections. *S. aureus* biofilms are more resistant to antibiotics than planktonic forms, which requires the introduction of new antibiotics that inhibit the enzymes produced by the biofilms.

### 3. Infections produced

The most common infections caused by *S. aureus* involve the skin and are suppurative. These superficial infections can spread through lymphatic or blood-continuity and causing a large variety of visceral infection.

Sources of infection are even own staphylococci on skin, respiratory and digestive system. From these levels, bacteria may penetrate the skin lesions or hair



follicles, sebaceous glands or sweat. The extent of infection depends on the infecting dose, bacterial virulence and host immune status.

Skin and subcutaneous tissue infections are characterized by intense suppuration, local necrosis and local abscess formation.

Basic anatomical lesions induced by *S. aureus* is represented by a pyogenic abscess. In addition, in certain circumstances, activation of exotoxin by lymphocytes may dominate the clinical symptoms (food poisoning, TSS).

CNS are etiological agents of nosocomial infection and the rate of infection is linked to increased use of prostheses and invasive devices and to the increasing number of immunocompromised patients in hospitals. In recent years, CNS have become more involved in the development of human sepsis.

#### **4. Resistance of stafilococci to antibiotics**

The increased empirical and abusive use of antibacterial chemotherapy generated the emergence of multi-resistant bacteria capable of producing nosocomial infections in surgical, intensive care units or in any department in which patients are immunocompromised.

The changing the bacterial flora sensitivity to chemotherapeutic agents is due to the constantly changing of antibacterial treatments.

*S. aureus* methicillin resistance is associated with other resistance mechanisms generating the inactivation of other antibiotics.

### **II. PERSONAL CONTRIBUTION**

#### **Study 1. Resistance to antibiotics of *Staphylococcus* strains**

The purpose of this study was to evaluate the distribution of antibiotic resistance phenotypes of staphylococci strains isolated from various clinics from Cluj-Napoca from March 2009 to March 2011.

The objectives of the study were:

1. The isolation and identification of *Staphylococcus* strains
2. The antibiotic susceptibility testing of isolates
3. The detection of the main antibiotic resistance phenotypes
4. The interpretation of results by comparing them with literature.

## 1.2. Material and methods

The specimen collection was performed according to the location of infection: pus, urine, sputum, secretion otitis, nasal, conjunctival, CSF.

*Staphylococcus* species were identified based on morphological, cultural properties, the production of coagulase, the enzymes activities and acid production by sugars fermentation.

The chemotherapy sensitivity testing of isolated strains was performed using disc diffusion Kirby-Bauer method with manual reading and the automated testing using Vitek 2 Compact system (bioMérieux).

## 1.3. Results

We included in this study a total of 908 strains isolated from patients hospitalized in Pneumology Clinic (287 strains), Pediatrics I, II and III (315 strains), Medicala III Clinic (96 strains) and from outpatients (210 strains).

Of all isolates, 74% were *S. aureus* strains (672 strains), and 26% (236 strains) were coagulase-negative staphylococci (CNS).

Considering the CNS isolated from patients in the three clinics and from outpatients, most strains were isolated from the Medicala III Clinic (37.5%), followed by Pediatric Clinics (30.5%), and Pneumology Clinic (13.6%).

Of all staphylococci strains (908 strains), 554 (61.01%) strains were isolated from male patients, and 354 strains (38.98%) were isolated from female patients.

In Pneumology and Pediatric Clinics, most strains of *S. aureus* were isolated from sputa, and in Medicala III Clinic and from outpatients most of the strains were isolated from abscesses, wounds, puncture fluid, and pus.

The majority of CNS strains isolated from Pneumology Clinic were isolated from urine, and in Medicala III Clinic and from outpatients most of the strains were isolated from bronchial abscess, tracheal secretions, central catheter. From Pediatric Clinics, CNS were predominantly isolated from urine.

Compared with CNS strains, *S. aureus* strains isolated from pediatric patients showed higher rates of resistance to penicillin - 210 strains (66.66%), erythromycin- 145 strains (46.03%), and clindamycin- 77 (24.44 %). CNS strains were resistant to penicillin- 87 strains (27.61%), erythromycin- 64 strains (20.31%), and clindamycin- 47 strains (14.92%). SCN strains showed higher rates of resistance to gentamicin- 44 strains (13.96%), ciprofloxacin- 40 strains (12.69%), nitrofurantoin- 26 strains (8.25%), and trimetoprim-sulfametoxazol- 59 strains (18.73%).

*S. aureus* strains isolated from patients in the Medicala Clinic III had higher rates of resistance to penicillin- 58 strains (60.41%), erythromycin- 38 strains (39.58%),

and clindamycin- 32 (33.33 %), gentamicin- 34 strains (35.41%), ciprofloxacin- 34 strains (35.41%), imipenem- 34 strains (35.41%), moxifloxacin- 34 strains (35.41%), and rifampin- 34 strains (35.41%). CNS strains showed high rates of resistance to penicillin-resistant- 24 strains (25%), erythromycin- 22 strains(22.91%), and imipenem- 16 strains and rifampin- 10 strains (10.41%).

*S. aureus* strains isolated from outpatients showed higher rates of resistance to penicillin- 110 strains (52.38%), erythromycin- 120 strains (57.14%). CNS isolated from outpatients were resistant to clindamycin- 31 strains (14.76%), gentamicin- 12 strains (5.71%), ciprofloxacin- 12 strains (5.71%), nitrofurantoin- 8 strains (3.8% ), and trimetoprim-sulfametoxazol- 12 strains (5.71%).

Of all methicillin-resistant strains isolated from patients from Medicala III Clinic, and from outpatients ambulatory pediatrics, most strains - 166 strains (59.28%) were *S. aureus* and were isolated from the Pediatric Clinics. Most of methicillin-resistant CNS strains, were *S. epidermidis*- 35 strains (11.11%) and most of them were isolated from Pediatric and Medicala III Clinics.

## 1.5. Conclusions

1. We included in this study a total of 908 strains isolated from 763 patients (84%) hospitalized in 3 clinics and 145 (16%) outpatients. *S. aureus* remains the most important representative of the genus *Staphylococcus* that causes infections in adults and children, 74% of all isolated staphylococci strains were *S. aureus* (672 strains).
2. The majority of staphylococci strains, 554 strains (61.01%) were isolated from male patients.
3. From all 672 *S. aureus* strains isolated from the four units, most were isolated from abscesses, wounds, pus, fluid puncture- 187 strains (27.82%), sputa (24.7%)- 166 strains, bronchial lavages (6.25%)- 42 strains, bronchial aspirates (5.35%) - 36 strains, pharyngeal exudates- 74 strains (11%).
4. The 236 strains SCN were isolated mainly from wounds, pus, eschar-69 strains (29.23%), urine- 69 strains (29.23%), central catheters- 32 strains (13.55%), tracheal secretions, bronchial aspirates - 14 strains (5.93%), conjunctival discharge, ear- 17 strains (9.18%), blood cultures- 2 strains (1.08%). Most SCN strains were isolated from Pediatric Clinic- 96 strains (40.67%) and from outpatients- 65 strains (27.54%).

5. The *S. aureus* strains isolated from patients from Medical III Clinic had higher rates of resistance to penicillin, erythromycin- 38 strains (39.58%) and clindamycin- 32 (33.33%), gentamicin- 34 strains (35 , 41%), ciprofloxacin- 34 strains (35.41%), imipenem- 34 strains (35.41%), moxifloxacin- 34 strains (35.41%) and rifampicin- 34 strains (35.41%). SCN strains showed high rates of resistance to penicillin -24 strains (25%), erythromycin-22 strains (22.91%) strains and imipenem- 16 strains and rifampicin- 10 strains (10.41%).
6. Compared with CNS strains, *S. aureus* strains isolated from pediatric patients showed higher rates of resistance to penicillin - 210 strains (66.66%), erythromycin- 145 strains (46.03%) and clindamycin- 77 (24.44 %). SCN strains showed higher rates of resistance to gentamicin- 44 strains (13.96%), ciprofloxacin- 40 strains (12.69%), nitrofurantoin- 26 strains (8.25%) and trimetoprim-sulfametoxazol- 59 strains (18, 73%).
7. Of all methicillin-resistant strains isolated from patients in the Medical Clinic III, Pediatric Clinics and from outpatients, 166 strains (59.28%) were *S. aureus*. The highest proportion of MRSA strains was reported in the Medical Clinic III, 41,66% (40 strains), followed by the Department of Pediatrics, 26.03% (82 strains), ambulatory 20.95% (44 strains) and Clinic of Pneumology, 13.31% (35 strains).
8. Of methicillin-resistant strains SCN, in all hospital units predominated *S. epidermidis*, followed by *S. haemolyticus* and *S. saprophyticus*. The highest percentage of methicillin-resistant strains of CNS was reported for *S. epidermidis* (18.75%) isolated from Medical Clinic III.
9. Of all methicillin-resistant strains isolated from patients in the Medical Clinic III, Pediatric Clinics and from outpatients, most of the strains- 166 strains (59.28%) were *S. aureus* and were isolated from the Pediatric Clinic. the majority of CNS methicillin-resistant strains were *S. epidermidis*- 35 strains (11.11%) and were isolated Pediatric and Medical III Clinic
10. No VISA or VRSA strains were isolated
11. Rate of antimicrobial resistance MRSA in community and its spread are increasing.
12. To choose an optimized therapy by removing the antibiotics become ineffective and ultimately not a proper monitoring of staphylococcal infections

is important to know the phenotypes circulating in our geographical area to improve the quality of medical assistance.

13. The results of our studies are concordant with data from literature and reveals that the emergence, spread and selection of antibiotic resistant bacteria is an important public health problem. The emergence of resistant strains is a phenomenon that can not be stopped, but the conversion of resistant strains in populations resistant to antibiotic therapy is favored by irrational chemiotherapeutic treatment.

## **Study 2.** Antibacterial activity of some plant extracts on *S. aureus* strains

Despite the pharmaceutical industry produces new antibiotics, in recent years the resistance to chemotherapics is growing. This problem generates serious question marks over the future use of chemotherapics, which requires taking measures to control the use of antibiotics, the development of further research to identify molecular means of acquiring antibiotic resistance and finding new antibacterial substances, synthetic or natural.

Various plant extracts are evaluated all over the world for potential antibacterial activity. It covers many bacterial species, including those responsible for causing nosocomial infections, including *S. aureus*.

The purpose of this study was to investigate the antibacterial properties of alcoholic extracts and essential oils derived from plants against *S. aureus* strains isolated from outpatients and hospitalized patients.

### **2.2. Material and Method**

We included in this study 50 *S. aureus* strains isolated from various hospitals in Cluj-Napoca and ambulatory.

The strains identification was based on morphological characters, cultural, biochemical and antigenic tests, as described in Study I, Chapter Material and Methods.

For each strain the susceptibility testing was performed using disc diffusion Kirby-Bauer method with manual reading (CLSI). The natural products tested were:

- A. tincture of marigold (*Callendulae flos*) from Hofigal company
- B. Hawthorn tincture (*Folium Crataegi cum floea*) from Fares company
- C. *Melissa officinalis* essential oil from Fares company
- D. sage tincture (*Salviae folium*) from Fares company
- E. propolis tincture

- F. Biosept forte (natural antibiotic) from Fares company containing 80% thyme essential oil (*Thyme aetheroleum*) and 20% cloves essential oil (*Caryophyllorum aetheroleum*)

In vitro antibacterial activity of natural products was tested on Mueller Hinton solid culture media in Petri dishes (90mm).

### 2.3. Results

For marigold tincture (*Callendulae flos*), the inhibition zone diameters for MSSA staphylococci were between 5-18 mm, and 4 MSSA strains were resistant. For MRSA strains, the inhibition zone diameters were between 7-14 mm.

For hawthorn tincture (*Folium Crataegi cum flore*), the inhibition zones diameters for MSSA strains were between 5-17 mm. In case of MRSA strains, the inhibition zone diameters were between 5-14 mm, and 9 strains were resistant.

For the essential oil of *Melissa officinalis*, the inhibition zones diameters for MSSA were between 12-25 mm. In case of MRSA strains, the diameters were between 12-22 mm.

In case of sage tincture (*Salviae folium*), the inhibition zone diameters for MSSA strains were between 9-27 mm. For MRSA strains, the inhibition zone diameters were between 8-18 mm, and 9 strains were resistant.

For propolis tincture, the inhibition zone diameters for MSSA strains were between 9-26 mm. In case of MRSA strains, the inhibition zone diameters were between 16-24 mm.

In case of Biosept forte product, the inhibition zone diameters for MSSA strains were between 51-61 mm. For MRSA strains, the inhibition zone diameters were between 40-65 mm.

The MSSA strains showed inhibition zone diameters  $\geq 10$  mm, for *Melissa officinalis* oil at 100% of strains, the tincture of propolis at a rate of 93.33% of strains, for *Salviae folium* at a rate of 86.66% of strains, and a rate of 46.66% for both *Calendula* tincture and for the hawthorn tincture.

MRSA strains showed inhibition zone diameters  $\geq 10$  mm, for *Melissa officinalis* oil and propolis tincture in 100% of strains, for *Salviae folium* at a rate of 97.14% of strains, a rate of 28.57% for Hawthorn tincture, and at a rate of 14.28% for *Calendula* tincture.

### 2.5. Conclusions

1. All six plant extracts tested on *S. aureus* strains had antibacterial activity.
2. The best antibacterial activity were observed with Biosept forte product.
3. The essential oil of *Melissa officinalis* and propolis showed significant antibacterial activity.
4. Sage tincture (*Salviae folium*), hawthorn (*Folium crataegi*) and marigold (*Callendulae flos*) showed moderate antibacterial activity.

UNIVERSITÉ DE MÉDECINE ET PHARMACIE "Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca

THESE DE DOCTORAT

**Résistance à la chimiothérapie  
de souches du genre  
*Staphylococcus* isole chez les  
patients de l'ambulatorio de  
l'hôpital**

Mihaela Laura Deak (Simon)- Doctorante

Professeur Lia Junie Monica- Directeur de these

Cluj-Napoca  
2012

# TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION</b>	12
<b>L'ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES</b>	
<b>1. Genre <i>Staphylococcus</i></b>	17
1.1. Historique	17
1.2. Taxonomie	18
1.3. Caractères générales	18
1.4. Habitat et représentants du genre	19
<b>2. La pathogénie des infections à <i>S. aureus</i></b>	20
2.1. Facteurs de pathogénicité de la surface	20
2.1.1. Polysaccharides capsulaires	20
2.1.2. Peptidoglycane et d'acides gras teichoïci	20
2.1.3. Protéine A	21
2.2. Enzymes	21
2.3. Toxines	24
2.4. Superantigènes	25
2.5. Les biofilms	26
2.6. Les étapes de l'invasion des tissus	29
2.7. L'immunité humorale et cellulaire dans les infections staphylococques	31
<b>3. Infections produites</b>	32
3.1. Les infections causées par <i>S. aureus</i>	32
3.2. Les infections causées par CNS	36
3.3. Les facteurs prédisposants des infections à <i>S. aureus</i>	37
<b>4. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques</b>	39
4.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines	39
4.2. Résistance aux Aminozydes	40
4.3. Résistance à la Tétracycline	41
4.4. Résistance aux Macrolides, Lincosamides, Streptogramines et les Kétolides	41
4.5. Résistance au Triméthoprime-sulfaméthoxazole	42
4.6. Résistance aux Quinolones	42
4.7. Résistance au Fosfomicin	42



4.8. Résistance à l'acide fusidique	42
4.9. Résistance à la Rifampicine	42
4.10. Résistance aux Glycopeptides	42
4.11. La résistance aux Oxazolidinones	43
4.12. Résistance associée	43
<b>CONTRIBUTION PERSONNELLE</b>	
<b>1. Étude 1 - La résistance aux antibiotiques des souches du genre <i>Staphylococcus</i></b>	<b>47</b>
1.1. Introduction	47
1.2. Matériels et méthodes	48
1.3. Résultats	57
1.3.1. La résistance aux antibiotiques des souches de staphylocoques isolées chez des patients à la clinique de Pneumologie	57
1.3.1.1. Les espèces bactériennes isolées	57
1.3.1.2. Répartition par groupes d'âge	57
1.3.1.3. Répartition par sexe	58
1.3.1.4. La distribution des produits pathologiques	59
1.3.1.5. Les schémas de résistance	60
1.3.2. La résistance aux antibiotiques des souches de staphylocoques isolées chez des patients de la Clinique Pédiatrique	62
1.3.2.1. Les espèces bactériennes isolées	62
1.3.2.2. Répartition par groupes d'âge	63
1.3.2.3. Répartition par sexe	63
1.3.2.4. La distribution des produits pathologiques	64
1.3.2.5. Les schémas de résistance	65
1.3.3. La résistance aux antibiotiques des souches de staphylocoques isolées de patients dans le Médicale III Clinique	69
1.3.3.1. Les espèces bactériennes isolées	69
1.3.3.2. Répartition par sexe	70
1.3.3.3. La distribution des produits pathologiques	70
1.3.3.4. Les schémas de résistance	71
1.3.4. La résistance aux antibiotiques des souches de staphylocoques isolés chez les patients externes	77
1.3.4.1. Les espèces bactériennes isolées	77
1.3.4.2. Répartition par groupes d'âge	77
1.3.4.3. Répartition par sexe	78
1.3.4.4. La distribution des produits pathologiques	78
1.3.4.5. Les schémas de résistance	80
1.3.5. En comparant les résultats obtenus à partir des quatre hôpitaux	82
1.3.5.1. Les espèces bactériennes isolées	82
1.3.5.2. Répartition par groupes d'âge	83

1.3.5.3. Répartition par sexe	83
1.3.5.4. La distribution des produits pathologiques	84
1.3.5.5. Les schémas de résistance	85
1.4. Discussion	88
1.5. Conclusions	92
<b>2. Étude 2 - Effet d'extraits de plantes antibactériennes sur des souches de <i>S. aureus</i></b>	94
2.1. Introduction	94
2.2. Matériels et méthodes	97
2.3. Résultats	100
2.4. Discussion	107
2.5. Conclusions	109
<b>3. Originalité et contributions innovantes de la thèse</b>	110
<b>RÉFÉRENCES</b>	111
<b>ABRÉVIATIONS</b>	10

Mots-clés: résistance; agents de chimiothérapie; SARM (staphylocoque doré résistant à *S. aureus*); *Staphylococcus*; extraits de plantes.

## INTRODUCTION

Le développement de la résistance aux antibiotiques parmi les souches de *S. aureus* est l'un des plus grands défis auxquels sont confrontés les microbiologistes. Au cours des 4 premières années après la Pénicilline G dans la pratique clinique a été signalée médiation résistance à la Pénicilline par  $\beta$ -lactamase.

Ces dernières années, le pourcentage de staphylocoques isolés avec résistance à la Méricilline, a considérablement augmenté, tendance provoquée par l'utilisation sans discernement des antibiotiques.

Les infections nosocomiales causées par *S. aureus* est un important problème de santé publique, étant une cause importante de morbidité et de mortalité.

## I. CONNAISSANCES ACTUELLES

### 1. Le genre *Staphylococcus*

Le genre *Staphylococcus* comme partie de la Famille *Staphylococaceae* avec les genres *Gemelli*, *Jeotgalicoccus*, *Macrocooccus* et *Salinicoccus*

Le genre *Staphylococcus* est actuellement composé de 38 espèces (18 peuvent être isolés de l'homme) et 17 sous-espèces.

Parmi les 38 espèces, dont trois sont importantes en pathologie humaine: *S. aureus* responsable de la production plupart des infections humaines avec des staphylocoques, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*, aussi appelé blanc staphylocoques, sont considérés comme des opportunistes.

Les membres du genre *Staphylococcus* sont cocci Gram positif, ayant un diamètre de 0,5-1,5, disposés isolé, en paires, tétrades, chaînes courtes (trois à quatre cellules bactériennes) ou en grappes, les cellules sont disposés dans trois plans, sans une configuration bien définie.

Les staphylocoques sont immobiles, non-sporulés, catalase-positive, non-capsulés ou avec des capacités limitées de formation de la capsule.

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquistes, largement répandus dans la nature, trouvées chez l'homme et les animaux. Gamme d'hôtes et de l'habitat peut être étroit ou large, selon les espèces.

### 2. La pathogénie des infections à *S. aureus*

La pathogénicité de *S. aureus* est influencée par divers éléments de surface bactériennes (polysaccharide capsulaire, la protéine A), les facteurs d'adhésion (agglutination facteur, la protéine fibronectine) et par des protéines extracellulaires (coagulase, hemolizine, entérotoxines, TSST, exfoliatine, PVL).

Les entérotoxines staphylococciques appartenir à superantigène toxines pyrogènes comprennent la toxine du choc toxique (TSST-1), les exotoxines pyrogènes streptococcique (SPE A, B, C, F, G, H et J) et le superantigène streptocoque.

Les biofilms de *S. aureus* formée sur la surface de cathéters et de prothèses produire des infections graves, puisque les biofilms de *S. aureus* sont plus résistants aux antibiotiques que les formes planctoniques, ce nécessite l'introduction de nouveaux antibiotiques qui inhibent les enzymes spécifiques produits par les biofilms.

### 3. Les infections produits

Les infections les plus courantes causées par *S. aureus* impliquent la peau et ces infections superficielles peuvent se propager par le sang ou par voie lymphatique en provoquant une grande variété des infections viscérales.

Les sources d'infection staphylocoques sont la peau propre, la cavité nasale, les voies respiratoires ou l'intestin. A partir de ces niveaux, les bactéries peuvent pénétrer dans la peau des lésions ou des follicules pileux, des glandes sébacées ou de sueur. Étendue de l'infection dépend de la dose, de la virulence bactérienne infectant et du statut immunitaire de l'hôte.

Les infections de la peau et des tissus sous-cutanés sont caractérisés par une suppuration intense, une nécrose locale et la formation d'un abcès local.

La lésion anatomiques de base induites par *S. aureus* est représenté par un abcès pyogènes. En outre, dans certaines circonstances, l'activation de l'exotoxine par les lymphocytes peuvent dominer le tableau clinique (intoxication alimentaire, TSS).

Les CNS sont des agents étiologiques des infections nosocomiales dont l'incidence est liée à l'utilisation accrue de prothèses et de dispositifs invasifs et le nombre croissant de patients immunodéprimés en milieu hospitalier. Ces dernières années, les CNS sont devenus plus impliqués dans le développement d'une septicémie humaine.

### 4. La résistance des staphylocoques aux antibiotiques

L'augmentation de la chimiothérapie antibactérienne, l'utilisation empirique et abusive conduit à l'émergence de bactéries multi-résistantes à la chimiothérapie qui sont capable de produire des infections nosocomiales dans les services de chirurgie, les soins intensifs ou dans n'importe quel département dans lequel les patients sont immunodéprimés.

Les traitements antibactériens sont en constante évolution, ce qui a une contribution majeure à l'évolution de la résistance de la flore bactérienne aux agents chimiothérapeutiques utilisés.

La résistance à la Méricilline de *S. aureus* est associée à d'autres mécanismes de résistance qui se traduit par l'inactivation d'autres familles d'antibiotiques.

## II. CONTRIBUTION PERSONNELLE

### Étude 1. La résistance aux antibiotiques des souches du genre *Staphylococcus*

But de cette étude était de mettre en évidence la répartition des phénotypes de résistance aux antibiotiques des souches de staphylocoques isolés à partir de différentes Cliniques de Cluj- Napoca, en Mars 2009- Mars 2011.

Les objectifs de l'étude étaient les suivants:

1. L'isolement et l'identification des souches du genre *Staphylococcus*
2. Les tests de sensibilité aux antibiotiques des isolats
3. La détection des phénotypes de résistance aux antibiotiques principale
4. L'interprétation des résultats en les comparant avec la littérature.

#### 1.2. Matériels et méthodes

Le prelevement a été fait en fonction de la localisation de l'infection: le pus, l'urine, les expectorations, l'otite sécrétion nasale, conjonctivale, LCR.

Les espèces du genre *Staphylococcus* ont été identifiées sur la base des propriétés morphologiques et de culture, la production de coagulase, la présence hémolysines, de l'activité enzymatique et la production d'acide par fermentation de sucres.

Les tests de sensibilité des germes isolés a été réalisée en utilisant la technique de diffusion du disque Kirby-Bauer avec lecture manuelle et automatisés avec le dispositif VITEK 2 Compact (bioMérieux).

#### 1.3. Résultats

Nous avons inclus dans l'étude un total de 908 souches isolées chez des patients hospitalisés à la Clinique de Pneumologie (287 souches), de Pédiatrie I, II et III (315 souches), Médicale III (96 souches) et pour les patients en ambulatoire (210 souches).

Parmi les isolates au total, 74% étaient des souches de *S. aureus* (672 souches), et 26% (236 souches) de SCN.

Considérant espèces SCN isolées de patients dans les trois universités et les cliniques externes, la plupart des souches ont été isolées à partir du Clinique III Médicale (37,5%), suivie par les Cliniques de Pédiatrie (30,5%) et de la Clinique de Pneumologie (13,6%).

Parmi toutes les souches de staphylocoques (908 souches), 554 (61,01%) souches ont été isolées à partir de patients de sexe masculin et 354 souches (38,98%) ont été isolées chez des patients de sexe féminin.

Dans les Clinique de Pneumologie et de Pédiatrie, la plupart des souches de *S. aureus* ont été isolés à partir des crachats. Dans la Clinique Médicale III et en

ambulatoire la plupart des souches ont été isolées des abcès, des plaies, liquide de ponction et de pus.

Dans la Clinique de Pneumologie, la plupart des souches de SCN ont été isolés à partir d'urine et dans la Clinique Médicale III et dans l'ambulatoire la plupart des souches ont été isolées à partir d'abcès bronchique, les sécrétions trachéales, les sondes, des catheteres centrales. Dans la Clinique de Pédiatrie, les SCN ont été principalement isolé dans l'urine et les sondes.

En comparaison avec les souches des CNS, des souches de *S. aureus* isolées chez des patients pédiatriques ont montré des taux plus élevés de résistance à la Pénicilline - 210 souches (66,66%), à l'Erythromycine- 145 souches (46,03%) et à la Clindamycine- 77 (24,44 %). Les SCN isolats étaient résistants à la Pénicilline- 87 souches (27,61%), l'Erythromycine- 64 souches (20,31%) et la Clindamycine- 47 souches (14,92%). Les souches de SCN ont montré des taux plus élevés de résistance à la Gentamicine- 44 souches (13,96%), à la Ciprofloxacine- 40 souches (12,69%), au Nitrofurantoin- 26 souches (8,25%) et au Triméthoprime-sulfaméthoxazole- 59 souches (18,73%).

Les souches de *S. aureus* isolées de malades dans le Clinique Médicale III presentent des taux plus élevés de résistance à la Pénicilline- 58 souches (60,41%), à l'Erythromycine- 38 souches (39,58%) et à la Clindamycine- 32 (33,33 %), à la Gentamicine- 34 souches (35,41%), à la Ciprofloxacine- 34 souches (35,41%), à l'Imipénème- 34 souches (35,41%), à la Moxifloxacine- 34 souches (35,41%), et à Rifampicine- 34 souches (35,41%). Les souches de SCN ont montré des taux élevés de résistance à la Pénicilline- 24 souches (25%), l'Erythromycine- 22 souches (22,91%) et à Imipénème- 16 souches et à la Rifampicine-10 souches (10,41%).

Les souches de *S. aureus* isolées chez les patients externes ont montré des taux plus élevés de résistance à la Pénicilline - 110 souches (52,38%), l'Erythromycine- 120 souches (57,14%). Les SCN isolés de patients ambulatoires étaient résistantes à la Clindamycine- 31 (14,76%), la Gentamicine- 12 souches (5,71%), la Ciprofloxacine- 12 souches (5,71%), la Nitrofurantoïne- 8 souches (3,8% ) et au Triméthoprime-sulfaméthoxazole -12 souches (5,71%).

Parmi toutes les souches résistantes à la méthicilline isolées de patients dans les Cliniques Médicale III, Pédiatrie et de l'ambulatoire, la plupart des souches- 166 (59,28%) étaient *S. aureus* et étaient isolées de la Clinique Pédiatrique. La majorité des souches de SCN résistantes à la Méthicilline étaient des souches de *S. epidermidis* - 35 (11,11%) provenaient du Cliniques de Pédiatrie et de Médicale III.

## 1.5. Conclusions

1. Ont été étudiés 908 souches de staphylocoques isolés à partir de 763 patients (84%) admis à trois centres hospitaliers universitaires et 145 patients (16%) de patients ambulatoires. *S. aureus* est le représentant le plus important du

- genre *Staphylococcus* qui provoque des infections chez les adultes et les enfants, 74% de toutes les souches de staphylocoques isolés ont été *S. aureus* (672 souches).
2. La plupart des souches de staphylocoques- 554 souches (61,01%) ont été isolées chez des patients de sexe masculin.
  3. Parmi les 672 souches de *S. aureus* isolées à partir des quatre unités, la plupart ont été isolées à partir des abcès, des plaies, de pus, ponction-187 souches (27,82%), des crachats (24,7%)- 166 souches, des lavages bronchiques (6,25%)- 42 souches, des aspirations bronchiques (5,35%)- 36 souches, du pharynx exsudats- 74 souches (11%).
  4. Les 236 SCN souches ont été isolées principalement de blessures, le pus, escarre- 69 souches (29,23%), d'urine- 69 souches (29,23%), des sondes, des cathéters- 32 souches (13,55%), des sécrétions trachéales, des aspirations bronchiques- 14 souches (5,93%), la décharge de la conjonctive, l'oreille- 17 souches (9,18%), des cultures de sang- 2 souches (1,08%). La plupart des souches ont été isolées à partir du Clinique Pédiatrique- 96 souches (40,67%) et de l'ambulatoire- 65 souches (27,54%).
  5. Les souches de *S. aureus* isolées de malades dans le Médicale III Clinique ont présentes des taux plus élevés de résistance à la Pénicilline, à l'Erythromycine- 38 souches (39,58%) et la Clindamycine- 32 (33,33%), la Gentamicine- 34 souches (35,41%), la Ciprofloxacine- 34 souches (35,41%), l'Imipénème- 34 souches (35,41%), la Moxifloxacine- 34 souches (35,41%), la Rifampicine- 34 souches (35,41%). Les souches de SCN ont montré des taux élevés de résistance à la Pénicilline - 24 souches (25%), l'Erythromycine- 22 souches (22,91%), à l'Imipénème- 16 souches et à la Rifampicine- 10 souches (10,41%).
  6. En comparaison avec les souches CNS, des souches de *S. aureus* isolées chez des patients pédiatriques ont montré des taux plus élevés de résistance à la Pénicilline - 210 souches (66,66%), l'Erythromycine- 145 souches (46,03%) et la Clindamycine- 77 (24,44 %). Les souches de SCN ont montré des taux plus élevés de résistance à la Gentamicine- 44 souches (13,96%), la Ciprofloxacine- 40 souches (12,69%), les Nitrofurantoin- 26 souches (8,25%) et à la Biseptol- 59 souches (18,73%).
  7. Parmi toutes les souches résistantes à la méthicilline isolées de patients dans les Clinique Médicale III, Pédiatrie et de l'ambulatoire, 166 souches (59,28%) appartenaient à l'espèce *S. aureus*. La plus grande proportion de souches de SARM a été signalée dans la Clinique Médicale III- 41,66% (40 souches), suivie par le Département de Pédiatrie- 26,03% (82 souches), ambulatoire- 20,95% (44 souches) et Clinique de Pneumologie, 13,31% (35 souches).
  8. Parmi les souches de SCN résistant à la méthicilline dans toutes les unités hospitalières ont prédominé *S. epidermidis*, suivie par *S. haemolyticus* et *S.*

*saprophyticus*. Le plus fort pourcentage de souches de SCN résistantes à la méthicilline a été enregistrée pour l'espèce *S. epidermidis*- 18,75% isolée de la Clinique Médicale III.

9. Parmi toutes les souches résistantes à la méthicilline isolées de patients dans le Clinique Médicale III, Pédiatrie et de l'ambulatoire, la plupart des souches- 166 (59,28%) étaient *S. aureus* et étaient isolées de les Cliniques Pédiatriques. Parmi les souches de CNS résistantes à la Méthicilline, la majorité étaient de *S. epidermidis*- 35 souches (11,11%) provenaient du des Cliniques de Pédiatrie et de Médicale III.
10. Aucune souche VISA ou VRSA a été isolées.
11. Le taux et la propagation de la résistance aux antimicrobiens dans la communauté sont en augmentation.
12. Pour choisir un traitement anti-infectieux optimisé c'est nécessaire de supprimer les antibiotiques deviennent inefficaces et, finalement est important de connaître les phénotypes qui circulent dans notre zone géographique pour améliorer la qualité de l'assistance médicale.
13. Les résultats des études sont comparables avec les données de la littérature et souligne une fois de plus que l'émergence, la propagation et la sélection des bactéries résistantes aux antibiotiques est un problème important de santé publique. L'émergence de souches résistantes est un phénomène qui ne peut être arrêtée, mais la conversion de souches résistantes dans les populations résistantes est favorisée par l'antibiothérapie irrationnelle.

## **Étude 2. L' Effet antibactérien de certains extraits de plantes sur des souches de *S. aureus***

Malgré l'industrie pharmaceutique produit de nouveaux antibiotiques, au cours des années récentes est la résistance de plus en plus à la chimiothérapie. Ce problème met des points d'interrogation graves sur l'usage futur de la chimiothérapie, ce qui nécessite de prendre des mesures pour contrôler l'utilisation d'antibiotiques, de mener des recherches supplémentaires pour identifier les moyens moléculaires de l'acquisition de la résistance aux antibiotiques et de trouver de nouvelles substances antibactériennes, synthétique ou naturel.

L'état de divers extraits végétaux et évalués pour le potentiel antibactérien. Il couvre de nombreuses espèces bactériennes, parmi lesquelles *S. aureus*.

Le but de cette étude était d'étudier les propriétés antibactériennes des extraits alcooliques et les huiles essentielles contre les souches de *S. aureus* isolées chez les patients externes et de l'hôpital.



## 2.2. Matériels et méthodes

Nous avons inclus dans l'étude de 50 souches de *S. aureus* isolées de diverses cliniques à Cluj-Napoca et ambulatoires.

Identification des souches a été fondée sur des caractères morphologiques, des tests des cultures et biochimiques et antigéniques, tels que décrits dans l'étude I, chapitre Matériel et Méthodes. L'antibiogramme a été réalisée en utilisant la methode diffusimetrique Kirby-Bauer avec lecture manuel (comme CLSI).

Les produits naturels testés étaient les suivants:

- A. teinture de Calendula (*Callendulae flos*) de la société Hofigal
- B. teinture de l'aubepine (*Folium Crataegi cum flore*) de la société Fares
- C. l'huile essentielle *Melissa officinalis* de la société Fares
- D. teinture de sauge (*Salviae folium*) de la société Fares
- E. la teinture de propolis
- F. Biosept forte (antibiotique naturel) de la société Fares contenant 80% d'huile essentielle de thym (*Thymi aetheroleum*) et 20% d'huile essentielle de clou de girofle (*Caryophyllorum aetheroleum*)

In vitro l'activité antibactérienne des produits naturels a été testé sur des milieux de culture Mueller-Hinton disposes en boîtes de Pétri (90mm).

## 2.3. Résultats

Pour la teinture de souci (*Callendulae flos*), les diamètres d'inhibition pour MSSA étaient entre 5-18 mm, et quatre souches MSSA étaient résistants. Pour MRSA, les diamètres des zones d'inhibition étaient entre 7-14 mm.

Pour la teinture de l'aubepine (*Folium Crataegi cum flore*) les diamètres des zones d'inhibition pour la MSSA étaient entre 5-17 mm. Pour MRSA, les diamètres des zones d'inhibition étaient entre 5-14 mm et 9 souches étaient résistantes.

Pour l'huile essentielle de *Melissa officinalis*, les diamètres des zones d'inhibition pour la MSSA se situaient entre 12-25 mm. Pour MRSA, les diamètres des d'inhibition étaient entre 12-22 mm.

Pour la teinture de sauge (*Salviae folium*), les diamètres d'inhibition pour MSSA étaient entre 9-27 mm. Pour MRSA, les diamètres d'inhibition étaient entre 8-18 mm, 9 souches étaient résistantes.

Pour teinture de propolis, des zones de diamètres d'inhibition pour MSSA étaient entre 9-26 mm. Pour MRSA, les diamètres d'inhibition de étaient entre 16-24 mm.

Pour le produit Biosept forte, les diamètres d'inhibition pour MSSA étaient entre 51-61 mm. Pour MRSA, les diamètres d'inhibition de étaient entre 40-65 mm.

Les souches de MSSA ont montré des diamètres des zones d'inhibition  $\geq 10$  mm pour l'huile de *Melissa officinalis* à 100% des souches, pour la teinture de la propolis à un taux de 93,33% des souches, pour *Salviae folium* à un taux de 86,66%

des souches, et la proportion de 46,66%, pour la teinture de l'aubépine et de l'aubépine.

Les souches de MRSA ont montré des diamètres d'inhibition  $\geq 10$  mm, pour l'huile de *Melissa officinalis* et pour la teinture de propolis dans 100% des souches, pour *Salviae folium* à un taux de 97,14%, un taux de 28,57% pour la teinture de l'aubépine et à un taux de 14,28% pour la teinture de souci.

## 2.5. Conclusions

1. Tous les six extraits végétaux testés souches de *S. aureus* ont des effets antibactériens.
2. Les meilleurs effets antibactériens ont été observés avec le produit Biosept forte.
3. *Melissa officinalis* et le propolis ont montré une importante effect antibactérienne.
4. Les teinture de sauge (*Salviae folium*), l'aubépine (*Folium crataegi*) et le souci (*Callendulae flos*) ont montré modérés antibactériennes effets.