



MD 4218 C1 2013.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4218** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12Q 1/10* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A61B 10/00 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

<p>(21) Nr. depozit: a 2012 0080 (22) Data depozit: 2012.06.07</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.04.30, BOPI nr. 4/2013 (67)* Nr. și data transformării cererii: s 2012 0082, 2012.09.21</p>
<p>(71) Solicitant: CENTRUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: BURDUNIUC Olga, MD; COJOCARU Radu, MD; SPANU Constantin, MD; GHEORGHITĂ Stela, MD; ROȘCIN Iurie, MD (73) Titular: CENTRUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA, MD</p>	

(54) **Procedeu de diagnosticare a infecțiilor cauzate de enterobacterii producătoare de beta-lactamaze**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la medicină, în special la un procedeu de diagnosticare a infecțiilor cauzate de enterobacterii producătoare de beta-lactamaze.

Esența invenției constă în aceea că se efectuează screeningul prin metoda multiplex al reacției de polimerizare în lanț cu utilizarea tulpinilor de referință *E. coli* profil BLSE CTX-M-1 din grupul filogenetic A, *E. coli* profil BLSE CTX-M-3 din grupul filogenetic A, *E. coli* profil BLSE CTX-M-3 din grupul filogenetic B2, *E. coli* profil BLSE CTX-M-14

2
din grupul filogenetic A, *E. coli* profil BLSE CTX-M-14 din grupul filogenetic B2, *E. coli* profil BLSE CTX-M-14 din grupul filogenetic D, *E. coli* profil BLSE CTX-M-15 din grupul filogenetic A, *E. coli* profil BLSE CTX-M-15 din grupul filogenetic B2, *E. coli* profil BLSE CTX-M-15 din grupul filogenetic D, iar in cazul stabilirii unor noi tulpini se efectuează metoda de secvențiere pentru stabilirea agentului infecțios și includerea lui în lista tulpinilor de referință.

Revendicări: 1

MD 4218 C1 2013.11.30

(54) Method for diagnosis of infections caused by enterobacteria producers of beta-lactamases

(57) Abstract:

1
The invention relates to medicine, in particular to a method for diagnosis of infections caused by enterobacteria producers of beta-lactamases.

Summary of the invention consists in that it is carried out the screening by multiplex method of chain polymerase reaction using the reference strains *E.coli* profile ESBL CTX-M-1 from the phylogenetic group A, *E.coli* profile ESBL CTX-M-3 from the phylogenetic group A, *E.coli* profile ESBL CTX-M-3 from the phylogenetic group B2, *E.coli* profile ESBL CTX-M-14 from the phylogenetic group A,

2
E.coli profile ESBL CTX-M-14 from the phylogenetic group B2, *E.coli* profile ESBL CTX-M-14 from the phylogenetic group D, *E.coli* profile ESBL CTX-M-15 from the phylogenetic group A, *E.coli* profile ESBL CTX-M-15 from the phylogenetic group B2, *E.coli* profile ESBL CTX-M-15 from the phylogenetic group D, and in the case of determining new strains is carried out the sequencing method to determine the infectious agent and its inclusion in the list of reference strains.

Claims: 1

(54) Способ диагностики инфекций вызванных энтеробактериями продуцирующими бета-лактамазы

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к медицине, в частности к способу диагностики инфекций вызванных энтеробактериями продуцирующими бета-лактамазы.

Сущность изобретения состоит в том что осуществляют скрининг мультиплексным методом полимеразной цепной реакции с использованием референс-штаммов *E.coli* профиль БЛРС СТХ-М-1 филогенетической группы А, *E.coli* профиль БЛРС СТХ-М-3 филогенетической группы А, *E.coli* профиль БЛРС СТХ-М-3 филогенетической группы В2, *E.coli* профиль БЛРС СТХ-М-14 филогенетической группы

2
А, *E.coli* профиль БЛРС СТХ-М-14 филогенетической группы В2, *E.coli* профиль БЛРС СТХ-М-14 филогенетической группы D, *E.coli* профиль БЛРС СТХ-М-15 филогенетической группы А, *E.coli* профиль БЛРС СТХ-М-15 филогенетической группы В2, *E.coli* профиль БЛРС СТХ-М-15 филогенетической группы D, а в случае определения новых штаммов осуществляют метод секвенирования для определения возбудителя инфекции и его включения в список референс-штаммов.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la medicină, în special la un procedeu de diagnosticare a infecțiilor cauzate de enterobacterii producătoare de beta-lactamaze.

5 Actualmente sunt cunoscute diferite teste de diagnosticare microbiologică a agenților cauzali ai maladiilor infecțioase și de caracterizare a acestora.

Este cunoscut testul PCR conventional (Polymerase Chain Reaction sau Reacție de Polimerizare în Lanț), care constă în amplificarea enzimatică *in vitro* a unei secvențe de ADN de interes. Numărul de copii ale secvenței țintă crește exponențial cu fiecare ciclu de amplificare, deoarece fiecare secvență nucleotidică nou sintetizată constituie o matriță 10 pentru o nouă copie. Produsul PCR care reprezintă o copie ADN/ARN țintă este numit *amplicon*. Acest test permite detectarea cu specificitate înaltă a unor concentrații scăzute ale secvenței țintă [1].

Ca tulpină martor pozitiv pentru compararea datelor obținute în detecția și identificarea 15 profilurilor de rezistență a bacteriilor la antibioticele betalactamice au fost utilizate tulpinile de *E. coli* tip CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-14, CTX-M-15) depozitate în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM.

Se cunoaște testul Real Time PCR, care este o variantă a reacției PCR și constă în 20 amplificarea fragmentului ADN în timp real cu analiza acestuia [2].

Mai este cunoscută și Tehnica ADN microarray, care poate fi utilizată la detectarea 25 polimorfismului punctiform de nucleotide (SNPs) sau la detectarea de ADN (studii de hibridizare genomică comparată) sau de ARN (detectat ca ADNc după realizarea revers transcrierii) care poate fi implicat în translarea de proteine [3].

Este cunoscut, de asemenea, testul de secvențiere ADN, care reprezintă identificarea 25 tipului, felului și succesiunii nucleotidelor dintr-un fragment ADN cercetat, unde a fost efectuată amplificarea genelor tulpinii suspecte de producerea de beta-lactamaze cu spectru extins (BLSE) [4]. Rezultatele amplificării supuse secvențierii sunt comparate cu secvențele nucleotidice cunoscute. Astfel utilizând secvențierea este posibilă identificarea nu numai a genelor cunoscute, dar și a noilor variante cu depozitarea acestora în Colecția Națională de 30 Microorganisme Neapatogene care ulterior pot servi ca tulpini de referință în determinarea markerilor de rezistență la antibioticele betalactamice (BLSE).

Cea mai apropiată soluție de procedeu propus este procedeu de determinare a rezistenței la antibiotice (screening a BLSE) a bacililor gram-negativi cu utilizarea testelor 35 de diagnosticare microbiologică a agenților cauzali ai maladiilor infecțioase și de caracterizare a acestora, și anume: PCR convențional sau PCR Real Time (8 ore) pentru screening și tehnica ADN microarray (24 ore) sau secvențierea (12 ore) pentru confirmare, unde procedeu durează 20...32 ore [5].

Dezavantajul acestor teste constă în timpul îndelungat de determinare și caracterizare a 40 microorganismelor rezistente la antibiotice și de determinare a profilului BLSE ce împiedică prescrierea precoce a preparatului antibacterian etiotrop.

Problema pe care o soluționează invenția propusă constă în elaborarea unui procedeu de depistare rapidă a microorganismelor din familia *Enterobacteriaceae* producente de beta-lactamaze și profilului BLSE.

55 Esența invenției constă în faptul că se propune un procedeu de diagnosticare a infecțiilor cauzate de enterobacterii producătoare de beta-lactamaze care constă în aceea că se efectuează screeningul prin metoda multiplex al reacției de polimerizare în lanț cu utilizarea tulpinilor de referință (*E. coli* profil BLSE CTX-M-1 din grupul filogenetic A, *E. coli* profil BLSE CTX-M-3 din grupul filogenetic A, *E. coli* profil BLSE CTX-M-3 din grupul filogenetic B2, *E. coli* profil BLSE CTX-M-14 din grupul filogenetic A, *E. coli* profil BLSE CTX-M-14 din grupul filogenetic B2, *E. coli* profil BLSE CTX-M-14 din grupul filogenetic D, *E. coli* profil BLSE CTX-M-15 din grupul filogenetic A, *E. coli* profil BLSE CTX-M-15 din grupul filogenetic B2, *E. coli* profil BLSE CTX-M-15 din grupul filogenetic D), iar în cazul stabilirii unor noi tulpini se efectuează metoda de secvențiere pentru stabilirea agentului infecțios și includerea lui în lista tulpinilor de referință.

55 *Rezultatul invenției* constă în reducerea timpului de depistare a bacteriilor rezistente la preparatele antibacteriene și definitivarea rezultatului peste 3...4 ore, iar în cazul tulpinilor nontipabile rezultatul poate fi definitivat peste 15...16 ore.

Exemplu de realizare a invenției

Procedeuul dat a fost utilizat la testarea sensibilității la antibiotice a 196 tulpini de *E. coli* izolate din probe clinice (urină și mase fecale), colectate de la persoane cu diagnostic de infecții ale căilor urinare internate în IMSP Institutul de Cercetări Științifice din Domeniul Ocrotirii Sănătății Mamei și Copilului, IMSP SCM „Sfânta Treime” și IMSP Spitalul Clinic Municipal nr.1. La persoanele implicate în studiu s-a efectuat o analiză citobacteriologică a urinei și s-a colectat anamneza epidemiologică. La majoritatea persoanelor au fost prezente antecedente ale infecțiilor urinare – în jur de 97%. Varsta pacienților a fost variată, de la 18 până la 42 ani. Din lotul pacienților investigați femeile au fost mai des afectate decât bărbații, ponderea acestora constituind 85% din lotul cercetat. Datele anamnezei epidemiologice au demonstrat că o mare parte din pacienți au utilizat antibiotice înainte de a fi incluși în studiu. Rezistența tulpinilor *E. coli* la preparatele antimicrobiene betalactamice a fost determinată și prin metode de biologie moleculară cu utilizarea tulpinilor tip cu profil BLSE cunoscut. Spre deosebire de metodele de biologie moleculară clasice – PCR conventional sau PCR Real Time, aplicarea metodei PCR Multiplex cu utilizarea tulpinilor tip cu profil BLSE cunoscut permite cu specificitate și sensibilitate înaltă evidențierea relației dintre informația genetică și expresia acesteia pentru prescrierea precoce a tratamentului antibacterian și prevenirea consumului neargumentat de antibiotice.

20

Eficiența invenției propuse față de cea mai apropiată soluție pentru detectarea BLSE

Cea mai apropiată soluție	Durata(ore)	Invenția	Durata (ore)
Screening: PCR conventional sau PCR Real Time	8	Screening: PCR Multiplex cu utilizarea tulpinilor de referință (<i>E. coli</i> tip profil BLSE CTX-M-1, grup filogenetic A; <i>E. coli</i> tip profil BLSE CTX-M-3, grup filogenetic A; <i>E. coli</i> tip profil BLSE CTX-M-3, grup filogenetic B2; <i>E. coli</i> tip profil BLSE CTX-M-14, grup filogenetic A; <i>E. coli</i> tip profil BLSE CTX-M-14, grup filogenetic B2; <i>E. coli</i> tip profil BLSE CTX-M-14, grup filogenetic D; <i>E. coli</i> tip profil BLSE CTX-M-15, grup filogenetic A; <i>E. coli</i> tip profil BLSE CTX-M-15, grup filogenetic B2; <i>E. coli</i> tip profil BLSE CTX-M-15, grup filogenetic D)	3...4
confirmarea: Tehnica ADN micro-array sau secvențierea	24 12	confirmarea: secvențierea în cazul depistării tulpinilor non-tipabile	12
Total	20...32		3...16

Astfel, utilizarea procedeuului algoritmicizat nou de depistare a producerii betalactamazelor la microorganismele familiei *Enterobacteriaceae*, prin aplicarea tulpinilor tip profil BLSE, permite identificarea și caracterizarea rapidă a genotipului care codifică exprimarea profilurilor de rezistență la antibioticele betalactamice și duce la eficientizarea sistemului de monitorizare și supraveghere a rezistenței la antibiotice, iar, ulterior, aceasta va perfecționa tactica de prescriere a tratamentului antibacterian și va preveni consumul neargumentat de antibiotice.

30

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

MD C2

5

1. Bernards A.T., et. al. NVMM guideline laboratory detection of highly resistant microorganisms, version 1.0, 2011, p. 23
2. Bernards A.T., et. al. NVMM guideline laboratory detection of highly resistant microorganisms, version 1.0, 2011, p. 25
3. Cohen Stuart J., et. al. Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, vol. 65, p. 1377-1381
4. Bernards A.T., et. al. NVMM guideline laboratory detection of highly resistant microorganisms, version 1.0, 2011, p. 19
5. Bernards A.T., et. al. NVMM guideline laboratory detection of highly resistant microorganisms, version 1.0, 2011, p. 28

(57) Revendicări:

Procedeu de diagnosticare a infecțiilor cauzate de enterobacterii producătoare de beta-lactamaze care constă în aceea că se efectuează screeningul prin metoda multiplex al reacției de polimerizare în lanț cu utilizarea tulpinilor de referință *E. coli* profil BLSE CTX-M-1 din grupul filogenetic A, *E. coli* profil BLSE CTX-M-3 din grupul filogenetic A, *E. coli* profil BLSE CTX-M-3 din grupul filogenetic B2, *E. coli* profil BLSE CTX-M-14 din grupul filogenetic A, *E. coli* profil BLSE CTX-M-14 din grupul filogenetic B2, *E. coli* profil BLSE CTX-M-14 din grupul filogenetic D, *E. coli* profil BLSE CTX-M-15 din grupul filogenetic A, *E. coli* profil BLSE CTX-M-15 din grupul filogenetic B2, *E. coli* profil BLSE CTX-M-15 din grupul filogenetic D, iar în cazul stabilirii unor noi tulpini se efectuează metoda de secvențiere pentru stabilirea agentului infecțios și includerea lui în lista tulpinilor de referință.

Șef Secție:	IUSTIN Viorel
Examinator:	LUPAȘCU Lucian
Redactor:	LOZOVANU Maria