

RAPORT FINAL PROIECT REZBIN

Studiu asupra mecanismelor moleculare de rezistență antimicrobiană ale germenilor cu potențial de nosocomialitate din spitalele publice brașovene

Directorul de proiect: Neculoiu Carmen-Daniela, șef de lucrări, Departamentul Discipline Fundamentale, Profilactice și Clinice, Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania din Brașov

Echipa de proiect:

1. Idomir Mihaela Elena, conferențiar universitar, Departamentul Discipline Fundamentale, Profilactice și Clinice, Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania din Brașov
2. Cocuz Maria Elena, șef de lucrări, Departamentul Discipline Fundamentale, Profilactice și Clinice, Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania din Brașov
3. Costache Delia, asistent universitar, Departamentul Discipline Fundamentale, Profilactice și Clinice, Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania din Brașov
4. Moleavin Ion, conferențiar universitar, Departamentul Discipline Fundamentale, Profilactice și Clinice, Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania din Brașov
5. Teodorescu Andreea, șef de lucrări, Departamentul Discipline Fundamentale, Profilactice și Clinice, Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania din Brașov
6. Bîgiu Nicușor Florin, asistent universitar, Departamentul Specialități Medicale și Chirurgicale, Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania din Brașov
7. Dracea Laura, șef de lucrări, Departamentul Specialități Medicale și Chirurgicale, Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania din Brașov
8. Pascu Mihai Lucian, lector universitar, Departamentul Științe Sociale și ale Comunicării, Facultatea de Sociologie și Comunicare, Universitatea Transilvania din Brașov

Perioada raportată: martie 2018 - ianuarie 2019

Obiective și activități prevăzute pentru perioada raportată

1. Obiective generale:

1. Aprofundarea prin expertiza unei echipe interdisciplinare și implicarea tuturor spitalelor publice brașovene a unei probleme importante de sănătate publică.

2. Întărirea rolului Universității Transilvania din Brașov ca partener strategic în rezolvarea unei probleme prioritare comunitare prin furnizarea de competențe multidisciplinare.

2. Obiective specifice

1. Colectarea de tulpini bacteriene cu potențial de nosocomialitate izolate din diverse produse patologice din spitalele publice din municipiul Brașov.
2. Prelucrarea tulpinilor bacteriene selectate în vederea identificării speciei și pattern-ului de rezistență la antibiotice în laboratorul Spitalului Clinic Județean de Urgență Brașov.
3. Identificarea bacteriilor multirezistente la antimicrobiene (Enterobacteriaceae ESBL și CPE, MRSA, HLAR, etc.).
4. Determinarea fenotipurilor de rezistență la antibiotice a germenilor colectați.
5. Analizarea mecanismelor de rezistență prin metode de biologie moleculară.
6. Centralizarea și prelucrarea statistică a datelor obținute.
7. Diseminarea rezultatelor la nivelul comunității locale și publicații medicale de specialitate.

I. Introducere

Tema abordată în cadrul proiectului este de mare actualitate și de interes major pentru comunitate. Rezistența la antibiotice a bacteriilor implicate în patologia umană are consecințe ca prelungirea evoluției bolilor și a perioadei de infectivitate, creșterea riscului de deces prin infecții, creșterea costurilor asociate îngrijirii medicale și riscuri înalte care limitează posibilitățile unităților spitalicești de a asigura terapie intensivă, chirurgie majoră, transplanturi, terapia copiilor prematuri sau a bolnavilor oncologici.

Încă din 2014, Organizația Mondială a Sănătății (OMS), în primul raport asupra rezistenței bacteriene la antibiotice ¹ semnalează că aceasta a devenit o amenințare majoră pentru sănătatea publică la nivel global. Deoarece ultimele decenii au fost marcate de o creștere progresivă, rapidă a numărului de tulpini bacteriene rezistente implicate în patologia umană și de o rată redusă de introducere în terapie de noi antibiotice, în 2017, OMS stabilește cele mai importante categorii de germeni multirezistenți pentru care se impune introducerea de noi posibilități terapeutice, cu 3 niveluri de prioritate: nivel critic (*Acinetobacter baumannii* și *Pseudomonas aeruginosa* rezistent la carbapeneme, Enterobacteriaceae rezistente la cefalosporine generația III, carbapeneme), nivel înalt (*Enterococcus faecium* rezistent la vancomicină, *Staphylococcus aureus* MRSA, VRSA și VISA, *Helicobacter pylori* rezistent la claritromicină, *Campylobacter* și *Salmonella* rezistente la fluoro-

chinolone, *Neisseria gonorrhoeae* rezistent la cefalosporine de generația III și la fluoroquinolone), nivel mediu (*Streptococcus pneumoniae* rezistent la penicilină, *Haemophilus influenzae* rezistent la ampicilină, *Shigella* rezistent la fluoroquinolone).²

Datele colectate în anii 2011-2014 de Rețeaua europeană de supraveghere a rezistenței antimicrobiene (EARS-Net) au arătat creșterea mai pregnantă a rezistenței în cazul bacililor gram negativi, cel mai înalt nivel fiind observat la *Acinetobacter*.^{3 4 5}

Creșterea ponderii tulpinilor producătoare de ESBL (Extended Spectrum β -Lactamases) a fost mai mare la *Escherichia coli* și *Klebsiella pneumoniae*. Frecvența tulpinilor MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) a fost constantă sau a scăzut în multe țări europene rămânând semnificativă în sudul și estul Europei. La *Klebsiella pneumoniae* s-a remarcat creșterea semnificativă a rezistenței combinate la cefalosporine de generația III, aminoglicozide și fluorochinolone. Datele raportate pentru anii 2015-2017 indică aceleași tendințe, procente mari raportate de multe țări demonstrând că rezistența la antimicrobiene reprezintă în prezent o serioasă amenințare la adresa siguranței pacienților în Europa.^{7 8 9}

În ciuda prioritizării politice a rezistenței antimicrobiene ca amenințare la adresa sănătății publice, în 2017 în multe state rămân niveluri înalte de rezistență pentru anumite specii bacteriene și la anumite clase de antimicrobiene. Situația din Europa prezintă variații largi în funcție de speciile bacteriene, grupul de antibiotice și de regiunea geografică. Nivelurile cele mai mari de rezistență se mențin în sudul și estul continentului. Variațiile între țări indică faptul că bunele practici pot contribui la reducerea acestui fenomen.

În cazul *Klebsiella pneumoniae*, izolarea de tulpini producătoare de ESBL ca și rezistența combinată la mai multe grupuri de antimicrobiene (cefalosporine de generația III, fluorochinolone, aminoglicozide) a fost comună, cu procente mult mai înalte la *K. pneumoniae* decât la *E. coli*. Se constată în multe țări creșterea, peste 10%, a ponderii *K. pneumoniae* rezistente la carbapeneme în timp ce la *E. coli* este încă foarte scăzută.

Și în cazul *Acinetobacter* spp. rezistența combinată la mai multe grupuri de antibiotice a fost comună, cel mai frecvent fenotip raportat fiind rezistența combinată la fluorochinolone, aminoglicozide și carbapeneme, aspect foarte îngrijorător din punct de vedere al opțiunilor terapeutice și al prevenției infecțiilor asociate asistenței medicale. Rezistența la carbapeneme a fost frecventă și în cazul *Pseudomonas aeruginosa* înregistrând în multe țări procente înalte.

Răspândirea rezistenței la carbapeneme constituie în prezent o amenințare serioasă fiindcă acestea reprezintă antibioticele de salvare în cazul infecțiilor severe determinate de bacili gram

negativi multirezistenți (BGN). La BGN, țările care au raportat cele mai mari procente de rezistență la carbapeneme au avut și cele mai crescute procente de rezistență pentru alte grupuri de antibiotice.

Frecvența MRSA s-a menținut sau a scăzut în unele țări europene (procentul mediu: 19,6% - 2014; 16,9% - 2017) dar acesta rămâne un agent patogen cu niveluri ridicate în mai multe țări, mai ales din sudul și estul Europei iar rezistența combinată cu alte grupuri antimicrobiene a fost comună.

Se constată o tendință de creștere a procentului de tulpini de *Enterococcus faecium* VRE (Vancomycin Resistant Enterococci) în circa 1/3 dintre țări (10,4% - 2014; 14,9% - 2017).

Conform raportului EARS-Net publicat în anul 2018, situația din România este îngrijorătoare. Pentru *K. pneumoniae*, rezistența este >50% la cefalosporinele de generația a III-a, fluorochinolone, aminoglicozide și combinată și cu valori între 25% și 50% la carbapeneme. La *P. aeruginosa*, rezistența este >50% la ceftazidime, fluorochinolone, aminoglicozide, carbapeneme, piperacilină-tazobactam și combinații ale acestora. De asemenea, la *Acinetobacter* species, ponderea tulpinilor rezistente a fost >50% la fluorochinolone, aminoglicozide, carbapeneme și combinată. Pentru România, în anul 2017, ponderea MRSA a fost între 25% și 50% iar ponderea VRE s-a situat în același interval, atât pentru *E. faecalis* cât și la *E. faecium*. Valorile pentru România în cazul acestor germeni în perioada 2014-2017, sunt prezentate în Tabelele 1-3.

Tabelul 1. Rezistența *Klebsiella pneumoniae* la diverse grupe de antibiotice

Grup de antimicrobiene	2014	2015	2016	2017
Cefalosporine gen. III (CEF)	73.8%	70.7%	68%	62.5%
Fluorochinolone (FL)	66.5%	61.4%	60.8%	64.1%
Aminoglicozide (AG)	67.6%	54.1%	61.9%	58.6%
Carbapeneme (CB)	31.5%	24.7%	31.4%	22.5%
Combinată la CEF, FL, AG, CB	56.3%	49.8%	55.2%	55.4%

Tabelul 2. Rezistența *Pseudomonas aeruginosa* la diverse grupe de antibiotice

Grup de antimicrobiene	2014	2015	2016	2017
Ceftazidime (CAZ)	59.1%	65.9%	44.2%	55.9%
Fluorochinolone (FL)	55.4%	62%	51.7%	62.1%
Aminoglicozide (AG)	63.4%	63.3%	50.6%	57.6%
Carbapeneme (CB)	58.5%	66.3%	51.6%	63.4%
Piperacilină-tazobactam (TZP)	62.2%	59%	48.8%	53.4%
Combinată la CAZ, FL, AG, CB, TZP	59.6%	63%	42.9%	59.1%

Tabelul 3. Rezistența Acinetobacter spp. la diverse grupe de antibiotice

Grup de antimicrobiene	2014	2015	2016	2017
Fluorochinolone (FL)	83.7%	82.5%	91.1%	89.1%
Aminoglicozide (AG)	77%	80.9%	80.5%	83.6%
Carbapeneme (CB)	81.3%	81.5%	85%	87.4%
Combinată la FL, AG, CB	76.9%	76.9%	82.9%	81.3%

În cazul cocilor gram pozitivi, conform EARS-Net, pentru aceeași perioadă, valorile pentru România sunt prezentate în Tabelul 4. Procentele obținute pentru E. faecalis sunt influențate și de numărul variabil de tulpini raportate sau chiar lipsa unor raportări.

Tabelul 4. Ponderea MRSA și VRE

Categorie de germeni	2014	2015	2016	2017
S. aureus MRSA	56%	57.2%	50.5%	44.4%
E. faecalis VRE	76.5%	-	56.3%	44.9%
E. faecium VRE	56.25%	25%	39%	34.4%

Raportul echipei ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), publicat în iunie 2018 și întocmit ca urmare a vizitei desfășurate în România în 6-10 martie 2017, la invitația autorităților naționale pentru a evalua în mod specific situația, relevă faptul că în țara noastră nivelele rezistenței bacteriene la antibiotice sunt foarte mari comparativ cu cele din majoritatea țărilor europene și au o tendință de creștere ceea ce reprezintă un serios motiv de îngrijorare ¹⁰. Principalii factori care au contribuit la această situație sunt rata ridicată a consumului de antibiotice, utilizarea largă a antibioticelor cu spectrul larg din ultimele generații, deficiențele în infrastructura spitalelor și în activitatea personalului medical, lipsa unei baze de date consistente privind nivelele rezistenței la antibiotice, infecțiile asociate asistenței medicale (IAAM) și consumul de antibiotice, care să constituie baza unor ghiduri de tratament, prevenție și control al infecțiilor. A fost remarcată și colaborarea inadecvată la nivelul unităților spitalicești între clinicieni, epidemiologi și microbiologi.

Aspectele prezentate anterior au constituit premise ale studiului contribuind la selectarea tulpinilor bacteriene analizate.

În prezent, problema infecțiilor asociate asistenței medicale (IAAM) se pune cu tot mai multă acuitate, acestea având un impact major la nivel individual, social și economic datorită faptului că prelungesc evoluția bolii, riscul de deces este mult mai mare și cresc costurile spitalizării. Acestea constituie un capitol aparte de patologie reliefat mai pregnant în contextul progreselor medicinei moderne ce au determinat atât înmulțirea manevrelor efectuate în scop diagnostic sau terapeutic dar și utilizarea

abuzivă a antibioticelor, mai ales a celor cu spectru larg, ce conduce la selecționarea bacteriilor rezistente.

Infecțiile nosocomiale sunt determinate adeseori de bacterii rezistente la antibioticele de primă linie iar în ultima vreme de tulpini rezistente și la antibioticele de rezervă sau chiar de ultimă intenție. Prin urmare, rezistența la diverse clase de antibiotice se manifestă cu precădere în cazul IAAM, cauza principală a instalării mecanismelor de rezistență dobândită fiind consumul excesiv de antibiotice ¹¹.

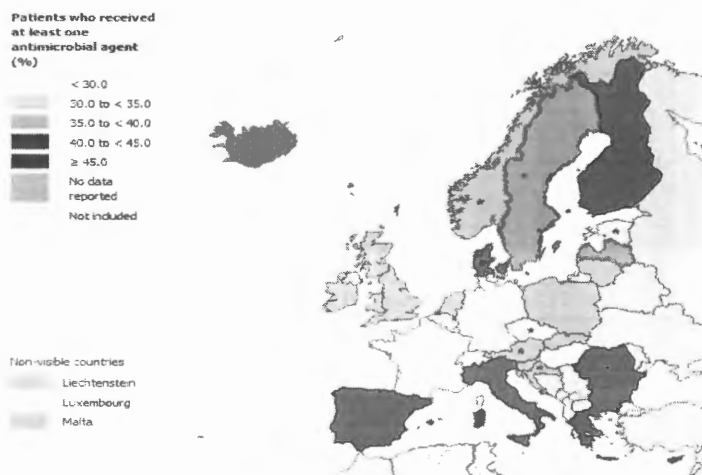


Figura 1. Prevalența pacienților tratați cu antimicrobiene la nivel european
 (https://ecdc.europa.eu/en/healthcare-associated-infections-acute-care-hospitals/database/point-prevalence-survey-indicators_

În România, IAAM sunt mult subestimate, rata de raportare fiind în intervalul 0-3% în timp ce media europeană de raportare este 6% ¹².

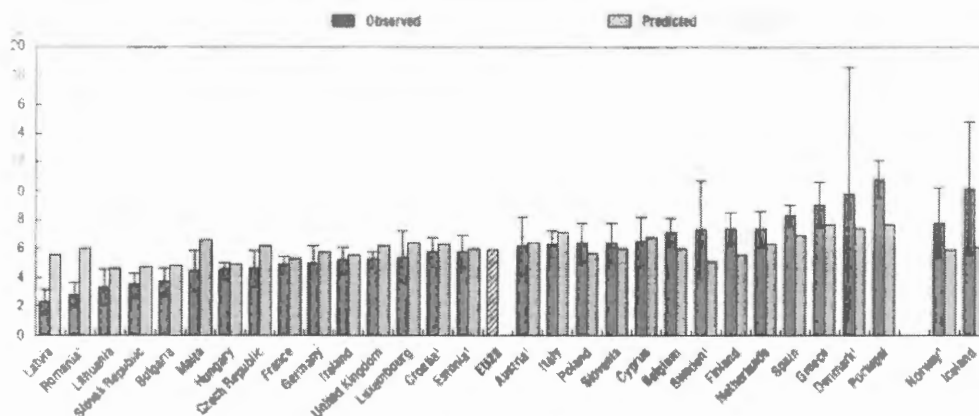


Figura 2. Prevalența IAAM la nivel european conform raportului ECDC PPS 2011-2012
 (https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/indicators/docs/ev_20170608_co05_en.pdf)

Raportul ECDC privind prevalența infecțiilor asociate asistenței medicale și utilizarea de antimicrobiene în spitalele de urgență din Europa (ECDC PPS 2011-2012) bazat pe un studiu în care au fost înrolați 231.459 pacienți, a relevat faptul că în secțiile de terapie intensivă au fost înregistrate cele mai mari incidențe atât în cazul IAAM cât și pentru pacienții tratați cu antibiotice.

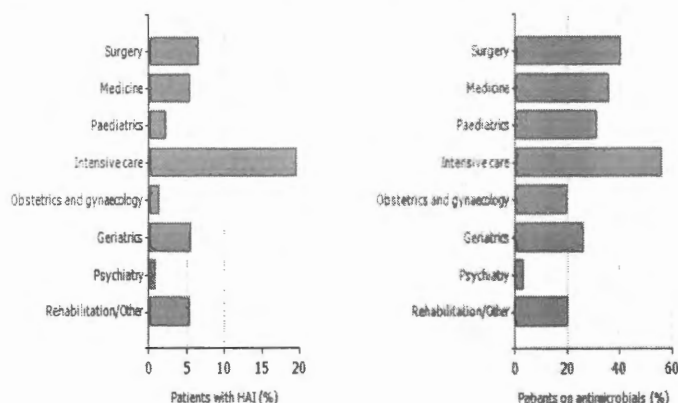


Figura 3. Prevalența secțiilor cu IAAM și a pacienților tratați cu antibiotice în spitalele de urgență europene conform raportului ECDC PPS 2011-2012

(https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/indicators/docs/ev_20170608_co05_en.pdf)

Din totalul de 15.000 de IAAM care au fost raportate, cele mai frecvente localizări au fost infecțiile respiratorii joase (23%), infecții ale plăgilor chirurgicale (20%), infecții ale tractului urinar (19%), infecții sanguine (11%) și infecții gastro-intestinale (8%), așa cum rezultă din Figura 4.

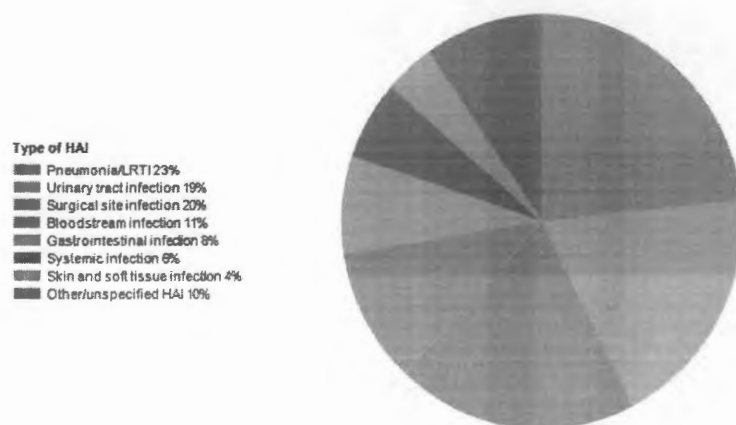


Figura 4. Distribuția tipurilor de IAAM în spitalele de urgență conform raportului ECDC PPS 2011-2012

(https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/indicators/docs/ev_20170608_co05_en.pdf)

Conform datelor furnizate de Institutul Național de Sănătate Publică, în România, în anul 2017, au fost raportate 19.607 cazuri de IAAM, cele mai multe fiind depistate în București (5.246), unde se găsesc și cele mai multe spitale din țară. Numeric, pe următoarele locuri s-au situat județul Iași (2.469), Cluj (1.720), Timiș (1.525), Sibiu (655), Galați (547), Dâmbovița (439), Suceava (429), Brașov (406) și Mureș (401).

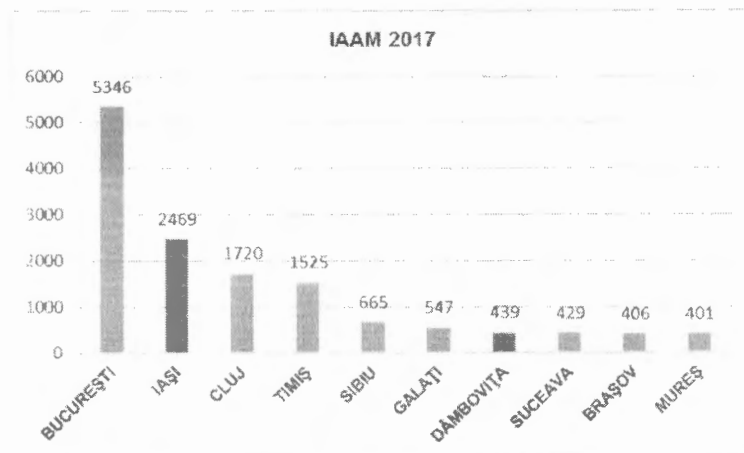


Figura 5. Distribuția cazurilor de IAAM în 2017 în România (primele 10 locuri)

În cazul anului 2018 există date centralizate, până în momentul publicării raportului, doar pentru primul semestru, numărul total al IAAM raportate fiind 9.805. Cele mai multe cazuri au fost raportate în București (2.412), Iași (1.289), Timiș (805), Cluj (711), Sibiu (311), Satu Mare (231), Galați (229), Prahova (220), Brașov (212) și Mureș (211).

Județul Brașov se menține pe locul 9 în topul celor 10 județe care raportează cele mai multe infecții din România iar incidența raportării cazurilor de IAAM nu a suferit modificări notabile de la un an la altul.

În cazul spitalelor publice din municipiul Brașov, raportările au fost realizate de Serviciile sau Compartimentele de Supraveghere și Prevenire a Infecțiilor Asistenței Medicale.

Astfel, în anul 2018, de la nivelul acestor unități medicale au fost raportate un număr total de 384 cazuri de IAAM, precizându-se ponderea tipurilor de IAAM din punct de vedere al localizării în organism precum și a germenii implicați etiologic în aceste infecții.

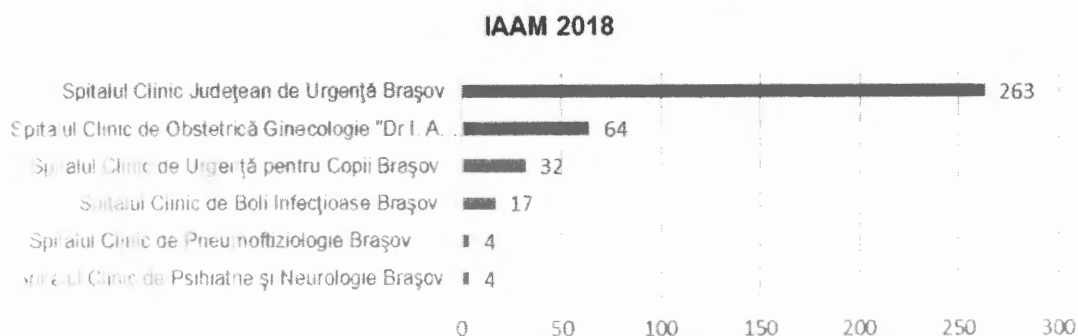


Figura 6. Reprezentarea grafică a numărului de cazuri cu IAAM raportate de spitalele publice din Braşov în anul 2018

Infecţiile localizate la nivelul sistemului gastrointestinal având ca agent etiologic *Clostridium difficile* a fost raportată în anul 2018 de 4 spitale, această categorie reprezentând uneori mai mult de jumătate din cazurile de IAAM raportate de unitatea spitalicească respectivă.

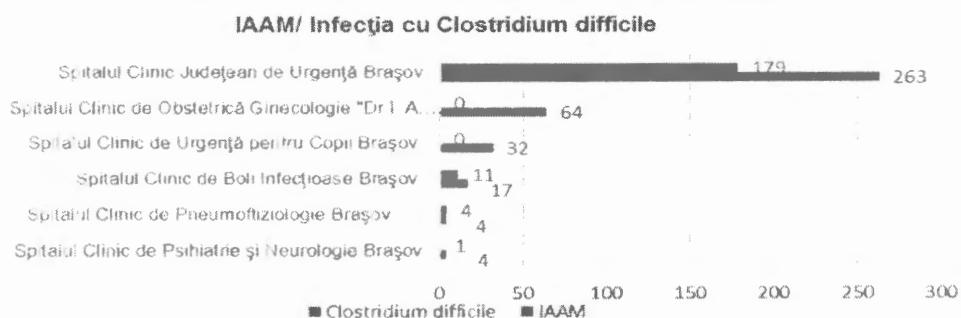


Figura 7. Reprezentarea grafică a numărului de IAAM şi de infecţiei gastrointestinale cu *Clostridium difficile* raportate de spitalele publice din Braşov în 2018

Infecţiile gastrointestinale cu *Clostridium difficile* au reprezentat 50.78% din numărul total de cazuri de IAAM raporate în anul 2018, restul având etiologie diversă. Infecţiile cu *Clostridium difficile* se datorează în primul rând consumului mare de antibiotice, în special a celor cu potenţial major de a declanşa această categorie de infecţie (cefalosporinele de generaţia 2-4, carbapenemele şi clindamicina) administrării de imunosupresoare sau antisecretorii gastrice (în special inhibitori de pompa de protoni) şi intervenţiilor chirurgicale la nivelul intestinului.

Implementarea la nivel naţional a unui sistem de supraveghere a infecţiilor cu *Clostridium difficile*, începând cu luna august 2014, a determinat o creştere a raportării infecţiilor nosocomiale gastrointestinale ca şi a numărului total de infecţii nosocomiale comunicate. Numărul crescut al infecţiilor produse de *Clostridium difficile* s-ar putea datora şi ineficienţei măsurilor de limitare a transmiterii interumane a bacteriei.

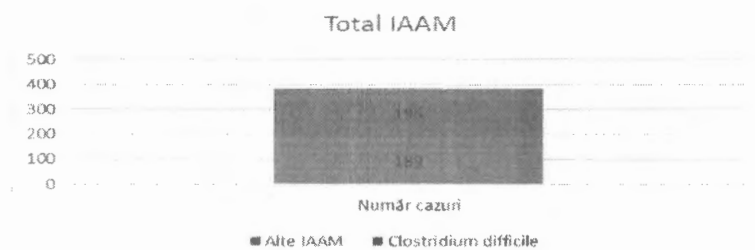


Figura 8. Reprezentarea grafică a raportului între numărul total de IAAM de altă etiologie / numărul de IAAM gastrointestinale cu Clostridium difficile raportate de spitalele publice din Brașov în 2018

Tipurile de IAAM, altele decât cele gastrointestinale, raportate de spitalele publice brașovene în 2018, au fost diferite în funcție de specificul activității medicale: pneumonie, infecția la nivelul intervențiilor chirurgicale, infecția tractului urinar, infecția la nivelul tegumentului sau al țesuturilor moi, infecții respiratorii altele decât pneumonia, infecția asociată unui cateter, infecția sistemului nervos central, infecția sanguină, infecția tractului genital, infecția la nivelul ochiului, urechii, etc.

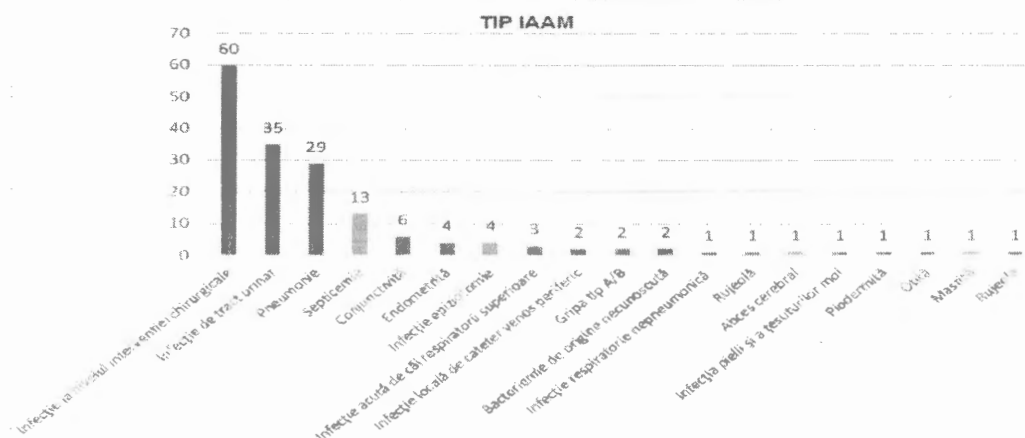


Figura 9. Distribuția tipurilor de IAAM altele decât infecțiile de la nivelul sistemului gastrointestinal raportate de spitalele publice brașovene

IAAM altele decât infecția la nivelul sistemului gastrointestinal, raportate de spitalele publice brașovene în anul 2018, sunt dominate de infecția la nivelul intervenției chirurgicale, infecția urinară, pneumonia și infecția sanguină.

Bacteriile predominante care au fost izolate din prelevatele pacienților cu aceste infecții au fost coci gram pozitivi (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*), bacili gram negativi fermentativi (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuarti*, *Enterobacter cloacae*) sau nefermentativi (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*).

Specii bacteriene implicate în IAAM

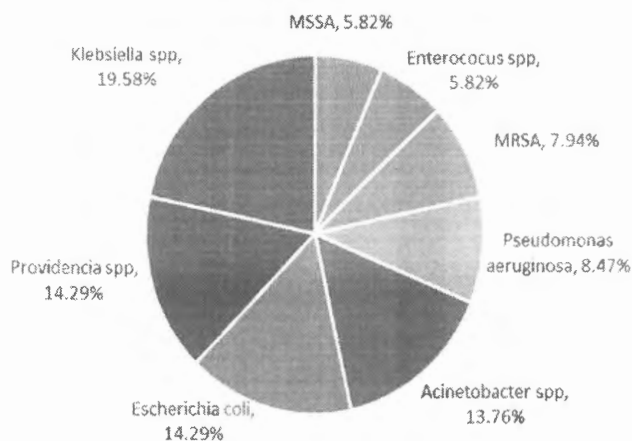


Figura 10. Ponderea primelor 8 specii bacteriene (90% din tulpini) implicate în IAAM în 2018

Datele privind rezistența antimicrobiană și modalitățile optime de testare ale acestora au fost analizate, atât pentru speciile bacteriene implicate în IAAM dar și în general pentru bacteriile izolate din diverse produse patologice recoltate de la pacienți, în compartimentele de bacteriologie din cadrul laboratoarelor de analize medicale.

Staphylococcus aureus rezistent la meticilină (MRSA) este caracterizat prin prezența unor proteine de legare la penicilină modificate, PBP2a sau PBP2c, codificate de genele mecA respectiv mecC.¹³ Beta-lactaminele au afinitate scăzută pentru aceste PBP modificate, cu excepția clasei noi de cefalosporine de tipul ceftarolinei și ceftobiprolului care au activitate anti-MRSA datorită unei afinități suficient de mari față de PBP2a și PBP2c.¹⁴

OS-MRSA sunt tulpini de MRSA mecA pozitive, sensibile la cefoxitină și oxacilină din cauza inactivării mecA, fiind semnalate în diferite părți ale lumii¹⁵. Au fost descrise și tulpini de MRSA cu expresie heterogenă a genei mecA, care fenotipic sunt sensibile la oxacilină și rezistente la cefoxitină¹⁶. Aceste tulpini de MRSA care au fenotip modificat pot fi detectate numai prin analize moleculare.

Tulpinile de Staphylococcus aureus numite "borderline susceptible S. aureus" (BORSA), prezintă nivele scăzute de rezistență la oxacilină, care nu sunt datorate producerii de PBP2a și PBP2c și sunt mecA respectiv mecC negative având un mecanism de rezistență slab caracterizat, care poate consta în alterarea PBP existent sau hiperproducția beta-lactamazelor.¹⁷

Metodele recomandate pentru detectarea rezistenței la meticilină a Staphylococcus aureus pot fi fenotipice (metoda

microdiluției în bulion cu determinarea CMI = concentrație minimă inhibitorie, metoda difuzimetrică, detectarea PBP2a cu kituri de latexaglutinare, etc.) sau genotipice (detectia genelor mecA și mecC prin PCR).¹⁸

Speciile de enterococi implicate în IAAM, în special *Enterococcus faecalis* și *Enterococcus faecium*, sunt de obicei rezistente la majoritatea antibioticelor disponibile la ora actuală. Tulpinile de enterococi cu rezistență la glicopeptide (vancomicină, teicoplanină) numite tulpini VRE (Vancomycin Resistant *Enterococcus*) determină infecții grave cu puține opțiuni de tratament. Mecanismul de rezistență este dat de ligazele vanA și vanB, codificate plasmidic care înlocuiesc D-Ala terminal din peptidoglican cu D-Lac. Această substituție reduce legarea glicopeptidelor la țintă.

Tulpinile de VRE vanA prezintă rezistență atât la vancomicină cât și la teicoplanina, în timp ce tulpinile producătoare de VanB sunt de obicei, sensibile la teicoplanină din cauza lipsei de inducție a operonului de rezistență. Alte enzime Van cu prevalența mai scăzută sunt VanD, VanE, VanG, VanL, VanM și VanN.^{19 20 21 22 23}

VVE (Vancomycin Variabil *Enterocci*) este un termen folosit pentru VRE în cazul în care expresia fenotipică genelor Van este silențioasă, datorită rearanjărilor genetice, dar aceste tulpini pot fi reversate sub presiunea de selecție a glicopeptidelor.^{24 25}

VRE low-MIC este un termen folosit pentru tulpinile vanB care au o expresie scăzută a genelor vanB și niveluri MIC (Minimum Inhibitory Concentration) sub pragul clinic de rezistență, datorită unei capacități scăzute de inducere de către vancomicină. Aceste tulpini pot deveni rezistente fenotipic în cazul expunerii la vancomicină.²⁶

Tulpinile VVE și VRE low-MIC pot să fie detectate numai prin analiză moleculară. Prevalența actuală a acestora în diferite regiuni geografice este necunoscută.

Principalul mecanism de rezistență al BGN la antibioticele β -lactamice este producerea de β -lactamaze care clivează nucleul beta-lactamic.

Beta-lactamazele sunt clasificate în patru clase: A, B, C și D în funcție de tipul de molecule hidrolizate și de structura primară²⁷: clasele A, C și D includ enzimele cu resturi de serină în situsul activ iar clasa B include enzimele zinc-dependente.²⁸

Beta-lactamazele din clasă A hidrolizează preferențial penicilinele fiind codificate în mare parte de gene situate pe plasmide care au suferit mutații de-a lungul timpului, ce au dus la apariția de fenotipuri noi de rezistență, cum este rezistența la inhibitorii beta-lactamazelor, raportată la enzimele TEM și SHV.²⁹

Beta-lactamazele cu spectru extins (ESBL = Extended Spectrum Beta-Lactamases) sunt enzime din această clasă care aparțin familiilor SHV, TEM și CTX-M³⁰ și care hidrolizează și alte β -lactamine (oxiimino-cefalosporine, cefamicine și monobactami), dar sunt sensibile la inhibitorii β -lactamazelor.

Beta-lactamazele din clasa B, numite și metalo- β -lactamaze (MBL), conțin Zn^{2+} în situsul activ, pot hidroliza o gamă largă de substraturi, inclusiv carbapenemele. Genele care codifică MBL sunt situate la nivel cromozomial/plasmidic, pot face parte din integroni ce le asigură diseminarea rapidă între specii și chiar și între genuri diferite.³¹ Cele mai comune MBL sunt cele din familiile VIM, IMP și NDM.³²

Beta-lactamazele din clasa C sunt cefalosporinaze de tip AmpC (genă de rezistență la ampicilină cu localizare cromosomală) Aceste enzimele sunt codificate de gene situate la nivelul cromozomilor, și în mai mică măsură la nivelul plasmidelor, cum ar fi DHA-1, CMY-2, ACT-1.³³ Din punct de vedere fenotipic, tulpinile AmpC hidrolizează penicilinele, cefalosporinele (inclusiv cea de-a treia generație dar, în general, nu și a patra generație) și monobactamul. În general, enzimele de tip AmpC sunt slab inhibitate de către inhibitorii clasici de ESBL, în special de acidul clavulanic.

Beta-lactamazele din clasa D au fost identificate frecvent la diverse specii din familia Enterobacteriaceae și la bacili gram negativi nefermentativi (*Acinetobacter baumannii*) implicați în IAAM. Din această clasă fac parte carbapenemazele OXA-23, OXA-24. Carbapenemaza OXA 48 hidrolizează carbapenemele cu o rată mai mică decât carbapenemazele din clasele A și B, astfel tulpinile pot fi pe deplin sensibile la cefalosporine.³⁴

Majoritatea tulpinilor de enterobacterii producătoare de carbapenemaze (CPE) coexprimă și enzime de hidroliză a cefalosporinelor de tip ESBL (CTX-M) fiind rezistente și la cefalosporine.

Asocierea mai multor tipuri de beta-lactamaze la același microorganism poate face dificilă depistarea corectă. În ghidurile de diagnostic recente au fost propuse metode alternative care să înlocuiască sau să completeze metodele fenotipice tradiționale³⁵. Cele mai utilizate dintre aceste metode sunt testele PCR standard și secvențierea de gene.

II. Material și metodă

1 Selectarea, cultivarea, identificarea fenotipică și testarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor bacteriene

Tulpinile bacteriene care au fost selectate pentru studiul molecular al mecanismelor de rezistență antimicrobiană au prezentat fenotipuri de rezistență la antibiotice, de obicei multiple, uneori și pentru antibioticele de ultimă intenție.

Categoriile bacteriene care au fost selectate în cadrul studiului au fost MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*), *Enterococcus faecium* și *Enterococcus faecalis* rezistenți la vancomicină (VRE = Vancomycin Resistant *Enterococcus*), *Klebsiella pneumoniae* și *Providencia stuarti* producătoare de carbapenemaze (CPE = Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae*) și *Pseudomonas aeruginosa* și *Acinetobacter baumannii* rezistenți la carbapeneme.

Aceste tulpini bacteriene au provenit în principal din Spitalul Clinic Județean de Urgență Brașov fiind selectate datorită identificării frecvente din produsele patologice provenite de la pacienți având infecții cu potențial de nozocomialitate, în perioada martie 2018 - ianuarie 2019.

În acest scop au fost analizate:

- buletinele de analiză cu rezultatele examenelor bacteriologice din sistemul informatic MEDIS al laboratorului SCJUBv;
- rapoartele epidemiologice puse la dispoziție de SPIAAM al aceleiași unități medicale;
- rapoartele obținute pe baza datelor care au fost colectate în WHONET în laboratorul de bacteriologie al SCJUBv.

Criteriile de includere în lotul studiat au constat în:

- izolarea din produse patologice care pot fi asociate cu infecții invazive sau cu un potențial de nosocomialitate (secreții de la nivelul unor sonde de intubație oro-traheală sau sonde urinare, secreții de plagă, lichide de puncție, etc.);

- proveniența din produse patologice diferite prelevate de la pacienți diferiți;

- posibilitatea identificării tulpinii bacteriene în laboratorul SCJUBv până la nivel de specie;

- posibilitatea efectuării unei antibiograme în laboratorul clinic al SCJUBv printr-o metodă cantitativă, cu determinarea CMI;

- prezența de fenotipuri multiple de rezistență.

Identificarea tulpinilor bacteriene incluse în studiu până la nivel de specie s-a efectuat prin utilizarea sistemului automat VITEK 2 Compact iar determinarea sensibilității la antibiotice a fost realizată prin determinarea valorilor CMI utilizând același sistem automat.

2 Conservarea tulpinilor bacteriene

Tulpinile bacteriene care au fost selectate conform criteriilor de includere în lotul de studiu au fost conservate prin congelare, pe medii de conservare care conțin, în cazul BGN, zaharoză, gelatină, apă distilată și ser de cal inactivat iar pentru CGP, mediu BHI (Broth Heart Infusion) și glicerină.

Procedura pentru conservarea tulpinilor bacteriene a constat în repartizarea în criotuburi a câte 0,3-0,5 ml mediu de conservare, la care s-au adăugat 2-3 anse bacteriologice încărcate cu cultura bacteriană de 18-20 de ore de pe un mediu solid sau cu depozitul unei culturi bacteriene dintr-un mediu lichid.

Tuburile au fost păstrate la congelator, la - 20°C.

3 Testarea genelor de rezistență prin metoda PCR (Polymerase Chain Reaction) multiplex cu hibridizarea inversă a ampliconilor

Metoda utilizată pe parcursul studiului se bazează pe amplificarea țintelor ADN printr-o reacție PCR (Polymerase Chain Reaction) multiplex și ulterior hibridizarea inversă a ampliconilor, pe o membrană de nitroceluloză care conține sonde specifice.

A fost utilizat un kit de diagnostic in vitro, AMR Flow Chip Direct, produs de Master Diagnostica, firmă ce face parte dintr-un grup de companii spaniole de biotehnologie, "Vitro Group", care se ocupă cu cercetarea în domeniul diagnosticului medical și al științelor biologice.

AMR Flow Chip Direct este un kit de diagnostic in vitro (IVD) al rezistenței antimicrobiene, care asigură detectarea rapidă a 20 de familii de gene de rezistență la antibiotice (ges, sme, kpc, nmc / imi, sim, gim, spm, ndm, vim, oxa23-like, oxa24-like, oxa 48-like, oxa51-like, oxa58-like, blaSHV, blaCTX-M, mecA, vanA și vanB) asociate cu bacterii rezistente la diferite antibiotice (MDR = Multidrug Resistant) cum sunt bacteriile gram-negative rezistente la carbapeneme, bacteriile producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL), enterococi cu rezistența la vancomicină (VRE) și stafilococi aurii rezistenți la meticilină (MRSA).

În ceea ce privește markerii rezistenței la antibiotice, kit-ul de diagnostic detectează o genă pentru rezistența la meticilină (mecA), două gene pentru rezistența la vancomicină (vanA și vanB), două pentru rezistența la $\beta\beta$ -lactamine (blaSHV și spectrul extins blaCTX-M), și 15 familii de gene pentru rezistența la carbapeneme, care cuprind majoritatea alelelor:

- kpc: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 și 23;
- sme: 1, 2, 3, 4 și 5;
- nmc/imi: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 și 9;
- ges: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 și 26;
- vim: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 și 46;
- gim: 1 și 2;
- spm, ndm: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 și 16;
- sim, imp3, 15, 19_like: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 15, 19, 20, 21, 24, 25, 28, 29, 30, 40, 41, 42 și 47;
- oxa23_like: 23, 27, 49, 73, 133, 146, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171 și 225;
- oxa24_like: 24, 25, 26, 40, 72, 139 și 160;
- oxa48_like: 48, 162, 163 și 181;
- oxa51_like: 51, 60, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 82, 83, 84, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95,

98, 99, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 115, 116, 117, 128, 130, 131, 132, 138, 144, 148, 149, 150, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 195, 196, 197, 194, 200, 201, 202, 203, 206, 208 și 223;

➤ oxa58_like: 58, 96, 97 și 164.

Testul s-a efectuat din colonii bacteriene izolate din produse patologice. Principiul metodei se bazează pe amplificarea simultană a 20 de gene de rezistență printr-o reacție multiplex PCR direct din extractul bacterian, urmată apoi de hibridizarea produsului amplificat cu sonde de ADN specific, aplicate pe o membrană de nitroceluloză.

Ampliconii biotinilați, care sunt generați după reacția PCR, sunt hibridizați pe o membrană care conține o serie de sonde specifice pentru fiecare țintă și control de hibridizare.

Această tehnologie permite hibridizarea rapidă între ampliconii PCR și sondele specifice din membrana de nitroceluloză, datorită porilor tridimensionali, ceea ce conferă un avantaj al detecției față de hibridizarea pe o suprafață convențională.

După producerea hibridizării, semnalul este vizualizat printr-o reacție imunoenzimatică între fosfataza alcalină cuplată cu streptavidină și soluția de cromogen BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/ nitro blue tetrazolium), care generează un precipitat insolubil, fixat pe membrana de nitroceluloză, în poziția în care a avut loc hibridizarea. Rezultatele sunt analizate prin scanarea membranei de nitroceluloză și analiza automată cu ajutorul programului hybriSoft™.

Implementarea acestui kit în practica clinică poate fi realizabil datorită posibilității de a identifica prezența genelor de rezistență direct din exsudatele rectale, exsudatele sau aspiratele nazofaringiene și / sau mediile de hemocultură, la pacienții infectați sau cu risc de colonizare, ca o măsură de ajutor în controlul și prevenirea infecțiilor cu bacterii cu rezistență multiplă la antibiotice.

III **REZULTATE**

1 Selectarea unui număr semnificativ de tulpini de CGP și de BGN, izolate din diferite produse patologice cu potențial de nozocomialitate, având fenotipuri multiple de rezistență antimicrobiană relevante clinic și epidemiologic.

Din analiza rapoartelor din baza de date WHONET din laboratorul Spitalului Clinic Județean de Urgență Brașov, s-au identificat categoriile de bacterii izolate din prelevatele pacienților internați în acest spital public în 2017 și 2018. A fost analizat în dinamică spectrul de germeni implicați în infecțiile pacienților spitalizați, rezultatele fiind prezentate în Tabelul 5 și Figura 11.

Tabelul 5. Germeni izolați în 2017 și 2018

Specii	Nr. tulpini	
	2017	2018
Escherichia coli	1311	1783
Klebsiella spp.	662	1079
Proteus spp.	323	349
Serratia spp.	16	41
Enterobacter spp.	13	10
Citrobacter spp.	0	4
Providencia spp.	0	117
Acinetobacter spp.	206	364
Pseudomonas spp.	297	523
Staphylococcus spp. coagulază negativi	600	163
Staphylococcus aureus	502	829
Enterococcus spp.	364	610
Streptococcus spp.	6	35

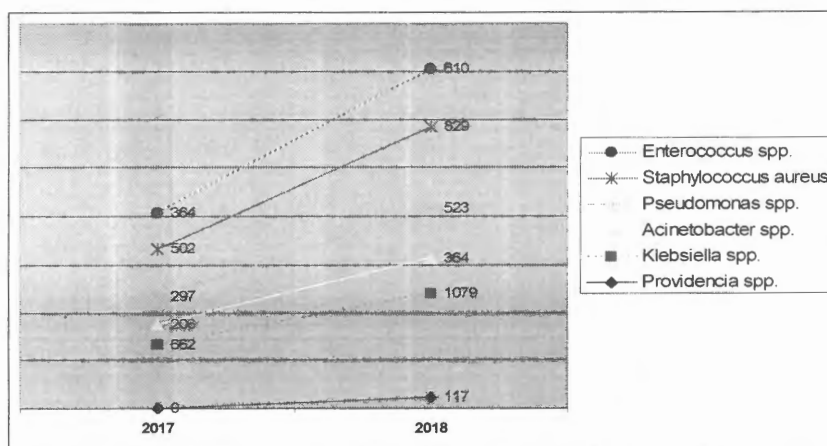


Figura 11. Dinamica numărului de tulpini din genurile incluse în studiu în perioada 2017-2018

Au fost selectate 123 de tulpini de CGN și BGN, provenite din diverse produse patologice cu potențial de nozocomialitate, de la pacienți internați în secțiile Spitalului Clinic Județean de Urgență din Brașov în perioada martie 2018 - ianuarie 2019.

Tulpinile bacteriene incluse în lotul studiat și analizate prin metode de biologie moleculară au putut fi selectate pe baza fenotipurilor de rezistență antimicrobiană multiplă, specifice fiecărei categorii de germeni.

Tabelul 6 ilustrează categoriile de germeni selectate și ponderea reprezentată de fiecare categorie în lotul studiat.

Tabelul 6. Categoriile de tulpini bacteriene selectate

Categoriile de germeni	Număr tulpini	Procent tulpini
MRSA	18	14.7%
VRE	11	8.9%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	17.1%
<i>Providencia stuartii</i>	18	14.6%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28	22.8%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	27	21.9%

2 Analizarea mecanismelor de rezistență prin metode de biologie moleculară

În cazul MRSA, ca urmare a analizei prin metode de biologie moleculară, a fost observată prezența genei de rezistență mecA la 15 (83,4%) tulpini în timp ce 3 tulpini au fost mecA negative, având în vedere faptul ca kit-ul de PCR nu conține primeri de detecție pentru gena mecC care ar putea fi prezentă la aceste tulpini.

La tulpinile VRE a fost observată prezența genei de rezistență vanA la 11 (83,4%) tulpini, iar la 2 tulpini a putut fi detectată prezența simultană a genelor de rezistență vanA și vanB. În literatura de specialitate au fost semnalate foarte rar cazuri de portaj simultan vanA și vanB³⁶, acestea fiind primele tulpini identificate în România.

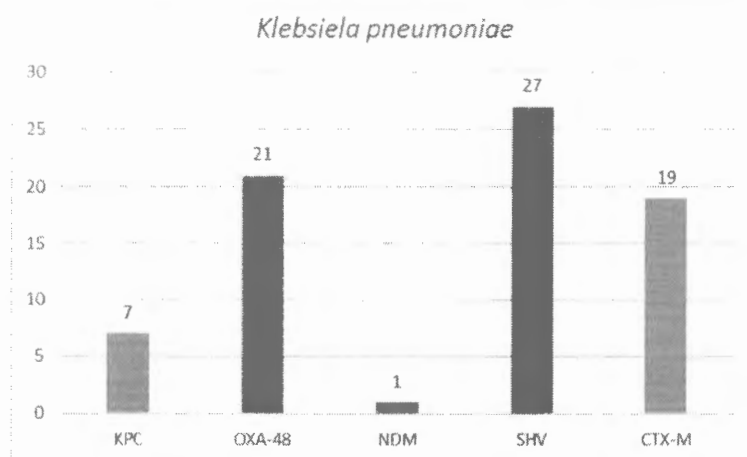


Figura 12. Distribuția beta-lactamazelor la tulpinile de *Klebsiela pneumoniae*

În cazul tulpinilor de *Klebsiela pneumoniae* testate pentru markerii genetici ai rezistenței la antibiotice a fost observată prezența genelor de rezistență ce conferă fenotip ESBL de tip SHV și CTX-M: SHV la 27 (96,4%) dintre tulpini și CTX-M la 19 (67,9%) dintre tulpini. Genele de rezistență la carbapeneme prezente la aceste tulpini au fost: OXA-48 la 22 (75%) tulpini, KPC la 7 (25%) tulpini și NDM la 1 (3,6%) tulpină, așa cum rezultă din Figura 12.

Prezența simultană a genelor pentru carbapenemaze și pentru ESBL a fost observată la toate tulpinile investigate, genotipul cel mai frecvent fiind OXA48+CTX-M+SHV prezent la 18 (64,3%) tulpini, urmat de genotipul KPC+SHV la 7 (25%) tulpini. Se remarcă faptul că în cazul unei tulpini s-a detectat prezența simultană a 2 gene de carbapenemază OXA28+NDM și a 2 gene de ESBL: SHV+CTX-M.

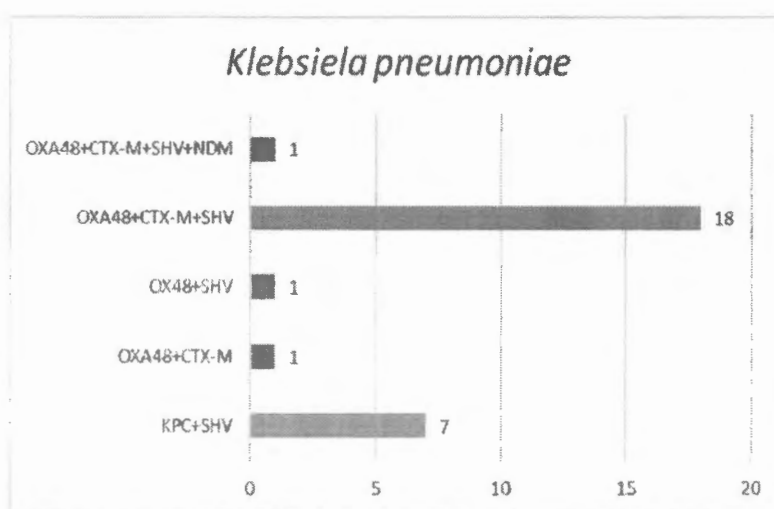


Figura 13. Distribuția genotipurilor la tulpinile de *Klebsiela pneumoniae*

Studii anterioare realizate pe tulpini de *Klebsiela pneumoniae* în România³⁷ au evidențiat prezența genelor pentru carbapenemazele OX-48, NDM și OXA-181.

La tulpinile de *Providencia stuartii* analizate a fost observată prezența genei de rezistență NDM de tip metalo- β -lactamaza la toate cele 18 (100%) tulpini studiate. New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1) este raportată ca fiind cea mai comună carbapenemază depistată la *Providencia species*.^{38 39 40}

Spre deosebire de alte categorii de BGN, speciile de *Providencia* au o rezistență intrinsecă la colistin și tigeciclină motiv pentru care tratamentul tulpinilor multirezistente este o adevărată provocare: doze mari de meropenem 2 grame la 8 ore, în perfuzie intravenoasă timp de 3 ore.⁴¹

Providencia stuartii rezistentă la carbapeneme este raportată în infecții la pacienți imuno-compromiși, de tipul infecțiilor urinare, sanguine, de tract respirator, de cateter, de țesuturi moi,

de os.⁴² În literatura de specialitate au fost raportate cel puțin 4 epidemii cu *Providencia* species rezistentă la carbapeneme: 3 au fost cauzate de *Providencia stuartii* și 1 de *Providencia rettgerii*. Toate epidemiile au apărut în unitățile de terapie intensivă. Cazurile de infecții cu *Providencia* spp. rezistente la carbapeneme trebuie rapid raportate și trebuie luate prompt măsuri de control al infecțiilor care previn răspândirea acestor tulpini. S-a raportat o epidemie cu *Providencia stuartii*, care a putut fi stinsă doar după 40 de luni de măsuri drastice de control al infecțiilor.⁴³

La tulpinile de *Acinetobacter baumannii*, a fost observată prezența următoarelor gene de rezistență la carbapeneme: OXA-23 la 23 (75%) de tulpini, OXA-24 la 4 (25%) tulpini și OXA-51 la toate tulpinile, așa cum rezultă din Figura 14.

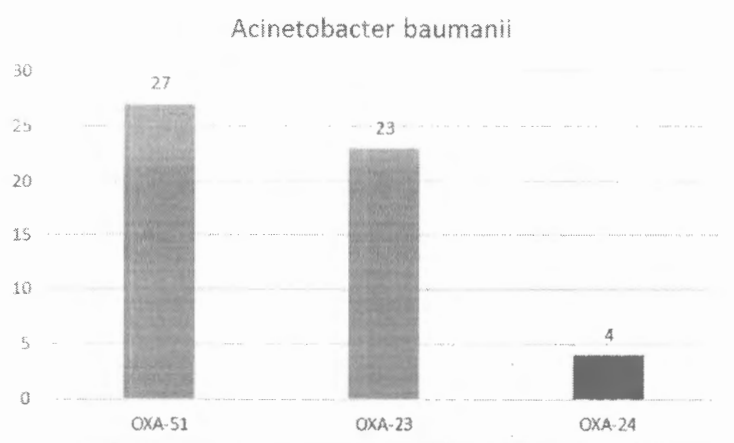


Figura 14. Distribuția carbapemenazelor la tulpinile de *Acinetobacter baumannii*

Prezența simultană a 2 gene pentru carbapenemaze a fost observată la toate tulpinile de *Acinetobacter* investigate, genotipurile detectate fiind OXA-23 + OXA-51 la 23 de tulpini și OXA-24 + OXA-51 la 4 tulpini. Gena pentru OXA-51 este considerată un marker de identificare pentru *Acinetobacter baumannii* fiind întâlnită la aproape toate tulpinile izolate din lume. Carbapenemaza OXA-51 este cromozomială și intrinsecă, rezistența clinică se observă la tulpinile cu secvența de inserție ISAbal.⁴⁴

În cazul *Acinetobacter* species carbapenemazele OXA sunt detectate cel mai frecvent, în principal enzimele OXA-23, OXA 24/40, OXA-58, OXA-143, OXA-235.⁴⁵

Tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* testate au prezentat gene de carbapenemaze de tip VIM (5 tulpini), OXA-23 (1 tulpină) și NDM (1 tulpină). Celelalte tulpini analizate nu au avut gene detectabile de carbapenemaze, fapt care ar putea să fie explicat prin lipsa de

primeri pentru alte carbapenemaze ale kit-ului utilizat sau prin mecanisme cromozomiale multiple de rezistență la carbapeneme (efluxul activ, alterarea / deficiențe ale porinelor). Prezența genei pentru VIM și NDM a mai fost semnalată în România ⁴⁶, în schimb prezența genei pentru OXA-23 la *Pseudomonas aeruginosa* este destul de rar semnalată, în special la tulpini din Iran.⁴⁷

IV CONCLUZII

1. Analizarea prin biologie moleculară a tulpinilor *MRSA* cu potențial de nosocomialitate a relevat prezența la majoritatea a genei de rezistență *mecA* (83,4% din tulpini), aspect care este în concordanță cu datele a numeroase studii publicate în literatura de specialitate.
2. În cazul *VRE*, la majoritatea a putut fi detectată gene *vanA* (83,4% din tulpini) dar au putut fi evidențiate, deși numărul de cazuri de infecții cu acești germeni a fost redus în perioada studiată și tulpini care poartă simultan genele *vanA* și *vanB*. Cunoașterea acestui aspect particular are importanță epidemiologică putând contribui la stabilirea filiației cazurilor și la monitorizarea circulației tulpinilor rezistente la glicopeptide.
3. În cazul tulpinilor de *Klebsiella pneumoniae* au putut fi depistate genotipuri diferite, cel mai frecvent fiind *OXA48+CTX-M+SHV*, aspecte care pot fi de asemenea utilizate pentru monitorizarea originii și diseminării acestor tulpini multirezistente în mediul spitalicesc și interspitale.
4. Prezența genei de rezistență *NDM*, de tip metalo-beta-lactamază, la toate tulpinile de *Providencia stuartii* analizate indică posibilitatea caracterului epidemic al răspândirii intraspitalicești a acestor germeni.
5. Oxacilinazele sunt frecvent prezente la *Acinetobacter* species conform studiilor publicate, unele fiind intrinseci (*OXA - 51*) iar altele dobândite (*OXA-23*, *OXA-24*), rezultatele fiind în concordanță cu datele din literatură.
6. Rezultatele obținute în cazul tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* care au fost analizate susțin nevoia investigării mai aprofundate a profilului genetic al acestor germeni cu mare potențial nosocomial, prezența genelor pentru VIM și NDM fiind comunicată și în alte studii din România, în schimb gena pentru *OXA-23* este rar semnalată.
7. Nivelul crescut de rezistență antimicrobiană a categoriilor bacteriene testate pe parcursul studiului susțin importanța utilizării biologiei moleculare la confirmarea fenotipurilor circulante de rezistență ale germeilor care sunt agenți redutabili ai infecțiilor nosocomiale în scopul optimizării

elaborării de protocoale care să maximizeze resursele existente pentru controlul infecțiilor cu bacterii multirezistente la nivelul spitalelor publice.

8. Rezultatele obținute permit conturarea unor viitoare direcții de cercetare în ceea ce privește aprofundarea prin tehnici de biologie moleculară a depistării mecanismelor rezistenței la categoriile de germeni selectați.
9. Diseminarea rezultatelor prin rapoarte emise către spitalele publice participante la proiect, publicarea de articole în reviste medicale de largă circulație și de înaltă valoare științifică, comunicări și dezbateri cu diferite categorii de populație și prin mijloacele mass-media poate contribui la creșterea cunoașterii în domeniu și creșterea rolului universității în comunitate.
10. Valoarea studiului derivă din implicarea într-o problemă prioritară, de o mare actualitate pentru sănătatea publică, a unei echipe interdisciplinare cu expertiză din mediul academic dar și din diverse spitale publice brașovene în analizarea și diseminarea datelor obținute din prelucrarea prin metode de vârf a unor tulpini bacteriene multirezistente de interes clinic și științific, importante în etiologia infecțiilor intraspitalicești.

V RECOMANDĂRI

Studiul realizat poate sta la baza următoarelor recomandări privind activitatea de prevenție și control a infecțiilor nosocomiale cu germeni multirezistenți în spitalele publice:

1. Este absolut necesară preocuparea permanentă pentru dotarea laboratoarelor cu resurse adecvate pentru screening-ul, identificarea până la nivel de specie, testarea sensibilității prin metode cantitative, determinarea fenotipurilor bacteriilor multirezistente.
2. Este necesară constituirea unor baze de date pentru monitorizarea rezistenței la antibiotice în scopul urmăririi ponderii și circulației fenotipurilor multirezistente de importanță clinică și epidemiologică.
3. Monitorizarea rezistenței bacteriene la antibiotice permite identificarea secțiilor cu risc mai înalt de nosocomialitate și elaborarea unor strategii adecvate pentru reducerea acestuia.
4. Actualizarea permanentă a datelor privind rezistența la antimicrobiene reprezintă un aspect foarte important pentru îmbunătățirea cunoștințelor personalului medical cu consecințe directe asupra optimizării achiziției și prescripției de antibiotice, a limitării răspândirii intra- și interspitale

sau în comunitate a germeilor multirezistenți, a optimizării diagnosticului bacteriologic și reducerii costurilor pentru îngrijiri medicale.

5. Accesul la un laborator de biologie moleculară permite creșterea calității diagnosticului de laborator al infecțiilor prin confirmarea cu multă acuratețe a caracterului multirezistent al tulpinilor bacteriene izolate, identificarea rapidă a fenotipurilor care crează mari dificultăți în terapia etiologică medicilor de diferite specialități, monitorizarea circulației intraspitalicești a acestor germeni și a caracterului epidemic al unor tulpini.
6. Îmbunătățirea continuă a colaborării și a comunicării între spitalele publice referitoare la rezistența bacteriană la antibiotice sunt esențiale pentru o abordare promptă a cazurilor depistate, elaborarea de strategii mai eficiente de prevenție a transmiterii între spitale și în comunitatea brașoveană, clasificarea focarelor intraspitalicești și a zonelor geografice în raport cu extinderea răspândirii tulpinilor multirezistente.

¹ Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva: World Health Organization, 2014

(<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en>, accessed 5 October 2017)

² WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics

(http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf)

³ European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2012.

⁴ European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2013

⁵ European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2014

⁶ European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2015

⁷ European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017.

⁸ European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017.

- ⁹ European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe - Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm: ECDC; 2018.
- ¹⁰ European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC country visit to Romania to discuss antimicrobial resistance issues. Stockholm: ECDC; 2018.
- ¹¹ Prevalence of antimicrobial use in hospitals in acute care hospitals in Europe, ECDC PPS 2011-2012 in Europe. <https://ecdc.europa.eu/en/healthcare-associated-infections-acute-care-hospitals/database/point-prevalence-survey-indicators>
- ¹² European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm: ECDC; 2013. ISBN 978-92-9193-485-0 doi 10.2900/86011
- ¹³ 5. Garcia-Alvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 2011;11:595-603
- ¹⁴ 4. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:629-41.
- ¹⁵ 7. Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J Infect Chemother* 2007; 13:79-86.
- ¹⁶ 8. Andrade-Figueiredo M, Leal-Balbino TC. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. *BMC Microbiol*. 2016; 16:115
- ¹⁷ 6. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:781-91.
- ¹⁸ 11. Pichon B, Hill R, Laurent F, Larsen AR, Skov RL, Holmes M, Edwards GF, Teale C, Kearns AM. Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of *nuc*, Panton-Valentine leucocidin (PVL), *mecA* and homologue *mecALGA251*. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67:2338-41
- ¹⁹ 6. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the *van* alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2004;42:5857-60.
- ²⁰ 7. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06- 0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2667-72.
- ²¹ 8. Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, Zhu D, Hu F, Zhang Y, Wang F, Jacoby GA, Wang M. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:4643-7.
- ²² 9. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V. DAla- d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(10):4606-12.
- ²³ 10. Chen C, Sun J, Guo Y, Lin D, Guo Q, et al. High Prevalence of *vanM* in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(12):7795-8.
- ²⁴ 12. Sivertsen A, Pedersen T, Larssen KW, Bergh K, Ronning TG, et al. A Silenced *vanA* Gene Cluster on a Transferable Plasmid Caused an Outbreak of Vancomycin-Vulnerable Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(7):4119-27.

-
- ²⁵ 13. Thaker MN, Kalan L, Waglechner N, Eshaghi A, Patel SN, et al. Vancomycin-variable enterococci can give rise to constitutive resistance during antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(3):1405-10.
- ²⁶ 14. Grabsch EA, Chua K, Xie S, Byrne J, Ballard SA, Ward PB, Grayson ML. Improved Detection of *vanB2*-Containing *Enterococcus faecium* with Vancomycin Susceptibility by Etest Using Oxgall Supplementation. *J. Clin. Microbiol* 2008; 46; 1961-4
- ²⁷ Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980;16:321-31
- ²⁸ Nordmann P, Poirel L, Carrère A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol* 2011;49:718-21. doi:10.1128/JCM.01773-10.
- ²⁹ Knox JR. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Dec;39(12):
- ³⁰ Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Oct;18(4):657-86
- ³¹ Bebrone C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol.* 2007 Dec 15;74(12):1686-701.
- ³² Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Gawryszewska I, et al. NDM-producing Enterobacteriaceae in Poland, 2012-2014: interregional outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 and sporadic cases. *J Antimicrob Chemother.*, 2016; 71:85-91.
- ³³ Jacoby GA. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:161-82
- ³⁴ Porres-Osante N, de Champs C, Dupont H, Torres C, Mammeri H. Use of avibactam to detect Ambler class Acarbapenemases and OXA-48 β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 79:399-400
- ³⁵ European Centre for Disease Prevention and Control. Laboratory manual for carbapenem and colistin resistance detection and characterisation for the survey of carbapenem- and/or colistin-resistant Enterobacteriaceae - Version 2.0. Stockholm: ECDC; 2019. ISBN 978-92-9498-307-7
- ³⁶ Papagiannitsis CC, Malli E, Florou Z, Medvecky M, Sarrou S, Hrabak J, Petinaki E. First description in Europe of the emergence of *Enterococcus faecium* ST117 carrying both *vanA* and *vanB* genes, isolated in Greece. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017 Dec;11:68-70
- ³⁷ Székely E, Damjanova I, Jánvári L, Vas KE, Molnár S, Bilca DV, Lőrinczi LK, Tóth A. First description of *bla*(NDM-1), *bla*(OXA-48), *bla*(OXA-181) producing Enterobacteriaceae strains in Romania. *Int J Med Microbiol.* 2013 Dec;303(8):697-700.
- ³⁸ Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003;41:5407-13.
- ³⁹ Olaitan AO, Diene SM, Assous MV, Rolain JM. Genomic plasticity of multidrug-resistant NDM-1 positive clinical isolate of *Providencia rettgeri*. *Genome Biol Evol* 2016;8:723-8.
- ⁴⁰ Tshisevhe VS, Lekalakala MR, Tshuma N, Janse van Rensburg S, Mbelle N. Outbreak of carbapenem-resistant *Providencia rettgeri* in a tertiary hospital. *S Afr Med J* 2016;107:31-3.

-
- ⁴¹ Rouhi S., Ramazanzadeh R. First literature review of carbapenem-resistant *Providencia*. *New Microbe and New Infect* 2018; 25: 16-23
- ⁴² Rouhi S., Ramazanzadeh R. First literature review of carbapenem-resistant *Providencia*. *New Microbe and New Infect* 2018; 25: 16-23
- ⁴³ Gefen-Halevi S, Hindiyyeh MY, Ben-David D, Smollan G, Gal-Mor O, Azar R, et al. Isolation of genetically unrelated bla_{NDM-1}-positive *Providencia rettgeri* strains in Israel. *J Clin Microbiol* 2013;51:1642-3.
- ⁴⁴ Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla_{OXA-51}-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 2006;44:2974-6.
- ⁴⁵ Higgins PG, Perez-Llarena FJ, Zander E, Fernandez A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(5):2121-6
- ⁴⁶ Dortet L., Flonta M., Boudehen Y.M, Creton E., Bernabeu S., Vogel A., Naas T. Dissemination of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* in Romania. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Nov; 59(11): 7100-7103.
- ⁴⁷ Rouhi S, Ramazanzadeh R. Prevalence of bla_{Oxacillinase-23} and bla_{Oxacillinase-24/40}-type Carbapenemases in *Pseudomonas aeruginosa* Species Isolated from Patients with Nosocomial and Non-nosocomial Infections in the West of Iran. *Iran J Pathol.* 2018 Summer;13(3):348-356.

Sef. Bucurari Str.
Carmen-Daniela Heurtoiu

Heurtoiu