



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

ȘCOALA DOCTORALĂ

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# **Fenotipuri de rezistență întâlnite la bacili Gram-negativi nefermentativi izolați din diferite produse patologice**

Doctorand **Luminița Modiga (căs. Matroș)**

---

Conducător științific **Prof. Dr. Lia Monica Junie**

---

Cluj-Napoca 2016

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	19
<b>1. Bacilii Gram-negativi nefermentativi</b>	19
1.1. Taxonomie	19
1.2. Caractere generale și semnificația clinică a unor genuri bacteriene mai frecvent implicate în patologia umană	21
1.2.1. Genul <i>Achromobacter</i>	21
1.2.2. Genul <i>Burkholderia</i>	22
1.2.3. Genul <i>Chryseobacterium</i>	22
1.2.4. Genul <i>Elizabethkingia</i>	23
1.2.5. Genul <i>Myroides</i>	23
1.2.6. Genul <i>Pseudomonas</i>	24
1.2.7. Genul <i>Rhizobium</i>	24
1.2.8. Genul <i>Shewanella</i>	25
1.2.9. Genul <i>Sphingomonas</i>	25
1.2.10. Genul <i>Stenotrophomonas</i>	25
<b>2. Patogenia infecțiilor determinate de <i>P. aeruginosa</i></b>	26
2.1. Factorii de virulență la <i>P. aeruginosa</i>	26
2.1.1. Capsula polizaharidică, biofilmul, Quorum Sensing	26
2.1.2. Pili	27
2.1.3. Neuraminidaza	27
2.1.4. Lipopolizaharidul	27
2.1.5. Exotoxina A	27
2.1.6. Enterotoxina	27
2.1.7. Exoenzimele	27
2.1.8. Fosfolipaza C	28
2.1.9. Elastaza	29
2.1.10. Leucocidinele	29
2.1.11. Piocianinele	29
2.1.12. Alți factori de virulență	30
2.2. Mecanisme patogenetice în infecțiile determinate de <i>P. aeruginosa</i>	30
<b>3. Infecții determinate de <i>P. aeruginosa</i></b>	32
3.1. Infecții ale tractului respirator	32
3.2. Infecții ale sistemului nervos central	32
3.3. Infecții oculare	33
3.4. Infecții otice	33
3.5. Infecții osoase și articulare	33
3.6. Infecții gastro-intestinale	33
3.7. Infecții ale tractului urinar	34
3.8. Infecții ale pielii și țesuturilor moi	34
3.9. Bacteriemie	34
3.10. Endocardită	34
3.11. Infecții nosocomiale	34
<b>4. Rezistența la antibiotice a BGN-NF</b>	35
4.1. Rezistența intrinsecă – mecanisme de rezistență	36
4.1.1. Impermeabilitatea membranei externe	36

4.1.2. Pompele de eflux	37
4.1.3. Enzimele	37
4.2. Rezistența dobândită	38
4.3. Rezistența genetică	38
4.3.1. Rezistența la $\beta$ -lactamine	38
4.3.1.1. Rezistența cromozomială	38
4.3.1.2. Rezistența extracromozomială (plasmidică)	39
4.3.2. Rezistența la aminoglicozide	41
4.3.2.1. Rezistența enzimatică	41
4.3.2.2. Rezistența nonenzimatică	42
4.3.3. Rezistența la fluoroquinolone	42
4.3.3.1. Rezistența cu ajutorul sistemelor de eflux	42
4.3.3.2. Rezistența prin alte mecanisme	43
4.4. Fenotipuri de rezistență	43
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	45
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	47
<b>2. Studiul 1 – Implicarea speciilor mai rare de BGN-NF în producerea infecțiilor și rezistența lor la antibiotice</b>	49
2.1. Introducere	49
2.2. Ipoteza de lucru/obiective	50
2.3. Material și metodă	50
2.4. Rezultate	57
2.5. Discuții	70
2.6. Concluzii	73
<b>3. Studiul 2 – Rezistența la antibiotice și fenotipuri de rezistență întâlnite la tulpinile de <i>P. aeruginosa</i></b>	76
3.1. Introducere	76
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	76
3.3. Material și metodă	77
3.4. Rezultate	77
3.5. Discuții	98
3.6. Concluzii	100
<b>4. Studiul 3 – Studiu fenotipic și genotipic al tulpinilor de <i>P. aeruginosa</i> producătoare de carbapenemaze izolate în infecții la pacienți spitalizați</b>	101
4.1. Introducere	101
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	102
4.3. Material și metodă	103
4.4. Rezultate	106
4.5. Discuții	120
4.6. Concluzii	122
<b>5. Discuții generale</b>	125
<b>6. Concluzii generale</b>	127
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	131
<b>REFERINȚE</b>	133

**Cuvinte cheie:** Bacili Gram-negativinefermentativi (BGN-NF), *Pseudomonas aeruginosa*,

*Stenotrophomonas maltophilia*, *Elizabethkingia meningoseptica*, infecții nosocomiale, rezistență intrinsecă, rezistență dobândită, mecanisme de rezistență, fenotipuri de rezistență la antibiotice, rezistența *P. aeruginosa* la carbapenemi, screening fenotipic pentru metalo- $\beta$ -lactamaze (MBL), detecția genelor care codifică MBL prin PCR (*bla*<sub>IMP</sub> și *bla*<sub>VIM</sub>) la tulpinile de *P. aeruginosa* carbapenem-rezistente.

## INTRODUCERE

Bacili Gram-negativi nefermentativi constituie permanent o problemă de mare actualitate prin intervenția lor tot mai frecventă în patogenia infecțiilor, mai ales a celor de proveniență nosocomială. Metodele moderne, automatizate de diagnostic microbiologic scot tot mai mult la lumină specii neobișnuite, unele foarte rare, care altădată erau greu de identificat prin metodele convenționale, greoaie și nesigure de multe ori.

Diversitatea acestor specii este interesantă prin prisma izolării lor din produse patologice rezultate în urma introducerii în practica medicală a unor noi metode moderne, invazive, de diagnostic și tratament. Folosirea de rutină a fibroscopelor, dispozitive care necesită intervenția unor noi metode de sterilizare, mult mai scumpe și inaccesibile încă în sistemul nostru de sănătate, are ca și repercusiune directă, apariția și creșterea incidenței infecțiilor cu aceste bacterii.

O altă problemă importantă și pe care am dezbătut-o pe larg în acest manuscris este rezistența naturală foarte importantă a acestor specii, care ar trebui cunoscută și de către medicul clinician, care se confruntă cu aceste infecții, precum și rezistența dobândită prin mecanisme genetice multiple. Cunoașterea fenotipurilor de rezistență ale acestor bacterii poate fi de multe ori, utilă în salvarea vieții pacienților, prin alegerea promptă a unui anumit agent antibacterian care să acționeze țintit pe aceste specii.

Dintre bacili Gram-negativi nefermentativi, bacteriile cel mai frecvent implicate sunt cele care aparțin speciei *Pseudomonas aeruginosa*, dar vin din urmă specii cum ar fi, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Chryseobacterium indologenes*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Burkholderia cepacia*, specii din genul *Achromobacter* și *Myroides* etc. Multe dintre aceste specii bacteriene s-au regăsit în secreția biliară după efectuarea unei gastro-duodenoscopii.

În teza mea, o atenție deosebită am acordat rezistenței la antibiotice a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa*. Fenotipul de rezistență la  $\beta$ -lactamine de tip  $\beta$ -lactamaze cu spectru extins (ESBL) a fost tot mai mult semnalat, de cele mai multe ori, asociat cu rezistența la aminoglicozidele antipseudomonale (gentamicină, tobramicină, amikacină) și la fluoroquinolone mai nou apărute în practică. Terapia agresivă, de multe ori necontrolată sau exagerată, cu carbapenemi a determinat bacteriile să-și construiască noi arme cu care să se apere de atacul carbapenemilor. Au construit noi enzime, încadrate astăzi într-o superfamilie, aceea a metalo- $\beta$ -lactamazelor, enzime care au în centrul lor activ, ioni bivalenți ( $Zn^{2+}$ ) și care hidrolizează activ toate  $\beta$ -lactaminele, inclusiv carbapenemii. Au devenit impermeabile pentru carbapenemi, și-au modificat țintele bacteriene, au construit pompe active de eflux sau enzime inactivatoare pentru alte antibiotice (aminoglicozide și fluoroquinolone).

În ultimii doi ani am început să observăm creșterea prevalenței tulpinilor de *P. aeruginosa* carbapenem-rezistente. Întrebarea noastră a venit firesc. Sunt aceste tulpini producătoare de metalo- $\beta$ -lactamaze? De aici, a pornit ideea acestei teze și interesul pentru a cerceta acest domeniu al sintezei de metalo- $\beta$ -lactamaze. Cu ajutorul sistemului automat Vitek®2 Compact, am identificat tulpinile carbapenem-rezistente, apoi prin metode de screening fenotipice am identificat posibila prezență a metalo- $\beta$ -lactamazelor, iar prin metode moleculare (PCR) am detectat prezența genelor de rezistență *bla*<sub>IMP</sub> și *bla*<sub>VIM</sub>, răspunzătoare de sinteza metalo- $\beta$ -lactamazelor. Această lucrare s-a realizat cu sprijinul Fondului Social European, Programul Operational Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, contract nr. POSDRU/159/1.5/S/138776.

Acest studiu contribuie alături de alte studii efectuate în diferite clinici din România la aducerea unor informații extrem de utile în ce privește prezența și circulația acestor tulpini în spitalele din țara

noastră. În laboratorul IRGH "Prof. Dr. O. Fodor" Cluj-Napoca, acest studiu constituie o rampă de lansare pentru noi studii privind rezistența la carbapenemi, implementarea în laborator a unor noi tehnici de rutină pentru detecția fenotipică a metalo- $\beta$ -lactamazelor, precum și implementarea pe viitor a unor măsuri mult mai stricte de supraveghere și control a acestor tulpini în mediul spitalicesc.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Această parte a tezei cuprinde 3 studii, al căror protocol de lucru a fost evaluat și avizat de Comisia de Etică a UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca și de asemenea, a fost aprobat de către direcțiunea IRGH "Prof. Dr. O. Fodor" Cluj-Napoca. S-a realizat un studiu retrospectiv desfășurat în perioada ianuarie-decembrie 2014, în care am analizat etiologia infecțiilor cu bacili Gram-negativi nefermentativi (BGN-NF), pattern-urile și fenotipurile de rezistență ale acestora, în studiul 2 am analizat rezistența și fenotipurile de rezistență la tulpinile de *P. aeruginosa* izolate, iar în studiul 3 am realizat screening-ul metalo- $\beta$ -lactamazelor (MBL) atât prin metode fenotipice cât și genotipice la tulpinile de *P. aeruginosa* cu rezistență la carbapenemi.

Datele au fost prelucrate cu ajutorul aplicației Microsoft Office Excel 2013, iar analiza statistică a fost de tip descriptiv, pentru variabilele calitative utilizându-se frecvențe absolute și relative, reprezentate grafic prin grafice sectoriale și de tip coloană. În cazul variabilelor cantitative, s-au utilizat grafice de tip coloană, histogramme de distribuție, valoarea medie și mediana, ca și parametri de centralitate și deviația standard, ca și parametru de dispersie. În studiul 3, analiza concordanței dintre metodele de screening fenotipice (ROSCO® și E-test) și PCR, considerată metoda de referință, am aplicat testul Mc'Nemar, coeficientul Kappa Cohen. Testul exact Fisher a fost utilizat pentru testarea asocierii dintre variabila sensibilității la aztreonam (ATM) și testele fenotipice studiate (ROSCO® și E-test). Pentru ambele teste, am considerat că semnificația statistică a fost atinsă atunci când  $p$ -valoarea estimată a fost  $<0,05$ . Datele au fost analizate cu ajutorul IBM SPSS Statistics V.20 (Armonk, NY: IBM Corp.).

### **Studiu 1. Implicarea speciilor mai rare de BGN-NF în producerea infecțiilor și rezistența lor la antibiotice**

**Scopul studiului:** a constat în analiza incidenței infecțiilor determinate de BGN-NF și a pattern-urilor de rezistență ale acestora, într-o clinică universitară din Cluj-Napoca.

**Material și Metode:** Am cules date referitoare la 405 tulpini de BGN-NF provenite din 357 produse patologice recoltate de la 215 pacienți internați în perioada ianuarie-decembrie 2014 în IRGH Cluj-Napoca. Parametrii pe care i-am urmărit au fost diferite date epidemiologice legate de pacienți, cum ar fi: codul unic de identificare al pacientului, data izolării, vârstă, sex, secția, diagnostic clinic, durata perioadei de internare, momentul primei izolări, evoluția clinică, tipul produsului patologic, asocieri bacteriene, precum și date legate de tulpinile de BGN-NF, respectiv, speciile bacteriene, profilul de rezistență și sensibilitate la antibiotice, precum și fenotipurile de rezistență ale acestora.

Recoltarea produselor patologice a fost realizată de către personalul specializat al clinicii la prescripția medicului clinician, respectând procedurile specifice de recoltare fiecărui tip de produs patologic. Pentru izolarea BGN-NF s-au folosit atât medii neselective, geloză-sânge sau geloză-chocolat, cât și medii slab selective pentru bacili Gram-negativi, cum ar fi: mediul Levine (EMB-Eosyne Methylene Blue), MacConkey, dar și medii selective pentru *P. aeruginosa*, cum ar fi: agar bază *Pseudomonas* adiționat cu diferite suplimente selective: Ceftrimid. Pentru uroculturi s-au utilizat și medii cromogene: UriSelect (Bio-Rad), Brilliance UTI Agar Medium (Oxoid, UK). Identificarea BGN-NF s-a realizat cu ajutorul sistemului automatizat Vitek®2 Compact (BioMérieux, Franța), cu ajutorul cardurilor GN. Testarea sensibilității la antibiotice s-a realizat, în principal cu ajutorul sistemului VITEK®2 Compact, dar și prin metoda difuzimetrică.

**Rezultate:** În studiul retrospectiv au fost analizate 405 tulpini de BGN-NF izolate din 357 produse patologice recoltate de la 215 pacienți internați în perioada ianuarie-decembrie 2014 în IRGH Cluj-Napoca. Pacienții au fost internați în secția de gastroenterologie (77; 35.81%) și medicină internă (7; 3.26%), în secții de chirurgie generală (111; 51.63%) și în secții de terapie intensivă (8; 3.72%). 12

pacienți (5.58%) au provenit din ambulator. Distribuția pacienților în funcție de sex a fost următoarea: 115 bărbați și 100 femei, cu vârste cuprinse între 19-90 ani. Produsele patologice cele mai reprezentative au fost: puroi din secrețiile de plagă chirurgicală (20.5%), secreție traheală (16.2%), materii fecale (11.5%), urină (10.1%), hemocultură (7%), cateter venos central (6.7%), spută (6.4%), bilă (5.9%), lichid peritoneal (5%), lichid ascitic (2%), alte secreții (2.5%), abcese viscerale (0.6%), un lichid pericardic (0.3%) și 3 lichide pleurale (0.8%). Evoluția clinică a fost infaustă la 28% dintre pacienți. Perioada de spitalizare a avut limite foarte largi, fiind cuprinsă între 2 și 207 zile de internare, cu o mediană de 32 de zile, iar momentul primei izolări a BGN-NF din produsele patologice la pacienții internați a fost cuprins între 2 și 164 de zile de la internare, cu o valoare mediană de 24.5 zile. Pacienții incluși în studiu au fost pacienți imunosupresați prin numeroși factori, cum ar fi: diferite forme de cancer primar sau metastazat, diferite afecțiuni chirurgicale, dar și medicale acute sau cronice. Dintre cele 405 izolate clinice, un număr de 314 tulpini (77.5%) au fost reprezentate de *P. aeruginosa*, 59 (14.6%) tulpini au fost reprezentate de *S. maltophilia* și 12 (3%) tulpini de *E. meningoseptica*. Celelalte specii au fost foarte rar izolate, astfel au fost identificate 4 tulpini (1%) de *Pseudomonas putida*, 3 tulpini din genul *Myroides* (0.7%), câte 2 tulpini (0.5%) de *C. indologenes*, *Pseudomonas fluorescens* și *S. paucimobilis* și câte o tulpină (0.2%) din speciile *A. denitrificans*, *A. xylosoxidans*, *B. cepacia*, *B. pseudomallei*, *R. radiobacter*, *Shewanella putrefaciens*. În 74 din cazuri (20.7%) s-a izolat o singură tulpină bacteriană, respectiv *P. aeruginosa* sau un alt nefermentativ, iar în 16 cazuri (4.5%) s-au izolat 2 tulpini de nefermentativi, cel mai frecvent, fie 2 tulpini diferite de *P. aeruginosa* fie o tulpină de *P. aeruginosa* asociată cu un alt nefermentativ. În 107 cazuri (30%), o tulpină de BGN-NF a fost asociată cu o altă specie bacteriană (enterobacterii, stafilococi, enterococi, fungi), în 71 din cazuri (20%) a fost asociată cu alte 2 specii bacteriene, în 36 din cazuri (10.1%) cu 3 specii bacteriene, în 7 cazuri (2%) cu 4 specii bacteriene, iar într-un produs patologic (0.3%) s-au regăsit chiar 5 specii bacteriene.

Doar tulpinile din speciile *Achromobacter*, *P. fluorescens* și *S. paucimobilis* au fost sensibile la peniciline și peniciline combinate cu inhibitori de  $\beta$ -lactamază. Toate tulpinile din genul *Achromobacter*, *B. pseudomallei*, *P. fluorescens* au fost sensibile la ceftazidim, în timp ce 2/4 tulpini de *P. putida* și 2/3 tulpini de *S. paucimobilis* au fost sensibile la acest antibiotic. Toate tulpinile de *Achromobacter*, *B. cepacia* și *C. indologenes* au fost rezistente la cefepim și aztreonam. Rezistența la carbapenemi a fost variabilă, în funcție de specie. Astfel, tulpinile din genul *Achromobacter* au fost rezistente la meropenem, având o CMI de 4 mg/l, tulpinile de *C. indologenes* și *Myroides* au fost rezistente la carbapenemi, cu o CMI  $\geq 16$  mg/l.

Cele mai multe specii au fost rezistente la aminoglicozide. Tulpinile de *P. fluorescens* au fost sensibile, în timp ce 1/4 tulpini de *P. putida* și 1/3 de *S. paucimobilis* au fost rezistente la toate aminoglicozidele testate, având o CMI de  $\geq 16$  mg/l. 6 din tulpinile de *E. meningoseptica* au fost rezistente la amikacină, având o CMI  $\geq 64$  mg/l. Sensibilitatea la fluoroquinolone a celor mai multe specii de BGN-NF a fost cuprinsă între 50 și 100%, excepție făcând tulpinile de *Myroides*, care au fost rezistente la toate fluoroquinolonele testate. Cele mai multe specii de BGN-NF au fost sensibile la minociclină (MIN) în procent de 100%. 2 tulpini de *P. putida* au fost rezistente la MIN, cu o CMI de  $\geq 16$  mg/l și 5 tulpini de *S. maltophilia* (9.6%) au fost rezistente la MIN. Deși cele 3 tulpini din genul *Myroides* au fost sensibile la MIN, ele au fost rezistente la celelalte ciclone testate, respectiv, la tetraciclină și tygeciclină. Majoritatea tulpinilor de BGN-NF testate au fost rezistente la colistin, cu excepția speciilor de *Pseudomonas*, *Shewanella* și *Sphingomonas*. Tulpinile testate la nitrofurantoin au fost rezistente în procent de 100%, iar dintre cele testate la cloramfenicol, doar tulpina de *S. putrefaciens* a fost sensibilă. Tulpinile din genul *Myroides* și *Achromobacter* au fost rezistente la sulphamethoxazol-trimethoprim (SXT), în timp ce alte specii au prezentat o rezistență variabilă, cuprinsă între 30.2% și 85.7%. Doar o tulpină de *E. meningoseptica* a fost sensibilă la SXT, având o CMI  $\leq 20$  mg/l, în timp ce 7 tulpini au fost sensibile la trimetoprim, cu o CMI de 8 mg/l.

**Concluzii.** Dintre BGN-NF principalul agent etiologic a fost *P. aeruginosa* (314, 77.5%), urmat la mare distanță de *S. maltophilia* (59, 14.6%) și *E. meningoseptica* (12, 3%). Alte specii bacteriene ale BGN-NF au fost foarte rar izolate. Diversitatea lor este dată de numeroasele caractere de cultivare și biochimice și de aceea se impune o identificare corectă și cu o mare acuratețe a acestora. Cunoașterea speciilor bacteriene implică și cunoașterea unor aspecte legate de antibiogramă, de la efectuarea ei până la

interpretarea ei. Cunoașterea speciei bacteriene atrage după sine cunoașterea rezistenței intrinseci la antibiotice a acesteia. BGN-NF sunt recunoscuți pentru rezistența de nivel înalt la foarte multe  $\beta$ -lactamine datorită impermeabilității crescute a membranei externe. Genul *Burkholderia* și specia *E. meningoseptica* au rezistență naturală la colistin. Celelalte specii au rezistențe variabile la diferite clase de antibiotice, cum ar fi: AG, FQ, SXT, TMP, fosfomicină, tetraciline, cloramfenicol.

În lipsa mijloacelor automatizate aceste specii pot fi identificate incorect și necunoașterea exactă a speciei incriminate atrage după sine o interpretare incorectă a antibiogrammei. Fiecare medic microbiolog ar trebui să țină cont de acest aspect și să fie pregătit în orice moment să identifice o astfel de specie bacteriană.

## **Studiu 2. Rezistența la antibiotice și fenotipurile de rezistență întâlnite la tulpinile de *P. aeruginosa***

**Scopul studiului:** Scopul studiului a constat în analiza rezistenței la antibiotice și a fenotipurilor de rezistență la tulpinile de *P. aeruginosa* izolate în perioada ianuarie-decembrie 2014, în IRGH "Prof. Dr. O. Fodor" Cluj-Napoca.

**Material și metode:** Parametrii pe care i-am urmărit în acest studiu au fost reprezentați de datele referitoare la rezultatele antibiogramelor a 314 tulpini de *P. aeruginosa* efectuate cu sistemul Vitek®2 Compact și fenotipurile de rezistență interpretate de sistemul expert Vitek®2 Compact. Această secțiune din studiul 2 a fost detaliată în studiul 1. Aceste date au fost culese din baza de date centralizată a laboratorului de microbiologie, din baza de date a sistemului automat Vitek®2 Compact, precum și din registrele de lucru ale laboratorului.

**Rezultate:** Tulpinile de *P. aeruginosa* au prezentat nivele de rezistență la ticarcilină de 62.1%, la piperacilină de 65.6%, la ticarcilină-acid clavulanic de 73.2%, iar la piperacilină-tazobactam de 51.6%. Nivelul de rezistență la cefalosporinele antipseudomonale a atins nivele ridicate, respectiv 44.3% la CAZ și 52.5% la FEP. De asemenea, rezistența la carbapenemi a atins nivele crescute, respectiv de 59.9% la imipenem și de 73.9% la meropenem. Tulpinile de *P. aeruginosa* incluse în studiu au prezentat nivele crescute de rezistență la GEN (57.6%) și la TOB (45.2%). La AK rezistența a avut un nivel mai redus, de 23.2%. Rezistența la Ciprofloxacina a tulpinilor testate de *P. aeruginosa* a arătat un nivel de 47.5%. Rezistența la pefloxacina și levofloxacina a avut valori mai mici, respectiv de 12.5% și de 17.5%. Dintre cele 314 tulpini de *P. aeruginosa* testate, am înregistrat 2 tulpini care au prezentat rezistență la colistin și care au fost izolate din secția de gastroenterologie.

Cel mai frecvent fenotip de rezistență la  $\beta$ -lactamine ales de sistemul expert Vitek® 2 Compact ca primă variantă posibilă, a fost cel de rezistență de nivel înalt la  $\beta$ -lactamine asociat cu rezistența la carbapenemi prin impermeabilitate (210 tulpini, 66.8%), urmat de fenotipul sălbatic într-un procent de 12.2%, respectiv la 38 de tulpini. A-II-a variantă propusă de sistemul expert Vitek®2 Compact la tulpinile de *P. aeruginosa* studiate a fost producerea de carbapenemaze (metalo- sau OXA) la un procent de 54.4% din cele 182 tulpini cu 2 fenotipuri posibile, respectiv 99 de tulpini, urmată de rezistența dobândită prin producerea de penicilinază asociată cu rezistența la carbapenemi prin impermeabilitate în 31.3% din cazuri, 57 tulpini. În secția de chirurgie generală, 34.7% dintre tulpini au fost rezistente la FQ, în secția de gastroenterologie, nivelul de rezistență a fost de 16.5%, iar în secția de terapie intensivă a fost de 6%. Spre deosebire de aceste secții, în ambulator și în secția de medicină internă, nivelul de rezistență la FQ a avut valori mult scăzute, respectiv de 1% și 0.6%. La aminoglicozide, 95 de tulpini (30.2%) au prezentat fenotipul GTNtA, 75 de tulpini (23.9%) au prezentat fenotipul GNtT/GT, iar 71 tulpini (22.6%) au prezentat fenotipul sălbatic. Fenotipul predominant de rezistență la colistin al tulpinilor de *P. aeruginosa* a fost fenotipul sălbatic, întâlnit la 99% dintre tulpini, un procent de 1% fiind reprezentat de tulpinile rezistente.

**Concluzii:** Tulpinile de *P. aeruginosa* izolate au înregistrat nivele înalte de rezistență la penicilinele antipseudomonale (63.1%), la cefalosporinele antipseudomonale (48.4%), la carbapenemi (66.9%), la AG (45.5%) și FQ (47.5%). În secția de terapie intensivă se decelează nivele înalte de rezistență (>80%) pentru  $\beta$ -lactaminele antipseudomonale și de aproximativ 80% la carbapenemi, iar în secția de chirurgie aceste nivele au atins valori în jur de 60%. În ambulator se observă nivele de rezistență relativ mici

pentru AG și FQ (7.7%) și de aproximativ 20% pentru  $\beta$ -lactaminele antipseudomonale. S-a înregistrat un procent de 7.7% de rezistență la MEM, dar nicio tulpină nu a fost rezistentă la IMP. În secția de gastroenterologie se înregistrează nivele crescute de peste 60% ale rezistenței la  $\beta$ -lactaminele antipseudomonale, la carbapenemi de 70%, la AG variază între 40 și 60%, iar la FQ, în jur de 50%. La 2 tulpini s-a înregistrat rezistența la colistin. Tulpinile de *P. aeruginosa* au prezentat frecvent fenotipuri de rezistență asociate, ceea ce denotă existența unor multiple mecanisme de rezistență intricate.

### **Studiu 3: Studiu fenotipic și genotipic al tulpinilor de *P. aeruginosa* producătoare de carbapenemaze izolate în infecții la pacienți spitalizați**

**Scopul studiului:** a constat în detecția producerii carbapenemazelor la tulpini de *P. aeruginosa* carbapenem-rezistente prin metode fenotipice de screening și metode genotipice (identificarea prezenței genelor care codifică MBL prin metoda PCR). De asemenea, am analizat fenotipurile de rezistență interpretate de sistemul expert VITEK® 2 Compact la tulpinile incluse în studiu. Metoda a avut la bază un studiu prospectiv desfășurat în perioada septembrie 2014-februarie 2015 în departamentul de microbiologie al IRGH "Prof. Dr. O. Fodor" Cluj-Napoca.

#### **Material și metode:**

Am inclus în studiu un număr de 38 tulpini non-repetitive de *P. aeruginosa* cu rezistență la carbapenemi provenite de la pacienți spitalizați în această perioadă.

Detecția producerii de carbapenemaze s-a realizat prin:

a. metoda dublu-disc sinergiei și metoda cu discuri combinate cu ajutorul kitului KPC/MBL la *P. aeruginosa*/*Acinetobacter baumannii* Confirm Kit (ROSCO® Diagnostica, Taastrup, Danemarca).

b. metoda Epsilometer-test (E-test) s-a realizat cu ajutorul benzilor Etest® MBL IP/IPI (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Franța), 256/64 imipenem - IP (4-256  $\mu\text{g/mL}$ )/imipenem (1-64  $\mu\text{g/mL}$ ) - acid etilendiaminotetracetic (EDTA) cu un nivel constant - IPI.

c. testarea sensibilității la Aztreonam (ATM) a fost testată prin metoda difuzimetrică cu discuri de ATM 30  $\mu\text{g}$ . (Oxoid, UK). Interpretarea s-a efectuat conform standardului CLSI în vigoare.

d. analiza fenotipurilor de rezistență interpretate cu sistemul expert VITEK® 2 Compact și compararea lor cu rezultatele obținute prin metodele fenotipice și genotipice de screening.

e. detecția genotipică a producerii de carbapenemaze s-a realizat prin metoda PCR pentru identificarea prezenței genelor care codifică MBL, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>.

**Rezultate:** Cele 38 de tulpini studiate au provenit din secția de chirurgie ( $n=21$ , 55.3%), terapie intensivă ( $n=6$ , 15.8%) și gastroenterologie ( $n=11$ , 28.9%). Aceste tulpini au fost izolate din diferite produse patologice (puroi, bilă, spută, secreție traheală, alte secreții). Pacienții au avut vârste cuprinse între 24 și 83 ani [medie: 56.7 ani], 22 bărbați și 16 femei, 16 pacienți (42.1%) au prezentat un teren imunosupresat prin diferite forme de cancer cu localizare digestivă. Perioada de spitalizare a fost cuprinsă între 3 și 210 zile [mediană: 27 zile], iar durata scursă între momentul internării și prima izolare a acestor tulpini carbapenem-rezistente a avut variații largi, cuprinse între o zi și 192 zile de la internare [mediană: 19 zile]. Evoluția clinică a fost favorabilă la 28 pacienți, în 10 cazuri survenind decesul.

S-a observat sinergie între discurile IMI10 și acid dipicolinic (DPA) la 23 tulpini (60.5%), iar pentru MRP10, zona de sinergie a fost evidentă la 20 de tulpini (52.6%). 11 tulpini au fost pozitive pentru *Klebsiella pneumoniae* carbapenemaze - KPC (29%), 27 de tulpini au fost negative pentru KPC (71%). Prin metoda E-test cu benzile MBL IP/IPI s-a observat pozitivitate la un număr de 28 de tulpini (74%) pentru un raport IP/IPI  $\geq 8$ .

Din cele 38 de tulpini testate, 18 de tulpini (56.3%) au fost sensibile la ATM, 8 tulpini au fost intermediar-sensibile (21.1%), iar 12 tulpini (31.6%) au fost rezistente la ATM. 22 de tulpini (57.9%) au prezentat următoarele fenotipuri de rezistență la  $\beta$ -lactamine posibile: producerea de carbapenemaze (metalo- sau OXA) sau nivel înalt de rezistență asociat cu rezistența la carbapenemi prin impermeabilitate, producerea de ESBL sau de penicilinaze dobândite).

6 din cele 38 tulpini testate (15.8%) au fost *bla*<sub>IMP</sub>+, 2 tulpini au fost *bla*<sub>VIM</sub>+ (5.3%), 4 tulpini au fost pozitive atât pentru gena *bla*<sub>IMP</sub> cât și pentru *bla*<sub>VIM</sub> (10.5%), iar 26 tulpini au fost negative (68.4%). 2 tulpini *bla*<sub>IMP</sub>+ și o tulpină *bla*<sub>IMP</sub>+/*bla*<sub>VIM</sub>+ au fost izolate din secția ATI, 2 tulpini *bla*<sub>IMP</sub>+, o tulpină



$bla_{VIM+}$  și 2 tulpini  $bla_{IMP+}/bla_{VIM+}$  au fost izolate din secția de chirurgie. 2 tulpini  $bla_{IMP+}$ , o tulpină  $bla_{VIM+}$  și o tulpină  $bla_{IMP+}/bla_{VIM+}$  au fost izolate din secția de gastroenterologie. Tulpinile  $bla_{IMP+}$  au fost izolate din spută, secreție traheală, secreție nazală, secreție plagă, hemocultură și cateter venos central. Tulpinile  $bla_{VIM+}$  au fost izolate din urocultură și spută, iar tulpinile  $bla_{IMP+}/bla_{VIM+}$  au fost izolate din secreție traheală, secreție plagă și alte secreții.

În ce privește asocierea între cele 2 teste fenotipice, a existat concordanță între rezultatele acestora, proporția rezultatelor pozitive respectiv negative ale ROSCO® fiind similară față de cele ale E-test atât la pacienții cu rezultat pozitiv PCR (Mc'Nemar test,  $p = 0.625$ ) cât și la cei cu rezultat PCR negativ (Mc'Nemar test,  $p = 0.754$ ). De asemenea, coeficientul de concordanță  $kappa$  a sugerat existența unei concordanțe rezonabile a rezultatelor metodei E-test și ROSCO®. Asocierea dintre fenotipurile interpretate de sistemul VITEK®2 Compact și metoda ROSCO® a fost realizată prin testul exact al lui Fisher; astfel am remarcat asociere statistic semnificativă între fenotipurile menționate și testul ROSCO® ( $p = 0.047 < 0.05$ ), putându-se observa frecvențe diferite ale fenotipurilor la pacienții cu rezultat pozitiv/negativ ROSCO® (14.3% vs 50% la fenotipul 1, 17.9% vs 20% la fenotipul 2, 73.7% vs 26.3% la fenotipul 3).

Există o tendință spre semnificația statistică ( $p = 0.09 > 0.05$ ) a asocierii dintre fenotip și PCR, putându-se observa frecvențe diferite ale fenotipurilor la pacienții cu rezultat PCR pozitiv/negativ (23.1% vs 24% la fenotipul 1, 38.5% vs 8% la fenotipul 2, 28.5% vs 68% la fenotipul 3).

Nu am găsit asociere statistic semnificativă între sensibilitatea la ATM și testul ROSCO® (test exact al lui Fisher,  $p = 0.888 > 0.05$ ), putându-se observa frecvențe similare ale ATM la pacienții cu rezultat pozitiv/negativ ROSCO® (50% vs 40% la tulpinile sensibile la ATM, 21.4% vs 20% la tulpinile intermediare la ATM, respectiv 28.6% vs 40% la tulpinile rezistente la ATM).

#### **Concluzii:**

Acest studiu dovedește circulația tulpinilor de *P. aeruginosa* producătoare de MBL, genele răspunzătoare de sinteza lor fiind  $bla_{IMP}$  și  $bla_{VIM}$ . Cele mai multe tulpini rezistente la carbapenemi au fost izolate din produse patologice care au fost în strictă legătură cu anumite dispozitive medicale (bilă, puroi, spută, secreție traheală). Aceste tulpini au fost izolate de la pacienți cu perioade lungi de spitalizare [mediana: 27 zile], mediana timpului de achiziție a acestor tulpini fiind de 19 zile. Tulpinile producătoare de MBL au prezentat nivele înalte de rezistență la toate clasele de antibiotice, colistinul fiind singurul antibiotic eficient împotriva acestora. Detecția prin biologie moleculară a genelor răspunzătoare de sinteza MBL întărește ideea supravegherii și controlului circulației acestor tulpini multidrug-rezistente în mediul spitalicesc.

### **ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI**

Acest studiu poate fi considerat ca un studiu pilot în clinica IRGH "Prof. Dr. O. Fodor", în ce privește studiul metalo- $\beta$ -lactamazelor. Originalitatea tezei rezidă din modul de abordare a fenomenului de rezistență. Testarea moleculară prin PCR a tulpinilor de *P. aeruginosa* pentru genele  $bla_{IMP}$  și  $bla_{VIM}$  este prima încercare pe care am realizat-o în IRGH, iar rezultatele pozitive pentru aceste gene răspunzătoare de sinteza MBL, dovedesc că aceste tulpini denumite generic și "superbug" nu au granițe și sunt răspândite în toată lumea,

Pentru diagnosticul microbiologic s-au folosit medii cromogene selective pentru izolarea fenotipurilor ESBL și producerea de carbapenemaze. Pentru identificarea tulpinilor bacteriene și pentru testarea sensibilității lor la antibiotice s-au utilizat metode moderne de diagnostic microbiologic, cum ar fi sistemul automatizat Vitek®2 Compact. Screening-ul fenotipic al tulpinilor de *P. aeruginosa* rezistente la carbapenemi s-a realizat cu kit-uri moderne de diagnostic cu sensibilitate înaltă (ROSCO® și E-test). Folosind analiza statistică am comparat rezultatele celor 2 metode, iar acestea dovedesc că sunt extrem de utile în laboratorul de microbiologie pentru detecția carbapenemazelor.

Rezultatele obținute în acest prim studiu ne încurajează să continuăm cu o cercetare mai amplă a întregului spectru al rezistenței la carbapenemi, respectiv supraexpresia porinei *OprD*, căutarea altor gene care exprimă MBL (SPM, SIM, GIM, NDM, DIM), KPC, OXA.

În acest studiu am evidențiat izolarea unor specii de BGN-NF neobișnuite, rar întâlnite în patologia umană, dar care ar trebui cunoscute pentru rezistența lor intrinsecă de nivel înalt și pentru mecanismele dobândite de rezistență. Limitele actualului studiu sunt reprezentate de testarea unui număr limitat de gene, astfel încât nu s-a realizat o caracterizare moleculară mai completă a tulpinilor, care să demonstreze și alte mecanisme de rezistență posibil prezente, intricate cu cele pe care le-am prezentat în manuscrisul de față.

Propuneri: necesitatea implementării în IRGH "Prof. Dr. O. Fodor" a unor metode de screening a pacienților la admisia în spital privind portajul tulpinilor multidrug-rezistente, folosind medii cromogene înalt selective pentru fenotipurile de rezistență (ESBL, CARBA, MRSA, VRE), pentru a limita pătrunderea și răspândirea acestor microbi multidrug-rezistenți.

De asemenea, este imperios necesară implementarea în laboratoarele de microbiologie a acestor noi tehnici de screening microbiologic pentru detecția diferitelor mecanisme de rezistență. Ar fi util, de asemenea, să se înființeze laboratoare de referință regionale, foarte bine dotate, care să caracterizeze molecular tulpinile din spitale, pentru o cunoaștere cât mai amplă a fenotipurilor circulante.



**PhD SCHOOL**

---

PhD THESIS. ABSTRACT

# **Resistance phenotypes found in nonfermentative Gram-negative bacilli isolated from different pathological specimens**

PhD Student **Luminița Modiga (căs. Matroș)**

---

PhD Scientific Coordinator **Prof. Dr. Lia Monica Junie**

---

## CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>PRESENT STATUS OF KNOWLEDGE</b>	19
<b>1. Nonfermentative Gram-negative bacilli</b>	19
1.1. Taxonomy	19
1.2. General characteristics and clinical significance of bacterial genera most frequently involved in human pathology	21
1.2.1. <i>Achromobacter</i> Genera	21
1.2.2. <i>Burkholderia</i> Genera	22
1.2.3. <i>Chryseobacterium</i> Genera	22
1.2.4. <i>Elizabethkingia</i> Genera	23
1.2.5. <i>Myroides</i> Genera	23
1.2.6. <i>Pseudomonas</i> Genera	24
1.2.7. <i>Rhizobium</i> Genera	24
1.2.8. <i>Shewanella</i> Genera	25
1.2.9. <i>Sphingomonas</i> Genera	25
1.2.10. <i>Stenotrophomonas</i> Genera	25
<b>2. Pathogenesis of infections caused by <i>P. aeruginosa</i></b>	26
2.1. Virulence factors in <i>P. aeruginosa</i>	26
2.1.1. Polysaccharide capsule, biofilm, Quorum Sensing	26
2.1.2. Pili	27
2.1.3. Neuraminidase	27
2.1.4. Lipopolysaccharide	27
2.1.5. Exotoxin A	27
2.1.6. Enterotoxin	27
2.1.7. Exoenzymes	27
2.1.8. Phospholipase C	28
2.1.9. Elastase	29
2.1.10. Leukocidins	29
2.1.11. Pyocyanin	29
2.1.12. Other virulence factors	30
2.2. Pathogenetic mechanisms in infections due to <i>P. aeruginosa</i>	30
<b>3. Infections caused by <i>P. aeruginosa</i></b>	32
3.1. Respiratory tract infections	32
3.2. Central Nervous System Infections	32
3.3. Eye infections	33
3.4. Ear infections	33
3.5. Bone and joint infections	33
3.6. Gastrointestinal infections	33
3.7. Urinary tract infections	34
3.8. Skin and soft tissue infections	34
3.9. Bacteraemia	34
3.10. Endocarditis	34
3.11. Nosocomial infections	34
<b>4. Antibiotic resistance of NF-GNB</b>	35
4.1. Intrinsic resistance - resistance mechanisms	36

4.1.1. Impermeability of the outer membrane	36
4.1.2. Efflux pumps	37
4.1.3. Enzymes	37
4.2. Acquired resistance	38
4.3. Genetic resistance	38
4.3.1. $\beta$ -lactams resistance	38
4.3.1.1. Chromosomal resistance	38
4.3.1.2. Extrachromosomal resistance (plasmids)	39
4.3.2. Aminoglycoside resistance	41
4.3.2.1. Enzymatic resistance	41
4.3.2.2. Non-enzymatic resistance	42
4.3.3. Fluroquinolones resistance	42
4.3.3.1. Resistance usingto efflux systems	42
4.3.3.2. Resistance through other mechanisms	43
4.4. Resistance phenotypes	43
<b>ORIGINAL STUDY</b>	45
<b>1. The working hypothesis / objectives</b>	47
<b>2. Study 1 - Involvement uncommon species of NF-GNB in infections production and their resistance to antibiotics</b>	49
2.1. Introduction	49
2.2. The working hypothesis / objectives	50
2.3. Material and method	50
2.4. Results	57
2.5. Discussions	70
2.6. Conclusions	73
<b>3. Study 2 - Antibiotic resistance and resistance phenotypes in <i>P. aeruginosa</i> strains</b>	76
3.1. Introduction	76
3.2. The working hypothesis / objectives	76
3.3. Material and method	77
3.4. Results	77
3.5. Discussions	98
3.6. Conclusions	100
<b>4. Study 3 - Phenotypic and genotypic study of carbapenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains isolated from hospitalized patients</b>	101
4.1. Introduction	101
4.2. The working hypothesis / objectives	102
4.3. Material and method	103
4.4. Results	106
4.5. Discussions	120
4.6. Conclusions	122
<b>5. General discussions</b>	125
<b>6. General conclusions</b>	127
<b>7. Originality of research and innovative contribution</b>	131
<b>REFERENCES</b>	133

**Key words:** Nonfermentative Gram-negative bacilli (NF-GNB), *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Elizabethkingia meningoseptica*, nosocomial infections, intrinsic resistance, acquired resistance, mechanisms of resistance, resistance phenotypes, phenotypic screening for detection of metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) in carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strains, detection of MBL encoding genes by PCR (*bla<sub>IMP</sub>* and *bla<sub>VIM</sub>*) in carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strains.

## INTRODUCTION

Non-fermentative Gram-negative bacilli (NF-GNB) represent an issue of great interest by their more frequent intervention in the pathogenesis of infections, especially those of nosocomial origin. Modern methods, automated microbiological diagnostic, light out increasingly uncommon species, some very rare, that were once difficult to detect by conventional methods, heavy and often unreliable. The diversity of these species is interesting in the perspective of their isolation from pathological specimens, resulting from the initiation into clinical practice of new modern methods, invasive diagnosis and treatment. The routine use of fiberscopes, which are devices that require the intervention of new sterilization methods, more expensive and inaccessible in our health system, still has as direct repercussion in the emergence and rise of infection with these bacteria.

Another significant issue that I discussed it extensively in this manuscript, is natural resistance, very important to these species, which should be known by the clinician, faced with these infections. The acquired resistance by multiple genetic mechanisms was also debated. Resistance phenotypes of these bacteria may often be useful in saving patients lives, by selecting a specific antibacterial agent that act on these species.

Most frequently involved non-fermentative Gram-negative bacilli, are those of the species *Pseudomonas aeruginosa*, but come most recent species, such as *Stenotrophomonas maltophilia*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Chryseobacterium indologenes*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Burkholderia cepacia*, species of genus *Achromobacter* și *Myroides* etc. Many of these bacterial species have been found in bile after a gastrointestinal duodenoscopy.

In my thesis, I offer a particular attention to antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains.  $\beta$ -lactams resistance phenotypes: extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL), has been more reported, most often associated with resistance to antipseudomonal aminoglycosides (gentamicin, tobramycin, amikacin) and to fluoroquinolones, that appeared in practice. Aggressive therapy, often uncontrolled or exaggerated, with carbapenems, caused bacteria to build new weapons to protect themselves from carbapenems attack.

They have built new enzymes, classified today in a superfamily, of metallo-enzymes  $\beta$ -lactamases. These enzymes have in their active center, divalent ions ( $Zn^{2+}$ ) which active hydrolyze all  $\beta$ -lactams, including carbapenems. They have become impermeable to carbapenems, have changed their bacterial targets or have built active efflux pumps or inactivating enzymes to other antibiotics (aminoglycosides and fluoroquinolones).

In the last two years we started to observe the increasing prevalence of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strains. Our question came naturally: are these strains metallo- $\beta$ -lactamase producers? The idea of this thesis and research interest, in the area of metallo- $\beta$ -lactamase synthesis started from here. Using the automatic Vitek®2 Compact, we have identified carbapenem-resistant strains, than by phenotypic screening methods, we identified the possible presence of metallo- $\beta$ -lactamase. We detected by molecular methods (PCR), the presence of genes *bla<sub>IMP</sub>* and *bla<sub>VIM</sub>*, responsible for synthesis of metallo- $\beta$ -lactamases. This work was supported by European Social Fund, Human Resources Development Operational Programme 2007-2013, project no. POSDRU/159/1.5/S/138 776.

This study contributes with other studies from Romania to bring some very useful information regarding the presence and spread of these strains in the hospitals of our country.

In the laboratory of microbiology from RIGH "Prof. Dr. O. Fodor "Cluj-Napoca, this study constitutes a pilot study regarding carbapenems resistance, implementation of new techniques for phenotypic detection of metallo- $\beta$ -lactamases in laboratory routine.

## PERSONAL CONTRIBUTIONS

This part of the thesis includes 3 studies, whose protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of UMF "Iuliu Hatieganu" and by the Directorate of RIGH "Prof. Dr. O. Fodor " Cluj -Napoca.

It was performed a retrospective study, conducted between January-December 2014, in which I analyzed the etiology of infections with non-fermentative Gram-negative bacilli, patterns and resistance phenotypes thereof. I also analyzed the pattern of resistance and resistance phenotypes of *P. aeruginosa* strains isolated from different pathological specimens.

In the study 3 I made the screening using phenotypic and genotypic methods for metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) production in carbapenem-resistant strains of *P. aeruginosa*.

The data were processed using Microsoft Office Excel 2013, the statistical analysis was descriptive, for qualitative variables we used absolute and relative frequencies, plotted by sector and column charts.

For quantitative variables were used column charts, histograms of the distribution, the mean and median, as well as the parameters of the plant, and the standard deviation, as the dispersion parameter.

In study 3, for the concordance analysis of phenotypic screening methods (ROSCO® and E-test) and PCR, considered the reference method, we applied the test Mc'Nemar and Cohen Kappa coefficient. The exact Fisher test, was used to test the association between ATM and tests studied variable (ROSCO® and E-test). For both tests, we considered that statistical significance was reached when p-value was estimated <0.05. The data were analyzed by using the IBM Statistics SPSS V.20 (Armonk, NY: IBM Corp.).

### **Study 1: Involvement uncommon species of NF-GNB in infections production and their resistance to antibiotics**

**The aim of the study:** to analyze the incidence of infections caused by NF-GNB and their resistance patterns in a university clinic in Cluj-Napoca.

**Material and Methods:** I analyzed data on 405 strains of NF-GNB from 357 pathological products collected from 215 patients hospitalized during January to December 2014 in RIGH Cluj-Napoca. Parameters that I followed were different epidemiological data related to patients, such as the unique patient identification, data isolation, age, sex, ward, clinical diagnosis, period of hospitalization, the moment of the first isolation, clinical evolution, the type of pathological product, association bacterial strains. Also I followed data related to NF-GNB, respectively, bacterial species, the profile of resistance and sensitivity to antibiotics, as well as their resistance phenotypes.

Harvesting pathological products was carried out by specialized personnel at the doctor's prescription, in compliance with specific procedures for each type of pathological product. To isolate NF-BGN were used both non-selective medium, agar-blood or agar-chocolat and poorly selective medium for Gram-negative bacilli, such as Levine (EMB-Eosyne Methylene Blue), MacConkey, and *P. aeruginosa* selective media such as agar added with different *Pseudomonas* selective supplements: Ceftrimide. For urine samples were used chromogenic media: UriSelect (Bio-Rad), Brilliance UTI Agar Medium (Oxoid, UK). NF-BGN identification was performed by Vitek®2 Compact automated system (bioMérieux, France) using GN cards. Antibiotic susceptibility testing was performed mainly using VITEK®2 Compact system, but also by Kirby-Bauer diffusion method.

**Results:** In the retrospective study I analyzed 405 NF-BGN strains isolated from 357 pathological specimens collected from 215 patients hospitalized during January to December 2014 in RIGH Cluj-Napoca. Patients were admitted to medical (7; 3.26%) and gastroenterology units (77; 35.81%) to general surgery (111; 51.63%) and intensive care units (8; 3.72%). 12 patients (5.58%) were outpatients. Patient distribution by gender was as follows: 115 men and 100 women, aged 19-90 years.

Most representative specimens were: pus secretions from the surgical wound (20.5%), tracheal secretion (16.2%), faeces (11.5%), urine (10.1%), blood cultures (7%), central venous catheter (6.7%), sputum (6.4%), bile (5.9%), peritoneal fluid (5%), the ascitic fluid (2%), and other body fluids (2.5%), visceral abscesses (0.6%), pericardial fluid (0.3%) and 3 pleural fluid (0.8%). The clinical evolution of patients was infaust in 28% of cases. The length of hospital stay had very wide limits, ranging between 2 and 207 days, with a median of 32 days, and the moment of the first isolation of NF-BGN from pathological products on inpatients ranged between 2 and 164 days after admission, with a median of 24.5 days. Patients included in the study were immunosuppressed by numerous factors, such as different forms of primary or metastatic cancer, various surgical conditions, and acute or chronic medical diseases.

Of the 405 clinical isolates, a number of 314 strains (77.5%) were *P. aeruginosa*, 59 strains (14.6%) were *S. maltophilia* and 12 (3%) strains, *E. meningoseptica*. The other species were rarely isolated: four strains (1%) were identified as *Pseudomonas putida*, three strains (0.7%) belonging to the *Myroides* genus, two strains (0.5%) were *C. indologenes* or *Pseudomonas fluorescens*. *S. paucimobilis* and each strain (0.2%) was identified as *A. denitrificans*, *A. xylosoxidans*, *B. cepacia*, *B. pseudomallei*, *R. radiobacter*, *Shewanella putrefaciens*. In 74 cases (20.7%) was isolated only one bacterial strain, or *P. aeruginosa* or other nonfermentative and in 16 cases (4.5%) were isolated two strains of nonfermentative, the most commonly be two different strains of *P. aeruginosa* or a strain of *P. aeruginosa* associated with another nonfermentative. In 107 cases (30%), a strain of NF-GNB has been associated with other bacteria species (enterobacteriaceae, staphylococci, enterococci, fungi). In 71 cases (20%) was associated with two bacterial species, in 36 cases (10.1%) with three bacterial species, in 7 cases (2%) with four bacterial species, and in a pathological product (0.3%) were found even five bacterial species.

Only strains of *Achromobacter*, *P. fluorescens* and *S. paucimobilis* species were susceptible to penicillin and penicillin combined with  $\beta$ -lactamase inhibitors. All strains of the genus *Achromobacter*, *B. pseudomallei*, *P. fluorescens* were sensitive to ceftazidime, whereas 2/4 *P. putida* strains and 2/3 *S. paucimobilis* strains were susceptible to this antibiotic. All strains of *Achromobacter*, *B. cepacia* and *C. indologenes* were resistant to the cefepim and aztreonam. Carbapenems resistance was variable, depending on the species. Thus, strains of the *Achromobacter* genus were resistant to meropenem, with a MIC of 4 mg/l, the *Myroides* and *C. indologenes* strains were resistant to carbapenems, with a MIC  $\geq$ 16 mg/l.

The most species were resistant to aminoglycosides. *P. fluorescens* strains were sensitive, whereas 1/4 of *P. putida* and 1/3 of *S. paucimobilis* strains were resistant to all tested aminoglycosides, with MIC  $\geq$ 16 mg/l. Six strains of *E. meningoseptica* were resistant to amikacin, with MIC  $\geq$ 64 mg/l. Sensitivity to fluoroquinolones of the most species of NF-GNB was between 50 and 100%, except *Myroides* strains that were resistant to all tested fluoroquinolones. The most species of NF-GNB were susceptible to minocycline (MIN) to 100%. Two *P. putida* strains were resistant to MIN with a MIC  $\geq$ 16 mg/l and five strains of *S. maltophilia* (9.6%) were resistant to MIN. Although three strains of the *Myroides* genus were susceptible to MIN, they were resistant to other tested cyclines, respectively, tetracycline and tigecycline. The most NF-GNB tested strains were resistant to colistin, except *Pseudomonas*, *Shewanella* and *Sphingomonas* species. The tested strains were 100% resistant to nitrofurantoin, and among the tested to chloramphenicol, only the strain of *S. putrefaciens* was sensitive. The strains of the *Myroides* and *Achromobacter* genera were resistant to trimethoprim-sulphamethoxazol (SXT), whereas other species have shown a variable resistance, between 30.2% and 85.7%. Only one strain of *E. meningoseptica* was sensitive to SXT, with MIC  $\leq$ 20 mg/l, while the seven strains were susceptible to trimethoprim, with a MIC of 8 mg/l.

**Conclusions:** Among NF-BGN the main etiologic agent was *P. aeruginosa* (314, 77.5%), followed at a great distance by *S. maltophilia* (59, 14.6%) and *E. meningoseptica* (12, 3%). Other bacterial species of NF-BGN were rarely isolated. Their diversity is given by numerous cultural and biochemical aspects and therefore requires a correct identification and great accuracy thereof. The knowledge of bacterial species involves the knowledge issues related to antibiotic testing from performing to interpretation. Knowledge of bacterial species entails knowing its intrinsic resistance to antibiotics. NF-BGN are recognized for high-



level resistance to  $\beta$ -lactams due to increased impermeability of outer membrane. *Burkholderia* genus and *E. meningoseptica* species have natural resistance to colistin. The other species have variable resistances to the different classes of antibiotics, such as AG, FQ, SXT, TMP, phosphomycin, tetracyclines, chloramphenicol.

Without automatic methods these species can be identified incorrectly and not knowing the exact species incriminated entails an incorrect interpretation of antibiotic sensitivity testing. Each microbiologist should take this into consideration and be prepared at all times to identify such bacterial species.

## **Study 2. Antibiotic resistance and resistance phenotypes in *P. aeruginosa* strains**

**The aim of the study:** The aim of this study was to analyze the pattern of antibiotic resistance and resistance phenotypes in *P. aeruginosa* strains isolated from January to December 2014 in RIGH "Prof. Dr. O. Fodor" Cluj-Napoca.

**Material and methods:** The parameters that I have followed in this study were data results on antibiotic susceptibility and resistance of 314 *P. aeruginosa* strains, performed using Vitek®2 Compact system and resistance phenotypes interpreted by the expert system Vitek®2 Compact -AES. This section of the study 2 was detailed in study 1. These data were collected from the central database of the microbiology laboratory, from the database of the automatically system Vitek®2 Compact and from the workbooks in the laboratory.

**Results:** *P. aeruginosa* strains showed high-level resistance to ticarcillin (62.1%), piperacillin (65.6%), ticarcillin-clavulanic acid (73.2%), and piperacillin-tazobactam to (51.6%). The level of resistance to antipseudomonal cephalosporins reached high levels, 44.3% to FEP, respectively 52.5% to CAZ. Also, resistance to carbapenems has reached high levels, 59.9% to imipenem, respectively, 73.9% to meropenem. *P. aeruginosa* strains included in this study had high levels of resistance to GEN (57.6%) and TOB (45.2%). Resistance to AK had a lower level of 23.2%. Ciprofloxacin resistance of *P. aeruginosa* tested strains showed a level of 47.5%. Pefloxacin and levofloxacin resistance had lower values, respectively 12.5% and 17.5%. Among the 314 *P. aeruginosa* isolates, we recorded two strains with resistance to colistin, isolated from the gastroenterology ward.

The most frequently  $\beta$ -lactam resistance phenotype chosen by advanced expert system Vitek®2 Compact as a first possible option, was the high-level resistance to  $\beta$ -lactam associated with impermeability to carbapenem (210 strains, 66.8%), followed by wild phenotype in a percentage of 12.2% (38 strains). The second variant proposed by the advanced expert system Vitek®2 Compact was carbapenemase production (metallo- or OXA) in a rate of 54.4% (182 strains) with two possible phenotypes, respectively 99 strains, followed by the production of acquired penicillinase associated with resistance to carbapenems by impermeability in 31.3% (57 strains).

In surgery ward 34.7% of strains were resistant to FQ, in gastroenterology ward the level of resistance was 16.5% and in ICU was 6%. Unlike these wards, outpatient and internal medicine ward was much lower values of FQ resistance level, respectively 1% and 0.6%.

To aminoglycosides, 95 strains (30.2%) had GTNtA phenotype, 75 strains (23.9%) had GNtT/GT phenotype and 71 strains (22.6%) had wild phenotype. Predominant phenotype of resistance to colistin was wild phenotype, encountered in 99% of strains, a 1% being the resistant strains.

**Conclusions:** *P. aeruginosa* strains showed high levels of resistance to antipseudomonal penicillins (63.1%), antipseudomonal cephalosporins (48.4%), carbapenems (66.9%), AG (45.5%) and FQ (47.5%). In the ICU were detected high levels of resistance (> 80%) for antipseudomonal  $\beta$ -lactam and approximately 80% to carbapenems, and in surgery ward these levels had reached around 60%.

In the ambulatory resistance levels to AG and FQ were relatively small (7.7%) and about 20% for antipseudomonal  $\beta$ -lactams. There has been a 7.7% rate of resistance to MEM, but no strain was resistant to IMP. In the gastroenterology ward were recorded the high levels of resistance to the antipseudomonal  $\beta$ -lactam more than 60%, 70% to carbapenems, between 40 and 60% to AG and about 50% to FQ, 2 strains were resistant to colistin. *P. aeruginosa* strains showed resistance phenotypes associated frequently, which suggests the existence of multiple resistance mechanisms intricate.

### Study 3: Phenotypic and genotypic study of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients

**The aim of the study:** The aim of the present study was to detect the production of carbapenemases in *P. aeruginosa* strains by phenotypic methods (double disc synergy test, E-test) and the presence of the most common MBLs encoding genes (*bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*) by polymerization chain reaction (PCR). We also analyzed the resistance phenotypes interpreted by expert system VITEK® 2 Compact strains included in the study. The method was based on a prospective study conducted between September 2014 and February 2015 in the microbiology department of RIGH "Prof. Dr. O. Fodor" Cluj-Napoca.

#### Material and methods:

We have included in the study a total of 38 non-repetitive strains of *P. aeruginosa* resistance to carbapenems from patients hospitalized during this period.

Detection carbapenemases production was carried out by:

- double-disc synergy method and the method with combined disc using the kit KPC/MBL in *P. aeruginosa*/*Acinetobacter baumannii* Confirmation Kit (ROSCO® Diagnostica, Taastrup, Denmark).
- epsilometer-test method (E-test) was performed with Etest® MBL IP/IPI (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), imipenem 256/64-IP (4-256 mg/ml)/imipenem (1-64 mg/ml)-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) with a constant level-IPI.
- aztreonam susceptibility testing (ATM) was tested by disc diffusion method with ATM 30 µg.disc (Oxoid, UK). Interpretation was performed according to the CLSI standard.
- analysis of resistance phenotypes interpreted with expert system VITEK® 2 Compact and compare them with results of phenotypic and genotypic screening methods.
- genotypic detection of carbapenemases production was performed by PCR for the presence of genes encoding MBL, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*

**Results:** The 38 strains studied were from surgical wards (n = 21, 55.3%), ICU (n = 6, 15.8%) and gastroenterology (n = 11, 28.9%). These strains were isolated from different pathological products (pus, bile, sputum, secretion, tracheal and other body fluids). Patients were aged between 24 and 83 years [mean: 56.7 years], 22 men and 16 women, 16 patients (42.1%) were immunosuppressed by various digestive cancers localized. The hospital stay was between 3 and 210 days [median: 27 days] and the time elapsed between of admission and the first isolation of these carbapenem-resistant strains had wide variations, between one day and 192 days of hospitalization [median : 19 days]. The clinical course was favorable in 28 patients, 10 cases death occurs.

The synergy area was observed between the IMI10 and dipicolinic acid (DPA) discs for 23 strains (60.5%), and for MRP10, the synergy area was evident in 20 strains (52.6%). 11 strains were positive for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases - KPC (29%), 27 strains were negative for KPC (71%). By the E-test strips IP/IPI, MBL positivity was observed in a total of 28 strains (74%) to report the IP/IPI ≥8. Of the 38 strains tested, 18 strains (56.3%) were susceptible to ATM, eight strains were intermediate sensitive (21.1%) and 12 strains (31.6%) were resistant to ATM. 22 strains (57.9%) showed following β-lactams resistance phenotypes possible: producing carbapenemases (metallo- or OXA) or high-level resistance associated with resistance to carbapenems by impermeable, acquired penicillinases or producing ESBL.

Six of 38 tested strains (15.8%) were *bla<sub>IMP</sub>*+, two strains were *bla<sub>VIM</sub>*+, (5.3%), four strains were positive for both gene *bla<sub>IMP</sub>* and for *bla<sub>VIM</sub>* (10.5%), and 26 strains were negative (68.4 %). Two strains *bla<sub>IMP</sub>* + and one strain *bla<sub>IMP</sub>*+/*bla<sub>VIM</sub>* + were isolated from ICU ward. Two strains *bla<sub>IMP</sub>* +, one strain *bla<sub>VIM</sub>* + and two strains *bla<sub>IMP</sub>*+/*bla<sub>VIM</sub>* + were isolated from surgery ward. Two strains *bla<sub>IMP</sub>* +, one strain *bla<sub>VIM</sub>* + and one strain *bla<sub>IMP</sub>*+/*bla<sub>VIM</sub>* + were isolated from gastroenterology ward. *Bla<sub>IMP</sub>* + strains were isolated from sputum, tracheal secretion, nasal secretion, wound secretion, blood cultures and central

venous catheter. *Bla<sub>VIM+</sub>* strains were isolated from sputum and urine culture, and *bla<sub>IMP+</sub>/bla<sub>VIM+</sub>* strains were isolated from tracheal secretion, wound discharge and other secretions.

Regarding the association between the two phenotypic tests, there was concordance between the results, the proportion of positive results that negative ROSCO® being similar to E-test both those in patients with positive PCR (Mc'Nemar test,  $p = 0.625$ ) and those with negative PCR result (Mc'Nemar test,  $p = 0.754$ ). Also, according kappa coefficient of concordance suggested a reasonable outcomes E-test method and ROSCO®. The association between phenotypes interpreted by VITEK®2 Compact system and method ROSCO® was performed by Fisher's exact test; as we noted statistically significant association between phenotypes mentioned with ROSCO® test ( $p = 0.047 < 0.05$ ), where one can see different frequencies of phenotypes in patients with positive/negative ROSCO® (14.3% vs 50% phenotype 1, 17.9% vs 20% phenotype 2, 73.7% vs 26.3% phenotype 3).

There is a trend toward statistical significance ( $p = 0.09 > 0.05$ ) association between phenotype and PCR, noticing different frequencies of phenotypes in patients with resulting PCR positive/negative (23.1% vs 24% phenotype 1, 38.5% vs 8% phenotype 2, 28.5% vs. 68% phenotype 3). I did not find a statistically significant association between ATM sensitivity and test ROSCO® (Fisher's exact test,  $p = 0.888 > 0.05$ ), noticing similar frequencies of ATM in patients with positive/negative ROSCO® (50% vs 40% ATM-sensitive strains, 21.4% vs 20% at intermediate-ATM strains or 28.6% vs 40% resistant-ATM strains).

#### **Conclusions:**

This study proves the circulation of *P. aeruginosa* strains producing MBL, genes responsible for their synthesis being *bla<sub>IMP</sub>* and *bla<sub>VIM</sub>*. Most strains resistant to carbapenems were isolated from pathological specimens which were strictly related to certain medical devices (bile, pus, sputum, tracheal secretion). These strains were isolated from patients with prolonged hospitalization period [median: 27 days], the median time of purchase of these strains was 19 days. MBL producing strains showed high levels of resistance to all classes of antibiotics, colistin is the only antibiotic effective against them. Detection by molecular biology of genes responsible for synthesis of MBL enhances the idea surveillance and control of multidrug-resistant strains spread in the hospital.

## **ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS**

This study of metallo- $\beta$ -lactamases can be considered as a pilot study in RIGH "Prof. Dr. O. Fodor". The originality of this thesis arises from the approach to the resistance phenomenon. PCR molecular testing of *P. aeruginosa* genes, *bla<sub>IMP</sub>* and *bla<sub>VIM</sub>*, is the first attempt I achieved in RIGH, and positive results for these genes responsible for MBL synthesis prove that these strains named "superbug" have no borders and are spread worldwide.

For microbiological diagnosis were used selective chromogenic medium for the isolation strains producing ESBL or carbapenemases. To identify bacterial strains and their antibiotic susceptibility, were used modern microbiological methods of diagnostic such as automated system Vitek®2 Compact.

Phenotypic screening of *P. aeruginosa* strains resistant to carbapenems, was performed with modern diagnostic kits with high sensitivity (ROSCO® and MBL E-test).

Using statistical analysis we compared the results of two methods, and prove that they are extremely useful for the carbapenemases detection in laboratory of microbiology.

The results obtained in this first study encourage us to continue with more extensive research across the spectrum of carbapenems resistance, respectively the overexpression of *OprD* porine and search for the other genes expressing MBL (SPM, GIM, NDM, DIM), KPC, OXA.

In this study we showed isolation of uncommon species of nonfermentative Gram-negative bacilli, very rare found in human pathology, but that should be known for their intrinsic resistance to high and acquired resistance mechanisms.

Limits of the current study are represented by testing a limited number of genes, such that it has not realized a full molecular characterization of the strains. This molecular characterization could prove, the presence of other resistance mechanisms, confounding those which we presented in the present manuscript.

Proposals: necessity to implement methods for screening of the multidrug-resistant strains portingby patients admitted to hospital, by using high selective chromogenic medium resistance phenotypes (ESBL,CARB, MRSA, VRE). These screening methods may help limit the entry and spread of multidrug-resistant germs.

Also, it is imperative to implement these new screening techniques for the detection of various microbiological resistance mechanisms in microbiology laboratories. It would be useful establishment of regional reference laboratories, well-equipped, to characterize molecular strains in hospitals, for knowledge as widely as possible phenotypes assets.