DINAMICA ANTIBIOREZISTENȚEI CELOR MAI FRECVENT IZOLATE BACTERII CU POTENȚIAL PATOGEN, ÎN SPITALUL DE BOLI INFECȚIOASE ȘI TROPICALE „DR. V. BABEȘ“, ÎN PERIOADA 2000-2015

Dinamic of resistance to antibiotics for the most frequent potential pathogen bacterial isolates in “Dr. V. Babes” Clinical Hospital of Infectious and Tropical Diseases (2000-2015)

M. Nica^{1,2}, T. Biolan¹, E. Turcu¹, A. Dascălu¹, C. Oprișan¹, S.M. Erscoiu^{1,2}, V. Simion^{1,2}, S. Florescu^{1,2}, C. Cristea^{1,2}, C. Oprea^{1,2}, C. Popescu^{1,2}, G. Vancea^{1,2}, R. Rusu¹, S. Lazăr^{1,2}, D. Duiculescu¹, P. Calistru^{1,2}, E. Ceașu^{1,2}

¹Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. V. Babeș“, București

²Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila“, București

REZUMAT

Objective. Analiza în dinamică, a rezistenței globale la antibiotice a principalelor specii bacteriene izolate în Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. V. Babeș“, în perioada 2000-2015.

Material și metode. Profilurile de antibiorezistență au fost identificate prin metoda standard difuzimetrică, iar valorile CMI prin metodele VITEK2C și E-test (Standarde CLSI și EUCAST). Screeningul izolatelor bacteriene producătoare de carbapenemaze s-a efectuat cu metode fenotipice, iar confirmarea prin tehnica RealTimePCR: “MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit” (Epicentre), detecția acizilor nucleici cu „Primer Design™ Kit” (*bla*OXA48; *bla*KPC, *bla*NDM, *bla*VIM) și LightScanner 32 Instrument/LS32 (Idaho Technology), precum și prin RTPCR, sistem GeneXpert. Control intern de calitate: *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC49619, *E. coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.

Rezultate. Incidența *St. aureus* metilino-rezistent (MRSA) a fost 12,7% în 1999 și 40,4% în 2015. Rezistența la eritromicină a *Str. pyogenes*: 0-2,5% în 1999-2009 și 20,3% în 2015. Rezistența totală la penicilină G a *Str. pneumoniae* (infecții non-meningeale) a fost 45,3%-54,5% până în 2009 și 2,7% în 2013. La *Enterococcus faecium* rezistența la vancomicină a fost 0% în 2000-2012, 11% în 2015. 17,6%-54,4% tulpini de *Klebsiella pneumoniae* producătoare de ESBL în perioada 2000-2013, 57% în 2015. 18,8% *Kb. pneumoniae* au fost rezistente la carbapeneme: 8 Kb. *pneumoniae* au fost confirmate ca fiind purtătoare de gena *bla*KPC; 21 izolate cu gena *bla*NDM; 35 de tulpini cu gena *bla*OXA48. *E. coli* ESBL(+): 3,2%-27% (1999-2013); 21% în 2015. La *Pseudomonas aeruginosa* rezistența la meropenem a fost 37,9% în 2015, iar la *Acinetobacter baumannii* de 69%. Pentru izolatele multidrogrezistente, alternativele terapeutice au vizat carbapenemele, glicopeptidele, tigecyclina, rifampicina, colistin și nitrofurantoin.

Concluzii. Supravegherea antibiorezistenței în zona noastră geografică este foarte importantă pentru administrarea unui tratament antibiotic de primă intenție corect și pentru elaborarea unei politici adecvate în sprijinul luptei împotriva dobândirii rezistenței la antibiotice.

Cuvinte cheie: ESBL, carbapenemaze, multidrogrezistență

ABSTRACT

Objective. Analyzing the dynamics of global antibiotic resistance of some bacterial species isolated from patients admitted to the „Dr. V. Babes” Hospital for Infectious and Tropical Diseases, between the years 2000 to 2015.

Material and methods. Antibiotic resistance profiles of bacteria isolated from inpatients, were identified by the standard diffusion method and MIC values by VITEK2C and E-test methods. (CLSI and EUCAST standards). Screening of carbapenemases – producing isolates were performed by phenotypic methods, and the confirmation by RealTimePCR: “MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit” (Epicentre), „Primer Design™ Kit” (*bla*OXA48; *bla*KPC, *bla*NDM, *bla*VIM)/ LightScanner 32 Instrument/LS32 (Idaho Technology),

Autor corespondent:

Dr. M. Nica, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila“, Str. Dionisie Lupu nr. 37, București

E-mail: nicamaria_lab@yahoo.com

and GeneXpert. Internal quality control: *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC49619, *E. coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.

Results. The incidence of *St. aureus* meticilino-rezistent (MRSA) highlights an increase from 12.2% (2002) to 40.4% (2015). In the past 3 years SVB microbiology lab found a sharp increase in the incidence of erythromycin resistant strains of *Streptococcus pyogenes*. In 2015 we registered 20.3% of macrolide resistant strains. Global resistance to penicillin G for *Str. pneumoniae* (non-meningeal infections) was 45.3%- 54.5% until 2009, and 2.7% in 2013. *Enterococcus faecium* strains showed 0% resistance to vancomycin between 2000 and 2012. A significant growth was recorded in 2015 of 11%. Isolation rate of *Klebsiella pneumoniae* ESBL producing strains has increased progressively from 17.6 in 2000 to 57% in 2015. Carbapenems – resistant *K. pneumoniae* isolated strains were 18,8% in 2015. Carbapenemases types identified by phenotypic and genetic methods where: 35/ Oxa48, 8 KPC and 21/MBL (NDM-1). Resistance to carbapenems recorded an upward trend: 23.9% in 2004 to 37.9% in 2015, and for *Acinetobacter baumannii* 69%.

Conclusions. Antibiotic resistance of bacteria is a major challenge for public health. Therapeutic solutions are extremely limited.

Keywords: ESBL, carbapenemases, multidrug resistance

INTRODUCERE

Antibiorezistența nu este un fenomen ciclic sau tranzitor, ci este o proprietate intrinsecă a lumii bacteriene. Variabilitatea rezistenței este legată de apariția mutațiilor sau de capacitatea bacteriilor de a accepta ADN străin.

După anii 1950, a început „Era de aur” a antibioticelor. Este momentul în care s-a început sinteza chimică a Beta-lactamilor, a quinoloneilor, iar cercetarea s-a intensificat. Rezultatele obținute, foarte încurajatoare, au determinat unii autori să declare imprudent că problema tratamentului bolilor infecțioase a fost rezolvată (5).

Administrarea de antibiotice cu spectru larg are însă și anumite consecințe. Astfel de antibiotice omoară nu numai bacteriile cu rol etiologic într-o infecție, ci și microbiota comensală, producând un dezechilibru (dismicrobism) ce permite bacteriilor condiționat patogene (oportuniste) să colonizeze și să declanșeze diverse mecanisme patogene, cu manifestări clinice grave (Ex.: diareea ulcero-necrotică produsă de *Clostridium difficile* sau vaginitele micotice post-antibioticoterapie, produse de *Candida albicans*).

Un alt aspect al tratamentului cu antibiotic cu spectru larg este legat de selecția din microbiota proprie a organismului a unor sușe rezistente, chiar dacă nu se instalează dismismul bacterian. Membri ai microbiotei organismului uman pot fi cauza unor infecții dobândite în mediul intraspitalicesc. Tratamentul cu vancomicină pen-

tru infecțiile cu *Staphylococcus aureus* meticilino-rezistent (MRSA) sau pentru diareea cu *Clostridium difficile* a dus la colonizări și infecții urinare cu *Enterococcus faecium* vanco-rezistent (VRE).

Bacteriile au abilitatea de a dezvolta rezistența la antibiotice printr-o multitudine de mecanisme a căror natură și eficiență depind de specie, dar și de particularitățile chimice ale antibioticului. Au uriașea capacitate de a suferi mutații și de a face schimburi de material genetic.

În SUA s-a estimat că aproximativ 50% dintre antibiotice sunt administrate incorect, frecvent în infecții virale ori în doze sau la intervale de administrare improprie. În ultimii ani, în întreaga lume, antibioticele s-au administrat excesiv, în condițiile în care au apărut doar câteva molecule antibacteriene noi.

Una dintre cele mai mari surse a emergenței antibiorezistenței o constituie tratamentul antibiotic administrat animalelor din ferme și înglobarea antibioticului în hrana acestora, ca factor de creștere rapidă, pentru sacrificare.

Aglomerarea urbană, creșterea numărului persoanelor fără locuință, nutriția săracă și igiena deficitară, lipsa îngrijirii medicale corespunzătoare duc la răspândirea rezistenței la antibiotice, atât în țările dezvoltate economic, dar mai ales în țările în curs de dezvoltare. În aceste țări, organizarea socială a rețelei de îngrijiri de sănătate și a spitalelor reprezintă surse pentru dobândirea de către bacterii a genelor de rezisten-

ță, care, ulterior, se răspândesc prin intermediul vizitatorilor, aparținătorilor, în comunitate.

Intensificarea turismului, a călătoriilor internaționale, reprezintă încă o modalitate de răspândire în întreaga lume a bacteriilor multi-rezistente.

Alte surse ale antibioretistenței sunt reprezentate de pacienții cu imunosupresie, bolnavii SIDA, procedurile medicale invazive, transplantul de organe, implanturi de dispozitive medicale (care implică formarea de biofilm) etc.

Toți acești factori sunt implicați în creșterea incidenței infecțiilor bacteriene dobândite în comunitate, cât și a celor dobândite în spital, cu tulpini multi-drog-rezistente (MDR).

Este important de subliniat faptul că bacteriile combină mai multe tipuri de mecanisme de rezistență pentru a-și întări scutul defensiv împotriva acțiunii antibioticelor.

OBIECTIVE

Analiza rezistenței globale la antibiotice în dinamică, a principalelor specii bacteriene izolate în Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. V. Babeș”, în perioada 2000-2015.

MATERIAL ȘI METODE

Profilurile de antibioretistență ale bacteriilor izolate de la pacienții internați în Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. V. Babeș”, în perioada 2000-2015, au fost identificate prin metoda standard difuzimetrică, iar valorile CMI prin metodele VITEK2C și E-test. Interpretarea rezultatelor și încadrarea în categoriile sensibil/S, intermediar/I și rezistent/R, precum și recunoașterea mecanismelor asociate de rezistență, s-a realizat în concordanță cu criteriile Standardului CLSI și EUCAST. Screeningul izolatelor producătoare de ESBL s-a realizat prin metoda difuzimetrică a dublului disc, care pune în evidență sinergismul dintre beta-lactam și inhibitorii de beta-lactamaze/acid clavulanic, sulbactam. Producerea de cefalosporinază AmpC s-a

pus în evidență prin metoda E-test, utilizând benzi impregnate cu cefotetan/cefotetan + cloxacilină. Izolatele bacteriene producătoare de carbapenemaze s-au identificat prin determinarea valorilor CMI la meropenem și imipenem prin metoda E-test, utilizarea cardurilor VITEK/AST084 și AST222, testul fenotipic Hodge modificat și benzile E-test impregnate cu imipenem/imipenem + EDTA (IP/IPI/bioMerieux). Extracția ADN din culturile de *Klebsiella pneumoniae* s-a efectuat cu “MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit” (Epicentre, Biotechnologies, Madison, Wisconsin), iar detecția și cuantificarea ADN bacterian, cu The Primer Design™ Kit (Primer Design 2X Precision™ MasterMix) și LightScanner 32 Instrument/LS32 (Idaho Technology, Salt Lake City, UT). De asemenea, confirmarea mecanismului de rezistență la carbapeneme a bacililor Gram negativi s-a efectuat prin RTPCR, utilizând sistemul automat GeneXpert.

Control intern de calitate: *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC49619, *E. coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.

Tehnicile de testare a sensibilității la antibiotice (ATS) reprezintă un obiectiv critic pentru laboratoarele de microbiologie. În era în care antibioretistența a devenit un fenomen obișnuit și se înregistrează o urgență a rezistenței multiple la antibiotice (în special la bacteriile Gram negative, unde au rămas doar câteva opțiuni terapeutice), importanța unui raport rapid și concis privind sensibilitatea unui izolat nu trebuie subestimată. Rezultatele unei antibiogramme reprezintă nu numai un ghid individual pentru terapia pacientului, ci o însumare de rezultate care pot fi cuprinse într-un ghid de terapie empirică.

Primul pas în elaborarea raportului privind antibioretistența îl reprezintă realizarea unor protocoale în care să se specifice care microorganism izolat dintr-un prelevat biologic este semnificativ implicat în procesul infecțios și trebuie să i se facă antibiograma. Această decizie

este luată în context clinic și depinde de câțiva factori: vârstă, sex, tipul specimenului clinic, istoricul recent al bolii, internări recente (ultimul an), spitalizări multiple (în special în secții de ATI), pretratamentul cu antibiotice etc.

Este de subliniat faptul că unele specii bacteriene prezintă rezistența intrinsecă la anumite antibiotice sau altele încă prezintă patternuri de sensibilitate predictibilă la unele clase de antibiotice (*Streptococcus pyogenes* sensibil la penicilină) și, conform Standardului CLSI, acestea nu mai trebuie testate.

Timpul necesar pentru obținerea primelor rezultate ale antibiogrammei depinde de intervalul necesar izolării agentului etiologic în cultura pură, adică 6-48 de ore. La acesta se adaugă testarea sensibilității la antibiotice, iar dacă tulpina prezintă fenotipuri particulare de rezistență (ESBL, carbapenemaze, rezistența la vancomicină etc.) sunt necesare teste suplimentare.

Pacientului i se administrează un tratament cu spectru larg, conform ghidului local de terapie empirică, iar după obținerea rezultatelor antibiogrammei, schema se poate reevalua prin indicarea deescaladării terapiei antibiotice.

În cazurile grave: meningită bacteriană, endocardită, sepsis, identificarea bacteriană și antibiograma reprezintă urgențe majore. În cazul în care izolatul bacterian prezintă rezistența la antibioticul administrat conform schemei empirice (ex. tratament cu ceftriaxon în meningita pneumococică), laboratorul are obligația să comunice imediat clinicianului rezultatele antibiogrammei.

De asemenea, dacă în ATI este internat un pacient căruia i se izolează din escară o *Klebsiella pneumoniae* producătoare de carbapenemaze (rezistența la toate antibioticele testate, inclusiv carbapeneme), rezultatul trebuie comunicat imediat medicului curant, pentru a declanșa procesul de izolare a pacientului și recoltarea de probe pentru screening al portajului de *K. pneumoniae* la personalul venit în contact cu pacientul, în special personalul medical.

Raportarea valorilor CMI, împreună cu interpretarea lor (S,I,R) este foarte utilă medicului clinician, în special pentru tratamentul infecțiilor sistemice sau profunde (endocardită, osteomielită), în care, penetrabilitatea preferențială sau inegală a antibioticului în țesuturi poate reduce eficiența tratamentului. Valorile CMI corelate cu principiile farmacocinetice și farmacodinamice pot selecta corect terapia antiinfecțioasă.

1. β -lactamii și *Staphylococcus spp*- antibiograma interpretativă

Stafilococii sunt bacterii Gram pozitive cu sensibilitate naturală la β -lactami (excepție făcând monobactamii). După introducerea penicilinei G în terapie, în anul 1940, în următorii ani au fost izolate deja tulpini de *Staphylococcus aureus* rezistente la penicilină. La doar doi ani după introducerea penicilinei M în tratamentul infecțiilor cu tulpini producătoare de beta-lactamaze (1959) au fost depistate tulpini de *Staphylococcus aureus* metilino-rezistente/MRSA.

Dacă tulpina de *Staphylococcus spp* este rezistentă la penicilină G, este rezistentă și față de alți β -lactami sensibili la penicilază, cum ar fi: ampicilină, amoxicilină, carbenicilină, azlocilină, ticarcilină, piperacilină. Combinația cu inhibitori de penicilaze (acid clavulanic, sulbactam, tazobactam) restabilește sensibilitatea *in vitro* a acestor antibiotice.

La *Staphylococcus aureus*, asocierea rezistenței la fluoroquinolone sugerează metilino-rezistență. Tulpinile de *Staphylococcus aureus* metilino-rezistente dobândite în infecții comunitare (CA-MRSA) sunt sensibile la majoritatea claselor de antibiotice testate, inclusiv la fluoroquinolone.

Tulpinile de *S. aureus* și stafilococi coagulazonegativi, oxacilino-rezistente (MRSA/MRSCN) trebuie raportate ca rezistente și față de ceilalți β -lactami: peniciline, asocieri peniciline-inhibitori de β -lactamaze, cefalosporine, carbapeneme. Ceftobiprol și ceftarolin au afinitate pentru PBP2a și sunt cefalosporine cu eficiență clinică pe tulpinile metilino-rezistente (8).

2. β -lactamii și *Streptococcus pneumoniae* – fenotipuri de rezistență

Rezistența la penicilina G a tulpinilor de *Streptococcus pneumoniae* a fost până de curând (CLSI 2008) arbitrar încadrată în categoriile S, I, R, în funcție de intervalele valorice ale CMI, astfel: MIC $\leq$ 0,06 μ g/ml (S), MIC = 0,12-1 μ g/ml (I) și $\geq$ 2 μ g/ml (R) (14). Această clasificare a valorilor CMI la penicilină G a creat confuzii și a determinat aplicații clinice improprii (13,14).

În acest moment situația a fost pe deplin clarificată, prin stabilirea valorilor clinic corespunzătoare ale CMI și breakpoints de sensibilitate la majoritatea β -lactamilor, în funcție de regimul de dozare a antibioticului și de locul infecției (infecții meningeale și non-meningeale) (5). Sensibilitatea la penicilină G a tulpinilor de *Streptococcus pneumoniae*, izolate din infecții meningeale, rămâne la valoarea CMI $\leq$ 0,06 μ g/ml, în timp ce noile breakpoints pentru administrare parenterală în infecțiile non-meningeale sunt următoarele: CMI $\leq$ 2 μ g/ml (S), CMI = 4 μ g/ml (I) și CMI $\geq$ 8 μ g/ml (R).

Conform ghidurilor EUCAST (10), privind detecția mecanismelor de rezistență și rezistența specifică a izolatelor de importanță clinică și epidemiologică, breakpoint-urile clinice la pneumococ au fost la început concepute pentru a asigura succesul terapeutic al meningitelor pneumococice. Studii clinice au demonstrat că pneumoniile determinate de tulpini de pneumococ, cu sensibilitate intermediară la penicilină și cu tratament parenteral cu penicilina G, au avut aceeași evoluție favorabilă, ca și cele tratate cu

alte clase de antibiotice (13,14). Pe baza datelor microbiologice, de farmacocinetică și farmacodinamică, breakpoint-urile clinice, pentru benzylpenicilină, în cazul izolatelor din infecții non-meningeale, au fost revizuite, astfel (vezi Tabelul 1).

3. Sensibilitatea *Enterobacteriaceae* la β -lactami

Producția de enzime inactivatoare este cel mai important mecanism de rezistență la antibioticele β -lactam, în familia *Enterobacteriaceae*. Marea diversitate de β -lactamaze existente este împărțită în două grupe majore, pe baza unor criterii structurale și funcționale:

1. Clasificare structurală Ambler (1) se bazează pe secvența amino-acizilor din elementele conservate ale site-ului activ și

2. Clasificare funcțională Bush (4) și G.A. Jacoby bazată pe activitatea hidrolitică și sensibilitatea β -lactamazelor la inhibitori, cum ar fi acidul clavulanic și EDTA (chelator cationic bivalent). (2)

Fenotipul de rezistență al tulpinilor producătoare de β -lactamaze cu spectru extins (ESBL)

Fenotipul de rezistență caracteristic tulpinilor de *Enterobacteriaceae* producătoare de β -lactamaze cu spectru extins (ESBL) se caracterizează prin rezistență la peniciline și cefalosporine, cu excepția cefamicinelor.

Carbapenemele și cefamicinele nu sunt, de obicei, substrat pentru aceste enzime. Producerea de ESBL este cauza multipleror eșecuri terapeutice. Excepționând combinațiile cu inhibitori de

TABELUL 1. Raportarea sensibilității la benzilpenicilină a izolatelor de *Streptococcus pneumoniae* din infecții meningeale și non-meningeale (EUCAST 2014) (7-9)

Indicații	CMI breakpoint (mg/L)		Note:
	S $\leq$	R $>$	
Benzylpenicilină (non-meningite)	0,06	2	În pneumonie: <ul style="list-style-type: none"> tulpinile de <i>S. pneumoniae</i> cu CMI $\leq$ 0,5 mg/L, pentru care se utilizează doză de 1,2 g X 4, sunt considerate sensibile la penicilină. tulpinile de <i>S. pneumoniae</i> cu CMI $\leq$ 1 mg/L, pentru care se utilizează doză de 2,4 g X 4 sau 1,2 g X 6, sunt considerate sensibile la penicilină. tulpinile de <i>S. pneumoniae</i> cu CMI $\leq$ 2 mg/L, pentru care se utilizează doză de 2,4 g X 6 se consideră sensibile la penicilină.
Benzylpenicilină (meningite)	0,06	0,06	1,2 g benzylpenicilină este echivalent cu 2 MU (milioane de unități) benzylpenicilină.

β -lactamaze, cefamicinele, carbapenemele, β -lactamii trebuie raportați mai bine ca „intermediari”, decât „sensibili”, dacă testul de sinergism este pozitiv (3,7).

ESBL au fost descrise în Europa de Vest, în anii 1980, când C3G erau larg utilizate în secțiile de ATI. Azi sunt prezente atât în infecții intraspitalicești, cât și în comunitate. Prevalența este aproape identică în Franța (1-3%) și Germania (1-5%), dar mare în Italia (9-15%), Marea Britanie (7-22%), Estul Europei (Polonia, Turcia, Grecia): 39-47% (6).

Hiperproducția de cefalosporinaze („High- level cephalosporinase”)

Fenotipul de rezistență determinat de sinteză de nivel înalt de cefalosporinaze se caracterizează prin rezistență marcată la peniciline, C1G, C2G cel puțin una dintre C3G sau aztreonam. Testul de sinergism este negativ între C3G, C4G sau aztreonam și inhibitori de β -lactamaze. Cefamicinele sunt inactive. În schimb, C4G rămân active.

Prevalența fenotipului de rezistență prin producție înaltă de cefalosporinaze, la speciile din familia *Enterobacteriaceae*, izolate din infecții nosocomiale, în Europa, este aproximativ 5-40%. Acest fenotip este caracteristic speciilor *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, uneori *E. coli*.

Rezistența la carbapeneme

Rezistența la carbapeneme în familia *Enterobacteriaceae* este determinată, în special, de producerea uneia dintre cele 3 clase de carbapenemaze: clasa A Ambler (*Klebsiella pneumoniae* – carbapenemese/KPC), clasa B (metallo- beta-lactamaze- MBL/Verona integron-encoded metallo- beta-lactamase (VIM), New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM) și clasa D (oxacilinaze/OXA-48), în combinație cu producerea de beta-lactamaze cu spectrul extins/ESBL (16,17).

Clasa A carbapenemaze reprezentată de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase”) a fost

descoperită prima dată în Carolina de Nord, în 1996, apoi s-a răspândit repede în Europa, America de Sud, Estul Mijlociu, Asia. Ele conferă rezistența față de toți β -lactamii, inclusiv cefamicinele, C3G, C4G, carbapeneme. Hiperproducția de cefalosporinaze, asociată cu impermeabilitatea de membrană (alterarea porinelor), este o cauză frecventă de rezistență la carbapeneme, la *Enterobacteriaceae*. Acest fenotip combinat de rezistență este observat, în special, la tulpinile producătoare de cefalosporinaze cromosomiale (*Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*).

4. Sensibilitatea *Pseudomonas aeruginosa* față de β -lactami

Pseudomonas aeruginosa produce în mod natural cantități mici de cefalosporinaze (AmpC), care contribuie la rezistență intrinsecă în cadrul acestei specii și la expresia naturală a celor 4 sisteme de eflux, din care, MexAB-OprM este cel mai important. Este rezistent la câțiva β -lactami cu proprietăți hidrofobice (impermeabilitate), cum ar fi benzylpenicilina, oxacilina, aminopenicilina, C1G, C2G (cephalothin, cefuroxim), C3G (cefotaxim), moxalactam, carbapeneme. Tulpinile sălbatice de *Pseudomonas aeruginosa* sunt sensibile la carboxypeniciline (ticarcilina, carbenicilina), ureidopeniciline (piperacilina), câteva cefalosporine (cefsulodin, ceftazidim), la monobactami (aztreonam), carbapeneme (imipenem, meropenem, doripenem).

În Europa, conform ultimului studiu MYSTIC 2006, rezistența la imipenem a fost în jur de 32%, 25% pentru ceftazidim, 22% pentru meropenem, 15% pentru piperacilina-tazobactam. Alte date europene (EARSS 2007) arată o mare diferență de rezistență între țările Nord Europe și Elveția, comparativ cu antibiorezistența din sudul Europei. Spre exemplu: rezistența la imipenem variază de la 5,4% în Elveția, față de 32,5% în Italia.

5. Sensibilitatea *Acinetobacter baumannii* la β -lactami

Acinetobacter baumannii, cocobacili Gram negativi, este una dintre bacteriile emergente

care pune mari probleme în instituțiile medicale cu secții de terapie intensivă. Afectează pacienții cu diverse cauze de imunodepresie, vârste extreme, boli grave, în condiții de ventilație asistată.

Tulpinile epidemice de MDR *Acinetobacter baumannii* sunt recunoscute a fi rezistente, de obicei, la toți β -lactamii, fluoroquinolone (mecanism cromosomal), aminoglycozide (enzime inactivatoare sau metilaze pentru 16S rRNA), rămânând sensibile doar la colistin, tigecyclină, rifampicină.

REZULTATE

Testarea, cunoașterea și analiza în dinamica multianuală a antibioretistenței locale reprezintă o obligație a microbiologilor, datorită informațiilor foarte utile pe care le furnizează colegilor clinicieni, în scopul alegerii celei mai eficiente decizii terapeutice, de primă intenție. O raportare anuală sumară, a laboratorului de Microbiologie – SVB, este exemplificată în Tabelul 2.

1. *Staphylococcus spp. metilino-rezistent*: Analiză în dinamică a incidenței globale a tulpinilor de *Staphylococcus aureus* MRSA în Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. V. Babeș”, în perioada 2000-2013, evidențiază o creștere a acestora de la 12,2% (2002) la 42,7% (2013). În 2015 incidența izolatelor MRSA a fost de 40,4%. Tulpinile de *S. aureus*/MRSA au fost izolate din diverse tipuri de prelevate: secreții leziuni cutanate superficiale și colecții profunde, infecții respiratorii și sfera O.R.L., infecții sistemice etc.

2. Dinamica rezistenței la macrolide a tulpinilor de *Streptococcus pyogenes* – SVB 2000-2015: Faringitele acute determinate de Streptococul beta hemolitic grup A Lancefield (*Streptococcus pyogenes*), au ca recomandare terapeutică penicilina G (administrare orală sau parenterală), ca fiind tratamentul de elecție, datorită costului redus, spectrului îngust de acțiune antibacteriană și eficienței clinice. Pacienții cu alergii la penicilină beneficiază de tratament cu cefalosporine de generația I: cefalexin, cefadroxil. În caz de eșec terapeutic, experții recomandă administrarea cefalosporinelor, datorită eficienței superioare a tratamentului în eradicarea infecțiilor și a portajului cronic.

În ultimii 3 ani, în laboratorul de microbiologie SVB am constatat o creștere bruscă a incidenței rezistenței la eritromicină a tulpinilor de *Streptococcus pyogenes*, datorită administrării macrolidelor în infecțiile respiratorii, în sfera O.R.L. și cutanate. Această atitudine terapeutică este frecvent întâlnită în medicina primară sau în automedicație. În anul 2010 am înregistrat o rezistență la macrolide de 3,2%, în 2011, o creștere bruscă la 10,1%, menținându-se peste 10% în următorii ani. În 2015 incidența izolatelor rezistente la eritromicină a fost de 20,3%.

3. Dinamica antibioretistenței la *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae este recunoscut a fi un important factor etiologic al bacteriemiei și meningitei și cea mai frecventă cauză a infecțiilor acute comunitare de tract respirator, incluzând

GRAFICUL 1. Dinamica izolării *Staphylococcus aureus* MRSA (SVB 2000-2015)

TABELUL 2. Incidența rezistenței (%) la agenți antimicrobieni a tulpinilor izolate în laboratorul de microbiologie clinică – Spitalul de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. Victor Babeș”, București

2013 (PAV A1, A2, A3, B1, B2, B3, B4, CA, CD)																				
Spital- % rezistență																				
Nr. tulp.	P	OX(i)	AMP	CRO	CN(g)	C	TE	E	RD	OFX	CIP	SXT	NI(b)	VAN	TEC	DA	LZD	NOR	CLR	
<i>Staphylococcus aureus</i>	383	96,6	42,7		17,4	0,8	52,4	52,4	18,5		20,2	0,8		0,0	0,0	52,3	0,6			
<i>Stafilococi coag(-)/SCN</i>	43	86,0	72,1		30,0	0,1	62,8	0,6	0,0		0,0	0,3		0,0	0,0	0,4	0,0			
<i>Streptococcus pyogenes</i>	713	0,0		0,0		0,45		11,17		0,0				0,0						
<i>Streptococcus grup B</i>	86	0,0		0,0		2,5		23,3		1,2				0,0						
<i>Streptococ grup C, G, F</i>	183	0,0		0,0		0,0		6,6		0,5				0,0						
<i>Enterococcus – urină</i>	132		21,2		67,6		82,1				76,0		1,5	1,5			0,0	74,4		
<i>Enterococcus – alte produse</i>	61		19,7		64,5	13,2	71,0	56,6	38,0		75,0			0,0			0,0			
<i>Strept. pneumoniae (a, f)</i>	289	2,74		0,91		12,0	45,7	58,8	1,0	0,7		53,7		0,0		48,8			54,2	
Nr. tulp.	TIC	TZP	CFP	PRL	CAZ	IPM	MEM	CN	AK	NET	TOB	CIP	ATM	FEP	CT					
<i>Acinetobacter</i>	52	76,5	78,7	78,8	75,0	78,8	60,0	65,4	56,0	59,6	36,7	40,4	82,9	87,2	71,2	0,0				
<i>Pseud. aeruginosa</i>	262	41,3	37,4	35,1	36,5	36,2	36,5	37,5	36,7	28,7	32,2	31,2	39,3	40,2	35,5	0,4				
Nr. tulp.	AMP	AMC	TZP	NET	KZ	CXM	CRO	CAZ	ATM	CN	IPM(d)	AK	C (c)	TE	NA(b)	NOR(b)	CIP	S300(b)	SXT	NI(b)
<i>Haemophilus infl.(e)</i>	366	10,3	0,2			0,8	0,0				0,0		1,5	3,7			0,0		27,8	
<i>Escherichia coli</i>	729	61,8	29,2	27,1	12,2	33,0	28,0	27,0	27,0	18,3	0,4	1,2	13,7	50,7	36,6	29,0	37,4	45,8	38,7	2,2
<i>K. pneumoniae</i>	338	100,0	56,5	78,0	28,4	61,5	55,3	54,4	54,4	34,7	7,9	8,0	26,7	55,9	44,9	43,4	42,0	55,3	43,5	46,0
<i>Enterobacter spp.</i>	55	100,0	100,0	40,3	33,3	100,0	40,7	40,0	40,0	29,6	6,0	9,1	17,8	26,9	50,0	63,6	25,0	40,9	33,3	63,6
<i>Proteus mirabilis</i>	87	62,7	38,0	31,3	62,5	45,9	33,7	31,0	31,0	36,1		4,5	58,3	98,7	51,7	35,5	40,0	56,0	61,5	100,0
<i>Shigella spp</i>	48	37,5															15,2		64,1	
<i>Salmonella BO, CO, DO</i>	129	25,6															2,3		6,2	

Legenda: AMP – ampicilină, AMC – amoxicilină + ac. clavulanic, AK – amikacină, ATM – aztreonam, C – cloramfenicol, CAZ – ceftazidim, CEC – cefaclor, CFP – cefoperazonă, CIP – ciprofloxacina, CLR – claritromicină, CN – gentamicină, CRO – ceftriaxon, CT – colistin, CXM – cefuroxim, E – eritromicină, FEP – cefepim, IPM – imipenem, KZ – ceftazolin, MEM – meropenem, NA – acid nalidixic, NET – netilmicină, NI – nitrofurantoin, NOR – norfloxacina, OFX – ofloxacina, OX – oxacilină, P – penicilina G, RD – rifampicină, S300 – sulfonamidă, SXT – trimetoprim-sulfametoxazol, TE – tetraciclină, TEC – teicoplanin, TIC – ticarcilină, TOB – tobramicină, TZP – piperacilină-tazobactam, VA – vancomicină.

GRAFICUL 2. Dinamica izolării *Streptococcus pyogenes* rezistent la macrolide (SVB 2008-2015)

pneumonia, rino-sinuzita și otita medie. Penicilina a fost larg utilizată, fiind considerată un agent antibacterian foarte activ împotriva infecțiilor streptococice, până în anii 1950- 1977, când au apărut primele tulpini rezistente, dar cu incidență foarte redusă. După anul 1970, situația s-a schimbat dramatic, odată cu apariția tulpinilor de *Streptococcus pneumoniae* rezistent la penicilină.

În contextul noilor criterii de interpretare a valorilor CMI pentru penicilina G în infecțiile non-meningeale cu *Str. pneumoniae*, începând cu anul 2009 se consemnează o rezistență semnificativ scăzută la penicilină G (2,7% – în 2013) a pneumococului izolat din infecții respiratorii și sfera ORL, stimulând clinicienii să utilizeze penicilina în tratamentul infecțiilor respiratorii necomplicate. Sensibilitatea pneumococilor la penicilină G este foarte variabilă, în funcție de serotip.

Tulpinile sălbatice de pneumococ sunt considerate sensibile la levofloxacin și moxifloxacin și intermediar sensibile la ciprofloxacin și ofloxacin.

Dintre carbapeneme, imipenem și meropenem sunt foarte active pe tulpinile de pneumococ rezistente la penicilină G, în timp ce ertapenemul este mai puțin activ.

4. Tulpinile de *Enterococcus faecium* izolate din infecții de tract urinar au prezentat 0% rezistență la vancomicină în perioada 1999-2012; 1,5% în 2013 și 11% în 2015.

5. Incidența tulpinilor de *E. coli* și *Klebsiella pneumoniae* producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins/ESBL

În perioada 2000-2015 se înregistrează în Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. V. Babeș” o creștere progresivă a incidenței tulpinilor de *E. coli* producătoare de ESBL, de la 3,2% în anul 2000 la 21% în anul 2015. Această situație se explică prin creșterea numărului de pacienți cu infecții multiple cu bacterii MDR din servicii de ATI și chirurgicale din alte spitale, tratamentului de primă intenție cu cefalosporine de generația a III-a și înființării compartimentului ATI în spitalul nostru.

GRAFIC 3. Dinamica rezistenței la penicilina G a tulpinilor de *Streptococcus pneumoniae* izolate între anii 2000-2013

GRAFICUL 4. Dinamica izolării *Enterococcus faecium* vancomicina – R (VRE 2015: VanA 9,9%, VanB: 1,1%)

GRAFICUL 5. Dinamica izolării *E. coli* ESBL (+) SVB 2000-2015

Klebsiella pneumoniae este o specie bacteriană, în general, mai rezistentă la antibiotice decât *E. coli*. Analiza în dinamică a incidenței tulpinilor producătoare de ESBL arată emergența tulpinilor de *K. pneumoniae* de la 17,6% în anul 2000 la 54,4% în anul 2013 și 57% în 2015.

Mecanismul de producere a beta-lactamazelor cu spectru extins la *Enterobacteriaceae* este frecvent asociat cu alte mecanisme de rezistență (fluoroquinolone, aminoglicozide, sulfonamide etc), care conduc la multidrogrezistență, situație în care tratamentul acestor specii beneficiază de

alternative terapeutice reduse, cum ar fi carbapenemele, polimixinele.

În anul 2013, din totalul tulpinilor de *K. pneumoniae* rezistente la carbapeneme, doar 7,9% au fost producătoare de carbapenemaze, restul prezentând alte mecanisme asociate: producere de ESBL, cefalosporinaze AmpC, impermeabilitate de membrană, alterarea porinelor etc. Dintre tulpinile producătoare de carbapenemaze, 6 au fost detectate cu gena *blaOXA 48*, 5 cu *blaKPC* și 4 cu *blaNDM-1*. În anul 2015, incidența izolatelor producătoare de carbapenemaze a fost de

GRAFICUL 6. Dinamica izolării *Klebsiella pneumoniae* ESBL (+) SVB 2000-2015

18,8%: 35/OXA-48, 8/KPC, 21 MBL (NDM-1). Tulpinile de *Klebsiella pneumoniae* izolate din uroculturi, producătoare de carbapenemaze, au avut ca alternative terapeutice nitrofurantoinul, colistinul și fosfomicina. Izolatele din secreții respiratorii sau secreții din plăgi superficiale/escare, au prezentat ca unică alternativă terapeutică sensibilitatea la colistin. 4 tulpini de *K. pneumoniae* izolate din infecții urinare nosocomiale, producătoare de carbapenemază New Delhi/NDM-1, au fost rezistente la toate antibioticele

GRAFICUL 7. Tulpini de *Klebsiella pneumoniae* producătoare de carbapenemaze izolate în 2015 (SVB)

testate, inclusiv colistin (RT PCR: gena MCR-1, care mediază rezistența la colisti: nedetectată. Probabil sunt implicate alte mecanisme genetice cromozomiale.

6. Rezistența la antibiotice a bacteriilor Gram negative-nefermentative

O caracteristică distinctivă a speciilor de *Pseudomonas aeruginosa* și *Acinetobacter baumannii* (ca patogeni responsabili, în special, de infecții dobândite în spital) o reprezintă nivelul înalt de rezistență intrinsecă la antibiotice, în particular la Beta-lactami. În plus, este recunoscută abilitatea acestor specii de a dobândi multiple mecanisme de rezistență, în special enzimatic, frecvent acumulate în aceeași tulpină.

Pentru perioada 2004-2015, rezistența izolatelor de *Pseudomonas aeruginosa* și *Acinetobacter baumannii* la carbapeneme este prezentată în Graficele 8 și 9.

CONCLUZII

Aplicarea noilor tehnologii, a metodelor avansate de cercetare, prin care se studiază me-

GRAFICUL 8. Dinamica rezistenței la meropenem *Pseudomonas* SVB 2004-2015

GRAFICUL 9. Dinamica rezistenței la meropenem a *Acinetobacter baumannii* SVB 2004-2015

canismele moleculare și genetice ale dobândirii rezistenței bacteriene la antibiotice, asigură un potențial uriaș de descoperire de molecule noi sau modificarea celor existente. Multe dintre produsele naturale vechi cu activitate antibiotică pot fi reanalizate din punct de vedere chimic și microbiologic.

Asocierile, combinațiile de antibiotice reprezintă o promisiune în succesul tratamentului bolilor emergente și reemergente.

Soluția reducerii incidenței infecțiilor cu bacterii MDR ar fi conservarea resurselor prețioase, reprezentate de „antibioticele de rezervă”, ce ar trebui utilizate doar în situații limită, salvatoare de viață.

Este nevoie de o implicare responsabilă a tuturor factorilor: pacienți (educație medicală, au-

tomedicație), medici (abuz, subdozare, antibioticul – administrat ca medicație antitermică în infecții virale), factori decizionali din agricultură și industrie, în scopul păstrării antibioticelor eficiente și pentru generațiile următoare.

Avem nevoie de o suplimentare periodică cu molecule de antibiotice noi și vaccinuri care să permită „oprirea timpului” în ceea ce privește evoluția și răspândirea rezistenței bacteriene.

Supravegherea antibioretistenței în zona noastră geografică este foarte importantă pentru administrarea unui tratament antibiotic de primă intenție corect și pentru elaborarea unei politici adecvate în lupta împotriva dobândirii rezistenței la antibiotice.

BIBLIOGRAFIE

1. Ambler R.P. The structure of Beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2089: 321-331, 1980.
2. Bonnet R. Growing group of extended- spectrum beta- lactamases: the CTX- M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1-14, 2004.
3. British Society of Antimicrobial Chemotherapy. 1991. A guide to sensitivity testing. *J. Antimicrob. Chemother.* 27: (suppl. D): 1- 50.
4. Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A. A funcțional classification scheme for beta- lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1211-1233, 1995.
5. Chabbert Y.A. Principles and Methods of antibiogram. *Antibiogram.* ASM Press, Editori: Patrice Courvalin, Roland Leclercq, Louis B. Rice., pg. 11-15, 2010.
6. Clatworthy A.E., Pierson E., Hung D.T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.* 3: 541-548, 2007.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informațional supplement: M100-S17.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Analysis and presentation of cumulative antimicrobial susceptibility test data; Approved Guideline- Third Edition M39- A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, P.A.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Nineteenth Informațional supplement; M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, P.A.
10. EUCAST, Vers. 1.0., Dec. 2013.
11. Dubois V., Poirel L., Arpin C., Coulange L., Bebear C., Nordman P., Quentin C. SHV- 49, a novel inhibitor- resistant beta-lactamase în a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 4466- 4469, 2004.
12. Goossens H. MYSTIC program: summary of European data from 1997 to 2000. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 41: 183-189, 2001.
13. Jacobs M.R., Bajaksouzian S., Zilles A., Lin G., Pankuch G.A., Appelbaum P.C. Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 oral antimicrobial agents based on pharmacodynamic parameters: 1997 U.S. Surveillance study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1901-8, 1999.
14. Jones R.N. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program platform (2004-2008, USA). JMI Laboratorie, North Liberty, Iowa, USA, 2009.
15. Jones R.N., Mutnick A.H., Varnam D.J. Impact of modified nonmeningeal *Streptococcus pneumoniae* interpretative criteria (NCCLS M100- S-12) on the susceptibility patterns of five parenteral cephalosporins: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997 to 2001). *J. Clin. Microbiol.* 40: 4332-3, 2002.
16. Livermore D.M., Struelens M., Amorim J., Baquero F., Bille J., Canton R., Henning S., Gatermann S., Marchese A., Mittermayer H., et al. Multicentre evaluation of the VITEK 2. Advanced Expert System for interpretive reading of antimicrobial resistance tests. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 289-300, 2002.
17. Nordmann P., Poirel L. Emerging carbapenemases în Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* 8: 321-331, 2002.