

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ
"ION IONESCU DE LA BRAD" IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA MICROBIOLOGIE – IMUNOLOGIE**

**DOCTORAND
OANA – ALEXANDRA CIOCAN (MOȚCO)**

TEZĂ DE DOCTORAT

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
PROF. UNIV. DR. MIHAI CARP – CĂRARE**

**IAȘI
2017**

**UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND VETERINARY
MEDICINE „ION IONESCU DE LA BRAD” IASI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
FIELD OF VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION MICROBIOLOGY – IMUNOLOGY**

**PHD STUDENT
OANA – ALEXANDRA CIOCAN (MOȚCO)**

DOCTORAL THESIS

**PHD COORDINATOR
PROF. UNIV. DR. CARP – CĂRARE MIHAI**

**IASI
2017**

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ
"ION IONESCU DE LA BRAD" IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA MICROBIOLOGIE – IMUNOLOGIE

DOCTORAND
OANA – ALEXANDRA CIOCAN (MOȚCO)

TEZĂ DE DOCTORAT

CARACTERIZAREA REZISTENȚEI LA ANTIBIOTICE A
TULPINILOR DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DE
ORIGINE UMANĂ ȘI ANIMALĂ ÎN ROMÂNIA

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
PROF. UNIV. DR. MIHAI CARP – CĂRARE

IAȘI
2017

**UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND VETERINARY
MEDICINE „ION IONESCU DE LA BRAD” IASI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
FIELD OF VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION MICROBIOLOGY – IMUNOLOGY**

**PHD STUDENT
OANA – ALEXANDRA CIOCAN (MOȚCO)**

**CHARACTERIZATION OF ANTIBIOTIC RESISTANT
OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS OF
HUMAN AND ANIMAL ORIGIN IN ROMANIA**

**PHD COORDINATOR
PROF. UNIV. DR. CARP – CĂRARE MIHAI**

**IASI
2017**

ABREVIERI

ADN	Acidul dezoxiribonucleic
AK	Amikacină
ARN	Acid ribonucleic
ATM	Aztreonam
<i>bla</i>	Genă ce codifică o b- lactamază
bp	Perechi de baze
CAZ	Ceftazidim
CDC	Centrul pentru prevenirea și controlul bolilor
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Institutul clinic de standarde în laboratoare
CMI	Concentrația minimă inhibitoare
CTX	Cefotaxime
EARSS	Rețeaua europeană de supraveghere și rezistența
antimicrobiană	
EDTA	Acid etilendiamintetraacetic
EFSA	Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară
ESBL	Beta – lactamaze cu spectru extins
EUCAST	Comitetul European privind testarea sensibilității
antimicrobiene	
FEP	Cefepim
GN	Gentamicină
I	Intermediar
IBL	Inhibitori de beta-lactamaze
IN	Infecțiile nosocomiale
IPM	Imipenem
ISCR	Insertie de secvență a regiunii comune
MBL	Metalo - β - lactamaze
MDR	Multiple drug resistance
MEM	Meropenem
MLST	Multilocus Sequence Typing
NDM	New Delhi metallo- β -lactamase
PB	Polimixina B
PCR	Reacție în lanț a polimerazei
PDR	Pandrug Resistance
PFGE	Electroforeza în câmp pulsatoriu

TEZĂ DE DOCTORAT – 2017

PIP	Piperacilin
PLP	Proteine de legare a penicilinei
R	Rezistent
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restricția polimorfismul lungimii fragmentelor
RT-PCR	Reacție în timp real de PCR
S	Sensibil
SAHN	Sequential, agglomerative, hierarchical and
nonoverlapping	
SPM	<i>Sao Paulo metallo-β-lactamase</i>
TAZ	Tazobactam
TOB	Tobramicină
TZP	Piperacilină – tazobactam
UPGMA	Unweighted Pair Group Method cu Arithmetic
Averages	
VIM	<i>Veronese imipenemase</i>
XDR	Extensive Drug Resistance

ABBREVIATIONS

DNA	Deoxyribonucleic acid
AK	Amikacin
RNA	Ribonucleic acid
ATM	Aztreonam
bla	Gene encoding a β -lactamase
bp	Base pairs
CAZ	Ceftazidim
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CIP	Ciprofloxacin
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
CTX	Cefotaxime
EARSS Network	European Antimicrobial Resistance Surveillance
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EFSA	European Food Safety Authority
ESBL	Extended spectrum β -lactamases,
EUCAST Testing	Antimicrobial Susceptibility Committee on European
FEP	Cefepime
GN	Gentamicin
I	Intermediate
IBL	β -lactamase inhibitors
IN	Nosocomial Infections
IPM	Imipenem
IPRC	Insertion Sequence Common Region
MBL	Metallo- β -lactamases
MDR	Multiple drug resistance
MEM	Meropenem
MLST	Sequence Typing multilocus
NDM	New Delhi metallo- β -lactam
PB	Polymyxin B

PCR	Polymerase Chain Reaction
PDR	Pandrug Resistance
PFGE	Pulsed-field electrophoresis
PIP	Piperacillin
PLP	Penicillin-binding Protein
R	Resistant
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RT-PCR	Real Time PCR
S	Sensitive
SAHNI	Sequential, agglomerative, Hierarchical and nonoverlapping
SPM	Sao Paulo metallo- β -lactams
TAZ	Tazobactam
TOB	Tobramycin
TZP	Piperacillin - tazobactam
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages
VIM	Veronese imipenem
XDR	Extensive Drug Resistance

CUPRINS

Cuprins.....	9
Introducere.....	13
Rezumat	19
 PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	 35
1. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> – GENERALITĂȚI	36
1.1. Ecologie	36
1.2. Epidemiologie.....	37
1.3. Implicarea în patologia umană și animală.....	39
2. REZISTENȚA IZOLATELOR DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> LA ANTIBIOTICE.....	41
2.1. Antibioticele și mecanismele de acțiune antimicrobiană.....	42
2.2. Mecanismele de rezistență la antibiotice.....	44
2.3. Metode fenotipice și moleculare de depistare a rezistenței la antibiotice.....	57
 PARTEA A II A – CONTRIBUȚII PROPRII	 63
3. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI	64
4. CADRUL INSTITUȚIONAL ÎN CARE S-AU DESFĂȘURAT CERCETĂRILE.....	66
5. IZOLAREA ȘI IDENTIFICAREA TULPINILOR DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	68
5.1. Material și metodă.....	68
5.1.1. Recoltarea probelor	68
5.1.2. Însămânțarea și cultivarea izolatelor.....	68
5.1.3. Identificarea fenotipică.....	70
5.1.4. Identificarea moleculară.....	76
5.2. Rezultate și discuții.....	83
5.3. Concluzii parțiale.....	88

6. STUDIUL ANTIBIOREZISTENȚEI LA TULPINILE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA DE ORIGINE UMANĂ ȘI ANIMALĂ	89
6.1. Testarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor izolate.....	89
6.1.1. Material și metodă.....	89
6.1.2. Rezultate și discuții.....	92
6.1.3. Concluzii parțiale.....	128
6. 2. Metode fenotipice de identificare a tulpinilor de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> producătoare de ESBL și MBL	131
6.2.1. Material și metodă.....	131
6.2.1.1. Identificarea tulpinilor producătoare de ESBL.....	131
6.2.1.2. Identificarea tulpinilor producătoare de MBL.....	135
6.2.2. Rezultate și discuții.....	140
6.2.3. Concluzii parțiale.....	141
7. SUPRAVEGHEREA EPIDEMIOLOGICĂ A TULPINILOR DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA	142
7.1. Metodă fenotipică de supraveghere epidemiologică – Antibiotiparea tulpinilor de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de origine umană și animală	142
7.1.1. Material și metodă	143
7.1.2. Rezultate și discuții.....	144
7.1.3. Concluzii parțiale.....	154
7.2. Metodă moleculară de supraveghere epidemiologică RAPD -ul tulpinilor de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de origine umană și animală.....	155
7.2.1. Material și metodă	155
7.2.2. Rezultate și discuții.....	156
7.2.3. Concluzii parțiale.....	171
8. CONCLUZII FINALE ȘI RECOMANDĂRI.....	176
8.1. Concluzii.....	176
8.2. Recomandări.....	177
BIBLIOGRAFIE.....	182
ANEXE.....	191

SUMMARY

SUMMARY.....	11
INTRODUCTION.....	16
ABSTRACT.....	27
 PART I - THE ACTUAL STAGE OF KNOWLEDGE	 35
1. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> – GENERAL.....	36
1.1. Ecology.....	36
1.2. Epidemiology.....	37
1.3. Involvement in human and animal pathology.....	39
2. RESISTANCE TO ANTIBIOTICS OF <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ISOLATES.....	41
2.1 Mechanisms of Antibiotic Resistance.....	42
2.2 Phenotypic and molecular methods for detecting antibiotic resistance.....	44
2.3. AND phenotypic methods for detecting molecular Antibiotic Resistance.....	57
 PART II - PERSONAL CONTRIBUTIONS	 63
3. AIMS AND OBJECTIVES.....	64
4. INSTITUTIONAL FRAMEWORK WERE CARRIED IN RESEARCH.....	66
5. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>.....	68
5.1. Material and method.....	68
5.1.1. Collection of samples.....	68
5.1.2. Processing samples in the laboratory.....	68
5.1.3. Phenotypic identification.....	70
5.1.4. Molecular identification.....	76

5.2. Results and discussions.....	83
5.3. Partial conclusions.....	88
6. THE STUDY ANTIBIOTIC RESISTANCE STRAINS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA OF ANIMAL AND HUMAN ORIGIN.....	89
6.1. Antibiotic susceptibility testing of isolates.....	89
6.1.1. Material and method.....	89
6.1.2. Results and discussions.....	92
6.1.3. Partial conclusions.....	128
6.2. Phenotypic methods for identification of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains producing ESBL and MBL	131
6.2.1. Material and method.....	131
6.2.1.1. Identification of ESBL-producing strains.....	131
6.2.1.2. Identification of MBL-producing strains.....	135
6.2.2. Results and discussions.....	140
6.2.3. Partial conclusions.....	141
7. EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE STRAINS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	142
7.1. Phenotypic surveillance epidemiological method – Antibiotype <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains of human and animal origin.....	142
7.1.1. Material and method.....	143
7.1.2. Results and discussions.....	144
7.1.3. Partial conclusions.....	154
7.2. Genotyping surveillance epidemiological method – RAPD Genetic analysis of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains of human and animal origin	155
7.2.1. Material and method.....	155
7.2.2. Results and discussions.....	156
7.2.3. Partial conclusions.....	171
8. FINAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.....	176
8.1. Conclusion.....	176
8.2. Recommendations.....	177
BIBLIOGRAPHY.....	182
ANNEXES.....	191

INTRODUCERE

Prezența microbilor în ecosistemul natural a fost intuită încă din antichitate. Bacteriile sunt cele mai vechi forme de viață și ca orice organism viu, scopul lor este să supraviețuiască, să se reproducă și, în mod evident, vor încerca să se adapteze la toți factorii care le pot afecta. De-a lungul timpului o parte din comunitatea medicală a semnalat pericolul care derivă din încercarea de a distruge microorganismele cu care coabităm, ele constituind o parte inextricabilă și obligatorie a unui ecosistem sănătos. Folosirea antibioticelor a stimulat modificări evolutive fără egal în istoria biologiei și a medicinei. De-a lungul vremii bacteriile au evoluat constant dar, în ultima vreme, și-au modificat ritmul de adaptare și transformare într-un mod pe care oamenii de știință l-au considerat imposibil.

Pseudomonas aeruginosa este specia cea mai importantă a genului *Pseudomonas*, aparținând familiei *Pseudomonadaceae*.

În prezent *Pseudomonas aeruginosa* reprezintă o provocare majoră pentru clinicienii din spitalele umane și veterinare, deoarece are rezistență naturală la multe antibiotice și o capacitate extremă de a dobândi rezistență.

Emergența crescută a tulpinilor de *P. aeruginosa* multirezistente la antibiotice a condus la intensificarea studiilor privind înțelegerea strategiilor utilizate de această bacterie în diferitele etape ale procesului infecțios, în scopul prevenirii și realizării unui control eficient al acestor infecții. Deși numărul studiilor referitoare la elucidarea rolului factorilor de virulență în diferite tipuri de infecții este impresionant, nu au fost încă stabilite corelații clare între prezența unui anumit profil de virulență și rezistența antimicrobiană.

La ora actuală, eșecul antibioterapiei se datorează, în principal, prezenței extinse a tulpinilor multidrog-rezistente și utilizării iraționale a antibioticelor.

Literatura de specialitate semnalează creșterea incidenței infecțiilor nosocomiale cu *Pseudomonas aeruginosa*, fapt explicat de condițiile intraspitalicești favorabile multiplicării și diseminării germenilor

și de starea de imunosupresie a pacienților care le permite exprimarea potențialului patogen.

Conform literaturii de specialitate, compușii antimicrobieni se apropie de sfârșitul eficienței lor. Deși s-a prevăzut evoluția rezistenței față de aceste medicamente, nu au fost intuite mecanismele prin care genele care conferă rezistență se vor răspândi. Prin urmare, substanțele antimicrobiene care se vor folosi în viitor trebuie să evite aceste mecanisme. Având în vedere complexitatea rezistenței față de antibiotice și creșterea continuă a acestui fenomen, este necesară o permanentă supraveghere, la care participă laboratoarele medical-veterinare și organele abilitate, în toată lumea.

Utilizarea irațională și abuzivă a antibioticelor – medicamentele cele mai frecvent prescrise – a dus la schimbarea ecologiei microbiene prin apariția tulpinilor "*de spital*", rezistente, parțial sau complet, la antibioticele uzuale, de rezervă și chiar la cele "*de excepție*". Rezistența microbiană dobândită reprezintă astăzi "*problema nr. 1*" a terapiei antiinfecțioase.

Pentru a beneficia în continuare de eficacitatea deosebită a antibioticelor vechi și noi, singura condiție este folosirea lor rațională. Succesul antibioticoterapiei, depinde pe de o parte, de informarea la zi a medicilor și, pe de altă parte, de utilizarea și interpretarea justă a tehnicilor microbiologice actuale, care asigură un diagnostic corect al infecției și câștigarea "pariului microbiologic".

Scopul acestei teze a fost: determinarea profilului de sensibilitate al tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* la antibioticele folosite în terapie și încadrarea lor în fenotipuri de rezistență; investigarea conexiunilor genetice existente între izolatele de origine umană și cele de origine animală; observarea cu ajutorul metodelor fenotipice mecanismele de antibiorezistență ce prezintă importanță globală, pentru a stabili ce metode pot fi optimizate pentru detectarea corectă și precoce a tulpinilor MDR în laboratorul clinic; recomandarea, pe baza rezultatelor, a unui protocol de identificare și supraveghere a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* multidrog-rezistente.

Doresc să adresez mulțumiri tuturor celor care, din punct de vedere profesional, direct sau indirect, au contribuit la elaborarea acestei teze.

Deosebită considerație, admirație și recunoștință domnului Prof.univ.dr. Mihai Carp-Cărare, coordonatorul științific al acestei teze, pentru încrederea acordată, sprijinul permanent oferit pe parcursul acestor ani de cercetare, pentru sfaturile profesionale și personale care m-au ajutat la realizarea și finalizarea acestei teze de doctorat.

Adresez mulțumiri Conducerii Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” Iași care mi-au oferit posibilitatea de a elabora și susține teza de doctorat în acest cadru academic.

Alese considerații și mulțumiri domnilor și doamnelor profesori universitari, membri în Comisia de doctorat pentru bunăvoința și efortul depus în analizarea tezei.

Exprim pe această cale, profunde și sincere mulțumiri colectivului de la disciplina de Microbiologie și Imunologie: Conf. univ. dr. Eleonora Guguianu, Conf. univ. dr. Cătălin Carp – Cărare, Șef lucr. dr. Cristina Horhogeia și nu în ultimul rând doamnei Cercetător Dr. Cristina Rîmbu pentru sprijinul profesional și moral fără de care evoluția mea profesională nu ar fi ajuns la acest nivel.

Sincere mulțumiri cadrelor didactice din cadrul disciplinelor de Boli Infecțioase, Micologie și Farmacologie, care mi-au oferit constant și dezinteresat ajutorul fizic și moral pentru a reuși să mă încadrez în toate etapele propuse pentru elaborarea acestei teze, mulțumiri alese și pentru ajutorul oferit în viața de zi cu zi.

Mulțumiri și recunoștință domnului Prof. univ. dr. Alper Ciftci și masterandei Yagmur Kocak din cadrul Ondokuz Mayıs Üniversitesi – Turcia, pentru suportul și ajutorul depus în realizarea investigațiilor de biologie moleculară.

Mulțumiri deosebite și alese colectivului de la Fundația HECUBA care, în cele mai dificile momente din viața mea, mi-a fost alături.

Mulțumesc doamnelor Conf. univ. dr. Carmen – Valentina Panzaru și Prof. univ. dr. Gabriela Coman din cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” din Iași și doamnei Biolog Dr. Elena Petraru, care m-au ajutat să recoltez și să identific izolatele pentru acest studiu, totodată mi-au oferit posibilitatea investigațiilor epidemiologice și de laborator, sincere mulțumiri pentru împărtășirea cunoștințelor și pentru prietenia oferită.

Mulțumesc familiei, care a fost permanent alături de mine; părinților pentru îndrumare și formare, fraților pentru iubirea cu care mă sprijină zilnic. În mod special, mulțumiri soțului meu, tatăl minunilor din viața mea, care a crezut și crede în mine. Alese mulțumiri și respect mamei Areta pentru încrederea oferită și suportul financiar.

Nu în ultimul rând, vreau să-i mulțumesc bunului Dumnezeu și Maicii Domnului, fără de care, nimic din ce se clădește nu rămâne clădit.

INTRODUCTION

The presence of microbes in the natural ecosystem was intuited since ancient times. Bacteria are the oldest forms of life and like any living organism, their goal is to survive, reproduce and, obviously, will try to adapt to all the factors that can affect.

Over time some of the medical community has signaled danger arising from the attempt to destroy microorganisms that coexist, as they are an inextricable part of a healthy ecosystem and binding. The use of antibiotics has stimulated changes in evolutionary biology and unequaled in the history of medicine. Over time the bacteria had evolved steadily but lately have changed the pace of adaptation and transformation in a way that scientists thought it impossible.

Pseudomonas aeruginosa is the most important genus *Pseudomonas*, belonging to the family *Pseudomonadaceae*.

Currently *Pseudomonas aeruginosa* is a major challenge for clinicians in hospitals and veterinary human because it has natural resistance to antibiotics and disinfectants and extreme capacity to acquire resistance.

Increased emergence of *P. aeruginosa* multiresistant to antibiotics has led to the intensification of studies on understanding the strategies used by this bacterium in various stages of the infection, to prevent and to achieve effective control of these infections. Although the number of studies on elucidating the role of virulence factors in different types of infections is impressive, it not yet established clear correlations between the presence of a certain profile of virulence and antimicrobial resistance.

Currently, antibiotic failure is due mainly to the presence of multidrug-resistant strains extensive and irrational use of antibiotics.

The literature indicates increased incidence of nosocomial infections with *Pseudomonas aeruginosa*, which is explained by favorable conditions in hospital germ multiplication and dissemination and state of immunosuppression of the patient which allows the expression of pathogenic potential.

According to the literature, antimicrobial compounds is nearing the end of their effectiveness. Although it has been provided for the

evaluation of resistance to these drugs were not predicted by mechanisms that confer resistance genes will be spread. Therefore, antimicrobial substances to be used in future need to avoid these mechanisms. Given the complexity of resistance to antibiotics and the continued growth of this phenomenon is needed constant supervision, involving medical and veterinary laboratories and bodies, worldwide.

Irrational use of antibiotics and abuse - the most commonly prescribed drugs - or so the microbial ecology of the emergence of strains "hospital" resistant, partially or completely, to common antibiotics, backup and even the "exceptional". Microbial resistance is gained today "issue no. 1" anti-infective.

To further benefit from special efficacy of antibiotics old and new, the only condition is their rational use. The success of antibiotic depends on the one hand, the doctors informed the day and, on the other hand, the use and interpretation of current fair microbiological techniques, which ensure a correct diagnosis of infection and winning "microbiological bet."

The aim of this thesis was: determine the pattern of susceptibility of strains of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics used in therapy and integration into resistance phenotypes; investigating genetic links between isolates of human and animal; observation methods using phenotypic antibiotic resistance mechanisms that present global importance, to determine what methods can be optimized for accurate and early detection of MDR strains in clinical laboratory; recommendation based on the results of a protocol for the identification and surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* strains multidorg-resistant.

I want to thank you all those who, professionally, directly or indirectly contributed to the development of this thesis.

Sincerely, admiration and gratitude to Mr. Prof. Mihai Carp-Path, the scientific coordinator of this thesis, for the trust continued support provided during these years of research, for professional and personal advice that helped me achieve and complete this thesis.

Thank you to management the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "Ion Ionescu de la Brad" University who gave me the opportunity to develop and support the thesis in this academic setting.

Chosen considerations and thanks ladies and gentlemen professors, members of the Commission for doctoral goodwill and effort in analyzing thesis.

I express in this way, profound and sincere thanks to the team of Microbiology and Immunology at discipline: Conf. Univ. dr. Eleonora Guguianu, Conf. univ. dr. Catalin Carp - Path, Lecturer. dr. Cristina Horhogeia and not least Mrs researcher Dr. Cristina Rimbu for professional and moral support without which my professional development would not have reached this level.

Sincerest thanks to the teachers in the disciplines of Infectious Diseases, Mycology and Pharmacology, who gave me constant and disinterested help physically and morally to succeed me to fit in all stages proposed for the development of this thesis, thanks chosen for their help in life daily.

Thanks and gratitude to Prof. dr. dr. Alper Ciftci and Yagmur master of the Ondokuz Mayıs Üniversitesi Kocak - Turkey for support and help in conducting investigations submitted molecular biology.

Special thanks to the staff and chosen from Hecuba Foundation who in the most difficult moments in my life was with me.

Thanks ladies Univ. dr. Gabriela Coman and Conf. univ. dr. Carmen - Valentina Panzaru of the University of Medicine and Pharmacy "Grigore T. Popa" University Biologist Dr. and Mrs. Elena Petraru, which helped to harvest and to identify isolates in this study also gave me the opportunity epidemiological and laboratory investigations, sincere thanks for sharing knowledge and friendship offered.

Thank you my family, who have always been there for me; guidance and training for parents, brothers for love that supports me daily. In particular, thanks to my husband, the father of miracles in my life who believed and believe in me. Chosen mother Areta thanks and respect for the trust and offered financial support.

Lastly, i want to thanks the good God and to his Mother, without which nothing is built remains built.

REZUMAT

Cuvinte cheie:

antibiorezistență, antibiotipare, identificare, Pseudomonas aeruginosa, RAPD

Teza de doctorat intitulată **"Caracterizarea rezistenței la antibiotice a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană și animală în România"** este redactată în 8 capitole și este structurată în două părți distincte.

Prima parte intitulată **"Stadiul actual al cunoașterii"** a fost fundamentată teoretic pe consultarea unor surse bibliografice reprezentative și cuprinde 27 de pagini, reprezentând 18,75 % din volumul tezei. Informațiile au fost sintetizate în 2 capitole și 6 subcapitole cu referire la: ecologia și epidemiologia speciei *Pseudomonas aeruginosa*, implicarea acestei bacterii în patologia umană și animală; rezistența la antibiotice a izolatelor de *Pseudomonas aeruginosa* și mecanismele de acțiune antimicrobiană a acestora; tehnicile fenotipice și moleculare de testare și identificare a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa*, în vederea identificării fenotipurilor rezistente la antibioticele utilizate în terapie specifică.

Partea a II-a, include **"Contribuțiile proprii"**, prezentate în 117 de pagini, reprezentând 81,25% din lucrare și cuprinde 6 capitole și 9 subcapitole, care descriu scopul și obiectivele, cadrul instituțional în care s-au desfășurat cercetările, metodele folosite pentru izolarea și identificarea tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa*, studiul antibiorezistenței la tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană și animală, cu analiza sensibilității la antibiotice a tulpinilor izolate și identificarea tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* producătoare de ESBL și MBL prin metode fenotipice; verificarea existenței unei legături între izolatele de origine umană și animală prin metodă fenotipică (antibiotiparea) și moleculară (RAPD-PCR).

Lucrarea însumează 24 de tabele și 99 de figuri, iar bibliografia cuprinde 94 de titluri bibliografice.

Capitolul 3, cuprinde **“Scopul și obiectivele cercetării”**. Cercetările efectuate au urmărit determinarea sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* la antibioticele folosite în terapie și încadrarea lor în fenotipuri de rezistență și testarea comparativă a metodelor fenotipice de identificare a tulpinilor rezistente la antibiotice, în vederea stabilirii unor metode optime de detectare corectă și precoce a antibioretistenței în condițiile unui laborator clinic, având ca scop final antibioterapia țintă în infecțiile cu *Pseudomonas aeruginosa*.

Obiectivele propuse: 1. determinarea profilului de sensibilitate la antibiotice a tulpinilor de *P. aeruginosa* izolate de la animale și de la oameni; 2. recomandarea, pe baza cercetărilor efectuate a unui protocol de identificare și supraveghere a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* multidorg-rezistente; 3. stabilirea unei legături genetice a tulpinilor de origine umană cu cele de origine animală; 4. identificarea și declararea în timp util a infecțiilor cu *Pseudomonas aeruginosa* atât în clinicile veterinare cât și umane pentru a preveni apariția și evoluția focarelor de infecție nosocomială; 5. valorificarea și diseminarea rezultatelor obținute prin prezentarea lor la manifestări naționale și internaționale.

Capitolul 4 prezintă cadrul instituțional în care s-au desfășurat cercetările.

În capitolul 5 intitulat “Izolarea și identificarea tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa*”, sunt prezentate etapele examenului bacteriologic desfășurate în vederea identificării și confirmării tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* izolate. În urma investigațiilor efectuate au fost izolate și confirmate molecular 125 de tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de la pacienții umani și 57 de tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de la animale. Tulpinile de origine umană au provenit din aspirate bronșice (15%), aspirate gastrice (12%), lichide pleurale (10%), colecții purulente post-operatorii (21%), secreții auriculare și oculare (20%), probe de spută (10%), probe de urină (12%). Cele de origine animală au fost recoltate din otite (30%), abcese perianale (44%), septicemii (14%), conjunctivite (12%).

Capitolul 6 intitulat **“Studiul antibioretistenței la tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană și animală”**. Eficiența unui tratament cu antibiotice este condiționată, în primul rând, de sensibilitatea agentului patogen față de antibioticul respectiv, proprietate care se apreciază “*in vitro*” prin antibiogramă. Scopul esențial al acestor investigații a fost acela de a ajuta decizia terapeutică, fiind utilă în: supravegherea epidemiologică a rezistenței bacteriene care va orienta

ulterior schemele de antibioterapie; compararea fenotipurilor de rezistență a tulpinilor presupus responsabile de infecția nosocomială și verificarea corectitudinii identificării bacteriene, prin punerea în evidență a rezistenței naturale. Toate tulpinile au fost testate față de cele 13 antibiotice care sunt uzual recomandate în patologia infecțioasă produsă de *Pseudomonas aeruginosa*.

Din aspirate bronșice prelevate de la pacienți umani (H-1) s-au izolat 19 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* și dintre acestea 5,27% au fost simultan rezistente la toate cele 13 antibiotice. Un aspect pozitiv este faptul că 15,78% din tulpinile testate au manifestat sensibilitate față de toate antibioticele testate.

Din aspirate gastrice prelevate de la pacienții umani (H-2), s-au izolat 15 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, 6,66% dintre tulpini fiind simultan rezistente la 11, 8, 7, 3, 2, 1 dintre antibioticele testate, 60% de tulpinile testate au manifestat sensibilitate simultană la toate cele 13 antibiotice testate. Nu s-a izolat nici o tulpină multirezistentă față de antibioticele testate.

Izolatele de *Pseudomonas aeruginosa* din lichidele pleurale (12 tulpini) (H-3), 8,33% au fost simultan rezistente la 9 antibiotice și la 3 antibiotice.

Cele 12 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din spută (H-4), 7,69% au fost simultan rezistente: față de 11 antibiotice; 23,07% tulpini față de 10 antibiotice; 15,34% față de 9 antibiotice; 15,34% tulpini față de 2 antibiotice și 7,69% dintre tulpini au manifestat rezistență la un singur antibiotic; 12 tulpini testate la grupul H-4, 8 tulpini au fost rezistente la IPM, MEM.

Din cele 15 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din probe de urină (H-5), 20% dintre tulpini au prezentat simultan rezistență față de: 11 antibiotice, 13,33% tulpini față de 10 antibiotice; 33,33% dintre tulpini au manifestat rezistență la un singur antibiotic.

Din 25 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din secreții otice de la pacienții umani (H-6), 4% tulpini au fost simultan rezistente față de 10 și respectiv 8 antibiotice.

Tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din colecții purulente (26 tulpini) (H-7), 3,84% au fost rezistente la 13 antibiotice.

Din secrețiile otice provenite de la animale (A-1), s-au izolat 17 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, 11,76% dintre acestea au fost rezistente la 13 antibiotice. Toate cele 17 tulpini testate au fost rezistente la PIP și TAZ.

Din colecțiile purulente perianale provenite de la animale (A-2) s-au izolat 25 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* din care: 36% au fost rezistente la cele 13 antibiotice testate.

Grupul A-3: 8 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din hemoculturi provenite de la animale (A-3), 25% au fost rezistente la 12 antibiotice, 7 tulpini au fost rezistente la PB și ATM, 6 tulpini au fost rezistente la MEM, 5 tulpini au fost rezistente la CIP și IPM, 3 tulpini au fost rezistente la TOB și 2 tulpini au fost rezistente la AK. Toate cele 8 tulpini testate au fost rezistente la TZP, PIP, FEP, CAZ și TZP.

Din probele de secreții conjunctivale provenite de la animale (A-4) s-au izolat 7 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* din care, 71,42% au fost rezistente la toate antibioticele testate. Toate cele 7 tulpini testate au fost rezistente la TZP, CAZ, FEP, CIP, GN, PB, PIP, ATM.

Utilizarea mediului de cultură Briliance ESBL a permis creșterea și multiplicarea a 68% din tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană și 100% tulpinile de origine animală.

În urma testului de sinergie între două comprimate pentru detectarea ESBL lotul de tulpini testat nu a prezentat zone de inhibiție sugestive/relevante pentru identificarea tulpinilor de ESBL, respectiv creșterea zonei de inhibiție în jurul antibioticului potențat cu inhibitor β -lactamază. Prin metoda discurilor combinate (Oxoid/Becton Dickinson - "Combination Discs" și Mast "MAST DD") s-a evidențiat o creștere a diametrului de inhibiție cu > 5 mm în prezența clavulanatului, ceea ce indică prezența de ESBL.

Metoda discului combinat imipenem-EDTA pentru depistarea metalo- β -lactamazelor, aplicată doar pe tulpinile care au fost rezistente la imipenem (52 tulpini de origine umană și 37 de origine animală) a surprins prin faptul că toate aceste tulpini elaborează enzime metalo-beta-lactamaze. Pentru susținerea rezultatului, aceleași tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, au fost testate și cu E-test MBL. Rezultatele au confirmat faptul că cele 89 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, testate pentru metalo-beta-lactamaze, au fost pozitive la acest test.

În **capitolul 7** intitulat "**Supravegherea epidemiologică a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa***", sunt prezentate datele privind supravegherea epidemiologică a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* obținute prin antibiotipare și teste moleculare.

Antibiotiparea izolatelor s-a realizat cu programul UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) / Quantity One Software (Bio – Rad Laboratories, SUA), lotul studiat a fost împărțit 2

grupuri, primul cuprinzând 125 tulpini de origine umană și 57 tulpini de origine animală. Conform acestor rezultate; 57 de tulpini de origine animală izolate au fost colectate în 4 grupe principale (A1-A4) pe bază de 70% similitudini. Pe de altă parte, 125 izolatele umane au fost colectate în 7 grupe principale (H1-H7) la 70% similitudine. Antibiotiparea este o metodă prin care se identifică un tipar dintr-un lot total analizat, cu ajutorul lui se poate urmări într-un circuit închis proveniența tulpinilor izolate (ferme, spitale etc.). Antibiotiparea poate fi utilizată ca metodă de supraveghere epidemiologică.

Tulpinile analizate cu tehnica moleculară RAPD prezintă un grad ridicat de înrudire genetică, ceea ce poate concluziona că tulpinile provin din același mediu și informația genetică se transmite de la o tulpină la altă.

Tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* au fost grupate în funcție de proveniența lor: 125 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană, reunite în 7 grupe (H1-H7); 57 de tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de origine animală, reunite în 4 grupe (A1- A4), izolate din: secreții auriculare, abcese perianale, septicemii și secreții conjunctivale.

Grupul H-1 (aspirate bronșice) a fost alcătuit din 3 cluster, fiecare cluster având coeficient diferit de înrudire genetică: cel mai mare grad este atribuit primului cluster, H1 – RD1, H1 – RD2 și H1 – RD3, respectiv tulpinile 115, 78 și 53, înrudirea profilelor din interiorul lui fiind de 80% - 85 %; al 2-lea cluster are coeficient de similitudine de 71%, H1 – RG1 și H1 – RG2, reprezentat de tulpinile 59 și 52, similar primului cluster cele două tulpini la antibiotipare au făcut parte din același cluster; al 3-lea cluster are un grad de înrudire genetică de la 75% la 84%, acest cluster predomină în grupul analizat. Relaționarea între tulpinile 115 și 53 a fost identificată și la antibiotipare, cele două tulpini aparținând aceluiași cluster, ceea ce confirmă înrudirea lor genetică.

Grupul H-2 (aspirate gastrice) a inclus 14 tipuri de profile genetice din care 4 sunt de tip unic: primul cluster cuprinde 3 tipuri de profile cu grad de înrudire genetic de 84%; cu predominanță în grup este cel de-al 2-lea cluster, cu coeficient de înrudire de 75%, clusterul fiind format din 7 tipuri de profile; un grad înalt de înrudire este reprezentat de perechea de profile H2 – RF6 și H2 – RF7, fiind vorba de tulpinile 23 și 12

Grupul H-3 (lichide pleurale) a inclus 2 cluster: primul având coeficient de similitudine de 77% și este format din 2 tipuri de profile; al 2-lea cluster, ce predomină în grup, are 4 tipuri de profile, astfel grupul are 10 tipuri de profile din care 4 sunt de tip unic. Înrudirea genetică ce

depășește procentul de 90% o întâlnim între profilele H3 – RF3 și H3 – RF4, fiind reprezentate de tulpinile 90 și respectiv 87. La antibiotipare cele două tulpini au prezentat un coeficient de similitudine de 0,78, fiind acum dovedită prin înrudirea genetică de 90%.

Grupul H-4 (spută) a inclus 3 clustere și 4 profile genetice de tip unic: primul cluster are 2 tipuri de profile genetice, coeficientul de înrudire depășește pragul stabilit de 0,70; cel de-al 2-lea cluster este înrudit într-un procent de 72%, fiind format din profilul H4 – RE1 și H4 – RE2, respectiv tulpinile 98 și 97; ultimul cluster este format din 4 tipuri de profile genetice, gradul lor de înrudire variază de la 71% la 76%. Toate tulpinile din acest grup provin de la pacienți cu aceeași patologie de fond, respectiv pacienți diagnosticați cu Fibroză chistică.

Grupul H-5 (uroculturi) a inclus 3 clustere și 3 tipuri unice de profile genetice: primul cluster este format din 2 tipuri de profile genetice, având coeficient de înrudire de 79%. cel de-al 2-lea cluster, cu procentajul de înrudire superior primului, 82%, este format din 2 tipuri de profile, H5 – RE1 și H5 – RE2, fiind vorba de tulpinile 114 și 22 izolate de la pacienți cu patologii de fond diferite, având în comun mediul de proveniență; ultimul cluster, predominant în acest grup, este format din 7 tipuri de profile cu diferite procente de similitudine, de la 74% până la 92%. Cel mai mare procentaj de înrudire fiind la perechea de profile H5 – RF1 și H5 – RF2, reprezentate de tulpinile 51 și 32, aceste izolate provin de la pacienți diferiți cu patologii diferite.

Grupul H-6 (secreții auriculare) a inclus 4 clustere cu 20 de tipuri de profile genetice și 2 profile genetice unice: primul cluster fiind reprezentat de 2 profile ce au coeficient de înrudire de 0,78. Similar primului cluster, al 2-lea și al 3-lea cluster cuprind câte 2 tipuri de profile genetice având coeficient de înrudire inferior primului, respectiv de 0,71 și 0,75, înrudirea lor fiind semnificativă deoarece depășește pragul de 0,70 stabilit prin formulă matematică. Al 4-lea cluster cuprinde 12 tipuri de profile genetice, cu procentaje diferite de înrudire genetică, de la 74% până la 90%. H6 – RF11 și H6 – RF12, reprezentate de tulpinile 112 și 103, 105, 121 care au profilele genetice identice de 90%, ele au fost izolate de la pacienți diferiți, internați în unități diferite deoarece patologiile de fond nu au fost similare.

Grupul H-7 (colecții purulente postoperatorii) a inclus 3 clustere cu 21 de tipuri de profile genetice și 7 profile de tip unic: primul cluster are coeficient de înrudire de 0,71, în interiorul lui ajungându-se până la 92% înrudirea genetică. Al 2-lea cluster este alcătuit din 5 tipuri de

profile, coeficientul de înrudire variază de la 0,74 până la 0,90. H7 – R11 și H7 – R12, reprezentate de tulpinile 38 și 26 au profilul genetic înrudit în proporție de 90%, izolatele provin de la pacienți diferiți cu patologii de fond diferite. Al 3-lea cluster analizat este format din 6 tipuri de profile genetic înrudite în procentaj de 73% până la 93%. Profile H7 – RJ5 și H7 – RJ6, reprezentate de tulpinile 107 și 99, au coeficient de înrudire de 0,93. Izolatele provin de la pacienți care provin din același mediu social, cu aceeași vârstă, dar cu patologii de fond diferite de tip cronic.

Grupul A-1 (exsudate otice) a inclus 2 cluster cu 9 tipuri de profile genetice: primul cluster cuprinde 3 tipuri de profile cu coeficient de înrudire de 0,73; cel de-al 2-lea cluster este format din 6 tipuri de profile, înrudirea genetică variază de la 72% până la 94%. Profilele A1 – RB5 și A1 – RB6, reprezentate de tulpinile 140 și 131 au gradul superior de înrudire genetic.

Grupul A-2 (colecții purulente perianale) a inclus 3 cluster cu 18 tipuri de profile genetice și 5 profile de tip unic: primul cluster este format din 2 profile cu coeficient de înrudire genetic de 0,72. Al 2-lea cluster însumează 3 tipuri de profile cu variații ale coeficientului de înrudire de la 0,71 până la 0,83. Al 3-lea cluster din acest grup, predominant de altfel, cuprinde 7 tipuri de profile genetice, similar celui de-al 2-lea cluster și aici întâlnim variații ale coeficientului de înrudire, de la 0,72 până la 0,86. Tulpinile ce reprezintă profilele genetice din ultimul cluster au în comun rezultatele la antibiogramă, unde întâlnim o rezistență de aproximativ 100%.

Grupul A-3 (hemoculturi) a inclus un cluster cu 5 tipuri de profile genetice și un singur profil de tip unic. Clusterul are coeficient de înrudire de 0,74. În interiorul lui profilul A3 – RB3, reprezentat de tulpinile 149, 150, 151 și 156 și profilul A3 – RB4 reprezentat de tulpina 139 prezintă 88% înrudire genetică.

Grupul A-4 (secreții conjunctivale) a inclus un cluster cu 3 tipuri de profile genetice și un singur profil de tip unic: coeficientul de înrudire ajunge până la 79%. A4 – RB2 și A4 – RB3. Tulpinile prezintă 79% grad de înrudire iar profilul de rezistență este aproximativ identic la aceste tulpini, care provin de la specii diferite (iepure, pisică și câine).

Analiza de grup, realizată pe tulpinile reprezentative fiecărui profil a evidențiat un singur cluster și 6 profile de tip unic. Clusterul este format din 5 tipuri de profile genetice, fiecare profil este reprezentat de câte un izolat din grupe diferite: TRG1 – H1 (aspirate bronșice recoltate de la oameni), TRG2 – A4 (secreții otice izolate de la animale de companie),

TRG3 – A3 (septicemii de la animale), TRG4 – H7 (izolate din secrețiile purulente postoperatorii de la oameni), TRG5 – A2 (izolate din abcese perianale de origine animală). Cele 6 profile de tip unic sunt: TRA – H4 (izolate din spută), TRB – H6 (izolate din secreții otice), TRC – H3 (izolate din lichide plurale), TRD – A1 (izolate din secreții otice), TRE – H5 (izolate din probe de urină), TRF – H2 (izolate din aspirate gastrice). În interiorul clusterului procente de înrudire genetică variază de la 73% până la 91%. Profilul cu cel mai mare procentaj de înrudire, respectiv 91%, format din TRG4 – H7 și TRG5 – A2, a fost reprezentat de tulpinile izolate de la oameni din secrețiile postoperatorii și tulpini izolate din abcese perianale de la animale care au 91% procentul de înrudire genetică.

În capitolul 8 intitulat "**Concluzii finale și recomandări**", sunt structurate 9 concluzii principale și 9 recomandări, desprinse în urma investigațiilor efectuate.

ABSTRACT

Key words

antibioresistance, antibiotyping, identification, Pseudomonas aeruginosa, RAPD

Thesis entitled "Characterization of antibiotic resistance strains of *Pseudomonas aeruginosa* of human and animal in Romania" is written in 8 chapters and is divided into two distinct parts.

The first part entitled "The current state of knowledge" theory was based on consultation with representative sources and comprises 27 pages, representing 18,75% of the thesis. The information was summarized in two chapters and 6 chapters covering: the ecology and epidemiology of the species *Pseudomonas aeruginosa*, the involvement of bacteria in human and animal pathology; antibiotic resistance isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and their mechanisms of antimicrobial action; Phenotypic and molecular testing techniques and identification of *Pseudomonas aeruginosa* strains to identify phenotypes resistant to specific antibiotics used in therapy.

Part II includes "own contributions" presented in 117 pages, representing 81,25% of the work and comprises 6 chapters and 9 chapters, describing the purpose and goals, the institutional framework in which the research took place, methods used for isolating and identifying the strains of *Pseudomonas aeruginosa*, the study antibioresistance strains of *Pseudomonas aeruginosa* of human and animal analysis antibiotic susceptibility of isolates and identification of strains of *Pseudomonas aeruginosa* producing ESBL and MBL; checking a connection between isolates of human origin and animal by phenotypic methods (antibiotyping) and molecular (RAPD-PCR).

Thesis have 24 work tables and 99 of figures, and the bibliography contains 94 references.

Chapter 3 contains "Purpose and research objectives." Research has sought to determine the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to

antibiotics used in therapy and integration into resistance phenotypes and comparative testing methods phenotypic identification of strains resistant to antibiotics, in order to establish how best to detect and correct early antibioresistance in clinical laboratory conditions, with the ultimate aim antibiotics target *Pseudomonas aeruginosa* infections.

Objectives: 1. Determination of antibiotic sensitivity profile of *P. aeruginosa* strains isolated from animals and humans; 2. The recommendation, based on research carried out a protocol for the identification and surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* strains multidorg-resistant; 3. to link genetic strains of human origin of the animal; 4. timely identification and declaration of *Pseudomonas aeruginosa* infections in both human and veterinary clinics to prevent nosocomial outbreaks and developments; 5. exploitation and dissemination of the results by presenting them at national and international events.

Chapter 4 presents the instituțional in which the research took place.

In Chapter 5, entitled "Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* strains" are presented the steps taken to identify bacteriological examination and confirmation of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated. Following investigations carried out were isolated and molecular confirmed 125 strains of *Pseudomonas aeruginosa* from human patients and 57 strains of *Pseudomonas aeruginosa* from animals. The strains of human origin were from bronchial aspirate (15%), aspirated gastric (12%), pleural liquids (10%), purulent collections postoperative (21%), runny ear and eyes (20%) sputum samples (10%), urine samples (12%). The animal were collected from ear infections (30%), perianal abscesses (44%), sepsis (14%), conjunctivitis (12%).

Chapter 6 entitled "antibioresistance study of *Pseudomonas aeruginosa* strains of human and animal." Effectiveness of treatment with antibiotics is conditioned primarily by the pathogen susceptibility to the antibiotic in question, property is assessed "in vitro" by antibiotic. The essential purpose of these investigations was to help the therapeutic decision being useful: epidemiological surveillance of bacterial resistance that will guide subsequent schemes antibiotics, comparing phenotypes resistant strains presumed responsible for nosocomial infection correctness identifying bacterial, by putting out of natural resistance. All

strains were tested against 13 antibiotics are usually recommended produced by *Pseudomonas aeruginosa* infectious pathology.

Since bronchial aspirates collected from human patients (H-1) were isolated 19 strains of *Pseudomonas aeruginosa* and of which 5.27% was 13 at the same time resistant to all antibiotics. A positive aspect is that 15.78% of tested strains showed sensitivity to all antibiotics tested.

Of gastric aspirates collected from human patients (H-2), they have isolated 15 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, being at the same time 6.66% of the strains resistant to 11, 8, 7, 3, 2, one of the antibiotics tested, 60 % of tested strains showed sensitivity simultaneously to all 13 antibiotics tested. There was no strain isolated tested antibiotics against multi-drug resistant.

Pseudomonas aeruginosa isolated from pleural fluid (12 strains) (H-3), 8.33% were simultaneously resistant to the three antibiotics and antibiotic 9.

The 12 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from sputum (H-4), 7.69% were simultaneously resistant: 11 to antibiotics; 23.07% strains to 10 antibiotics; 15.34% vs. 9 antibiotics, 15.34% against 2 strains antibiotics and 7.69% of the strains showed resistance to one antibiotic; 12 strains tested group H-4, 8 strains were resistant to IPM, MEM.

Out of the 15 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urine samples (H-5), 20% of the strains had at the same time resistance to 11 antibiotics, 13.33% compared with 10 strains of antibiotics; 33.33% of the strains showed resistance to one antibiotic.

Out of 25 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ear secretion from human patients (H-6), 4% were simultaneously strains resistant to antibiotics 10 and 8 respectively.

Pseudomonas aeruginosa strains isolated in purulent collections (26 strains) (H-7), 3.84% were resistant to 13 antibiotics.

Perianal purulent collections from animals (A-2) were isolated 25 strains of *Pseudomonas aeruginosa* of which 36% were resistant to 13 antibiotics tested. Of the 8 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from blood cultures from animals (A-3), 25% of the strains were resistant to 12 antibiotics, 25% of the strains were resistant to 11 antibiotics, 25% strains were resistant to 10 antibiotics, resistant strains were 12.5% to 9 antibiotic-resistant strains were eight antibiotics. Of the eight tested strains from the group A-3, 7 strains were resistant to PB and ATM, 6

strains were resistant in MEM, 5 strains were resistant to CIP and IPM three strains were resistant to TOB and two strains AK was resistant. All 8 strains tested were resistant to TZP, PIP, FEP, and TZP CASE

The evidence of conjunctival secretions from animals (A-4) were isolated seven strains of *Pseudomonas aeruginosa* of which 71.42% were resistant to all antibiotics tested. All 7 strains tested were resistant to TZP, IF ANY, FEP, CIP, GN, PB, PIP, ATM.

Using culture medium Briliance ESBL allowed a 68% growth and multiplication of *Pseudomonas aeruginosa* strains of human and animal strains 100%.

Following test for the detection of synergy between the two tablets lot ESBL strains tested showed no inhibition zones suggestive / relevant for the identification of ESBL strains or growth inhibition zone around the antibiotic β -lactamase inhibitor boosted. By way of combination discs (Oxoid / Becton Dickinson - "Combination Discs" masks "MAST DD") was shown to inhibit an increase in the diameter of > 5 mm in the presence of clavulanate, which indicates the presence of ESBL.

Imipenem-EDTA combined disk method for detection of β -lactamases Metal, applied only strains that were resistant to imipenem (52 strains of human and animal 37) surprised by the fact that all these strains develop enzymes metallo-beta- lactamases. In order to support the result of the same strain of *Pseudomonas aeruginosa* they were tested with E-test MBL. The results confirmed that the 89 strains of *Pseudomonas aeruginosa* tested for metallo-beta-lactamases were positive in this test.

In Chapter 7 entitled "Epidemiological Surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* strains" are presented data on epidemiological surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained by antibiotipare and molecular tests.

Antibiotyping of isolates was performed with the program UPGMA (unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) / Quantity One Software (Bio - Rad Laboratories, USA), the study group was divided two groups, the first comprising 125 strains of human origin and 57 strains of animal origin . According to these results; 57 strains isolated animal were collected into 4 main groups (A1-A4) based on 70% similarity. On the other hand, 125 human isolates were collected in seven main groups (H1-H7) to 70% similarity. Antibiotyping is a method that identifies a pattern of a total batch analyzed with help you can watch a closed circuit

isolates origin (farms, hospitals etc). Antibiotyping can be used as a method of epidemiological surveillance.

Strains analyzed with molecular technique RAPD a high degree of genetic relatedness, which may conclude that stems from the same background and genetic information is passed from one strain to another. *Pseudomonas aeruginosa* strains were grouped according to their origin: 125 strains of *Pseudomonas aeruginosa* of human origin, gathered in 7 groups (H1-H7); 57 strains of *Pseudomonas aeruginosa* animal pooled into 4 groups (A1-A4), isolated: ear discharge, perianal abscesses, septicemia and conjunctival discharge.

Group H-1 (bronchial aspirate) consisted of three clusters, each cluster having different coefficient of relatedness genetics: the highest is assigned to the first cluster, H1 - RD1, H1 - RD2 and H1 - RD3, respectively strains 115 78 and 53, the affinity profiles inside of being 80% - 85% of the 2nd cluster is the coefficient of similarity of 71% H1 - RG1 and H1 - RG2, represented by the stems 59 and 52, similarly to the first clusters the two strains antibiotipare were part of the same cluster; 3 rd cluster has a degree of genetic relatedness from 75% to 84%, this cluster among the group analyzed. Relationships between 115 and 53 strains were identified and antibiotipare two strains of the same cluster, which confirms their genetic relatedness.

H-2 group (gastric aspirate) included 14 types of genetic profiles of which 4 are unique type: the first cluster comprises three types of profiles degree of genetic relatedness of 84%; predominant group is the the 2nd cluster, kinship coefficient of 75%, the cluster consisting of 7 types of profiles; a high degree of relatedness is the pair of profiles H2 - d 6 and H2 - RF7, involving strains 11:12 p.m.

H-3 group (pleural fluid) included two clusters: the first having similarity coefficient of 77% and consists of two types of profiles; the 2nd cluster, that predominate in the group, has 4 types of profiles, so the group has 10 types of profiles that are unique type 4. Genetic kinship percentage exceeding 90% a meeting between profiles H3 - RF 3 and H3 - RF4, being represented by strains 90 and 87. antibiotipare that the two strains showed a similarity coefficient of 0.78, the similarity is now proven by 90% genetic relatedness.

Group H-4 (sputum) includes 3 clusters and 4 unique genetic profiles by type: first cluster has 2tipuri of genetic profiles, the coefficient of relatedness exceeds the threshold set by 0.70; at the 2-nd cluster is related to a percentage of 72%, consisting of profile H4 - and H4 RE1 -

RE2, 98 and 97 strains respectively; last cluster consists of 4 types of genetic profiles, their degree of kinship ranges from 71% to 76% .All strains of this group come from patients with the same pathology background that patients diagnosed with cystic fibrosis.

Group H-5 (urine) included three clusters and three unique types of genetic profiles: first cluster consists of two types of genetic profiles having kinship coefficient of 79%. the 2-nd cluster, the percentage of relatedness superior first, 82% consists of 2 types of profiles, H5 - RE1 and H5 - RE2, involving strains 114 and 22 isolates from patients with pathologies background different having common area of origin; the last cluster, predominantly in this group consists of seven types of profiles with different percentages of similarity, from 74% to 92%. The highest percentage of relatedness is the pair of profiles H5 - and H5 RF1 - RF2, represented by strains 51 and 32, these isolates come from different patients with different pathologies.

Group H-6 (discharge auticulare) included 4 clusters with 20 different genetic profiles and two unique genetic profiles: first cluster is represented by two profiles that have kinship coefficient of 0.78. Similar to the first cluster, the 2 nd and 3 rd cluster include two types of genetic profiling by having lower coefficient of relatedness first respectively 0.71 and 0.75, their kinship is significant because it exceeds the threshold of 0.70 set by formula math. 4th cluster includes 12 types of genetic profiles with different percentages of genetic relatedness, from 74% to 90%. H6 - RF11 and H6 - RF12 represented by strains 112 and 103, 105, 121 which have the same genetic profiles of 90%, they have been isolated from different patients, hospitalized in different units responsible for pathologies were not similar.

H-7 group (postoperative purulent collections) includes 3 clusters with 21 types of genetic profiling and 7 profiles unique type: the first cluster has kinship coefficient of 0.71, in the interior of reaching up to 92% genetic relatedness . The 2nd cluster consists of five types of profiles, the coefficient of relatedness ranges from 0.74 to 0.90. H7 - RI1 and H7 - RI2, represented by strains 38 and 26 have cognate genetic profile 90% isolates derived from different patients with different pathologies background. 3rd analyzed cluster consists of 6 different genetic profiles îrudite percentage of 73% to 93%. Profile H7 - RJ5 and H7 - RJ6 represented by strains 107 and 99, have kinship coefficient of 0.93. Isolates from patients come from the same social background, same age but with different pathologies background of chronic type.

Group A-1 (ear swabs) included two clusters 9 types of genetic profiles: first cluster comprises three types of profiles kinship coefficient of 0.73; the 2-nd cluster is made up of six types of profiles, the genetic relatedness ranges from 72% to 94%. Profiles A1 - A1 and RB5 - RB6, represented by 140 and 131 strains have higher degree of genetic relatedness.

Group A-2 (perianal purulent collections) includes 3 clusters with 18 types of genetic profiling and 5 unique type profiles: first cluster consists of two profiles with genetic relatedness coefficient of 0.72. The 2nd cluster totaling 3 types of profiles with variations of the coefficient of kinship from 0.71 to 0.83. 3rd cluster in this group of otherwise predominantly comprises 7 types of genetic profiles similar to the 2nd-cluster here meet changes in the coefficient of kinship, from 0.72 to 0.86. Strains representing the genetic profiles of the last cluster share the results of the antibiotic, where we meet a resistance of about 100%.

Group A-3 (BCs) included a cluster with 5 different genetic profiles and unique one profile type. The cluster has kinship coefficient of 0.74. Inside his profile A3 - RB3, represented by strains 149, 150, 151 and 156 and A3 profile - RB4 represented by 139 strain shows 88% genetic relatedness.

Group A-4 (conjunctival discharge) included a cluster with 3 types of genetic profiles and profile type one single coefficient of kinship up to 79%. A4 - RB2 and A4 - RB3. Strains present 79% degree of kinship and resistance profile is almost identical to those strains, originating from different species (rabbit, cat, and dog).

Total cluster analysis performed on each profile representative strains revealed a single cluster and 6 unique type profiles.

The cluster consists of 5 different genetic profiles, each profile is the one isolated from different groups: TRG1 - H1 (bronchial aspirate taken from humans), TRG2 - A4 (runny ear isolated from pets), TRG3 - A3 (septicemia from animals), TRG4 - H7 (postoperative purulent secretions isolated from humans), TRG5 - A2 (perianal abscess isolates of animal origin).

The 6 profiles unique type are: TRA - H4 (isolated from sputum), TRB - H6 (isolated from runny ear), TRC - H3 (isolated from liquid plural), TRD - A1 (isolated from runny ear), TRE - H5 (isolated from urine samples), TRF - H2 (isolated from gastric aspirates).

The genetic relatedness within the cluster percentages ranging from 73% to 91%. Profile with the highest percentage of consanguinity or

91%, consisting of TRG4 - H7 and TRG5 - A2, it was represented by strains isolated from humans secretions postoperative isolates of abscess perianal from animals that have 91% the percentage of genetic relatedness.

In chapter 8 entitled "Final conclusions and Recommendations", are structured 9 main conclusions and 9 recommendations, drawn from the investigations.

PARTEA I
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

FIRST PART
THE ACTUAL STAGE OF KNOWLEDGE

1. PSEUDOMONAS AERUGINOSA – GENERALITĂȚI

1. PSEUDOMONAS AERUGINOSA – GENERAL

Pseudomonas aeruginosa face parte din familia *Pseudomonadaceae* (incluzând peste 265 de specii bacteriene), genul *Pseudomonas*, majoritatea dintre ele fiind nepatogene. Pentru patologia umană și veterinară prezintă interes un număr restrâns de specii. Genul *Pseudomonas* grupează bacili Gram negativi, drepți sau ușor curbați cu dimensiuni de 0,5 – 1,0/1,5 – 4,0 μm, mobili, cu cili dispuși polar sau lofotrich. Sunt nepretențioși nutritiv, producători de pigment, strict aerobi, catalază pozitivi și nu fermentează zaharurile dar le folosesc prin oxidare energia derivă din oxidare în loc de fermentarea carbohidraților (Carp–Cărare C., 2015).

Acesta poate utiliza cel puțin optzeci de compuși organici neavând nevoie de factori de creștere organică (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 2001).

1.1. ECOLOGIE

Speciile genului *Pseudomonas* sunt răspândite în toate mediile naturale. Se izolează frecvent de pe piele, mucoase, din tubul digestiv al oamenilor și animalelor și din cadavrele aflate în putrefacție (Carp-Cărare C., 2015).

Prima descriere a bacteriei datează din 1872, când Schroeter îi dă denumirea de “aeruginosum”, provenind de la aspectul asemănător oxidului de fier. A fost obținut pentru prima dată în cultură pură de Gessard în 1882, în urma modificărilor de culoare, respectiv albastru-verzui, care s-au produs la nivelul rănilor (Forkner, 1960). Cuvântul “aeruginosa” provine din latină semnificând rugină de cupru. Aceasta descrie pigmentul bacterian verde-albăstrui observat în culturile din laborator (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 2001). Stover și colab. (2000) au realizat secvențierea genomului de *P. aeruginosa*. În timp, germenul a fost cunoscut și sub alte denumiri, dintre care amintim următoarele: *P. pycyanea*, *B. aerugineum*, *Micrococcus pyocyaneus*, *P.*

policolor ș.a. Numele comun este bacilul piocianic sau bacilul puroiului albastru (Răpunțean Ghe.și colab., 2005; Carp-Cărare C. și colab., 2015).

Dimensiunea mare a genomului și complexitatea genetică a speciei *P. aeruginosa* reflectă adaptările evolutive care îi permit să se dezvolte în diverse nișe ecologice. Temperatura optimă de creștere este de 37°C, și este capabilă să crească la temperaturi de până la 42°C, nu se dezvoltă la 5 °C (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 2001). Toleranța față de o largă varietate de condiții fizice, inclusiv temperatura, contribuie la succesul ecologic ca agent patogen oportunist. *Pseudomonas aeruginosa* are o preferință pentru creștere și dezvoltare în mediile umede (Todar, 2004).

Tipurile mari de colonii sunt des întâlnite în prelevatele clinice, colonii mici de obicei sunt obținute din surse naturale (Véron și Berche, 1976). Adesea se izolează din secrețiile tractului respirator și urinar și au fost observate pentru prima dată de Sonnenshein (1927). Mucusul este atribuit producției de alginat, acest tip de colonii joacă un rol important în colonizare și virulență (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 2001).

Pseudomonas aeruginosa poate produce mai multe tipuri de pigmenți solubili din care piocianina și pioverdina sunt cele mai frecvente. Pioverdina (galben/verde) este produsă din abundență, are un conținut scăzut de fier; culoarea albastră este o caracteristică a infecțiilor supurative cauzate de *Pseudomonas aeruginosa* (Palleroni, 1986). Alți pigmenți produși sunt piorubina (roșu) și piomelanina (maro) (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 2001).

1.2. EPIDEMIOLOGIE

Literatura de specialitate semnalează creșterea incidenței infecțiilor cu *Pseudomonas aeruginosa*, fapt explicat de condițiile minime necesare pentru dezvoltare. Folosirea excesivă a terapiei cu antibiotice, atât în cazul profilaxiei dar și în caz curativ, a dus la selectarea de tulpini de *P. aeruginosa* multirezistente.

Potrivit CDC, incidența globală a infecțiilor cu tulpini de *P. aeruginosa* în spitalele din SUA este în medie de aproximativ 0,4 la sută (4 %0 externați), această bacterie ocupă locul 4 printre izolatele care produc infecții nosocomiale.

Pseudomonas aeruginosa este un microorganism comun din sol, apă, vegetație și se găsește pe pielea unor persoane sănătoase și a fost izolată din gât (5%) și materiile fecale (3 %) la pacienți non-spitalizați.

Bacteria este reintrodusă în mod constant în mediul de spital pe fructe, plante, legume, precum și de către vizitatori și de pacienții transferați de la alte secții. Transmiterea de la pacient la pacient apare prin mâinile personalului din spitale, prin contactul direct cu pacientul. În cadrul spitalului, numeroase rezervoare de *Pseudomonas aeruginosa* sunt: dezinfectanții contaminați, ce nu au respectat concentrațiile din prospectele producătorilor, aparate pentru susținerea funcției respiratorii, produsele alimentare, chiuvetele, robinetele, toaletele, dușurile și periile.

P. aeruginosa este un agent patogen oportunist care prezintă un înalt interes pentru clinicieni, datorită incidenței crescute a tulpinilor rezistente la antibiotice, este frecvent izolat din pneumoniile nosocomiale (Hocquet și col. 2007, Richards și col. 2000). Având în vedere capacitatea sa de a persista în spital, nu este surprinzător faptul că *P. aeruginosa* este cel mai frecvent patogen izolat de la pacienții spitalizați mai mult de o săptămână (Geffer și col. 2004). Deși infecțiile acute cu *P. aeruginosa* sunt adesea vindecabile, un număr mare de infecții, cum ar fi cele provocate de arsuri sau cele care cauzează pneumonie sunt asociate cu decesul pacienților (Kang și col. 2003). Pe lângă infecțiile acute, *P. aeruginosa* cauzează frecvent infecții pulmonare cronice la pacienți cu fibroză chistică (Lyczak și col., 2002).

Căi de transmitere

Pseudomonas aeruginosa se poate transmite prin contact direct, de la o persoană la alta, când acele persoane tușesc sau strănută expulzează picături Pflugge în aerul din jur, dacă persoanele respective suferă de o boală infecțioasă aceste picături conțin bacili ce pot cauza boala, totodată se poate transmite prin contactul cu animalele, mușcătura sau zgârietura provocată de un animal infectat poate dezvolta o infecție cu piocianic (deoarece el poate exista în flora oro-faringiană), la fel de periculos este și contactul cu reziduurile animale, deoarece *Pseudomonas aeruginosa* este des izolat de pe suprafețele animalelor decedate.

O altă cale de transmitere a bacililor de *Pseudomonas aeruginosa* este contactul indirect, ei aderă pe suprafața unor obiecte precum masa, mânerul ușii sau robinet. În contact cu aceste suprafețe o persoană sănătoasă poate contacta microbii lăsați de o persoană infectată; o altă cale de transmitere a acestor bacterii este prin ingerarea alimentelor

contaminate fiind un pericol mai mare deoarece baciliile pot fi transmiși mai multor persoane de către aceeași sursă.

Răspândirea tulpinilor de *P. aeruginosa* poate fi controlată prin respectarea procedurilor adecvate de izolare a pacienților infectați, aplicarea tehnicilor de dezinfectare după fiecare manipulare aplicată pacienților spitalizați, igienizarea atentă a saloanelor, manevrarea corectă a cateterelor, a aparatelor folosite pentru ventilarea bolnavilor dar și cele folosite pentru aspirarea sputei în vederea efectuării controlului microbiologic, folosindu-se mănușile de protecție, mască și alte instrumente toate trebuie să fie sterile și nu în cele din urmă gestionarea într-un circuit închis al deșeurilor din spitale pentru a nu putea fi o sursă și un rezervor de răspândire al acestor bacterii în aer, apă și sol.

Răspândirea tulpinilor cu rezistență multiplă la antibiotice dar și apariția mecanismelor de rezistență au fost declarate de către Organizația Mondială a Sănătății ca fiind probleme prioritare și serioase, necesitând implementarea unor programe de supraveghere mondială, deoarece ele induc complicații în tratamentul infecțiilor bacteriene.

Astăzi clinicienii se confruntă mai ales cu infecții cauzate de germeni panrezistenți Gram-negativi. Aceste infecții care în trecut erau simple de tratat cu ajutorul antibioticelor, astăzi se dovedesc a fi dificil sau chiar imposibil de tratat. Această problemă a adus în atenția comunității științifice, un nou concept, acela al "erei post-antimicrobiene", în care unii agenți infecțioși nu mai răspund la terapia cu antibiotice (Sjölund M., 2004).

1.3. IMPLICARE ÎN PATOLOGIA UMANĂ ȘI ANIMALĂ

Infecțiile cu *Pseudomonas aeruginosa* îmbracă diferite forme clinice, în funcție de răspunsul gazdei: infecții ale pielii (plăgi chirurgicale, arsuri); infecții ale tractului urinar, în special în perioada de spitalizarea când este necesară utilizarea cateterelor urinare; infecții ale tractului respirator inferior: pneumonie de ventilație, după asistare respiratorie în timpul intervenției chirurgicale și/sau resuscitare în secții de terapie intensivă, cu diseminare la nivel circulator; infecții respiratorii cronice, în special în maladia congenitală numită fibroză chistică (FC), în care sunt prezente deficite ale sistemului de apărare locală de la nivelul căilor respiratorii, izolarea inițială a tulpinilor de *P. aeruginosa* este din spută, odată ce infecția cronică se stabilește este aproape imposibil de a o

eradica chiar și cu un tratament intensiv cu antibiotice (Rayner și col., 1994); endocardite, meningite, otite, infecții oculare; septicemie.

Pseudomonas aeruginosa este un agent patogen oportunist pentru oameni și animale, rareori cauzează infecții la organisme sănătoase, este o cauză majoră a infecțiilor dobândite definite ca și infecții nosocomiale (Todar, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* este cunoscută pentru rezistența sa la antibiotice și este, prin urmare un agent patogen oportunist deosebit de periculos (Seol și col., 2002). Este rezistent la multe clase de antibiotice folosite în terapia veterinară și umană, inclusiv tetraciline și benzilpenicilină datorită barierei permeabilității oferite de lipopolizaharidele din membrana externă (LPS) (Livermore DM, 2001). Acest lucru limitează viitoarele utilizări terapeutice ale antibioticelor împotriva acestei bacterii ceea ce duce la creșterea ratelor de deces.

În patologia veterinară piobacilii fiind germeni condiționat patogeni pot produce diverse infecții secundare: **la rumegătoare** : enterite la viței, mamite, metrite, cistite, artrite, avorturi, sterilitate; **la suine**: asociați în complexul etiologic al rinitei atrofile; **la cabaline**: infecții pulmonare, genitale și avorturi sporadice; **la carnivore**: otite, dermatite, conjunctivite; **la animalele de blană**: pneumonia hemoragică a nurelor și septicemii; **la pasări**: la galinacee produce pseudomonoză aviară (boala fecalelor verzi) iar la porumbei – septicemii (Carp – Cărare C. 2016).

2. REZISTENȚA IZOLATELOR DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

2. RESISTANCE OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATES

Rezultatele benefice ale antibioticelor sunt astăzi „întunecate” de numeroase reacții adverse, de schimbarea ecologiei microbiene prin apariția germenilor rezistenți la antibioticele „clasice” dar și cele „de rezervă”.

Antibiorezistența constituie un fenomen al cărei amploare a pus în prezent în discuție necesitatea supravegherii acestora dar și testarea bacteriilor pentru a se observa eficacitatea antibioticelor, căci de aproape trei decenii nu au mai fost descoperite alte molecule diferite de cele cunoscute (Magiorakos AP și colab., 2012).

Prezența tulpinilor multi-rezistente și alegerea la întâmplare a antibioticelor constituie principalele cauze ale insuccesului antibioterapiei și antibioprevenției, în decursul anilor, tulpinile inițial rezistente, precum și cele cu rezistență dobândită, s-au selectat în detrimentul celor sensibile, care au dispărut, fiind o consecință a folosirii excesive a antibioticelor. Această schimbare continuă în aspectul florei microbiene, precum și sensibilitatea ei la antibiotice, dă antibiorezistenței un caracter dinamic, iar acest dinamism trebuie să se reflecte și asupra terapiei antimicrobiene (Guguianu E., 2002).

Ar trebui să ne îngrijoreze faptul că mai devreme sau mai târziu, unele bacterii patogene devin rezistente la antibiotice și că astfel s-ar putea să ne întoarcem la situația de la care am pornit, deoarece nu se mai produc antibiotice noi (Nordmann P. și colab., 2002).

Necesitatea monitorizării antibiorezistenței se datorează, alături de distribuția ei deosebit de mare, fenomenului de transfer al acestora, odată cu flora bacteriană de origine animală se pot transmite la om și unele aspecte particulare, de exemplu rezistența față de dezinfectante (Mereuță A., 2013).

2.1. ANTIBIOTICELE ȘI MECANISMELE DE ACȚIUNE ANTIMICROBIANĂ

Antibioticele constituie un grup important de compuși chimici cu o largă heterogenitate, utilizați în terapia antiinfecțioasă, capabili să acționeze selectiv asupra unor microorganisme patogene.

Ele pot fi clasificate după mai multe criterii: în funcție de spectrul de activitate (spectrul larg, intermediar și redus) și după mecanismul de acțiune (bactericid sau bacteriostatic). Cea mai uzuală schemă de clasificarea antibioticelor, se bazează pe structura chimică a antibioticelor. După Nastasă V., (2005), substanțele antimicrobiene sunt grupate în 6 categorii importante: (1) betalactamine, (2) în locuitori ai betalactaminelor; (3) aminoglicozide și polipeptide; (4) antibiotice “clasice”, cu spectrul larg; (5) chimioterapice sistemice și urinare; (6) tuberculostatice.

Substanțele antimicrobiene acționează asupra bacteriilor prin diferite mecanisme, cele mai importante având ca mod de acțiune inhibarea biosintezei unor structuri din peretele celular (peptidoglican) și a unor faze din mecanismul de biosinteză a unor macromolecule (proteine, enzime, ADN, ARN) (fig.2.1.)

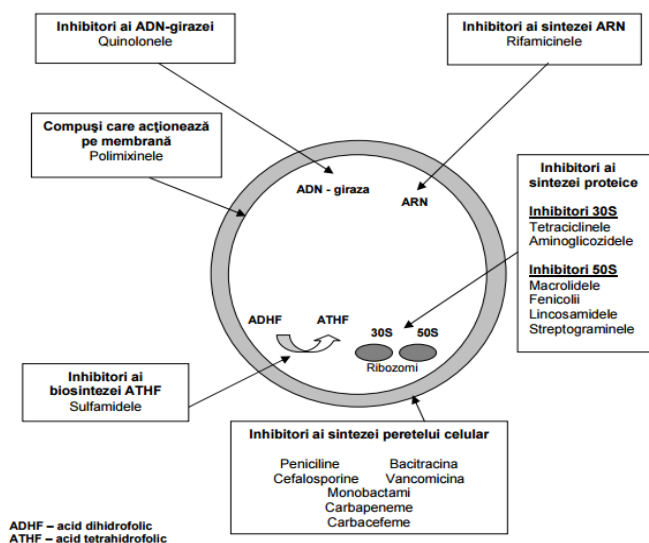


Fig. 2.1 Principalele mecanisme de acțiune ale antibioticelor
(după Marculescu, 2007)

Fig. 2.1 The main mechanisms of action of antibiotics (after Marculescu, 2007)

Structura chimică a substanțelor antimicrobiene influențează și mecanismul de acțiune:

1. Penicilinele, cefalosporinele, vancomicina, bacitracina, cefamicinele, acționează prin **inhibarea sintezei peretelui celular**. Ca urmare, în interiorul bacteriei sunt blocați produși care tulbură sinteza proteică și sinteza acizilor nucleici, bacteriile modificându-și forma și volumul, fiind influențată astfel, capacitatea de multiplicare și în final se autolizează (efect bactericid), (Nastasă V., 2005).

2. Polimixinele, colistina acționează prin **deteriorarea funcției membranei celulare**, prin acțiunea directă asupra structurii membranei sau prin inhibarea bunei funcționări având drept consecință moartea celulară (Todar K., 2002; Mărculescu A., 2008).

3. Aminoglicozidele, macrolidele, tetraciclinele, lincosamidele, fenicolii acționează prin **inhibarea sintezei proteice**. Acțiunea acestor antibiotice este selectivă, majoritatea având afinitate sau specificitate pentru ribozomii 70S. Această inhibare selectivă a sintezei proteice se datorează sistemului de transport activ de la nivelul celulei bacteriene, care este dependent de energie și care permite pătrunderea antibioticului numai în celula bacteriană. (Todar K., 2002; Mărculescu A., 2008). **Tetraciclinele** inhibă sinteza proteică acționând asupra subunităților 30S, intervenind în faza de elongare blocând astfel apariția de noi aminoacizi în lanțul polipeptidic. Utilizând transportul activ, tetraciclinele penetrează membrana celulară și se acumulează în concentrații mari în celula bacteriană. **Macrolidele și fenicolii** se fixează la nivelul subunității 50S și împiedică alungirea lanțului peptidic. **Aminoglicozidele** acționează atât pe subunitatea 30S cât și pe 50S, inhibând sinteza proteică prin blocarea fixării factorilor de inițiere, erori în citirea ARN-ului mesager care duc la apariția unor proteine anormale și anomalii de translocare având ca efect eliberarea prematură a peptidil-transferazei (Mayer, 2003, Mărculescu, 2007).

4. Quinolonele, novobiocina, metronidazolul acționează prin **inhibarea sintezei ADN**. **Quinolonele** inhibă ADN topoisomeraza având ca țintă subunitatea A a ADN-giraza) enzimă esențială pentru supraviețuirea bacteriană. Gradul de inhibare diferă în funcție de specia bacteriană. Astfel, ADN-giraza este diferită la *Escherichia coli* față de *Pseudomonas aeruginosa*, quinolonele fiind mai eficiente față de infecțiile cu *E. coli*. **Novobiocina** acționează asupra subunității A inhibând ADN-giraza. **Metronidazolul** acționează asupra structurii helicoidale, alterând funcția ADN-ului (Mărculescu, 2007).

5. Rifampicinele acționează specific prin **inhibarea ARN-polimerazei ADN-dependentă**. Inhibă transcriptaza și împiedică sinteza ARNm afectând transcrierea informației din molecula de ADN. Atașarea la subunitatea beta a polimerazei, duce la blocarea intrării primei nucleotide necesare activării polimerazei, dar este obligatoriu ca ARN-polimeraza să fie liberă (Grady O. și col., 1997; Mărculescu, 2007).

6. Trimetoprim, sulfamidele acționează prin **inhibarea sintezei acidului folic și implicit a sintezei ADN**. În general chimioterapicele de sinteză sunt inhibitori competitivi ai metaboliților esențiali sau ai factorilor de creștere cu rol în metabolismul bacterian. Acești inhibitori acționează bacteriostatic sau bacteriocid. Această acțiune selectivă se bazează pe premisa că, calea metabolică bacteriană nu apare la organismul gazdă (Montoya Echeverri A., 2002 citat de Mărculescu, 2008). **Sulfamidele și trimetoprim** inhibă enzimele bacteriene cu rol în sinteza acidului tetrahidrofolic (THF), componentă esențială în coenzima responsabilă de metabolismul carbonului în celulă. Ele pot inhiba sinteza fosfaților acționând ca inhibitori competitivi ai celor două enzime (DHPS și DHFR) care sunt necesare în sinteza bazelor purinice, pentru biosinteza metioninei și glicinei. Astfel este suprimată sinteza proteinelor și a proceselor metabolice necesare în supraviețuirea microorganismelor (Mărculescu, 2007).

În ceea ce privește sensibilitatea la antibiotice, datele din literatură arată că cel mai frecvent utilizate clase de antibiotice împotriva *P. aeruginosa* sunt **β -lactaminele, aminoglicozidele și chinolonele** (Sjölund M., 2004).

2.2. MECANISMELE DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE

De la introducerea antibioticelor în terapia medicală umană și veterinară s-au scurs câteva decenii bune, 90 de ani, timp în care domeniul medicației antimicrobiene s-a îmbogățit an de an cu numeroase achiziții. Estimările numărului de antibiotice existente pe piață variază, unii autori au inventariat circa 5.000 de antibiotice identificate, în timp ce alții evaluează numărul acestora la o valoare net superioară, de ordinul a 10.000 (Mihăescu Gr., 2007).

Pe lângă imensele beneficii aduse de antibiotice, în ultimul timp s-au conturat în mod pregnant o serie de aspecte negative, survenite mai ales ca urmare a prescrierilor iraționale, dintre acestea, cele mai

Îngrijorătoare sunt reprezentate de patologia iatrogenă generată de antibiotice și de selectarea mutantelor rezistente la antibioticele uzuale sau chiar la toate antibioticele cunoscute pentru tulpinile de spital. Datele acumulate până în prezent a demonstrat că singura modalitate de a putea beneficia în continuare, în mod eficient, de virtuțile terapeutice ale medicației antimicrobiene este folosirea competentă și rațională a antibioticelor.

Termenul de rezistență microbiană definește capacitatea unor agenți patogeni de a supraviețui și de a se multiplica în prezența antibioticelor. Cu alte cuvinte, germenii rezistenți sunt sau devin indiferenți sau toleranți la antibiotice, sustrăgându-se prin variate modalități efectului antibacterian scontat, după administrarea de doze uzuale, netoxice (Țogoe I., 2009).

Mecanisme de rezistență la antibiotice

În funcție de antibioticele utilizate, mecanismele rezistenței bacteriene pot fi clasificate diferit (tabelul 2.1.).

Rezistența bacteriilor la antibiotice este fie naturală (intrinsecă), fie dobândită.

Rezistența microbiană naturală (de specie) sau dobândită (prin apariția mutantelor rezistente), este o noțiune absolută care trebuie deosebită de pseudorezistența (falsa rezistență), noțiune relativă, întâlnită în practica tratamentelor clinice.

Un agent patogen, dovedit rezistent *in vitro*, este implicit rezistent și *in vivo*, fenomenul de rezistență depinde exclusiv de capacitatea bacteriei de a fi refractară față de acțiunea antimicrobiană a antibioticului.

Rezistența naturală este transmisibilă la descendenți, fiind cromozomială (transmisie verticală), ea determinând fenotipurile sălbatice la antibiotice. Transmisia orizontală este rară sau inexistentă.

Mecanismele rezistenței dobândite au ca suport genetic elemente mobile (plasmide, transpozoni), ele având capacitatea de a fi transmisibile orizontal, uneori între specii diferite. Transmisia verticală este posibilă, dar uneori este aleatorie. Mecanismele de rezistență dobândită sunt mai bine cunoscute decât cele ale rezistenței naturale.

Rezistențele dobândite pot fi mecanisme enzimatice (penicilinaze, cefalosporinaze, BLSE = beta-lactamaze cu spectru extins, metaloenzyme) sau mecanisme neenzimatice (impermeabilitate, mecanism de eflux și modificarea țintei antibioticului).

Tabelul 2.1

Mecanismele rezistenței bacteriene (Oniga C., 2003, citat de Marculescu, 2007)

Table 2.1

Bacterial resistance mechanisms (Oniga C., 2003, cited by Marculescu, 2007)

Antibioticul	Mecanisme de rezistență ale bacteriilor
Betalactamine (peniciline, cefalosporine etc.)	Inactivare enzimatică (betalactamaze) (C, P) Modificarea PBP (C, P) Reducerea permeabilității celulare (C)
Aminoglicozide	Inactivare enzimatică (enzime modificatoare de aminoglicozide) (C, P) Alterarea proteinei țintă ribozomale (C) Modificarea sistemelor de transport activ prin învelișurile bacteriene (C)
Chinolone	Diminuarea afinității țintei de acțiune (modificarea ADN-girazei) (C) Reducerea permeabilității membranei externe (C) Eflux activ al antibioticelor din celula bacteriană (C, P)
Macrolide	Modificarea țintei de acțiune (C, P) Eflux activ al antibioticelor din celula bacteriană Achiziționarea de către bacterii a unor enzime modificatoare ale atb.(P)
Macrolide	Modificarea țintei de acțiune (C, P) Eflux activ al antibioticelor din celula bacteriană Achiziționarea de către bacterii a unor enzime modificatoare ale atb.(P)
Lincosamide	Modificarea țintei de acțiune (C, P) Achiziționarea de către bacterii a unor enzime modificatoare ale atb.(P)
Vancomicina	Modificarea țintei de acțiune
Tetraciclina	Eflux activ al antibioticelor din celula bacteriană (P) Modificarea proteinei ribozomale (P)
Cloramfenicol	Inactivare enzimatică (cloramfenicol-acetiltransferază) (P) Diminuarea permeabilității peretelui bacterian (C)
Sulfamide	Diminuarea permeabilității bacteriene (C, P) Modificarea unor enzime (C, P) Hiperproducție de APAB (C)
Trimetoprim	Diminuarea permeabilității bacteriene (C, P)
Nitrofurani	Diminuarea permeabilității bacteriene Deficit de activitate a nitrofuran-reductazei (C)
Nitroimidazoli	Diminuarea permeabilității bacteriene Activitate insuficientă a nitro-reductazei

C – determinism cromozomial; P – determinism plasmidic; PBP – *penicillin binding proteins*; APAB – acid paraaminobenzoic

Rezistența dobândită enzimatică se exprimă prin:

- penicilinaze plasmidice transferabile: PSE, TEM, OXA, cu rezistență la carboxipeniciline, ureidopeniciline, cefoperazonă și sensibilitate la: ceftazidim, cefepim, imipenem, IBL;
- BLSE tip penicilinază (TEM, SHV, PER, VEB): sensibilitate la imipenem, carboxipeniciline + IBL, ureidopeniciline + IBL;

- BLSE tip oxacilinază: OXA-2, OXA-10: sensibilitate la imipenem;
- cefalosporinaze cromozomiale dereprimate hiperproduse, cu rezistență la toate beta-lactaminele, cu excepția cefepimului și imipenemului;
- cefalosporinaze cromozomiale deprimite hiperproduse la nivel înalt: cu sensibilitate doar la imipenem;
- carbapenemaze: sensibile doar la aztreonam.

Rezistența dobândită neenzimatică se exprimă prin trei sisteme de eflux:

- MexA-MexD-OprM, constitutiv, care conferă rezistență naturală, dar poate fi supraexprimată și poate induce o rezistență la carboxipeniciline și aztreonam;
- MexC-MexD-OprJ: rezistență la cefepim și cefpirom;
- MexC-MexF-OprN: adesea cuplată cu diminuarea D2, rezistență la imipenem;
- deficit de porine: pierderea porinelor D2, rezistență variabilă la carbapeneme (uneori asociată cu o cefalosporinază dereprimată);
- modificarea lipopolizaharidului (LPS): permeabilitate diminuată pentru toate beta-lactaminele, cu excepția imipenemului;
- modificarea PLP-urilor (*protein-binding-penicillin*): PLP-urile 2 sau 4: rezistență la imipenem; PLP-3: rezistență la toate beta-lactaminele, cu excepția imipenemului.

Mecanismele de rezistență dobândită sunt deci, influențate de diminuarea cantității de antibiotic care atinge ținta prin diminuarea permeabilității sau prin apariția sistemelor de eflux, de modificarea țintei antibioticului și de inactivarea antibioticului.

Diminuarea permeabilității apare mai ales la nivelul membranei externe a bacteriilor Gram-negative, la care porii se obturează parțial sau total sau pot uneori să dispară. Mutațiile care afectează lipopolizaharidul pot duce la scăderea accesibilității antibioticelor prin porii de la exteriorul membranei externe. Modificările apărute la nivelul membranei citoplasmice pot fi implicate mult mai rar (rezistența la aminoglicozide prin modificarea sistemelor de transport). Sistemele de eflux sunt alcătuite din proteine particulare cu rol de pompe, care utilizează o forță proton-motrice care expulzează antibioticul de când pătrunde în celula bacteriană. Aceste sisteme de eflux pot apărea la clase de antibiotice diferite: fluorochinolone, cloramfenicol, tetraciclina, dar și beta-lactamine, constituind sistemele de rezistență multiplă.

Modificarea țintei antibioticului: poate fi vorba de o modificare parțială sau a naturii țintei, o modificare a numărului (hiperproducție), o schimbare totală a țintei (țintă nouă) sau uneori o asociere a mai multor

mecanisme din cele menționate. Aceste modificări se realizează prin mutații la nivelul genelor care codifică ținta antibioticului sau prin achiziționarea de gene străine.

Un exemplu de mutație este rezistența dobândită la fluorochinolone prin modificarea ADN-girazei sau a topoisomerasei IV. Inactivarea antibioticului este mecanismul cel mai frecvent întâlnit. Poate fi o distrugere a antibioticului (hidroliza beta-lactaminelor de către beta-lactamaze) sau modificarea moleculei prin anexare de radicali: esterificarea aminoglicozidelor de către aminozidfosfotransferaze (APH), nucleotidiltransferaze (ANT), acetiltransferaze (AAT).

Rezistența naturală a *P. aeruginosa* este importantă, iar rezistențele dobândite sunt foarte frecvente.

Rezistența multiplă este destul de comună în rândul bacteriilor non-fermentative, gram-negative, cu precădere la specia *Pseudomonas aeruginosa*, aceasta este un principal agent patogen nosocomial, ea posedă o diversitate de mecanisme de rezistență care ulterior pot duce la MDR sau chiar PDR (Murugan N. și colab., 2016).

Rezistența generală a *P. aeruginosa* se datorează unei combinații de mai mulți factori: acesta este intrinsec rezistent la anumiți agenți antimicrobieni, datorită permeabilității scăzute a peretelui celular; are capacitatea de a-și exprima genetic un larg repertoriu al mecanismelor de rezistență: el poate deveni rezistent prin mutații cromozomiale în genele care reglementează rezistența genetică, poate achiziționa gene suplimentare de rezistență de la plasmide, transpozoni sau bacteriofagi.

Un element suplimentar care contribuie la rezistența *P. aeruginosa* mai ales la izolatele provenite de la pacienți cu fibroză chistică este modul său de dezvoltare în plămâni. Agregatele de bacterii din plămâni sunt înconjurate de un strat de polizaharid alginat. De acest strat se pot lega antibiotice cationice, cum ar fi aminoglicozidele, restricționând difuzia acestora. Aceste microcolonii sau biofilme sunt extrem de rezistente la antibiotice, datorită unor mecanisme care rămân neclare (Michael J. și colab., 2016).

Mecanismele de rezistență la antibioticele beta-lactamice în cazul bacililor Gram-negativi implică producerea de beta-lactamaze. Extinderea spectrului de beta-lactamaze (ESBL), sunt în general, dobândite prin transferul de gene pe orizontală și conferă rezistență la oximino-cefalosporine, unele dintre ele fiind mutante beta-lactamaze mediate plasmidic (de exemplu, TEM / SHV) sau mobilizate din bacteriile de mediu (de exemplu, CTX -M).

Frecvența cu care noi enzime au fost descrise în literatura de specialitate reflectă nu numai ritmul de descoperire dar și abilitatea de a diferenția aceste enzime dar și apariția lor rapidă și evoluția sub presiunea selectivă a utilizării antibioticelor (Fereshteh J., și col., 2011.)

De la începutul secolului, au existat schimbări dramatice raportate privind prevalența și tipurile de ESBL raportate în Europa, iar tulpinile producătoare de CTX-M devenind dominante în special CTX-M-15. În unele țări, rapoartele privind tulpinile izolate care produc CTX-M rămân sporadice.

Bacteriile aparținând genului *Pseudomonas* sunt recunoscute pentru rezistența intrinsecă la anumite clase de antibiotice, precum și pentru capacitatea lor de a achiziționa rapid gene ce codifică rezistența la antibiotice. Cele mai comune mecanisme de rezistență sunt producerea de β -lactamaze, precum și producerea de enzime care pot duce la inactivarea aminoglicozidelor. În plus, diminuarea expresiei proteinelor membranare externe, apariția unor mutații în topoizomerase, precum și apariția sistemelor de eflux, joacă un rol important în rezistența la diferite clase de antibiotice, precum fluorochinolonele, cloramfenicolul, tetraciclinele, dar și betalactaminele. Acumularea acestor mecanisme duce la apariția tulpinilor multirezistente sau „panrezistente”.

Tipuri de rezistență la antibiotice

Rezistența la beta-lactamine

Fenotipul sălbatic este legat de producerea unei cefalosporinaze inductibile de către aminopeniciline și cefalosporinele din prima și a doua generație, cuplată sau nu cu o impermeabilitate mai mult sau mai puțin marcată și de un sistem de eflux activ constitutiv. Acest fenotip se traduce printr-o rezistență la aminopeniciline, ca atare sau asociate cu inhibitori de beta-lactamaze (IBL) și la cefalosporinele de generația I a sau a II-a.

Clasa A de β -lactamaze

ESBL de clasă A, conferă rezistență la un spectru extins de cefalosporine și sunt inhibitate *in vitro* de către acidul clavulanic și tazobactam. Au fost identificați în mod extensiv de membrii din familia *Enterobacteriaceae*, dar sunt de asemenea raportate și la cele non-fermentative.

PER-1 β -lactamază a fost primul ESBL identificat la *P. aeruginosa*. A fost izolată și identificată de la un pacient turc spitalizat în Paris - Franța, în 1991. Sondajele naționale din Turcia au arătat că izolatele care produc PER-1 la *P. aeruginosa* sunt larg răspândite în Turcia. PER-

1 a fost raportată și în țările europene cu nici o graniță geografică comună cu Turcia, cum ar fi Belgia, Italia, Spania, Polonia, Ungaria, Serbia și Tunisia, precum și în țările din Asia. În plus, a fost identificată în Grecia și Iran. Cercetările epidemiologice au arătat că o predominantă de *P. aeruginosa* tip secvență (ST) și variante cu un singur locus, corespunzând clonei internaționale CC11 complexă, este asociată cu o largă difuzare a PER-1- produsă de *P. aeruginosa* izolate în Turcia, Belgia și Italia, ca și în mai multe țări din Europa de Est. PER-2 - β -lactamază, care împarte 86% identitate de aminoacizi cu PER-1 și prin urmare, reprezintă o altă descendență a enzimelor de tip PER, ce a fost identificată numai de la o tulpină de *P. aeruginosa* izolată în Bolivia (Poirel L. și colab., 2009).

O altă enzimă ESBL izolată de la *P. aeruginosa* este VEB-1, care a fost identificată la pacienții internați în Franța, dar care au fost transferați din Tailanda. Răspândirea infecției nosocomiale a *P. aeruginosa* producătoare de VEB-1 a fost identificată în Tailanda. Mai târziu, alte izolate care produc VEB-1 au fost raportate în Kuweit, India, Iran, Bulgaria, Marea Britanie și Danemarca, subliniind diseminarea la nivel mondial a acestor tulpini producătoare de VEB. Izolatele care produc VEB-2 sau VEB-3 au fost identificate în Tailanda și China, cu aceste ESBL- uri diferite de la VEB-1 cu doar o singură sau două substituții de aminoacizi. Alte enzime ESBL sunt enzimele GES care au fost detectate în *P. aeruginosa*. Gena *bla*GES-1 a fost identificată la *P. aeruginosa* din Franța și America de Sud și este înrudită structural ESBL IBC-2 (care diferă de la BSE-1 printr-o singură unitate de aminoacid și apoi redenumit BSE-8) și BSE-13 au fost izolate din două tulpini de *P. aeruginosa* în Grecia (Akbar M. și colab., 2010). O altă enzimă de BSE-9 care posedă un spectru extins de hidroliză la aztreonam, a fost identificată într-o singură tulpină de *P. aeruginosa* izolată din Franța. ESBL de tip SHV au fost identificate în izolate rare de *P. aeruginosa*. ESBL de tip TEM au fost de asemenea raportate rar de la *P. aeruginosa*, fiind TEM-4, TEM-21, TEM-24. CTX-M-de tip ESBL, în unele cazuri, s-a demonstrat transferul orizontal de la *Enterobacteriaceae* la *P. aeruginosa*. Un singur CTX-M-1 *P. aeruginosa* a fost izolat și raportat în Olanda în 2006.

Recent, CTX-M-3, CTX-M-14 și CTX-M-15 au fost identificate la mai multe tulpini de *P. aeruginosa* izolate din China (Ktari S., 2006). În 2005, un alt ESBL, care a avut un grad scăzut de identitate cu cele din clasa A, dar a avut proprietăți biochimice similare a fost raportat; gena

care codifică BEL-1 a fost localizat la nivelul unui integron clasa 1 inserat în cromozomul unui izolat de *P. aeruginosa* într-un spital în Belgia. Mai târziu, un alt studiu a raportat difuzarea BEL-1 de *P. aeruginosa* izolat în mai multe spitale situate în diferite zone geografice din Belgia. BEL-2 și BEL-3, fiecare diferă de BEL-1 printr-un singur aminoacid, aceste enzime au fost identificate în 2010, într-o tulpină izolată în Belgia și Spania. Comparat cu BEL-1, BEL-2 posedă proprietăți îmbunătățite împotriva acțiunii hidrolitice asupra cefalosporinelor cu spectru extins (Livermore D. și colab., 2003).

ESBL PME-1 este cel mai recent ESBL identificat dintr-o cultură de *P. aeruginosa* izolată în Pennsylvania, Statele Unite ale Americii, în 2008. Această enzimă are 43% identitate de aminoacid cu CTX-M-9. PME-1 conferă un nivel ridicat de rezistență la peniciline, ceftazidim și aztreonam și într-o mai mică măsură, cefotaxim, dar păstrează sensibilitate la cefepim și carbapeneme. Gena blaPME-1, s-a dovedit a fi amplasată pe plasmidă.

Carbapenemaze

Așa cum a fost descris anterior mai multe tipuri de BSE – ESBL prezintă proprietăți carbapenemazice.

Prima carbapenemază de tip BSE a fost identificată la o tulpină de *P. aeruginosa*, fiind-2 BSE, care diferă de la 1-BSE printr-o singură unitate de aminoacizi. Acest izolat a fost recoltat de la un pacient internat în spital din Africa de Sud și a fost de fapt izolat dintr-un focar din același spital. Varianta BSE-5 care posedă o activitate semnificativă carbapenemazică a fost, de asemenea raportată la o tulpină de *P. aeruginosa* izolată în China, Africa de Sud, Brazilia și Turcia. (Gupta N. și colab., 2011). Aceste gene de tip blaGES fac parte din clasa 1 a structurii de integron.

Recent o variantă BSE, BSE-18, a fost identificată la o tulpină de *P. aeruginosa* izolată din Belgia. BSE-18 era diferită de BSE-5 prin substituție de aminoacid cu proprietatea de a hidroliza carbapenemele (Yang Y. și colab., 1995).

Cu toate că în trecut rareori au fost identificate KPC de la *P. aeruginosa*, întâi în Columbia în 2006 și apoi în Puerto Rico, Trinidad și Tobago, SUA și China, ele sunt din ce în ce mai des identificate și raportate în cele două Americi și în regiunea Caraibelor.

Momentan nu există nici o dovadă clară de transfer orizontal al genei blaKPC de la *Enterobacteriaceae* la bacteriile non-fermentative (Queenan AM. și colab., 2007).

Clasa B de β -lactamaze

Aceste β -lactamaze, de asemenea, numite metalo β lactamaze (MBL), hidrolizează carbapenemele și alte β -lactame (cu excepția monobactamelor) foarte eficiente și nu sunt inhibitate clinic de inhibitorii β -lactamază disponibile, cum ar fi acidul clavulanic sau tazobactam. Cu toate acestea, activitatea lor este inhibată de ioni chelatori metalici (Bush K. și colab., 1995).

Rezistența la carbapeneme a tulpinilor de *P. aeruginosa* este în mare parte legată de porine (OprD) deficitul lor. Carbapenemazele sunt, în principal MBL de tip IMP, VIM, SPM și tipuri de GIM. IMP-1 a fost raportată pentru prima dată în *Enterobacteriaceae* și la *P. aeruginosa* în Japonia și acum este distribuită la nivel global, ceea ce sugerează un transfer orizontal de blaIMP-1 între bacteriile gram negative. (Osano E. și colab., 1994). Enzimele IMP asemănătoare pot fi împărțite în mai multe subgrupuri și identitatea procentuală de aminoacizi în cadrul acestor grupuri de fapt, variază de la 90% la 99%. Aceste variante posedă foarte multe activități hidrolitice. Printre cele 51 de variante IMP cunoscute, 32 au fost raportate la bacteriile de *P. aeruginosa* și au fost identificate în întreaga lume.

Cu toate că enzimele VIM au o identitate de <40% din aminoacizi cu enzimele de tip IMP, ele împart același spectru hidrolitic. VIM-1 a fost primul MBL identificat la *P. aeruginosa* și a fost raportat în mai multe țări europene. În orice caz, VIM 2 este acum cea mai răspândită MBL la tulpinile de *P. aeruginosa* ca sursă în mai multe focare. Douăzeci și trei dintre cele patruzeci și șase de variantele VIM au fost identificate la tulpinile de *P. aeruginosa* (Lauretti L. și colab., 1999).

β -lactamaza SPM este destul de diferită de VIM și IMP și, prin urmare, reprezintă o nouă subfamilie de MBL. SPM-1 a fost izolată pentru prima dată în Brazilia, în 1997, dintr-un izolat clinic, care a fost foarte rezistent la toate antibioticele anti-Gram-negative, cu excepția colistinului. Difuzarea de tulpini multidrug rezistente producătoare de SPM-1 a fost demonstrată în regiuni distincte ale acestei țări, cu toate acestea ele nu au difuzat în alte țări, cu singura excepție a unui singur izolat, identificat în Elveția de la un pacient care a fost anterior internat în Brazilia. Gena blaSPM-1 poate să fie cromozomială sau plasmidică codată (Camargo C. H. și colab., 2011)

În anul 2002 o nouă MBL, numită GIM-1, a fost identificată la *P. aeruginosa* izolată din Germania. Această enzimă este produsă și de

specii de Enterobacteriaceae, ea fost identificată numai în Germania (Andreas F. și colab., 2015).

Enzimele NDM-1 au fost raportate pentru prima dată în 2011, la două tulpini izolate din Serbia. În 2012, o singură NDM-1-produsă de *P. aeruginosa* aparținând ST235 a fost izolată în Franța, de la un pacient spitalizat anterior, în Serbia. Mai recent, NDM-1 izolate *P. aeruginosa* au fost raportate în India (patru izolate), Italia (un singur izolat, aparținând ST235), Egipt și Slovacia. Interesantă este apariția MDR de VIM 2- *P. aeruginosa*, în Rusia, care este, de asemenea, legată de o clonă dominantă-ST235 (Kumarasamy K.K. și colab., 2010).

Recent, o enzimă MBL numită FIM-1 (*Florence imipenemase*), care prezintă similitudine ridicată (40% identitate de aminoacizi) cu enzime de tip NDM, a fost raportată la o singură tulpină de *P. aeruginosa* izolată din Italia. Gena blaFIM-1 a fost localizată cromozomial și a fost asociată cu ISCR19, elemente care au fost implicate probabil în captarea și mobilizarea ei; originea sa rămâne necunoscută (Pollini S. și colab., 2013).

Clasa C de β – lactamaze

O genă cromozomială care codifică cefalosporinazele de tip AmpC este intrinsecă pentru *P. aeruginosa*. Această genă AmpC este asociată cu o genă de reglementare de tip LysR cu care unele molecule β -lactamice pot interacționa, ceea ce duce la supra-exprimarea acestei gene AmpC. Unele β -lactame, cum ar fi carbapenemele sunt inductoare ale expresiei genei AmpC, cu toate că ele nu sunt substraturi ale acestor cefalosporinaze (Neyestanaki D. K. și colab., 2014). Selecția de mutante de supraproducție ale genei AmpC este observată frecvent la tulpinile de *P. aeruginosa*, ceea ce duce la o rezistență dobândită la ticarcilina ca atare, piperacilina și cefalosporine cu spectru larg (ceftazidim). În plus, introducerea elementului IS1669 în gena de reglementare LysR (de asemenea, cunoscut sub numele de gena AmpR) de AmpC poate duce la supra-exprimarea acestei enzime. Pe lângă aceste mecanisme care duc la creșterea rezistenței la cefalosporine cu spectru extins, au fost identificate enzime foarte specifice de tip AmpC la *P. aeruginosa* care posedă o activitate hidrolitică extinsă spre imipenem. Ele corespund în mod natural, cromozomial codificate de tip AmpC β -lactamaze care au un rest de alanină la poziția 105 și care conferă o activitate carbapenemazică slabă. Adevărata semnificație clinică a acestor enzime care sunt o sursă de rezistență la carbapeneme rămâne să fie clarificată (Tam V.H. și colab., 2007).

Clasa D β – lactamaze

Pseudomonas aeruginosa produce în mod natural enzime din clasa D β -lactamază, OXA-50, care nu contribuie la tabloul general de rezistență β -lactamic de *P. aeruginosa*, cu excepția Latamoxef (sau Moxalactam) este un antibiotic oxacephem de obicei grupat cu cefalosporine, atomul de sulf al miezului cefalosporină este înlocuit cu un atom de oxigen. Latamoxef a fost asociat cu prelungirea timpului de sângerare, precum și în mai multe cazuri de coagulopatii, unele letale, au fost raportate în timpul anilor 1980. Latamoxef nu mai este disponibil în Statele Unite ale Americii ca și în cazul altor cefalosporine, cu o catenă laterală metiltiotetrazol, provoacă o serie de reacții adverse când este amestecat cu alcool. În plus, **catena laterală metiltiotetrazol** inhibă γ -carboxilarea acidului glutamic; acest lucru poate interfera cu acțiunile vitaminei K. Aceasta a fost descrisă ca o cefalosporină de generația a treia (Chen Y.C. și colab., 1996).

Cele mai multe enzime din clasa D beta-lactamazelor sunt capabile să hidrolizeze cefalosporine cu spectru extins și au fost identificate la tulpinile de *P. aeruginosa*. Există două tipuri principale de enzime cu spectru extins din clasa D beta-lactamaze (ES-OXAs). Unele sunt derivate de puncte mutante de spectru îngust din clasa D beta-lactamaze, cu unitati de aminoacizi care lărgesc spectrul lor de hidroliză față de cefalosporine cu spectru extins. Aceste ES-OXAs provin, în principal din spectrul îngust de beta-lactamaze OXA-10 (OXA-11, -13, -14, -16, -17, -19, -28, -129, -142, -145, -147 și -183), OXA-2 (OXA-15, -32, -34, -36, -141 și -161) și OXA-1 (OXA-31). (Wonmok L. și col., 2013). Enzimele de tip ES-OXAs dețin mai puțin din identitatea de aminoacizi cu aceste enzime din urmă. OXA-18, care este inhibată de către acidul clavulanic, ea a fost identificat pentru prima dată ES-OXA la o tulpină de *P. aeruginosa* izolată la Paris, de la un pacient spitalizat anterior în Sicilia. Această enzimă cu o identitate <50% de aminoacizi cu alte enzime din clasa D beta-lactamaze. OXA-45 este un alt ES-OXA, identificat de la MDR *P. aeruginosa*, izolate ce co-exprimă clasa B β -lactamază VIM-7. OXA-45 cea mai mare identitatea cu OXA-18 (66%) și, ca și pentru OXA-18, activitatea sa este bine inhibată de către acidul clavulanic. Interesant fiind faptul că gena blaOXA-45, situată pe o plasmidă de 24 kb, nu a fost găsită ca o formă a unei casete de gene, dar este asociată cu două copii ale unui element ISCR5-like (Blagui S. K. și colab., 2007).

Doar două enzime din clasa D beta-lactamaze dobândite compromis eficacitatea carbapenemelor au fost raportate la tulpini de *P. aeruginosa*. Una dintre ele este OXA-40, cunoscută ca fiind larg răspândită la tulpinile de *Acinetobacter baumannii*, aceasta enzimă a fost raportată la o tulpina de *P. aeruginosa* izolată în Spania în 2006. (Sevillano E. și colab., 2009). Cealaltă este OXA-198 izolată la un piocianic din Belgia (Garch E.F. și colab., 2011).

Rezistența la aminoglicozide

Tulpinile sălbatice de *P. aeruginosa* sunt sensibile la toate aminoglicozidele. Rezistența dobândită se datorează unor numeroase mecanisme gen impermeabilitate, eflux, inactivare enzimatică, mutante respiratorii sau combinații ale acestor mecanisme. Rezistența prin impermeabilitate este frecventă.

Rezistența la aminoglicozide s-a observat la tulpini de *P. aeruginosa* prin supraexpresia unei proteine din membrana externă, OprH, care protejează LPS, nepermițând legarea antibioticului.

Primele enzime ARNr 16S methylase izolate de la *P. aeruginosa* au fost identificate în 2003. Acestea au provenit de la un izolat clinic din Japonia, tulpini producătoare RmtA. Alte enzime RmtA la izolate de *P. aeruginosa* au fost apoi identificate în Coreea de Sud, în 2009. Gena RmtA este situată pe elemente genetice mobile, cum ar fi transpozonul Tn5041 (Jin J.S. și colab., 2009).

În 2007, methylase RmtD a fost raportat la un PDR *P. aeruginosa* izolat clinic și cu co-producerea MBL SPM-1 din Brazilia. RmtD deține 40% identitate de aminoacizi cu RmtA, iar structurile genetice înconjurătoare au caractere similare. Ulterior, un alt studiu a subliniat faptul că o co-producție a MBL SPM-1 și ARNr 16S methylase RmtD a fost frecventă printre tulpinile rezistente la imipenem, izolate în spitale din São Paulo, Brazilia. (Kalluf K.O. și colab., 2017). În aceste izolate, atât genele *bla*SPM-1 și RmtD s-au dovedit a fi localizat cromozomial. Enzima ArmA a fost de asemenea identificată la tulpini de *P. aeruginosa* co-producătoare de MBL IMP-1 în S - Coreea (Tojo M. și colab., 2014).

Rezistența la fluorochinolone

Fenotipul sălbatic al tulpinilor de *P. aeruginosa* este sensibil în vitro la toate fluorochinolonele: norfloxacin, ofloxacin, perfloxacin, ciprofloxacin și levofloxacin.

P. aeruginosa este natural rezistent la trimethoprim-sulfamethoxazol și Nitrofurantoin.

Așa cum se descrie în literatura de specialitate la tulpinile de *P. aeruginosa*, rezistența dobândită la fluorochinolone, este dată de mutații în gene care codifică topoizomeraza, dar în principal este legată de sistemele de eflux sau suprareglarea (în funcție de reglementare este pozitivă sau negativă) acestora, contribuie semnificativ la activitate redusă a fluorochinolonei. În cazul tulpinilor de *P. aeruginosa*, implicarea sistemului de tip RND MexAB-OprM, expresie care este constitutivă, a fost demonstrată, iar efectul său larg a fost evidențiat, conferind sensibilitate redusă, de asemenea, la cloramfenicol, tetraciline și β -lactame. (Goli H. R. și colab., 2016). De asemenea, operonul mexCD-oprJ conferă capacitatea de eliminare a chinolonei, penicilinei și tetraciclinei. Cu toate acestea, acest impact este văzut doar când NfxB negativ proteina reglatoare este alterată, indicând faptul că exprimarea constitutivă a acestui sistem de eflux nu contribuie la această trăsătură de rezistență. Un alt sistem de eflux este MexEF-OprN, care nu este implicat în sensibilitate redusă, dacă nu se observă supraexpresia (Tian Z.X. și colab., 2009).

Rezistența la colistin

Pe parcursul ultimului deceniu, clinicienii au asistat la o reînnoire a interesului clinic față de polimixine (colistin), ca urmare a două fapte concomitente:

- ✓ apariția bacteriilor Gram-negative rezistente la carbapeneme, cefalosporine și aminoglicozide
- ✓ numărul mic de noi molecule comercializate de antibiotice. De fapt, polimixinele rămân cel mai adesea active împotriva acestor izolate MDR. Emergența rezistenței la colistină a crescut și este îngrijorătoare, deoarece polimixinele sunt ultimele opțiuni terapeutice în multe cazuri.

Achiziția de rezistență este în mare parte legată de modificările lipopolizaharidice (LPS) (biosinteza).

Cu toate că EARSS are cea mai completă bază de date despre rezistența germenilor la chimioterapicele antiinfecțioase din Europa, sistemul are unele limite. EARSS nu testează bacteriile, ci preia date, EUCAST și statele membre UE fac eforturi să standardizeze testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase în Europa.

EARSS organizează frecvent cursuri pentru îmbunătățirea calității testării sensibilității la chimioterapice antiinfecțioase în laboratoarele care aparțin EARSS. Cu toate acestea, EARSS se bazează pe datele raportate de statele membre conform protocolului său. Pentru unele state membre nu există date relevante din toate regiunile geografice ale țării.

Cu toate acestea, datele sunt de obicei estimate pentru fiecare țară în parte, lipsind date doar pentru foarte puține țări.

În țările Europei de Nord se observă că procentul tulpinilor de *P. aeruginosa* rezistente la cefalosporine de generația a III-a este descendent în majoritatea țărilor participante la studiul EARSS (Irlanda de la 10% în 2005 la 4% în 2008; Islanda de la 8% în 2005 la <1% în 2008).

Cel mai ridicat procent al tulpinilor de *P. aeruginosa* rezistente la cefalosporine de generația a III-a din Europa Centrală și de Vest s-a înregistrat în Germania în anul 2007, respectiv 17%.

Cele mai recente date ale EARSS indică în România (singura țară din Europa cu acest nivel de rezistență) un procent al rezistenței la carbapeneme (meropenem) de peste 50%. Rezistența la aminoglicozide (gentamicină) și fluoroquinolone (ciprofloxacin), precum și la piperacilin se situează între 25-50%, alături de: Bulgaria, Ungaria, Polonia, Cipru, Grecia, Italia. În ceea ce privește rezistența la ceftazidim, nu au fost suficiente date raportate (sau numărul lor a fost sub 10 izolate raportate), pentru un raport privind rezistența la acest antibiotic.

Datele îngrijorătoare privind rezistența la antibiotice a *P. aeruginosa* în Europa și mai ales în România implică necesitatea cunoașterii mecanismelor de rezistență la antibiotice ale *P. aeruginosa*, recunoașterea fenotipurilor de rezistență, cu aplicarea antibioterapiei corecte, dar și administrarea rațională a antibioticelor. (EARS-Net 2014)

2.3. METODE FENOTIPICE ȘI MOLECULARE DE DEPISTARE A REZISTENȚEI LA ANTIBIOTICE

Având în vedere consecințele rezistenței bacteriene față de o gamă tot mai largă de antibiotice, au fost elaborate metode de laborator care să permită identificarea tulpinilor bacteriene cu sensibilitate antimicrobiană modificată.

METODE FENOTIPICE

Determinarea β -lactamazelor cu spectru extins prin metoda difuzimetrică

Este metoda cea des utilizată în laboratoare. ESBL – urile sunt sintetizate de marea majoritate a enterobacteriilor, sunt reproduse cel mai adesea în antibiogramă prin imaginea unui sinergism („dop de șampanie”) între un disc de cefalosporină din generația a-III-a și/sau

monobactam și un disc de amoxicilină+ acid clavulanic. Această imagine poate fi discretă sau atipică.

Secreția de ESBL va fi suspectată în primul rând de micșorarea diametrelor de inhibiție la cefalosporinele de generația a-III-a: cefotaxime (CTX)< 27mm; ceftazidim (CAZ)< 22 mm; monobactam-aztreonam (ATM)< 27mm.

O tulpină de referință trebuie testată în aceleași condiții, în scopul verificării validității discurilor de antibiotice. Prezența unei ESBL indică faptul că tulpina este rezistentă la toate β -lactamicele, cu excepția imipenemului și a cefamicinei (Mihăescu, 2007).

Determinarea β -lactamazelor cu spectru extins cu ajutorul E-test

Această metodă se bazează pe proprietatea ESBL de a fi sensibile la inhibitori de β -lactamaze (ac. clavulanic). Benzile E-test conțin un gradient de cefalosporină (cefotaxim) la un capăt și cefalosporină asociată cu un inhibitor de β -lactamază (cefotaxim+ac. clavulanic) la celălalt capăt.

Concentrația minimă inhibitorie va fi mai mică în cazul asocierii de cefalosporină cu acid clavulanic față de concentrația minimă inhibitorie a cefalosporinei singură. Dacă raportul dintre C.M.I a cefalosporinei+ac. clavulanic și C.M.I. a cefalosporinei este mai mare de 8 atunci tulpina respectivă este potențial producătoare de β -lactamaze cu spectru extins (Mihăescu, 2007).

Metoda discurilor duble

Această metodă presupune compararea diametrelor zonelor de inhibiție date de un disc impregnat cu o cefalosporină cu spectru larg singură, cu un disc impregnat cu același antibiotic asociat cu un inhibitor de β -lactamaze. Dacă tulpina testată produce o enzimă de tip ESBL, diametrul zonei de inhibiție este mai mare pentru discul ce conține asociația antibiotic+inhibitor.

CLSI, recomandă compararea diametrelor zonelor de inhibiție date de cefotaxim 30 μ g/disc cu cele ale cefotaximului+acid clavulanic 30 μ g+10 μ g/disc, precum și ceftazidim 30 μ g/disc cu cele ale ceftazidimului+acid clavulanic 30 μ g+10 μ g/disc. O variantă a metodei discurilor duble cu antibiotic (produse de Oxoid) se bazează pe compararea diametrelor zonelor de inhibiție produse de cefpodoxim 10 μ g/disc și cefpodoxim+acid clavulanic 10+1 μ g/disc. Producerea ESBL este confirmată dacă diametrul zonei de inhibiție dată de discul ce

conține și clavulanat este cu 5 mm mai mare decât diametrul discului fără inhibitor (Mihăescu, 2007).

Testul dublei difuzii pentru detectarea ESBL

Pe o placă cu mediu Mueller-Hinton inoculată cu tulpina de testat (cultură de 24h, însămânțare pe placă prin tehnica tamponului) se aplică un disc cu amoxicilină+acid clavulanic. De o parte și de alta a discului cu AMC, la o distanță de 25-30 de mm se aplică un disc cu ceftazidim și de cealaltă parte un disc cu cefotaxim. Se incubează peste noapte la 37 °C. Producerea de ESBL este certificată dacă diametrul zonei de inhibiție a cefalosporinelor este extins spre zona clavulanatului.

Avantajul acestei metode simple este costul redus; dezavantajul este că izolatele cu ESBL de tipul TEM și SHV pot da rezultate pozitive, în schimb pentru izolarea enzimelor de tip CTX-M trebuie înlocuit ceftazidimul cu cefpodixim (Mihăescu, 2007).

Screening-ul cu o cefalosporină indicator

Strategia de bază pentru a detecta producătorii – ESBL este de a folosi drept indicator o cefalosporină pentru potențialele tulpini ESBL-producătoare, apoi să caute sinergii între cefalosporine/clavulanat, care să distingă producătorii de ESBL, de exemplu, de tulpinile AmpC-hiperproducătoare sau enzimele de tip K1.

Screening: cefalosporina ideală pentru a fi utilizată drept indicator este una la care toate tipurile de ESBL conferă rezistență, chiar și atunci când producția lor este redusă.

Alegerea este bazată pe următoarele trăsături generale:

Tulpinile producătoare de enzime de tip TEM & SHV prezintă rezistență la ceftazidim și sensibilitate variabilă la cefotaxim.

Tulpinile producătoare de enzime de tip CTX-M prezintă rezistență evidentă la cefotaxim, variabilă la ceftazidim.

Toate tulpinile producătoare de enzime de tip ESBL prezintă rezistență la cefpodoxim de aceea cel mai bun indicator este folosirea cefpodoxim sau combinația ceftazidim/cefotaxim.

Utilizarea mediilor înalt selective - Brilliance ESBL Agar

Brilliance ESBL Agar este un mediu cromogen de screening pentru tulpinile care produc beta – lactamase cu spectru extins. Mediul prevede identificarea prezumtivă ESBL de *Enterobacteriaceae* direct din probele clinice.

Unul din avantajele majore este durata de testare, timpul pentru identificarea prezumtivă a ESBL într-un lot de testat este de 24 de ore, fiind o metodă convenabilă și ușor de utilizat, poate face o diferențiere

clară între tulpinile de *E. coli*, *P aeruginosa* și *Klebsiella*, inoculate direct din proba recoltată, sau din suspensia bacteriană.

Este un mediu selectiv în care este inclus Cefpodoxime, un marker bine cunoscut pentru verificarea producției de ESBL, fiind prezentă o rezistență mediată, inhibând majoritatea tulpinilor non-ESBL *Enterobacteriaceae*.

Are o incidență redusă a rezultatelor fals-pozitive în comparație cu tradiționale teste fenotipice care se utilizează în laboratoare în scop de cercetare, reducând ulterioarele teste de confirmare a tulpinilor ESBL. Identificarea prezumtivă și precoce a ESBL permite un tratament adecvat pacienților precum și procedurile de control al infecțiilor depistate în mediul spitalicesc.

Metoda discului combinat Imipenem – EDTA pentru metalo- β -lactamaze

Principiul se bazează pe faptul că, metalo- β -lactamazele, având Zn^{2+} în centrul activ, sunt inhibitate de chelatorii de metale precum acidul etilendiamintetraacetic (EDTA) (Yong și colab., 2002), lotul studiat: tulpinile ce prezintă rezistență la imipenem.

Etest MBL

Metoda se bazează pe utilizarea unor benzi de plastic sau hârtie impregnate cu un gradient de concentrații de imipenem (IP) la un capăt și imipenem+EDTA (IPI) la celălalt. Testul se bazează pe inhibiția MBL de către chelatorul de zinc EDTA. Testul este considerat pozitiv dacă raportul dintre IP/IPI este ≥ 8 sau dacă apare o așa numită zonă fantomă, datorită difuziei EDTA dinspre partea IPI spre IP (Walsh și colab., 2002).

Testul microdiluțiilor EPI (EDTA-phenanthroline-imipenem)

Metoda are la bază susceptibilitatea MBL la inhibiția prin chelatori de metale, amestecul de EDTA și o fenantrolină. Testul constă în determinarea CMI la imipenem în absența și în prezența amestecului chelator. O scădere de ≥ 4 ori a valorii CMI pentru imipenem în prezența chelatorilor este considerată ca sugestivă pentru producerea de MBL (Migliavacca și colab., 2002).

Brilliance CRE AGAR

CRE Agar (depistarea precoce a enterobacteriaceelor rezistente la carbapeneme) presupune o identificare cromogenică prezumtivă a tulpinilor izolate rezistente la carbapeneme, direct din prelevatele clinice, timpul necesar de testare fiind de 18 ore. Izolatele considerate rezistente la carbapeneme pot produce enzime de tip MBL.

METODE MOLECULARE

Tehnicile moleculare sunt utilizate tot mai frecvent în identificarea mecanismelor de rezistență, genele purtătoare de informații legate de rezistența la substanțe antimicrobiene fiind identificate și caracterizate. Se pot urmări prin tehnici moleculare: modul de achiziție a genelor, transferul informațiilor genetice, procesul epidemiologic de achiziție a rezistenței la antibiotice.

O bacterie inițial sensibilă la un antibiotic poate deveni rezistentă prin modificarea unei gene astfel încât "ținta" antibioticului este modificată și acesta nu-și mai poate exercita acțiunea antibacteriană, achiziționarea unei noi gene care să inactiveze sau să împiedice accesul antibioticului intracelular; unele gene pot interfera sinteza unor compuși bacterieni care sunt blocați de către antibiotic anulând acțiunea specifică drogului, rezistența poate să se instaleze și prin apariția de mutații genetice definitive (Ordeanu V., 2012).

Metodele genetice de analiză microbiologică presupun accesul liber la acizii nucleici prezenți în celula bacteriană, prin urmare izolarea și purificarea acizilor nucleici este prima etapă în diagnosticul molecular (Buiuc , 2009).

Tehnica PCR

Reacția PCR (*Polymerase Chain Reaction* = *Reacție de Polimerizare în Lanț*) este o metodă de amplificare enzimatică *in vitro* a unei anumite secvențe de ADN. În prezent a fost dezvoltată o adevărată tehnologie PCR care este folosită într-o varietate foarte mare de domenii: biologie moleculară, științele mediului, criminalistică, științe medicale, biotehnologie, microbiologie, industria alimentară, epidemiologie etc.

În concluzie, reacția PCR este o metodă prin care se obțin cantități mari dintr-o anumită secvență ADN. Aceste molecule pot fi ulterior manipulate/analizate fără a fi necesară o prealabilă clonare moleculară a acestora.

Prima raportare în literatura de specialitate a unui experiment de amplificare *in vitro* a unei secvențe ADN prin PCR a fost realizată de Kary Mullis în 1985. Ulterior, metoda a fost aplicată de către un grup de cercetători de la Departamentul de Genetică Umană de la Cetus Corporation (SUA) pentru amplificarea secvenței de ADN ce codifică hemoglobina umană și pentru diagnosticul prenatal al anemiei caliciforme.

Inițial, reacția PCR folosea ca replicază fragmentul mare (Klenow) al ADN polimerazei I de la *Escherichia coli*. Această enzimă era însă

inactivată de temperaturile ridicate necesare etapei de denaturare a matriței. Ca urmare, la fiecare ciclu de replicare trebuia adăugată enzimă “proaspătă”.

Ulterior, a fost descoperită și introdusă în reacția PCR o ADN polimerază termostabilă izolată inițial dintr-o tulpină de *Thermus aquaticus* (bacterie termofilă izolată din izvoarele termale Yellow Spring din SUA).

Un alt pas important în dezvoltarea tehnologiei PCR a fost procesul de automatizare care a condus la producerea în prezent a unor aparate ce desfășoară “singure” întreg procesul de PCR.

Separarea produșilor ADN-ului se realizează prin electroforeză. Electroforeza în geluri de agaroză reprezintă metoda standard de analiză a acizilor nucleici. Este cea mai utilizată metodă de separare, identificare și purificare a acizilor nucleici. Deplasarea moleculelor se face în prezența unui curent electric (acizii nucleici sunt încărcăți negativ datorită prezenței grupărilor fosfat și migrează spre electrodul încărcat pozitiv).

Mobilitatea electroforetică este influențată de următorii factori: concentrația de agaroză, conformația moleculei de ADN (monocatenar, bicatenar sau superăsucit), prezența compusului fluorescent în gel, tamponul utilizat, tipul de agaroză și voltajul aplicat.

Detectarea la nivel molecular a prezenței unor gene responsabile de rezistența la antibioticele folosite în terapia infecțiilor provocate de *P. aeruginosa* se poate realiza prin PCR și MUTIPLEX PCR.

PARTEA A II A
CONTRIBUȚII PROPRII

PART II
PERSONAL RESEARCHES

3. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

3. AIM AND OBJECTIVES OF THE THESIS

Pseudomonas aeruginosa constituie la ora actuală o provocare terapeutică pentru clinicienii umani și veterinari datorită efectului cumulat asupra organismelor cu imunitate scăzută. Este implicat frecvent în infecțiile nosocomiale datorită capacității de supraviețuire în condiții minimale din punct de vedere al nutriției, a capacității de formare a biofilmului pe diferite suprafețe abiotice și implicit datorită rezistenței intrinsecă la antibiotice.

Infecțiile nosocomiale sunt infecții dobândite de pacienți în urma asistenței medicale acordate în spațiile intraspitalicești. Prezența lor agravează starea clinică a pacienților, modificând evoluția bolii de bază cu consecințe asupra calității vieții pacientului sau cu deces. Din punct de vedere economic, se amplifică costurile prin creșterea perioadei de spitalizare, costuri pentru investigațiile de laborator și pentru tratamente suplimentare costisitoare. Eradicarea acestui tip de infecții este dificilă deoarece cauzele determinante sunt complexe.

Antibiototerapia reprezintă pentru epoca modernă un instrument revoluționar în lupta împotriva celor mai grave boli transmisibile atât în rândul oamenilor cât și al animalelor. Utilizarea responsabilă a substanțelor antimicrobiene permite conservarea și optimizarea efectului antimicrobian și diminuează posibilitatea selectării tulpinilor rezistente, protejând sănătatea publică și sănătatea animală.

Având în vedere, efectul epidemiologic al transmiterii tulpinilor bacteriene multirezistente și semnalele de îngrijorare existente la nivel național și mondial, în anul 2016, Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor a elaborat și transmis o strategie națională de combatere a rezistenței antimicrobiene în medicina veterinară.

Întrucât sănătatea animală este strâns legată de sănătatea publică ne-am propus să caracterizăm și să comparăm rezistența la antibiotice a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* izolate de la animale și oameni.

Scopul acestei teze a fost de a determina sensibilitatea tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* la antibioticele folosite în terapie și încadrarea tulpinilor în fenotipuri de rezistență. De asemenea, ne-am propus testarea comparată a metodelor fenotipice de identificare a tulpinilor rezistente la antibiotice, în vederea stabilirii și validării unor metode optime de detectare corectă și precoce a antibiorezistenței, în condițiile unui laborator clinic, având ca scop final antibioterapia țintă în infecțiile cu *Pseudomonas aeruginosa*.

Obiective

- Determinarea profilului de sensibilitate la antibiotice a tulpinilor de *P. aeruginosa* izolate de la animale și de la oameni.
- Recomandarea unui protocol pentru detectarea rapidă a tulpinilor potențial producătoare de ESBL și MBL.
- Stabilirea unei legături genetice a tulpinilor de origine umană cu cele de origine animală.
- Identificarea și declararea timpurie a infecțiilor cu *Pseudomonas aeruginosa* atât în clinicile veterinare cât și umane și reducerea timpului de evoluție a unui focar de infecție nosocomială.
- Valorificarea și diseminarea rezultatelor obținute, prezentarea lor la manifestări naționale și internaționale.

4. CADRUL INSTITUȚIONAL ÎN CARE S-AU DESFĂȘURAT CERCETĂRILE

4. INSTITUTIONAL FRAMEWORK WERE CARRIED IN RESEARCH

Cercetările s-au desfășurat în cadrul a două instituții care au ajutat la realizarea activităților științifice propuse.

U.S.A.M.V. IAȘI

Facultatea de Medicină Veterinară a fost înființată în anul 1961 și funcționează în cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară "Ion Ionescu de la Brad" din Iași. În departamentele acesteia funcționează laboratoare de cercetare dotate cu aparatură și echipamente utile cercetărilor din domeniul microbiologiei.

Competențele de cercetare se referă la cercetări fundamentale de medicină veterinară și medicină comparată, cercetări aplicative și fundamentale în patologia animală și cercetări de igienă a alimentelor de origine animală și protecția sănătății publice.

Echipamentele existente sunt reprezentate de linia de PCR clasic și PCR în timp real.

ONDOKUZ MAYIS VETERINER FAKÜLTESİ - ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ – TURCIA

Facultatea de Medicină Veterinară aparține Universității Ondokuz Mayıs (OMU). Activitatea departamentului de Microbiologie a început în 2003, activitățile academice, de educație și de cercetare ale departamentului sunt efectuate de către 5 profesori.

În cadrul laboratorului de Microbiologie Clinică sunt analizate atât probe de bacteriologie cât și de micologie, de la animalele de companie, de fermă sau de la animalele exotice.

Materialul obținut prin Laboratorul de Microbiologie este utilizat și ca resursă de cercetare.

Toate laboratoarele dispun de aparatură și reactivi necesare pentru desfășurarea cercetărilor fiind abordabile toate metodele de analiză, de la cele mai simple până la cele mai complexe, bazate pe tehnici de biologie moleculară – PCR, PFEG, MLST, RT-PCR.

5. IZOLAREA ȘI IDENTIFICAREA TULPINILOR DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

5. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *PSEUDOMONAS* *AERUGINOSA* STRAINS

Pseudomonas aeruginosa ocupă primul loc între pseudomonade sub raportul frecvenței izolărilor în laboratorul clinic (Buiuc D. și colab., 2009).

5.1. MATERIAL ȘI METODĂ

În acest studiu au fost incluse tulpinile de *P. aeruginosa* izolate în perioada 2013-2015 în Laboratorul de Microbiologie al Facultății de Medicină Veterinară Iași și în Laboratorul de Diagnostic Microbiologic din cadrul unui spital din județul Iași.

Lotul studiat a inclus 125 de tulpini de origine umană și 57 de tulpini de origine animală.

5.1.1. Recoltarea probelor

Izolatele provin din diverse prelevate: urină, spută, secreții traheale, plăgi, hemoculturi, cateter, secreții oculare / conjunctivale.

Prelevarea s-a realizat cu tampoane sterile pentru secreții, plăgi, cu seringi sterile și catetere pentru probele de sânge și urocultoare.

5.1.2. Însămânțarea și cultivarea izolatelor

Izolare și identificarea tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* a parcurs etapele clasice al diagnosticului bacteriologic (fig. 5.1.).

Examenul bacteriologic propriu-zis constă în însămânțarea produsului patologic pe medii de cultură uzuale și speciale (selective și diferențiale) în vederea izolării și identificării germenilor pe baza caracterelor culturale, morfologice, biochimice și a testelor serologice și de biologie moleculară (Carp Cărare C. și colab., 2015).

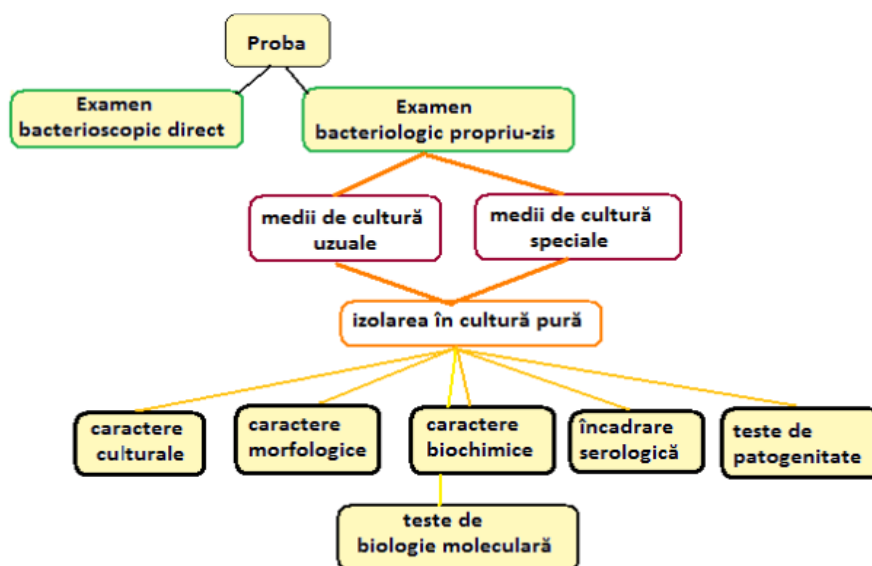


Fig. 5.1 Etapele diagnosticului bacteriologic (Carp Cărare C. și colab., 2015)

Fig. 5.1 Steps of bacteriological diagnosis (Carp Cărare C. și colab., 2015)

Bacilii Gram-negativi, nefermentativi, nepretențioși, din care face parte și *Pseudomonas aeruginosa*, se dezvoltă optim pe mediile uzuale: geloză nutritivă, bulion nutritiv, agar Muller Hinton, agar-sânge sau agar șocolat.

Ca mediu selectiv pentru *Pseudomonas aeruginosa*, recomandat în cazul unor prelevate cu contaminare ridicată, s-a utilizat mediul Agar bază *Pseudomonas* + suplimente selective: Cetrimid (Merk), Irgasan (Difco), Cetrimid + Nalidixat de sodiu ori Cetrimid + Fucidină + Cefaloridină (mediile Oxoid C-N respectiv C-F-C) (fig.5.2.) Ciocan O. și colab., 2014).



Fig. 5.2 Mediu + supliment *Pseudomonas aeruginosa*

Fig. 5.2 Medium + supplement *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa este un germene strict aerob care se dezvoltă optim la temperatura de 37° C (minima de 5°C și maxima de 42°C.) în timp de 24 ore (Carp Cărare C. și colab., 2015).

5.1.3. Identificarea fenotipică

➤ Caracterele culturale

Cele mai multe tulpini de *P. aeruginosa* produc pigmenti, care sunt difuzibili în mediu, imprimând culoarea lor și mediului de cultură sau chiar țesuturilor din organism. Toți pigmentii elaborați de *P. aeruginosa* sunt considerați a avea acțiune antagonică asupra altor specii microbiene și chiar miceli.

Piocianina este cel mai răspândit pigment; face parte din grupa fenazinelor, iar în prezența aerului are o culoare albastră-verzuie (fig.5.3.). În lipsa oxigenului pigmentul rămâne sub forma unui leucoderivat incolor. Prezența acestui pigment este caracteristică pentru specia *P. aeruginosa* deoarece nu este produs de nici o altă bacterie. Prin subculturi repetate, piocianina poate fi iremediabil pierdută. Pigmentul are o acțiune anatagonică față de *Aspegillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* și posedă un efect toxic asupra celulelor epidermice și leucocitelor. Este solubilă în apă caldă, cloroform, fenol și nitrobenzen.

Pioverdina sau fluoresceina este un pigment galben-verzui, fluorescent, care este sintetizat de mai multe specii de *Pseudomonas*. Este deseori asociat cu piocianina în mediile uzuale de cultură și este mascată de către aceasta. Fluoresceina este un corp azotat. În culturi vechi se degradează datorită oxidării, devenind brună-roșie. Formarea este condiționată de prezența ionilor de PO₄, Mg, SO₄, Fe, K. Este solubilă în apă și insolubilă în cloroform (Carp Cărare C. și colab., 2015).

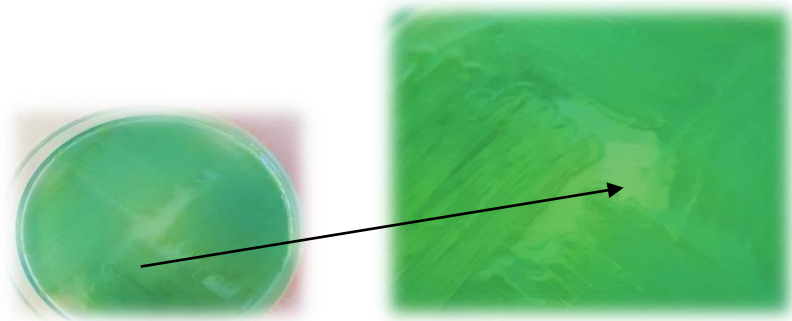


Fig. 5.3 *Pseudomonas aeruginosa* agar – cultură 24 h (original)
Fig. 5.3 *Pseudomonas aeruginosa* agar – culture 24 hours (original)

Piorubina sau *eritrina* este un pigment de culoare roșie, cu o structură chimică necunoscută. Prezența acestui pigment este mascată de pioverdină. Este solubilă în apă și insolubilă în cloroform.

Piomelanina sau pigmentul brun imprimă o culoare brună; se întâlnesc rar tulpini ce produc acest pigment (Ghe. Răpuntean și colab., 2005; Carp - Cărare C. și colab., 2015).

În medii lichide, *Pseudomonas aeruginosa* determină turbiditate intensă cu formarea unei pelicule la suprafață și un depozit abundent, ușor omogenizabil și pigmentează specific într-un timp variabil (Carp-Cărare C. și colab., 2015), (fig. 5.4.).

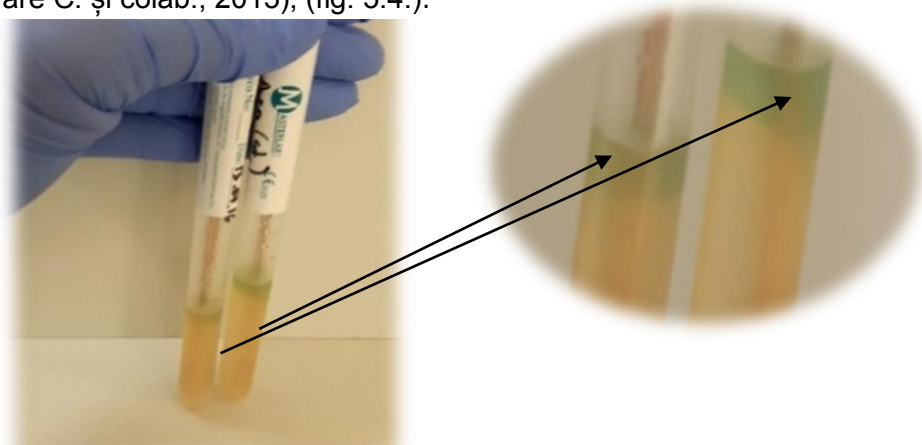


Fig. 5.4 *Pseudomonas aeruginosa* – bulion nutritiv (original)

Fig. 5.4 *Pseudomonas aeruginosa* - nutrient broth (original)

Pe medii solide formează diferite tipuri de colonii pigmentate, (fig. 5.5, fig.5.6.):

- Coloniile de tip 1: mari, 2-3mm diametru, rotunde cu centrul bombat, margini neregulate și tendință invazivă (aspect de ou prăjit); suprafața granulară; consistența untoasă; dau suspensii omogene.
- Coloniile de tip 2: mai mici, convexe, ca ale coliformilor; dau suspensii omogene.
- Coloniile de tip 3: convexe, rugoase; dau suspensii granulare.
- Coloniile mucoide (fig.5.7.b.): inițial convexe, cu timpul tind să conflueze; unele devin apoase, translucide; altele cu consistența gumoasă.
- Colonii pitice: se dezvoltă după 48-72 h de incubare.
- Cultura are suprafața iridescentă cu luciu metalic și plaje de autoliză.

- Cultura degajă aromă pătrunzătoare particulară asemănătoare florilor de iasomie.

Întrucât producerea de pigmenți este condiționată de prezența oxigenului, în absența acestuia pigmenții se pot transforma în leucoderivat incolor (Carp - Cărare C. și colab., 2015).

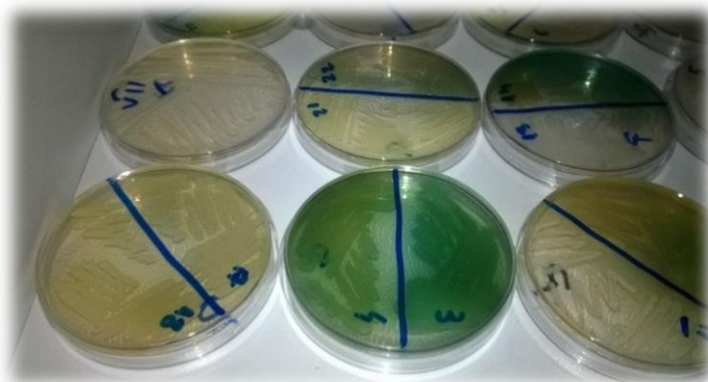


Fig.5. 5 *Pseudomonas aeruginosa* – agar nutritiv cultură 12 h - 37° C (original)
Fig.5. 5 *Pseudomonas aeruginosa* – nutritious agar culture 12 h - 37° C (original)

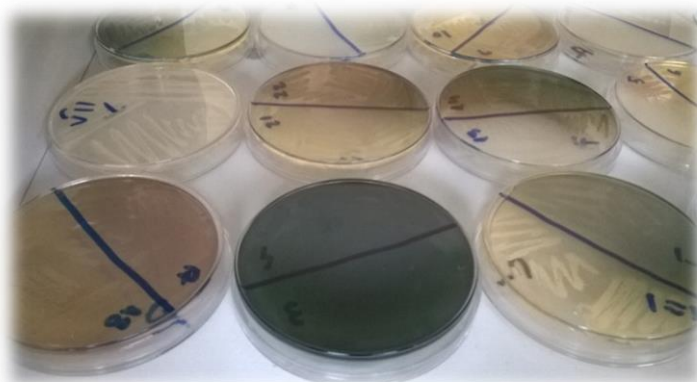


Fig. 5.6 Mediu *Pseudomonas* Agar Base + Supliment *Pseudomonas aeruginosa* C-N Oxoid, UK (original)
Fig. 5.6 Environment *Pseudomonas* Agar Base + Extra C-N Oxoid, UK (original)

Cea mai importantă specie sub raport clinic și epidemiologic, *P. aeruginosa*, este curent identificată chiar în primocultură sau în subculturi de triaj biochimic prin pigmenți difuzibili fluorescenți. Tulpinile de *P.*

aeruginosa produc în proporție de cca 80% piocianină, 70% pioverdină, ocazional piorubrină și rar (sub 1%) piomelanină.

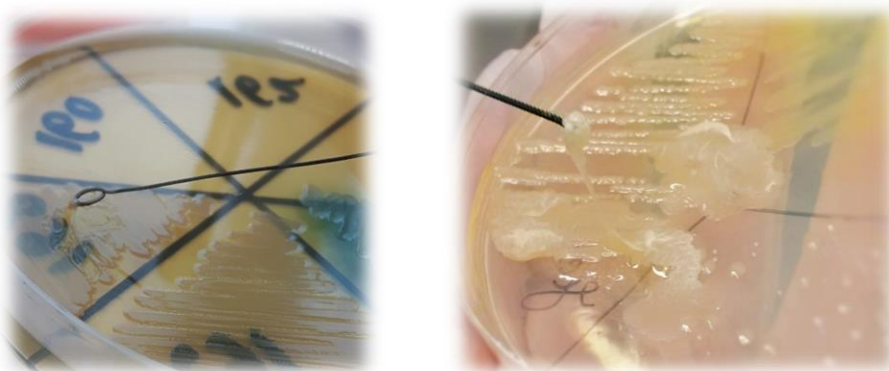


Fig. 5.7 Aspect colonii mucoide (original)

a. TSA agar

b. Mediul de cultură P.A.+ CN

Fig. 5.7 Appearance mucoid colonies (original)

a. TSA agar

b. Pseudomonas agar + CN P.A.

Randamentul cu care mediile de izolare stimulează pigmentogeneza este variabil. Cele mai bune rezultate le dau mediile cu agar nutrienți bază pentru *Pseudomonas* (Merk, Oxoid). Folosirea altor medii impune controlul pigmentogenezei prin subcultivare pe mediile King-Ward-Raney A și B, care stimulează sinteza piocianinei și respectiv a pioverdinei.

Tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din secrețiile respiratorii ale pacienților cu fibroză chistică, pigmentează rar.

Oricum, teste suplimentare sunt necesare pentru diferențierea de *Burkholderia cepacia* și de *Stenotrophomonas maltophilia*, care, deși la distanță, ocupă locul al 2 -lea și respectiv al 3- lea în colonizarea și infecția tractusului respirator la pacienții cu fibroză chistică.

Pioverdina este produsă de aproximativ 91% din tulpinile de *P. fluorescens* și 82% din cele *P. putida*. Dar, spre deosebire de *P. aeruginosa*, aceste specii nu cresc la 42°C, iar cultura lor nu are luciu metalic, nici aromă caracteristică (Buiuc D. și colab., 2009).

Examenul culturilor sub radiație ultravioletă (fig. 5.8.) cu lungime de undă scurtă (aproximativ 254 nm) evită confuzia între pioverdina fluorescentă și pigmentul galben, difuzibil, dar nefluorescent produs de *Burkholderia cepacia* și alte specii ale genului (Buiuc D. și colab., 2009).

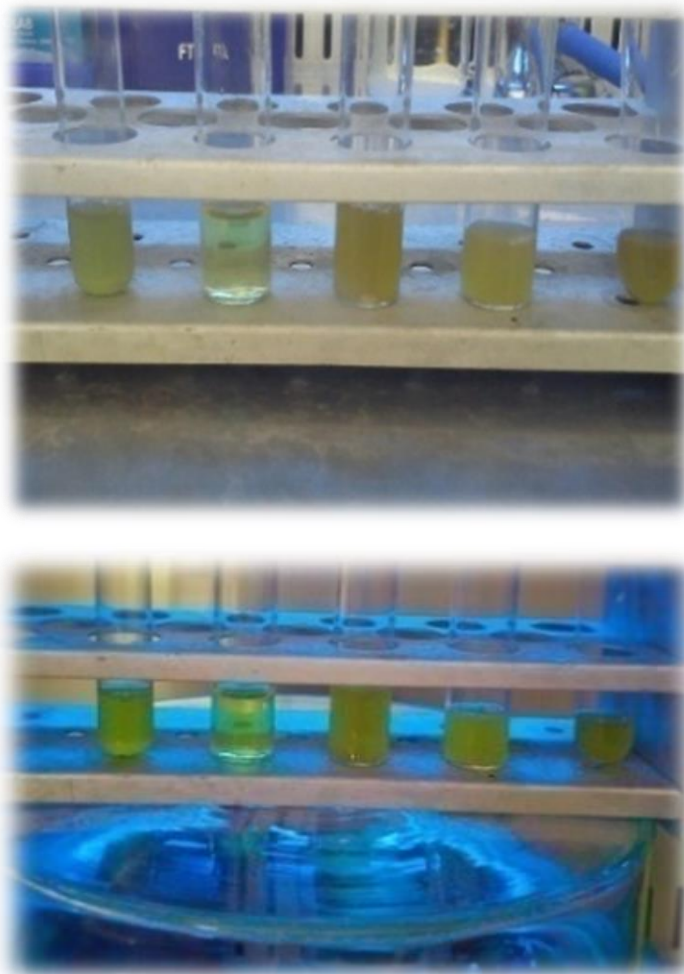


Fig. 5.8 . *Pseudomonas fluorescens* bulion nutritiv - 24 h (original)
Fig. 5.8 *Pseudomonas fluorescens* nutrient broth - 24 hours (original)

Tulpinile acromogene de *P. aeruginosa* pot fi identificate pe baza următoarelor caractere cheie: mobilitatea printr-un unic flagel polar, mirosul aromatic caracteristic degajat de cultură, cultivarea la 42°C, dar nu la 4°C, oxidarea glucozei, dar niciodată a dizaharidelor, reducerea nitraților. Cresc pe traiectul de însămânțare în coloană de agar-nitrat, în timp ce *P. putida* și majoritatea tulpinilor de *P. fluorescens* nu cresc. Nu tolerează 6,5% NaCl în timp ce toate tulpinile de *P. stutzeri* și *P. mendocina* cresc la această concentrație de sare (Buiuc D. și colab., 2009 ed. III).

➤ Caracterele microscopice

Pseudomonas aeruginosa au formă de bacili subțiri și drepecți (0,5/0,8/1,5-3 μm), grupați în lanțuri scurte, Gram negativi (fig.5.9). Sunt nesporulați, necapsulați, mobili, cu cili dispuși monotrich (rar dispuși polar).

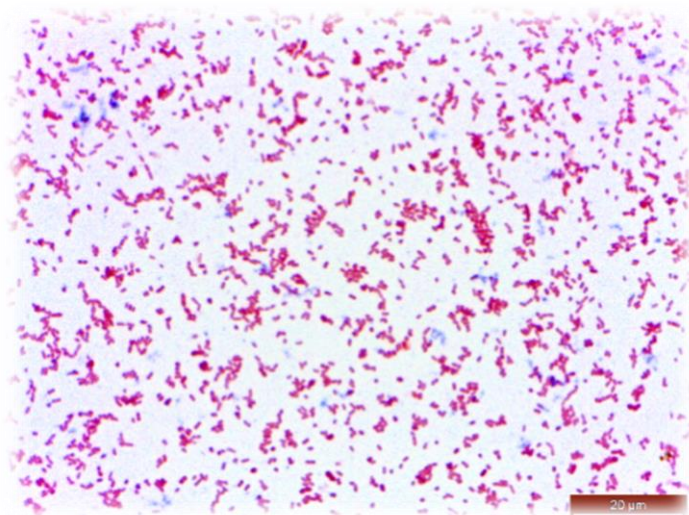


Fig. 5.9 *Pseudomonas aeruginosa* – examen bacterioscopic (original)

Fig. 5.9 *Pseudomonas aeruginosa* – bacterioscopic exam (original)

➤ Caractere biochimice

Pseudomonas aeruginosa nu fermentează zaharurile dar descompune oxidativ glucoza, este oxidază pozitiv, descompune gelatina, nu produce indol și H_2S , urează negativ. Verificarea oxidazei (+/-) și cultivarea la 42°C sunt teste necesare pentru identificarea tulpinilor care nu produc pigment. Sintetizează o serie de enzime (nitrat-reductază, arginin-dehidrogenază) și îi lipsește lizin-decarboxilaza, ornitin-decarboxilaza, ortonitrofenil-galactoza. Utilizează glucoza, acidul lactic, acidul acetic, manitolul, arginina, citratul, etc. ca surse de carbon (Carp – Cărare C. și colab., 2015).

Confirmarea biochimică s-a realizat cu ajutorul sistemelor multitest **Rapid NF Plus System Oxoid** (fig.5.10.) și galeriile **API 20 NE** (BioMérieux, Franța) (fig.5.11).



Fig. 5.10 Confirmarea biochimică cu Rapid NF Plus System Oxoid (original)
Fig. 5.10 Biochemical confirmation with Rapid NF Plus System Oxoid (original)

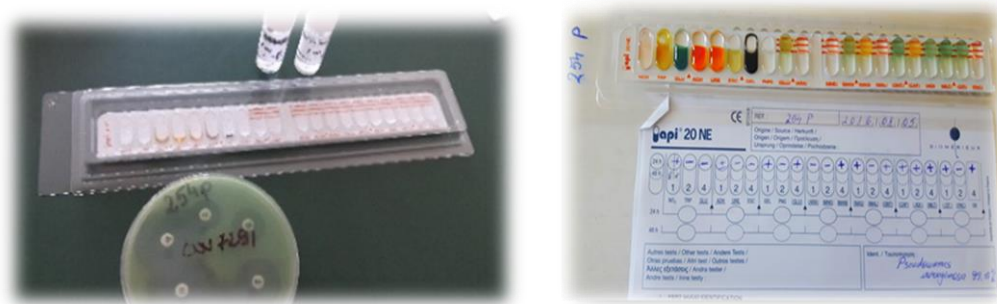


Fig. 5.11 Confirmarea biochimică cu API 20 NE (original)
Fig. 5.11 Biochemical confirmation with API 20 NE (original)

5.1.4. Identificarea moleculară

Pentru identificarea cu acuratețe a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* în prezentul studiu am folosit tehnica moleculară PCR.

PCR (*polymerase chain reaction*) este o metodă de diagnostic de o precizie înaltă, utilizată pentru diagnosticarea diferitelor infecții. Analiza PCR dă posibilitatea identificării agenților cauzatori ai bolilor infecțioase, prin identificarea materialului lor genetic (ADN sau ARN), în probele obținute de la persoana supusă investigației (Solcan C. și colab., 2008).

Metoda PCR se caracterizează printr-o precizie, specificitate și sensibilitate înaltă. Aceasta înseamnă că analiza este capabilă: să determine cu acuratețe prezența sau absența infecției; să specifice exact tipul de infecție (specificitate); să detecteze infecția, chiar la niveluri

foarte scăzute ale ADN-ului microbial într-un material biologic supus investigației (sensibilitate).

În contrast cu metoda imunoenzimatică și cu alte metode imunologice ale diagnosticului infecțiilor, analiza PCR mai rar oferă un rezultat fals-negativ (analiza indică absența infecției atunci când, de fapt, aceasta există), și aproape niciodată nu dă rezultate fals-pozitive (analiza arată prezența unei infecții în cazul în care, de fapt, aceasta nu există).

PCR face posibilă nu numai determinarea tipului infecției existente în organism, dar, de asemenea, oferă și o evaluare cantitativă acestei infecții, adică, cât de mulți microbi sunt în organism.

Pentru identificarea moleculară a tulpinilor izolate, conform literaturii de specialitate s-au folosit primerii:

1) PA-SS-F GGGGGATCTTCGGACCTCA

2) PA-SS-R TCCTTAGAGTGCCACCCG 1124–1144 *P. aeruginosa*
956 – bp pozitiv

Extracția ADN-ului

Extracția ADN-ului a fost realizată prin metoda de fierbere simplă. Câteva colonii de cultură au fost suspendate în 500 μ l de apă distilată sterilă, după care se vortexează fiecare tub eppendorf.

Suspensia se fierbe la 97 ° C timp de 10 minute în bloc termic (fig.5.12), apoi se centrifughează la 10000 x timp de 5 minute, 2 μ l de supernatant a fost utilizat ca matriță ADN pentru PCR (fig.5.13).



Fig. 5.12 Bloc termic JSR (original)
Fig. 5.12 Thermal block JSR (original)



5.13 Centrifugă Thermo (original)
Fig. 5.13 Centrifuge Thermo (original)

Determinarea concentrației de ADN și a purității acestuia s-a făcut cu ajutorul spectrofotometrului NanoDrop ND2000 (fig.5.14). Pentru ca reacția PCR să dea cele mai bune rezultate un rol important îl are concentrația și puritatea ADN extras.

Cu ajutorul spectrofotometrului se poate determina atât concentrația de ADN cât și puritatea acestuia.

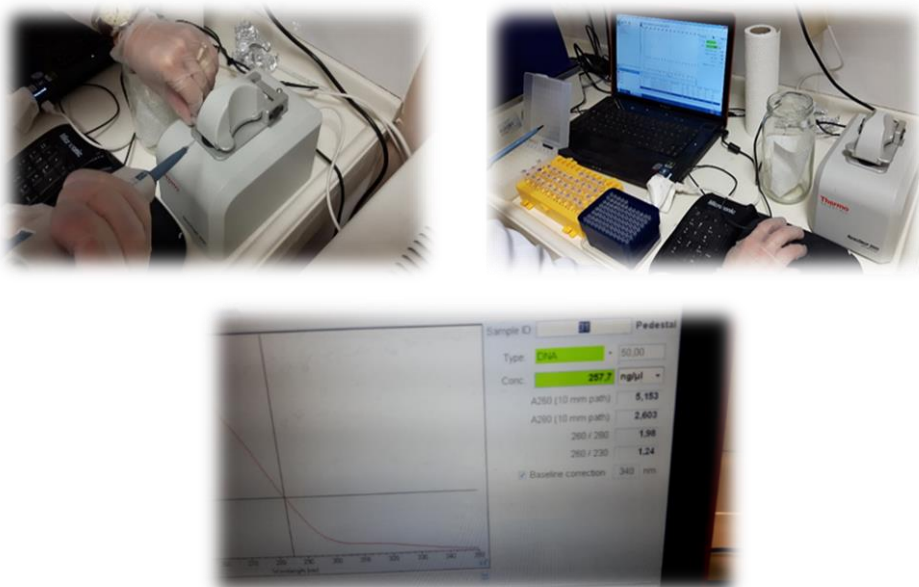


Fig. 5.14 Spectrofotometru NanoDrop ND2000 (original)
Fig. 5.14 NanoDrop Spectrophotometer ND2000 (original)

Tehnica PCR sau reacția în lanț a polimerazei, dezvoltată la mijlocul anilor '80, această tehnică a fost pusă la punct de Kary Mullis în anul 1983, plecând de la caracteristicile replicării ADN, cu ajutorul enzimei ADN polimeraza care utilizează o catenă a ADN ca matriță pentru sinteza unei noi catene complementare.

Amplificarea fragmentelor de ADN, se realizează pe baza unei secvențe de oligonucleotide, numită primer specific care se află în soluția de reacție.

Principiul metodei este următorul: pentru realizarea amplificării, într-o eprubetă specială de 200 μ l se realizează un amestec alcătuit din: ADN genomic care conține secvența țintă care trebuie amplificată; 2

primeri – secvențele complementare a fragmentului țintă care trebuie amplificat (fig.5.15). Taq polimerază – este o enzimă care contribuie la amplificarea fragmentului țintă; dNTP (dezoxinucleotid trifosfați) – dATP, dGTP, dCTP și dTTP; diverși cationi: ioni de Mg, sau Mn; tampon de reacție (tabelul 5.1., fig.5.15 a, b, c).

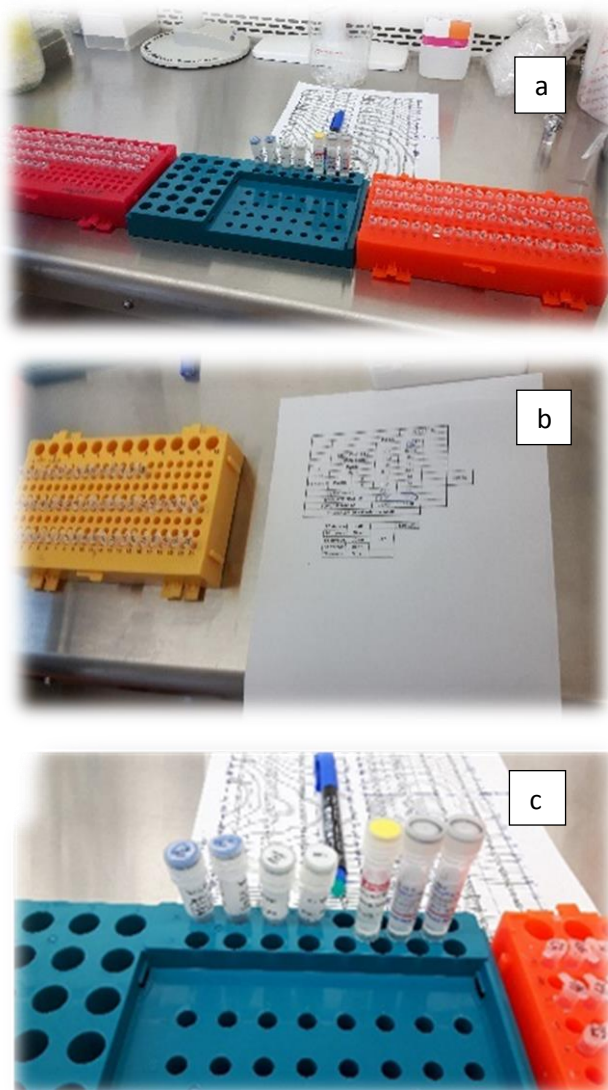


Fig. 5.15 Pregătirea amestecului pentru realizarea amplificării (original)
Fig. 5.15 Preparation in order of the mix to achieve amplification (original)

Tabelul 5.1

Elementele necesare reacției PCR

Table 5.1

The necessary elements PCR

				04.03.2016
PA-SS				
			35	
	Apă distilată sterilă	14,27	499,45	
	10xPCR Buffer	2,50	87,5	
2	MgCl₂	2,00	70	
0,25	dNTP	0,63	22,05	
0,4 microM	PA-SS	F	0,2	7
		R	0,2	7
	Taq Polimeraz		0,20	7
	Volum DNA		5,00	175
	Volum total		25,00	875
Primerii se diluează de 10 ori				
	95 °	2 min		126-182
	94 °	20 s	x25	
	58 °	20 s		
	72 °	40 s		
	72 °	5 min		

Reacția PCR se realizează în tuburi mici (0,2-0,5 ml) iar volumul reacției de 15 – 100 µl (material cu enzime speciale ce leagă ADN-ul izolatului și sintetizează copia lui), se introduce într-un aparat în care realizarea ciclurilor termice este controlată automat (fig.5.16).

PCR (*polymerase chain reaction*) fiind astfel o metodă de diagnostic cu precizie înaltă.



Fig. 5.16 Thermal cycler (original)

Fig. 5.16 Thermal cycler (original)

1. **Faza de denaturare** – în această fază, amestecul de reacție este încălzit la 94- 960 C și menținut la această temperatură timp de 1-9 minute. În această fază ADN este supus procesului de denaturare care constă în distrugerea punților de hidrogen dintre cele două lanțuri de nucleotide. Astfel dintr-o secvență de ADN dublu-catenar vor rezulta 2 secvențe de ADN monocatenare;

2. **Atașarea primerilor** se realizează prin răcirea la 40 - 60 0 C a soluției în care se află ADN de amplificat. În această etapă, primerii recunosc pe ADN genomic capetele de la secvența complementară și se atașează la capetele 3' ale celor două catene de ADN ale genei pe care dorim să o amplificăm. Scăderea temperaturii determină activarea enzimei polimerază.

3. **Etapa de elongare** – temperatura ajunge undeva între 70-74 0 C. În această fază polimeraza determină atașarea dNTP la secvența complementară de ADN genomic între capetele recunoscute de cei doi primeri. Taq polimeraza funcționează optim, în faza de extensie. Ciclul se repetă de 25 – 40 ori. Amplificarea este exponențială, după 3 cicluri realizându-se 2 copii, după 10 cicluri 256 copii, iar după 32 cicluri 1,73 miliarde copii ale secvenței supuse amplificării

Ulterior fragmentele de ADN sunt încărcate în gelul de agaroză (fig 5.17 a, b).

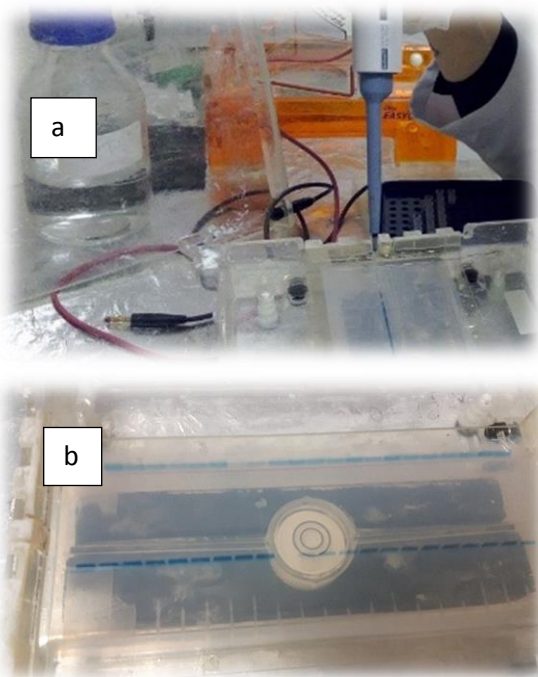


Fig. 5.17 Încărcarea ampliconilor în gelul de agaroză (original)

Fig. 5.17 Charging amplicons in agarose gel (original)

Vizualizarea acestora se va face în camera destinată special pentru această operație, întrucât principiul de vizualizare a fragmentelor este cu ajutorul bromurii de etidium care este foarte toxică (fig.5.18, fig.5.19).



Fig. 5.18 DigiDoc-It 125 Imagine Sistem imagine UVP, USA (original)

Fig. 5.18 DigiDoc-It 125 Imaging System UVP, USA (original)

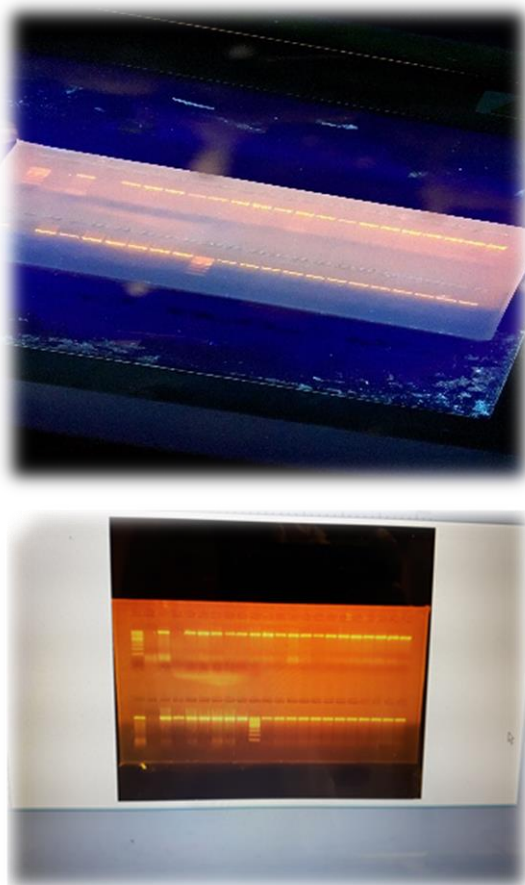


Fig. 5.19 Vizualizare la lumina UV (original)
Fig. 5.19 Visualized under UV light (original)

5.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Lotul de studiu a inclus 182 de tulpini (125 de origine umană – tabelul 5.2 și 57 de origine animală – tabelul 5.3) de *P. aeruginosa*, non-duplicat, selectați aleator dintre tulpinile cu semnificație clinică izolate în laboratoarele de microbiologie, confirmare cultural, morfologic, biochimic și molecular.

Tulpinile de origine umană au provenit din aspirate bronșice (15%), aspirate gastrice (12%), lichide pleurale (10%), colecții purulente

post-operatorii (21%), secreții auriculare și oculare (20%), probe de spută (10%), probe de urină (12%) (fig. 5.20).

Tabelul 5.2

Proveniența tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană

Table 5.2

The source of *Pseudomonas aeruginosa* strains of human origin

Aspirate bronșice		Aspirate gastrice		Lichide pleurale		Probe de spută		Probe de urină		Secreții auriculare și oculare		Colecții purulente post- operatorii	
Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr	%
19	15,0 0	15	12,0 0	12	10,0 0	13	10,0 0	15	12,0 0	25	20,0 0	26	21,0 0

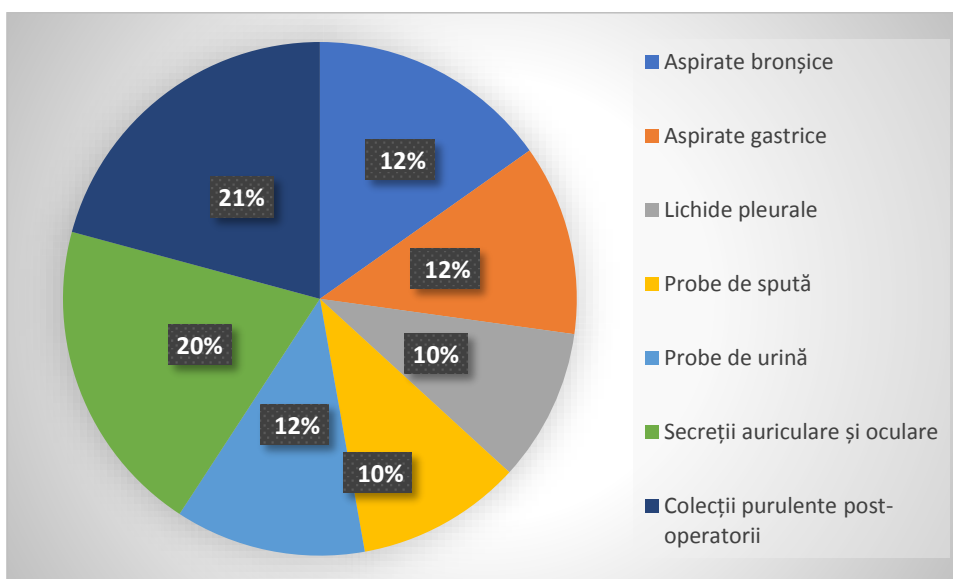


Fig.5.20 Reprezentarea grafică a prelevatelor de origine umană

Fig.5.20 Graphic representation isolates of human origin

Cele de origine animală au fost recoltate din otite (30%), abcese perianale (44%), septicemii (14%), conjunctivite (12%).

Tabelul 5.3

Proveniența tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* de origine animală

Table 5.3

The source of *Pseudomonas aeruginosa* strains of animal origin

Otite		Abcese perianale		Septicemie		Conjunctivită	
Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
17	30,00	25	44,00	8	14,00	7	12,00

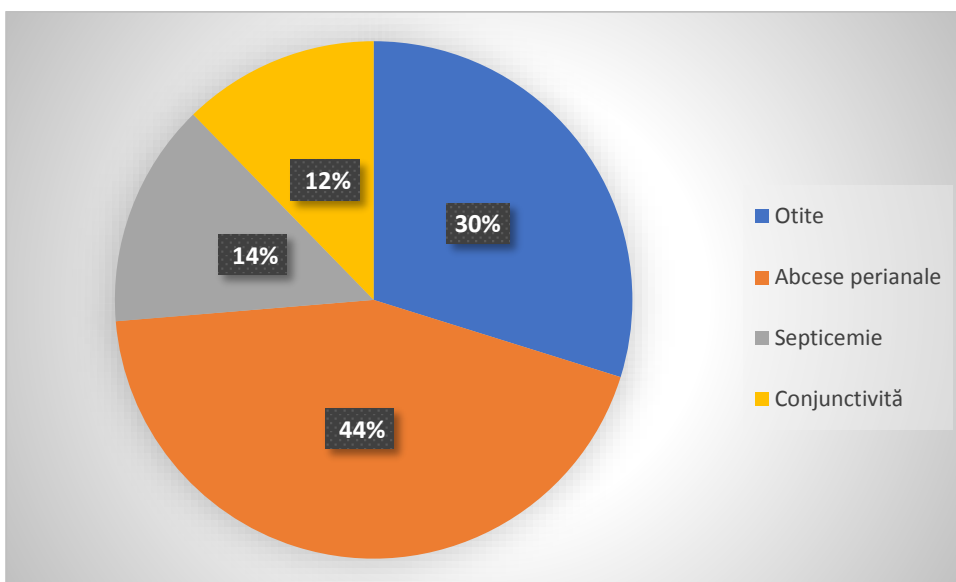


Fig. 5.21 Reprezentarea grafică a prelevatelor de origine animală
Fig. 5.21 Graphic representation isolates of animal origin

Toate cele 182 de tulpini de *Pseudomonas spp.* au fost confirmate molecular ca fiind ***Pseudomonas aeruginosa*** (fig.5.20, fig.5.21, fig.5.22, fig.5.23, fig.5.24, fig.5.25, fig.5.26, fig.5.27).

Confirmarea moleculară

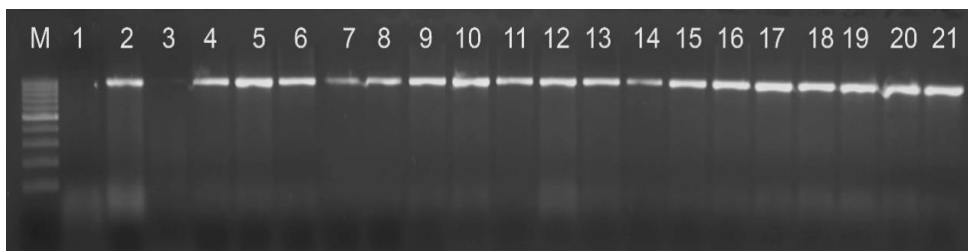


Fig. 5.22 Confirmare moleculară – lot tulpini 1 – 21 (original)

Fig. 5.22 Molecular confirmation – lot strains 1 – 21 (original)

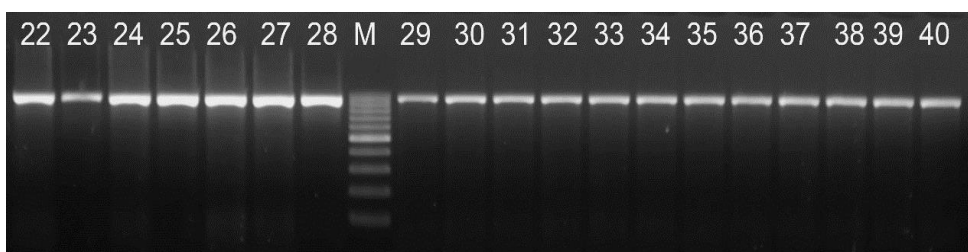


Fig. 5.23 Confirmare moleculară – lot tulpini 22 – 40 (original)

Fig. 5.23 Molecular confirmation – lot strains 22 – 40 (original)

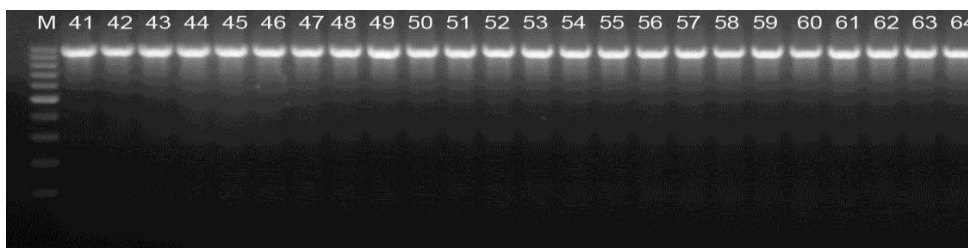


Fig. 5.24 Confirmare moleculară – lot tulpini 41 – 64 (original)

Fig. 5.24 Molecular confirmation – lot strains 41 – 64 (original)

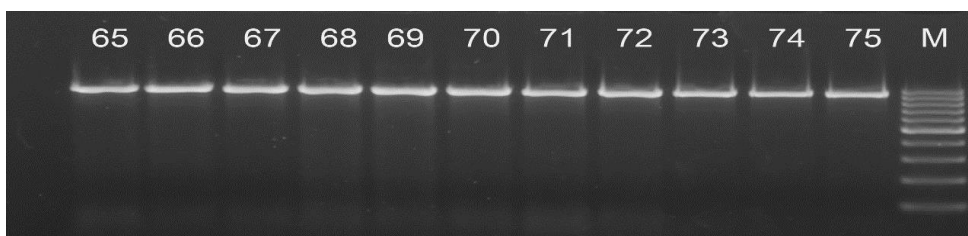


Fig. 5.25 Confirmare moleculară – lot tulpini 65 – 75 (original)

Fig. 5.25 Molecular confirmation – lot strains 65 – 75 (original)

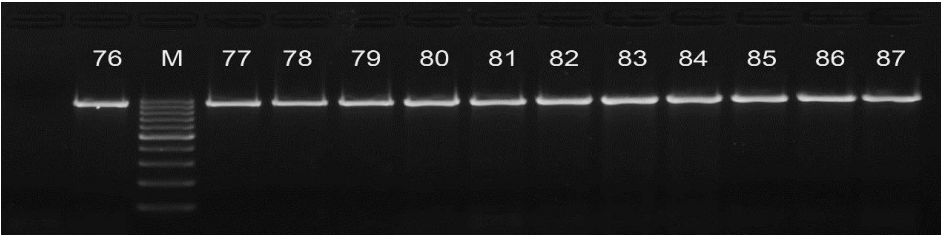


Fig. 5.26 Confirmare moleculară – lot tulpini 76 – 87 (original)
Fig. 5.26 Molecular confirmation – lot strains 76 – 87 (original)

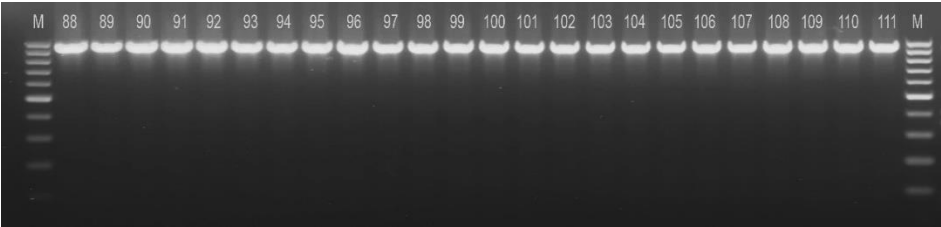


Fig. 5.27 Confirmare moleculară – lot tulpini 88 – 111 (original)
Fig. 5.27 Molecular confirmation – lot strains 88 – 111 (original)



Fig. 5.28 Confirmare moleculară – lot tulpini 112 – 149 (original)
Fig. 5.28 Molecular confirmation – lot strains 112 – 149 (original)

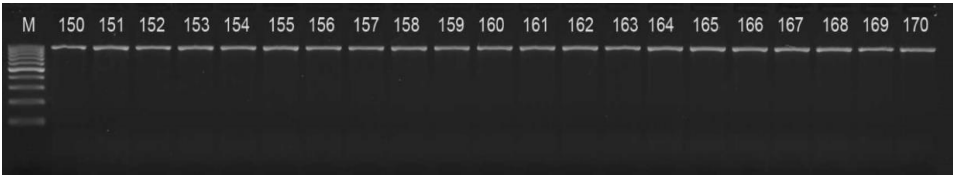


Fig. 5.29 Confirmare moleculară – lot tulpini 150 – 170 (original)
Fig. 5.29 Molecular confirmation – lot strains 150 – 170 (original)

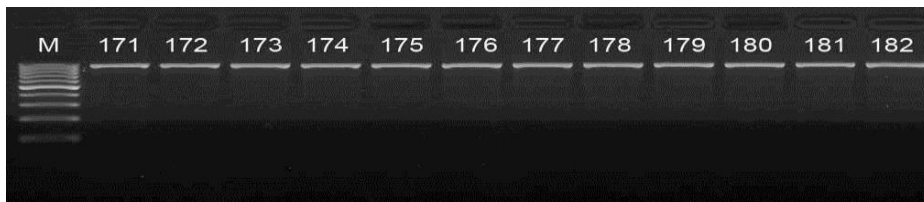


Fig. 5.30 Confirmare moleculară – lot tulpini 171 – 182 (original)

Fig. 5.30 Molecular confirmation – lot strains 171 – 182 (original)

5.3. CONCLUZII PARȚIALE

- S-au izolat și confirmat molecular 182 de tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*.
- S-au izolat 125 (68,68%) tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană și 57 (31,32 %) tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de origine animală;
- Din cele 125 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană, 15% proveneau din aspirate bronșice, 12% din aspirate gastrice, 10% din lichide pleurale, 21% din colecții purulente post operatorii, 20% din secreții auriculare și oculare, 10% din spută, 12% din uroculturi.
- Din cele 57 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate de la animale, 30% proveneau din secreții otice, 44% din abcese perianale, 14% septicemii și 12% din conjunctivite.

6. STUDIUL ANTIBIOREZISTENȚEI LA TULPINILE DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DE ORIGINE UMANĂ ȘI ANIMALĂ

6. STUDY ON ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS OF HUMAN AND ANIMAL ORIGIN

6.1.TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE A TULPINILOR DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Eficiența unui tratament cu antibiotice este condiționată, în primul rând, de sensibilitatea agentului patogen față de antibioticul respectiv, proprietate care se apreciază “*in vitro*” prin testul numit antibiogramă (Ciocan O. și colab., 2015)

Pentru ca rezultatul antibiogramei să fie concludent se impune respectarea unor standarde internaționale. În prezent, sunt acceptate două standarde: cel european EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) și cel american CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute).

Scopul esențial al antibiogramei este de a ajuta decizia terapeutică, fiind utilă în: supravegherea epidemiologică a rezistenței bacteriene care va orienta ulterior schemele de antibioterapie, compararea fenotipurilor de rezistență a tulpinilor presupus responsabile de infecția nosocomială, verificarea corectitudinii identificării bacteriene, prin punerea în evidență a rezistenței naturale.

6.1.1. Material si metodă

Au fost luate în studiu tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate în perioada 2013-2015. Au fost testate tulpinile cu semnificație clinică.

Tulpinile izolate au fost testate și confirmate conform protocolului de diagnostic bacteriologic.

Lotul de studiu a inclus 125 de tulpini *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană și 57 de origine animală, non-duplicat.

Antibiograma se poate executa prin 2 categorii de tehnici: tehnici difuzimetrice și tehnici bazate pe diluții. În studiul nostru, testarea sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* s-a realizat prin metoda difuzimetrică. Interpretarea rezultatelor am efectuat-o pe baza normelor CLSI 2015 (*Clinical Laboratory and Standard Institute*).

Metoda difuzimetrică – tehnica microcomprimatelor

Principiul: pe suprafața mediului Mueller-Hinton înșămânțat cu tulpina de testat se depun discuri cu diferite antibiotice; antibioticul difuzează circular în mediu, realizând concentrații descrescătoare; creșterea bacteriană este inhibată în zona în care realizează concentrații mai mari decât CMI (Codiță, 2009a).

Materiale folosite:

- tulpina de testat în cultură pură;
- plăci cu agar Mueller-Hinton (Oxoid, Marea Britanie);
- discuri impregnate cu antibiotice (Oxoid, Marea Britanie);
- ser fiziologic steril;
- tampoane sterile;
- densitometru .

Protocol de lucru:

- s-a preparat mediul Mueller-Hinton agar, conform indicațiilor producătorului și s-a turnat câte 25 ml în plăci Petri cu diametrul de 90 mm, astfel încât grosimea mediului să fie de 4 mm;
- în 2 ml de ser fiziologic, s-a pregătit o suspensie bacteriană cu turbiditatea 0,5 McFarland din cultură de 24 h a tulpinii de testat, ceea ce corespunde unei densități celulare de $1-2 \times 10^8$ CFU/ ml, conform McFarland Nephelometer Standards;

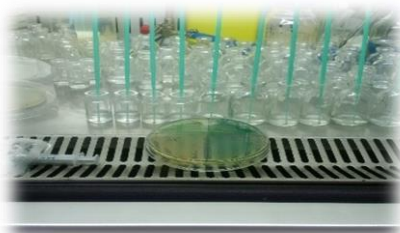


Fig. 6.1 Pregătirea suspensiei bacteriene pentru testarea sensibilității la antibiotice

Fig. 6.1 Preparation of the bacterial suspension for antibiotic susceptibility testing

- plăcile cu agar Mueller-Hinton (uscate în prealabil la termostat 5-10 minute) au fost însămânțate cu un tampon de recoltare steril îmbibat în suspensia bacteriană, în trei direcții, astfel încât să se disperseze pe întreaga suprafață pentru a obține o creștere confluentă;
- microcomprimatele s-au aplicat cu ajutorul aparatului Disc Dispenser automat Oxoid, Marea Britanie (fig.6.2);



Fig. 6.2 Dispunerea microcomprimatelor pe mediu de cultură

Fig. 6.2. The layout of the microdisks on culture medium

- incubarea plăcilor la 37° C, timp de 20-24h;
- diametrele zonelor de inhibiție din jurul discurilor s-a măsurat în mm, apoi s-a interpretat categoria de sensibilitate (sensibil, rezistent, intermediar) conform standardelor CLSI, 2015, (fig.6.3).

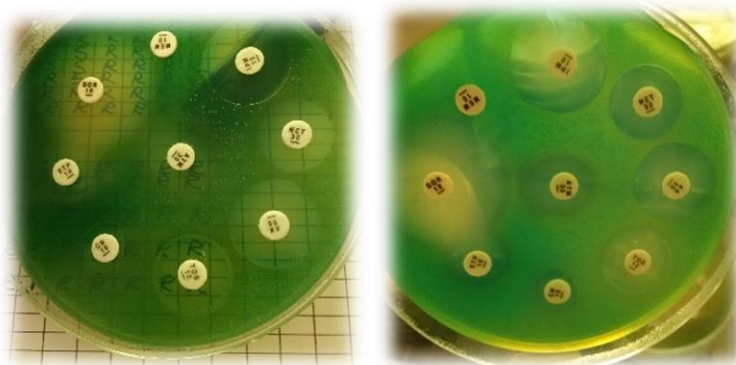


Fig. 6.3 Interpretarea rezultatelor la 24 h de la incubare (original)

Fig. 6.3 Interpretation of the results after 24 hours of incubation (original)

6.1.2. Rezultate si discuții

Toate izolatele au fost împărțite în grupe de analiză pentru a se putea urmări unde este rezistența mai des întâlnită, astfel lotul de 125 probe de origine umană a fost împărțit în 7 grupe (H1-H7) și cele de origine animală în 4 (A1-A4) grupe.

Testările s-au realizat pe 13 antibiotice din grupa **quinolonele**: ciprofloxacina (5 μ g) , **grupa betalactamine**: imipenem (10 μ g), meropenem (10 μ g), piperacilin + tazobactam (10 μ g), ceftazidime (30 μ g), cefepim (30 μ g), aztreonam (30 μ g), piperacilin (10 μ g), tazobactam (10 μ g), grupa **aminoglicozide**: amikacina (30 μ g), gentamicina (10 μ g), tobramicina (10 μ g) și **polimixine**: polimixina B (10 μ g).

S-au izolat 19 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* din aspirate bronșice de la pacienți umani, majoritatea cu patologie respiratorie (tabelul 6.1) (Ciocan O. și colab., 2016).

Prelevarea sputei se efectuează din expectorația de dimineață, când pacientului i se face de obicei „toaleta bronhiilor”. În prealabil bolnavul va efectua o gargară cu ser fiziologic steril (Richard B.T., 2003).

Produsul a fost prelevat într-un recipient steril, cu gât larg, prevăzut cu capac. În infecțiile acute este suficient să se recolteze un volum de 1-2 ml secreție purulentă (Buiuc D., 1999).

Creșterea rezistenței la antibiotice la bacteriile non-fermentative este tot mai des raportată și sunt în pericol eficacitatea antibioticelor utilizate ca ultimă instanță în terapie (Ciocan O. și colab., 2015).

La tulpinile de *P. aeruginosa*, achiziția de mecanisme de rezistență la aceste molecule de antibiotice devine tot mai frecventă, ce duce la formarea de tulpini MDR și PDR (Ciocan O. și colab., 2014).

Ultimii ani au arătat că cea mai mare parte a mecanismelor de rezistență la antibioticele cu spectru larg la *Enterobacteriaceae* pot fi identificate la ora actuală și la *P. aeruginosa*.

Acumularea de mecanisme de rezistență independente (de exemplu, la β -lactame și aminoglicozide) se observă zilnic la nivel mondial; și deși unele bacterii sunt slab patogene comparativ cu *P. aeruginosa*, ele pot juca un rol important în răspândirea genelor de rezistență la antibioticele cu spectru larg, condițiile de călătorie și de transfer internațional dintre pacienții spitalizați **îmbunătățește** în continuare această răspândire.

Tabelul 6.1

H-1 Tulpini de *P. aeruginosa* de origine umană izolate din aspirate bronșice

Table 6.1

H-1 *P. aeruginosa* strains of human origin isolated from bronchial aspirates

Nr. tulpină	Tipul izolatului	Patologie de fond	Vârstă (ani)	Sex	Apartenență pacient	Antibioterapie în antecedente
29	Aspirat bronșic	Sindrom funcțional respirator	1	♂	Rural	DA
33	Aspirat bronșic	Sindrom funcțional respirator	1	♂	Rural	DA
40	Aspirat bronșic	Sindrom Reye	1	♀	Rural	DA
49	Aspirat bronșic	Bronhopneumonie	1	♂	Urban	DA
52	Aspirat bronșic	Sindrom funcțional respirator	1	♂	Rural	DA
53	Aspirat bronșic	FC	1	♂	Rural	DA
59	Aspirat bronșic	Sindrom funcțional respirator	16	♀	Urban	DA
64	Aspirat bronșic	Rinofaringită acută	1	♀	Rural	DA
72	Aspirat bronșic	Granulom laterotoracic	1	♀	Rural	DA
73	Aspirat bronșic	Sindrom funcțional respirator	1	♀	Rural	DA
78	Aspirat bronșic	FC	14	♂	Urban	DA
79	Aspirat bronșic	Bronhopneumonie	1	♀	Rural	DA
82	Aspirat bronșic	FC	9	♂	Urban	DA
83	Aspirat bronșic	Bronhopneumonie	1	♀	Rural	DA
89	Aspirat bronșic	Bronhopneumonie	10	♂	Urban	DA
96	Aspirat bronșic	Sindrom Reye	1	♀	Rural	DA
100	Aspirat bronșic	FC	4	♀	Rural	DA
110	Aspirat bronșic	FC	6	♀	Rural	DA
115	Aspirat bronșic	FC	2	♀	Rural	DA

Toate tulpinile au fost testate față de cele 13 antibiotice care sunt uzual recomandate în patologia infecțioasă produsă de *Pseudomonas aeruginosa* (tabelul 6.2.).

Din analiza de ansamblu a tabelului 6.2, reiese faptul că sensibilitatea tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană din grupul H1, variază de la un izolat la altul.

Testările au evidențiat o rezistență relativ redusă (fig. 6.4). Se observă faptul că, 5,27% dintre tulpini au fost simultan rezistente la toate

cele 13 tulpini testate; 5,27% tulpini rezistente la 10 antibiotice, 15,78% tulpini rezistente la 4 antibiotice, 10,52% tulpini rezistente la 3 antibiotice, 26,31% dintre tulpini rezistente la două antibiotice, 21,05% tulpini rezistente la un singur antibiotic. Un aspect pozitiv este faptul că 15,76% din tulpinile testate nu manifestau rezistență față de antibioticele testate.

Tabelul 6.2

Rezultatele la antibiogramă pe tulpinile umane de *P. aeruginosa* obținute din aspirate bronșice (H-1)

Table 6.2

The results of the antibiotic on the human strains of *P. aeruginosa* obtained from bronchial aspirates (H-1)

Nr.	IPM	MEM	TZP	CAZ	FEP	CIP	AK	GN	TOB	ATM	PB	PIP	TAZ
29	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
33	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
40	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	I	I
49	R	R	I	R	R	R	S	R	I	R	S	S	S
52	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
53	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I
59	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
64	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
72	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
73	R	R	I	R	R	S	S	S	S	I	R	R	R
78	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
79	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
83	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
89	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
96	R	R	I	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R
100	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
110	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
115	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legendă: S – sensibil, R – rezistent, I – intermediar

Antibiotice testate: IPM – imipenem, MEM – meropenem, TZP – piperacilin + tazobactam, CAZ - , FEP – cefepim, CIP – ciprofloxacin, AK – amikacin, GN – gentamicin, TOB – tobramicin, ATM – aztreonam, PB – polimixin B, PIP – piperacilin TAZ – tazobactam

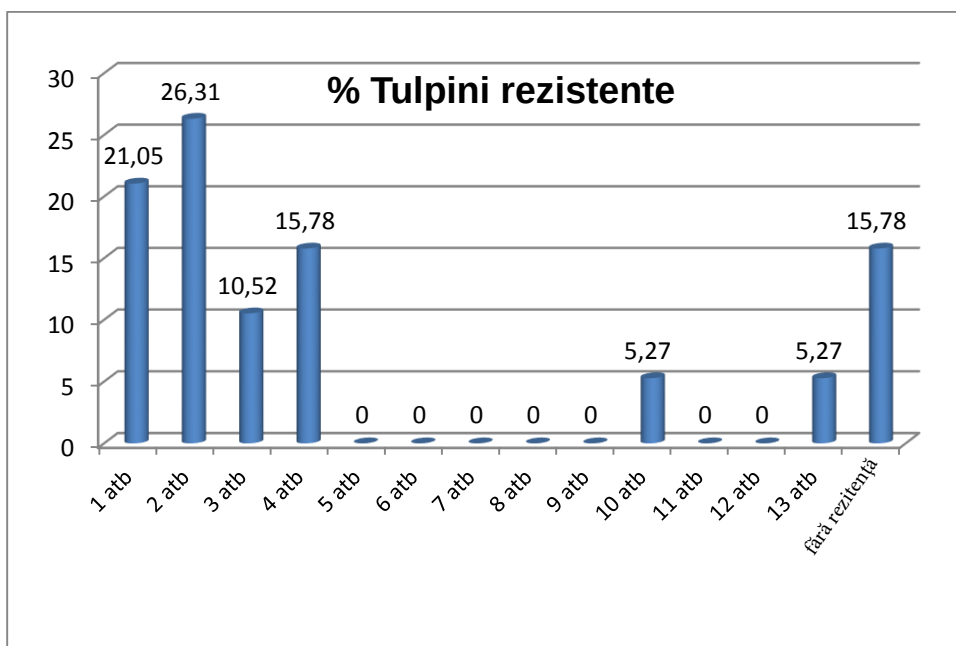


Fig. 6.4 Incidența rezistenței microbiene a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din H-1

Fig. 6.4 The incidence of microbial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains of H-1

Aspiratele bronșice au provenit în mare parte din Bronhopneumonii și FC (Fibroză chistică) spre deosebire de pneumonie, bronhopneumonia necesită un tratament diferit, dar și atenție medicală diferită. Severitatea ambelor patologii de fond depinde de tipul de bacterie ce cauzează infecția, în aceeași măsură contează starea generală de sănătate a persoanei afectate.

Bronhopneumonia afectează preponderent copii mici, persoanele imunosupresate și cele vârstnice (Buiuc D., 2010).

Fibroza chistică este o boală genetică gravă, ce afectează în special plămânii, astfel copii diagnosticați cu FC sunt predispuși infecțiilor pulmonare recidivante (Poonja A. și colab., 2017).

Analiza sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grup H1, raportată la grupe de antibiotice este prezentată în fig. 6.5.

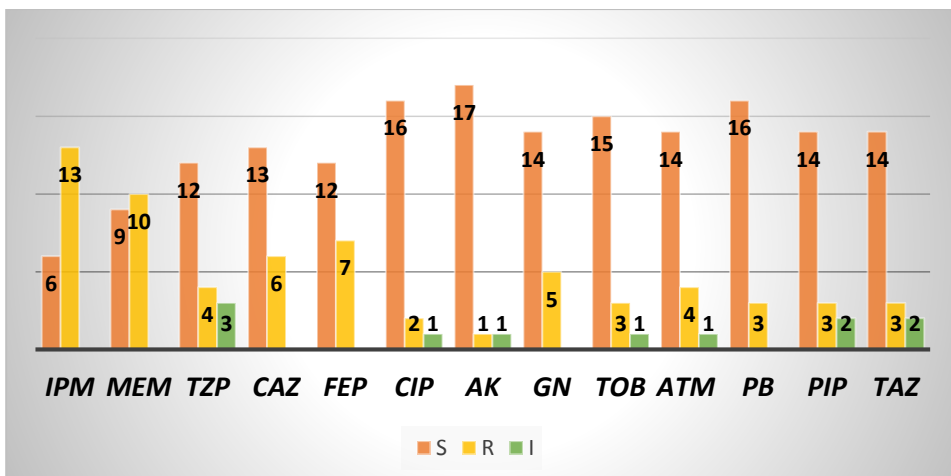


Fig. 6.5 Reprezentarea grafică a sensibilității bacteriene față de antibiotice la grupul H-1

Fig. 6.5 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics , group H-1

Tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* provenite din aspiratele bronșice au prezentat o înaltă sensibilitate la CIP, AK și rezistență la IMP și MEM, fapt îngrijorător deoarece carbapenemele sunt antibioticele betalactame cu spectru ultralarg (antibiotic total) (Năstasă V., 2005) față de gamă largă de bacterii.

Antibioticele betalactamice au fost utilizate tot mai frecvent datorită eficienței terapeutice. În timp, aceste acțiuni au dus, în mod inevitabil, la selectarea unor tulpini rezistente, capabile să producă enzime care să scindeze legătura betalactamică.

Aminoglicozidele nu sunt foarte eficiente în infecțiile sistemice dar au o foarte bună acțiune bactericidă asupra bacteriilor Gram negative. Întrucât sunt moderat nefrotoxice și neurotoxice, și pentru că bacteriile creează foarte repede rezistență față de aminoglicozide, administrarea lor se face cu precauție (Năstasă V., 2005).

Monoterapia cu fluoroquinolone trebuie rezervată doar pentru infecțiile comunitare, datorită riscului emergenței rezistenței.

Pentru infecții severe este indicată terapia combinată, cel mai adesea administrându-se o betalactamină antipseudomonas (ceftazidim, cefepim, piperacilină + tazobactam) și un aminoglicozid.

Pseudomonas aeruginosa este un agent patogen oportunist care colonizează orofaringele, fiind unul din patogenii izolați din probele de

spută de la pacienți cu afecțiuni respiratorii făcând posibilă contaminarea conținutului gastric (Bynum L.J. și colab., 1976). Aderența bacteriilor la epiteliul căilor respiratorii este primul pas al infecțiilor bronhopulmonare ce favorizează ulterior colonizarea tubului digestiv.

Aspiratele gastrice pot distinge diferite boli pulmonare legate de produsul aspirat. Conținutele acide pot agrava infecția bacteriană printr-un mecanism care implică adeziunea celulei bacteriene la epiteliul căilor respiratorii (Augustine SM și colab., 1991).

Aspiratele gastrice prelevate de la pacienți umani (H-2), cu diferite patologii de fond, au reprezentat o altă categorie de afecțiuni produse de *Pseudomonas aeruginosa* (tabelul 6.3.)

Tabelul 6.3

H – 2 Tulpini de *P. aeruginosa* de origine umană izolate din aspirate gastrice

Table 6.3

H – 2 *P. aeruginosa* strains of human origin isolated from gastric aspirates

Nr. tulpină	Tipul izolatului	Patologie de fond	Vârstă (ani)	Sex	Apartenență pacient	Antibioterapie în antecedente
1	Aspirat gastric	Atrezie esofagiană	1	♀	Urban	NU
2	Aspirat gastric	Electrocuție	2	♀	Urban	NU
3	Aspirat gastric	Insuficiență renală	5	♀	Urban	NU
4	Aspirat gastric	Malnutriție	1	♀	Rural	DA
6	Aspirat gastric	Sindrom dureros abdominal	7	♀	Rural	DA
7	Aspirat gastric	Malnutriție	3	♀	Rural	DA
8	Aspirat gastric	Insuficiență renală	1	♂	Urban	NU
9	Aspirat gastric	FC	6	♂	Rural	DA
10	Aspirat gastric	Obstrucție corp străin	8	♂	Urban	DA
12	Aspirat gastric	Rinofaringită acută	2	♂	Urban	DA
19	Aspirat gastric	Insuficiență renală	1	♂	Rural	NU
23	Aspirat gastric	Malnutriție	5	♂	Rural	DA
50	Aspirat gastric	Insuficiență renală	1	♂	Urban	NU
56	Aspirat gastric	Sindrom Reye	1	♀	Rural	NU
124	Aspirat gastric	Malnutriție	1	♀	Rural	NU

Tabelul . 6.4

Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de *P. aeruginosa* de origine umană izolate din aspiratele gastrice (H-2)

Table 6.4

The results obtained from the antibiotic of *P. aeruginosa* strains of human origin isolated from gastric aspirates (H-2)

Nr.	IPM	MEM	TZP	CAZ	FEP	CIP	AK	GN	TOB	ATM	PB	PIP	TAZ
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	R	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S
8	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S
9	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	I	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
23	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
50	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S
56	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	I	I
124	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Din analiza de ansamblu a tabelului 6.4, reiese faptul că, tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană izolate de la grupul H-2, au o sensibilitate foarte bună față de antibioticele testate (fig 6.6).

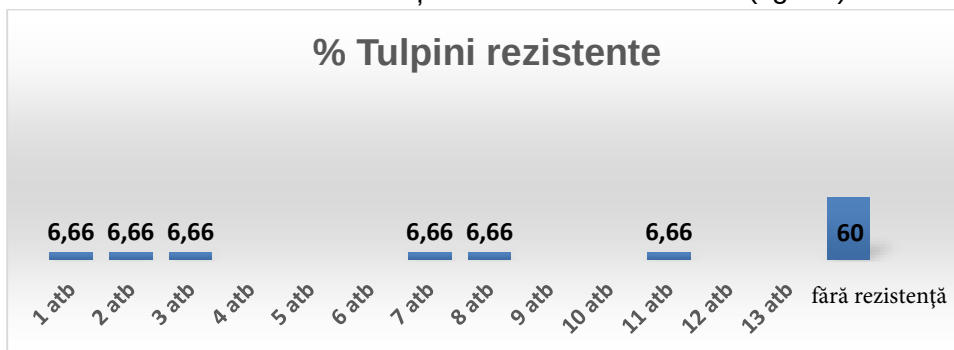


Fig. 6.6 Incidența rezistenței microbiene a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grupul H-2

Fig. 6.6 The incidence of microbial resistance strains of *Pseudomonas aeruginosa* of group H-2

Testările au evidențiat o rezistență redusă ceea ce a determinat reușita terapeutică. Se observă faptul că, 6,66% dintre tulpini au fost simultan rezistente la 11, 8, 7, 3, 2, 1 dintre antibioticele testate. De remarcat incidența ridicată de 60% de tulpinile sensibile simultan la toate cele 13 antibiotice testate.

Analiza comparată a sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grup H-2, evaluată în funcție de grupa de antibiotice, este prezentată în fig. 6.7.

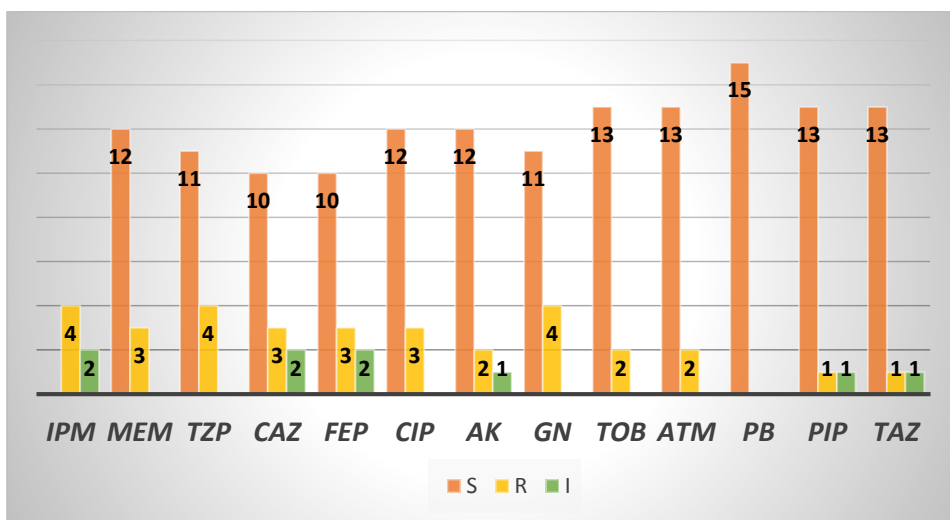


Fig. 6.7 Reprezentarea grafică a sensibilității bacteriene față de antibiotice la grupul H-2

Fig. 6.7 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics group H-2

Toate tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din aspiratele gastrice ale pacienților umani (H-2), au prezentat sensibilitate PB.

Din cele 15 tulpini izolate, 4 tulpini au manifestat rezistență la IPM, TZP, GN, 3 tulpini au manifestat rezistență la MEM, CAZ, FEP, CIP, 2 tulpini au manifestat rezistență la AK, TOB, ATM și câte o tulpină rezistentă la PIP și TAZ. Nu s-a izolat nici o tulpină multirezistentă față de antibioticele testate.

Testarea microbiologică a lichidului pleural, de la pacienți umani (H-3) cu diverse patologii de fond (osteoartrită, encefalopatii, stenoza posttraumatică, enterocolită, etc.), a permis izolarea unor tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* (tabelul 6.5.)

În mod normal, la nivelul cavității pleurale există doar o cantitate mică de lichid (0,1-0,2 ml/kg), care îndeplinește două funcții importante: asigură alunecarea ușoară a foițelor pleurale în cursul mișcărilor respiratorii, scăzând semnificativ forța de frecare; permite păstrarea plămânilor „lipiți” de peretele toracic, realizând o expansiune optimă a țesutului pulmonar (Nistor N., 2016).

Investigațiile microbiologice ale prelevatelor a permis izolarea a 12 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*. Pentru stabilirea protocolului terapeutic, toate tulpinile au fost testate față de cele 13 antibiotice: ciprofloxacina, imipenem, meropenem, piperacilin + tazobactam, ceftazidime, cefepim, aztreonam, piperacilin, tazobactam, amikacina, gentamicina, tobramicina și polimixina B (tabelul 6.6).

Tabelul 6.5

Tulpini de *P. aeruginosa* de origine umană izolate din lichidul pleural H – 3

Table 6.5

P. aeruginosa strains of human origin isolated from pleural fluid H-3

Nr. tul pin ă	Tipul izolatului	Patologie de fond	Vârst ă (ani)	Se x	Apartene ță pacient	Antibiotera pie în antecedent e
25	Lichid pleural	Sindrom dureros abdominal	16	♀	Urban	DA
42	Lichid pleural	Sindrom dureros abdominal	17	♂	Rural	DA
44	Lichid pleural	Osteoartrită	1	♂	Rural	NU
57	Lichid pleural	Sindrom dureros abdominal	16	♀	Urban	DA
60	Lichid pleural	Encefalopatie cronică infantilă	3	♀	Urban	NU
63	Lichid pleural	Stenoză post-traumatică	6	♀	Urban	NU
67	Lichid pleural	Sindrom dureros abdominal	12	♂	Urban	DA
80	Lichid pleural	Anemie carențială	2	♂	Rural	NU
87	Lichid pleural	Enterocolită acută	2	♂	Urban	NU
90	Lichid pleural	Cardiomiopatie	4	♀	Rural	DA
91	Lichid pleural	Uretrohidronefroza bilaterală	5	♀	Rural	DA
93	Lichid pleural	Hidrocefalie	1	♂	Rural	NU

Testarea sensibilității la antibiotice, similar tuturor grupelor testate a fost efectuată prin metoda disc difuziei Kirby Bauer pe mediul Mueller Hinton folosind microcomprimat Oxoid UK; interpretarea rezultatelor a fost realizată în concordanță cu ghidul CLSI 2015. Densitatea inoculului

pentru antibiogramă, de 0,5 MacFarland, a fost determinată cu ajutorul densitometrului. Tulpina de referință față de care s-a testat comparativ sensibilitatea la antibiotice este *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, furnizată de firma Oxoid UK (Thermo Fisher Scientific).

Tabelul 6.6

Rezultatele obținute la antibiograma realizată pe tulpinile de *P. aeruginosa* de origine umană din lichidul pleural ,H-3

Table 6.6

The results obtained from the antibiotic strains of *P. aeruginosa* in the pleural fluid of human origin, H-3

Nr.	IPM	MEM	TZP	CAZ	FEP	CIP	AK	GN	TOB	ATM	PB	PIP	TAZ
25	S	R	I	I	S	S	I	R	R	I	S	S	S
42	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
44	S	R	S	I	I	S	S	R	S	S	S	S	S
57	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
60	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
63	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S
67	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S
80	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
87	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
90	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
91	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
93	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R

Rezultatele antibiogramelor au arătat faptul că: tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană izolate de la grupul H-3 au o sensibilitate foarte bună față de antibioticele testate.

Testările au evidențiat o rezistență relativ redusă față de antibioticele testate.

Se observă faptul că: 8,33% dintre tulpini au fost simultan rezistente la 9 antibiotice, 8,33% la 3 antibiotice; 33,33% tulpini rezistente doar la 2 antibiotice și 25% dintre tulpini au manifestat rezistență la un singur antibiotic; 16,66% din cele 12 tulpini testate au fost sensibile la cele 13 antibiotice testate (fig. 6.8).

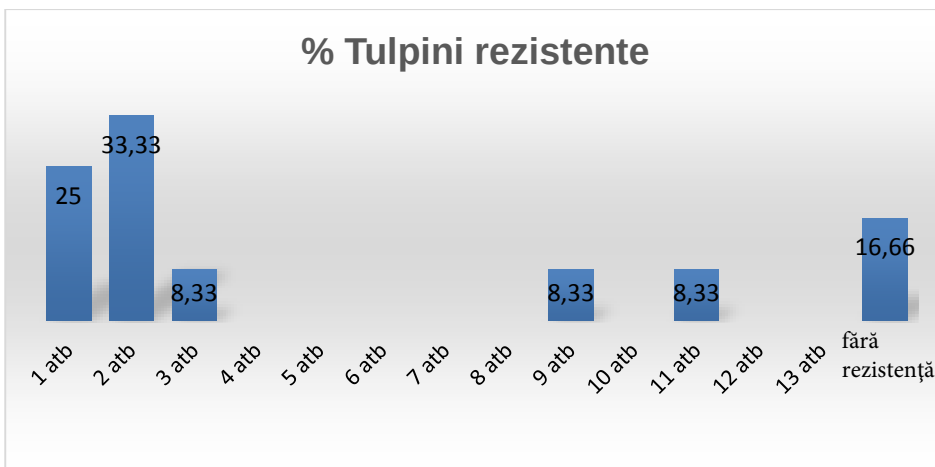


Fig. 6.8 Incidența rezistenței microbiene a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grupul H-3

Fig. 6.8 The incidence of microbial resistance strains of *Pseudomonas aeruginosa* in group H-3

Analiza comparată a sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grup H-3, în funcție de grupa de antibiotice, este prezentată în fig. 6.9.

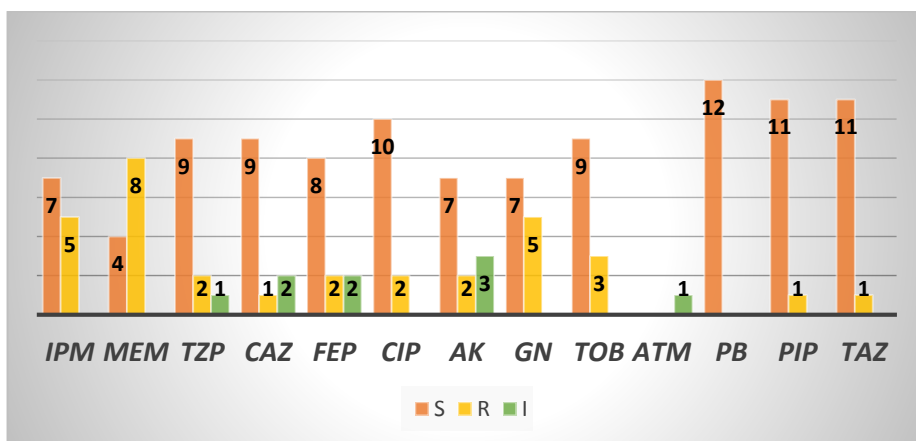


Fig. 6.9 Reprezentarea grafică a sensibilității bacteriene față de antibiotice la grupul H-3

Fig. 6.9 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics group H-3

Toate tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* provenite din lichide pleurale ale pacienților umani (H-3), au fost sensibile la PB și ATM.

Din cele 12 tulpini testate, 8 tulpini au fost rezistente la MEM, 5 tulpini au fost rezistente la IPM și GN, 3 tulpini rezistente la TOB, 2 tulpini rezistente la TZP, FEP, CIP, AK și câte o tulpină rezistentă la PIP, TAZ.

Au fost realizate investigații microbiologice pe spute prelevate de la pacienți umani (H-4) spitalizați în spații clinice specializate. În urma testărilor s-au izolat 13 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* (tabelul 6.7).

Cei mai mulți patogeni pulmonari își au originea în flora orofaringiană. Aspirarea acestor agenți patogeni este cel mai frecvent mecanism de producere a pneumoniei.

Frecvența colonizării mucoasei orofaringelui cu bacili aerobi gram-negativi, nu este obișnuită la subiecții sănătoși (< 2%), crește în cursul spitalizării, odată cu înrăutățirea stării generale, în legătură cu afecțiuni subiacente, poate fi consecința unei activități proteolitice salivare crescute, care distruge fibronectina, o glicoproteină ce tapetează suprafața mucoasei. Fibronectina este receptorul pentru flora normală gram-pozitivă din orofaringe. Pierderea fibronectinei expune receptorii de pe suprafața celulelor epiteliale la bacilii aerobi gram-negativi. Sursa bacililor aerobi gram-negativi poate să fie atât stomacul pacientului, care poate fi colonizat cu aceste microorganisme, ca urmare a unui pH gastric crescut (prin atrofia gastrică sau ca urmare a utilizării unor blocante H-2 sau antiacide), cât și aparatul respirator sau mâinile contaminate ale infirmierelor, sau apa și alimentele contaminate. Sondele nazo-gastrice pot facilita transferul bacteriilor gastrice spre faringe.

Tabelul 6.7

Tulpini de *P. aeruginosa* de origine umană izolate din probele de spută H – 4

Table 6.7

P. aeruginosa strains of human origin isolated from sputum samples H-4

Nr. tulpină	Tipul izolatului	Patologie de fond	Vârstă (ani)	Sex	Apartenență pacient	Antibioterapie în antecedente
34	Spută	FC	19	♂	Rural	DA
36	Spută	FC	3	♂	Rural	DA
47	Spută	FC	1	♂	Rural	DA
55	Spută	FC	8	♂	Rural	DA
65	Spută	FC	4	♂	Urban	DA
69	Spută	FC	5	♂	Urban	DA
92	Spută	FC	17	♂	Rural	DA
97	Spută	FC	16	♀	Rural	DA
98	Spută	FC	13	♀	Urban	DA
109	Spută	FC	6	♀	Rural	DA
117	Spută	FC	2	♂	Urban	DA
119	Spută	FC	1	♂	Rural	DA
120	Spută	FC	18	♂	Rural	DA

Toate tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* au fost testate în vederea determinării sensibilității la cele 13 antibiotice recomandate în infecții produse cu bacilul pioceanic (tabelul 6.8).

Rezultatele antibiogramelor au arătat faptul că, tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană izolate de la grupul H-4, au o sensibilitate redusă față de antibioticele testate.

Tabelul 6.8

Rezultatele obținute la antibiograma realizată pe tulpinile de *P. aeruginosa* de origine umană din probele de spută, H-4

Table 6.8

The results obtained from the antibiotic strains of *P. aeruginosa* from sputum samples of human origin, H-4

Nr.	IPM	MEM	TZP	CAZ	FEP	CIP	AK	GN	TOB	ATM	PB	PIP	TAZ
34	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S
36	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S
47	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
55	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
65	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
69	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
92	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
97	R	R	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R
98	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
109	I	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S
117	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
119	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
120	R	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S

Testările au evidențiat o rezistență relativ redusă față de antibioticele testate (fig. 6.10).

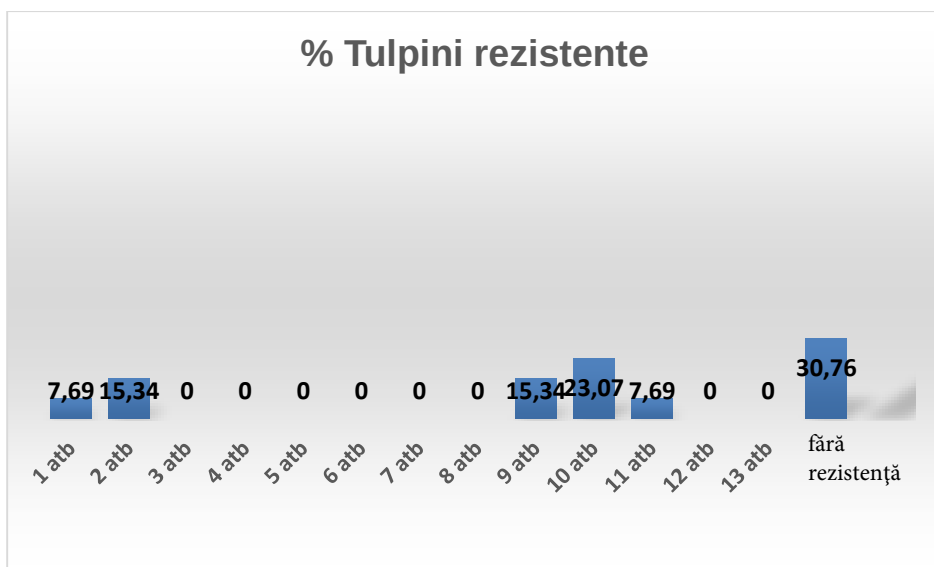


Fig. 6.10 Incidența rezistenței microbiene a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grupul H-4

Fig. 6.10 The incidence of microbial resistance strains of *Pseudomonas aeruginosa* in group H-4

Putem observa că: 7,69% dintre tulpini au fost simultan rezistente față de 11 antibiotice, 23,07% față de 10 antibiotice, 15,34% la 9 antibiotice, 15,34% la 2 antibiotice și 7,69% dintre tulpini au manifestat rezistență la un singur antibiotic; 30,76% din cele 13 tulpini testate au fost sensibile la cele 13 antibiotice testate

Analiza comparată a sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grup H-4, în funcție de grupa de antibiotice, este prezentată în fig. 6.11.

Pacienților cu stare generală alterată infectați cu *P. aeruginosa*, este prudent să se utilizeze combinația β -lactam/aminoglicozide pentru obținerea efectului bactericid. Combinarea beta-lactamilor și a aminoglicozidelor cu o fluorochinolonă nu pare să aducă o creștere a activității bactericide, deja rapidă în cazul fluorochinolonei singure; totuși, combinațiile pot lărgi spectrul și probabil împiedică dezvoltarea rezistenței. Fluorochinolonele în asociere fie cu un β -lactamic, fie cu un aminoglicozid pot fi folosite în instituțiile unde este de așteptat ca infecția cu un agent nosocomial să fie rezistent la fluorochinolonă sau capătă frecvent rezistență în timpul tratamentului, precum *P. aeruginosa*.

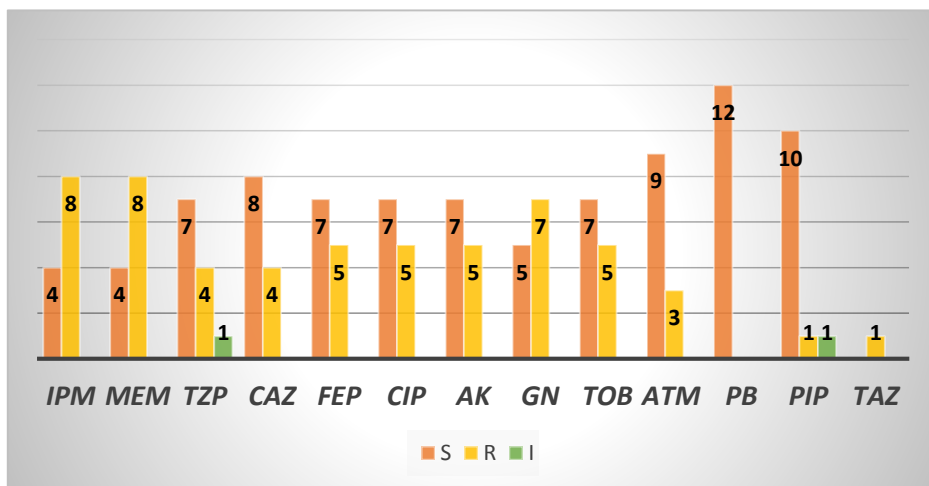


Fig. 6.11 Reprezentarea grafică a sensibilității bacteriene față de antibiotice la grupul H-4

Fig. 6.11 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics group H-4

Toate tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* provenite din sputa pacienților umani (H-4), au fost sensibile la PB.

Din cele 13 tulpini testate, 8 tulpini au fost rezistenți la IPM, MEM; 7 tulpini au fost rezistenți la GN; 5 tulpini rezistenți la FEP, CIP, EK, TOB; 4 tulpini rezistenți la TZP, CAZ; 3 tulpini au fost rezistenți la ATM și câte o tulpină rezistentă la PIP și TAZ.

Au fost prelevate probe de urină de la pacienți umani (H-5) cu diferite patologii (insuficiență renală, stenoză uretrală, insuficiență renală, sindrom abdominal dureros, sindrom subocluziv), (tabelul 6.9). În urma investigațiilor microbiologice au fost izolate 15 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*.

ITU (infecții ale tractului urinar) constituie după infecțiile căilor respiratorii și cele digestive, cea de-a treia entitate ca frecvență a localizării infecțiilor la copil, incidența fiind apreciată a fi cu o pondere la fetițe (Rushton H.G. și colab., 1997). Conform diverselor concepții, ITU nu constituie o boală unitară, ci un grup de boli având în comun prezența bacteriilor semnificative precum *Pseudomonas aeruginosa*, dar cu o etiologie și patogenie diferită (Karlowsky J.A. și colab., 2002).

Tabelul 6.9.

Tulpini de *P. aeruginosa* de origine umană izolate din probele de urină H-5

Table 6.9

P. aeruginosa strains of human origin isolated from urine samples H-5

Nr. tulpină	Tipul izolatului	Patologie de fond	Vârstă (ani)	Sex	Apartenență pacient	Antibioterapie în antecedente
5	Urină	Insuficiență renală cronică	8	♂	Urban	DA
15	Urină	Stenoză uretră	6	♀	Rural	DA
22	Urină	Stenoză uretră	9	♀	Urban	DA
31	Urină	Insuficiență renală cronică	8	♂	Urban	DA
32	Urină	Sindrom dureros abdominal	3	♀	Urban	DA
37	Urină	Stenoză post-traumatică de uretră	18	♂	Rural	DA
45	Urină	Insuficiență renală cronică	8	♂	Urban	DA
51	Urină	Insuficiență renală cronică	1	♂	Urban	DA
70	Urină	Stenoză uretră	4	♂	Rural	DA
88	Urină	Stenoză uretră	6	♂	Rural	DA
101	Urină	Sindrom dureros abdominal	2	♂	Urban	DA
104	Urină	Sindrom subocluziv	9	♀	Rural	DA
106	Urină	Insuficiență renală cronică	5	♀	Urban	DA
114	Urină	Insuficiență renală cronică	1	♀	Urban	DA
116	Urină	Sindrom dureros abdominal	4	♀	Rural	DA

Toate tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* au fost testate în vederea determinării sensibilității, la cele 13 antibiotice recomandate în terapia antiinfecțioasă (tabelul 6.10.).

Rezultatele antibiogramelor au arătat faptul că, tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană izolate de la grupul H-5, au avut o sensibilitate heterogenă față de antibioticele testate (fig. 6.12).

Tabelul 6.10

Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de *P. aeruginosa* de origine umană din probele de urină H-5

Table 6.10

The results obtained from the antibiotic strains of *P. aeruginosa* in samples of human urine H-5

Nr.	IPM	MEM	TZP	CAZ	FEP	CIP	AK	GN	TOB	ATM	PB	PIP	TAZ
5	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S
15	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
31	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
32	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
37	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
45	S	I	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S
51	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
70	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
88	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
101	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
104	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
106	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
114	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S
116	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Se observă faptul că din cele 15 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate, 20% dintre tulpini au fost simultan rezistente față de 11 antibiotice, 13,33% rezistente simultan față de 10 antibiotice, 33,33% dintre tulpini au manifestat rezistență la un singur antibiotic; 33,33% dintre tulpinile testate au manifestat sensibilitate la cele 13 antibiotice testate (fig. 6.12).

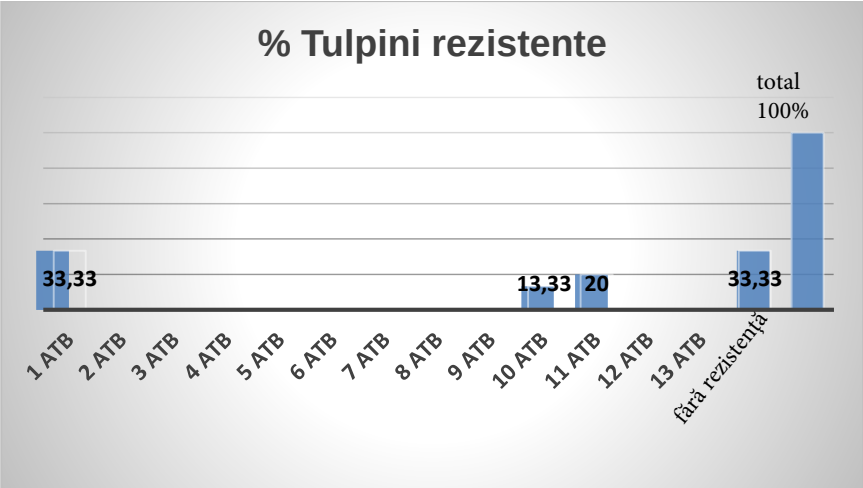


Fig.6.12 Incidența rezistenței microbiene a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grupul H-5

Fig.6.12 incidence of microbial resistance strains of *Pseudomonas aeruginosa* in group H-5

Analiza comparată a sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grup H-5, în funcție de grupa de antibiotice este prezentată în fig. 6.13.

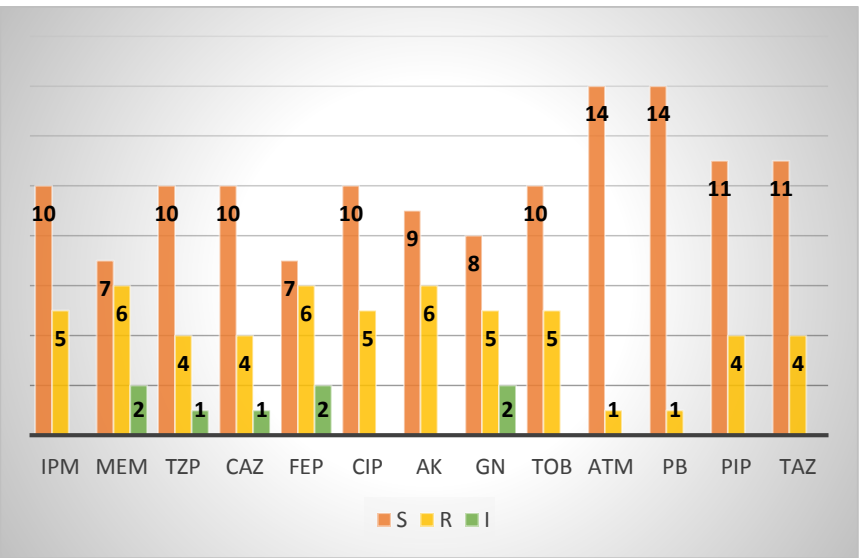


Fig. 6.13 Reprezentarea grafică a sensibilității bacteriene față de antibiotice la grupul H-5

Fig. 6.13 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics group H-5

Din cele 15 tulpini testate, 6 tulpini au fost rezistente la MEM, FEP, AK, 5 tulpini au fost rezistente la CIP, IPM, GN, TOB, 4 tulpini au fost rezistente la PIP, TAZ, TZP, CAZ și câte o tulpină rezistentă la ATM și PB.

Au fost prelevate secreții otice de la pacienții umani (H-6), care aveau patologii diferite (otită, insuficiență respiratorie, bronșită, sinuzită, rinită, urticarii, obstrucții nazale), (tabelul 6.9).

Tabelul 6.11

Tulpini de *P. aeruginosa* de origine umană izolate din secrețiile otice H – 6

Table 6.11

P. aeruginosa strains of human origin isolated from ear secretions H-6

Nr. tulpină	Tipul izolatului	Patologie de fond	Vârstă (ani)	Sex	Apartenență pacient	Antibioteerapi e în antecedente
13	Secreție otică	Otită	3	♂	Rural	DA
14	Secreție otică	Insuficiență respiratorie cronică	2	♂	Rural	DA
16	Secreție otică	Bronșiolită acută	5	♂	Rural	NU
17	Secreție otică	Obstrucția foselor nazale	6	♂	Urban	DA
18	Secreție otică	Sinuzită acută	9	♂	Urban	DA
20	Secreție otică	Sinuzită acută	11	♂	Rural	DA
21	Secreție otică	Insuficiență respiratorie cronică	8	♂	Urban	DA
24	Secreție otică	Obstrucția foselor nazale	11	♂	Rural	DA
28	Secreție otică	Otită	2	♀	Urban	NU
39	Secreție otică	Otită	4	♂	Urban	NU
43	Secreție otică	Otită	1	♀	Rural	NU
46	Secreție otică	Urticarie veziculoasă	19	♂	Rural	DA
66	Secreție otică	Deviație de sept nazal	4	♂	Urban	NU
74	Secreție otică	Rinită hipertrofică	9	♂	Urban	DA
76	Secreție otică	Sinuzită acută	9	♂	Rural	DA
84	Secreție otică	Otită	10	♀	Rural	DA
86	Secreție otică	Bronșiolită acută	5	♀	Rural	NU
95	Secreție otică	Obstrucția foselor nazale	3	♀	Urban	NU
102	Secreție otică	Rinită hipertrofică	10	♀	Rural	DA
103	Secreție otică	Otită	5	♀	Urban	DA
105	Secreție otică	Otită	3	♂	Urban	NU
112	Secreție otică	Insuficiență respiratorie cronică	2	♂	Urban	NU
121	Secreție otică	Rinită hipertrofică	3	♀	Rural	NU
122	Secreție otică	Deviație de sept nazal	7	♀	Rural	DA
123	Secreție otică	Otită	2	♀	Rural	NU

În urma investigațiilor microbiologice au fost izolate 25 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*.

Factorii favorizanți implicați în apariția otitelor sunt: rinitele alergice, adenoidită acută sau cronică (polipii), rinofaringitele acute sau

cronice, sinuzitele acute/cronice, deviații de sept, boli infecto-contagioase, folosirea în exces a bețișoarelor igienice otice.

Rezultatele antibiogramelor au arătat faptul că, tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană izolate de la grupul H-6, au o sensibilitate variabilă față de antibioticele testate dar favorabilă actului terapeutic (fig. 6.14)

Tabelul 6.12

Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de *P. aeruginosa* de origine umană din secrețiile otice H-6

Tabelul 6.12

The results obtained from the antibiotic of *P. aeruginosa* strains of human secretions ear H-6

Nr.	IPM	MEM	TZP	CAZ	FEP	CIP	AK	GN	TOB	ATM	PB	PIP	TAZ
13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	I	S	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R
16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	R	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S
18	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
39	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
43	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
46	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
66	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
74	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
76	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
84	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
86	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
95	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
102	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
103	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
105	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
112	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
121	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
122	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
123	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S

Otita externă, prezintă particularități proprii infecției tegumentului. Cel mai frecvent este cauzată de pseudomonade, mai ales de *Pseudomonas aeruginosa* dar și alte bacterii aerobe, în condiții favorizante, cum ar fi pătrunderea apei în conductul auditiv extern. Toate tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din secreții otice, au fost testate prin tehnica antibiogramei, pentru determinarea sensibilității față de cele 13 antibiotice recomandate în terapia antiinfecțioasă (tabelul 6.12).

Se observă faptul că din cele 25 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din secreții otice de la pacienții umani (H-6), 4% dintre tulpini sunt simultan rezistente față de 10 antibiotice și respectiv 8 antibiotice, 20% tulpini sunt rezistente simultan față de 3 antibiotice, 16% tulpini au fost rezistente la 2 antibiotice și 8% dintre tulpini au manifestat rezistență la un singur antibiotic. De asemenea, 48% dintre tulpinile testate au manifestat sensibilitate simultană la toate cele 13 antibiotice testate (fig. 6.12).

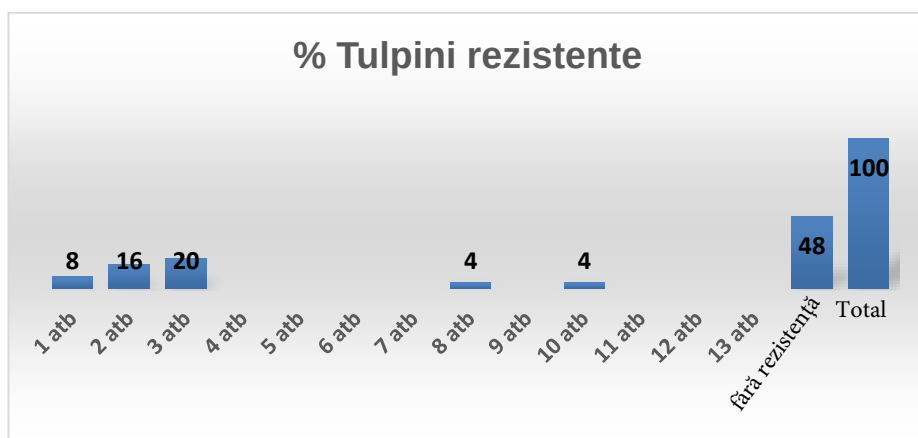


Fig.6.14 Incidența rezistenței microbiene a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grupul H-6

Fig.6.14 Incidence of microbial resistance strains of *Pseudomonas aeruginosa* in group H-6

Analiza comparată a sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grup H-5, în funcție de grupa de antibiotice, este prezentată în fig. 6.15.

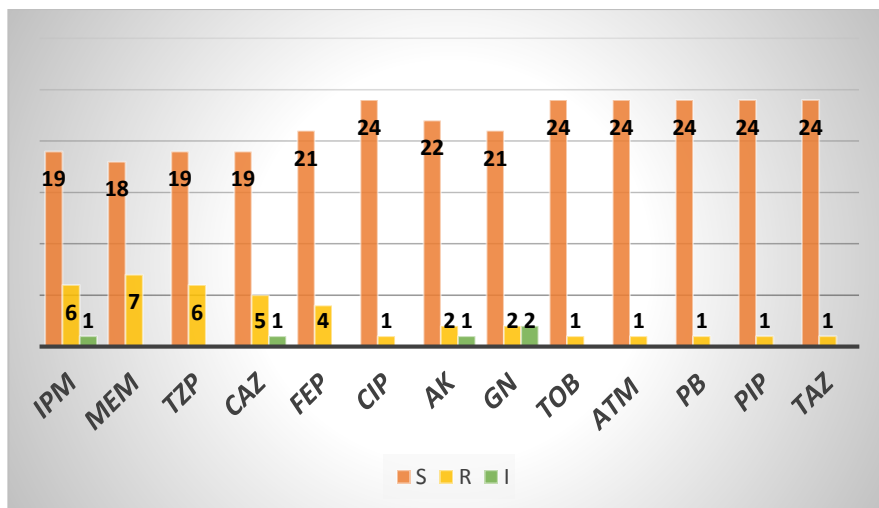


Fig. 6.15 Reprezentarea grafică a sensibilității bacteriene față de antibiotice la grupul H-6

Fig. 6.15 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics group H-6

Din cele 25 tulpini testate, 7 tulpini au fost rezistente la MEM, 6 tulpini au fost rezistente la IPM, TZP, 5 tulpini au fost rezistente la CAZ, 4 tulpini au fost rezistente la FEP, 2 tulpini au fost rezistente la AK, GN și câte o tulpină rezistentă la ATM, PB, PIP, TAZ, TOB, CIP.

Au fost prelevate și investigate microbiologic diferite colecții purulente provenite de la pacienți umani (H-7) spitalizați cu diferite afecțiuni (plăgi, chisturi, atrezie esofagiană, pneumotorax, etc), (tabelul 6.13).

În anii 1850, Ignaz Semmelweis a dedus prima legătură între transferul agenților patogeni de la personalul medical la pacienți. Semmelweis a observat o diferență între numărul cazurilor de febră puerperală din secțiile de maternitate. Incidența febrei puerperale era mai mare în sectoarele unde își desfășurau activitatea studenții în medicină comparativ cu sectoarele unde lucrau moașele și s-a gândit că ar fi fost o legătură cu participarea studenților la necropsii. După introducerea spălării mâinilor la terminarea procedurilor postmortem și înaintea reluării activității la sala de naștere. Ratele infecțiilor și a mortalității consecutive s-au redus semnificativ (Wilson J., 2007).

În urma analizelor de laborator, s-au izolat și identificat 26 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* din colecții purulente postoperatorii.

Tabelul 6.13

Tulpini de *P. aeruginosa* de origine umană izolate din colecții purulente postoperatorii H-7

Table 6.13

P. aeruginosa strains of human origin isolated from postoperative purulent collections H-7

Nr. tulpină	Tipul izolatului	Patologie de fond	Vârstă (ani)	Sex	Apartenență pacient	Antibiotezie în antecedente
11	Secreție purulentă postoperatorie	Plagă prin înjunghiere	16	♂	Rural	DA
26	Secreție purulentă postoperatorie	Electrocutare	7	♂	Rural	DA
27	Secreție purulentă postoperatorie	Plagă prin arsură	4	♀	Rural	NU
30	Secreție purulentă postoperatorie	Chist bronhogen în mediastin	3	♀	Urban	NU
35	Secreție purulentă postoperatorie	Electrocutare	4	♀	Urban	NU
38	Secreție purulentă postoperatorie	Atrezie esofagiană	2	♀	Rural	DA
41	Secreție purulentă postoperatorie	Politraumatism accident	9	♀	Rural	DA
48	Secreție purulentă postoperatorie	Insuficiență renală cronică	6	♀	Urban	DA
54	Secreție purulentă postoperatorie	Sindrom deshidratare - acidoză	4	♀	Rural	NU
58	Secreție purulentă postoperatorie	Stop cardio - respirator	17	♂	Urban	DA
61	Secreție purulentă postoperatorie	Fractură membru inferior	2	♂	Rural	NU
62	Secreție purulentă postoperatorie	Pneumotorax	9	♂	Rural	DA
68	Secreție purulentă postoperatorie	Cardiomiopatie hipertrofică septală	2	♂	Urban	NU
71	Secreție purulentă postoperatorie	Insuficiență renală cronică	5	♀	Urban	DA
75	Secreție purulentă postoperatorie	Insuficiență respiratorie cronică	6	♀	Urban	DA
77	Secreție purulentă postoperatorie	Accident (multiple fracturi)	18	♂	Rural	DA
81	Secreție purulentă postoperatorie	Sindrom funcțional respirator	7	♀	Rural	DA
85	Secreție purulentă postoperatorie	Pneumotorax	2	♂	Urban	NU
94	Secreție purulentă postoperatorie	Sindrom Reye	2	♂	Urban	NU
99	Secreție purulentă postoperatorie	Sindrom Down	8	♀	Rural	DA
107	Secreție purulentă postoperatorie	Fractură membru posterior	8	♂	Rural	DA
108	Secreție purulentă postoperatorie	Electrocutare	4	♂	Urban	NU
111	Secreție purulentă postoperatorie	Accident (multiple fracturi)	15	♀	Rural	DA
113	Secreție purulentă postoperatorie	Pneumotorax	8	♀	Urban	DA
118	Secreție purulentă postoperatorie	Atelectazie pulmonară	17	♂	Rural	DA
125	Secreție purulentă postoperatorie	Stop cardio - respirator	11	♂	Rural	DA

Toate tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din colecții purulente, au fost testate prin tehnica antibiogrammei, pentru determinarea sensibilității față de cele 13 antibiotice recomandate în terapia antiinfecțioasă (tabelul 6.14).

Este dovedit că mediul spitalicesc se poate contamina cu microorganisme responsabile de infecții asociate îngrijirilor medicale. Prin urmare, transmiterea microorganismelor din mediul de spital la pacienți poate apare prin contact nemijlocit cu echipamentele contaminate sau indirect ca rezultat al atingerii mâinilor (Denton M. și colab., 2004).

Pseudomonas aeruginosa poate infecta orice parte a corpului, inclusiv ficatul, creierul, oasele, sinusurile, de aceea din recoltarea colecțiilor purulente localizate/sau nu, putem oricând izola un piocianic, indiferent de patologiile de fond ale pacienților, favorizarea infectării rămânând la pacienții imunodeprimați.

Folosirea echipamentului de protecție de către personalul medical este o măsură esențială pentru protejarea sănătății și siguranței pacienților dar și a personalului medical.

Trebuie folosite toate măsurile de siguranță când urmează a fi manipulate prelevate purulente/lichide corporale contaminate în vederea examinării bacteriologice (mănuși sterile de unică folosință, șorț și protecție pentru ochi).

Pseudomonas aeruginosa prin capacitatea de a aderența la suprafața celulelor endoteliale, cu ajutorul pililor și proteinelor implicate în aderență face ca, colecțiile purulente postoperatorii să fie un mediu prielnic pentru dezvoltarea ei și pentru diseminarea totodată în organismul imunosupresat, persistența la nivel local prin intermediul materialului exopolizaharidic, cu structură de alginat, face posibilă formarea unui biofilm ce duce la protejarea bacilului față de factorii de apărare locali (dezinfecțanți, antibiotice etc).

Rezultatele antibiogramelor au arătat faptul că, tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană izolate de la grupul H-7, au o sensibilitate relativ redusă față de antibioticele testate.

Tabel 6.14

Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de *P. aeruginosa* de origine umană din colecții purulente postoperatorii H-7

Table 6.14

The results obtained from the antibiotic of *P. aeruginosa* strains of human origin of postoperative purulent collections H-7

Nr.	IPM	MEM	TZP	CAZ	FEP	CIP	AK	GN	TOB	ATM	PB	PIP	TAZ
11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	S	S
27	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	I
30	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
35	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
38	R	R	I	I	R	R	S	R	R	R	S	S	S
41	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
48	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
54	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
58	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
61	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
62	S	R	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
68	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
71	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
75	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
77	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
81	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R
85	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
94	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
99	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
107	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
108	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
111	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
113	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
118	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
125	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R

Se observă faptul că din cele 26 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din colecții purulente provenite de la pacienții umani (H-7), 3,84% dintre tulpini au fost rezistente la 13 antibiotice, 3,84% dintre tulpini au fost rezistente la 12 antibiotice, 7,69% tulpini au fost

rezistente la 11 antibiotice, 11,53% tulpini au fost rezistente la 10 antibiotice, 7,69% tulpini au fost rezistente la 9 antibiotice, 3,84% dintre tulpini au fost rezistente la 8 antibiotice respectiv 7 antibiotice, 11,53% au fost rezistente la 3 antibiotice, 3,84% au fost rezistente la 2 antibiotice și tot 3,84% au fost rezistente doar la un antibiotic.

De asemenea, 38,46% dintre tulpinile testate au manifestat sensibilitate microbiană la toate cele 13 antibiotice testate (fig.6.16).

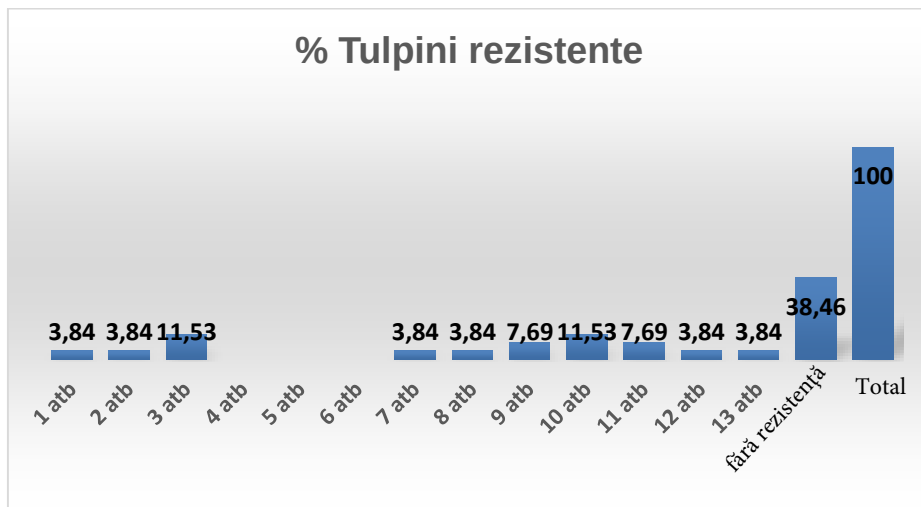


Fig.6.16 Incidența rezistenței microbiene a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grupul H-7

Fig.6.16 Incidence of microbial resistance strains of *Pseudomonas aeruginosa* in group H-7

Analiza comparată a sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grup H-7, în funcție de grupa de antibiotice, este prezentată în fig.6.17.

Asocierile de antibiotice reprezintă una dintre cele mai importante probleme ale utilizării acestor substanțe medicamentoase. Dificultățile constau în utilizarea judicioasă și alegerea acelor asocieri optime fiecărui caz în parte.

Regula generală în utilizarea antibioticelor este aceea a monoterapiei, cu tratament ținut, utilizându-se un antibiotic cu spectru cât mai îngust. Cu toate acestea există situații în care se impune asocierea de antibiotice. Aceste situații sunt: septicemii, endocardite bacteriene, bronhopneumonii grave, meningite cu etiologie multiplă sau generate de

germeni multirezistenți la antibiotice. Asocierea se face în scopul acoperirii cât mai extinse a spectrului bacterian; de aceea se recomandă până la obținerea rezultatelor microbiologice efectuarea antibiogramei care va permite un tratament ținut evitând astfel declanșarea mecanismelor de rezistență împotriva AB.

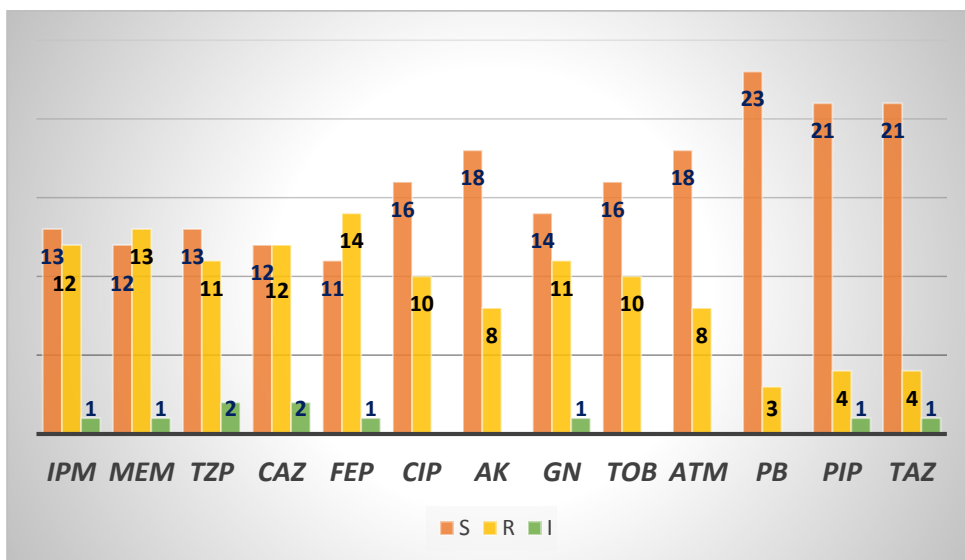


Fig. 6.17 Reprezentarea grafică a sensibilității bacteriene față de antibiotice la grupul H-7

Fig. 6.17 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics group H-7

Din cele 26 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* testate, 14 tulpini au fost rezistente la FEP, 13 tulpini au fost rezistente la MEM, 12 tulpini au fost rezistente la CAZ, IPM, 11 tulpini au fost rezistente la GN, TZP, 10 tulpini au fost rezistente la CIP, TOB, 8 tulpini au fost rezistente la AK, ATM, 4 tulpini au fost rezistente la PIP, TAZ și 3 tulpini au fost rezistente la PB.

Testarea tulpinilor de origine animală (A1-A4)

Potrivit prezentului studiu rezistența la antibiotice este destul de mare, fapt îngrijorător atât pentru oameni cât și pentru animale. Lupta împotriva rezistenței la antibiotice trebuie să înceapă din crescătoriile de animale. Trebuie să fie interzisă utilizarea în scop preventiv a antibioticelor, să se limiteze tratamentele în masă la cazuri strict delimitate, să se interzică în medicina veterinară folosirea antibioticelor extrem de importante și de rezervă în medicina umană și să fie stopate vânzările pe internet de antibiotice, prin aplicarea acestor măsuri, s-ar

reduce fenomenul de rezistență bacteriană în medicina umană cât și veterinară.

Toate tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din secreții otice, provenite de la diferite specii de animale (*câine, pisică, iepure*), au fost testate pentru determinarea sensibilității față de același panel de antibiotice utilizate în testarea tulpinilor de origine umană (tabelul 6.15).

Tabelul 6.15

Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de *P. aeruginosa* de origine animală izolate din otite, A – 1

Table 6.15

The results obtained from the antibiotic of *P. aeruginosa* strains isolated from animal otitis A – 1

Nr.	Origin e izolat	Patologie de fond	<i>IP</i> <i>M</i>	<i>ME</i> <i>M</i>	<i>TZ</i> <i>P</i>	<i>CA</i> <i>Z</i>	<i>FE</i> <i>P</i>	<i>CIP</i>	<i>AK</i>	<i>GN</i>	<i>TO</i> <i>B</i>	<i>AT</i> <i>M</i>	<i>PB</i>	<i>PIP</i>	<i>TA</i> <i>Z</i>
126	Câine	Otită	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R
127	Câine	Otită	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R
128	Câine	Otită	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
129	Câine	Otită	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
130	Câine	Otită	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R
131	Câine	Otită	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R
132	Câine	Otită	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
133	Câine	Otită	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R
134	Câine	Otită	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R
135	Câine	Otită	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
140	Câine	Otită	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R
148	Câine	Otită	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R
153	Pisică	Otită	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R
154	Iepure	Otită	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
155	Pisică	Otită	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
157	Iepure	Otită	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
182	Câine	Otită	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Din cele 17 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din secrețiile otice provenite de la animale (A-1), 11,76% dintre tulpini au fost rezistente la 13 antibiotice, 11,76% dintre tulpini au fost rezistente la 12 antibiotice, 17,64% tulpini au fost rezistente la 11 antibiotice, 11,76% tulpini au fost rezistente la 10 antibiotice, 11,76% tulpini au fost rezistente la 9 antibiotice, 17,64% dintre tulpini au fost rezistente la 8 antibiotice, 11,76% tulpini au fost rezistente la 7 antibiotice și 5,88% au fost rezistente la 2 antibiotice (fig.6.18).

Nu s-a identificat nici o tulpină de *Pseudomonas aeruginosa* cu sensibilitate totală la antibioticele luate în testare.

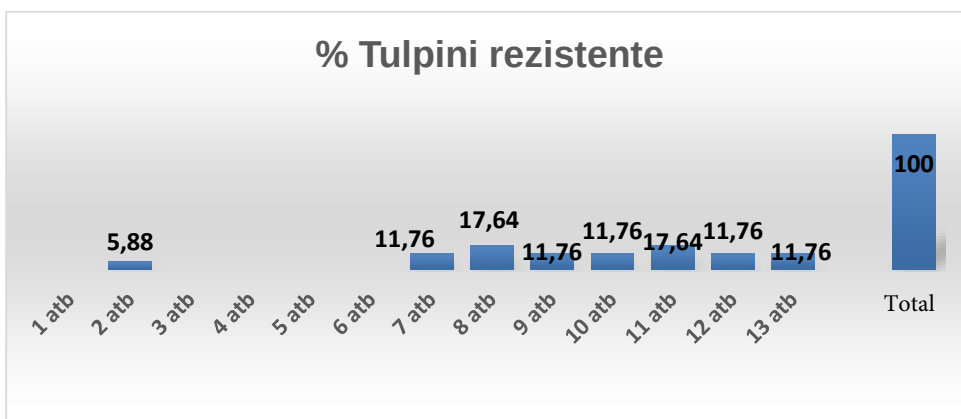


Fig. 6.18 Incidența rezistenței microbiene a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grupul A-2

Fig. 6.18 The incidence of microbial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains from the group A-2

Analiza comparată a sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grup A-1, în funcție de grupa de antibiotice, este prezentată în fig. 6.19.

Toate cele 17 tulpini testate au fost rezistente la PIP și TAZ, 16 tulpini au fost rezistente la TZP, CAZ, FEP; 15 tulpini au fost rezistente la CIP; 12 tulpini au fost rezistente la MEM; 11 tulpini au fost rezistente la PB; 10 tulpini au fost rezistente la ATM; 9 tulpini au fost rezistente la GN și IPM; 7 tulpini au fost rezistente la TOB și 6 tulpini au fost rezistente la AK.

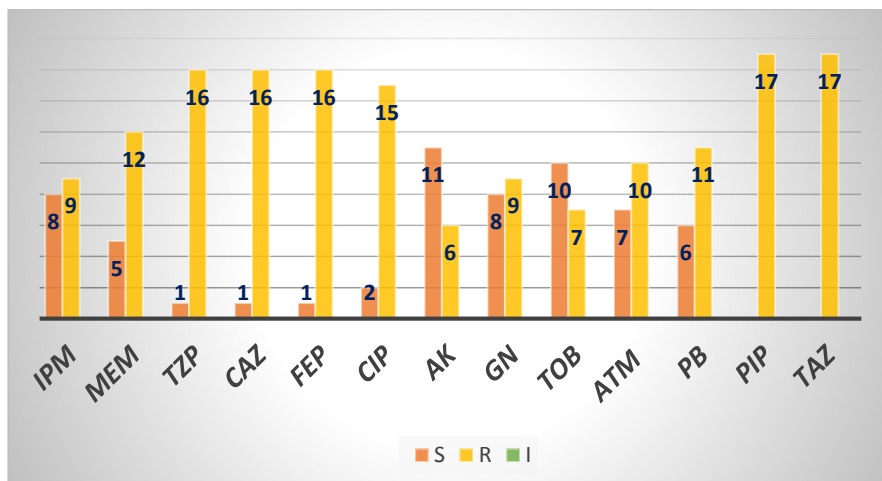


Fig. 6.19 Reprezentarea grafică a sensibilității bacteriene față de antibiotice la grupul A-1

Fig. 6.19 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics „ the group A-1

Au fost prelevate și testate microbiologic colecții purulente provenite de la câini cu abcese perianale.

Au fost izolate 25 de tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* cărora le-a fost testată sensibilitatea față de antibiotice (tabelul 6.16).

Toți câinii au glande perianale, ele sunt localizate de o parte și de alta a anusului.

În spatele glandelor se afla niște săculețe care secretă o substanță puternic mirositoare, cu ajutorul căreia câinii marchează teritoriul în momentul în care glandele perianale sunt înfundate, acestea sunt predispuse la infecție, caz în care se poate observa puroi cu sânge. În astfel de situații recomandăm recoltarea și identificarea agentului patogen înainte de a se administra antibiotice, pentru a se evita tratarea superficială și recidivele ce vor fi provocate prin instalarea mecanismelor de rezistență bacteriană.

Tabelul 6.16

Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de *P. aeruginosa* de origine animală izolate din abcese perianale

Table 6.16

The results obtained from the antibiotic of *P. aeruginosa* strains isolated from animal perianal abscess

Nr.	Origine izolat	Patologie de fond	IPM	MEM	TZP	CAZ	FEP	CIP	AK	GN	TOB	ATM	PB	PIP	TAZ
137	Câine	Abces perianal	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R
138	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R
141	Câine	Abces perianal	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
142	Câine	Abces perianal	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
145	Câine	Abces perianal	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
146	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R
147	Câine	Abces perianal	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R
158	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R
159	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
160	Câine	Abces perianal	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
161	Câine	Abces perianal	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
162	Câine	Abces perianal	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
163	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
164	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
165	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
166	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
167	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
168	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
169	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
170	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
171	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
172	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
173	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
174	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
175	Câine	Abces perianal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Din cele 25 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din colecțiile purulente, provenite de la animale cu abcese perianale (A-2), 36% dintre tulpini au fost rezistente la cele 13 antibiotice testate, 12% dintre tulpini au fost rezistente la 12 antibiotice, 24% tulpini au fost rezistente la 11 antibiotice, 8% tulpini au fost rezistente la 10 antibiotice, 8% tulpini au fost rezistente la 9 antibiotice, 8% dintre tulpini au fost rezistente la 8 antibiotice și 4% tulpini au fost rezistente la 5 antibiotice (fig. 6.20).

Din analiza acestor rezultate se observă faptul că, nici o tulpină de *Pseudomonas aeruginosa* nu a manifestat sensibilitate 100% la antibioticele testate.

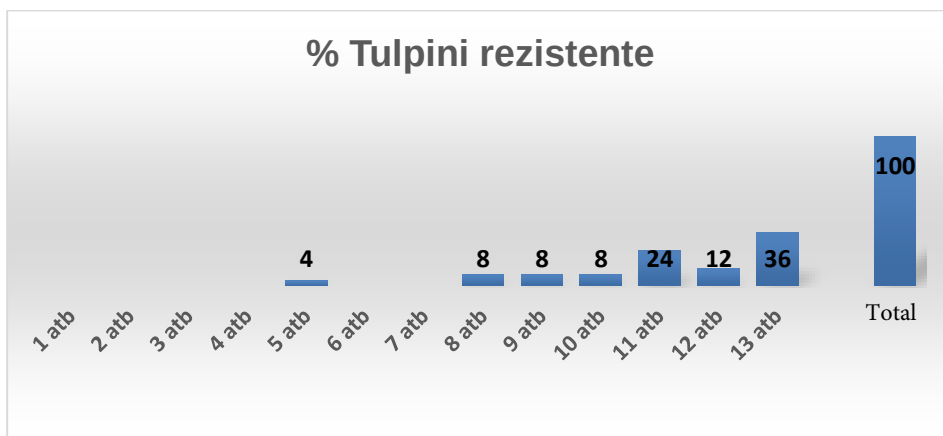


Fig. 6.20 Incidența rezistenței microbiene a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grupul A-2

Fig. 6.20 The incidence of microbial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains from the group A-2

Analiza comparată a sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grup A-2, în funcție de grupa de antibiotice, este prezentată în fig. 6.21.

Toate cele 25 tulpini testate au fost rezistente la TZP, CAZ, PIP și TAZ., 24 tulpini au fost rezistente la PB,FEP, 21 tulpini au fost rezistente la MEM, 20 tulpini au fost rezistente la CIP, 19 tulpini au fost rezistente la ATM, 17 tulpini au fost rezistente la IPM și AK și 14 tulpini au fost rezistente la TOB.

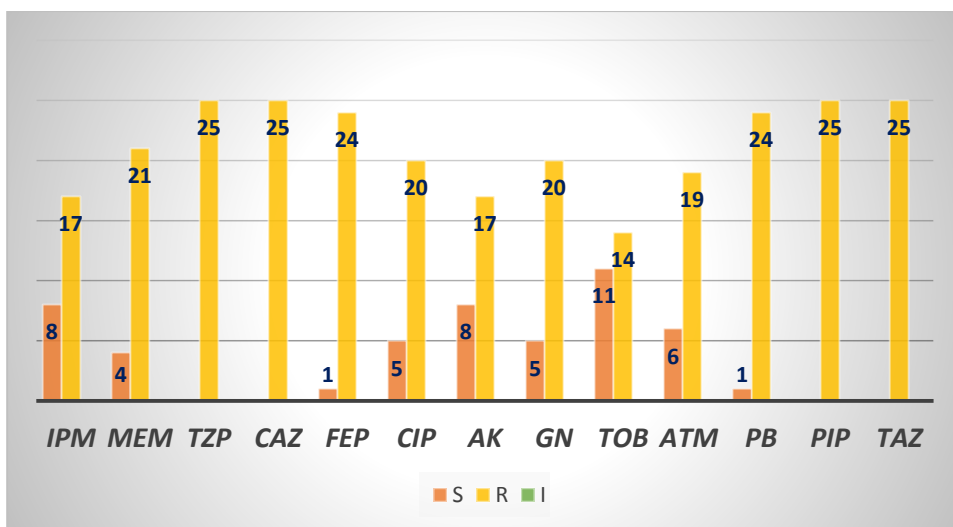


Fig. 6.21 Reprezentarea grafică a sensibilității bacteriene față de antibiotice la grupul A-2

Fig. 6.21 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics in group A-2

Investigațiile microbiologice, realizate pe hemoculturi prelevate de la diferite animale cu suspiciune de septicemie, au permis izolarea a 8 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* (tabelul 6.17).

Tabelul 6.17

Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de *P. aeruginosa* de origine animală izolate din septicemii, A – 3

Table 6.17

The results obtained from the antibiotic of *P. aeruginosa* strains isolated from animal sepsis, A – 3

Nr.	Origine izolat	Patologie de fond	IPM	MEM	TZP	CAZ	FEP	CIP	AK	GN	TOB	ATM	PB	PIP	TAZ
139	Câine	Septicemie	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
144	Câine	Septicemie	S	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R
151	Pisică	Septicemie	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R
136	Câine	Septicemie	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
149	Chinchi	Septicemie	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
150	Chinchi	Septicemie	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R
152	Chinchi	Septicemie	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
156	Chinchi	Septicemie	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R

La majoritatea antibioticelor, tulpinile testate au prezentat o sensibilitate redusă, fenomenul de rezistență fiind dominant și inductibil.

Din cele 8 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din hemoculturi, provenite de la animale cu septicemie (A-3), 25% dintre tulpini au fost rezistente la 12 antibiotice, 25% dintre tulpini au fost rezistente la 11 antibiotice, 25% tulpini au fost rezistente la 10 antibiotice, 12,5% tulpini au fost rezistente la 9 antibiotice și 12,5% tulpini au fost rezistente la 8 antibiotice (fig.6.22).

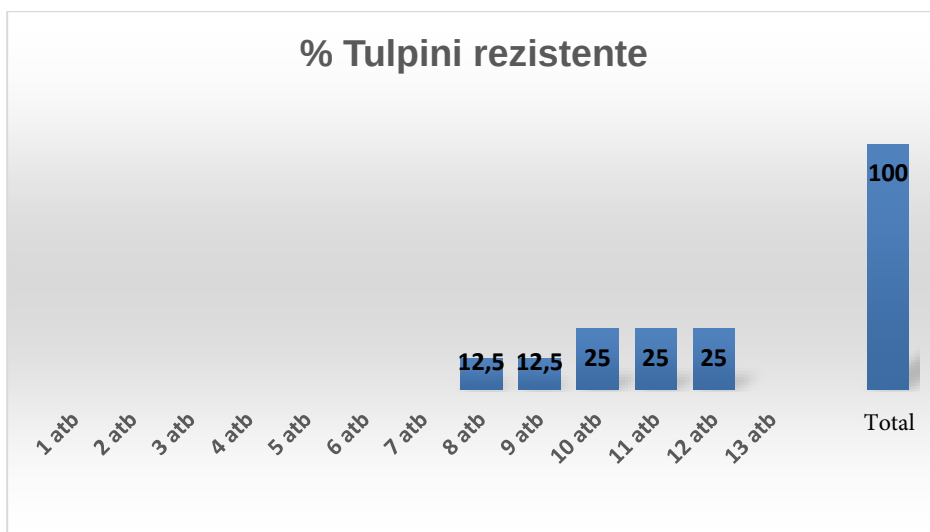


Fig. 6.22 Incidența rezistenței microbiene a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grupul A-3

Fig. 6.22 The incidence of microbial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains from the group A-3

Analiza comparată a sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grup A-3, în funcție de grupa de antibiotice, este prezentată în fig. 6.23. Toate cele 8 tulpini testate au fost rezistente la TZP, PIP, FEP, CAZ și TZP; 7 tulpini au fost rezistente la PB și ATM; 6 tulpini au fost rezistente la MEM; 5 tulpini au fost rezistente la CIP și IPM; 3 tulpini au fost rezistente la TOB și 2 tulpini au fost rezistente la AK.

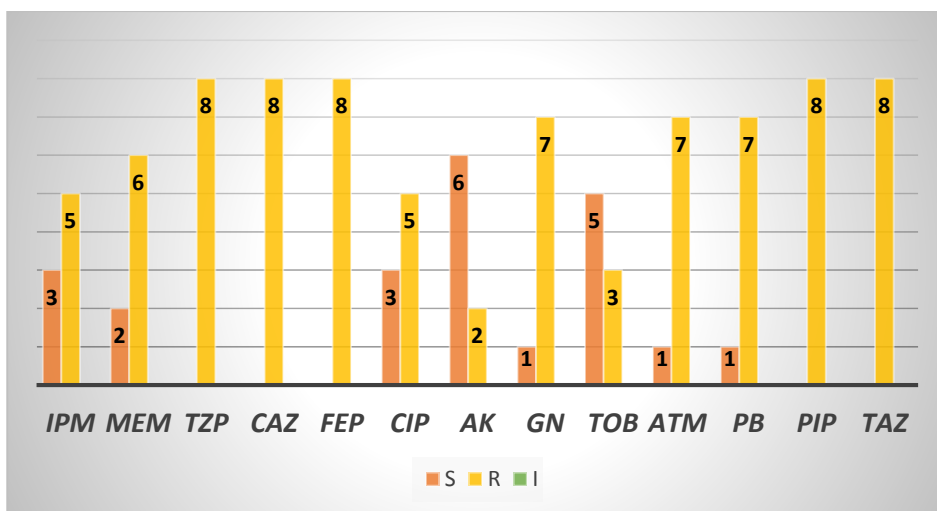


Fig. 6.23 Reprezentarea grafică a sensibilității bacteriene față de antibiotice, la grupul A-3

Fig. 6.23 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics in group A-3

În grupa A-4 au fost încadrate tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din secreții conjunctivale, provenite de la câini, pisici și iepuri (tabelul 6.18).

Tabelul 6.18

Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de *P. aeruginosa* de origine animală izolate din conjunctivite, A – 4

Table 6.18

The results obtained from the antibiotic of *P. aeruginosa* strains isolated from animal conjunctivitis, A – 4

Nr.	Origine izolat	Patologie de fond	IPM	MEM	TZP	CAZ	FEP	CIP	AK	GN	TOB	ATM	PB	PIP	TAZ
178	Pisică	Conjunctivită	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
143	Câine	Conjunctivită	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
176	Iepure	Conjunctivită	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
177	Pisică	Conjunctivită	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
179	Câine	Conjunctivită	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
180	Câine	Conjunctivită	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
181	Câine	Conjunctivită	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Majoritatea tulpinilor testate au prezentat rezistență multiplă față de majoritatea antibioticelor testate.

Din cele 7 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din secreții conjunctivale, provenite de la diferite specii de animale (A-4), 71,42% dintre tulpini au fost rezistente la toate antibioticele testate, 14,28% dintre tulpini au fost rezistente la 12 antibiotice și 14,28% tulpini au fost rezistente la 9 antibiotice, (fig.6. 22).



Fig. 6.24 Incidența rezistenței microbiene a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grupul A-4

Fig. 6.24 The incidence of microbial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains from the group A-4

Analiza comparată a sensibilității tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* din grup A-3, în funcție de grupa de antibiotice, este prezentată în fig. 6.25.

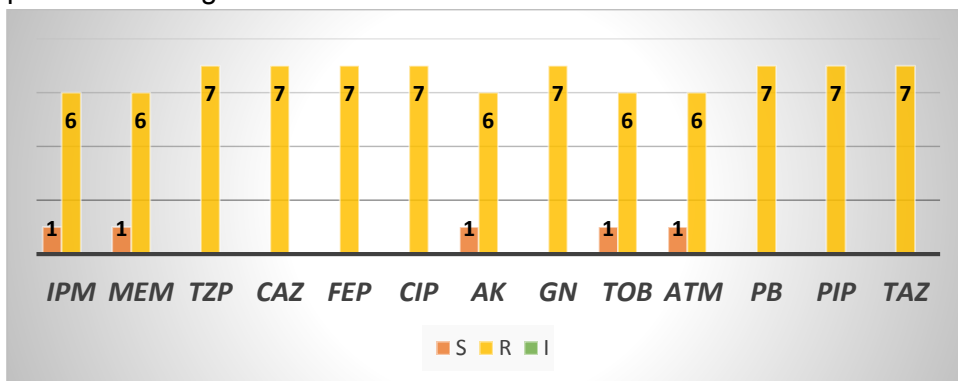


Fig. 6.25 Reprezentarea grafică a sensibilității bacteriene față de antibiotice la grupul A-4

Fig. 6.25 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics the group A-4

Toate cele 7 tulpini testate au fost rezistente la TZP, CAZ, FEP, CIP, GN, PB, PIP, TAZ și 6 tulpini au fost rezistente la TOB și ATM.

6.1.3. Concluzii parțiale

1. Toate tulpinile au fost testate față de cele 13 antibiotice care sunt uzual recomandate în patologia infecțioasă produsă de *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Din cele 19 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din aspirate bronșice de la pacienți umani (H-1), 5,27% dintre tulpini au fost simultan rezistente la toate cele 13 tulpini testate, 5,27% tulpini au fost rezistente la 10 antibiotice, 15,78% au fost rezistente la 4 antibiotice, 10,52% tulpini au fost rezistente la 3 antibiotice, 26,31% dintre tulpini au fost rezistente la două antibiotice, 21,05% au fost rezistente la un singur antibiotic. Un aspect pozitiv este faptul că 15,78% din tulpinile testate au manifestat sensibilitate față de toate antibioticele testate.

3. Din cele 19 tulpini testate la grupul H-1, 13 tulpini au fost rezistente la IPM, 10 tulpini au fost rezistente la MEM, 7 tulpini rezistente la FEP, 6 tulpini rezistente la CAZ, 5 tulpini au fost rezistente la GN, 4 tulpini au fost rezistente la TZP și ATM, 3 tulpini la TAZ, PIP, PB, TOB și 2 tulpini rezistente la CIP.

4. Din cele 15 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din aspirate gastrice (H-2), 6,66% sunt simultan rezistente la 11, 8, 7, 3, 2, 1 dintre antibioticele testate. 60% de tulpinile testate manifestă sensibilitate simultană la toate cele 13 antibiotice testate.

5. Din cele 15 tulpini izolate, din grupa H-2, 4 tulpini au manifestat rezistență la IPM, TZP, GN, 3 tulpini au manifestat rezistență la MEM, CAZ, FEP, CIP, 2 tulpini au manifestat rezistență la AK, TOB, ATM și câte o tulpină rezistentă la PIP și TAZ. Nu s-a izolat nici o tulpină multirezistentă față de antibioticele testate.

6. Din cele 12 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din lichide pleurale (H-3), 8,33% dintre tulpini sunt simultan rezistente la 9 antibiotice, 8,33% tulpini rezistente simultan la 3 antibiotice, 33,33% tulpini rezistente doar la 2 antibiotice și 25% dintre tulpini au manifestat rezistență la un singur antibiotic. De asemenea, 16,66% din cele 12 tulpini testate au fost sensibile la cele 13 antibiotice testate.

7. Din cele 12 tulpini testate la grupa H-3, 8 tulpini au fost rezistente la MEM, 5 tulpini au fost rezistente la IPM și GN, 3 tulpini rezistente la

TOB, 2 tulpini rezistente la TZP, FEP, CIP, AK și câte o tulpină rezistentă la PIP și TAZ.

8. Din cele 12 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din spută (H-4), 7,69% dintre tulpini sunt simultan rezistente față de 11 antibiotice, 23,07% tulpini sunt rezistente simultan față de 10 antibiotice, 15,34% tulpini sunt rezistente la 9 antibiotice, 15,34% tulpini sunt rezistente la 2 antibiotice și 7,69% dintre tulpini au manifestat rezistență la un singur antibiotic.

9. Din cele 12 tulpini testate la grupa H-4, 8 tulpini au fost rezistente la IPM, MEM; 7 tulpini au fost rezistente la GN; 5 tulpini rezistente la FEP, CIP, EK, TOB; 4 tulpini rezistente la TZP, CAZ; 3 tulpini au fost rezistente la ATM și câte o tulpină rezistentă la PIP și TAZ.

10. Din cele 15 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din spută (H-5), 20% dintre tulpini sunt simultan rezistente față de 11 antibiotice, 13,33% tulpini sunt rezistente simultan față de 10 antibiotice, 33,33% dintre tulpini au manifestat rezistență la un singur antibiotic.

11. Din cele 12 tulpini testate la grupa H-5, 6 tulpini au fost rezistente la MEM, FEP, AK, 5 tulpini au fost rezistente la CIP, IPM, GN, TOB, 4 tulpini au fost rezistente la PIP, TAZ, TZP, CAZ și câte o tulpină rezistentă la ATM și PB.

12. Din cele 25 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din secreții otice de la pacienții umani (H-6), 4% dintre tulpini sunt simultan rezistente față de 10 antibiotice și respectiv 8 antibiotice, 20% tulpini sunt rezistente simultan față de 3 antibiotice, 16% tulpini au fost rezistente la 2 antibiotice și 8% dintre tulpini au manifestat rezistență la un singur antibiotic.

13. Din cele 12 tulpini testate la grupa H-6, 7 tulpini au fost rezistente la MEM, 6 tulpini au fost rezistente la IPM, TZP, 5 tulpini au fost rezistente la CAZ, 4 tulpini au fost rezistente la FEP, 2 tulpini au fost rezistente la AK, GN și câte o tulpină rezistentă la ATM, PB, PIP, TAZ, TOB, CIP.

14. Din cele 26 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din colecții purulente (H-7), 3,84% dintre tulpini au fost rezistente la 13 antibiotice, 3,84% dintre tulpini au fost rezistente la 12 antibiotice, 7,69% tulpini au fost rezistente la 11 antibiotice, 11,53% tulpini au fost rezistente la 10 antibiotice, 7,69% tulpini au fost rezistente la 9 antibiotice, 3,84% dintre tulpini au fost rezistente la 8 antibiotice respectiv 7 antibiotice, 11,53% au fost rezistente la 3 antibiotice, 3,84% au fost

rezistente la 2 antibiotice și tot 3,84% au fost rezistente doar la un antibiotic.

15. Din cele 26 tulpini testate la grupa H-7, 14 tulpini au fost rezistente la FEP, 13 tulpini au fost rezistente la MEM, 12 tulpini au fost rezistente la CAZ, IPM, 11 tulpini au fost rezistente la GN, TZP, 10 tulpini au fost rezistente la CIP, TOB, 8 tulpini au fost rezistente la AK, ATM, 4 tulpini au fost rezistente la PIP, TAZ și 3 tulpini au fost rezistente la PB.

16. Din cele 17 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din secreții otice provenite de la animale (A-1), 11,76% dintre tulpini au fost rezistente la 13 antibiotice, 11,76% dintre tulpini au fost rezistente la 12 antibiotice, 17,64% tulpini au fost rezistente la 11 antibiotice, 11,76% tulpini au fost rezistente la 10 antibiotice, 11,76% tulpini au fost rezistente la 9 antibiotice, 17,64% dintre tulpini au fost rezistente la 8 antibiotice, 11,76% tulpini au fost rezistente la 7 antibiotice și 5,88% au fost rezistente la 2 antibiotice.

17. Din cele 26 tulpini testate la grupa A-1, 16 tulpini au fost rezistente la TZP, CAZ, FEP, 15 tulpini au fost rezistente la CIP, 12 tulpini au fost rezistente la MEM, 11 tulpini au fost rezistente la PB, 10 tulpini au fost rezistente la ATM, 9 tulpini au fost rezistente la GN și IPM, 7 tulpini au fost rezistente la TOB, 6 tulpini au fost rezistente la AK. Toate cele 17 tulpini testate au fost rezistente la PIP și TAZ.

18. Din cele 25 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din colecții purulente perianale provenite de la animale (A-2), 36% dintre tulpini au fost rezistente la cele 13 antibiotice testate, 12% dintre tulpini au fost rezistente la 12 antibiotice, 24% tulpini au fost rezistente la 11 antibiotice, 8% tulpini au fost rezistente la 10 antibiotice, 8% tulpini au fost rezistente la 9 antibiotice, 8% dintre tulpini au fost rezistente la 8 antibiotice și 4% tulpini au fost rezistente la 5 antibiotice.

19. Din cele 25 tulpini testate la grupa A-2, 24 tulpini au fost rezistente la PB, FEP, 21 tulpini au fost rezistente la MEM, 20 tulpini au fost rezistente la CIP, 19 tulpini au fost rezistente la ATM, 17 tulpini au fost rezistente la IPM, AK și 14 tulpini au fost rezistente la K. Toate tulpinile au fost rezistente la TZP, CAZ, PIP și TAZ.

20. Din cele 8 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din hemoculturi provenite de la animale (A-3), 25% dintre tulpini au fost rezistente la 12 antibiotice, 25% dintre tulpini au fost rezistente la 11 antibiotice, 25% tulpini au fost rezistente la 10 antibiotice, 12,5% tulpini au fost rezistente la 9 antibiotice și 12,5% tulpini au fost rezistente la 8 antibiotice.

21. Din cele 8 tulpini testate la grupa A-3, 7 tulpini au fost rezistente la PB și ATM, 6 tulpini au fost rezistente la MEM, 5 tulpini au fost rezistente la CIP și IPM, 3 tulpini au fost rezistente la TOB și 2 tulpini au fost rezistente la AK. Toate cele 8 tulpini testate au fost rezistente la TZP, PIP, FEP, CAZ și TZP

22. Din cele 7 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din secreții conjunctivale, provenite de la animale (A-4), 71,42% dintre tulpini au fost rezistente la toate antibioticele testate, 14,28% dintre tulpini au fost rezistente la 12 antibiotice și 14,28% tulpini au fost rezistente la 9 antibiotice.

23. Din cele 7 tulpini testate la grupa (A-4), 6 tulpini au fost rezistente la TOB și ATM. Toate cele 7 tulpini testate au fost rezistente la TZP, CAZ, FEP, CIP, GN, PB, PIP, TAM.

6.2. TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE A TULPINILOR DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PRODUCĂTOARE DE ESBL ȘI MBL

6.2.1. Material și metodă

Scopul acestui studiu a constat în stabilirea prevalenței și a sensibilității la unele antibiotice a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* ESBL și MBL.

Lotul de studiu a fost constituit din 125 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană și 57 tulpini de origine animală izolate din urină, spută, secreții traheale, plăgi și hemoculturi.

Investigațiile microbiologice au realizate în laboratorul de specialitate dintr-un spital din județul Iași și în laboratorul de Microbiologie al FMV Iași.

6.2.1.1. Identificarea tulpinilor producătoare de ESBL

Identificarea fenotipică a tulpinilor producătoare de ESBL s-a realizat prin metoda difuzimetrică.

ESBL (*Extended Spectrum Beta Lactamase* = *Beta Lactamaze cu Spectru Larg*) sunt sintetizate de majoritatea enterobacteriilor. Prezența lor este detectată cel mai adesea prin tehnica antibiogramei. Detecția tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* producătoare de ESBL se bazează pe testul de sinergie (dop de șampanie) realizat între un disc de

cefalosporină din generația a-III-a și/sau monobactam și un disc de amoxicilină+ acid clavulanic.

Secreția de ESBL va fi suspectată mai întâi de micșorarea diametrelor de inhibiție la cefalosporinele de generația a-III-a: cefotaxim(CTX) < 27mm; ceftazidim (CAZ) < 22 mm; monobactami-aztreonam (ATM) < 27mm. O tulpină de referință trebuie testată în aceleași condiții, în scopul verificării validității discurilor de antibiotice. Prezența betalactamazelor indică faptul că tulpina este rezistentă la toate β -lactamicele, cu excepția imipenemului și a cefamicinei (Mihăescu Gr., 2007).

Brilliance ESBL Agar

Brilliance ESBL Agar sunt plăci cu mediu cromogen de screening pentru tulpinile care produc beta – lactamase cu spectru extins.

Mediul prevede identificarea prezumtivă a tulpinilor potențial producătoare de enzime de tip ESBL de *Enterobacteriaceae* direct din probele clinice.

Timpul pentru identificarea prezumtivă a ESBL într-un lot de testat este de 24 de ore, ceea ce constituie un avantaj, față de timpul necesar prin identificarea după protocoalele clasice (48-72h).

Este o metodă convenabilă și ușor de utilizat care poate face o diferențiere clară între tulpinile de *E. coli*, *P. aeruginosa* și KESC (*Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Citrobacter*), inoculate direct din proba recoltată sau din suspensia bacteriană .

Este un mediu selectiv în care este inclus Cefpodoxime, un marker bine cunoscut pentru producția de ESBL, fiind prezentă o rezistență mediată, inhibând majoritatea tulpinilor non-ESBL *Enterobacteriaceae*.

Are o incidență redusă a rezultatelor fals-pozitive comparativ cu testele fenotipice tradiționale care se utilizează în laboratoare în scop de cercetare, reducând ulterioarele teste de confirmare a tulpinilor ESBL. Identificarea prezumtivă și precoce a ESBL permite un tratament adecvat pacienților precum și procedurile de control al infecțiilor depistate în mediul spitalicesc.

În studiul nostru, în scopul cercetării coloniile oxidază pozitiv au fost izolate și identificate, pentru a se evalua dacă tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* se dezvoltă pe acest mediu cromogen specific *Enterobacteriaceaelor*.

În general, aspectul și culoarea diferitelor colonii de bacterii nonfermentative observate la bacteriile oxidază pozitiv este de brun

roșcat, majoritatea tulpinilor de *P. aeruginosa* din studiul nostru a prezentat acest aspect la 24 h de la inoculare, reflectând astfel prezența legată de piocianină/pigmentare (fig. 6.26) (Te-Din Huang și colab., 2010).

Brilliance ESBL agar s-a dovedit a fi util pentru detectarea tulpinilor ESBL produse de *P.aeruginosa*, obținându-se un rezultat în 24 de ore.

Brilliance ESBL agar poate fi o metodă de screening ce permite excluderea rapidă a pacienților care nu transportă bacterii producătoare de ESBL.



Fig. 6.26 Cultură de *Pseudomonas aeruginosa* pe mediu Brilliance ESBL Agar la 24 h de la incubare (original)

Fig. 6.26 Culture of *Pseudomonas aeruginosa* Brilliance ESBL agar medium at 24 hours of incubation (original)

Testul de sinergie între două comprimate pentru detectarea ESBL

Pe o placă cu mediu Mueller-Hinton am inoculat tulpina de testat (cultură de 24 h, însămânțată pe placă prin tehnica tamponului), am aplicat un disc cu amoxicilină+acid clavulanic în mijlocul plăcii, de o parte și de alta a discului cu AMC, la o distanță de 20 – 25 de mm am aplicat un disc cu ceftazidim și de cealaltă parte un disc cu cefotaxim.

Păcile au fost incubate timp de 24 h la 37 °C.

Producerea de ESBL este confirmată dacă diametrul zonei de inhibiție a cefalosporinelor este extins spre zona clavulanatului (fig. 6.27 a, b ,c, d).

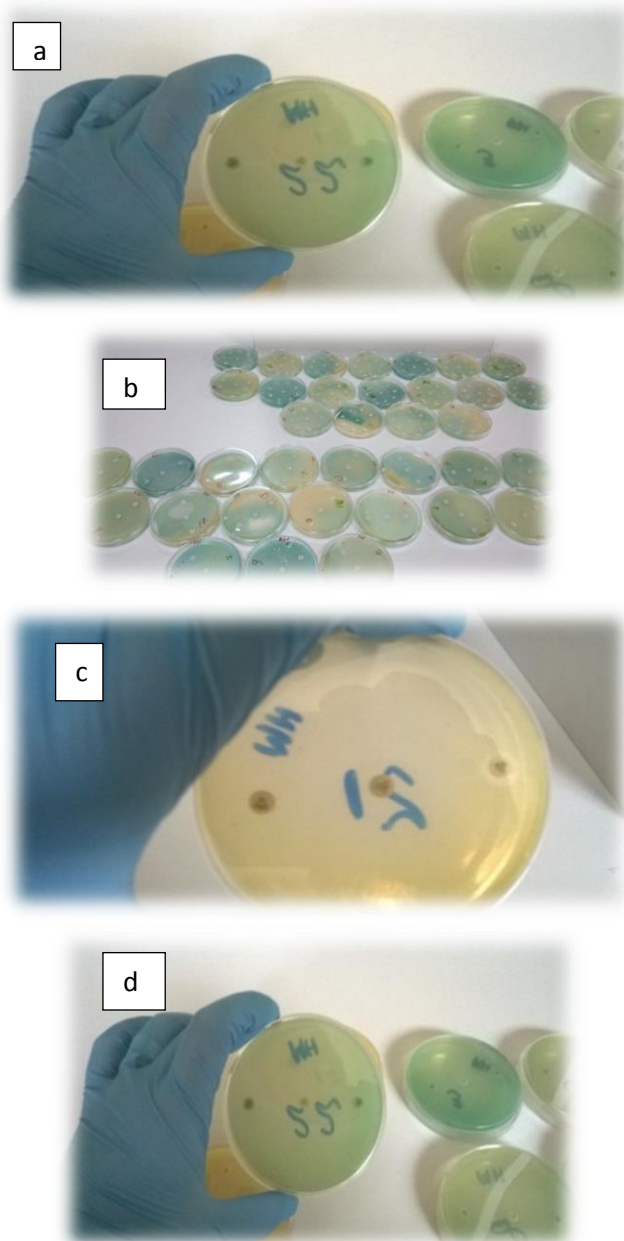


Fig. 6.27 Testul de sinergie între două comprimate pentru detectarea ESBL (original)

Fig. 6.27 Synergy between the two tablets test for detecting ESBL (original)

Metoda discurilor

Această metodă presupune folosirea unor discuri de cefalosporine simple și a unor discuri de cefalosporine potențate cu acid clavulanic.

Pentru interpretare se compară diferența dintre diametrele zonelor de inhibiție.

Creșterea diametrului de inhibiție de >5 mm în prezența clavulanatului indică producția de ESBL (fig. 6.28) Aceste teste sunt ieftine și nu necesită o spațiere exactă a discurilor.



Fig. 6.28 Metoda discurilor cu cefalosporine simple și potențate cu acid clavulanic(original) – prima etapă

Fig 6.28 Cephalosporins simple method discs and enhanced with clavulanic acid (original) – first step

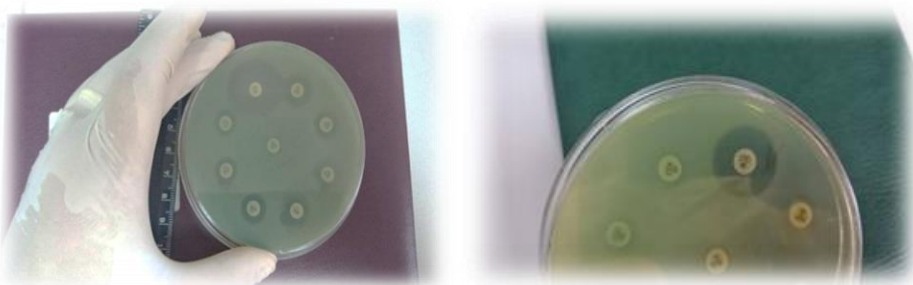


Fig. 6.28 Metoda discurilor cu cefalosporine simple și potențate cu acid clavulanic (original) – a 2 a etapă

Fig 6.28 Cephalosporins simple method discs and enhanced with clavulanic acid (original) – second step

6.2.1.2. Identificarea tulpinilor producătoare de MBL

Metalo-betalactamazele reprezintă beta-lactamazele din clasa B, care au 4 atomi de zinc (Ambler R.,1980). Emergența MBL accentuează

nevoia controlului riguros al prescrierii carbapenemelor, în timp ce creșterea rezistenței la cefalosporine și fluorochinolone impune utilizarea carbapenemelor.

Pe o placă cu agar MH se inoculează suspensie din cultură de 24 h, se face diluție 0,5 MF, apoi la o distanță convenabilă (15 mm – 20 mm) se vor aplica microdiscurile de testat, fiind o metodă prin antibiogramă difuzimetrică (Ciocan O. și colab., 2015).

Cu ajutorul acestor metode se testează tulpinile care prezintă rezistență la carbapeneme (fig. 6.29).

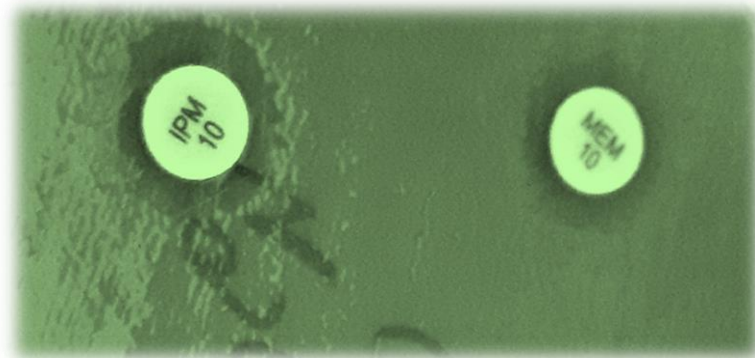


Fig. 6.29 Tulpină de *P. aeruginosa* cu rezistență la carbapeneme.

Fig. 6.29 Strain of *P. aeruginosa* resistance to carbapenems

Metalo- β -lactamazele constituie o amenințare clinică serioasă, deoarece: compromis eficiența carbapenemelor, antibiotice cu spectru larg, folosite de obicei ca ultimă resursă terapeutică, ele sunt rezistente la acțiunea inhibitorilor de β -lactamază, sunt codificate de un aparat genetic foarte mobil, de aceea o identificare timpurie a bacteriilor care produc acest tip de enzime este vitală, pentru identificarea și determinarea fenotipică a izolatelor potențial producătoare de MBL se folosesc în special teste rapide, medii de cultură cromogene, benzile Etest MBL, dar și metode bazate pe antibiograma difuzimetrică.

Brilliance CRE AGAR

CRE Agar (depistarea precoce a enterobacteriaceelor rezistente la carbapeneme) presupune o identificare cromogenică prezumtivă a tulpinilor izolate rezistente la carbapeneme, direct din prelevatele clinice, timpul necesar de testare fiind de 18 ore.

Brilliance CRE Agar ajută la detectarea pacienților colonizați-CRE. Mediul conține o cantitate de carbapeneme la un nivel modificat ce este recomandat atât de EUCAST cât și de CLSI, asigurând rezultate

fiabile, în urma testării lui pe o largă varietate de organisme rezistente la carbapeneme, inclusiv New Delhi Mettalo β -lactamază -1 (NDM-1).

Plăcile sunt incubate la 37 ° C și asigură o sensibilitate și specificitate ridicată cu rezultate disponibile în doar 18-24 de ore (fig. 6.30 a și b: prima și a doua etapă).



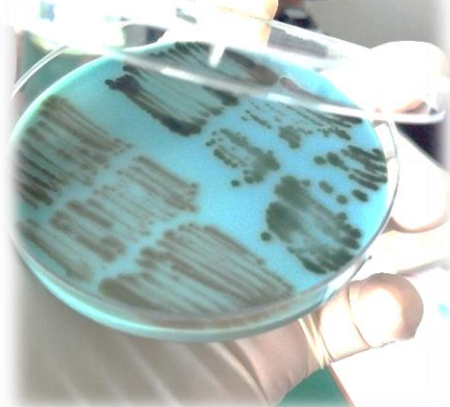
Fig.6.30a Brilliance Agar CRE inoculat direct cu probă de urină (original) – prima etapă

Fig. 6.30a Brilliance CRE Agar inoculated directly with the urine sample (original) – first step



Fig.6.30b Brilliance Agar CRE inoculat direct cu probă de urină (original) – a 2 a etapă

Fig. 6.30b Brilliance CRE Agar inoculated directly with the urine sample (original) – second step



Brilliance Agar CRE poate fi inoculat direct din tampoane rectale de screening, probe de fecale sau dintr-o colonie izolată preparată sub formă de suspensie lichidă, 0,5 McFarland turbiditate.

Mediul trebuie lăsat să se încălzească la temperatura camerei înainte de inoculare. Se incubează timp de 18-24 ore la 37 ° C, plăcile negative trebuie re-incubate timp de încă 24 de ore, coloniile roz pal sunt prezumtiv pozitive pentru rezistența la carbapeneme, coloniile cafenii cu un halogen maro prin reacția triptofan dezaminazei (TDA) sunt considerate rezistente la carbapeneme și pot produce enzime de tip MBL.

Rezultatele noastre indică faptul că Brilliance CRE Agar permite creșterea și dezvoltarea tulpinilor rezistente la carbapeneme, cu limite de detecție scăzute și poate reprezenta un mediu util de screening pentru bacteriile non-fermentative G - rezistente la carbapeneme.

Metoda discului combinat Imipenem – EDTA pentru metalo-β-lactamaze (MBL)

Metallo-β-lactamazele, având Zn^{2+} în centrul active, sunt inhibitate de chelatorii de metale precum acidul etilendiamintetraacetic (EDTA) (Yong și col., 2002). S-au testat doar tulpinile rezistente la imipenem.

Materiale folosite:

- Tulpinile de testat în cultură pură;
- Plăci cu agar Mueller-Hinton (Oxoid, Marea Britanie);
- Discuri cu imipenem de 10 μg (Oxoid, Marea Britanie);
- Pulbere de EDTA;
- Ser fiziologic steril;
- Tampoane de recoltare sterile;
- Standard de 0,5 McFarland.

Protocol de lucru:

S-a preparat o soluție de EDTA dizolvând 186,1 g de EDTA în 1000 ml de apă distilată, s-a ajustat pH la 8 cu NaOH și s-a sterilizat-o la autoclave la 121⁰ C, 15 minute;

Tulpina de testat s-a însămânțat pe agar Mueller-Hinton, utilizând aceeași tehnică pentru antibiograma difuzimetrică;

S-a plasat la distanță convenabilă 2 discuri de imipenem 10 μg, peste unul din ele s-a adăugat 5 μl din soluția de EDTA;

După incubarea peste 37°C s-a măsurat și comparat diametrele zonelor de inhibiție apărute în jurul celor 2 discuri. Criteriile de pozitivitate au fost următoarele: creșterea diametrului zonei de inhibiție în prezența EDTA cu cel puțin 5 mm (fig. 6.31.)

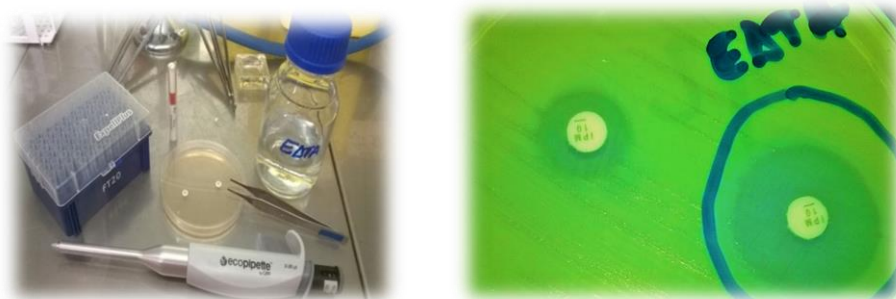


Fig. 6.31 Metoda discului combinat Imipenem – EDTA pentru screening MBL

Fig. 6.31 Combined disc method imipenem - EDTA screening for MBL

Această metodă se mai poate realiza și cu ajutorul discului de IMP + EDTA ea presupune compararea diametrelor zonelor de inhibiție date de discul simplu de IMP și de cel care conține un inhibitor MBL respectiv EDTA (fig. 6.32).

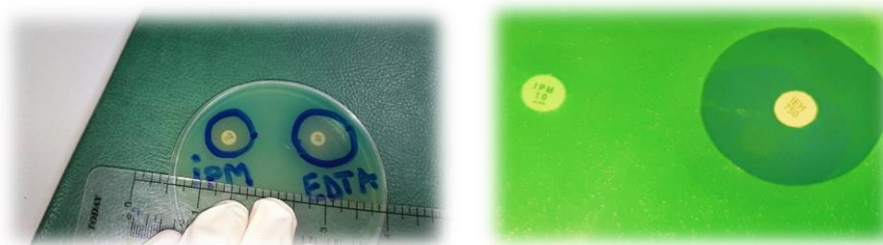


Fig. 6.32 Cultură de *P. aeruginosa* testată cu discul simplu de IMP și de cel care conține un inhibitor MBL respectiv EDTA

Fig. 6.32 Culture of *P. aeruginosa* tested IMP and simple disc containing an inhibitor of the MBL that EDTA

E-test MBL

Etest-MBL constă din benzi de plastic sau hârtie impregnate cu un gradient de concentrații de imipenem la un capăt și imipenem+EDTA la celălalt (fig. 6.33).

Testul se bazează pe inhibiția MBL de către chelatorul de zinc EDTA. Testul este considerat pozitiv dacă raportul dintre imipenem și imipenem + EDTA este ≥ 5 (Walsh și col., 2002).



Fig. 6.33 E-test MBL

Fig. 6.33 E-test MBL

6.2.2. Rezultate și discuții

Utilizarea mediului de cultură Briliance ESBL a permis creșterea și multiplicarea a 68% din tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană și 100% tulpinile de origine animală.

În urma testului de sinergie între două comprimate pentru detectarea ESBL lotul de tulpini testat nu a prezentat zone de inhibiție sugestive/relevante pentru identificarea tulpinilor de ESBL, respectiv creșterea zonei de inhibiție în jurul antibioticului potențat cu inhibitor β -lactamază.

Prin metoda discurilor combinate (Oxoid/Becton Dickinson - "Combination Discs" și Mast "MAST DD") s-a evidențiat o creștere a diametrului de inhibiție cu > 5 mm în prezența clavulanatului, ceea ce indică prezența de ESBL.

Metoda discului combinat imipenem-EDTA pentru depistarea metalo- β -lactamazelor, aplicată doar pe tulpinile care au fost rezistente la imipenem (52 tulpini de origine umană și 37 de origine animală) a surprins prin faptul că toate aceste tulpini elaborează enzime metalo-betalactamaze.

Pentru susținerea rezultatului, aceleași tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, au fost testate și cu E-test MBL.

Rezultatele au confirmat faptul că cele 89 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, testate pentru metalo-betalactamaze, au fost pozitive la acest test.

Carbapenemele (imipenem, meropenem, ertapenem și doripenem) sunt antibiotice de neprețuit în tratamentul infecțiilor cu bacterii gram-negative multi-rezistente.

Apariția și difuzarea de bacterii rezistente la carbapeneme reprezintă o amenințare considerabilă pentru îngrijirea pacienților, depistarea precoce a tulpinilor de *P. aeruginosa* rezistente la carbapeneme, va permite punerea în aplicare mai rapid a unor strategii adecvate pentru tratarea pacienților și a limita răspândirea acestor agenți patogeni.

6.2.3. Concluzii parțiale

1. Testului de sinergie între două comprimate este o metodă ieftină iar interpretarea este dificilă.
2. Brilliance Agar CRE permite o depistare precoce a tulpinilor de *P. aeruginosa* rezistente la carbapeneme ce pot produce enzime de tip MBL, de aceea poate fi folosită ca și metodă rapidă de identificare a tulpinilor producătoare de MBL.
3. Pentru identificarea tulpinilor producătoare de MBL cu ajutorul metodei discurilor combinate s-a folosit 2 tipuri de testare cu același principiu, respectiv folosirea chelatorului de zinc EDTA pentru inhibiția MBL,
4. Pentru a se verifica acuratețea mediului cromogen CRE s-a făcut testarea tulpinilor în paralel cu celelalte metode pentru a se urmări specificitatea testelor și pentru a verifica prezența unor posibile erori, în studiul nostru tulpinile inoculate pe acest mediu care au fost pozitive au răspuns tot pozitiv și la celelalte testări.
5. Rezultatele noastre indică faptul că Brilliance CRE Agar permite creșterea și dezvoltarea tulpinilor rezistente la carbapeneme, cu limite de detecție scăzute și poate reprezenta un mediu util de screening pentru bacteriile non-fermentative G - rezistente la carbapeneme.

7. SUPRAVEGHEREA EPIDEMIOLOGICĂ A TULPINILOR DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

7. EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE METHODS *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* INFECTION

Supravegherea epidemiologică este o activitate sistematică de continuă colectare, analiză, prelucrare și interpretare a datelor necesare pentru identificarea și cunoașterea frecvenței infecțiilor nosocomiale precum și pentru determinarea factorilor de risc. Toate datele obținute se utilizează pentru elaborarea, planificarea și implementarea acțiunilor de prevenire a transmiterii microorganismelor multidrogrezistente.

Tipizarea prin diferite metode se practică la toate grupările sau speciile de interes epidemiologic major. Cele mai utilizate metode de tipizare sunt: tipizarea serologică, tipizarea biochimică (biotiparea), tipizarea cu bacteriofagi (lizotiparea), tipizarea cu antibiotice (antibiotiparea).

Antibiotiparea este o metodă sensibilă bazată pe stabilirea filiațiunii tulpinilor microbiene testate dintr-un focar (areal). Metodele moleculare sunt utilizate tot mai frecvent în supravegherea epidemiologică, bazându-se pe tipizarea plasmidică, tipizarea ribotipului, detectarea tipului de PFGE (pulsed *field gel electrophoresis*= electroforeză în câmp pulsatil).

7.1. ANTIBIOTIPAREA TULPINILOR DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DE ORIGINE UMANĂ ȘI ANIMALĂ

Toate izolatele au fost testate pentru a se stabili sensibilitate antimicrobiană cu ajutorul metodei Kirby-Bauer pe Mueller-Hinton agar, rezultatele au fost interpretate conform Institutului de Standarde Clinice și de Laborator 2015 (CLSI).

Antibiotiparea izolatelor s-a realizat cu programul UPGMA/Quantity One Software (Bio – Rad Laboratories, SUA), lotul studiat a fost împărțit 2 grupuri, primul cuprinzând 125 tulpini de origine umană și 57

tulpini de origine animală. Conform acestor rezultate; 57 de tulpini de origine animală izolate au fost colectate în 4 grupe principale (A1-A4) pe bază de 70% similitudini. Pe de altă parte, 125 izolatele umane au fost colectate în 7 grupe principale (H1-H7) la 70% similitudine.

7.1.1. Material și metodă

UPGMA – Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (construcție filogenetică) această comandă este utilizată pentru a construi un copac UPGMA.

Această metodă de luare a arborelui presupune că rata de evoluție a rămas constantă de-a lungul istoriei evolutive a taxonilor incluși. Prin urmare, ea produce un copac cu rădăcini. Se utilizează acest program pentru a se crea dendrograme de la (a) seturi de variabile, (b) matricea de similaritate sau (c) matricea de distanță.

Software-ul calculează matricea de similaritate (numai pentru opțiunea a), se transformă în similaritate și distanțele.

Coeficienții de similitudine se fac prin grupare folosind metoda neponderată, formând pereche de grup cu ajutorul mediei aritmetice (UPGMA).

Pentru opțiunile (b) și (c) construcția de dendrograme cu similitudine trebuie să fie implementate matricele de similaritate sau distanța de matrice.

Este cel mai simplu algoritm de construcție a unui arbore filogenetic, fiind similar algoritmilor aglomerativi de clustering, calculează distanțele dintre clustere folosind media distanțelor

O colecție de 125 izolate de *P. aeruginosa* au fost recoltate de la pacienții internați într-un spitalul clinic din și 57 de izolate de origine animală în Laboratorul de Microbiologie al FMV Iași pe parcursul anilor 2013 – 2015.

Toate tulpinile au fost izolate din procese patologice și doar acestea au fost incluse în studiu. Identificarea și confirmarea bacteriană a fost efectuată prin teste biochimice standard folosindu-se RapID NF Plus (Oxoid) și API 20 NE.

Identificarea s-a bazat și pe morfologia coloniilor, colorația Gram, producția de pigment și creșterea la 42°C. Izolatele identificate ca fiind rezistente la carbapeneme au fost investigate în conformitate cu obiectivele studiului.

7.1.2. Rezultate și discuții

Antibiotiparea grupului de tulpini de origine umană

Puterea discriminatorie (D) este probabilitatea medie ca sistemul de tastare va atribui un tip diferit de cele două tulpini care nu au legătură în eșantion aleatoriu din populația microbiană a unui anumit taxon.

Acest program a fost creat pentru a ajuta la calcularea acestui parametru.

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S x_j(x_j - 1)$$

Acolo unde D este indicele de discriminare, N este numărul de tulpini testate, S este numărul de diferite tipuri și x_j – numărul de tulpini care aparțin tipului j th, presupunând că tulpinile vor fi clasificate în categorii care se exclud reciproc.

Astfel, o valoare de 1.0 a D-ului ar indica faptul ca o metoda de tipizare a fost capabilă să distingă fiecare membru al populației tulpinilor dintre toți membrii ai acelei populații.

Pe de alta parte, un indice de 0.0 ar indica faptul că toți membrii populației au fost “identici”, nu au fost identificate diferențe ce pot ”urmări” un tipar. Un indice de 0.5 ar însemna că în cazul în care o tulpină a fost aleasă la întâmplare dintr-o populație de tulpini, atunci ar trebui să existe o probabilitate de 50% ca următoarea tulpină aleasă randomizat să fie imposibil de distins față de prima (Hunter P. 1990).

Tabelul 7.1

Factorul de discriminare pentru loturile de origine umană

Table 7.1

Discrimination factor for lots of human origin

GRUP ANALIZAT	ANTIBIOTIPARE	RAPD
H1	0,9474	0,9649
H2	0,8952	0,9905
H3	0,9242	0,9697
H4	1	1
H5	1	0,9905
H6	1	0,9767
H7	1	0,9815

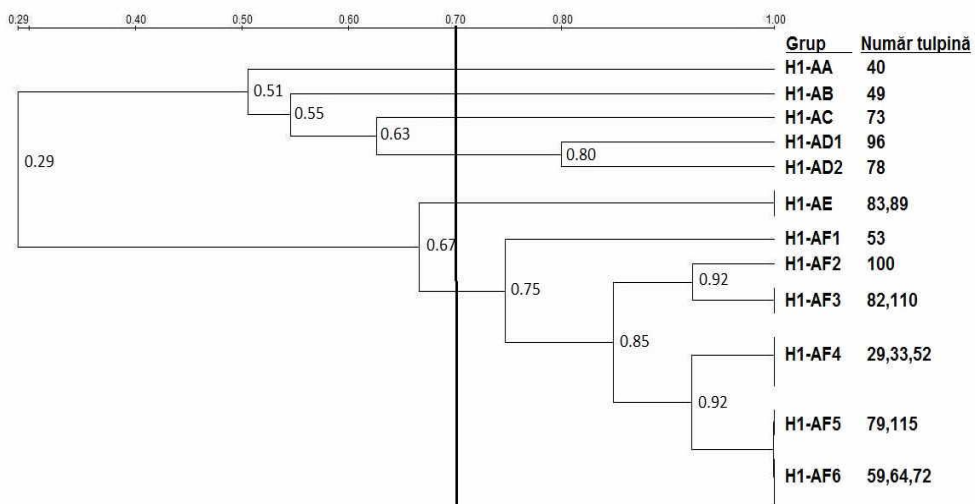
H – 1

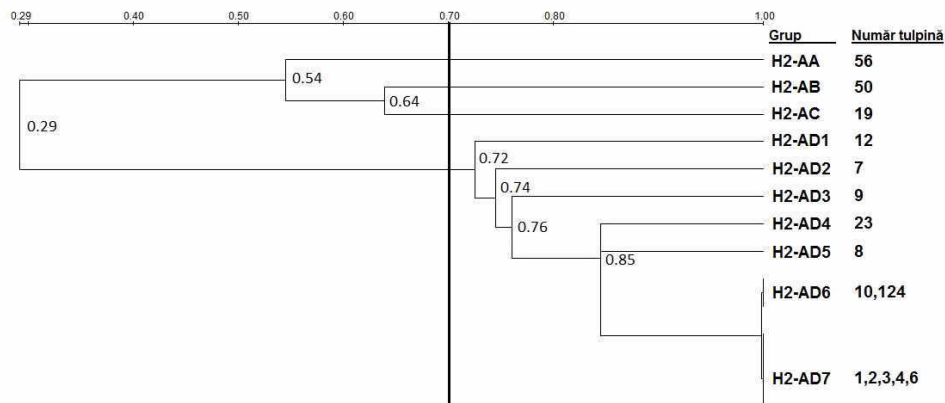
Fig. 7.1 Antibiotiparea grupului H – 1 de *P. aeruginosa* de origine umană
Fig. 7.1 Antibiotyping Group H - 1 *P. aeruginosa* of human origin

Grupul 1 de origine umană este alcătuit din 19 tulpini de *P. aeruginosa* izolate din aspirate bronșice. În urma introducerii rezultatelor la antibiogramă în softul UPGMA pentru a se efectua antibiotiparea sau tipizarea tulpinilor pentru a se verifica existența unui tipar și existența similitudinii din acel tipar a rezultat dendograma din fig. 7.1, de unde rezultă ca acest grup este format din 12 tipuri de profile, punându-se în evidență 2 cluster și 4 profile de tip unic.

Primul cluster este alcătuit din H1 – AD1 și H1 – AD2, respectiv tulpinile 96 și 78, ambele tulpini au fost izolate de la pacienți cu o patologie a aparatului respirator, având în istoricul medicației administrarea pe o perioadă lungă de timp (peste 21 de zile) a antibioticelor.

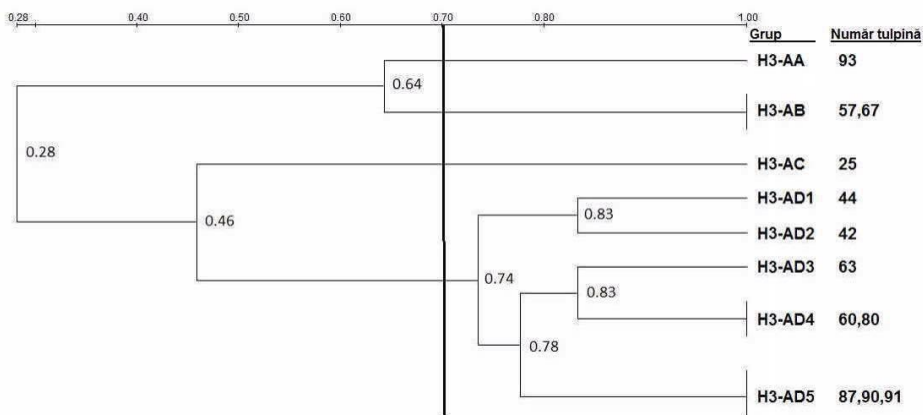
Gradul de similitudine în acest cluster este de 0,80, evidențiind o asociere înaltă a profilurilor identificate la antibiogramă.

Al 2 lea cluster, cel ce predomină grupul, este format din 6 tipuri de profile, cu variații ale coeficientului de similitudine, de la 0,75 la 0,92. Similar primului cluster pacienții au în istoric administrarea antibioticelor ca și terapie.

H – 2**Fig. 7.2 Antibiotiparea grupului H – 2 de *P. aeruginosa* de origine umană****Fig. 7.2 Antibiotyping Group H - 2 *P. aeruginosa* of human origin**

Tulpinile analizate provin din aspirate gastrice, ele au fost supuse testării aceluiași panel de antibiotice, respectiv: IPM, MEM, TZP, CAZ, FEP, CIP, AK, GN, TOB, ATM, PB, PIP și TAZ. Acest grup este alcătuit din 10 tipuri de profile din care 3 sunt de tip unic (fig.7.2).

În interiorul dendogramei se poate observa existența unui singur cluster ce cuprinde 7 tipuri de profile cu grade diferite de similitudine, de la 0,72 la 0,85. Gradul de similitudine a clusterului este de 0,72, depășind astfel pragul de 0,70, această valoare indică faptul că metoda de tipizare a fost capabilă să distingă fiecare tulpină din acest cluster.

H – 3**Fig. 7.3 Antibiotiparea grupului H – 3 de *P. aeruginosa* de origine umană****Fig. 7.3 Antibiotyping Group H - 3 *P. aeruginosa* of human origin**

Izolatele analizate provin din lichide peritoneale. Acest grup cuprinde un singur cluster cu 5 tipuri de profile și 3 de tip unic (fig.7.3). Clusterul are 0,74 gradul de similitudine, în interiorul lui ajungându-se și până la 0,83 la tulpinile H4 – AD1 și H4 – AD2, ambele izolate prezentând rezistență la MEM, patologiiile de fond și istoricul antibioterapiei ale pacienților sunt diferite.

H – 4

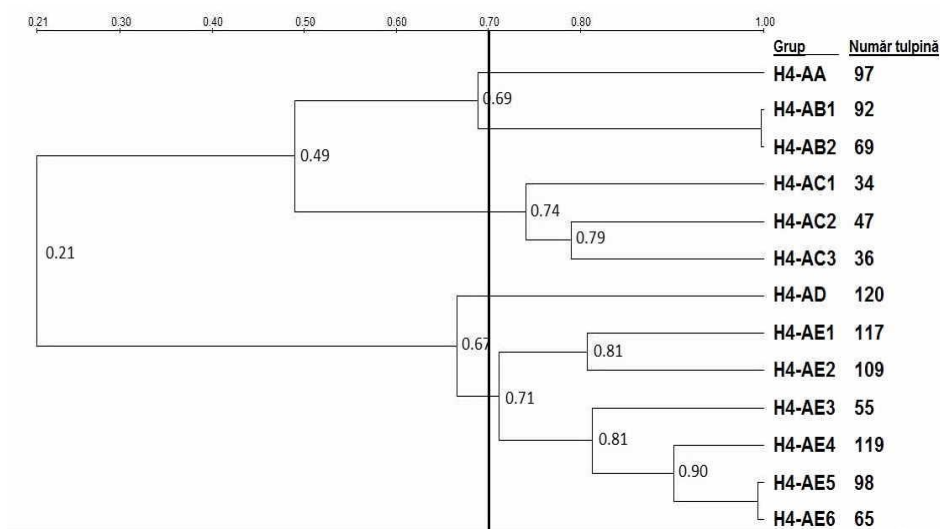


Fig. 7.4 Antibiotiparea grupului H – 4 de *P. aeruginosa* de origine umană
Fig. 7.4 Antibiotyping Group H - 4 *P. aeruginosa* of human origin

Grupul 4 este format din tulpini ce provin din probe de spută. Dendograma pune în evidență 2 clusterse cu 13 tipuri de profile, din care 3 sunt de tip unic (fig.7.4).

Primul cluster are grad de similitudine de 0,74, este format din 3 tipuri de profile, cu grade de similitudine de la 0,74 la 0,79, respectiv la tulpinile 47 și 36, ambele prezentând rezistență înaltă la cele 13 antibiotice testate, fiind sensibile doar la 4 antibiotice.

Cel de-al 2 lea cluster are ca și coeficient de similitudine 0,71, similar primului cluster întâlnim valori diferite ale similitudinii între profile, de la 0,71 la 0,90, valoarea maximă fiind la H4 – AE5 și H4 – AE 6, aceste tulpini având același profil de sensibilitate la antibioticele testate.

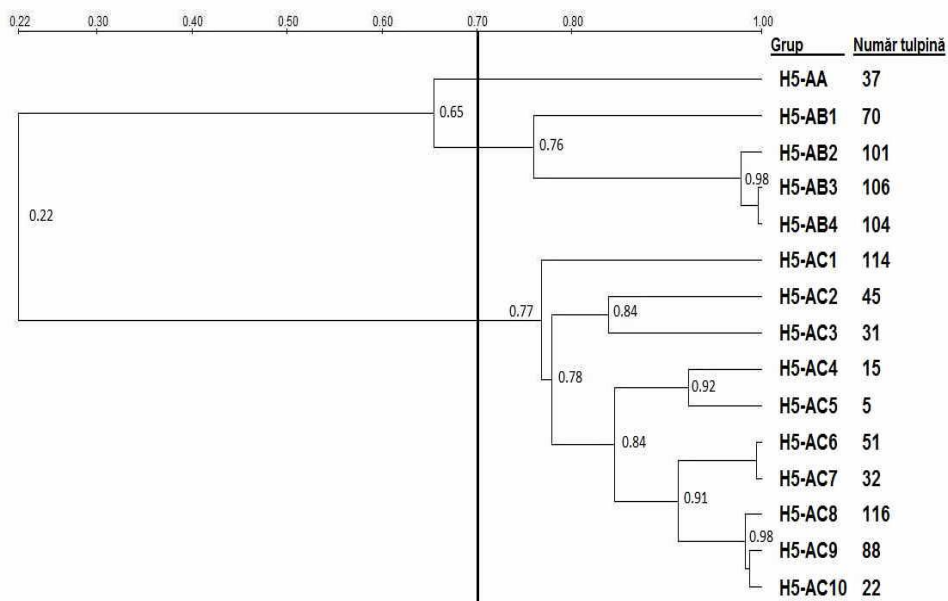
H – 5

Fig. 7.5 Antibiotiparea grupului H – 5 de *P. aeruginosa* de origine umană
Fig. 7.5 Antibiotyping Group H - 5 *P. aeruginosa* of human origin

Grupul 5 cuprinde izolate de *P. aeruginosa* recoltate din probe de urină. Dendograma evidențiază 2 clustere, 15 tipuri de profile din care 2 sunt de tip unic (fig.7.5).

Primul cluster este format din 4 tipuri de profile, H5 – AB3 și H5 – AB4, respectiv tulpinile 106 și 104 au un coeficient de similitudine de 0,98, în urma testării la antibiotice profilul de rezistență și de sensibilitate al acestor tulpini este identic.

Al 2 lea cluster are grad de similitudine de 0,77, cuprinde 10 tipuri de profile din care H5 – AC9 și H5 – AC10 au 0,98 coeficient de similitudine, fapt explicat prin identitatea de 100 % al rezultatelor la testarea panelului de antibiotice.

În acest cluster putem observa diversitatea tipurilor de profile și gradele lor de înrudire, contrar provenienței izolatelor și diferențelor de patologii de fond ale pacienților, ele prezintă între 78% și 98% similaritate.

H – 6

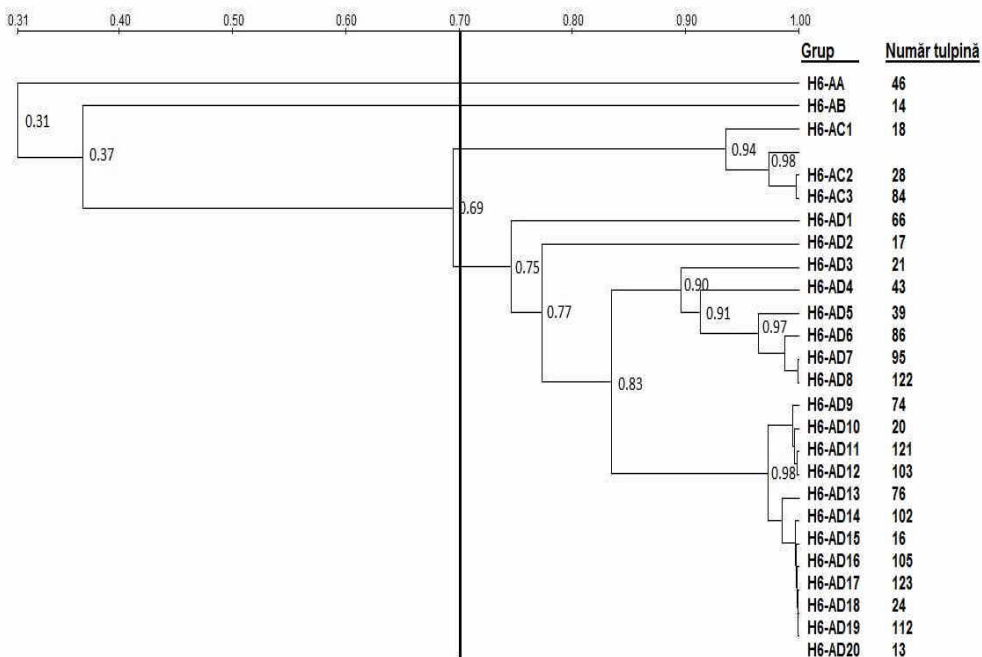


Fig. 7.6 Antibiotiparea grupului H – 6 de *P. aeruginosa* de origine umană

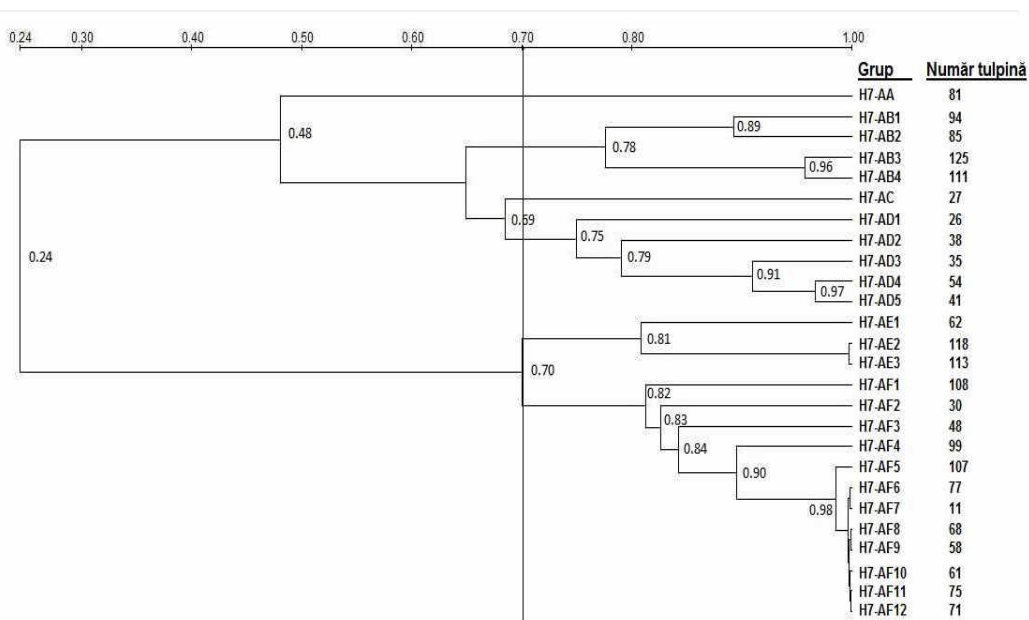
Fig. 7.6 Antibiotyping Group H - 6 *P. aeruginosa* of human origin

Grupul 6 este alcătuit din izolate de *P. aeruginosa* izolate din secreții auriculare.

Dendograma evidențiază 25 tipuri de profile împărțite în 2 clustere și 2 profile de tip unic (fig.7.6).

Primul cluster are 0,94 coeficientul de similitudine, cuprinde 3 tipuri de profile, H6 – AC2 și H6 – AC3 depășește coeficientul de 0,94, aceste tulpini sunt rezistente la TZP, CAZ și FEP.

Al 2 lea cluster are 0,75 coeficientul de similitudine, este alcătuit din 20 de tipuri de profile, valorile coeficientului de similitudine variază de la 0,75 la 0,98, depășind cu mult pragul de 0,70.

H – 7**Fig. 7.7 Antibiotiparea grupului H – 7 de *P. aeruginosa* de origine umană****Fig. 7.7 Antibiotyping Group H - 7 *P. aeruginosa* of human origin**

Ultimul grup de origine umană supus analizei cu ajutorul softului UPGMA este format din tulpini de *P. aeruginosa* izolate din secrețiile purulente post – operatorii.

În dendrogramă se poate observa însumarea a 26 de tipuri de profile reprezentate prin 4 clustere și 2 profile de tip unic (fig.7.7).

Primul cluster este format din 4 tipuri de profile diferite, având 0,78 coeficientul de similitudine, în interiorul clusterului H7 – AB3 reprezentat de tulpina 125 și H7 – AB4 reprezentat de tulpina 111 au peste 0,90 gradul de similitudine. Tulpinile prezintă același profil de rezistență la panelul de antibiotice testat.

Cel de-al 2 lea cluster are 0,75 coeficient de similitudine, dar ca și în primul cluster întâlnim grade diferite de similitudine în interiorul lui, de până la 0,97, între H7 – AD4 și H7 – AD5, acestea fiind tulpinile 54 și 41, profilele lor fiind de 100 % identice în urma testării a celor 13 antibiotice, patologii de fond și istoricul administrării de antibiotice fiind diferite, doar unui singur pacient i s-a mai administrat antibiotice.

Al 3 lea cluster din acest grup este format din 3 profile diferite având grad de similitudine de 0,81, tulpinile prezintă diferențe minore la testarea antibioticelor. Ultimul cluster are 0,82 coeficient de similitudine, fiind format din 12 tipuri de profile cu diferite grade de similitudine, de la 0,82 și până la 0,98. Toate tipurile de profile sunt reprezentate de tulpini cu sensibilitate la toate cele 13 antibiotice testate.

Antibiotiparea tulpinilor de origine animală

Tabelul 7.2

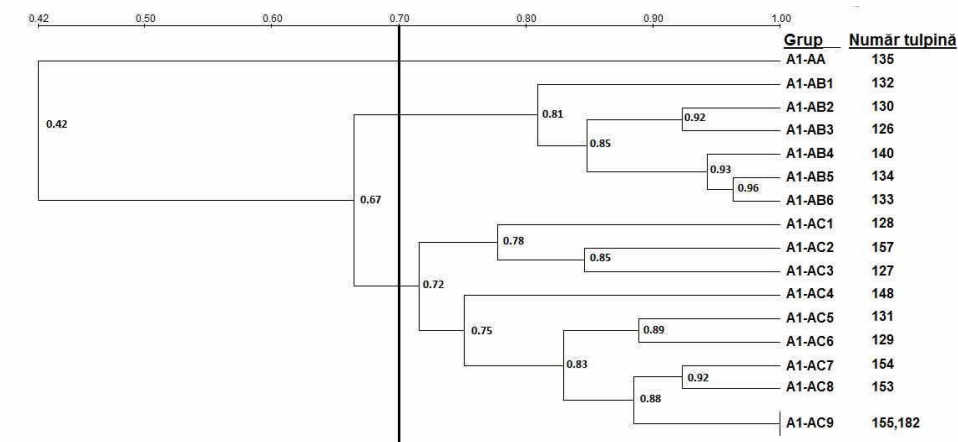
Factorul de discriminare pentru loturile de origine animală

Table 7.2

Discrimination factor for lots of animal origin

GRUP ANALIZAT	ANTIBIOTIPARE	RAPD
A1	0,9926	0,8971
A2	1	0,9633
A3	1	0,7857
A4	0,8095	0,8095

A – 1

Fig. 7.8 Antibiotiparea grupului A – 1 de *P. aeruginosa* de origine animalăFig. 7.8 Antibiotyping Group A - 1 *P. aeruginosa* of animal origin

Lotul de 57 de tulpini de *P. aeruginosa* de origine animală a fost împărțit în 4 grupuri de analiză, împărțirea a fost efectuată în baza provenienței izolatului, astfel primul grup de tulpini este izolat din secrețiile otice ale animalelor de companie.

În urma analizei au rezultat 17 tipuri de profile formând 2 clusteruri și un profil de tip unic (fig.7.8).

Primul cluster este format din 6 tipuri de profile cu diferite coeficiente de similitudine, de la 0,81 și până la 0,96, ultima valoare fiind atribuită profilelor A1 – B5 și A1 – B6, fiind vorba de tulpinile 134 și 133, ele prezintă cel mai înalt grad de similitudine din acest cluster cât și din grupul total de analiză.

Al 2-lea cluster este alcătuit din 9 tipuri de profile și în acest cluster coeficienții de similitudine variază de la 0,72 până la 0,92, această similitudine o întâlnim la profilurile A1 – C7 și A1 – C8.

A – 2

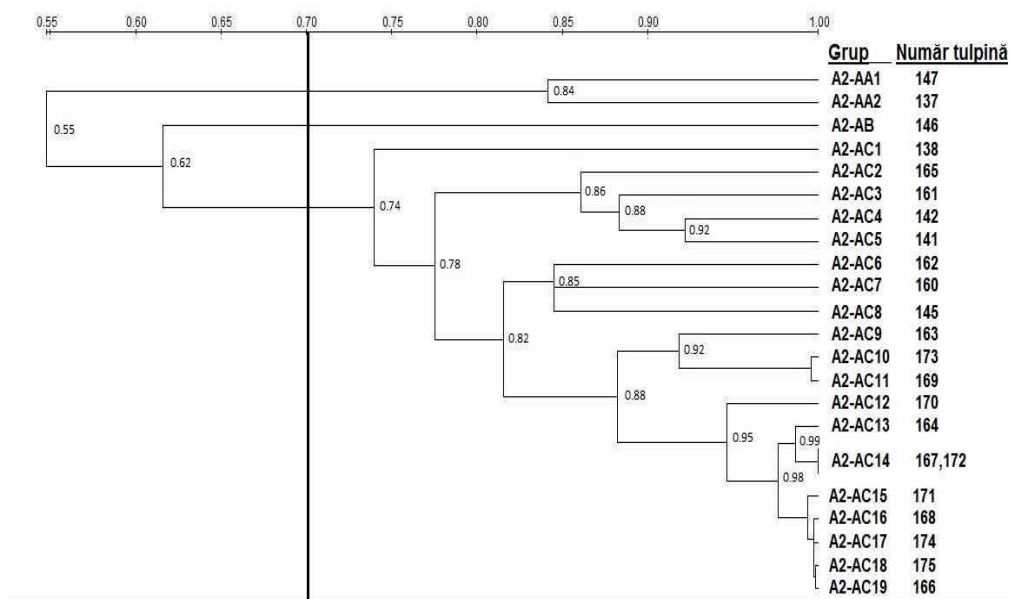


Fig. 7.9 Antibiotiparea grupului A – 2 de *P. aeruginosa* de origine animală

Fig. 7.9 Antibiotyping Group A - 2 *P. aeruginosa* of animal origin

Grupul 2 supus antibiotipării este format din tulpini de *P. aeruginosa* de origine animală izolate din abcese perianale de la animalele de companie.

Dendograma pune în evidență 23 tipuri de profile, din care unul singur este de tip unic, profilele sunt împărțite în 2 clustere (fig.7.9).

Primul cluster este alcătuit din 2 profile ce au coeficient de înrudire de 0,84.

Cel de-al 2 lea cluster este format din 19 tipuri de profile, în interiorul clusterului întâlnim profile cu coeficient de similitudine de aproape 100 %, respectiv profilele A2 – AC13 și A2 – AC14 cu un coeficient de similitudine de 0,99.

A – 3

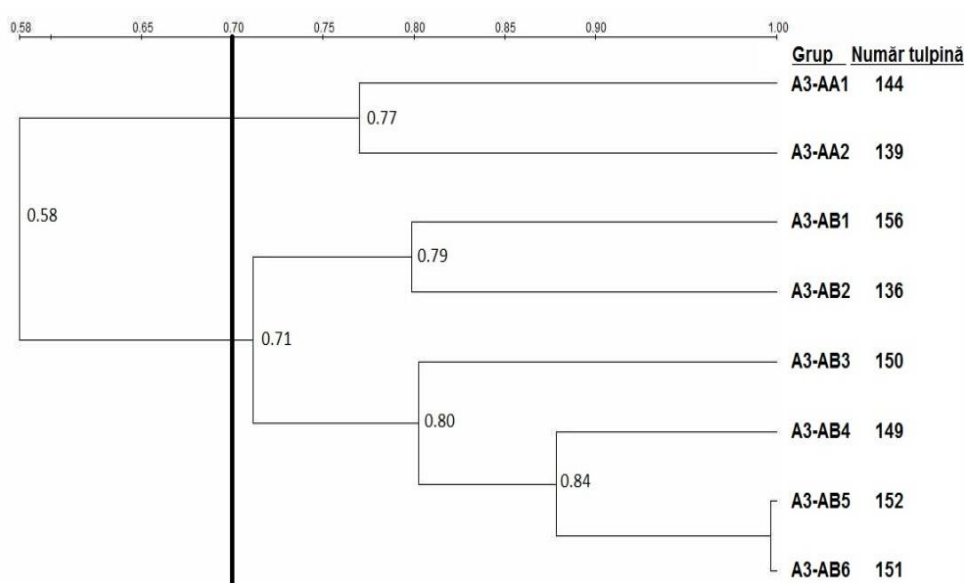
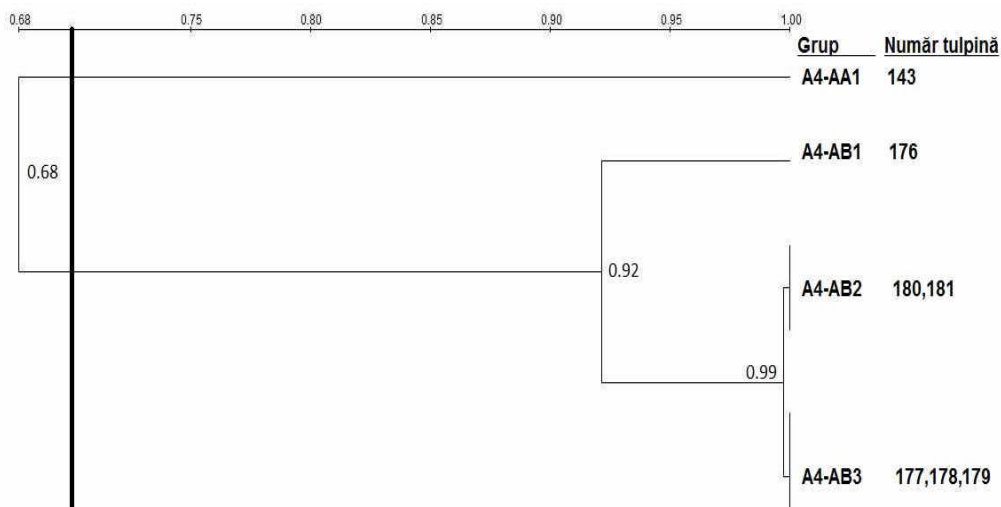


Fig. 7.10 Antibiotiparea grupului A – 3 de *P. aeruginosa* de origine animală
Fig. 7.10 Antibiotyping Group A - 3 *P. aeruginosa* of animal origin

Acest grup este alcătuit din tulpini de *P. aeruginosa* izolate de la animalele de companie ce prezentau septicemie. În dendogramă sunt evidențiate 8 tipuri care formează 2 clustere (fig.7.10).

Primul cluster este format din 2 tipuri de profile cu un coeficient de similitudine de 0,77 și cel de-al 2 lea cluster este format din 6 tipuri de profile având coeficient de similitudine de 0,71, profilul cu coeficientul cel mai mare de similitudine l-a prezentat grupul de profile A3 – AB4 cu profilul A3 – AB5 și A3 – AB6 el fiind de 0,84.

A – 4Fig. 7.11 Antibiotiparea grupului A – 4 de *P. aeruginosa* de origine animalăFig. 7.11 Antibiotyping Group A - 4 *P. aeruginosa* of animal origin

Ultimul grup supus tipizării pe baza rezultatelor la antibiotice este format din tulpini de *P. aeruginosa* de origine animală izolate din secreții oculare.

Dendograma este formată din 7 tipuri de profile, din care doar unul este de tip unic și un cluster alcătuit din 3 tipuri de profile, având grad de similitudine de 0,92, în interiorul clusterului valoarea coeficientului ajunge la 0,99 la profilele A4 – AB2 și A4 – AB3 (fig.7.11).

7.1.3. Concluzii parțiale

1. Antibiotiparea este o metodă prin care se identifică un tipar dintr-un lot total analizat, cu ajutorul lui se poate urmări într-un circuit închis proveniența tulpinilor izolate (ferme, spitale etc).
2. Analiza în acest studiu s-a realizat cu ajutorul rezultatelor la antibiogramă, datele fiind înregistrate în soft – ul (UPGMA).
3. Tot lotul de tulpini a fost testat cu aceleași antibiotice.
4. Este important ca antibioticele să fie identice, dacă se schimbă un singur antibiotic la o tulpină apar erori de similitudine.
5. Valorile fixe sunt antibioticele și cele variabile fiind rezultatele analizei.
6. Această metodă este economă și necesită doar achiziția soft – ului.

7. Antibiotiparea poate fi utilizată ca metodă de supraveghere epidemiologică.

7.2. METODĂ MOLECULARĂ DE SUPRAVEGHERE EPIDEMIOLOGICĂ – RAPD – UL TULPINILOR DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DE ORIGINE UMANĂ ȘI ANIMALĂ

Pentru testarea genetică a tuturor izolatelor de *Pseudomonas aeruginosa*, identificate în studiul nostru, s-a folosit metoda RAPD, prin care se poate pune în evidență înrudirea genetică.

7.2.1. Material și metodă

Efectuarea RAPD – ului a fost de a investiga variația genotipică a tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* izolate de la om și de la animale utilizând metoda aleatorie de ADN polimorfic Amplified (RAPD).

Tehnica RAPD – PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*) a fost descoperită de Williams și colaboratorii în anul 1990. Metoda este rapidă, relativ economi și bine adaptată pentru obținerea unei amprente genetice neradioactive (Welsh și McClelland, 1990). Tehnica RAPD se bazează pe determinarea polimorfismului la nivel alelic, în ceea ce privește producerea unor produși de amplificare sau lipsa lor, în urma utilizării unui primer oligonucleotidic, arbitrar, într-o poziție care să-i permită realizarea amplificării (Carșai și colab., 2009).

Progresele în domeniul tehnicilor de biologie moleculară au furnizat o adevărată baza pentru descoperirea practica a unui număr nelimitat de markeri a ADN-ului. Utilitatea markerilor de ADN bază este în general determinat de tehnologia utilizată pentru a dezvălui polimorfismul bazat pe ADN. În prezent, restricția polimorfismul lungimii fragmentelor (RFLP) a fost alegerea pentru multe specii de a măsura diversitatea genetică și a construi o harta genetică care pune în evidența legatura dintre ele, un test RFLP detectează polimorfismul ADN prin digestie cu enzime de restricție.

Reacțiile RAPD sunt reacțiile PCR, dar utilizează un singur primer, care s-ar putea atașa în mod aleatoriu în mai multe secvențe de ADN în genomul bacterian și a crea modele de electroforeză repetitive, care este utilizat pentru diferențierea genotipică. Dacă o mutație a avut loc în ADN-ul șablon care a fost anterior complementar primerului, un

produs PCR nu va fi produs, rezultând într-un alt model de segmente de ADN amplificate pe gel. Cealaltă diferență între această metodă și PCR este utilizarea a două temperaturi diferite de tratament termic.

Se folosește un singur primer M13 (**5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'**) respectându-se literatura de specialitate Coban și colab., 2009 și Gulhan și colab., 2015.

Similaritatea benzilor RAPD au fost determinate în baza Dice similarity coefficient. Pentru a crea dendogramele și a se evidenția înrudirea genetică dintre tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* izolate de la oameni și cu cele de la animale, am folosit programul “Unweighted Pair Group Method cu Arithmetic Averages (UPGMA)” Quantitiy One & Software.

Etape de lucru RAPD:

- Extragerea ADN – ului
- Determinarea cantității de ADN
- Reacția PCR (se folosește un singur primer)
- Amplificarea ADN – ului
- Separarea segmentelor de ADN în gelul de electroforeză
- Vizualizarea segmentelor de ADN folosind bromura de etidium în transiluminatorul UV

Fiecare gel de electroforeză va fi analizat urmărind prezența sau absența polimorfismului de fragmente de ADN, datorită naturii RAPD, doar așa se va putea evalua fiecare gel. Se vor analiza și lua în considerare doar profilele de benzi clare, altfel coeficientul de înrudire/similitudine va fi greu de stabilit.

Similitudinea/înrudirea din matricea de ADN va fi analizată prin metoda aritmetică UPGMA folosind SAHN (Sequential, agglomerative, hierarchical and nonoverlapping), module de clustere.

Metodele de grupare combinaționale ale lui Sahn pot fi împărțite în mod logic în două clase. Metodele d-Sahn caută distanțe minime și maxime dintre clustere verificând omogenitatea. Metodele lui Sahn clustering sunt compatibile cu binecunoscuta formula a lui Lance & Williams (1966).

7.2.2. Rezultate și discuții

RAPD -ul este o tehnică de biologie moleculară ce are la bază PCR -ul. În ultimul deceniu analiza RAPD fost una dintre tehnicile moleculare cel mai frecvent utilizate pentru a dezvolta markeri ADN.

RAPD este o modificare a PCR – ului, în care un singur primer este capabil să se alipească la mai multe locații din întregul genom ce poate produce un spectru de produse de amplificare, care sunt caracteristice unui șablon de ADN.

În studiul de față, am găsit tehnica RAPD-PCR fiind un instrument util pentru studierea variației genetice a tulpinilor *P. aeruginosa*. Acesta metodă are un cost redus, este rapidă, fiind o metodă genotipică cu o putere de discriminare ridicată. Rezultatele pot ajuta la aflarea originii infecției cauzate de acest organism pentru a se realiza un control al bacteriilor împiedicându-le astfel să colonizarea și transmiterea lor.

Înțelegerea distribuției agentului patogen și înrudirea este esențială pentru determinarea epidemiologiei infecțiilor nosocomiale și sprijinirea în proiectarea metodelor raționale de control al agentului patogen. PCR-genotipare moleculară a *P. aeruginosa* este de o importanță majoră în elucidarea rutelor de transport, care în comparație cu metodele de fenotipare sunt mai puțin afectați de factorii de mediu. În general, metodele moleculare dețin o putere mai mare de discriminare și de reproductibilitate decât testele fenotipice, datorită capacității lor de a detecta diferențele minore ale genomului pentru unele specii.

Tulpinile analizate cu tehnica RAPD prezintă un grad ridicat de înrudire genetică, ceea ce poate concluziona că tulpinile provin din același mediu și informația genetică se transmite de la o tulpina la altă.

Prin RAPD cu primerul M13 au fost obținute pattern-uri RAPD distincte, dimensiunea și numărul benzilor variază de la un grup la altul, (fig.7.12, 7.14, 7.16, 7.18, 7.20, 7.22, 7.24, 7.26, 7.28, 7.30, 7.32, 7.34). după evidențierea lor, datele au fost introduse în softul de analiză, pentru vizualizarea dendogramelor.

Genotiparea grupului de tulpini de origine umană

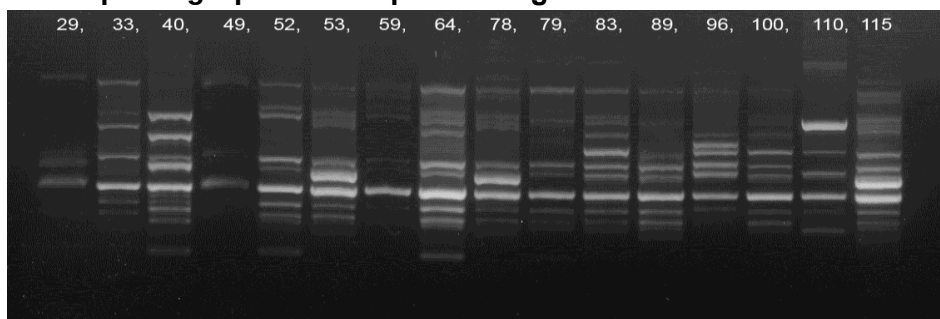


Fig. 7.12 Vizualizarea benzilor de ADN din grupul 1 de origine umană
Fig. 7.12 Viewing Group 1 DNA bands of human origin

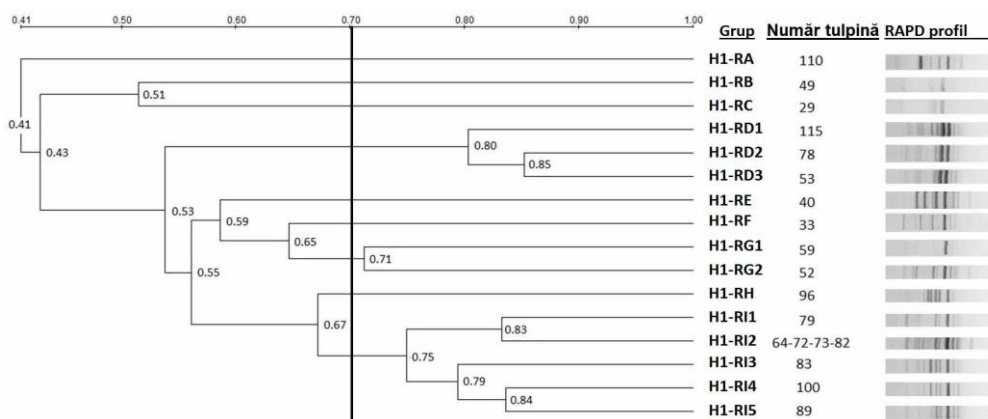


Fig. 7.13 Genotiparea grupului H – 1 de *P. aeruginosa* de origine umană

Fig 7.13 Genotyping Group H - 1 *P. aeruginosa* of human origin

Profilul molecular de înrudire genetică a primului grup analizat este format din 16 tipuri de profile, notate în ordin cronologic și alfabetic, primul profil identificat fiind H1 – RA, H fiind litera grupului total de origine umană (H – human), a 2 a literă reprezentând prescurtarea metodei moleculare RAPD (R) și ultima literă fiind atribuită primului profil, următoarele profile fiind notate cu B, C șamd.

Numerotarea cronologică este însoțită în interiorul profilelor, determinând de câte ori a fost identificat respectivul profil. Grupul 1 este alcătuit din 3 cluster, fiecare cluster având coeficient diferit de înrudire genetică, cel mai mare grad este atribuit primului cluster, H1 – RD1, H1 – RD2 și H1 – RD3, respectiv tulpinile 115, 78 și 53, înrudirea profilelor din interiorul lui fiind de 80% - 85 % (fig.7.13).

Relaționarea între tulpinile 115 și 53 a fost identificată și la antibiotipare, cele două tulpini aparținând aceluiași cluster. Tulpinile din acest cluster au fost izolate din aspirate bronșice, pacienții având în comun patologii de fond, respectiv Fibroză chistică. Profilele de rezistență și de sensibilitate la panelul de antibiotice testat sunt total diferite.

Al 2 lea cluster are coeficient de similitudine de 71%, H1 – RG1 și H1 – RG2, reprezentat de tulpinile 59 și 52, similar primului cluster cele două tulpini la antibiotipare au făcut parte din același cluster, putem concluziona astfel că metoda de antibiotipare poate fi o metodă eficientă pentru supraveghere epidemiologică. Ultimul cluster are un grad de

înrudire genetică de la 75% la 84%, acest cluster predomină în grupul analizat.

H – 2

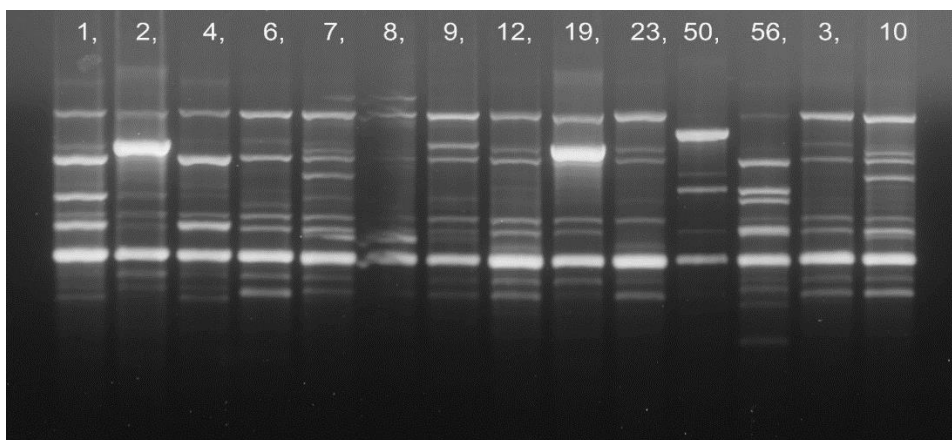


Fig. 7.14 Vizualizarea benzilor de ADN din grupul 2 de origine umană

Fig. 7.14 Viewing Group 2 DNA bands of human origin

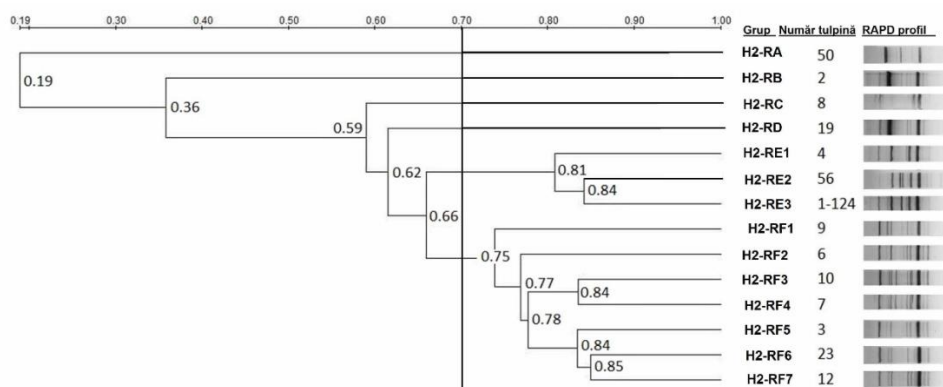


Fig. 7.15 Genotiparea grupului H – 2 de *P. aeruginosa* de origine umană

Fig 7.15 Genotyping Group H - 2 *P. aeruginosa* of human origin

Grupul 2 este format din tulpini de *P. aeruginosa* izolate din aspirate gastrice. În urma RAPD – ului s-a identificat în interiorul lui 14 tipuri de profile genetice din care 4 sunt de tip unic (fig.7.15).

Profilele au fost împărțite în două clusteruri cu coeficient de înrudire de până la 85%. Primul cluster cuprinde 3 tipuri de profile cu grad de înrudire genetic de 84%.

Cu predominanță în grup este cel de-al 2 lea cluster, cu coeficient de înrudire de 75%, clusterul este format din 7 tipuri de profile, un grad înalt de înrudire este reprezentat de perechea de profile H2 – RF6 și H2

– RF7, fiind vorba de tulpinile 23 și 12, ambilor pacienți li s-a mai administrat antibiotice, patologiiile de fond sunt diferite, aproximativ similar fiind doar profilul de sensibilitate la panelul de antibiotice testat.

H – 3

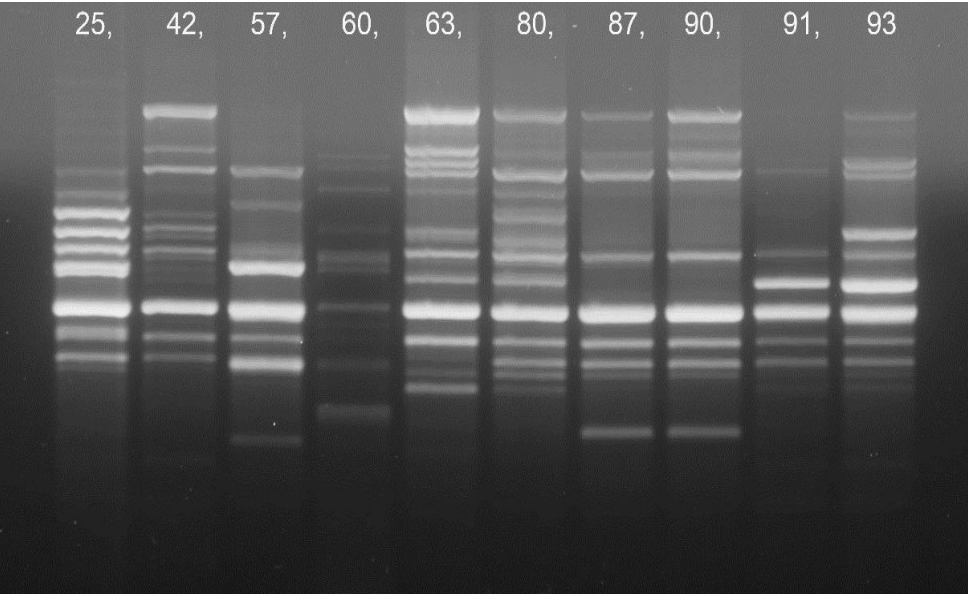


Fig. 7.16 Vizualizarea benzilor de ADN din grupul 3 de origine umană
Fig. 7.16 Viewing Group 3 DNA bands of human origin

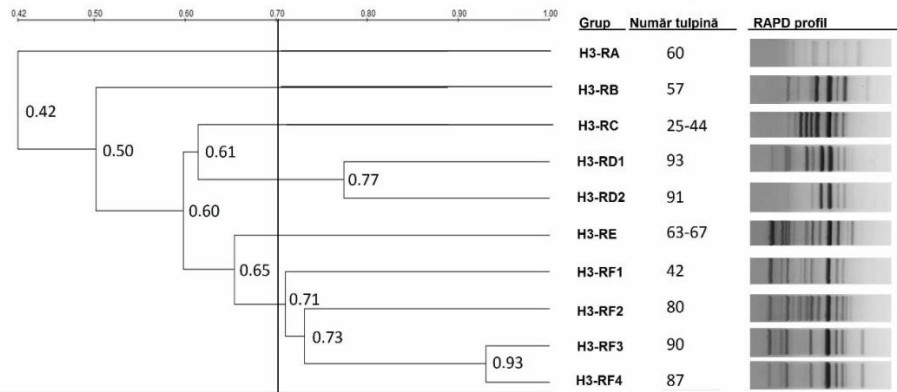


Fig. 7.17 Genotiparea grupului H – 3 de *P. aeruginosa* de origine umană
Fig 7.17 Genotyping Group H - 3 *P. aeruginosa* of human origin

Grupul 3 analizat este format din tulpini de *P. aeruginosa* izolate din lichide pleurale, dendograma evidențiază 2 cluster.

Primul având coeficient de similitudine de 77% și este format din 2 tipuri de profile. Al 2 lea cluster ce predomină în grup are 4 tipuri de profile, astfel grupul are 10 tipuri de profile din care 4 sunt de tip unic (fig.7.17).

Înrudirea genetică ce depășește procentul de 90% o întâlnim între profilele H3 – RF3 și H3 – RF4, fiind reprezentate de tulpinile 90 și respectiv 87.

Tulpinile sunt izolate de la pacienți cu patologii de fond diferite, doar unul din ei are în istoric administrarea de antibiotice și totodată apartenența pacienților este diferită (urban/rural), la antibiotipare cele două tulpini au prezentat un coeficient de similitudine de 0,78, similitudine fiind acum dovedită prin înrudirea genetică de 90%

H – 4

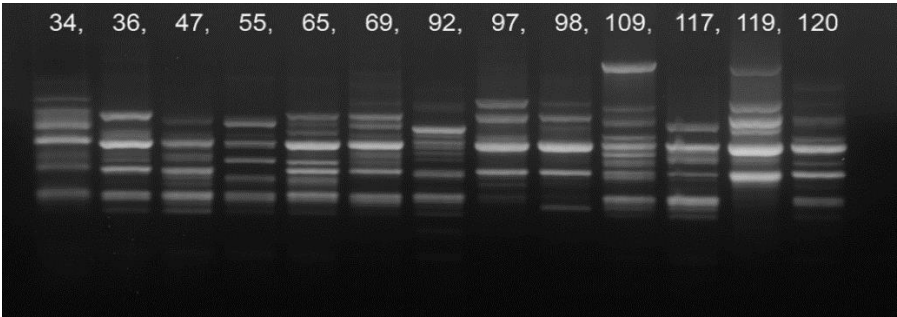


Fig. 7.18 Vizualizarea benzilor de ADN din grupul 4 de origine umană
Fig. 7.18 Viewing Group 4 DNA bands of human origin

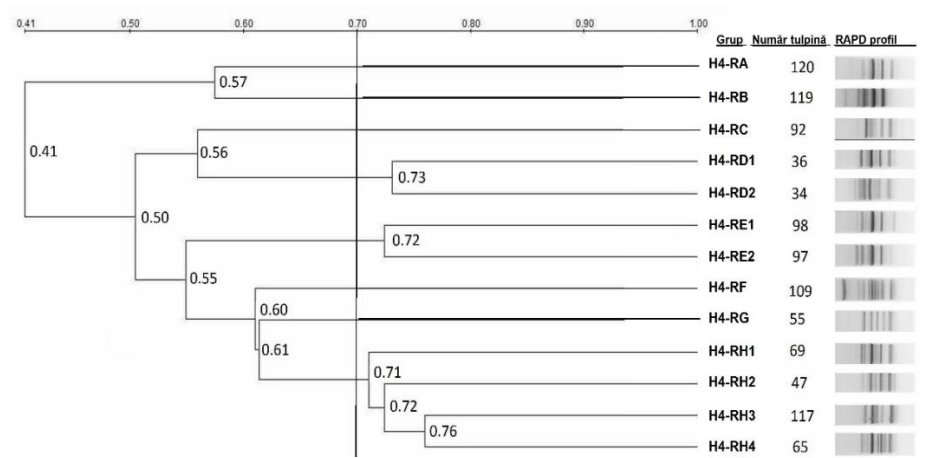


Fig. 7.19 Genotiparea grupului H – 4 de *P. aeruginosa* de origine umană
Fig. 7.19 Genotyping Group H - 4 *P. aeruginosa* of human origin

Grupul 4 supus analizei RAPD este format din tulpini de *P. aeruginosa* izolate din probe de spută.

Dendograma evidențiază 3 cluster și 4 profile genetice de tip unic. Profile din primul cluster are 2 tipuri de profile genetice, coeficientul de înrudire depășește pragul stabilit de 0,70 (fig.7.19).

Cel de-a 2 lea cluster este înrudit într-un procent de 72%, fiind format din profilul H4 – RE1 și H4 – RE2, respectiv tulpinile 98 și 97, tulpinile au fost izolate de la pacienți diferiți ce au în comun patologii de fond, Fibroză chistică și antibioterapie repetată, proveniența pacienților și rezultatele la testarea antibioticelor sunt total diferite.

Ultimul cluster este format din 4 tipuri de profile genetice, gradul lor de înrudire variază de la 71% la 76%.

Toate tulpinile din acest grup provin de la pacienți cu aceeași patologie de fond, respectiv pacienți diagnosticați cu Fibroză chistică, acest lot de tulpini a fost supus și verificării producerii de biofilm, din 13 tulpini, 53,84% sunt producătoare de biofilm (7 tulpini: 36, 47, 69, 92, 98, 117, 119), înaintea analizei RAPD, izolatele au fost supuse la diferite analize, pentru a se verifica prin metode fenotipice dacă au puncte în comun.

H – 5

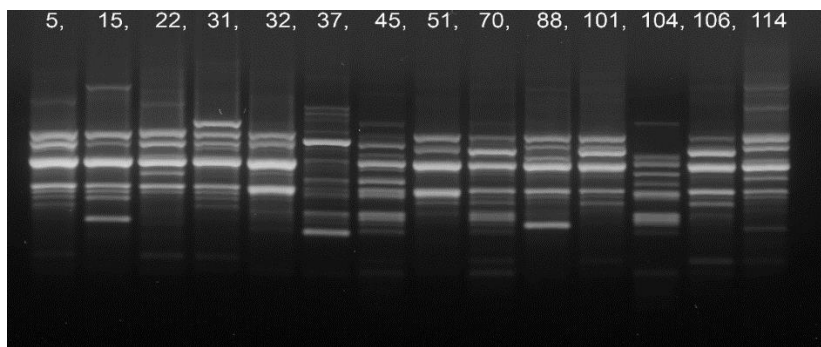


Fig. 7.20 Vizualizarea benzilor de ADN din grupul 5 de origine umană

Fig. 7.20 Viewing Group 5 DNA bands of human origin

Grupul 5 este reprezentat de tulpini care au fost izolate din probe de urină, probele provin de la pacienți diferiți cu patologii de fond diferite. Prin dendogramă putem observa formarea a 3 cluster și 3 tipuri unice de profile genetice.

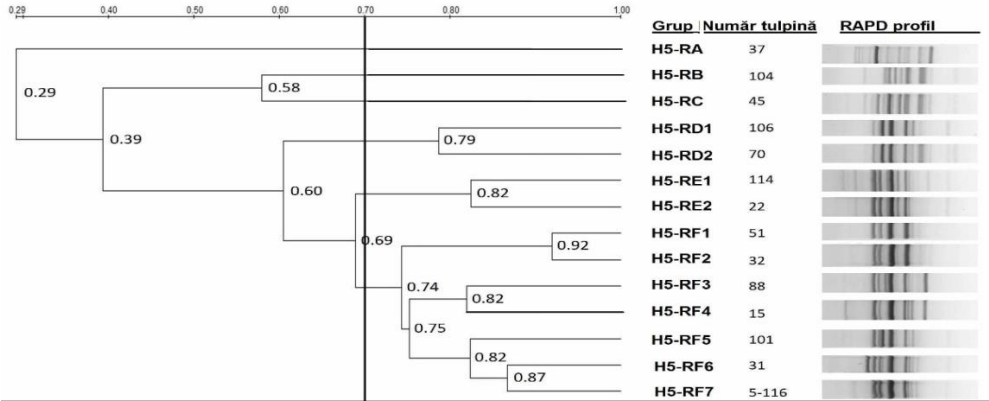


Fig. 7.21 Genotiparea grupului H – 5 de *P. aeruginosa* de origine umană
Fig 7.21 Genotyping Group H - 5 *P. aeruginosa* of human origin

Primul cluster este format din 2 tipuri de profile genetice, având coeficient de înrudire de 79% (fig.7.21).

Cel de-al 2 lea cluster, cu procentajul de înrudire superior primului, 82%, este format din 2 tipuri de profile, H5 – RE1 și H5 – RE2, fiind vorba de tulpinile 114 și 22 izolate de la pacienți cu patologii de fond diferite, având în comun mediul de proveniență, rezultatele antibiogrammei și administrarea de antibiotice în trecut de lungă durată, deoarece patologiiile de fond sunt cronice ce necesită administrarea lor, împiedicând astfel septicemiile.

Ultimul cluster, predominant în acest grup, este format din 7 tipuri de profile cu diferite procente de similitudine, de la 74% până la 92%. Cel mai mare procentaj de înrudire fiind la perechea de profile H5 – RF1 și H5 – RF2, reprezentate de tulpinile 51 și 32, aceste izolate provin de la pacienți diferiți cu patologii diferite.

H – 6

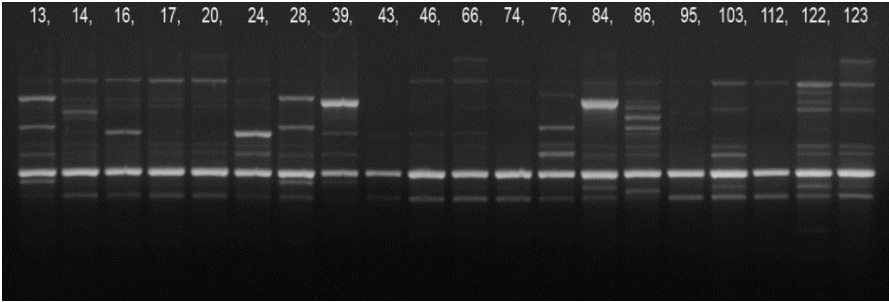


Fig. 7.22 Vizualizarea benzilor de ADN din grupul 6 de origine umană
Fig. 7.22 Viewing Group 6 DNA bands of human origin

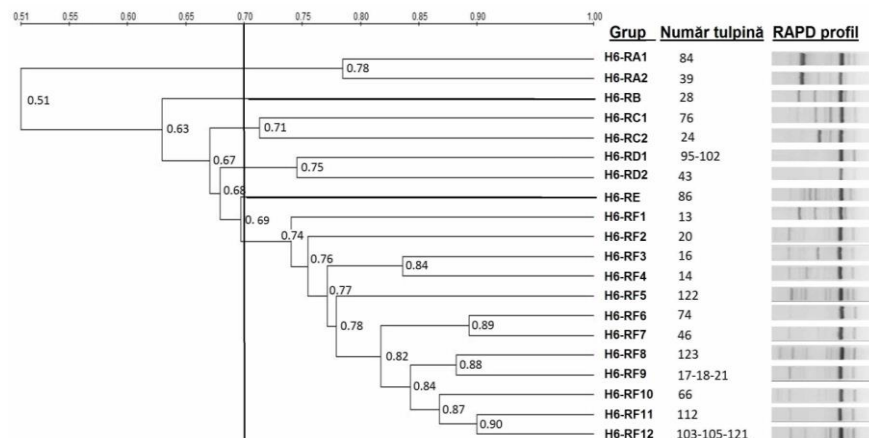


Fig. 7.23 Genotiparea grupului H – 6 de *P. aeruginosa* de origine umană
Fig 7.23 Genotyping Group H - 6 *P. aeruginosa* of human origin

Penultimul grup de origine umană este format din tulpini de *P. aeruginosa* izolate din secreții auriculare, tulpinile sunt non-duplicat și provin de la pacienți diferiți.

Dendograma distinge 20 de tipuri de profile genetice, ce sunt divizate în 4 clustere și 2 tipuri de profile genetice de tip unic (fig.7.23).

Primul cluster fiind reprezentat de 2 profile ce au coeficient de înrudire de 0,78.

Similar primului cluster, al 2 lea și al 3 lea cluster cuprind câte 2 tipuri de profile genetice având coeficient de înrudire inferior primului, respectiv de 0,71 și 0,75, înrudirea lor fiind semnificativ deoarece depășește pragul de 0,70 stabilit prin formulă matematică.

Ultimul cluster cuprinde 12 tipuri de profile genetice, cu procentaje diferite de înrudire genetică, de la 74% până la 90%. H6 – RF11 și H6 – RF12, reprezentate de tulpinile 112 și 103, 105, 121 care au profilele genetice identice de 90%, ele au fost izolate de la pacienți diferiți, cu internați în unitate cu patologii de fond diferite, pacienții au în comun rezultatele de antibiogramă.

H – 7

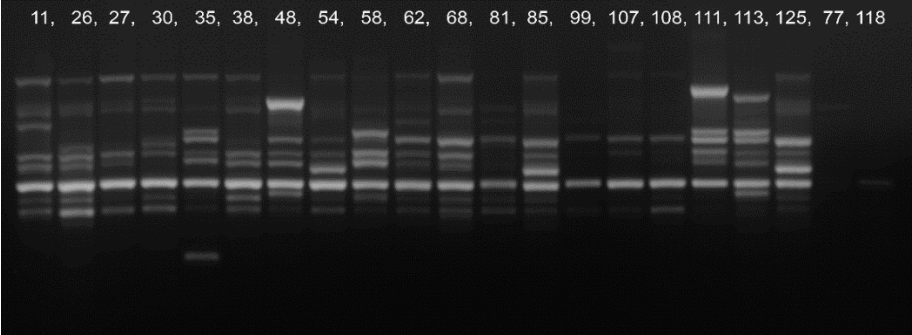


Fig. 7.24 Vizualizarea benzilor de ADN din grupul 7 de origine umană
Fig. 7.24 Viewing Group 7 DNA bands of human origin

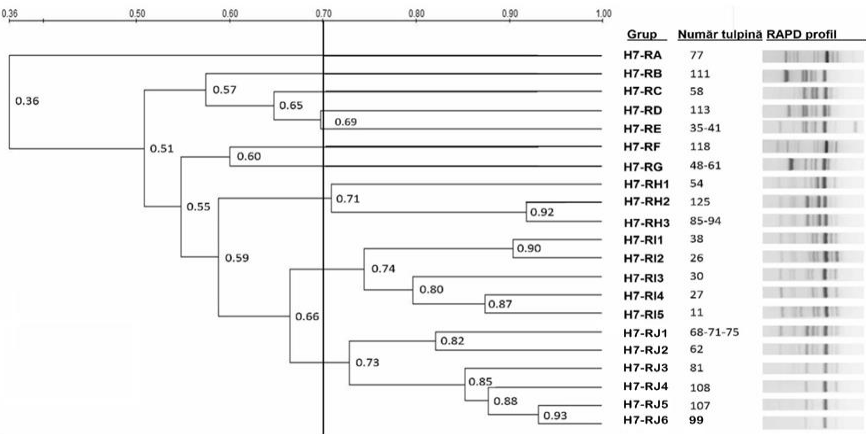


Fig. 7.25 Genotiparea grupului H – 7 de *P. aeruginosa* de origine umană
Fig 7.25 Genotyping Group H - 1 *P. aeruginosa* of human origin

Ultimul grup analizat este format din tulpini de *P. aeruginosa* izolate din secreții purulente postoperatorii.

Dendograma este formată din 21 tipuri de profile genetice, ele fiind împărțite în 3 clustere și 7 profile de tip unic (fig.7.25).

Primul cluster are coeficient de înrudire de 0,71, în interiorul lui ajungându-se până la 92% înrudirea genetică.

Al 2 lea cluster este alcătuit din 5 tipuri de profile, coeficientul de înrudire variază de la 0,74 până la 0,90. H7 – RI1 și H7 – RI2, reprezentate de tulpinile 38 și 26 au profilul genetic înrudit în proporție de 90%, izolatele provin de la pacienți diferiți cu patologii de fond diferite.

Ultimul cluster analizat este format din 6 tipuri de profile genetice înrudite în procentaj de 73% până la 93%. Profile H7 – RJ5 și H7 – RJ6, reprezentate de tulpinile 107 și 99, au coeficient de înrudire de 0,93. Izolatele provin de la pacienți care provin din același mediu social, cu aceeași vârstă, dar cu patologii de fond diferite de tip cronic, ambii pacienți având în istoricul medical administrarea antibioticelor.

Genotiparea grupului de tulpini de origine animală

A – 1

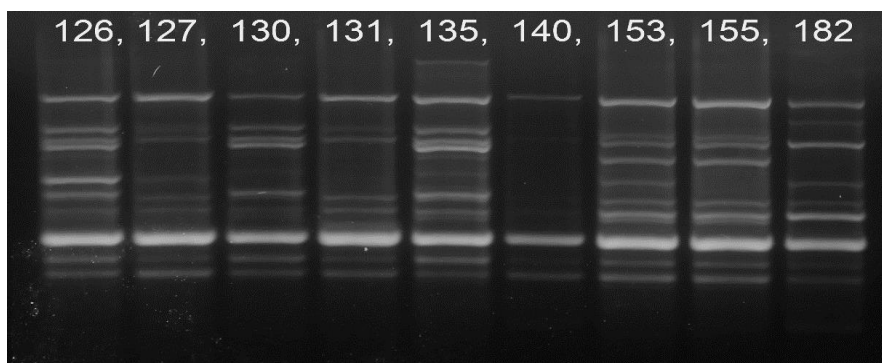


Fig. 7.26 Vizualizarea benzilor de ADN din grupul 1 de origine animală
Fig. 7.26 Viewing Group 1 DNA bands of animal origin

Lotul de tulpini de *P. aeruginosa* de origine animală cuprinde un număr de 57 de tulpini ce au fost împărțite în funcție de proveniența lor, astfel au fost împărțite în 4 grupe: secreții auriculare, abcese perianale, septicemii și secreții conjunctivale.

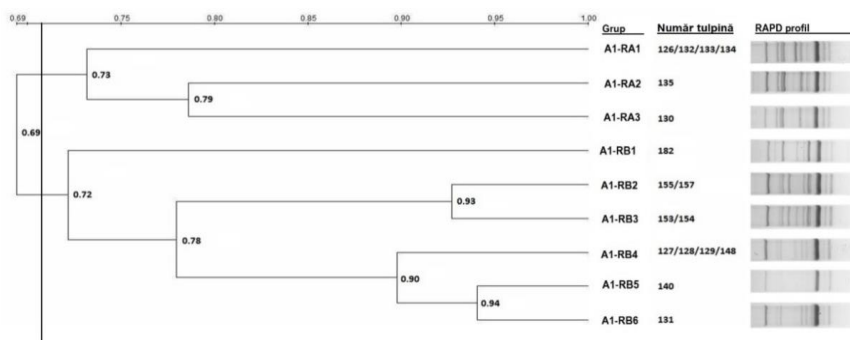


Fig. 7.27 Genotiparea grupului A – 1 de *P. aeruginosa* de origine animală
Fig 7.27 Genotyping Group H - 1 *P. aeruginosa* of animal origin

Primul grup supus analizei este format din tulpini recoltate de la animale de companie cu otită.

Dendograma evidențiază 9 tipuri de profile genetice, ce sunt divizate în 2 cluster (fig.7.27).

Primul cluster cuprinde 3 tipuri de profile cu coeficient de înrudire de 0,73. Câinii de la care s-au recoltat probele provin din același mediu, rezultatele antibiogramelor sunt diferite.

Cel de-al 2 lea cluster este format din 6 tipuri de profile, înrudirea genetică variază de la 72% până la 94%.

Profilele A1 – RB5 și A1 – RB6, reprezentate de tulpinile 140 și 131 au gradul superior de înrudire genetică din tot grupul analizat, ele provin de la câini ce au în comun mediul de creștere, diferă rezultatele la antibiotice.

A – 2

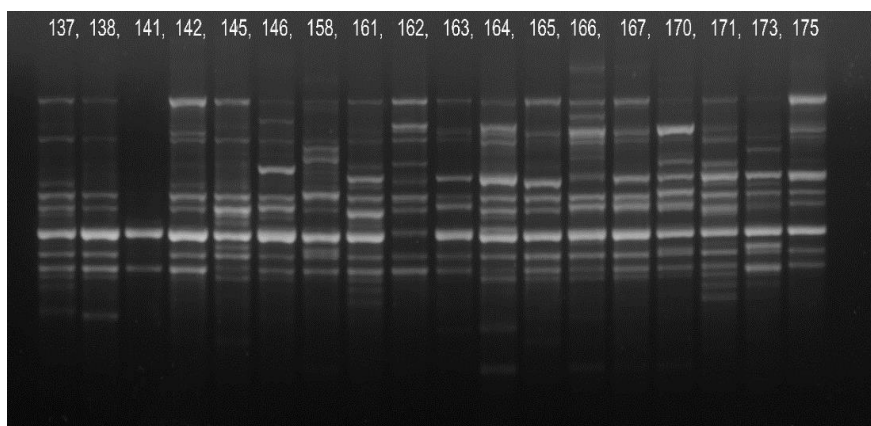


Fig. 7.28 Vizualizarea benzilor de ADN din grupul 2 de origine animală

Fig. 7.28 Viewing Group 2 ADN bands of animal origin

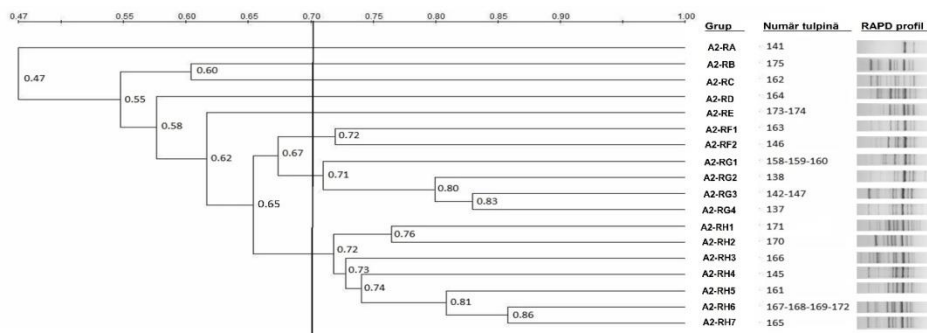


Fig. 7.29 Genotiparea grupului A – 2 de *P. aeruginosa* de origine animală

Fig. 7.29 Genotyping Group H - 2 *P. aeruginosa* of animal origin

Grupul 2 analizat este format din tulpini de *P. aeruginosa* izolate din abcese perianale de la animale de companie.

Dendograma este formată din 18 tipuri de profile, divizate în 3 clustere și 5 profile de tip unic (fig.7.29).

Primul cluster este format din 2 profile cu coeficient de înrudire genetic de 0,72.

Al 2 lea cluster însumează 3 tipuri de profile cu variații ale coeficientului de înrudire de la 0,71 până la 0,83.

Ultimul cluster din acest grup, predominant de altfel, cuprinde 7 tipuri de profile genetice, similar celui de-al 2 lea cluster și aici întâlnim variații ale coeficientului de înrudire, de la 0,72 până la 0,86.

Tulpinile ce reprezintă profilele genetice din ultimul cluster au în comun rezultatele la antibiogramă, unde întâlnim o rezistență de aproximativ 100%.

A – 3

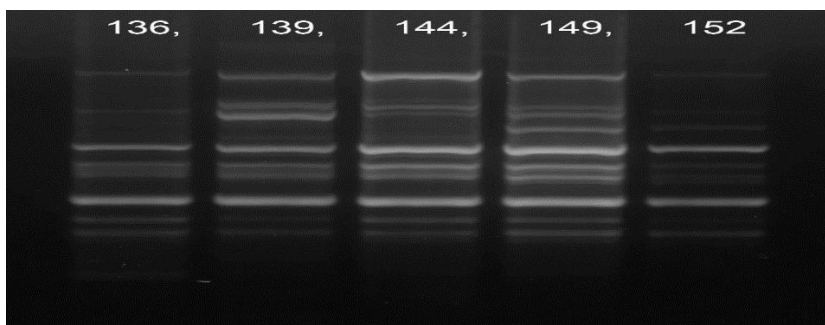


Fig. 7.30 Vizualizarea benzilor de ADN din grupul 3 de origine animală

Fig. 7.30 Viewing Group 3 ADN bands of animal origin

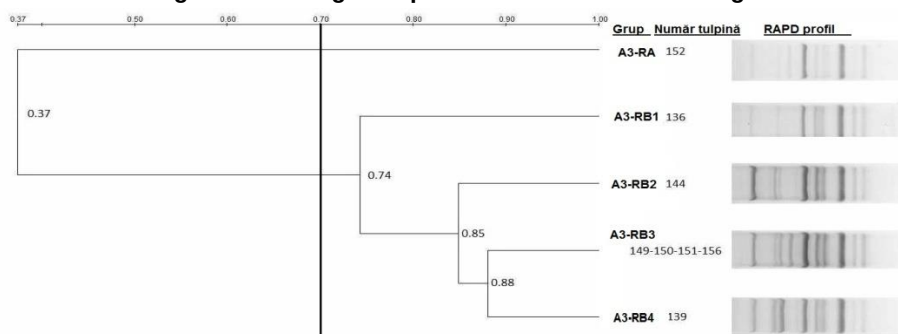


Fig. 7.31 Genotiparea grupului A – 3 de *P. aeruginosa* de origine animală

Fig. 7.31 Genotyping Group H - 3 *P. aeruginosa* of animal origin

În grupul 3 analizat sunt tulpini de *P. aeruginosa* izolate din septicemii.

Dendograma este formată din 5 tipuri de profile genetice, evidențiind un singur cluster și un singur profil de tip unic (fig.7.31).

Clusterul are coeficient de înrudire de 0,74.

În interiorul lui profilul A3 – RB3, reprezentat de tulpinile 149, 150, 151 și 156 și profilul A3 – RB4 reprezentat de tulpina 139 prezintă 88% înrudire genetică.

Tulpinile au în comun rezultatele la testarea panelului de antibiotice, același panel care a fost folosit și pentru celelalte grupe.

A – 4

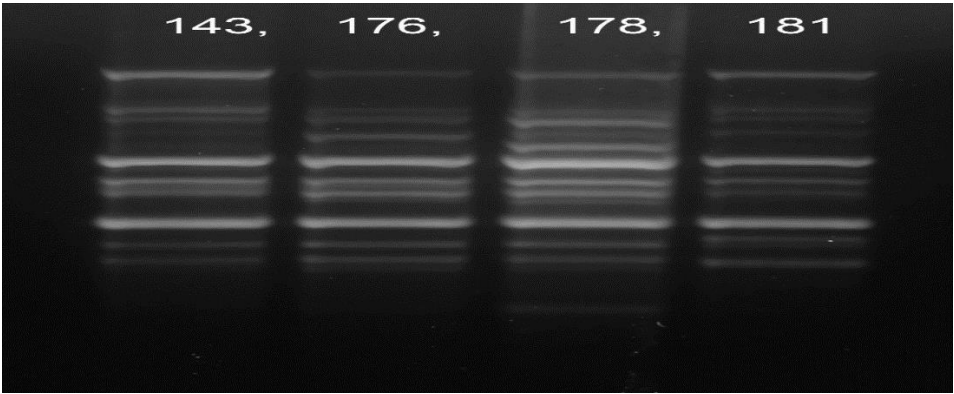


Fig. 7.32 Vizualizarea benzilor de ADN din grupul 4 de origine animală
Fig. 7.32 Viewing Group 4 ADN bands of animal origin

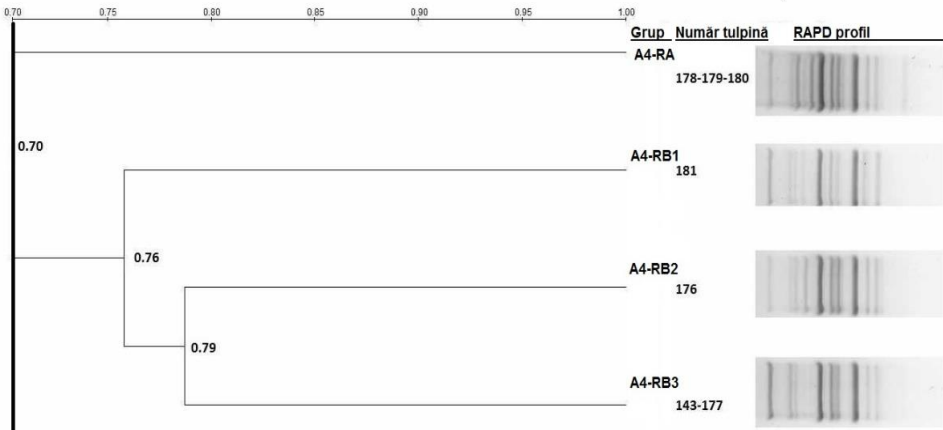


Fig. 7.33 Genotiparea grupului A – 4 de *P. aeruginosa* de origine animală
Fig. 7.33 Genotyping Group H - 4 *P. aeruginosa* of animal origin

Dendograma ultimului grup analizat este similară cu cea din grupul anterior, este evidențiat un singur cluster și un singur profil de tip unic (fig.7.33).

Clusterul este format din 3 tipuri de profile, coeficientul de înrudire ajunge până la 79%. A4 – RB2 și A4 – RB3 este reprezentat din tulpini ce provin de la specii diferite de animale (iepure, câine și pisică), contrar acestui lucru tulpinile prezintă 79% grad de înrudire, profilul de rezistență este aproximativ identic la aceste tulpini.

H – TOTAL

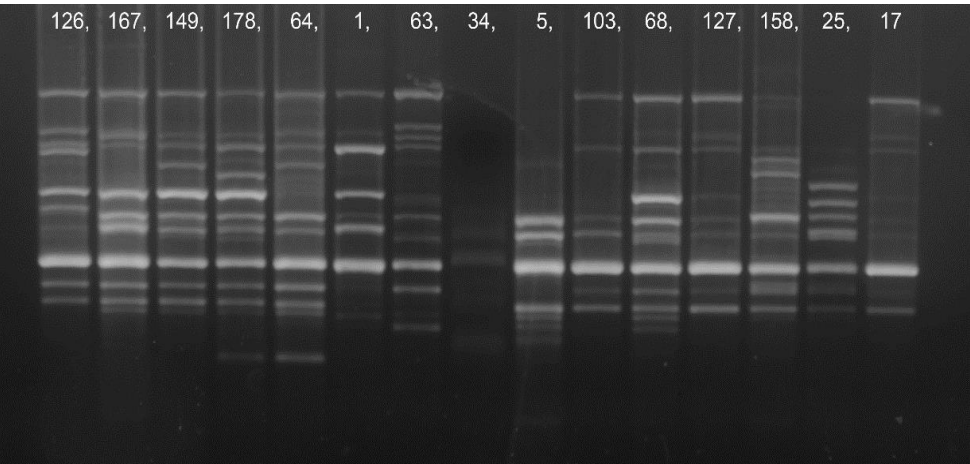


Fig. 7.34 Vizualizarea benzilor de ADN din grupul total de origine umană și animală

Fig. 7.34 Viewing Group 5 ADN bands of animal origin

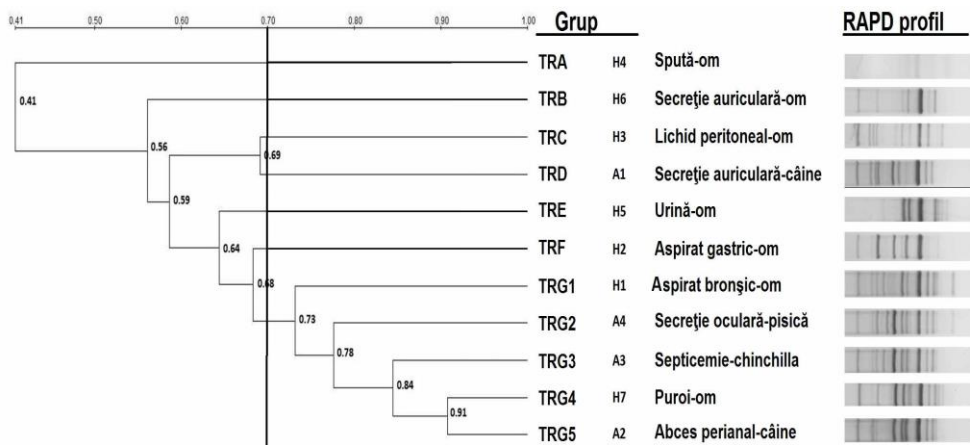


Fig. 7.35 Genotiparea tulpinilor de *P. aeruginosa* reprezentative a grupelor analizate de origine umană și animală

Fig 7.35 Genotyping of *P. aeruginosa* representative strains groups analyzed human and animal origin

Acest grup analizat este foarte important, deoarece a fost efectuat pe tulpini de *P. aeruginosa* de origine umană și animală.

Din fiecare grup a fost ales câte un izolat ce a fost reprezentativ profilului respectiv.

Dendograma evidențiază un singur cluster și 6 profile de tip unic: TRA – H4 (izolate din spută), TRB – H6 (izolate din secreții otice), TRC – H3 (izolate din lichide plurale), TRD – A1 (izolate din secreții otice), TRE – H5 (izolate din probe de urină), TRF – H2 (izolate din aspirate gastrice). Clusterul este format din 5 tipuri de profile genetice, fiecare profil este reprezentat de câte un izolat din grupe diferite: TRG1 – H1 (aspirate bronșice recoltate de la oameni), TRG2 – A4 (secreții otice izolate de la animale de companie), TRG3 – A3 (septicemii de la animale), TRG4 – H7 (izolate din secrețiile purulente postoperatorii de la oameni), TRG5 – A2 (izolate din abcese perianale de origine animală).

În interiorul clusterului procente de înrudire genetică variază de la 73% până la 91%. Profilul cu cel mai mare procentaj de înrudire, respectiv 91%, format din TRG4 – H7 și TRG5 – A2, reprezentat de tulpini izolate de la oameni din secrețiile postoperatorii și tulpini izolate din abcese perianale de la animale au 91% procentul de înrudire genetică (fig.7.35). Tulpinile de origine animală au fost recoltate de la câinii aflați în proximitatea unității spitalicești din care au fost recoltate tulpinile din secrețiile purulente postoperatorii de origine umană.

7.2.3. Concluzii parțiale

1. Tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* au fost grupate în funcție de proveniența lor: 125 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană, reunite în 7 grupe (H1-H7), izolate din ; 57 de tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de origine animală, reunite în 4 grupe (A1-A4), izolate din: secreții auriculare, abcese perianale, septicemii și secreții conjunctivale.
2. Tulpinile analizate cu tehnica RAPD prezintă un grad ridicat de înrudire genetică, ceea ce poate concluziona că tulpinile provin din același mediu și informația genetică se transmite de la o tulpina la altă.
3. Grupul H-1 (aspirate bronșice) a fost alcătuit din 3 cluster, fiecare cluster având coeficient diferit de înrudire genetică:
 - a. cel mai mare grad este atribuit primului cluster, H1 – RD1, H1 – RD2 și H1 – RD3, respectiv tulpinile 115, 78 și 53, înrudirea profilelor din interiorul lui fiind de 80% - 85 %.

- b. Al 2-lea cluster are coeficient de similitudine de 71%, H1 – RG1 și H1 – RG2, reprezentat de tulpinile 59 și 52, similar primului cluster cele două tulpini la antibiotipare au făcut parte din același cluster
- c. al 3lea cluster are un grad de înrudire genetică de la 75% la 84%, acest cluster predomină în grupul analizat.
- 4. Relaționarea între tulpinile 115 și 53 a fost identificată și la antibiotipare, cele două tulpini aparținând aceluiași cluster, ceea ce confirmă înrudirea lor genetică.
- 5. Grupul H-2 (aspirate gastrice) a inclus 14 tipuri de profile genetice din care 4 sunt de tip unic:
 - a. . Primul cluster cuprinde 3 tipuri de profile cu grad de înrudire genetic de 84%.
 - b. Cu predominanță în grup este cel de-al 2 lea cluster, cu coeficient de înrudire de 75%, clusterul fiind format din 7 tipuri de profile; un grad înalt de înrudire este reprezentat de perechea de profile H2 – RF6 și H2 – RF7, fiind vorba de tulpinile 23 și 12
 - 6. Grupul H-3 (lichide pleurale) ia inclus 2 clustere:
 - a. Primul având coeficient de similitudine de 77% și este format din 2 tipuri de profile.
 - b. Al 2 lea cluster, ce predomină în grup, are 4 tipuri de profile, astfel grupul are 10 tipuri de profile din care 4 sunt de tip unic.
 - c. Înrudirea genetică ce depășește procentul de 90% o întâlnim între profilele H3 – RF3 și H3 – RF4, fiind reprezentate de tulpinile 90 și respectiv 87.
 - d. la antibiotipare cele două tulpini au prezentat un coeficient de similitudine de 0,78, similitudine fiind acum dovedită prin înrudirea genetică de 90%
 - 7. Grupul H-4 (spută) a inclus 3 clustere și 4 profile genetice de tip unic:
 - a. primul cluster are 2tipuri de profile genetice, coeficientul de înrudire depășește pragul stabilit de 0,70.
 - b. Cel de-a 2 lea cluster este înrudit într-un procent de 72%, fiind format din profilul H4 – RE1 și H4 – RE2, respectiv tulpinile 98 și 97.
 - c. Ultimul cluster este format din 4 tipuri de profile genetice, gradul lor de înrudire variază de la 71% la 76%.
 - d. Toate tulpinile din acest grup provin de la pacienți cu aceeași patologie de fond, respectiv pacienți diagnosticați cu Fibroză chistică
 - 8. Grupul H-5 (uroculturi) a inclus 3 clustere și 3 tipuri unice de profile genetice:

- a. Primul cluster este format din 2 tipuri de profile genetice, având coeficient de înrudire de 79%.
 - b. Cel de-al 2 lea cluster, cu procentajul de înrudire superior primului, 82%, este format din 2 tipuri de profile, H5 – RE1 și H5 – RE2, fiind vorba de tulpinile 114 și 22 izolate de la pacienți cu patologii de fond diferite, având în comun mediul de proveniență,
 - c. Ultimul cluster, predominant în acest grup, este format din 7 tipuri de profile cu diferite procente de similitudine, de la 74% până la 92%. Cel mai mare procentaj de înrudire fiind la perechea de profile H5 – RF1 și H5 – RF2, reprezentate de tulpinile 51 și 32, aceste izolate provin de la pacienți diferiți cu patologii diferite.
9. Grupul H-6 (secreții auriculare) a inclus 4 cluster care cuprind 20 de tipuri de profile genetice și 2 profile genetice unice:
- a. Primul cluster fiind reprezentat de 2 profile ce au coeficient de înrudire de 0,78.
 - b. Similar primului cluster, al 2 lea și al 3 lea cluster cuprind câte 2 tipuri de profile genetice având coeficient de înrudire inferior primului, respectiv de 0,71 și 0,75, înrudirea lor fiind semnificativă deoarece depășește pragul de 0,70 stabilit prin formulă matematică.
 - c. al 4-lea cluster cuprinde 12 tipuri de profile genetice, cu procentaje diferite de înrudire genetică, de la 74% până la 90%. H6 – RF11 și H6 – RF12, reprezentate de tulpinile 112 și 103, 105, 121 care au profilele genetice identice de 90%, ele au fost izolate de la pacienți diferiți, cu internați în unitate cu patologii de fond diferite
10. Grupul H-7 (colecții purulente postoperatorii) a inclus 3 cluster care cuprind 21 de tipuri de profile genetice și 7 profile de tip unic:
- a. Primul cluster are coeficient de înrudire de 0,71, în interiorul lui ajungându-se până la 92% înrudirea genetică.
 - b. Al 2 lea cluster este alcătuit din 5 tipuri de profile, coeficientul de înrudire variază de la 0,74 până la 0,90. H7 – RI1 și H7 – RI2, reprezentate de tulpinile 38 și 26 au profilul genetic înrudit în proporție de 90%, izolatele provin de la pacienți diferiți cu patologii de fond diferite.
 - c. Al 3-lea cluster analizat este format din 6 tipuri de profile genetice înrudite în procentaj de 73% până la 93%.
 - d. Profile H7 – RJ5 și H7 – RJ6, reprezentate de tulpinile 107 și 99, au coeficient de înrudire de 0,93.
 - e. Izolatele provin de la pacienți care provin din același mediu social, cu aceeași vârstă, dar cu patologii de fond diferite de tip cronic.

11. Grupul A-1 (exsudate otice) a inclus 2 cluster cu 9 tipuri de profile genetice:

a. Primul cluster cuprinde 3 tipuri de profile cu coeficient de înrudire de 0,73.

b. Cel de-al 2 lea cluster este format din 6 tipuri de profile, înrudirea genetică variază de la 72% până la 94%. Profilele A1 – RB5 și A1 – RB6, reprezentate de tulpinile 140 și 131 au gradul superior de înrudire genetică.

12. Grupul A-2 (colecții purulente perianale) a inclus 3 cluster cu 18 tipuri de profile genetice și 5 profile de tip unic:

a. Primul cluster este format din 2 profile cu coeficient de înrudire genetic de 0,72.

b. Al 2 lea cluster însumează 3 tipuri de profile cu variații ale coeficientului de înrudire de la 0,71 până la 0,83.

c. Al 3-lea cluster din acest grup, predominant de altfel, cuprinde 7 tipuri de profile genetice, similar celui de-al 2 lea cluster și aici întâlnim variații ale coeficientului de înrudire, de la 0,72 până la 0,86.

d. Tulpinile ce reprezintă profilele genetice din ultimul cluster au în comun rezultatele la antibiogramă, unde întâlnim o rezistență de aproximativ 100%.

13. Grupul A-3 (hemoculturi) a inclus un cluster cu 5 tipuri de profile genetice și un singur profil de tip unic:

a. Clusterul are coeficient de înrudire de 0,74.

b. În interiorul lui profilul A3 – RB3, reprezentat de tulpinile 149, 150, 151 și 156 și profilul A3 – RB4 reprezentat de tulpina 139 prezintă 88% înrudire genetică.

14. Grupul A-4 (secreții conjunctivale) a inclus un cluster cu 3 tipuri de profile genetice și un singur profil de tip unic:

a. coeficientul de înrudire ajunge până la 79%. A4 – RB2 și A4 – RB3

b. tulpinile prezintă 79% grad de înrudire, profilul de rezistență este aproximativ identic la aceste tulpini, care provin de la specii diferite (iepure, pisică, și câine).

15. Analiza de grup, realizată pe tulpinile reprezentative fiecărui profil a evidențiat un singur cluster și 6 profile de tip unic:

a. Clusterul este format din 5 tipuri de profile genetice, fiecare profil este reprezentat de câte un izolat din grupe diferite: TRG1 – H1 (aspirate bronșice recoltate de la oameni), TRG2 – A4 (secreții otice izolate de la animale de companie), TRG3 – A3 (septicemii de la animale), TRG4 –

H7 (izolate din secrețiile purulente postoperatorii de la oameni), TRG5 – A2 (izolate din abcese perianale de origine animală)

b. Cele 6 profile de tip unic sunt: TRA – H4 (izolate din spută), TRB – H6 (izolate din secreții otice), TRC – H3 (izolate din lichide plurale), TRD – A1 (izolate din secreții otice), TRE – H5 (izolate din probe de urină), TRF – H2 (izolate din aspirate gastrice).

c. În interiorul clusterului procentele de înrudire genetică variază de la 73% până la 91%. Profilul cu cel mai mare procentaj de înrudire, respectiv 91%, format din TRG4 – H7 și TRG5 – A2, a fost reprezentat de tulpinile izolate de la oameni din secrețiile postoperatorii și tulpini izolate din abcese perianale de la animale care au 91% procentul de înrudire genetică.

8. CONCLUZII FINALE ȘI RECOMANDĂRI

8. FINAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

8.1. CONCLUZII FINALE

1. S-au izolat și confirmat molecular 182 de tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*.
2. S-au izolat 125 (68,68%) tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană și 57 (31,32 %) tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de origine animală.
3. Din cele 125 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană, 15% proveneau din aspirate bronșice, 12% din aspirate gastrice, 10% din lichide pleurale, 21% din colecții purulente post operatorii, 20% din secreții auriculare și oculare, 10% din spută, 12% din uroculturi.
4. Din cele 57 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate de la animale, 30% proveneau din secreții otice, 44% din abcese perianale, 14% septicemii și 12% din conjunctivite.
5. Toate tulpinile au fost testate față de 13 antibiotice: imipenem, meropenem, piperacilin + tazobactam, ceftazidim, cefepim, ciprofloxacina, amikacin, gentamicin, tobramicin, aztreonam, polimixin B, piperacilin, tazobactam, care sunt uzual recomandate în patologia infecțioasă produsă de *Pseudomonas aeruginosa*.
6. Din cele 125 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de origine umană, 43,2% au fost rezistente la Meropenem, 41,6% au fost rezistente la Imipenem, 36% au fost rezistente la Cefepim, 32% au fost rezistente la Gentamicină, 28,8% au fost rezistente la Ceftazidim, 28,8% au fost la Piperacilin+tazobactam, 24% au fost rezistente la Tobramicină, 23,2% au fost rezistente la Ciprofloxacina, 19,2% au fost rezistente la amikacina, 18,4% au fost rezistente la Aztreonam, 14,4% au fost rezistente la Piperacilină, 14,4% au fost rezistente la Tazobactam și 8,8% au fost rezistente la Polimixină B.
7. Din cele 57 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* de origine animală, 100% au fost rezistente la Tazobactam, 100% au fost rezistente la Piperacilină, 98,24% au fost rezistente la TZP, 98,24% au fost

rezistente șa Cef tazidim, 96,49% au fost rezistente la Cefepim, 85,96% au fost rezistente la Polimixină B, 82,45% au fost rezistente la Ciprofloxacina, 78,94% au fost rezistente șa Meropenem, 75,43% au fost rezistente la Gentamicină, 73,68% au fost rezistente șa Aztreonam, 64,91% au fost rezistente la Imipenem, 54,38% au fost rezistente la Amikacin, 52,36% au fost rezistente la Tobramicin.

8. Antibiotiparea poate fi utilizată ca metodă de supraveghere epidemiologică, cu ajutorul ei se poate urmări într-un circuit închis proveniența tulpinilor izolate (ferme, spitale etc.).

9. Analiza genetică pe grupul total, înfăptuită pe baza similitudinii genetice, a fost realizată pe tulpinile reprezentative fiecărui profil, ea a evidențiat un singur cluster și 6 profile de tip unic:

a. Clusterul este format din 5 tipuri de profile genetice, fiecare profil fiind reprezentat de câte un izolat din grupe diferite: TRG1 – H1 (aspirate bronșice recoltate de la oameni), TRG2 – A4 (secreții otice izolate de la animale de companie), TRG3 – A3 (septicemii de la animale), TRG4 – H7 (izolate din secrețiile purulente postoperatorii de la oameni), TRG5 – A2 (izolate din abcese perianale de origine animală)

b. Cele 6 profile de tip unic sunt: TRA – H4 (izolate din spută), TRB – H6 (izolate din secreții otice), TRC – H3 (izolate din lichide plurale), TRD – A1 (izolate din secreții otice), TRE – H5 (izolate din probe de urină), TRF – H2 (izolate din aspirate gastrice).

c. În interiorul clusterului procente de înrudire genetică variază de la 73% până la 91%. Profilul cu cel mai mare procentaj de înrudire, respectiv 91%, format din TRG4 – H7 și TRG5 – A2, a fost reprezentat de tulpinile izolate de la oameni din secrețiile postoperatorii și tulpini izolate din abcese perianale de la animale

8.2. RECOMANDĂRI

Rezultatele studiului ne-au permis să propunem următoarele recomandări:

1. izolarea tulpinilor de *P. aeruginosa* pe mediul Pseudomonas Agar Base + supliment C-N (Oxoid, UK) – mediu înalt selectiv și care stimulează caracterele culturale specifice și reduce perioada de incubare de la 24-48 de ore la 12 – 16 h;

2. utilizarea mediului de cultură TSA pentru dezvoltarea tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* producătoare de biofilm;

3. utilizarea testelor biochimice RapID NF Plus de la Oxoid UK deoarece înjumătățește perioada de testare comparativ cu galeriile Api 20 NE;
4. instituirea antibioterapiei în infecțiile cu *P. aeruginosa* pe baza rezultatelor antibiogramei și respectarea posologiei și a duratei tratamentului pentru prevenirea fenomenului de antibiorezistență atât în medicina omului cât și în cea veterinară;
5. evitarea administrării aminopenicilinelor (ampicilina, amoxicilina) în infecțiile produse de *P. aeruginosa* întrucât bacteria este natural rezistentă la aceste antibiotice;
6. evitarea administrării uzuale a carbapenemelor - antibiotice cu spectru ultralarg și de rezervă – deoarece studiul nostru a evidențiat rezistența tulpinilor de origine animală la aceste substanțe antimicrobiene;
7. eliminarea animalelor comunitare din preajma instituțiilor medicale deoarece constituie vectori în transmiterea microorganismelor multidrog rezistente;
8. declararea izolatelor de *Pseudomonas aeruginosa* cu rezistență multiplă la antibiotice, pentru supravegherea epidemiologică a acestor tulpini;
9. folosirea în scopul supravegherii epidemiologice a metodei de antibiotipare, a cărei eficacitate a fost demonstrată în studiul nostru prin efectuarea în paralel a analizei RAPD.

8. FINAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

8.1. FINAL CONCLUSIONS

1. We isolated and molecularly confirmed 182 strains of *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Isolated 125 - (68.68%) *Pseudomonas aeruginosa* strains of human origin and 57 - (31.32%) strains of *Pseudomonas aeruginosa* animal.
3. Of the 125 strains of *Pseudomonas aeruginosa* of human origin, 15% came from bronchial aspirates, 12% of gastric aspirate, 10% of pleural fluid, 21% of postoperative purulent collections, 20% of ear and eye secretions, 10% sputum, 12% of urine cultures.
4. Out of the 57 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from animals, 30% came from the ear discharge, perianal abscess 44%, 14% and 12% of sepsis conjunctivitis.
5. All strains were tested against 13 antibiotics: imipenem, meropenem, piperacillin + tazobactam, ceftazidime, cefepime, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, tobramycin, aztreonam, polymyxin B, piperacillin, tazobactam, which are usually produced from infectious pathology *Pseudomonas aeruginosa*.
6. Of the 125 strains of *Pseudomonas aeruginosa* of human origin, 43.2% were resistant to Meropenem, 41.6% were resistant to imipenem, 36% were resistant to cefepime, 32% were resistant to gentamicin, 28.8% were resistant to ceftazidime, 28.8% piperacillin + tazobactam, 24% were resistant to tobramycin, 23.2% were resistant to ciprofloxacin, 19.2% were resistant to amikacin, 18, 4% were resistant to Aztreonam, 14.4% were resistant to piperacillin, 14.4% were resistant to Tazobactam and 8.8% were resistant to Polymyxin B.

7. Of the 57 strains of *Pseudomonas aeruginosa* animal, 100% were resistant to Tazobactam, 100% were resistant to piperacillin, 98.24% were resistant to TZP, 98.24% were resistant saddle Ceftazidim, 96.49% were resistant to cefepime, 85.96% were resistant to Polymyxin B, 82.45% were resistant to ciprofloxacin, 78.94% were resistant saddle Meropenem, 75.43% were resistant to gentamicin, 73.68% were resistant saddle Aztreonam, 64.91% were resistant to imipenem, 54.38% were resistant to Amikacin, 52.36% were resistant to tobramycin.

8. Antibiotyping can be used as a method of epidemiological surveillance with the help they can watch a closed circuit isolates origin (farms, hospitals etc).

9. Genetic analysis on the total group, achieved on the basis of genetic similarity was performed on representative strains of each profile, she revealed a single cluster and 6 unique profile type:

a. The cluster consists of 5 different genetic profiles, each profile being represented by one isolated from different groups: TRG1 - H1 (bronchial aspirate taken from humans), TRG2 - A4 (runny ear isolated from pets) TRG3 - A3 (septicemia from animals), TRG4 - H7 (postoperative purulent secretions isolated from humans), TRG5 - A2 (perianal abscess isolates of animal origin)

b. The 6 profiles unique type are: TRA - H4 (isolated from sputum), TRB - H6 (isolated from runny ear), TRC - H3 (isolated from liquid plural), TRD - A1 (isolated from runny ear), TRE - H5 (isolated from urine samples), TRF - H2 (isolated from gastric aspirates).

c. Inside the cluster genetic kinship percentages ranging from 73% to 91%. Profile with the highest percentage of consanguinity or 91%, consisting of TRG4 - TRG5 H7 - A2, was represented by strains isolated from humans secretions and postoperative perianal abscess isolates from animals

8.2. RECOMMENDATIONS

The study results allowed us to propose the following recommendations:

1. isolation of *P. aeruginosa* Pseudomonas Agar Base on environment-N + C supplement (Oxoid, UK) - and highly selective environment that

stimulates specific cultural characters and reduce the incubation period of 24-48 hours to 12-16 hours;

2. The use of the culture medium for the development of TSA-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm;

3. biochemical tests using the Oxoid Rapid NF Plus UK since halved the test period compared with galleries Api 20 NE;

4. establishment antibiotic in *P. aeruginosa* infections based antibiotic test results and compliance with dosage and duration of treatment to prevent the phenomenon of antibiotic resistance in both human medicine and in the veterinary;

5. avoid administration aminopenicilinelor (ampicillin, amoxicillin) in infections by *P. aeruginosa* bacteria are naturally resistant because these antibiotics;

6. usual to avoid the use of carbapenems - ultra-spectrum antibiotics and backup - because our study showed strains of animal resistance to these antimicrobials;

7. eliminating stray animals around medical institutions because they constitute vectors in the transmission of multidrug-resistant microorganisms;

8. declaration of *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to multiple antibiotics for epidemiological surveillance of these strains;

9. use in epidemiological surveillance purposes antibiotipare method, whose efficacy has been demonstrated in our study performed in parallel by RAPD analysis.

BIBLIOGRAFIE BIBLIOGRAPHY

1. Agerso Y., D. Sandvang, 2005, *Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in alcaligenes, arthrobacter, and Pseudomonas spp. isolated from pigsties and manured soil*, Appl.Envirom. Microbiol., 71(12): 7941-7;
2. Ambler R. P., 1980-*The structure of β -lactamases*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B 289:321-331
3. Ami Varaiya, Nikhil Kulkarni, Manasi Kulkarni, Pallavi Bhalekar, Jyotsana Dogra. *Incidence of metallo beta lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in ICU patients*. Indian J Med Res. April 2008;127: 398-402
4. Andreea Paula Cozma, Ioana Crivei, **Oana – Alexandra Ciocan**, Catalin Carp-Cărare, Cristina Rimbu, Eleonora Guguianu, Cristina Horhoge, Mihai Carp-Cărare, *The Prevalence of Positive ESBL E. Coli and Klebsiella pneumoniae strains isolated from the owners of pets 2016 (acceptată, în curs de publicare – Mai 2017)*
5. Andreea-Paula Cozma, **Oana-Alexandra Ciocan**, Cătălin Carp-Cărare, Eleonora Guguianu, Cristina Horhoge, Cristina Rîmbu, Mihai Mareş, Mihai Carp – Cărare, *Lucrări Ştiinţifice Medicină Veterinară Timişoara*, Vol. 49 (3) *The Prevalence of ESBL-producing strains of E.Coli, isolated from calves with colibacillosis - Preliminary Remarks 2016*
6. Angheliescu M. *Ghid practice de antibioterapie* – Editura Medicală, Bucureşti, 1988
7. Baxter I, Lambert P. *The effect of zinc on imipenem*. J Antimicrob Chemoter 1997
8. Bellais S, Mimoz O, Léotard S et al. *Efficacy of β -lactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolysing metallo- β -lactamase-producing strain of Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemoter 2002

9. Bennett PM. *Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement*. Methods Mol Biol 2004
10. Bennett PM. *Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria*. J Antimicrob Chemoter 1999
11. Bergés L, Rodriguez-Villalobos H, Deplano A, Struelens M J. *Prospective evaluation of imipenem/EDTA combined disc and Etest for detection of metallo- β -lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemoter 2007
12. Borcan E, Ghiță C. M., Chifiriuc M. C, Măruțescu L, Isar C, Lazăr V., 2009- *Antibiotic resistance of Gram negative bacilli strains isolated from the Intensive Care Unit in Fundeni*, Clinical Institute, Bucharest, Romania., Roum Arch Microbiol Immunol. 2009 Oct-Dec;68(4):228-34
13. Bradford PA. *Extended-spectrum β -lactamase in the 21st century: characterisation, epidemiology, and detection of this important resistance threat*. Clin Microbiol Rev 2001
14. Brock Th., 2005- *Biology of microorganisms*, 11th , Ed. Madigan M. T., Martinko J.M, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey
15. Buiuc D., Neguț M., 2010- *Tratat de microbiologie clinică* Ed.alIII-a revizuită și adăugită Editura Medicală, București
16. Buiuc D., Neguț M.. 1999, *Tratat de microbiologie clinică*. – București, 1999.P. 591 – 925.
17. Carp-Cărare C., Guguianu Eleonora, Rîmbu Cristina, 2015 – *Bacteriologie specială. Îndrumător de lucrări practice*. Ed. „Ion Ionescu de la Brad” Iași
18. Carp-Cărare M., 1991 – *Microbiologie. Curs*.Institutul Agronomic „Ion Ionescu de la Brad „” Iași.
19. Carp-Cărare M., 2001 –*Microbiologie veterinară. Virusologie*. Casa de Editură Venus, Iași
20. Carp-Cărare M., Guguianu E., Timofte D., 1997- *Lucrări Practice de Microbiologie Veterinară*, Uz Intern , Iași
21. Cheol-In Kang, Sung-Han Kim, Hong-Bin Kim, Sang-Won Park, Young-Ju Choe, Myoung-don Oh, Eui-Chong Kim, and Kang-Won Choe, 2003, *Pseudomonas aeruginosa Bacteremia: Risk Factors for Mortality and Influence of Delayed Receipt of Effective Antimicrobial Therapy on Clinical Outcome* Clinical Infectious Diseases 2003; 37:745–751
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 22th informational supplement. 2015; CLSI M100-S22, Wayne PA.

23. Coban I, Adsay NV, 2009 *Pancreatic chyst pathologic classification, diferential diagnosis, and clinical implication*, Arch Pathol Lab Med 133(3):423-438
24. Codiță I, Buiuc D. 2008 *Determinarea sensibilității la antibiotice: tehnici cantitative. Tratat de Microbiologie Clinică*. Ediția a II-a. București: Editura Medicală, 2008, 440-7.
25. Codiță I, Buiuc D. *Determinarea sesibilității la antibiotic: tehnici calitative*. În Buiuc D, Neguț M (eds) *Tratat de micribiologie clinică*, 3rd ed. București: Ed. Medicală, 2009
26. Coman, G; Panzaru, C; Dahorea, C; Carlan, M; Butnaru, F. *Advantages of blood agar-NaCl selective medium in the isolation of beta-hemolytic streptococci from throat swabs, streptococci and the host*, 1997, 418(): 41-43
27. Cura P., *Farmacologie veterinară*, 1996, Ed. Apollonia Iași
28. Donescu, D; Somoghi, R; Ghiurea, M; Ianchis, R; Petcu, C; Gavrilui, S; Lungu, M; Groza, C; Ionescu, CR; Panzaru, C. *Aqueous dispersions of silver nanoparticles in polyelectrolyte solutions*, JOURNAL OF CHEMICAL SCIENCES, 2013, 125(2): 419-429.
29. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); *Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals*. EFSA Journal 2011;9(8):2322. [95 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2322. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
30. Geffers Gastmeier P1, Geffers C, Schwab F, Fitzner J, Obladen M, Rüden H.- 2004, *Development of a surveillance system for nosocomial infections: the component for neonatal intensive care units in Germany*. J Hosp Infect. 2004 Jun;57(2):126-31.
31. Gheorghe Răpunțean, Sorin Răpunțean, *Bacteriologie Veterinară Specială*, Cluj-Napoca 2005
32. Guguianu E., 2002- *Bacteriologie generală*, Casa de Editură Venus, Iași.
33. Gulhan T, Aksakal A, Ekin IH, Savasan S, Boynukara B. 2006, *Virulence factors of Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis strains isolated from humans and pets*. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2006;30:477–482
34. Ioana CRIVEI, Andreea Paula COZMA, Oana Alexandra CIOCAN, Ionuț BORȘ, Petru ROȘCA, Dan DRUGOCIU *Preliminary remarks regarding the prevalence of ESBL-Producing Strains of E.Coli*

and *K. Pneumoniae*, isolated from cows with clinical endometritis Bulletin UASVM Veterinary Medicine Cluj Napoca (acceptată, în curs de publicare – Mai 2017)

35. Iulian Țogoe, Mimi Dobrea, *Bacteriologie Veterinară*, 2005

36. Iuliana E. Maciuca, Nicola J. Williams, Cristina Tuchilus, Olivia Dorneanu, Eleonora Guguianu, Catalin Carp-Carare, Cristina Rimbu, Dorina Timofte, 2015 *High Prevalence of Escherichia coli-Producing CTX-M-15 Extended-Spectrum BetaLactamases in Poultry and Human Clinical Isolates in Romania*, MICROBIAL DRUG RESISTANCE, Impact factor 2.524, Volume 12, Number 25, , DOI: 10.1089/mdr.2014.0248

37. Keith Poole, 2011, *Pseudomonas aeruginosa: resistance to the max.* *Frontiers in Microbiology*. Cellular and infection Microbiology. April 2011; 2(65):1-7.

38. Livermore DM, 2001, *J Antimicrob Chemother.* 2001 *Detection of beta-lactamase-mediated resistance.* Livermore DM1, Brown DF. 2001 - Jul;48 Suppl 1:59-64.

39. Livermore M. D., -1995 *β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance* *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 1995, p. 557–584 Vol. 8, No. 4

40. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. 2002, *Lung infections associated with cystic fibrosis.* *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:194–222.

41. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012 *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance.* *Clin Microbiol Infect.* 2012 Mar;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Epub 2011 Jul 27.

42. Mărculescu A., Cernea M., Nueleanu V., Oros N.A., Chereji R., 2007 –*Rezistența microbiană față de antibiotice*, *Rev. Medicamentul Veterinar/Veterinary Drug* vol. 1, No. 1, Iulie 2007.

43. Marculescu, (2007) Salgado CD, Dash S, Cantey JR, Marculescu CE. 2007, *Higher risk of failure of methicillin-resistant Staphylococcus aureus prosthetic joint infections.* *Clin Orthop Relat Res.* 2007;461:48–53.

44. Mariana GRECU, Alina ANTON, Cristina RIMBU, **Oana CIOCAN**, Mihai MAREȘ, Valentin NĂSTASĂ *Lucrări Științifice USAMV IAȘI – seria Medicină Veterinară*, Volumul 59/2016 (nr. 4) *Evaluation of the*

Antimicrobial effect of the two substances used in Otitis extern in dogs
The Prevalence of positive ESBL E. Coli and Klebsiella Pneumoniae strains in the Dogs in the Iasi Paddock, 2015

45. Mereuță Ana Irina, Aida Corina Bădescu, Olivia Simona Dorneanu, Luminița Smaranda Iancu*, Cristina Gabriela Tuchiluș, 2013 *Răspândirea metalo-beta-lactamazei VIM-2 printre izolate clinice de Pseudomonas aeruginosa și Acinetobacter baumannii din Iași, Romania*, Revista Română de Medicină de Laborator Vol. 21, Nr. 4/4, Decembrie 2013

46. Mihăescu Gr., Chifiriuc, M. C, Dițu L. M., 2007- *Antibiotice și substanțe chimioterapeutice antimicrobiene.*– Editura Academiei Române, București

47. Mirela Petrașcu, Mirela Flonta, Ariana Mihaela Almaș, 2011, *Fenotipuri de rezistență pentru tulpini de Escherichia coli și Klebsiella pneumoniae producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (BLSE), izolate din infecții urinare*, Clujul Medical 2011 Vol. 84 - nr. 3

48. Năstasă Valentin., 2005 – *Farmacologie veterinară*, vol. I. Ed. „Ion Ionescu de la Brad”, Iași, ISBN: 973-7921-53-4

49. Nicodim Iosif FIȚ, 2008, *Microbiologie Generală Veterinară*; ed. AcademicPres.

50. **Oana – Alexandra Ciocan (Moțco)**, Alper Ciftci, Mihai Carp – Cărare, Mihai Mareș, Mariana Grecu, Cătălin Carp – Cărare, Carmen – Valentina Panzaru *Lucrări Științifice USAMV IAȘI – seria Medicină Veterinară*, Volumul 59/2016 (nr.3-4) *Comparative Evaluation of Three Testing Methods for Detection of Mediated Resistance MBL In Pseudomonas aeruginosa isolates*

51. **Oana – Alexandra Ciocan (Moțco)**, Alper Ciftci, Mihai Carp – Cărare, Mihai Mareș, Mariana Grecu, Cătălin Carp – Cărare, Carmen – Valentina Panzaru *Lucrări Științifice USAMV IAȘI – seria Medicină Veterinară*, Volumul 59/2016 (nr.3-4) *The First Case of Isolation and Identification of Acinetobacter Radioresistens in Infant from Iasi County (Case Report)*

52. **Oana – Alexandra CIOCAN (MOTCO)**, Alper ÇİFTÇİ, Mihai CARP – CĂRARE, Mihai MAREȘ, Eleonora GUGUIANU, Ioana CRIVEI, Carmen – Valentina PANZARU, Cătălin CARP – CĂRARE *Bulletin UASVM Veterinary Medicine* 73(2) / 2016, Print ISSN 1843-5270; Electronic ISSN 1843-5378 DOI:10.15835/buasvmcn-vm: 12202, CLUJ – NAPOCA *The Prevalence of Pseudomonas aeruginosa strains in Infants with Cystic Fibrosis in a Hospital from North Easter Romania*

- 53. Oana – Alexandra Ciocan (Motco), Alper Çiftçi, Mihai Carp – Cărare, Mihai Mareş, Eleonora Guguianu, Cristina Rîmbu, Mariana Grecu, Cătălin Carp – Cărare** *Lucrări Ştiinţifice USAMV Iaşi – seria Medicină Veterinară*, volumul 59/2016 (nr.3-4) *Determination of biofilm production in animals originated Pseudomonas aeruginosa strains*
- 54. Oana – Alexandra CIOCAN (MOTCO), Alper ÇİFTÇİ, Yagmur KOÇAK, Mihai CARP – CĂRARE, Mihai MAREŞ, Andreea – Paula COZMA, Ioana CRIVEI, Eleonora GUGUIANU, Cristina RÎMBU, Carmen - Valentina PANZARU, Cătălin CARP – CĂRARE** *Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine. Vol. LXII (1) ISSN 2065-1295; ISSN 2343-9394 (CD-ROM); ISSN 2067-3663 (Online); ISSN-L 2065-1295, BUCUREŞTI Phenotypes of fluoroquinolone resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from a Romanian Hospital*
- 55. Oana – Alexandra Ciocan (Motco), Mihai Carp – Cărare** *Classifying Pseudomonas aeruginosa strains of animal origin in MDR, XDR And PDR by determining the resistance to antibiotics* *Lucrări Ştiinţifice USAMV Iaşi – seria Medicină Veterinară*, volumul 57/2014 (nr.1-2)
- 56. Oana – Alexandra CIOCAN (MOTCO), Mihai CARP – CĂRARE, Carmen – Valentina PANZARU, Elena PETRARU** *Bulletin UASVM Veterinary Medicine 71(2) / 2014, Print ISSN 1843-5270; Electronic ISSN 1843-5378 DOI:10.15835/buasvmcn-vm: 10644, CLUJ – NAPOCA* *Classifying Pseudomonas aeruginosa strains of human origin in MDR, XDR and PDR by determining the resistance to antibiotics from seven groups*
- 57. Oana – Alexandra Ciocan, Andreea – Paula Cozma, Irina Lipovan (Abalaşei), Eleonora Guguianu, Carmen - Valentina Panzaru, Mihai Mareş, Mihai Carp – Cărare, Cătălin Carp – Cărare** *Lucrări Ştiinţifice USAMV IAŞI Vol. 58 Medicină Veterinară Partea 3, 2015* *Antibiotics Resistance Dynamics of isolated Pseudomonas aeruginosa strains in a hospital from Northeastern Romania in the period 2012 – 2014*
- 58. Oana – Alexandra Ciocan, Cătălin Carp – Cărare, Andreea – Paula Cozma, Eleonora Guguianu, Cristina Rîmbu, Elena Petraru, Stratulat Petercă Emma Cecilia, Carmen - Valentina Panzaru, Mihai Carp – Cărare** *Lucrări Ştiinţifice USAMV IAŞI Vol. 58 Medicină Veterinară Partea a3a, 2015* *Resistance Phenotypes of Pseudomonas aeruginosa strains of human origin in Aminoglycosides*

59. **Oana – Alexandra Ciocan**, M. Carp – Cărare, Cristina Rîmbu, Andreea – Paula Cozma, C. Carp – Cărare, Eleonora Guguianu, Carmen – Valentina Panzaru *Lucrări Științifice Medicină Veterinară* vol. XLVIII (3), 2015, *TIMIȘOARA The Incidence of dog recurrent otitis caused by strains of Multidrug-Resistant (MDR) Pseudomonas aeruginosa*
60. **Oana – Alexandra CIOCAN**, Mihai CARP – CĂRARE, Cătălin CARP – CĂRARE, Andreea – Paula COZMA, Eleonora GUGUIANU, Cristina RÎMBU, Elena Petraru, Carmen - Valentina PANZARU *Bulletin UASVM Veterinary Medicine* 72(2) / 2015, Print ISSN 1843-5270; Electronic ISSN 1843-5378 DOI:10.15835/buasvmcn-vm: 11530, CLUJ – NAPOCA *Resistance Phenotypes of Pseudomonas aeruginosa strains of human origin in B – Lactamases*
61. **Oana – Alexandra CIOCAN**, Mihai CARP CĂRARE, Andreea – Paula COZMA, Cătălin CARP – CĂRARE, Cristina RÎMBU, Gabriela COMAN, Elena PETRARU, Carmen – Valentina PANZARU *Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine. Vol. LXI (2)* ISSN 2065-1295; ISSN 2343-9394 (CD-ROM); ISSN 2067-3663 (Online); ISSN-L 2065-1295, BUCUREȘTI *Isolation and Identification of Pseudomonas aeruginosa strains producing B-Lactamases (ESBL) and Carbapenemases (MBL) of human origin*
62. **Oana-Alexandra CIOCAN**, Mihai CARP-CĂRARE *Detectarea rapidă a tulpinilor de Pseudomonas aeruginosa de origine animală* *Lucrări Științifice Volumul 40 Medicină Veterinară*, CHIȘINĂU, 2014
63. Palleroni NJ, 2008 *The road to the taxonomy of Pseudomonas*. In: Cornelis P, editor. *Pseudomonas: Genomic and Molecular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press. 1–18
64. Paula-Maria Saftencu, Andreea-Paula Cozma, **Oana-Alexandra Ciocan**, Sorin Pasca, Gheorghe Solcan, *Lucrări Științifice USAMV IAȘI – seria Medicină Veterinară* 2015 *A case of cystitis produced by ESBL-Positive Escherichia Coli in a male cat*
65. Panzaru, C; Diculencu, D; Apetrei, C; Dahorea, C; Coman, G. *The study of penicillin tolerance in Streptococcus pyogenes, STREPTOCOCCI AND THE HOST*, 1997, 418(): 453-455.
66. Răpunțean Sorin, Răpunțean Gheorghe. 2015, *Bacteriologie veterinară specială* – Cluj-Napoca: AcademicPres, 2015 ISBN 978-973-744-466-0.
67. Richard B.Thomson JR., J.Michael Miller. 2003 - *Specimen Collection, Transport, and Processing: Bacteriology*. In *Manual of Clinical Microbiology*. Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen,

Michael A.Pfaller, Robert H. Yolken, ASM PRESS, USA, 8 ed. 2003; 20: 286-330

68. Richards, Dacheux D1, Toussaint B, Richard M, Brochier G, Croize J, Attree I., 2000, *Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils*. Infect Immun. 2000 May;68(5):2916-24

69. Rushton H.G., 2007, *Urinary tract infections in children*. Pediatr. Clin. North Am., 1997, 44(5): 1133-1164 Wilson J., 2007

70. Seol Gurung M., Moon D. C., Tamang M. D., Kim J., Lee Y. C., Seol S. Y., Cho D. T., Lee J. C. (2010). *Emergence of 16S rRNA methylase gene armA and cocarriage of blaIMP-1 in Pseudomonas aeruginosa isolates from South Korea*. Diagn. Microbiol. Infect Dis. 68, 468–470

71. Sjölund M., 2004- *Development and Stability of Antibiotic Resistance*, Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala p 9-15

72. Solcan C., 2008, *-Biologie moleculară generală și aplicată*, Editura Tehnopress, Iași 2008

73. Stainer R.Y., (1975) *Reflexion sur la taxonomie des Pseudomonas* – Bull. Inst. Pasteur, 74, 255-270

74. Stamatin N. – (1957) *Microbiologie veterinară*, vol II, Ed. Agro-Silvică

75. Stanca Lucia Pandrea, Lia Monica Junie, 2011, *Pseudomonas aeruginosa: fenotipuri de rezistență la antibiotice*, Clujul Medical 2011 Vol. 84 - nr. 1

76. Stancă Lucia Pandrea, Lia Monica Junie, 2011, *Pseudomonas aeruginosa: fenotipuri de rezistență la antibiotice*, Clujul Medical 2011 Vol. 84 - nr. 1

77. Stover CK1, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S., 2000. *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*. Olson MV. Nature Aug 31;406(6799):959-64

78. Véron și Berche, 1976, Boukadida J, de Montalembert M, Gaillard JL, Gobin J, Grimont F, Girault D, Véron M, Berche P. 1991 *Outbreak of gut colonization by Pseudomonas aeruginosa in immunocompromised*

children undergoing total digestive decontamination: analysis by pulsed-field electrophoresis. J Clin Microbiol. Sep;29(9):2068–2071

79. www.cmvro.ro/#!__publicatii
80. www.ehagroup.com/resources/pathogens/pseudomonas-aeruginosa/
81. www.ema.europa.eu
82. www.engr.psu.edu/iec/abe/database/bPseudoA.htm
83. www.hpa.org.uk
84. www.microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_aeruginosa
85. www.pediatrics.answers.com/health/is-pseudomonas-aeruginosa-contagious
86. www.pseudomonas.com/genomeMenu.do?strain_id=81
87. www.pseudomonas.com/p_aerug.jsp
88. www.pubmlst.org/paeruginosa/
89. www.rmr.medica.ro/
90. www.rrml.ro/
91. www.sciencedirect.com/
92. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857910005352
93. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X11000862
94. www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html

ANEXE ANNEXES

LISTA TABELELOR

Tabelul 2.1 Mecanismele rezistenței bacteriene (Oniga C., 2003, citat de Marculescu, 2007).....	46
Tabelul 5.1 Elementele necesare reacției PCR.....	80
Proveniența tulpinilor de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de origine umană.....	84
Tabelul 5.3 Proveniența tulpinilor de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de origine animală.....	85
Tabelul 6.1 Tulpini de <i>P. aeruginosa</i> de origine umană izolate din aspirate bronșice H – 1	93
Tabelul 6.2 Rezultatele la antibiogramă pe tulpinile umane de <i>P. aeruginosa</i> obținute din aspirate bronșice H-1.....	94
Tabelul 6.3 Tulpini de <i>P. aeruginosa</i> de origine umană izolate din aspirate gastrice H2.....	97
Tabelul 6.4 Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de <i>P. aeruginosa</i> de origine umană izolate din aspiratele gastrice (H-2).....	98
Tabelul 6.5 Tulpini de <i>P. aeruginosa</i> de origine umană izolate din lichidul pleural H-3.....	100
Tabelul 6.6 Rezultatele obținute la antibiograma realizată pe tulpinile de <i>P. aeruginosa</i> de origine umană din lichidul pleural, H-3.....	101
Tabelul 6.7 Tulpini de <i>P. aeruginosa</i> de origine umană izolate din probele de spută H – 4.....	103
Tabelul 6.8 Rezultatele obținute la antibiograma realizată pe tulpinile de <i>P. aeruginosa</i> de origine umană din probele de spută, H-4.....	104
Tabelul 6.9. Tulpini de <i>P. aeruginosa</i> de origine umană izolate din probele de urină H-5.....	107
Tabelul 6.10 Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de <i>P. aeruginosa</i> de origine umană din probele de urină H-5.....	108
Tabelul 6.11 Tulpini de <i>P. aeruginosa</i> de origine umană izolate din secrețiile otice H – 6.....	110
Tabelul 6.12 Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de <i>P. aeruginosa</i> de origine umană din secrețiile otice H 6.....	111
Tabelul 6.13 Tulpini de <i>P. aeruginosa</i> de origine umană izolate din colecții purulente postoperatorii H-7.....	114
Tabel 6.14 Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de <i>P. aeruginosa</i> de origine umană din colecții purulente postoperatorii H-7.....	116
Tabelul 6.15 Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de <i>P. aeruginosa</i> de origine animală izolate din otite, A – 1.....	119
Tabelul 6.16 Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de <i>P. aeruginosa</i> de origine animală izolate din abcese perianale.....	122
Tabelul 6.17 Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de <i>P. aeruginosa</i> de origine animală izolate din septicemii, A – 3.....	124
Tabelul 6.18 Rezultatele obținute la antibiogramă pe tulpinile de <i>P. aeruginosa</i> de origine animală izolate din conjunctivite, A – 4.....	126
Tabelul 7.1 Factorul de discriminare pentru loturile de origine umană.....	144
Tabelul 7.2 Factorul de discriminare pentru loturile de origine animală.....	151

LIST OF TABLES

Table 2.1 Bacterial resistance mechanisms (Oniga C., 2003, cited by Marculescu, 2007).....	46
Table 5.1 The necessary elements PCR.....	80
Table 5.2 The source of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains of human origin.....	84
Table 5.3 The source of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains of animal origin.....	85
Table 6.1 H-1 <i>P. aeruginosa</i> strains of human origin isolated from bronchial aspirates.....	93
Table 6.2 The results of the antibiotic on the human strains of <i>P. aeruginosa</i> obtained from bronchial aspirates (H-1).....	94
Table 6.3 H – 2 <i>P. aeruginosa</i> strains of human origin isolated from gastric aspirates.....	97
Table 6.4 The results obtained from the antibiotic of <i>P. aeruginosa</i> strains of human origin isolated from gastric aspirates (H-2).....	98
Table 6.5 <i>P. aeruginosa</i> strains of human origin isolated from pleural fluid H-3.....	100
Table 6.6 The results obtained from the antibiotic strains of <i>P. aeruginosa</i> in the pleural fluid of human origin, H-3.....	101
Table 6.7 <i>P. aeruginosa</i> strains of human origin isolated from sputum samples H-4.....	103
Table 6.8 The results obtained from the antibiotic strains of <i>P. aeruginosa</i> from sputum samples of human origin, H-4.....	104
Table 6.9 <i>P. aeruginosa</i> strains of human origin isolated from urine samples H-5.....	107
Table 6.10 The results obtained from the antibiotic strains of <i>P. aeruginosa</i> in samples of human urine H-5.....	108
Table 6.11 <i>P. aeruginosa</i> strains of human origin isolated from ear secretions H-6.....	110
Table 6.12 The results obtained from the antibiotic of <i>P. aeruginosa</i> strains of human secretions ear H-6.....	111
Table 6.13 <i>P. aeruginosa</i> strains of human origin isolated from postoperative purulent collections H-7.....	114
Table 6.14 The results obtained from the antibiotic of <i>P. aeruginosa</i> strains of human origin of postoperative purulent collections H-7.....	116
Table 6.15 The results obtained from the antibiotic of <i>P. aeruginosa</i> strains isolated from animal otitis A – 1.....	119
Table 6.16 The results obtained from the antibiotic of <i>P. aeruginosa</i> strains isolated from animal perianal abscess.....	122
Table 6.17 The results obtained from the antibiotic of <i>P. aeruginosa</i> strains isolated from animal sepsis, A – 3.....	124
Table 6.18 The results obtained from the antibiotic of <i>P. aeruginosa</i> strains isolated from animal conjunctivitis, A – 4.....	126
Table 7.1 Discrimination factor for lots of human origin.....	144
Table 7.2 Discrimination factor for lots of animal origin.....	151

LIST OF FIGURES

Fig. 2.1 The main mechanisms of action of antibiotics (after Marculescu, 2007).....	42
Fig. 5.1 Steps of bacteriological diagnosis (Carp - Cărare C. și colab., (2015)).....	69
Fig. 5.2 Medium + supplement <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
Fig. 5.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> agar – culture 24 hours (original).....	70
Fig. 5.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - nutrient broth (original).....	71
Fig. 5.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – nutritious agar culture 12 h - 37° C (original).....	72
Fig. 5.6 Environment <i>Pseudomonas</i> Agar Base + Extra C-N Oxoid, UK original.....	72
Fig. 5.7 Appearance mucoid colonies (original) a. TSA agar b. <i>Pseudomonas</i> agar + CN P.A.....	73
Fig. 5.8 <i>Pseudomonas fluorescens</i> nutrient broth - 24 hours (original).....	74
Fig. 5.9 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – bacterioscopic exam (original).....	75
Fig. 5.10 Biochemical confirmation with Rapid NF Plus System Oxoid (original).....	76
Fig. 5.11 Biochemical confirmation with API 20 NE (original).....	76
Fig. 5.12 Thermal block JSR (original).....	77
Fig. 5.13 Centrifuge Thermo (original).....	77
Fig. 5.14 NanoDrop Spectrophotometer ND2000 (original).....	78
Fig. 5.15 Preparation in order of the mix to achieve amplification (original)...	79
Fig. 5.16 Thermal cycler (original).....	81
Fig. 5.17 Charging amplicons in agarose gel (original).....	82
Fig. 5.18 DigiDoc-It 125 Imaging System UVP, USA (original).....	82
Fig. 5.19 Visualized under UV light (original).....	83
Fig. 5.20 Graphic representation isolates of human origin.....	84
Fig. 5.21 Graphic representation isolates of animal origin.....	85
Fig. 5.22 Molecular confirmation – lot strains 1 – 21 (original).....	86
Fig. 5.23 Molecular confirmation – lot strains 22 – 40 (original).....	86
Fig. 5.24 Molecular confirmation – lot strains 41 – 64 (original).....	86
Fig. 5.25 Molecular confirmation – lot strains 65 – 75 (original).....	86
Fig. 5.26 Molecular confirmation – lot strains 76 – 87 (original).....	87
Fig. 5.27 Molecular confirmation – lot strains 88 – 111(original).....	87
Fig. 5.28 Molecular confirmation – lot strains 112 – 149 (original).....	87
Fig. 5.29 Molecular confirmation – lot strains 150 – 170 (original).....	87
Fig. 5.30 Molecular confirmation – lot strains 171 – 182 (original).....	88
Fig. 6.1 Preparation of the bacterial suspension for antibiotic susceptibility testing.....	90
Fig. 6.2. The layout of the microdisks on culture medium.....	91
Fig. 6.3 Interpretation of the results after 24 hours of incubation (original)....	91
Fig. 6.4 The incidence of microbial resistance of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains of H-1.....	95
Fig. 6.5 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics , group H-1.....	98

Fig. 6.6 The incidence of microbial resistance strains of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> of H-2.....	98
Fig. 6.7 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics group H-2.....	99
Fig. 6.8 The incidence of microbial resistance strains of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in group H-3.....	102
Fig. 6.9 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics group H-3.....	102
Fig. 6.10 The incidence of microbial resistance strains of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in group H-4.....	105
Fig. 6.11 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics group H-4.....	106
Fig.6.12 incidence of microbial resistance strains of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in group H-5.....	109
Fig. 6.13 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics group H-5.....	109
Fig.6.14 Incidence of microbial resistance strains of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in group H-6.....	112
Fig. 6.15 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics group H-6.....	113
Fig.6.16 Incidence of microbial resistance strains of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in group H-7.....	117
Fig. 6.17 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics group H-7.....	118
Fig. 6.18 The incidence of microbial resistance of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains from the group A-2.....	120
Fig. 6.19 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics ,, the group A-1.....	121
6.20 The incidence of microbial resistance of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains from the group A-2.....	123
Fig. 6.21 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics in group A-2.....	124
Fig. 6.22 The incidence of microbial resistance of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains from the group A-3.....	125
Fig. 6.23 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics in group A-3.....	126
Fig. 6.24 The incidence of microbial resistance of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains from the group A-4.....	127
Fig. 6.25 Graphical representation of bacterial susceptibility to antibiotics the group A-4.....	127
Fig. 6.26 Culture of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Brilliance ESBL agar medium at 24 hours of incubation (original).....	133
Fig. 6.27 Synergy between the two tablets test for detecting ESBL (original).....	134
Fig 6.28 Cephalosporins simple method discs and enhanced with clavulanic acid (original) – first step.....	135
Fig 6.28 Cephalosporins simple method discs and enhanced with clavulanic acid (original) – second step.....	135
Fig. 6.29 Strain of <i>P. aeruginosa</i> resistance to carbapenems.....	136

Fig. 6.30 Brilliance CRE Agar inoculated directly with the urine sample (original) – first step.....	137
Fig. 6.30 Brilliance CRE Agar inoculated directly with the urine sample (original) – second step.....	137
Fig. 6.31 Combined disc method imipenem - EDTA screening for MBL.....	139
Fig. 6.32 Culture of <i>P. aeruginosa</i> tested IMP and simple disc containing an inhibitor of the MBL that EDTA.....	139
Fig. 6.33 E-test MBL.....	140
Fig. 7.1 Antibiotyping Group H - 1 <i>P. aeruginosa</i> of human origin.....	145
Fig. 7.2 Antibiotyping Group H - 2 <i>P. aeruginosa</i> of human origin.....	146
Fig. 7.3 Antibiotyping Group H - 3 <i>P. aeruginosa</i> of human origin.....	146
Fig. 7.4 Antibiotyping Group H - 4 <i>P. aeruginosa</i> of human origin.....	147
Fig. 7.5 Antibiotyping Group H - 5 <i>P. aeruginosa</i> of human origin.....	148
Fig. 7.6 Antibiotyping Group H - 6 <i>P. aeruginosa</i> of human origin.....	149
Fig. 7.7 Antibiotyping Group H - 7 <i>P. aeruginosa</i> of human origin.....	150
Fig. 7.8 Antibiotyping Group A - 1 <i>P. aeruginosa</i> of animal origin.....	151
Fig. 7.9 Antibiotyping Group A - 2 <i>P. aeruginosa</i> of animal origin.....	152
Fig. 7.10 Antibiotyping Group A - 3 <i>P. aeruginosa</i> of animal origin.....	153
Fig. 7.11 Antibiotyping Group A - 4 <i>P. aeruginosa</i> of animal origin.....	154
Fig. 7.12 Viewing Group 1 DNA bands of human origin.....	157
Fig 7.13 Genotyping Group H - 1 <i>P. aeruginosa</i> of human origin.....	158
Fig. 7.14 Viewing Group 2 DNA bands of human origin.....	159
Fig 7.15 Genotyping Group H - 2 <i>P. aeruginosa</i> of human origin.....	159
Fig. 7.16 Viewing Group 3 DNA bands of human origin.....	160
Fig 7.17 Genotyping Group H - 3 <i>P. aeruginosa</i> of human origin.....	160
Fig. 7.18 Viewing Group 4 DNA bands of human origin.....	161
Fig. 7.19 Genotyping Group H - 4 <i>P. aeruginosa</i> of human origin.....	161
Fig. 7.20 Viewing Group 5 DNA bands of human origin.....	162
Fig 7.21 Genotyping Group H - 5 <i>P. aeruginosa</i> of human origin.....	163
Fig. 7.22 Viewing Group 6 DNA bands of human origin.....	163
Fig 7.23 Genotyping Group H - 6 <i>P. aeruginosa</i> of human origin.....	164
Fig. 7.24 Viewing Group 7 DNA bands of human origin.....	165
Fig 7.25 Genotyping Group H - 1 <i>P. aeruginosa</i> of human origin.....	165
Fig. 7.26 Viewing Group 1 DNA bands of animal origin.....	166
Fig 7.27 Genotyping Group H - 1 <i>P. aeruginosa</i> of animal origin.....	166
Fig. 7.28 Viewing Group 2 ADN bands of animal origin.....	167
Fig. 7.29 Genotyping Group H - 2 <i>P. aeruginosa</i> of animal origin.....	167
Fig. 7.30 Viewing Group 3 ADN bands of animal origin.....	168
Fig. 7.31 Genotyping Group H - 3 <i>P. aeruginosa</i> of animal origin.....	168
Fig. 7.32 Viewing Group 4 ADN bands of animal origin.....	169
Fig. 7.33 Genotyping Group H - 4 <i>P. aeruginosa</i> of animal origin.....	169
Fig. 7.34 Viewing Group 5 ADN bands of animal origin.....	170
Fig 7.35 Genotyping of <i>P. aeruginosa</i> representative strains groups analyzed human and animal origin.....	170

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ÎN CALITATE DE PRIM – AUTOR

1. **Oana – Alexandra CIOCAN (MOȚCO)**, Mihai CARP – CĂRARE, Carmen-Valentina PANZARU, Elena PETRARU, 2014, *Classifying Pseudomonas aeruginosa strains of human origin in MDR, XDR and PDR by determining the resistance to antibiotics from seven groups*, Bulletin UASVM Veterinary Medicine 71(2) Print ISSN 1843-5270; Electronic ISSN 1843-5378 DOI:10.15835/buasvmcn-vm: 10644, CLUJ – NAPOCA.
2. **Oana – Alexandra CIOCAN (Moțco)**, 2014, Mihai Carp – Cărare, *Classifying Pseudomonas aeruginosa strains of animal origin in MDR, XDR And PDR by determining the resistance to antibiotics*, Lucrări Științifice USAMV Iași – seria Medicină Veterinară, volumul 57/2014 (nr.1-2).
3. **Oana-Alexandra CIOCAN**, Mihai CARP-CĂRARE, 2014, *Detectarea rapidă a tulpinilor de Pseudomonas aeruginosa de origine animală*, Lucrări Științifice Volumul 40 Medicină Veterinară, CHIȘINĂU.
4. **Oana – Alexandra CIOCAN**, Mihai CARP-CĂRARE, Cătălin CARP – CĂRARE, Andreea – Paula COZMA, Eleonora GUGUIANU, Cristina RÎMBU, Elena Petraru, Carmen-Valentina PANZARU, 2015, *Resistance Phenotypes of Pseudomonas aeruginosa strains of human origin in B – Lactamases*, Bulletin UASVM Veterinary Medicine 72(2) , Print ISSN 1843-5270; Electronic ISSN 1843-5378 DOI:10.15835/buasvmcn-vm: 11530, CLUJ – NAPOCA
5. **Oana – Alexandra CIOCAN (MOȚCO)**, Alper ÇİFTÇİ, Mihai CARP – CĂRARE, Mihai MAREȘ, Eleonora GUGUIANU, Ioana CRIVEI, Carmen – Valentina PANZARU, Cătălin CARP – CĂRARE, 2016, *The Prevalence of Pseudomonas aeruginosa strains in Infants with Cystic*

Fibrosis in a Hospital from North Easter Romania, Bulletin UASVM Veterinary Medicine 73(2) / 2016, Print ISSN 1843-5270; Electronic ISSN 1843-5378 DOI:10.15835/buasvmcn-vm: 12202, CLUJ – NAPOCA

6. Oana – Alexandra CIOCAN (MOȚCO), Alper ÇİFTÇİ, Yagmur KOÇAK, Mihai CARP – CĂRARE, Mihai MAREȘ, Andreea – Paula COZMA, Ioana CRIVEI, Eleonora GUGUIANU, Cristina RÎMBU, Carmen - Valentina PANZARU, Cătălin CARP – CĂRARE, 2016, *Phenotypes of Fluoroquinolone Resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from a Romanian Hospital*, Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine. Vol. LXII (1) ISSN 2065-1295; ISSN 2343-9394 (CD-ROM); ISSN 2067-3663 (Online), BUCUREȘTI.

7. Oana – Alexandra CIOCAN, Mihai CARP CĂRARE, Andreea – Paula COZMA, Cătălin CARP-CĂRARE, Cristina RÎMBU, Gabriela COMAN, Elena PETRARU, Carmen – Valentina PANZARU, 2015, *Isolation and Identification of Pseudomonas aeruginosa strains producing B-Lactamases (ESBL) and Carbapenemases (MBL) of human origin*, Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine. Vol. LXI (2) ISSN 2065-1295; ISSN 2343-9394 (CD-ROM); ISSN 2067-3663 (Online); ISSN-L 2065-1295, BUCUREȘTI.

8. Oana – Alexandra CIOCAN, M. Carp – Cărare, Cristina Rîmbu, Andreea – Paula Cozma, C. Carp – Cărare, Eleonora Guguianu, Carmen – Valentina Panzaru, 2015, *The Incidence of dog recurrent otitis caused by strains of Multidrug-Resistant (MDR) Pseudomonas aeruginosa*, *Lucrări Științifice Medicină Veterinară* vol. XLVIII (3), TIMIȘOARA.

9. Oana – Alexandra CIOCAN, Andreea – Paula Cozma, Irina Lipovan (Abalasei), Eleonora Guguianu, Carmen - Valentina Panzaru, Mihai Mareș, Mihai Carp – Cărare, Cătălin Carp-Cărare, 2015, *Antibiotics Resistance Dynamics of isolated Pseudomonas aeruginosa strains in a hospital from Northeastern Romania in the period 2012 – 2014*, *Lucrări Științifice USAMV IAȘI* Vol. 58 *Medicină Veterinară* Partea 3.

10. Oana – Alexandra CIOCAN, Cătălin Carp – Cărare, Andreea – Paula Cozma, Eleonora Guguianu, Cristina Rîmbu, Elena Petraru, Stratulat Petercă Emma Cecilia, Carmen - Valentina Panzaru, Mihai Carp – Cărare, 2015, *Resistance Phenotypes of Pseudomonas aeruginosa strains of human origin in Aminoglycosides*, *Lucrări Științifice USAMV IAȘI* Vol. 58 *Medicină Veterinară* Partea 3.

11. Oana – Alexandra CIOCAN (MOȚCO), Alper Ciftci, Mihai Carp – Cărare, Mihai Mareș, Mariana Grecu, Cătălin Carp – Cărare, Carmen – Valentina Panzaru, 2016, *Comparative Evaluation of Three Testing*

Methods for Detection of Mediated Resistance MBL In Pseudomonas aeruginosa isolates, Lucrări Științifice USAMV IAȘI – seria Medicină Veterinară, volumul 59/2016 (nr.3-4).

12. Oana – Alexandra CIOCAN, (MOȚCO), Alper Ciftci, Mihai Carp – Cărare, Mihai Mareș, Mariana Grecu, Cătălin Carp – Cărare, Carmen – Valentina Panzaru, 2016, *The First Case of Isolation and Identification of Acinetobacter Radioresistens in Infant from Iasi County (Case Report)*, Lucrări Științifice USAMV IAȘI – seria Medicină Veterinară, volumul 59/2016 (nr.3-4).

13. Oana – Alexandra CIOCAN (MOȚCO). Alper Çiftçi, Mihai Carp – Cărare, Mihai Mareș, Eleonora Guguianu, Cristina Rîmbu, Mariana Grecu, Cătălin Carp – Cărare, 2016, *Determination of biofilm production in animals originated Pseudomonas aeruginosa strains*, Lucrări Științifice USAMV IAȘI – seria Medicină Veterinară, volumul 59/2016 (nr.3-4).