

**PN-III-ID\_PCE\_2016-0921**  
**Contract: 179/2017**  
**RAPORT DE ACTIVITATE**  
**Perioada raportată: 12/07/2017 — 15/12/2017**

## Introducere

Citometria în flux (FCM) este o tehnică ce oferă posibilitatea unei analize calitative și cantitative a unei populații celulare, prin detectarea concomitentă a mai multor caracteristici ale unei singure celule (analiza multiparametrică a proprietăților fizice - dimensiunea celulei și complexitatea internă, a proprietăților chimice sau a caracteristicilor optice și de fluorescență). Un număr tot mai mare de studii recente descriu diversele aplicații ale FCM în domeniul microbiologiei. Spre deosebire de alte tehnici care implică studiul populațiilor microbiene în cultură prin metode cronofage, FCM oferă posibilitatea analizei rapide și individuale a mai multor parametri pe o populație mare de microorganisme, reușind astfel să detecteze și să cuantifice diferențele dintre populațiile bacteriene. Prin FCM pot fi detectate microorganisme ne-cultivabile și pot fi obținute informații în timp real cu privire la fiziologia microbială<sup>1</sup>. În laboratoarele clinice, FCM poate fi aplicată pentru identificarea microorganismelor, pe baza caracterelor lor antigenice sau enzimatică, utilizând diferiți fluorocromi (tabelul 1).

Tabelul 1. Fluorocromi utilizați pentru studiul microorganismelor prin metoda citometriei în flux (modificat după <sup>2,3</sup>)

<b>Fluorocromi</b>	<b>Substrat</b>	<b>Aplicații</b>
<i>SYTOX Green</i>	DNA-RNA	Viabilitate, cuantificare ADN
<i>Iodură de propidium (PI)</i>	DNA-RNA	Viabilitate, cuantificare ADN, Ciclu celular
<i>Bromură de etidiu</i>	DNA-RNA	cuantificare ADN, Ciclu celular
<i>SYTO 13</i>	DNA-RNA	Viabilitate, cuantificare ADN, Ciclu celular
<i>Hoechst 33258/33342</i>	DNA (perechile GC)	Ciclu celular
<i>Mithramycină</i>	DNA	
<i>Pyronină Y</i>	RNA	Cuantificare ARN
<i>Izotiocianat de fluoresceină (FITC)</i>	Proteine	Detectarea microorganismelor
<i>Texas Red</i>	Proteine	
<i>Oregon Green Isothiocyanate</i>	Proteine	
<i>Anticorpi cuplați cu fluorocromi</i>	Antigene	
<i>Oligonucleotide marcate fluorescent</i>	Secvențe nucleotidice	
<i>Indo-1</i>	Ca <sup>2+</sup>	Transportul ionilor de Ca <sup>2+</sup>
<i>Fura-2</i>	Ca <sup>2+</sup>	
<i>Fluor-3</i>	Ca <sup>2+</sup>	
<i>BCECF</i>	pH	Variații metabolice
<i>SNARF-1</i>	pH	
<i>DIOC6(3)</i>	Potențialul de membrană	Variații metabolice
<i>Oxonol [DiBAC4(3)]</i>	Potențialul de membrană	
<i>Rhodamine 123</i>	Potențialul de membrană	
<i>Lectine</i>	Membrană oligozaharide	Compoziția peretelui celular, Detectarea microorganismelor
<i>Substraturi marcate fluorescent</i>	Activitatea enzimelor	Activitate metabolică
<i>Nile Red</i>	Lipide	Starea fiziologică a drojdiilor
<i>Red Fun-1</i>	Activitatea enzimelor vacuolare	
<i>Calcofluor white</i>	Chitină sau alți carbohidrați polimerici	Detectarea fungilor

De asemenea, prin analiza FCM (cu asocierea a doi fluorocromi, respectiv iodură de hexidiu și Syto 13) se pot diferenția cu ușurință și rapiditate (10 – 60 min) bacteriile Gram

pozitive și Gram negative direct în probele de urină sau în alte probe clinice de consistență lichidă (hemoculturi, LCR, alte lichide de puncție), asigurându-se astfel optimizarea tratamentului pacienților cu infecții ale tractului urinar, meningite, bacteriemii, septicemii etc.<sup>4, 5</sup>. Corelată cu valorile bacteriuriei, leucocituriei și hematuriei, detectarea rapidă a uropatogenilor într-o probă de urină prin FCM poate contribui la excluderea bacteriuriei, ceea ce va conduce la o reducere substanțială a costurilor asociate metodei clasice a însămânțării probelor de urină<sup>6</sup>.

FCM poate fi de asemenea utilizată pentru diferențierea tulpinilor bacteriene sensibile de cele cu fenotipuri de rezistență (de exemplu, *S. aureus* meticilină-rezistent *versus* *S. aureus* meticilină-sensibil)<sup>7, 8</sup>, pentru determinarea rapidă a viabilității criptococilor sau pentru determinarea efectului diferitelor substanțe antimicrobiene asupra microorganismelor, ceea ce deschide noi perspective pentru studiul activității antimicrobiene a agenților antimicrobieni noi sau consacrați<sup>2, 9-18</sup>.

FCM ar putea contribui, de asemenea, la selecția adecvată a terapiei inițiale (empirice) cu antibiotice, prin furnizarea unor rezultate preliminare rapide, înainte obținerii rezultatelor testelor de sensibilitate la antibiotice. FCM ar putea avea așadar o contribuție esențială în managementul infecțiilor severe sau nosocomiale, care sunt de obicei tratate empiric cu antibiotice de spectru larg. Dacă rezultatele privind identificarea și profilul de rezistență al microorganismului ar putea fi furnizate simultan cu cele ale analizelor biochimice și hematologice, rata de prescriere a antibioticelor ar putea scădea semnificativ, iar eficiența terapeutică ar crește. Pe de altă parte, FCM ar putea contribui la îmbunătățirea supravegherii epidemiologice, făcând posibilă identificarea rapidă și izolarea pacienților colonizați cu tulpini multirezistente, prevenind astfel diseminarea rezistenței la antibiotice.

Scopul acestui proiect este dezvoltarea unui protocol de analiză microbiologică a a probelor, prin metoda citometriei în flux, care să fie utilizat ca metodă ieftină, specifică și rapidă pentru determinarea directă a prezenței bacteriilor rezistente la antibiotice în probele clinice, oferind astfel posibilitatea optimizării terapiei de urgență a infecțiilor severe.

În continuare vom prezenta principalele activități realizate în perioada raportată pentru îndeplinirea obiectivelor propuse.

## **OB. 1. Selecția și caracterizarea fenotipică a tulpinilor bacteriene izolate din infecții nosocomiale în două unități spitalicești**

### *1.1. Materiale și metode*

Un număr de 154 tulpini de bacili Gram negativi (BGN) și 60 de tulpini de coci Gram pozitivi (CGP) recoltate în două unități clinice mari din București au fost izolate în perioada Iulie-Decembrie 2017 și identificate folosind sistemele automate VITEK<sup>®</sup>2 compact și respectiv, Phoenix. Determinarea profilurilor de sensibilitate la antibiotice s-a realizat prin metoda difuzimetrică Kirby-Bauer, testul dublei difuzii pentru confirmarea anumitor fenotipuri de rezistență ( $\beta$ -lactamază de spectru extins - BLSE, cefalosporinaze inductibile, carbapenemaze), E-Test și metoda automată, conform standardelor CLSI și EUCAST ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)), edițiile actualizate<sup>19-21</sup>.

### *1.2. Rezultate*

În perioada Iulie-Decembrie 2017 au fost izolate și analizate un număr de 92 de tulpini de BGN non-fermentativi (BGNNF) și 62 de tulpini de BGN fermentativi (BGNF).

Analizând distribuția tulpinilor de BGNNF în corelație cu sursele de izolare, am remarcat că numărul tulpinilor izolate din situsuri nesterile (secreții traheale, secreții plagă, exsudate, coprocultură, spută) este net superior celor izolate din situsuri care în condiții normale sunt

sterile. Tulpinile de *P. aeruginosa* se izolează cu o frecvență superioară comparativ cu tulpinile de *A. baumannii*.

Evaluarea profilurilor de rezistență pentru tulpinile de *P. aeruginosa* izolate din situsuri fiziologic sterile și nesterile a arătat că majoritatea tulpinilor au un nivel de rezistență ridicat la majoritatea claselor de antibiotice de uz curent<sup>1</sup>:  $\beta$ -lactamice (100% - imipenem, 90,9% - meropenem, 66,6% cefalosporine de generația III-a și a IV-a); aminoglicozide (75% - gentamicină, 60,6% - amikacină și tobramicină); fluoroquinolone (66,6% - ciprofloxacina, 54,5% - levofloxacina).

Evaluarea sensibilității/rezistenței la antibiotice a culturilor de *A. baumannii* a evidențiat un număr mare de tulpini cu rezistență multiplă, 81,25% dintre tulpinile analizate fiind MDR (*Multi Drug Resistance*) și sensibile exclusiv la colistin. Tulpinile de *A. baumannii* analizate sunt 100% rezistente la imipenem, piperacilină-tazobactam, piperacilină, ceftazidim și cefepim, urmat de trimetoprim-sulfametoxazol (93,75%); 75% la ticarcilină, meropenem și ciprofloxacina; 62,5% la amikacină; 50% la gentamicină.

Evaluarea sensibilității/rezistenței la aminoglicozide a oferit următoarele rezultate: 31,25% dintre tulpini au fenotipul de rezistență la amikacină + tobramicină + gentamicină; 75% dintre tulpini au fost rezistente la o quinolonă (ciprofloxacina), 50% la levofloxacina și 43,75% dintre tulpinile analizate au fost rezistente la ambele quinolone.

În ceea ce privește tulpinile de BGNF au fost analizate 17 tulpini de *Escherichia coli*, 34 de tulpini de *Klebsiella pneumoniae*, 5 tulpini de *Enterobacter cloacae*, 3 tulpini de *K. oxytoca*, 2 tulpini de *M. morgani* și o tulpină de *E. aerogenes*.

Profilurile de rezistență la antibioticele  $\beta$ -lactamice ale tulpinilor celor 6 specii de enterobacterii au fost variate. Astfel, toate tulpinile de *E. cloacae* au fost rezistente la imipenem, amoxicilină+acid clavulanic, aztreonam, ceftazidim, ceftriaxonă, cefepim, cefoxitin.

Tulpinile de *K. pneumoniae*, în proporție de 90% au fost rezistente la aztreonam și ceftriaxonă; 80% dintre tulpini au fost rezistente la amoxicilină+acid clavulanic, 70% rezistente la imipenem, cefepim, cefoxitin.

Toate tulpinile de *E. coli* au fost rezistente la amoxicilină+acid clavulanic, 80% dintre tulpini au fost rezistente la ceftazidim, 50% la cefepim și 30% la imipenem.

Testul Hodge a relevat prezența mecanismelor enzimatic de rezistență la carbapeneme la 49,6% din cele 62 de tulpini. Probabil că tulpinile care nu sintetizează enzime hidrolitice sunt rezistente printr-un mecanism de impermeabilitate, asociat cu producerea la nivel ridicat a unor cefalosporinaze cromosomale de tip AmpC.

E-test a confirmat prezența carbapenemazelor de tip MBL la 37,2% ( $n = 23$ ) din cele 62 de tulpini analizate, restul producând carbapenemaze din clasele A sau D de  $\beta$ -lactamaze. Toate tulpinile producătoare de BLSE au fost multirezistente, fiind încadrate în categoria MDR și XDR (*Extended Drug Resistance*) conform criteriilor propuse de Magiorakos *et al.*, (2011)<sup>22</sup>. Tulpinile producătoare de BLSE sunt rezistente la antibioticele  $\beta$ -lactamice, la care se asociază rezistența la aminoglicozide (92%) și la quinolone (92%). Asocierea rezistenței la mai multe clase de antibiotice sugerează posibilitatea distribuției clonale a unor tulpini înalt rezistente<sup>23-25</sup> sau a unui substrat genetic comun (plasmidă de tip MDR) al rezistenței<sup>26-27</sup>.

În ceea ce privește tulpinile de coci Gram pozitivi (CGP) izolate și identificate în perioada Iulie-Decembrie 2017, au fost analizate 30 de tulpini de *Staphylococcus aureus* și 30 tulpini de *Enterococcus faecalis* izolate de la pacienți internați în secțiile de terapie intensivă. Studiul fenotipic al rezistenței la antibiotice la tulpinile de *S. aureus* a evidențiat următoarele profiluri de rezistență: penicilină (75.9%), tetraciclină (44.8%), oxacilină (37.9%), gentamicină (20.7%), rifampicină (24.1%), trimetoprim-sulfametoxazol (6.9%), fosfomicină (3.4%), ciprofloxacina (24.1%), clindamicină (48.3%), eritromicină (48.3%), moxifloxacina (24.1%). Fenotipul inductibil (MLS<sub>Bi</sub>) și constitutiv (MLS<sub>Bc</sub>) de rezistență la macrolide a fost identificat la 23.8% dintre tulpinile de *S. aureus*.

Cele 30 de tulpini de *E. faecalis* au fenotip MDR, 82% dintre tulpini sunt rezistente la rifampicină, 78% la eritromicină și penicilină și 50% la vancomicină.

## OB. 2. Identificarea suportului genetic al rezistenței la antibiotice (detectia genelor de rezistență la antibiotice prin PCR convențional și secvențierea ampliconilor)

### 2.1. Materiale și metode

ADN bacterian a fost izolat prin metoda extracției alcaline. În acest scop, din fiecare tulpină s-a obținut o suspensie celulară care a fost denaturată timp de 15 min, la 95 °C, apoi s-au adăugat 180 μl TE, această etapă fiind urmată de centrifugare timp de 3 min, la 13.000 rpm, după care a fost recuperat supernatantul care a fost utilizat în reacția de amplificare.

În funcție de fenotipurile de rezistență ale tulpinilor analizate, am verificat prezența unor gene frecvent asociate cu producerea de carbapenemaze și β-lactamaze de spectru extins la tulpinile de BGN, a genelor codificatoare ale rezistenței la meticilină la tulpinile de *S. aureus* și a celor de rezistență la vancomicină la tulpinile de *E. faecalis*, utilizând mixul de reacție - GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) (tabelele 2, 3).

Programul de amplificare s-a realizat în următoarele condiții:

94°C 10 min	} 36 cicluri
94°C 30s	
52°C 40s	
72°C 50s	
72°C 5 min.	

Tabelul 2. Secvența primerilor și dimensiunea ampliconilor obținuți în experimentele multiplex și simplex PCR la tulpinile de BGN

Genă	Primeri	Secvența primerilor	Nr. bp	Referința
<i>bla<sub>GES</sub></i>	GES-C GES-D	5'GTTTTGCAATGTGCTCAACG 3' 5'TGCCATAGCAATAGGCGTAG 3'	371	28
Subgrup 4 (OXA-58)	Pre-OXA-58prom Pre-OXA-58B	5'TTATCAAAAATCCAATCGG C 3' 5'TAACCTCAAACCTCTAATTC 3'	934	
Subgrup 5 (Shewanella OXA-55)	OXA-55/1 OXA-55/2	5'CATCTACCTTTAAAAATTCCC 3' 5'AGCTGTTCTGCTTGAGCAC 3'		
Subgrup 7 (OXA-50)	S AS	5'AATCCGCGCTCATCCAT C 3' 5'GGTCGGCGACTGAGGCGG 3'	869	
Subgrup 8 (OXA-60)	OXA-60A OXA-60B	5'AAAGGAGTTGTCTCATGCTGTCTCG 3' 5'AACCTACAGGCGCGCTCTCACGGTG 3'		
<i>bla<sub>OXA-23</sub></i>	OXA-23-F OXA-23-R	5'-ATGAGTTATCTATTTTGTGTC-3' 5'-TGTC AAGCTCTTAAATAATA-3'	501	29
<i>bla<sub>OXA-2</sub></i>	OXA-2-F OXA-2-R	5' GCCAAAGGCACGATAGTTGT3' 5' GCGTCCGAGTTGACTGCCGG3'	701	30-31
<i>bla<sub>OXA-10</sub></i>	OXA-10-F OXA-10-R	5' TCTTTCGAGTACGGCATTAGC3' 5' CCAATGATGCCCTCACTTTCC3'	759	
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	OXA-F OXA-R	5'GCGTGGTTAAGGATGAACAC 3' 5'CATCAAGTTCAACCCAACCG 3'	438	32
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	IMP-F IMP-R	5'GGAATAGAGTGGCTTAA(C/T)TCT C 3' 5'GGTTTAA(C/T)AAAACAACCACC 3'	232	
<i>bla<sub>SPM</sub></i>	SPM-F SPM-R	5'AAAATCTGGGTACGCAAACG 3' 5'ACATTATCCGCTGGAACAGG 3'	789	
<i>bla<sub>AIM</sub></i>	AIM-F AIM-R	5'CTGAAGGTGTACGGAAACAC 3' 5'GTTCCGGCCACCTCGAATTG 3'	322	
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	VIM-F VIM-R	5'GATGGTGTGGTTCGCATA 3' 5'CGAATGCGCAGCACCAG 3'	390	
<i>bla<sub>GIM</sub></i>	GIM-F GIM-R	5'TCGACACACCTTGGTCTGAA 3' 5'AACTTCCAACCTTGCCATGC 3'	477	
<i>bla<sub>BIC</sub></i>	BIC-F BIC-R	5'TATGCAGCTCCTTTAAGGGC 3' 5'TCATTGGCGGTGCCGTACAC 3'	537	

<i>bla</i> <sub>SIM</sub>	SIM-F SIM-R	5'TACAAGGGATTTCGGCATCG 3' 5'TAATGGCCTGTTCATCATGTG 3'	570	
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	NDM-F NDM-R	5'GGTTTGGCGATCTGGTTTTC 3' 5'CGGAATGGCTCATCACGATC 3'	621	
<i>bla</i> <sub>DIM</sub>	DIM-F DIM-R	5'GCTTGCTTCGCTTGCTAACG 3' 5'CGTTCGGCTGGATTGATTG 3'	699	
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	KPC-Fm KPC-Rm	5'CGTCTAGTTCTGCTGCTTG 3' 5'CTTGTCATCCTTGTTAGGCG 3'	271	
<i>bla</i> <sub>PER</sub>	PER-F PER-R	5'-AATTTGGGCTTAGGGCAGAA-3' 5'-ATGAATGTCATTATAAAAAGC-3'	925	33
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM-F TEM-R	5'-ATGAGTTTTCAACATTTTCG-3' 5'-TTACCAATGCTTAATCAG TG-3'	1080	34
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV-F SHV-R	5'-GCCCTCACTCAAGGATGTAT-3' 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTCGA-3'	888	35
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CTX-M-F CTX-M-R	5'-CGCTGTTGTTAGGAAGTGTG-3' 5'-GGCTGGGTGAAGTAAGTGAC-3'	730	36

Tabelul 3. Componentele reacției PCR.

Gena	Concentrația						Volum final
	primeri	MgCl <sub>2</sub>	dNTP	ADN-TaqPol	tampon reacție	and	
<i>bla</i> <sub>VIM</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP</sub> , <i>bla</i> <sub>SPM</sub> , <i>bla</i> <sub>BIC</sub> , <i>bla</i> <sub>AIM</sub> , <i>bla</i> <sub>SIM</sub> , <i>bla</i> <sub>DIM</sub> , <i>bla</i> <sub>GIM</sub> , <i>bla</i> <sub>BIC</sub> , <i>bla</i> <sub>PER1</sub> , <i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-10</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-24</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-50</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-55</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-58</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-60</sub>	0,5 μM	1,2 mM	2 μM	0,2 Uμl	1X	10X	20μl

În scopul caracterizării genotipice a casetelor *SCCmec* la tulpinile de *S. aureus*, au fost realizate două reacții *multiplex* PCR folosindu-se cinci, respectiv patru perechi de primeri specifici pentru diferite secvențe de la nivelul casetelor *SCCmec*, în vederea detectării simultane a unor elemente constitutive necesare diferențierii tipurilor și subtipurilor de casete *SCCmec* I...V. Secvențele primeri-ilor utilizați precum și parametri de desfășurare ai reacțiilor au urmărit protocolul elaborat de Miheirico și colab. (2007)<sup>37-38</sup>. Secvența primerilor, dimensiunea ampliconilor obținuți în experimentele PCR și electroforeza, precum și condițiile de amplificare sunt evidențiate în tabelele 4- 7.

Tabelul 4. Condițiile PCR utilizate pentru amplificarea elementelor *SCCmec* (după<sup>39</sup>)

Programul de amplificare					
<b>Temperatura</b>	94°C	94°C	53°C	72°C	72°C
<b>Durata</b>	4 min	30 sec	30 sec	1 min	4 min
<b>Număr cicluri</b>	1		30		1

Tabelul 5. Componentele de reacție utilizate în reacțiile PCR.

Volum primeri (10μM)	Volum PCR Master Mix*	Volum apă ultra-pură	Volum ADN	Volum de reacție
0,3 μl	10 μl	6,5 μl	0,5 μl	20 μl

Tabel 6. Secvențele nucleotidice ale primerilor utilizați, specificitatea acestora și dimensiunile ampliconilor obținuți (după<sup>40</sup>)

Primeri	Secvența de nucleotide	Mărime amplicon (pb)	Specificitate primeri (tipul de casetă mec)
Type I-F Type I-R	5'-GCT TTA AAG AGT GTC GTT ACA GG-3' 5'-GTT CTC TCA TAG TAT GAC GTC C-3'	613	<i>SCCmec</i> I
Type II-F Type II-R	5'-CGT TGA AGA TGA TGA AGC G-3' 5'-CGA AAT CAA TGG TTA ATG GAC C-3'	398	<i>SCCmec</i> II
Type III-F Type III-R	5'-CCA TAT TGT GTA CGA TGC G-3' 5'-CCT TAG TTG TCG TAA CAG ATC G-3'	280	<i>SCCmec</i> III
Type IVa-F	5'-GCC TTA TTC GAA GAA ACC G-3'	776	<i>SCCmec</i> IVa

Type IVa-R	5'-CTA CTC TTC TGA AAA GCG TCG-3'		
Type IVb-F Type IVb-R	5'-TCT GGA ATT ACT TCA GCT GC-3' 5'-AAA CAA TAT TGC TCT CCC TC-3'	493	SCCmec IVb
Type IVc1-F Type IVc1-R	5'-TCT ATT CAA TCG TTC TCG TAT T-3' 5'-TCG TTG TCA TTT AAT TCT GAA CT-3'	200	SCCmec IVc
Type IVd1-F Type IVd1-R	5'-AAT TCA CCC GTA CCT GAG AA-3' 5'-AGA ATG TGG TTA TAA GAT AGC TA-3'	881	SCCmec IVd
Type V-F Type V-R	5'-GAA CÂT TGT TAC TTA AAT GAG CG-3' 5'-TGA AAG TTG TAC CCT TGA CAC C-3'	325	SCCmec V
ccrB2 F2 ccrB2 R2	5'-AGT TTC TCA GAA TTC GAA CG-3' 5'-CCG ATA TAG AAW GGG TTA GC-3'	311	II și IV, complexul ccr
ccrC-F ccrC-R	5'-CGT CTA TTA CAA GAT GTT AAG GAT AAT-3' 5'-CCT TTA TAG ACT GGA TTA TTC AAA ATA T-3'	495	ccr Tip 5
CIF2 F2 CIF2 R2	5'-TTC GAG TTG CTG ATG AAG AAG G-3' 5'-ATT TAC CAC AAG GAC TAC CAG C-3'	495	I, regiunea J1
mecI P2 mecI P3	5'-ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC-3' 5'-GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC-3'	209	II și III, complexul mec
mecA P4 mecA P7	5'-TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G-3' 5'-CCA CTT CÂT ATC TTG TAA CG-3'	162	gena mecA
SCC mec III J1 F SCCmec III J1 R	5'-CÂT TTG TGA AAC ACA GTA CG-3' 5'-GTT ATT GAG ACT CCT AAA GC-3'	243	III, regiunea J1
SCCmecV J1 F SCCmecV J1 R	5'-TTC TCC ATT CTT GTT CÂT CC-3' 5'-AGA GAC TAC TGA CTT AAG TGG-3'	377	V, regiunea J1
kdp F1 kdp R1	5'-AAT CÂT CTG CCA TTG GTG ATG C-3' 5'-CGA ATG AAG TGA AAG AAA GTG G-3'	284	II, regiunea J1

Tabelul 7. Condițiile PCR utilizate pentru amplificarea elementelor genetice corespunzătoare tipurilor de casete SCCmec (după <sup>41</sup>)

Programul de amplificare							
Temperatura	94°C	94°C	65°C	72°C	94°C	55°C	72°C

Secvența primerilor, dimensiunea ampliconilor obținuți în experimentele PCR și electroforeza, precum și condițiile reacției de amplificare în studiul genotipic al rezistenței la vancomicină la tulpinile de *E. faecalis* sunt evidențiate în tabelele 8-9.

Tabelul 8. Secvențele nucleotidice ale primerilor utilizați, specificitatea acestora și dimensiunile ampliconilor obținuți (după <sup>42</sup>)

VAN AF	TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA	Y = C or T	57 C		
VAN AR	TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG				
VAN B-F	GCGCGAGATGACCCGCCGCA		60 C		
VAN B-R	CTGGCGGAAGAAGAAGGTCAACA				
VAN C-F	CGGCGTTCGTCTCGGGCGTGGTGAAGGA		60 C		
VAN C-R	TCGAGGGCGTAGTAGATGTCCCTTGCCGA				(xxxix)

Tabelul 9. Condițiile reacției PCR pentru amplificarea genelor VAN

Programul de amplificare					
Temperatura	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C
Durata	4 min	30 sec	30 sec	1 min	4 min
Număr cicluri	1	30			1

## 2.2.Rezultate

Screening-ul genotipic al rezistenței tulpinilor BGNNF la carbapeneme a evidențiat prezența următoarelor gene, în ordine descrescătoare a frecvenței: *bla*<sub>OXA23like</sub> (80% dintre tulpinile de *A. baumannii*), *bla*<sub>VIMlike</sub> (53,33% dintre tulpinile de *P. aeruginosa* analizate), iar secvențierea ampliconilor a evidențiat prezența carbapenemazei VIM-2 la tulpinile de *P. aeruginosa*, și a oxacilinazei OXA-23 la tulpinile de *A. baumannii*.

Genele codificatoare pentru rezistența mediată de  $\beta$ -lactamazele de spectru extins au fost identificate astfel: *bla*<sub>TEMlike</sub> (33,3% dintre tulpinile de *A. baumannii* și 13,3% dintre tulpinile de *P. aeruginosa*); *bla*<sub>CTX-Mlike</sub> (8,88% dintre tulpinile *A. baumannii* și 6,66% dintre tulpinile *P. aeruginosa*); *bla*<sub>PERlike</sub> (20% dintre tulpinile de *P. aeruginosa* și 5,55% dintre tulpinile de *A. baumannii*); *bla*<sub>VEB-1</sub> și *bla*<sub>VEB-3</sub> (10% dintre tulpinile de *P. aeruginosa*).

Investigarea prin PCR și secvențierea ampliconilor genelor a evidențiat prezența carbapenemazelor de tip NDM (35%) și OXA-48 (46%) și asocierea carbapenemazelor de tip NDM și OXA-48 (9%). la tulpinile de *Enterobacteriaceae* rezistente la antibiotice  $\beta$ -lactamice.

Rezultatele analizei noastre confirmă stabilirea tulpinilor bacteriene care sintetizează aceste carbapenemaze, în România.

Secvențierea externalizată a ampliconilor rezultați a evidențiat prezența genelor *bla*<sub>NDM-1</sub> (35%), *bla*<sub>OXA-48</sub> (46%) și *bla*<sub>OXA-181</sub> (9%). Dintre aceste tulpini, 80% produc  $\beta$ -lactamaza de spectru extins CTX-M-15, iar asocierea  $\beta$ -lactamazelor CTX-M-15 cu OXA-48 și, respectiv, TEM cu OXA-48, a fost identificată la 7% dintre tulpini.

Studiul genotipic al rezistenței tulpinilor de *S. aureus* la meticilină ne-a arătat că 18% aparțin SCCmec de tipul V, urmat de SCCmec tipul II (16%), SCCmec tipul III (incluzând prezența genei RIF5 (7%) și SCCmec tipul I (5%).

Studiul genotipic al rezistenței tulpinilor de *E. faecalis* la vancomicină a relevat prezența genei VanA la 43,13% dintre tulpini și a genei VanB la 6,34% dintre tulpini colecției noastre.

### OB. 3. Identificarea relațiilor de clonalitate a tulpinilor bacteriene izolate din cele două unități spitalicești

#### 3.1. Materiale și metode

Determinarea relațiilor de clonalitate a tulpinilor Gram negative rezistente s-a realizat prin metodele PFGE și MLST. Tulpinile producătoare de carbapenemaze au fost tipizate prin metoda PFGE. Metoda presupune încorporarea culturii bacteriene în agaroză, liza proteinelor celulare, urmată de clivarea ADN bacterian cu enzime cu situsuri de restricție rare. Migrarea fragmentelor de ADN la electroforeză în gel se realizează cu un aparat care schimbă direcția curentului electric după un program prestabilit. Profilul electroforetic al ADN rezultat prin metoda PFGE este comparat, pentru a determina gradul de înrudire al tulpinilor bacteriene selectate. Criteriile de interpretare ale profilului electroforetic al fiecărei tulpini sunt descrise în tabelul 10.

Tabelul 10. Criteriile de interpretare ale profilului ADN prin metoda PFGE<sup>43</sup>

Categoria de înrudire a profilului ADN	Numărul de diferențe la nivel genetic între tulpinile comparate	Diferențele ale numărului de fragmente (benzi) separate prin electroforeză
Identice	0	0
Strâns înrudite	1	2-3
Posibil înrudite	2	4-6
Diferite	$\geq 3$	$\geq 7$

Tulpinile au fost cultivate timp de 16-18 ore într-un volum de 1 ml mediu LB lichid, după care culturile au fost centrifugate (4 min, 8000 rpm) și spălate de două ori cu 1 ml soluție TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8).

Încorporarea culturilor în agaroză a presupus parcurgerea următoarelor etape: i) se prepară o soluție 1,6% de agaroză tip *ultrapure, low-melting point* (BioRad) în soluție TE, răcită la temperatura de 56°C; ii) se amestecă 0,5 ml soluție agaroză cu 0,5 ml suspensie celulară; iii) amestecul se repartizează în matrițe de plastic - *plug molds* (matrițe pentru blocuri) - câte trei

pentru fiecare tulpină; iv) după solidificarea agarozei rezultă blocuri de celule bacteriene încorporate în geloză.

Fiecare bloc a fost introdus în tuburi de tip *Falcon* de 50 ml, peste care s-au adăugat 3 ml soluție de liză (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% N-lauril-sarcozină, 0,1 mg/ml proteinază K, pH 8) și incubat peste noapte la 54°C pe baie de apă cu agitare.

A doua zi, blocurile au fost spălate o dată în 3 ml apă distilată timp de 10 minute la temperatura de 54°C pe baie de apă cu agitare, apoi de trei ori în 3 ml soluție TE, timp de 25 minute în aceleași condiții. După spălare, blocurile pot fi păstrate în soluție TE la 4°C, până la un an.

Fragmentarea ADN cu a enzime de restricție din celulele încorporate în agaroză s-a realizat cu enzima *XbaI* (Promega, Wisconsin, SUA) pentru tulpinile familiei *Enterobacteriaceae*, *ApaI* pentru tulpinile de *A. baumannii* și *SpeI* pentru tulpinile de *P. aeruginosa*.

Fiecare bloc de agaroză a fost tăiat la 1/3 din dimensiunea inițială, introdus în soluția de digestie (se plasează în tuburi Eppendorf ce conțin soluția de digestie (87,8 μl apă ultrapură; 10 μl tampon de reacție NEB4, 1 μl BSA, 1 μl enzimă de restricție - *XbaI/ApaI/SpeI*), incubat la 25°C, 24h pentru *A. baumannii* și la 37°C, 24h pe baia de apă pentru *P. aeruginosa* și tulpinile aparținând familiei *Enterobacteriaceae*.

După restricția enzimatică a ADN bacterian, a fost preparat gelul pentru electroforeză (1,2% agaroză tip *ultrapure, low-melting point* în soluție TBE – Tris acid boric EDTA – 0,5x). Blocurile de agaroză cu ADN au fost transferate pe suprafața pieptenului pentru electroforeză, iar apoi a fost turnat gelul de migrare, astfel încât blocurile au fost încorporate în masa gelului.

După solidificare, gelul a fost transferat în aparatul CHEF DR III (BioRad), iar probele au fost migrate în câmp pulsator, utilizând următoarele condiții de migrare:

- pentru tulpinile aparținând familiei *Enterobacteriaceae*: voltaj 6V/cm (200 V), timp de 24 h; timpul inițial de schimbare a direcției curentului: 8-10 sec timp de 4 h; timpul intermediar de schimbare a direcției curentului: 15-25 sec timp de 16 h; timpul final de schimbare a direcției curentului: 50-65 sec timp de 4 h; temperatura de migrare 14°C.
- pentru tulpinile de *A. baumannii* timpul inițial de reorientare: 5 sec; timpul final de reorientare: 13 sec; voltaj: 6V; unghiul de reorientare: 120°; timpul de migrare: 25h.
- pentru tulpinile de *P. aeruginosa*: I ciclu: timpul inițial de reorientare - 4 sec; timpul final de reorientare- 12 sec; adăugare 760 μl tiouree în tancul de migrare; voltaj- 6V; unghiul de reorientare - 120°; timpul de migrare - 12h; al II-lea ciclu: timpul inițial de reorientare - 15 sec; timpul final de reorientare - 36 sec; voltajul - 6V; unghiul de reorientare -120°; timpul de migrare - 12h.

Gelul a fost vizualizat cu bromură de etidiu, prin expunerea la UV și captarea imaginilor cu un aparat *Gel Doc XR + System*(BioRad).

În continuare, au fost selectate tulpini aferente fiecărui pulsotip, pentru care s-a efectuat optimizarea reacției PCR pentru evidențierea genelor *house-keeping* specifice fiecărei specii, secvențierea ampliconilor și interpretarea rezultatelor pentru aplicarea schemei MLST.

Metoda MLST (*Multilocus Sequence Typing*) este o metodă de studiu epidemiologic utilizată pentru a determina traseul clonei. Ulterior tipizării prin metoda PFGE a tulpinilor de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* și *A. baumannii* producătoare de carbapenemaze și de CHLD, a fost selectată câte o tulpină din fiecare gen aparținând fiecărui pulsotip pentru determinarea clonei prin metoda MLST, care presupune secvențierea anumitor gene esențiale, conservate în structura genomului bacterian (gene *house-keeping*), implicate în metabolismul celular și caracterizarea tulpinilor în funcție de profilul alelic obținut. Metoda s-a dezvoltat pornind de la *MLEE* (*multilocus enzyme electrophoresis*) în care detectarea electroforetică a enzimelor produse ca expresie genică este înlocuită cu secvențierea genelor codificatoare. Rezultatele



secvențierii sunt comparate cu bazele de date, iar identificarea unei mutații noi, conduce la înregistrarea unui tip alelic nou (ST= sequence type)<sup>44</sup>.

Tabelul 11. Genele *house-keeping* utilizate în tipizarea tulpinilor cu diferite profiluri PFGE cu ajutorul metodei MLST<sup>45-46</sup>

<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
<i>rpoB</i> (subunitatea $\beta$ a ARN polimerazei); <i>gapA</i> (gliceraldehidă 3-fosfat dehidrogenaza); <i>mdh</i> (malat dehidrogenaza); <i>pgi</i> (fosfoglucozo izomeraza); <i>phoE</i> (fosforina E); <i>infB</i> (factorul 2 de inițiere a translației); <i>tonB</i> (transductor periplasmic).	acetil coenzima A sintetază ( <i>acsA</i> ), shikimat dehidrogenază ( <i>aroE</i> ), GMP sintetază ( <i>guaA</i> ), proteina „reparatoare” a AND ( <i>mutL</i> ), lanțurile C, D ale NADH dehidrogenazei I ( <i>nuoD</i> ), fosfoenolpiruvat-sintetază [ <i>ppsA</i> ] componenta I al antranilat-sintetazei I ( <i>trpE</i> );	<i>cpn60</i> (60-KDa chaperonin) <i>fusA</i> (factorul de elongare EF-G) <i>gltA</i> (citrat sintetaza) <i>pyrG</i> (CTP sintetaza) <i>recA</i> (factor de recombinare omolog) <i>rplB</i> (subunitatea 50S a proteinei ribosomale L2) <i>rpoB</i> (ARN polimeraza subunitatea B)

### 3.2. Rezultate

*Screening*-ul efectuat în etapa anterioară a proiectului, a permis selectarea a 34 tulpini de *Klebsiella pneumoniae* din diferite surse clinice.

Analiza PFGE a relevat prezența a 10 pulsotipuri (fig. 1), însă niciunul nu s-a corelat cu un anumit fenotip de rezistență.

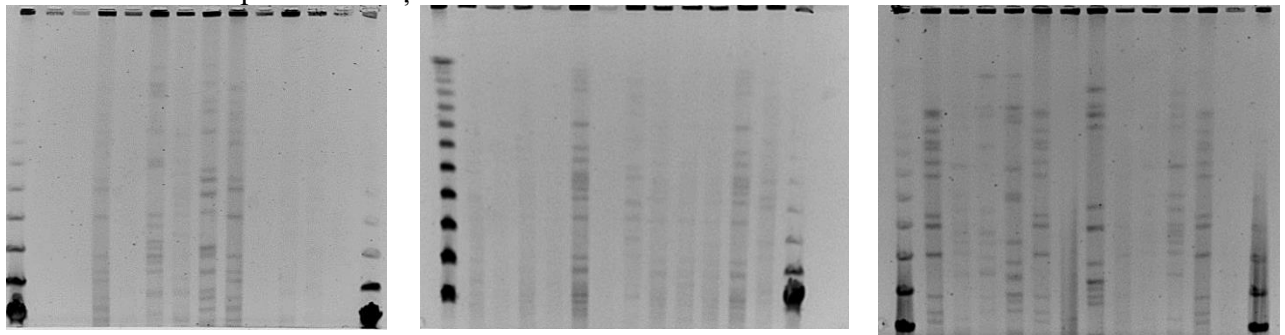


Fig.1. 1-Lambda Ladder PFG Marker Biolabs; 2- K17; 3-K23; 4- K4; 5-K18; 6- K10; 7-K16; 8-K19; 9-K8; 10-K12; 11-K17; 12-K25; 13-K20; 14- Lambda Ladder PFG Marker Biolabs

1. Lambda Ladder PFG Marker Biolabs; 2- K13; 3-K5; 4-K9; 5-K15 498; 6- E21; 7-K27 642; 8-K58; 9-K3825; 10- K29653; 11-K1305; 12-K57; 13- K30453; 14- Lambda Ladder PFG Marker Biolabs; 15- godeu liber

1-Lambda Ladder PFG Marker Biolabs; 2- E 21 825; 3-E24 992; 4- E23; 5-E41; 6- E61; 7-E66; 8-E70; 9- E75; 10-K4 1311; 11-K7 1043; 12- K11 1071; 13-K16; 14- Lambda Ladder PFG Marker Biolabs; 15- K19 449

Astfel, constatăm că rezistența la antibiotice  $\beta$ -lactamice (prin producere de  $\beta$ -lactamaze de tip CTX-M-15, OXA-48 și TEM) nu este corelată cu o clonă specifică, ceea ce sugerează diseminarea policonală a rezistenței în mediul spitalicesc, mediată de elemente genetice mobile.

La tulpinile de bacili Gram negativi non-fermentativi [13 tulpini de *P. aeruginosa* cu fenotip MDR și 7 tulpini de *A. baumannii*], reacția de amplificare PCR și secvențierea produșilor de amplificare a identificat genele *bla<sub>VIM-2</sub>* la *P. aeruginosa* (cu excepția a 2 tulpini) și *bla<sub>OXA-23</sub>* la *A. baumannii*. Prin tehnica PFGE au fost identificate 4 pulsotipuri (A, n=7, același *pattern* de restricție; B, n=1; C, n=1; și D, n=2) (fig. 2).

Tulpinile reprezentative din fiecare pulsotip, dar și cele care nu au putut fi tipizate prin tehnica PFGE au fost analizate ulterior prin tehnica MLST. Astfel am evidențiat că tulpinile de *P. aeruginosa* aparțin pulsotipului A, iar tulpina X aparține *P. aeruginosa* ST233. Au fost de asemenea identificate, clone sporadice ale pulsotipului B, iar tulpina de *P. aeruginosa* nr.

9 a fost identificată ca *P. aeruginosa* ST364. Pulsotipul C aparține *P. aeruginosa* ST1074. Clona ST1074 aparține CC235 și a fost anterior semnalată la izolate clinice de *P. aeruginosa* producătoare de *bla*<sub>VIM-2</sub> din Croația, Serbia (ST235), Ungaria (ST235 și ST230) și Italia (ST111, ST235, și ST227) și România<sup>47</sup>.

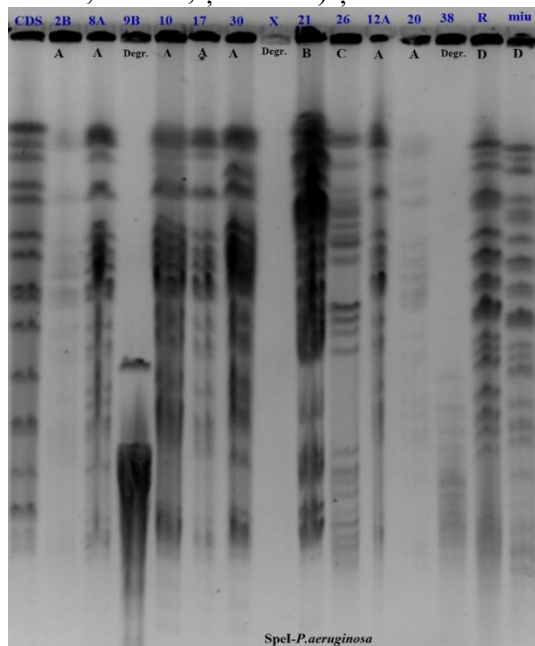


Fig. 2. Electroforegrama *pattern*-urilor de restricție cu enzima *SpeI* pentru tulpinile de *P. aeruginosa* nr. 2B, 8A, 9B, 10, 17, 30, X, 21, 26, 12A, 20, 38, R, miu, 23 producătoare de *bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>VEB-1</sub> și *bla*<sub>VEB-3</sub>. CDS-Marker de dimensiune.

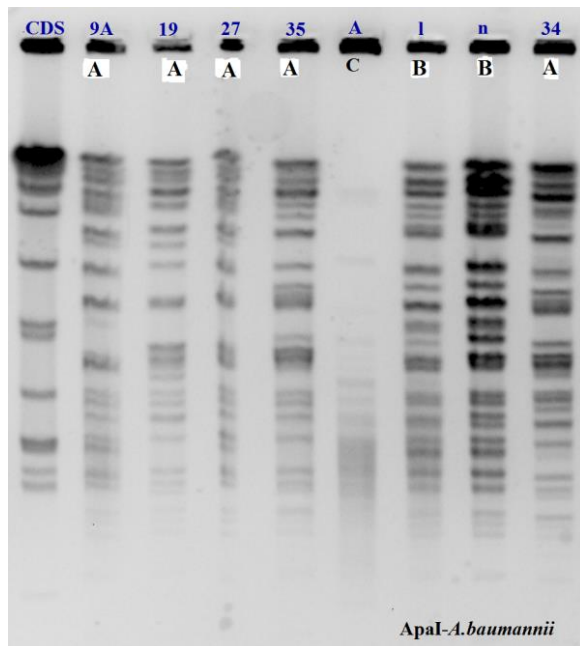


Fig. 3. Electroforegrama *pattern*-urilor de restricție cu enzima *ApaI* pentru tulpinile de *A. baumannii* producătoare de *bla*<sub>OXA-23</sub> (exc.9A). 9A,19,27,35, A,l,n,34-tulpini de *A. baumannii*; CDS-marker de dimensiune.

Prin tehnica PFGE utilizând enzima de restricție *ApaI*, tulpinile de *A. baumannii* producătoare de OXA-23 au fost încadrate în trei pulsotipuri: A- n=4 izolate; B- n=2 izolate; C- n=1 izolat (fig. 3).

Tulpinile reprezentative din fiecare pulsotip au fost analizate ulterior prin tehnica MLST. Astfel am identificat trei clone ce aparțin CC92, care circulă în cele două unități spitalicești: i) ST437 [4 izolate, PFGE-pulsotipul A] tulpini circulante în prima unitate spitalicească; ii) ST764, clonă cu un singur locus genic diferit față de ST437 (1 izolat, PFGE-pulsotipul C) și ii) ST765, clonă cu doi loci genici diferiți față de ST437 (2 izolate, PFGE-pulsotipul B), ambele circulante în a doua unitate spitalicească.

## Concluzii

1. În cursul acestei etape a fost realizat un studiu epidemiologic, pe baza căruia a fost constituită colecția de peste 200 de tulpini rezistente la antibiotice, izolate din surse fiziologic sterile și nesterile ale unor pacienți spitalizați, caracterizate la nivel fenotipic și genetic.
2. Majoritatea tulpinilor de bacili Gram negativi non-fermentativi sunt *P. aeruginosa* și *A. baumannii* multirezistente la antibioticele de uz curent, respectiv  $\beta$ -lactamice (66,6% - 100%); aminoglicozide (50%-75%); fluoroquinolone (54,5%-66,6%), trimetoprim-sulfametoxazol (93,75%).
3. Majoritatea tulpinilor de bacili Gram negativi fermentativi a fost reprezentată de tulpini de *Klebsiella pneumoniae* (rezistente în proporție de 90% la aztreonam și ceftriaxonă; 80% la amoxicilină+acid clavulanic, 70% la imipenem, cefepim,

- cefoxitin) și *Escherichia coli* (100% rezistente la amoxicilină+acid clavulanic, 80% la ceftazidim, 50% la cefepim și 30% la imipenem).
4. Tulpinile de enterobacterii au fost pozitive la testul Hodge în proporție de 49,6%, iar producerea metalocarbapenemazelor din clasa B a fost confirmată prin E-test la 37,2%, restul tulpinilor rezistente producând carbapenemaze din clasele A sau D.
  5. Toate tulpinile producătoare de  $\beta$ -lactamaze de spectru larg (BLSE) au fost multirezistente sau cu rezistență extinsă la antibiotice. Asocierea rezistenței la mai multe clase de antibiotice sugerează posibilitatea distribuției clonale a unor tulpini înalt rezistente sau a unui substrat genetic comun (plasmidă de tip MDR) al rezistenței.
  6. Tulpinile de coci Gram pozitivi prezintă fenotip MDR, cele de *Staphylococcus aureus* prezentând în proporție de 37.9% / 23.8% / 23.8% fenotipurile MRSA (majoritatea aparținând tipurilor SCCmec V și II) / MLSBi /MLSBc, iar cele de *Enterococcus faecalis* rezistență de nivel înalt la rifampicină (82%), eritromicină (78%) și vancomicină (50%) (VanA - 43,13%, VanB - 6, 34%).
  7. Analiza moleculară a substratului rezistenței la antibiotice prin PCR și secvențiere a relevat că tulpinile de *P. aeruginosa* și *A. baumannii* poartă un spectru larg de gene codificatoare de BLSE (*bla*<sub>TEMlike</sub>, *bla*<sub>CTX-Mlike</sub>, *bla*<sub>PERlike</sub>, *bla*<sub>VEB-1</sub> și *bla*<sub>VEB-3</sub>) și carbapenemaze (*bla*<sub>OXA23</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub>); la tulpinile de *Enterobacteriaceae*, rezistența enzimatică la carbapeneme este codificată de *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> și *bla*<sub>OXA-181</sub>, iar BLSE sunt de tip CTX-M-15.
  8. Analiza PFGE a relevat prezența a 4 pulsotipuri la tulpinile de *P. aeruginosa*, 3 pulsotipuri la *A. baumannii* și a 10 pulsotipuri la cele 34 tulpini de *K. pneumoniae* analizate.
  9. Analiza MLST a revelat prezența clonelor ST233, ST364 și ST1074 la tulpinile de *P. aeruginosa*, respectiv a clonelor ST437, ST764 și ST765 la cele de *A. baumannii*.
  10. Analiza clonalității tulpinilor rezistente la antibiotice izolate din mediul spitalicesc sugerează diseminarea policlonală a rezistenței în mediul spitalicesc, mediată de elemente genetice mobile, clonele circulante având distribuție locală sau pe un areal geografic larg.

## Valorificarea si diseminarea rezultatelor

### Participări la Conferințe Nationale:

Chifiriuc MC, Marutescu L, Kamerzan C, Popa M, Badea M, Olar R, Calu L, Daniliuc CG, Falcescu D, Tozar T, Nastasa V, Stoicu A, Pascu ML, Lazar V. Evaluarea rapida a sensibilitatii microorganismelor la compusi naturali si nou sintetizati prin citometria in flux. Al XI-lea Congres National de Citometrie, Bucuresti, 19-21 octombrie 2017.

## Bibliografie

1. Veal DA, Deere D, Ferrari B, Piper J, Attfield PV. 2000. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J Immunol Methods*; 243(1-2): 191-210.
2. Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Cantòn R, Nombela C, Sánchez-Pérez M. 2000. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Reviews*; 13(2): 167-195.
3. Pieretti B, Masucci A, Moretti M. 2012. Clinical flow cytometry – emerging applications, Applications of flow cytometry to clinical microbiology. In: Schmid I, editor. *Clinical flow cytometry - emerging applications*. InTech.
4. Wada A, Kono M, Kawauchi S, Takagi Y, Morikawa T. 2012. Rapid discrimination of Gram-positive and Gram-negative bacteria in liquid samples by using NaOH-sodium dodecyl sulfate solution and flow Cytometry. *PLoS ONE*; 7(10): e47093.
5. Zboromyrska Y, Rubio E, Alejo A, Vergara A, Mons I, Campos J, Bosch J, Marco F, Vila J. 2016. Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. *Clin Microbiol Infect*; 22 (6): 561.e1 - 561.e6.
6. Moshaver B, Boer F, van Egmond-Kreileman H, Kramer E, Stegem E, Groeneveld P. 2016. Fast and accurate prediction of positive and negative urine cultures by flow cytometry. *BMC Infect Dis*; 16(211): 1-7.
7. Shapiro HM. 2001. Multiparameter flow cytometry of bacteria: implications for diagnostics and therapeutics. *Cytometry*; 43: 223-226.
8. Shrestha NK, Scalerà NM, Wilson DA, Procop GW. 2011. Rapid differentiation of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* by flow cytometry after brief antibiotic exposure. *J Clin Microbiol*; 49(6): 2116-2120.
9. Mortimer FC, Mason DJ, Gant VA. 2000. Flow cytometric monitoring of antibiotic-induced injury in *Escherichia coli* using cell-impermeant fluorescent probes. *Antimicrob Agents Chemother*; 44: 676-681.
10. Roth BL, Poot M, Yue ST, Millard PJ. 1997. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX Green nucleic acid stain. *Appl Environ Microbiol*; 63 : 2421-2431.
11. Steen HB. 1990. Flow cytometric studies on microorganisms. In: Meland MR, Lindmo T, Mendelsohn ML, editors. *Flow cytometry and sorting*, 2nd edition. New York: Wiley-Liss; p 605-622.
12. Walberg M, Gaustad P, Steen HB. 1996. Rapid flow cytometric assessment of mecillinam and ampicillin bacterial susceptibility. *J Antimicrob Chemother*; 37(6): 1063-1075.
13. Gant VA, Warnes G, Phillips I, Savidge GF. 1993. The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. *Med Microbiol*; 39: 147-154.
14. Novo DJ, Perlmutter NG, Hunt RH, Shapiro HM. 2000. Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrob Agents Chemother*; 44(4): 827-834.
15. Jepras RI, Paul FE, Pearson SC, Wilkinson MJ. 1997. Rapid assessment of antibiotic effects on *Escherichia coli* by bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol and flow cytometry. *Antimicrob Agents Chemother*; 41(9): 2001-2005.
16. Kirk SM, Schell RF, Moore AV, Callister SM, Mazurek GH. 1998. Flow cytometric testing of susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to ethambutol, isoniazid, and rifampin in 24 hours. *J Clin Microbiol*; 36: 1568-1573.
17. Gauthier C, St-Pierre Y, Villemur R. 2002. Rapid antimicrobial susceptibility testing of urinary tract isolates and samples by flow cytometry. *J Med Microbiol*; 51: 192-200.
18. Suller MT, Starkb JM, Lloyd D. 1997. A flow cytometric study of antibiotic-induced damage and evaluation as a rapid antibiotic susceptibility test for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*; 40(1): 77-83.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.
20. Vedel G. 2005. Simple method to determine beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 56: 657-664.
21. Livermore DM, Paterson D. 2006. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase in resistance. *Current Medicine Group Ltd*. 3.
22. Magiorakos M, Srinivasan A, Carey R B, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF. 2011. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect*; 18(3): 268-281,
23. Coque TM, Novais Â, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, Baquero F, Cantón R, Nordmann P. 2008. Dissemination of Clonally Related *Escherichia coli* Strains Expressing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis*; 14(2): 195-200.

24. Czobor I, Gheorghe I, Banu O, Velican A, Lazăr V, Mihăescu Gr, Chifiriuc MC. 2014. ESBL genes in Multi Drug Resistant Gram negative strains isolated in a one year survey from an Intensive Care Unit in Bucharest, Romania. *Rom. Biotechnol. Lett*; 19(4): 9553–9560.
25. Sandegren L, Linkevicius M, Lytsy B, Melhus Å, Andersson DI. 2012. Transfer of an *Escherichia coli* ST131 multiresistance cassette has created a *Klebsiella pneumoniae*-specific plasmid associated with a major nosocomial outbreak. *J. Antimicrob. Chemother*; 67(1):74–83.
26. Carattoli A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 53(6): 2227–38.
27. Huang XZ, Frye JG, Chahine M, Glenn LM, Ake JA, Su W, Nikolich MP, Lesho EP. 2012. Characteristics of plasmids in multi-drug-resistant *Enterobacteriaceae* isolated during prospective surveillance of a newly opened hospital in Iraq. *PLoS One*; 7(7): e40360.
28. Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*; 20(3): 440-458.
29. Woodford N., Ellington M.J., Coelho J.M., Turton J.F., Ward M.E., Brown S et al. 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*; 27(4): 351-353.
30. De Champs C, Poirel L, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J, et al. 2002. Prospective survey of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. *Antimicrob. Agents Chemother*. 46(9): 3031-4.
31. Naas T, Poirel, Nordmann P. 2008. Minor extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect*; 14(Suppl. 1):42-52.
32. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. 70(1): 119-123.
33. Jiang X, Ni Y, Jiang Y, Yuan F, Han L, Li M, et al. 2005. Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 beta-lactamase in China. *J Clin Microbiol*. 43: 826-831.
34. Efrekar RF, Hosseini-Mazinani SM, Ghandili S, Hamraz M, Zamani S. 2005. PCR detection of plasmid mediated TEM, SHV and AmpC  $\beta$ -lactamases in community and nosocomial urinary isolates of *Escherichia coli*. *Iranian J Biotech*; 3(1): 48-54.
35. Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordmann P. 1999. An SHV-derived extended spectrum  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 43: 1281-4.
36. Israil A, Chifiriuc C, Palade G, Cotar A. 2013. Clinical and bacteriological aspects of bacterial infections associated to abdominal surgical emergencies. *Ars Docenti Publ. House*; 150.
37. Miheirico C, Oliveira DC, de Lencastre H. 2007. Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of mec Element Types in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob. Chemother*; 51(9): 3374-3377.
38. Kunyan Z, McClure JA, Sameer Elsayed S, Conly JM. 2005. Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types I to V in Methicillin-Resistant.
39. Agnello M, Wong-Beringer A. 2012. Differentiation in Quinolone Resistance by Virulence Genotype in *Pseudomonas aeruginosa*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042973>
40. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol*; 33: 2233–2239.
41. Damian A, Negruț M. 2011. Diagnosticul de laborator în toxiinfecțiile alimentare produse de bacilli *Gram* negativi. Edit. Ceres. pp. 304.
42. <http://www.pasteur.fr/mlst/>.
43. <http://pubmlst.org/paeruginosa/>.
44. [http://pubmlst.org/abaumannii/info/primers\\_Pasteur.shtml](http://pubmlst.org/abaumannii/info/primers_Pasteur.shtml).
45. Grosso F, Quinteira S, Peixe L. 2011. Understanding the dynamics of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lineages in Portugal. *Clin Microbiol Infect*; 17(8): 1275-9.
46. Sardelic S, Bedenic B, Colignon-Dupuich C, Orhanovic S, Bosnjak Z, Plecko V, Cournoyer B, Rossolini MG. 2012. Infrequent Finding of Metallo- $\beta$ -Lactamase VIM-2 in Carbapenem-2 Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Croatia. *Antimicrob. Agents Chemother*. 56(5): 2746-9.
47. Gheorghe I, Novais A, Grosso F, Rodrigues C, Chifiriuc MC, Lazar V, Peixe L. 2015. Snapshot of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in Bucharest hospitals reveals unusual clones and novel genetic surroundings for *bla*<sub>OXA-23</sub>. *J Antimicrob Chemother*; 70 (4):1016-1020.