

ENTEROBACTERII PRODUCENTE DE BLSE – ASPECTE CONTEMPORANE A DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR

(revista literaturii)

Olga Burduniuc

Centrul Național de Sănătate Publică

Summary

Producent of EBLs Enterobacteriaceae – issues contemporary a diagnostic laboratory

One of the main research problems in clinical microbiology is currently acquired resistance of bacteria to antibiotics. Currently inactivation by beta-lactam beta-lactamase is the most common mechanism. The rapid spread of this type of resistance is because coding genes found on transmissible plasmids or movable. At this point it is important to mitigate the social impact of the phenomenon of multiple resistance to antibacterial preparations, with detailed knowledge of the mechanisms of bacterial resistance. Correct detection of strains producing ESBLs *Enterobacteriaceae* family, remains a challenge for the microbiology laboratory

Key words: antibiotics, resistance, mechanisms, Beta Lactamases.

Rezumat

Una din problemele prioritare de cercetare în microbiologia clinică la ora actuală reprezintă rezistența dobândită a bacteriilor la antibiotice. Actualmente inactivarea beta-lactaminelor de către beta-lactamaze este mecanismul cel mai frecvent întâlnit. Răspândirea rapidă a acestui tip de rezistență se datorează faptului că genele codante se găsesc pe plasmidele transmisibile sau mobilizabile. În acest moment este important să diminuăm impactul social al fenomenului de rezistență multiplă la preparatele antibacteriene, prin cunoașterea detaliată a mecanismelor de rezistență bacteriană. Detectarea corectă a tulpinilor familiei *Enterobacteriaceae* producătoare BLSE, rămâne o provocare pentru laboratorul de microbiologie.

Cuvinte cheie: antibiotice, rezistență, mecanisme, beta-lactamaze

Studiul actual al problemei în lume

Rezistența alarmantă a bacteriilor la antibiotice este cel mai discutat subiect al reuniunilor științifice de oriunde în lume. Din nefericire, bacteriile multirezistente la antibiotice au devenit o obișnuință a laboratoarelor și spitalelor de pretutindeni. Presiunea de selecție a antibioticelor, prin efecte directe și indirecte, a determinat o creștere a frecvenței infecțiilor cu tulpini rezistente și multirezistente [21].

Antibioticoterapia excesivă reduce biodiversitatea bacteriană favorizând colonizarea intestinului gazdei umane cu germeni oportuniști rezistenți la diverse antimicrobiene [31].

Infecțiile determinate de Enterobacterii producătoare de BLSE (Beta Lactamazele cu Spectru Extins) determină un nivel înalt de morbiditate și mortalitate datorită eșecurilor terapeutice și costuri tot mai ridicate pentru îngrijirile medicale. Rezistența la antibioticele beta-lactamice este înscrisă în codul genetic al bacteriei, dobândirea acesteia producându-se prin mutație sau prin achiziționare de material genetic [12, 38].

Datele literaturii de specialitate relatează următoarele mecanisme dobândite de rezistență către antibioticele beta-lactamine: sinteza β -lactamazelor - enzime secretate de către bacterii care neutralizează antibioticele beta-lactamine, făcându-le ineficiente; mutațiile PBP (Penicillin binding protein), al căror efect este reducerea afinității de legare cu antibioticele β -lactamice; înglobarea diminuată a antibioticelor datorată schimbărilor în structura peretelui sau activității pompelor de eflux [31].

Actualmente, inactivarea beta-lactaminelor de către beta-lactamaze este, în prezent, mecanismul cel mai frecvent întâlnit. Aceste enzime scindează nucleul beta-lactamic, producând inactivarea antibioticului. [2, 10, 28]. Ele pot fi inductibile, secretate numai în prezența beta-lactaminelor, sau constitutive, produse permanent chiar și în absența substratului. Toate

bacteriile gram-negative produc beta-lactamaze codificate cromozomal, majoritatea hidrolizând preferențial cefalosporine, inclusiv de generația a III-a și a IV-a, care sânt rezistente la acțiunea beta-lactamazelor codificate plasmidic [11, 15, 29].

Activitatea hidrolitică a BLSE asupra diferitelor substraturi - peniciline, cefalosporine sau monobactami diferă de la un tip de enzimă la alta. Spre exemplu, în mod caracteristic, BLSE de tip TEM și SHV au acțiune hidrolitică mai intensă asupra ceftazidimei decât asupra cefotaximei, spre deosebire de enzimele de tip CTX-M, la care acțiunea este mai mare asupra cefotaximei. Astfel de diferențe pot face ca bacteriile producătoare de BLSE să fie sensibile *in vitro* la unele antibiotice mai sus menționate. În recomandările CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) este indicat că tulpinile de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* și *Proteus mirabilis* producătoare de BLSE să fie raportate ca fiind rezistente la peniciline, cefalosporine și monobactami, indiferent de datele de susceptibilitate *in vitro* [12].

Fenomenul de co-rezistență, fie prin alterarea porinelor, fie prin expresia concomitentă de betalactamaze AmpC, este responsabil și de ineficacitatea în infecții cu Enterobacteriaceae producătoare de BLSE a cefamicinelor (cefotaxina, cefotetan, cefmetazol), deși acestea nu sânt incluse în spectrul lor de acțiune [16, 17].

În identificarea bacteriilor din familia *Enterobacteriaceae* nu este suficientă determinarea apartenenței la o specie, este necesară evidențierea factorilor de virulență specifici (determinați fenotipic). Identificarea unei tulpini bacteriene nu prezintă interes clinic dacă nu este completată de enumerarea arsenalului de factori/gene posibile de patogenitate [30].

Apariția de gene de rezistența la beta-lactamine și fluorochinolone la *Enterobacteriaceae* implicate în infecții umane ridică un risc vital și impune familiarizarea cu tehnicile de identificare a acestor gene, în vederea instituirii unui tratament adecvat și controlării epidemiilor potențiale [39].

Reprezentanții familiei *Enterobacteriaceae* reprezintă principalii producători de BLSE, având un impact major asupra sănătății publice. BLSE sânt definite ca enzime codate plasmidic, care hidrolizează penicilinele, oximino - cefalosporinele de generația I, II și III și aztreonamul. BLSE nu sânt active față de cefamicine și carbapeneme, și sânt, inhibitate de inhibitorii de beta-lactamaze, cum ar fi acidul clavulanic [29]. Cel mai des întâlnite BLSE sânt cele din clasa A (TEM, SHV, CTX-M) [3].

După anul 1995, au apărut variantele CTX-M, mai ales la pacienți spitalizați, ale căror prevalență crește rapid [14]. Spre deosebire de enzimele derivate din TEM și SHV, depistate cu precădere în mediul intraspitalicesc, BLSE de tip CTX-M s-au răspândit masiv în mediul comunitar, în special în cazul speciei *Escherichia coli* putând fi chiar „importate” din comunități în structurile spitalicești [33].

Încă de la începutul anilor '80, au fost descoperite în Germania tulpini producătoare de BLSE și la speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Serratia marcescens* implicate în infecții nozocomiale, numărul de tipuri (VEB, GES, IBC, PER, TLA, SFO, BEL), precum și frecvența raportării fiind în creștere [31]. BLSE din clasa D (OXA) sunt mai puțin întâlnite [24]. Ocazional, sunt detectate alte clase de BLSE [20]. Disiminarea alarmantă a BLSE se datorează în mare parte proliferării de beta-lactamaze CTX-M [18].

Prezența beta-lactamazelor AmpC pot interfera cu detectarea de BLSE [29]. Este important să reținem că beta-lactamazele AmpC sunt din ce în ce mai frecvent găsite pe plasmide [25].

Detectarea de laborator a enterobacterilor producătoare de BLSE

Teste directe de evidențiere a beta-lactamazelor

Au fost concepute numeroase teste directe de detectare a activității β-lactamazice, dar numai o parte dintre ele se pot folosi ca analize de rutină.

Majoritatea testelor folosesc cefalosporine cromogene, sau corelează hidroliza penicilinei cu o schimbare a culorii mediului de reacție, mediată de iod sau detectată cu un indicator de pH [33].

Testele cu cefalosporine cromogene

Producerea de beta-lactamaze, la multe specii de microorganisme, poate fi determinată cu ajutorul testelor cromogene sensibile, bazate pe utilizarea substraturilor speciale, care schimbă culoarea ca rezultat al scindării, sau cu urmărirea reacției, care implică procesul de hidroliză de β – lactamine. Cel mai utilizat substrat cromogen este nitrocefina - cefalosporină, scindată de majoritatea beta-lactamazelor, cu formarea unui produs de culoare roșie aprinsă. Testul dat nu este utilizat pe larg la reprezentanții familiei *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. și alți bacili gram-negativi aerobi deoarece rezultatele pot să nu indice sensibilitatea la β -lactamii cei mai des utilizați pentru tratament [38].

Testul la nitrocefina

Nitrocefina este o cefalosporină care poate funcționa ca substrat cromogen pentru β -lactamaze și își schimbă culoarea de la galben la roșu atunci când este hidrolizat. Acesta reprezintă testul cel mai sensibil pentru majoritatea β -lactamazelor, exceptând penicilinazele stafilococice. Avantajul folosirii acestui antibiotic în testele de evidențiere constă în faptul că el este hidrolizat de toate β – lactamazele cunoscute, indiferent de specificitatea acestora.

Nitrocefina este disponibil sub formă de pudră purificată de la Becton Dickinson (Oxford, UK) sau discuri îmbibate cu antibiotic (OXOID) [27].

Testul la nitrocefina în tuburi. Coloniile bacteriene sunt raclate de pe mediul nutritiv solid și resuspendate în tampon fosfat obținându-se o suspensie densă, peste care se adaugă soluție nitrocefina. Activitatea β -lactamazică este evidențiată prin apariția culorii roșii în 1 - 2 minute. În cazul enzimelor cu activitate mai mică răspunsul poate întârzia, însă rezultatele pozitive apărute la mai mult de 10 minute trebuie tratate cu scepticism întrucât ele pot fi cauzate de o activitate β -lactamazică secundară a proteinelor care leagă penicilina (PBP) care formează complexe acil instabile [27].

Testul acidimetric. Principiul testului este modificarea culorii la indicatorii acido-bazici, cum ar fi bromocrezol violet, cauzată de apariția unui grup decarboxil suplimentar la scindarea inelului beta-lactamic. Hidroliza nucleului β -lactamic generează o grupare carboxil care acidifică un mediu netamponat. Acidifierea rezultată poate fi detectată în tuburi sau pe hârtie de filtru [27].

Metoda în tub: Se folosește un indicator (soluție de roșu fenol la care s-a adăugat benzilpenicilină, pH 8,5). Soluția de culoare violet este distribuită în godeuri și inoculată cu bacterii din cultură solidă pentru a forma o suspensie densă. Activitatea β -lactamazică este indicată de virajul culorii de la roșu la galben în maxim 5 minute [10].

Metoda pe benzi de hârtie: benzile mici, de hârtie de filtru Whatman sunt îmbibate într-o soluție proaspăt preparată de benzilpenicilină, brom-crezol și NaOH. Benzile se usucă și se păstrează pentru mai multe luni. Înainte de folosire, benzile se rehidratează în apă distilată și apoi se aplică cultura bacteriană de pe agar solid. Apariția culorii galbene în maxim 5 minute indică activitate β -lactamazică [10].

Testul iodometric se bazează pe capacitatea produselor de hidroliză a antibioticelor beta-lactamice de-a recupera iodul până la iodură, cauzând decolorarea complexului iod / amidon [39].

Metoda în tub se poate efectua în cantități mici atât în tuburi, cât și în plăci cu godeuri. Se distribuie benzilpenicilina (penicilină G) în tampon fosfat, în godeurile unei plăci. În această soluție se suspendă cultura bacteriană, solidă (de pe agar) și se păstrează la temperatura camerei pentru aproximativ 30 – 60 minute. Se adaugă amidon solubil în apă distilată și ulterior iod în soluție de iodură de potasiu. Activitatea β – lactamazică este demonstrată prin decolorarea iodului în maximum 5 minute [5].

Metoda pe benzi de hârtie: Se folosește hârtie de filtru Whatman nr.3, îmbibată în soluție de amidon dizolvat în apă distilată la fierbere, la care s-a adăugat benzil – penicilină la răcire. Când benzile de hârtie iodometrică s-au uscat (aproximativ 2 ore), acestea sânt înmuiate în soluție de iod în iodură de potasiu. Pe acestea se aplică colonii dintr-o cultură de 24 de ore. Decolorarea apare în 5 minute și indică activitate β – lactamazică [5].

Metode fenotipice de evidențiere a beta - lactamazelor

Metodele fenotipice sânt metode mai simple de indicare și caracterizare a β-lactamazelor și sânt disponibile pentru toate laboratoarele clinice. Comitetul European pentru Testarea Sensibilității la Antibiotice recomandă utilizarea standardului european, care începând cu anul 2008 cuprinde și o secțiune referitoare la metodele fenotipice. Standardul pentru metoda difuzimetrică s-a îmbogățit permanent cu noi recomandări, pe măsură ce cunoașterea caracterelor de sensibilitate/rezistență specifice tulpinilor circulante în Europa au devenit accesibile.

Metoda difuzimetrică calitativă clasică (metoda Kirby – Bauer) [6]

BLSE pot fi sintetizate în cea mai mare parte de către enterobacterii și sunt reproduse cel mai adesea în antibiogramă prin imaginea unui sinergism (dop de șampanie) între un disc de cefalosporină de generația a III-a și / sau monobactam și un disc de amoxicilină + acid clavulanic. Această metodă implică utilizarea discurilor cu 30 μg de cefotaxim și ceftazidim precum și discuri ce conțin în combinație cefotaxim + acid clavulanic, ceftazidim + acid clavulanic (30/10μg). Această imagine poate fi discretă sau atipică. Secreția de BLSE va fi suspectată, în primul rând, de micșorarea tuturor diametrelor de inhibiție la toate cefalosporinele din generația a III-a: CTX ≤ 27 mm, CAZ ≤ 22mm, CRO ≤ 25mm, ATM ≤ 27mm.

O tulpină de referință trebuie testată în aceleași condiții în scopul verificării validității discurilor de antibiotice. Prezența unei BLSE indică faptul că tulpina este rezistentă la toate β lactamicele, cu excepția imipenemului și cefamicinei [6].

Metoda discurilor duble fiind o variantă a metodei clasice difuzimetrice de determinare a sensibilității la antibiotice, permite depistarea BLSE. Această metodă presupune compararea diametrelor zonelor de inhibiție date de un disc impregnat cu o cefalosporină de spectru larg cu un alt disc impregnat cu același antibiotic asociat cu un inhibitor de β-lactamaze (acidul clavulanic). Dacă tulpina testată produce o enzimă de tip BLSE, diametrul zonei este mai mare pentru discul ce conține antibiotic + inhibitor [6,13,38].

E-testul- metoda difuzimetrică cantitativă. Această metodă se bazează pe proprietatea BLSE de a fi sensibile la inhibitori de β-lactamaze (acidul clavulanic). Benzile E-test conțin un gradient de cefotaxim la un capăt și un gradient de cefotaxim și acid clavulanic la celălalt capăt. Concentrația de cefotaxim este mai mică în cazul în care acesta este asociat cu acidul clavulanic. Benzile similare conținând gradientele de ceftazidim / ceftazidim + clavulanat (TZ / TZL) sânt mai binevenite pentru detectarea tipului enzimatic CTX-M. Dacă raportul dintre concentrația minimă inhibitorie (CMI) de cefotaxim și CMI de cefotaxim + clavulanat este mai mare de 8 rezultă că tulpina respectivă este producătoare de BLSE [9].

Metoda microdiluțiilor succesive în bulion: a permis stabilirea concentrației minime inhibitorii (CMI). Această metodă a implicat utilizarea diluțiilor duble succesive a antibioticului testat în mediu de cultură lichid în următoarele concentrații: 0,25 la ceftazidimă 128,0 mg / L ceftazidimă / clavulanat 0,25 / 4,0 – 128,0 / 4,0 mg / L cefotaxim 0,25 – 64,0 mg / L cefotaxim / clavulanat 0,25 / 4,0 până la 64,0 / 4,0 mg / L. În cadrul cercetării ar trebui incluse atât cefalosporine cât și combinarea lor cu acid clavulanic. Se adaugă cantități fixe din cultura bacteriană cercetată, apoi se incubează timp de 18 ore la temperatura de 35°C. CMI: cea mai mică concentrație de antibiotic care inhibă creșterea microorganismelor (bulion transparent) [2, 6].

Controlul de calitate în testarea sensibilității la antibiotice beta-lactamine

Controlul de calitate are drept scop să asigure precizia și fiabilitatea tehnicii de testare a sensibilității, performanța reactivilor utilizați și performanța personalului care efectuează testele.

Pentru a răspunde acestor deziderate, laboratoarele care realizează antibiograma trebuie să dispună de tulpini de referință pentru realizarea antibiogramei, și anume: *E. coli* ATCC 25922 (BLSE-negativă), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *E. coli* ATCC 35219.

Controlul de calitate trebuie să fie realizat pentru fiecare lot nou de mediu Mueller Hinton și / sau antibiotic, utilizând tulpinile de referință. Antibiogramele vor fi efectuate zilnic pentru fiecare dintre tulpinile de referință [38].

Teste pentru confirmarea prezenței β -lactamazelor cromosomale inductibile (tip AmpC)

Cefalosporinele de generația I (ampicilina și amoxicilina) induc exprimarea enzimelor tip AmpC și sânt distruse de către acestea, la majoritatea speciilor de Enterobacteriaceae. Speciile producătoare de β -lactamaze inductibile tip AmpC segregă mutante derepresate care produc enzime AmpC fără inducție (derepresie stabilă). Aceste mutante sânt rezistente la majoritatea penicilinelor și cefalosporinelor și sânt depistate frecvent în izolatele clinice [19].

Speciile producătoare de β -lactamaze tip AmpC pot fi recunoscute prin teste de antagonism între cefoxitim și cefotaxim. Pentru efectuarea acestui test se inoculează plăci, conform protocolului din metoda antibiogrammei, și se plasează discuri cu ceftazidim și cefoxitim, pe aceeași placă, la o distanță de 25 mm. Inducția de β -lactamaze este evidențiată prin aplatizarea zonei de inhibiție a ceftazidimului în dreptul discului de cefoxitim. Astfel, cefoxitumul a determinat producerea de β -lactamaze inductibile care au hidrolizat ceftazidimul. Acidul clavulanic este un inductor al β -lactamazelor tip AmpC și de aceea apariția unor colonii în interiorul zonei de inhibiție a discului AMC (amoxicilină - acid clavulanic) poate fi un indicator util pentru detectarea prezenței enzimelor AmpC [6].

Metodele de biologie moleculară pentru evidențierea tulpinilor de beta-lactamaze

Actualmente, în detectarea beta-lactamazelor predomină metodele microbiologice clasice de detectare cum ar fi disc-difuzimetrică, metoda diluțiilor successive în bulion, metoda discurilor duble, precum și diferite teste directe bazate pe reacțiile enzimatic colorimetrice. Aceste metode microbiologice tradiționale sânt potrivite pentru caracteristicile fenotipice ale microorganismului. Cu toate acestea, utilizarea metodelor tradiționale pentru detectarea beta-lactamazelor permit estimarea prezenței enzimei, dar nu pot oferi informații, care să ne permită să distingem enzime specifice responsabile pentru producția de BLSE (SHV, TEM sau CTX-M). Identificarea definitivă a acestor enzime este posibilă numai prin tehnici de secvențiere a proteinelor și genelor, însă aceste tehnici sânt costisitoare și nu pot fi utilizate în clinică și diagnostic. Însă, cercetările efectuate de către mai multe laboratoare de referință din diferite țări, utilizând metode moleculare pentru identificarea de gene specifice responsabile pentru producerea de BLSE, au demonstrat că aceste metode au capacitate suplimentară de a detecta nivel scăzut de rezistența ce ne poate fi scapat prin metode fenotipice. În plus, testele moleculare au, de asemenea, potențial de a detecta BLSE direct din probele clinice, fără izolarea culturilor bacteriene, ceea ce reduce esențial timpul de detectare [35].

Utilizarea acizilor nucleici ca probe biologice de către microbiologi a devenit frecventă în ultimii ani. Există o varietate de probe ADN folosite în rutina laboratoarelor de diagnostic atât pentru confirmarea culturilor cât și pentru detecția directă a patogenilor din probele biologice.

Tehnica PCR (Polymerase Chain Reaction) sânt utilizare pe larg, acestea dovedind o mare sensibilitate și specificitate. Metodele PCR convenționale care utilizează electroforeza în gel de agaroză pentru a detecta produsele de amplificare, nu sunt bine adaptate pentru screening-ul rapid din cauza numărului limitat de probe ce pot fi analizate pe gel, fiind necesare etape suplimentare pentru încărcare, migrare și interpretare. Astfel considerăm că metodele PCR în timp real sunt mai adecvate acestor determinări. Un șir de metode de tipizare a BLSE sânt bazate pe amplificarea genelor enzimelor și analiza ulterioară a produsului de amplificare. La utilizarea primerilor oligonucleotidici, complementari cu secțiuni conservatoare a genelor beta-lactamazelor diverselor grupuri, este posibilă detectarea eficientă a unui grup de enzime (de tip TEM-, CSV-, CTX- și OXA). Cu toate acestea, diferențierea enzimelor din cadrul acestor grupuri, este imposibilă utilizând PCR.

PCR multiplex: amplificarea concomitentă a câtorva gene (PCR multiprimer)-reacția de co-amplificare a câtorva ADN matrice într-o singură reacție cu utilizarea câtorva perechi de primeri. La moment sânt cunoscute PCR multiplex pentru amplificare a 3 tipuri de bază de BLSE : TEM, SHV, CTX [21].

Secvențierea ADN reprezintă identificarea tipului, felului și succesiunii nucleotidelor dintr-un fragment ADN de analizat. În momentul de față s-au dezvoltat tehnici de secvențiere

automate: fie chimic prin metoda Maxam-Gilbert, fie enzimatic prin metoda Sanger. Secvențierea ADN-ului "Standardul de aur" al tipizării moleculare a BLSE este secvențierea genelor acestor enzime. Cea mai răspândită abordare este amplificarea genelor beta-lactamazelor din totalul ADN-ului tulpinei, fenotipic suspecte de producerea BLSE. Pentru amplificare sunt utilizați primerii, specifici pentru anumite categorii de enzime (de tip TEM-, CSV-, CTX-și OXA, etc). Produsele amplificării sânt supuse secvențierii, iar rezultatele obținute sunt comparate cu secvențele nucleotidice cunoscute a enzimelor din băncile internaționale de date. Utilizarea secvențierii permite de a identifica nu numai enzimele cunoscute, dar și noi variante de enzime. Principalul dezavantaj al secvențierii este complexitatea și costul relativ ridicat. Cu toate acestea, perfecționarea continuă a utilajului, foarte repede reduce semnificația acestor deficiențe. Până în prezent, sunt elaborate o serie de metode de tipizare moleculară a BLSE, fără secvențierea genelor lor [4, 7, 30].

Oligotipizarea. Metoda se bazează pe utilizarea seturilor de sonde oligonucleotidice, care permit identificarea mutațiilor punctiforme în genele beta-lactamazelor cunoscute. Sondele oligonucleotidice sânt utilizate pentru reacțiile de hibridizare în condiții severe. Pentru detectarea produselor de hibridizare sânt utilizați marcați radioactivi sau biotina. Pe utilizarea sondelor oligonucleotidice sânt bazate tehnologiile de ADN-cip-uri. Conform acestor tehnologii, pe un purtător cu suprafață mică (1-2 cm) poate fi amplasat 100 de mii sau mai multe sonde oligonucleotidice individuale. Elaborarea cipurilor ADN este cea mai de perspectivă direcție de dezvoltare a metodelor moleculare de diagnostic microbiologic [21].

Teste comerciale. Există, de asemenea, sisteme comerciale de testare destinate pentru detectarea producerii BLSE. Acestea se bazează pe compararea CMI a cefalosporinelor fără inhibitori și cefalosporinelor în asociere cu clavulanatul. Criteriile pentru interpretarea rezultatelor sunt aceleași ca pentru metoda diluțiilor succesive. Cu regret, nici una dintre metodele microbiologice clasice, bazate pe evaluarea fenotipului microorganismului, nu prevede detectarea BLSE la 100% din tulpini [36].

Test-sistemele comerciale "Vitek" sunt puțin eficiente în detectarea BLSE la reprezentanții genului Enterobacter. Situația devine mult mai dificilă în cazurile prezenței concomitente la microorganisme a câtorva determinate de rezistență. De exemplu, la producerea BLSE și hiperproducerea beta-lactamazelor cromozomiale din clasa C, rezistența ultimelor la clavulanat maschează prezența BLSE [36,38].

Sistem automat BD Phoenix armonizat cu CLSI și EUCAST. Sistemul automat de microbiologie BD PhoenixTM este destinat identificării și testării susceptibilității la substanțe antimicrobiene a microorganismelor clinic relevante. Identificarea are loc în 3 ore, iar determinarea susceptibilității în 6 – 10 ore. Aparatul, care incubează și citește în mod continuu panelurile, are capacitatea de a identifica și a determina susceptibilitatea la 100 de izolate, raportând totodată rezultatele pe măsură ce testarea este încheiată. Înainte de a fi raportate, rezultatele sunt examinate de către aparat prin sistemul BDXpert. Sistemul de BDXpert prevede o serie de reguli, care sunt declanșate de diverse condiții: de datele de identificare a speciilor de bacterii, rezultatul testului detectării BLSE și datele CMI [36].

Rezultatele de rutină privind rezistența la antibiotice trebuie reevaluate sistematic pentru identificarea de noi probleme, cum ar fi identificarea de tulpini bacteriene cu profil de rezistență modificat și a unor focare epidemice legate de o asemenea clonă; stabilirea tendințelor evolutive ale rezistenței germenilor; îmbunătățirea calității testelor microbiologice.

Datorită extinderii alarmante a numărului de enterobacterii producătoare de BLSE este necesar monitorizarea rezistenței germenilor menționați la antibioticele beta-lactamine. Detectarea la timp și corectă a BLSE va permite majorarea semnificativă a eficienței antibioterapiei infecțiilor severe.

Concluzii

1. Bacteriile familiei *Enterobacteriaceae* s-au adaptat la spectru larg de antibiotice β -lactamice prin producerea a unor enzime, beta-lactamaze cu spectru extins, ce permit inactivarea lor. BLSE sunt atribuite către determinanții de rezistență, răspândirea cărora este cea mai mare amenințare pentru un grup întreg de preparate antibacteriene - cefalosporine din diferite generații.
2. În prezent, cele mai frecvent întâlnite familii de beta-lactamaze sunt BLSE tip TEM, SHV, și CTX-M. Aceste enzime conferă rezistență la ceftazidim, cefotaxim, ceftriaxona, aztreonam, și alte oxymino-beta-lactamine și se găsesc cel mai adesea la specii de *E. coli* și *Klebsiella spp.*.
3. Tipul exact de beta-lactamază nu este posibil a fi detectat cu ajutorul testelor de rutină. Asocierea mai multor tipuri de beta-lactamaze la același microorganism face și mai dificilă depistarea corectă, identificarea definitivă a acestor enzime fiind posibilă numai prin tehnici de biologie moleculară.

Bibliografie

1. Arlet G., et al. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995, p. 203-208.
2. Buiuc D, Neagu M. *Tratat de Microbiologie Clinică*. Editura Medicală, București. 2008.
3. Bradford P. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001, p. 933-951.
4. Bradford P. Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of blaSHV genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, p. 2960-2963.
5. Catlin B. Iodometric detection of Haemophilus influenzae β -lactamase: rapid presumptive test for ampicillin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemother* 1975, p. 265-270.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement 2011. M100-S21
7. Clermont O., et al. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol* 2000, p. 4555-4558.
8. Cohen Stuart J, et al. Method for phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacter species in the routine clinical setting. *J Clin Microbiol* 2011, p. 2711-2713.
9. Cormican, M., et al. Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *Journal of Clinical Microbiology* 1996, p. 1880-1884.
10. Duma, R. et al. Simple test for identifying penicillinase-producing staphylococci. *Applied Microbiology* 1968, p. 1261-1262.
11. Einhorn A. Extended-Spectrum Beta-lactamases: Frequency, Risk Factors and Outcomes. *Pharmacotherapy Publications* 2002, p. 14-20.
12. Falagas M., et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms, *Journal of Hospital Infection*, vol. 73, 2009, p. 345-354.
13. Jarlier V, et al. Extended spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988, p. 867-878.
14. Jones C., et al. Characterization and sequence analysis of extended spectrum β -lactamase encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 53, 2009, p. 465-475.
15. Lorian V. *Antibiotics in laboratory medicine*. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
16. Lee C., et al. Collateral damage of flomoxef therapy: in vivo development of porin deficiency and acquisition of blaDHA-1 leading to ertapenem resistance in a clinical isolate

- of *Klebsiella pneumonia* producing CTX-M-3 and SHV-5 betalactamases, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 60, 2007, p. 410-413.
17. Lee C., et al. Treatment of ESBL - producing *Klebsiella pneumonia* bacteraemia with carbapenems or flomoxef: a retrospective study and laboratory analysis of the isolates, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 58, 2006, p. 1074-1077.
 18. Livermore D., et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 59, 2007, p. 165-174.
 19. Livermore, D., et al. Interpretative reading: recognising the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, *Suppl.* 2001, p. 59-64.
 20. Lahey Clinic. Beta-lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. 2011. Available at: www.lahey.org/studies
 21. Mabilat C., et al. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases. In: Persing D., Smith T., editors. *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*. Washington: ASM, 1993; p.553-559.
 22. Marc Lipsitch, et al. Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance: A Population Perspective. *Emerg Infect Dis* 2002, p. 540.
 23. Mabilat C., et al. Development of «oligotyping» for characterization and molecular epidemiology of TEM β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; p. 2210-2216.
 24. Naas T, et al. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008 (Suppl 1), p. 42-52.
 25. Navarro F., et al. CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999-December 2000). *J Antimicrob Chemother* 2001, p. 383-369.
 26. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement (M100-S15), 2005 National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
 27. O'Callaghan, C. H., et al. Novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1972, p. 283-288.
 28. Overdevest I., et al. Laboratory Detection of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Evaluation of Two Screening Agar Plates and Two Confirmation Techniques *Clin Microbiol* 2011, p. 519-522.
 29. Paterson D. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005, p. 657-686.
 30. Payne D., et al. Molecular Approaches for the Detection and Identification of β -lactamases. *Molecular Bacteriology*. In: Woodford N., Johnson A.P., editors. *Protocols and Clinical Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press 1998, p. 495-512.
 31. Pfeifer Y., et al. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens, *International Journal of Medical Microbiology*, vol 300, 2010, p. 371-379.
 32. Ronald N. Jones, et al. Inducible β -lactamase-mediated resistance to third-generation cephalosporins. *Clinical Microbiology and Infection* 1997, vol.3, suppl.1:S7-S18.
 33. Ruppé E. Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi: l'avènement des CTX-M, *Antibiotiques*, vol 12, issue 1, 2010, pg. 3-16
 34. Sanders, C., et al. In vitro antagonism of β -lactam antibiotics by ceftiofur. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1982, p. 968-975.
 35. Tenover F. Rapid detection and identification of bacterial control and beyond. *Clin Infect Dis* 2007, p. 418-423.

36. Thomson K, et al. Comparison of Phoenix and VITEK 2 extended-spectrum-beta-lactamase detection tests for analysis of *Escherichia coli* and Klebsiella isolates with well-characterized beta-lactamases. J Clin Microbiol 2007, p. 2380-2384.
37. Woodford N, et al.. Molecular detection of antibiotic resistance: when and where? J Antimicrob Chemother 2005, p. 259–261.
38. Сидоренко С.В. Бета-лактамазы расширенного спектра: клиническое значение и методы детекции. Инфекции и антимикробная терапия Том 04/N6/2002, с. 16-26.

ACTUALITIES IN THE ANTIBIOTIC RESISTANCE PHENOMENON OF *E. COLI* ISOLATED FROM URINARY TRACT INFECTION

Olga Burduniuc

Centrul Național de Sănătate Publică

Summary

Research on the detection of enterobacteria of antibiotic resistance markers in the current context of rapid increase in the prevalence of resistant strains of *E. coli*, the need to use methods of molecular biology is becoming increasingly stringent, which is far more sensitive than phenotypic testing and surveillance and epidemiological monitoring of strains producing CTX-M are important in determining treatment tactics for review empirical treatment protocols. Our study is something new for our country by molecular analysis of plasmid genes with great potential for the communities.

Rezumat

Actualități privind rezistența la antibiotice a E. coli izolată de la pacienții cu infecții ale tractului urinar

În contextul actual de creștere rapidă a prevalenței rezistenței tulpinilor de *E. coli* necesitatea utilizării metodelor de biologie moleculară devine din ce în ce mai stringentă, acestea fiind metode mult mai sensibile decât testarea fenotipică, iar supravegherea și monitorizarea epidemiologică a tulpinilor producătoare de CTX-M sunt importante în stabilirea tacticilor terapeutice pentru revizuirea protoalelor de tratament empiric. Studiu efectuat de noi reprezintă ceva nou pentru republica noastră prin analiza moleculară a unor gene plasmidice cu mare potențial de diseminare în colectivități.

Introduction

Antimicrobial resistance has become an important problem worldwide. Bacterial resistance to antimicrobial agents has been emerging and rapidly disseminating among many nosocomial and community-acquired pathogens [1,4].

Infections caused by resistant microorganisms determine a high morbidity and mortality level due to therapeutic failures and rising costs for medical care [1,14].

The main causes of increasing resistance to antibiotics are inappropriate use and invalid prescription of these preparations by misinterpretation of symptoms, uncertain diagnosis and perceived expectations of the patient, duration too long / too short or inappropriate dose administration, self-medication, use of antibiotics in the veterinary sector, poor arsenal of diagnostic measures, medicaments and vaccines, inadequate supervision and control over medicaments use [4, 8].

Difficulties in treatment of infectious diseases occur more often in infections caused by producing strains of ESBLs (Extended Spectrum Beta Lactamases) - enzymes that develop resistance to extended-spectrum antibiotics [15].

The emergence of strains of *Enterobacteriaceae* producer of ESBLs is at present days a strong threat, in terms of effectiveness of antibiotics use in therapy of infections [9].