

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ**

*Dezvoltarea și evaluarea unui nou test fenotipic de detecție a  
producției de carbapenemaze*

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. POPA MIRCEA IOAN**

**Student-doctorand:**

**FLOREA (CĂS. MUNTEAN) MĂDĂLINA-MARIA**

<b>Introducere</b>	3
<b>1. Mecanisme de rezistență la carbapeneme</b>	4
1.1. Generalități	4
1.2. Mecanisme de rezistență la $\beta$ -lactamine	5
<b>2. Metode fenotipice și genotipice de detecție a carbapenemazelor</b>	8
2.1. Introducere	8
2.2. Teste fenotipice	8
2.3. Teste enzimatic bazate pe hidroliză	9
2.4. Teste imunocromatografice simple și multiplex	10
2.5. Teste genotipice	10
<b>3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale</b>	10
<b>4. Dezvoltarea și evaluarea testului rCIM</b>	11
4.1. Introducere	11
4.2. Material și metodă	12
4.3. Rezultate	13
4.5. Concluzii	14
<b>5. Optimizarea testului rCIM pentru detecția carbapenemazelor în tulpini hiperproducătoare natural de cefalosporinaze</b>	15
5.1. Introducere	15
5.2. Material și metodă	15
5.3. Rezultate	16
5.4. Discuții	17
5.5. Concluzii	17
<b>6. Optimizarea testului rCIM pentru detecția carbapenemazelor la bacili Gram-negativi ne-fermentativi</b>	18
6.1. Introducere	18
6.2. Material și metodă	18
6.3. Rezultate	19
6.4. Discuții	20
6.5. Concluzii	20
<b>7. Utilizarea testului rCIM într-un spital clinic din România - studiu pilot</b>	21
7.1. Introducere	21
7.2. Materiale și metodă	21
7.3. Rezultate	22
7.4. Discuții	23
7.5. Concluzii	23
<b>Concluzii și contribuții personale</b>	23
Concluzii	23
Contribuții proprii	24
<b>Bibliografie</b>	24

## Introducere

Rezistența la substanțe antimicrobiene reprezintă una dintre marile provocări ale lumii moderne, punând în pericol anumite proceduri medicale ce nu sunt posibile în lipsa administrării de antibiotic cum sunt chirurgia majoră sau transplantul de organe. Rezistența la antibiotice este un fenomen natural de evoluție bacteriană ce poate să fie determinată atât cromozomial prin apariția unor mutații în genele ce codifică susceptibilitatea la antibiotice, fie extracromozomial prin achiziția de material genetic exogen. Genele responsabile de rezistența la antibiotice se află frecvent pe elemente genetice mobile (plasmide, transpozoni, integroni etc.) ce pot fi transferate orizontal cu ușurință. Bacteriile pot prelua astfel mecanisme de rezistență față de o clasă sau de mai multe clase de antibiotice, limitând opțiunile terapeutice disponibile.

În România, studiile privind ecologia rezistenței la antibiotice sunt foarte limitate. Până la ora actuală au fost realizate studii dispersate în marile centre universitare, pe perioade scurte de timp și fără o metodologie comună, astfel încât nu există niciun studiu care să prezinte o reflexie reală a situației din întreaga țară.

Lucrarea de față dorește să prezinte o nouă metodă fenotipică de detecție a carbapenemazelor. Pornind de la un test deja existent pe piață (Carbapenem Inactivation Method), am testat ipoteza unei metode similare dar mult mai rapide (18 h vs. 3 h), ce ar permite evaluarea tulpinilor din orice laborator de microbiologie clinică în aceeași zi, eficientizând astfel procesul expertizei tulpinilor. Datorită timpului redus de prelucrare a tulpinilor, testul a fost denumit rapid Carbapenem Inactivation Method (rCIM).

Lucrarea este structurată în 7 capitole, 2 în partea generală și 5 în partea specială. Partea generală prezintă o introducere în temă, arătând succint principalele mecanisme de rezistență la carbapeneme, accentul aflându-se pe producția de carbapenemaze și date despre enzimele testate în cadrul studiilor descrise în partea specială. De asemenea, în partea generală sunt analizate principalele metode fenotipice și genotipice utilizate la ora actuală în laboratoarele de microbiologie clinică din lume pentru detecția carbapenemazelor.

Partea specială cuprinde 4 studii, având în mijloc testul rCIM. Astfel, am descris procesul de validare a testului pe un lot foarte mic de microorganisme (10 tulpini) pentru testarea ipotezei de lucru urmat de validarea pe un lot reprezentativ de enterobacterii (213 tulpini și o varietate de carbapenemaze), atât retrospectiv cât și prospectiv. Testul rCIM și-a dovedit astfel

non-inferioritatea față de testul fenotipic de referință utilizat la ora actuală, CarbaNP (sensibilitate de 98% a rCIM versus 92% CarbaNP dar o specificitate mai mică, 95% versus 100%).

Deoarece în cadrul studiului 3 tulpini hiperproducătoare de AmpC au prezentat rezultate fals pozitive, am urmărit îmbunătățirea testului pentru diferențierea corectă între tulpinile producătoare de carbapenemaze și cele care au cefalosporinaza cromozomială dereprimată. Cunoscând faptul că enzimele de tip AmpC pot fi inhibate de către cloxacilină, am adaptat protocolul și a rezultat testul rCIM-A. Noul protocol a îmbunătățit specificitatea testului pentru tulpinile natural producătoare de AmpC (99.29% vs. 80.85%).

De asemenea, deoarece protocolul inițial nu a avut rezultate foarte bune în ceea ce privește detecția producției de carbapenemaze la BGN ne-fermentativi, am adaptat protocolul, modificând carbapenemul folosit (imipenem în loc de meropenem), am adăugat cloxacilină și suflat de zinc și am crescut perioada de timp necesară incubării inițiale. Testul a prezentat o sensibilitate și o specificitate de 92%, respectiv 100%.

Ultimul capitol a inclus experiența de lucru cu un partener clinic. Am constatat mai multe deficiențe ale sistemului de lucru, printre care o identificare deficitară a microorganismelor, testarea unui număr insuficient de antibiotice pe antibiograma difuzimetrică sau chiar cazuri de contaminări serioase ale acesteia. În ceea ce privește producția de carbapenemaze, am identificat tulpini producătoare de NDM, OXA-48 sau co-producătoare de KPC + NDM.

Rezultatele obținute au fost foarte bune, caracteristicile operaționale ale testului rCIM fiind comparabile cu cele ale testului CarbaNP, utilizat ca test de referință sau chiar superioare, în funcție de enzimele testate și de protocolul utilizat. Punctele forte ale testului sunt acuratețea dar și faptul că este un test rapid, ce poate fi realizat cu materiale și aparatură prezente în orice laborator de microbiologie clinică și nu necesită personal specializat.

## **1. Mecanisme de rezistență la carbapeneme**

### **1.1. Generalități**

Enterobacteriile (EPC) și bacilii Gram-negativi nefermentativi (BGN-NF) producători de carbapenemaze sunt microorganisme frecvent rezistente față de majoritatea (sau chiar toate) clasele de molecule antimicrobiene, reprezentând o problemă majoră de sănătate publică. Deși fac parte din flora intestinală umană, enterobacteriile sunt printre cei mai răspândiți patogeni,

cauzând o varietate mare de infecții, de la cistită la pielonefrită, pneumonie, meningită, infecții intraabdominale, sepsis sau infecții asociate unor manevre invazive. *Pseudomonas aeruginosa* și *Acinetobacter baumannii* sunt descriși mai degrabă în infecții nosocomiale, asociate îngrijirilor de sănătate cum sunt cele legate de transplant, spitalizare în unități de terapie intensivă sau chirurgie. Enterobacteriile se transmit facil prin intermediul portajului - de pe mâini, prin alimente sau apă contaminată sau prin achiziția orizontală de material genetic. Spre deosebire de acestea, BGN-NF pot genera epidemii de spital monoclonale din care se pot selecta ulterior tulpini și mai rezistente. (1)

## **1.2. Mecanisme de rezistență la $\beta$ -lactamine**

Astfel, activitatea beta-lactaminelor poate fi perturbată de alterarea oricăruia dintre mecanismele de acțiune: modificarea numărului sau a funcției porinelor conduce la scăderea permeabilității sau chiar impermeabilitatea moleculei, scăderea afinității pentru țintă (rară) conduce de asemenea la impermeabilitate iar capacitatea de acumulare în spațiul periplasmatic este afectată de producția de beta-lactamaze care vor inactiva enzimatic antibioticele dar și de prezența sistemelor de eflux care exportă activ antibioticul în afara celulei.

Inactivarea enzimatică a antibioticului este principalul mecanism de rezistență la beta-lactamine pentru enterobacterii. Beta-lactamazele acționează prin inactivarea beta-lactaminelor deschizând inelul beta-lactamic la nivelul unei legături amidice conducând la pierderea activității acestora.

La ora actuală sunt descrise peste 7000 de beta-lactamaze, cu spectre de acțiune diferite. (2) Acestea pot fi clasificate în funcție de mai multe criterii. Cele mai frecvent întâlnite clasificări sunt clasificarea structurală Ambler și cea funcțională elaborată de Bush și Jacoby. (3,4)

### **a. Clasificarea Ambler**

Această clasificare încadrează beta-lactamazele în 4 clase, în funcție de omologia secvențelor primare de aminoacizi din structurile înalt conservate din situsul activ. Astfel, enzimele ce aparțin claselor A, C și D conțin un reziduu de serină în centrul activ (serin-beta-lactamaze) în timp ce enzimele din clasa B necesită un ion metal bivalent (de obicei zinc) pentru substratul de hidroliză (metalo-beta-lactamaze).

### **a. Clasificarea Bush-Jacoby**

Clasificarea Bush-Jacoby a fost publicată pentru prima dată în anul 1995, încercând să ia în considerare profilurile substraturilor și a inhibitorilor lor pentru a grupa enzimele astfel încât

acestea să poată fi corelate cu aspectul lor fenotipic. Această clasificare a suferit mai multe modificări de-a lungul timpului, cea mai recentă actualizare datând din 2010. (4)

Mecanismul de acțiune al carbapenemazelor variază în funcție de structura acestora. Astfel, enzimele din clasele Ambler A, C și D necesită un reziduu de serină în timp ce enzimele de clasă B necesită unul sau mai mulți cationi divalenți (de obicei, zinc) pentru a fi active. Inactivarea antibioticului este realizată prin deschiderea inelului beta-lactamic la nivelul legăturii sale amidice, într-o singură reacție de hidroliză.

Deși nu există un consens precis al definiției BSLE, acestea sunt descrise frecvent drept beta-lactamaze rezistente față de peniciline, aztreonam și cefalosporine de generația 1, 2 și 3 cu excepția cefamicinelor și care pot fi inhibitate de inhibitori de beta-lactamază cum este acidul clavulanic.

Din punct de vedere al clasificărilor, enzimele BLSE sunt încadrate în subgrupa 2be (b=beta-lactamază, e=spectru extins/extended-spectrum) a clasificării Bush-Jacoby și cele din subgrupa 2d cu particularități similare celor din 2be. În clasificarea Ambler, enzimele BLSE fac parte din grupele A și D. (5)

Beta-lactamazele de tip AmpC sunt cefalosporinaze produse în mod natural de o varietate de microorganisme cum ar fi enterobacteriile de grup 3 (*Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp., *Providencia* spp.), membrii din încrengătura Actinobacteria (*Mycobacterium smegmatis*) sau din ordinul Pseudomonadales (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* etc.). De asemenea, pot fi codificate plasmidic de către specii bacteriene care nu le produc în mod normal (ex. *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*) sau sunt produse la un nivel neglijabil (ex. *E. coli*). (6) Expresia fenotipică a producției acestor enzime depinde de atât de gradul ei (bazal sau hiperprodus) cât și de tipul ei (poate fi constitutivă sau indusă). Din punct de vedere al clasificării Ambler fac parte din clasa C în timp ce în clasificarea Bush-Jacoby sunt incluse în grupul 1. (7)

Carbapenemazele sunt beta-lactamazele cu cel mai larg spectru de hidroliză a beta-lactaminelor. Acestea aparțin claselor Ambler A, B și D iar în clasificarea Bush-Jacoby grupelor 2 și 3. (4)

#### **a. Carbapenemaze de clasă A**

Carbapenemazele de clasă A aparțin grupului 2f din clasificarea Bush-Jacoby, hidrolizând o paletă largă de beta-lactamine ce include peniciline, cefalosporine, carbapeneme și monobactami. Mecanismul de acțiune implică un reziduu de serină în poziția 70 și implică mai mulți pași cum ar fi formarea unui intermediar acil-enzimă urmat de distrucția sa

hidrolitică. Pot fi inhibitate de inhibitori de beta-lactamază (acid clavulanic, tazobactam). (1) Majoritatea beta-lactamazelor cu impact clinic aparțin clasei Ambler A.

#### **b. Carbapenemaze de clasă B**

Carbapenemazele de clasă B sunt beta-lactamaze cu spectru larg, capabile să hidrolizeze penicilinele, toate cefalosporinele și carbapenemele cu excepția aztreonamului. Cele mai frecvent întâlnite enzime din cadrul clasei B sunt VIM, IMP și NDM. Acestea necesită ioni divalenți (de obicei zinc) în situsul activ pentru a realiza hidroliza carbapenemelor motiv pentru care sunt inhibitate de către chelatori ai acestor ioni divalenți (ex. EDTA) dar nu și de către inhibitorii clasici de beta-lactamază (acid clavulanic, tazobactam, sulbactam).

#### **c. Carbapenemaze de clasă D**

Carbapenemazele de clasă Ambler D se mai numesc oxacilinaze (toate cuprind prescurtarea OXA) și corespund grupului 2d din clasificarea Bush-Jacoby. Similar claselor Ambler A și C, au nevoie de un reziduu de serină în situsul activ pentru a putea hidroliza carbapenemele. La ora actuală au fost descrise peste 1000 de enzime care prezintă o varietate mare din punct de vedere genetic și biochimic. (2) Acestea cuprind spectre de hidroliză extrem de diverse, unele acționând doar asupra penicilinelor în timp ce altele pot hidroliza toate beta-lactaminele.

Rezistența la antibiotice poate să apară și prin modificarea numărului sau a activității porinelor prin modificarea structurii acestora. Fenomenul de impermeabilitate nu este specific, acesta putând afecta activitatea mai multor familii de antibiotice. Sinteza de porine poate fi reglată ca răspuns adaptativ la prezența unor compuși antimicrobieni prin diferite cascade moleculare ce conduc la scăderea numărului de porine. (8)

Pompele de eflux sunt transportori membranari care excretă activ molecule percepute drept toxice de către celula bacteriană. Acestea pot fi clasificate în funcție de capacitatea de a excreta în mod specific un anumit tip de moleculă (ex. pompele de eflux Tet pentru excreția tetraciclinelor) sau a mai multor antibiotice simultan (pompe MDR). Ele se pot diferenția de asemenea după sursa de energie utilizată pentru transportul molecular. Astfel, familiile MFS, RND și SMR folosesc forța proton-motrice, familia MATE utilizează ionii de sodiu iar transportorii ABC folosesc hidroliza de adenosin trifosfat.

Modificările la nivelul PLP apar frecvent în cazul bacteriilor Gram pozitive dar în cazul BGN nu reprezintă un mecanism de rezistență important. Pierderea afinității PLP pentru beta-lactamine poate să apară prin modificări de tip calitativ (mutații ce conduc la modificări conformaționale ale unei PLP cu afinitate ridicată, achiziția de gene sau fragmente de gene ce

codifică PLP-uri cu afinitate redusă) sau cantitativ (mutații ce conduc la scăderea producției unei PLP de afinitate ridicată sau hiperproducția unei PLP de afinitate scăzută).

## **2. Metode fenotipice și genotipice de detecție a carbapenemazelor**

### **2.1. Introducere**

Deoarece prevenția emergenței unor noi carbapenemaze și a genelor lor de rezistență este dificilă (sau imposibilă), cea mai bună metodă de încetinire a răspândirii lor este detecția lor precoce. Detecția bacililor Gram-negativi rezistenți la carbapeneme se poate realiza prin mai multe metode, fenotipice sau genotipice.

### **2.2. Teste fenotipice**

Testele fenotipice sunt metode ce au la bază creșterea bacteriană. Acestea măsoară producția de carbapenemaze în funcție de creșterea microorganismului de cercetat în prezența unui carbapenem.

Prima etapă include screening-ul pornind de la antibiograma difuzimetrică sau de la concentrația minimă inhibitorie (CMI) realizată în mediu lichid. Ghidul EUCAST indică meropenemul drept „cel mai bun compromis” între sensibilitate și specificitate, un diametru sub 28 de mm indicând faptul că tulpina respectivă produce o carbapenemază.

Testul Hodge modificat a fost printre primele teste fenotipice utilizate pentru detecția carbapenemazelor la enterobacterii. Principiul testului constă în abilitatea tulpinii producătoare de carbapenemaze de a reduce concentrația locală de carbapenem din mediu, permițând astfel creșterea tulpinii indicator, sensibilă la carbapeneme, în jurul inoculului tulpinii de investigat, producând, de asemenea, un aspect asemănător unei frunze de trifoi.<sup>(9)</sup> Din 2018 THM nu mai este recomandat dar el a reprezentat o piatră de temelie pentru detecția fenotipică a carbapenemazelor.

Testul CIM a apărut ca o alternativă la testele disponibile pe piață. Principiul testului constă în incubarea microorganismului de investigat în apă pură sterilă cu un disc de carbapenem și incubarea sa pentru 2 ore la 35°C. La finalul celor 2 ore, discul de meropenem este recuperat și depus pe o placă însămânțată în prealabil cu o tulpină martor foarte sensibilă de *E. coli* - ATCC 25922. Placa este incubată pentru minim 6 ore iar apoi se face citirea. Dacă tulpina de investigat produce o carbapenemază, aceasta va inactiva discul de carbapenem iar tulpina martor de *E. coli* va putea crește până la marginea acestuia. Dacă din contră, tulpina de



investigat este rezistentă la carbapeneme prin alte mecanisme, discul de meropenem își va menține capacitatea de hidroliză, inhibând creșterea tulpinii martor. (10) Pentru a îmbunătăți performanțele testului CIM, protocolul de lucru a fost îmbunătățit de către echipa CLSI. Astfel, aceștia au redus cantitatea de bacterie (1  $\mu$ l vs. 10  $\mu$ l), au înlocuit mediul de incubare (TSB vs. apă) și au extins perioada de incubare (4 h vs. 2 h), fiind raportate performanțe bune ale testului. În urma succesului testelor CIM și mCIM, au început să apară o serie de metode similare, cu scopuri diferite (simplificarea protocolului, detecția MBL, îmbunătățirea performanțelor pentru detecția carbapenemazelor în tulpini de BGN-NF etc.). Printre acestea se numără sCIM, CIMTris, eCIM, SMA-mCIM sau LCIM. De asemenea, au fost descrise o serie de teste fenotipice bazate pe proprietățile inhibitorii ale acidul boronic pentru carbapenemazele de tip KPC, ale acidul dipicolinic sau ale EDTA-ului pentru metalo-beta-lactamaze și ale cloxacilinei pentru cefalosporinaze.

### **2.3. Teste enzimaticе bazate pe hidroliză**

Testele enzimaticе bazate pe hidroliză au capacitatea de a detecta produșii rezultați în urma degradării carbapenemului.

Testul CarbaNP este un test biochimic ce poate detecta rapid activitatea de carbapenemază a tulpinilor de investigat. Principiul metodei are la bază evidențierea colorimetrică a acidifierii mediului în cazul hidrolizei imipenemului către un derivat carboxilic de către o carbapenemază. Testul prezintă caracteristici foarte bune și poate fi utilizat și direct din produs patologic (hemoculturi). (11–13) Pe lângă varianta *in house* au apărut și diferite variante comerciale cum ar fi testele Rapidec CarbaNP, Rapid CARB Screen sau testul  $\beta$  Carba.

Ratele de hidroliză ale imipenemului ale acestor enzime sunt prea slabe pentru detecția lor de către CarbaNP, motiv pentru care autorii au optimizat testul, dezvoltându-se astfel testul CarbAcinetoNP. (14,15)

Testul Blue Carba este o altă adaptare a principiului testului CarbaNP. Principalele modificări sunt absența necesarului de B-PER II (fapt ce conduce la scăderea prețului per test) și folosirea unui alt indicator de culoare (albastru de bromtimol în locul roșului de fenol).

Tehnologia MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS)) a fost utilizată încă din anii '70 în domeniul proteomicii. În ceea ce privește investigarea mecanismului de rezistență la carbapeneme, spectrometria de masă poate înregistra o modificare de spectru a carbapenemelor sub efectul carbapenemazelor.

## 2.4. Teste imunocromatografice simple și multiplex

Testele imunocromatografice permit evidențierea unei carbapenemaze (teste simple) sau a mai multor carbapenemaze (teste multiplex) direct din cultură în maxim 15 minute. Principiul acestor teste este detecția carbapenemazelor prin utilizarea unor anticorpi specifici împotriva acestora.

## 2.5. Teste genotipice

Pornind de la PCR-ul clasic până la metodele noi de secvențiere ale genomului, testele moleculare au lărgit cunoștințele legate de structura și funcțiile bacteriene, inclusiv în domeniul rezistenței la antibiotice. În cazul bacteriilor MDR, testele genotipice au fost utilizate drept teste confirmatorii, fiind considerate standardul de aur al detecției unor gene de rezistență. Cu toate acestea, necesită un echipament costisitor frecvent rezervat laboratoarelor specializate și nu permit decât detecția genelor cunoscute.

Single end-point PCR este o tehnică de Polymerase Chain Reaction (PCR) care urmărește o singură țintă moleculară și este baza de la care au pornit metodele moleculare utilizate pentru diagnosticul și studiile epidemiologice ale genelor de rezistență la antibiotice. Multiplex end-point PCR este o tehnică care are la bază același principiu ca single end-point PCR dar utilizează mai mulți primeri simultan, permițând astfel amplificarea unor ținte diferite în cadrul aceleiași reacții. Între metodele vechi de secvențiere se numără metoda Maxam-Gilbert și Sanger. Între metodele noi de secvențiere se numără pirosevențierea, sistemul SOLiD® care încep să fie abandonate în favoarea platformelor Illumina, IonTorrent®, sistemele PacBio® și Nanopore®.

## 3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Metodologia de bază implică incubarea tulpinii de interes cu o cantitate fixă de carbapenem timp de jumătate de oră sau o oră într-un tub Eppendorf, centrifugarea tubului urmată de colectarea supernatantului și adăugarea acestuia peste un inocul adus la o anumită turbiditate dintr-o tulpină martor extrem de sensibilă de *Escherichia coli* (ATCC 25922). Testul cuantifică producția de carbapenemaze în funcție de dezvoltarea tulpinii martor peste care a fost adăugat mediu care conține sau nu carbapenem încă activ. Dacă tulpina martor se poate dezvolta fără probleme, mediul în care a avut loc incubația inițială nu mai are urme de antibiotic deoarece a fost hidrolizat de către tulpina de interes. În schimb, creșterea neinhibată a tulpinii

martor este un indiciu că rezistența la carbapeneme a apărut prin alte mecanisme decât producția de carbapenemaze.

Obiectivele studiului au fost dezvoltarea acestui nou test fenotipic de confirmare a producției de carbapenemaze a membrilor genului *Enterobacterales* și evaluarea caracteristicilor sale operaționale dar și optimizarea acestuia pentru bacilii Gram-negativi nefermentativi (*Pseudomonas aeruginosa* și *Acinetobacter baumannii*) și pentru bacilii Gram-negativi ce produc o cefalosporinază cromozomială inductibilă tip AmpC. Dezvoltarea unui test rapid dar și ieftin poate ajuta la detecția rapidă a microorganismelor producătoare de carbapenemaze, ajutând astfel la implementarea unor metode de limitare a răspândirii acestora dar și la adaptarea terapiei.

Un alt obiectiv al prezentei teze este efectuarea unui studiu epidemiologic prospectiv, generator de cunoștințe asupra ecologiei producției de carbapenemaze la microorganisme de interes medical, prin evaluarea a cel puțin 200 de tulpini rezistente la carbapeneme din România. În mod specific, studiul include evaluarea prospectivă a profilului de susceptibilitate la antibiotice a izolatelor rezistente la carbapeneme obținute de la doi parteneri clinici în perioada 2016 - 2019 și validarea în condiții de practică clinică reală a testului de confirmare fenotipică (rCIM) pe un lot de microorganisme rezistente la carbapeneme circulante în România. De asemenea, un alt obiectiv a fost crearea unei baze proprii de tulpini producătoare de carbapenemaze bine-caracterizate, fapt ce permite dezvoltări viitoare în domeniul detecției carbapenemazelor și a rezistenței la antibiotice dar și oportunități de dezvoltare a învățământului românesc în acest domeniu critic.

## **4. Dezvoltarea și evaluarea testului rCIM**

### **4.1. Introducere**

Ipoteza de lucru a pornit de la studiile de microcalorimetrie realizate de dr. Muntean et al. în cadrul cercetării sale de doctorat, am lansat ipoteza că producția de carbapenemaze poate fi detectată în mod similar, utilizând măsurarea nefelometrică de această dată pentru urmărirea creșterii unei tulpini bacteriene indicator în mediu lichid, în urma interacțiunii tulpinii bacteriene de interes cu carbapenem.

## 4.2. Material și metodă

Pentru validarea ipotezei de lucru am folosit 10 tulpini bine caracterizate ce prezentau rezistență la carbapeneme prin diferite mecanisme. Pentru stabilirea protocolului de lucru, am incubat cantități diferite de bacterie (o ansă versus două anse de 10  $\mu$ L din tulpina de interes) cu un număr diferit de discuri de meropenem (unul versus două) dar și un inocul diferit al tulpinii indicator (0,5 versus 1 McFarland).

Protocolul cu cea mai rapidă distincție între tulpinile producătoare versus tulpinile neproducătoare de carbapenemaze dar și cu cea mai bună performanță este redat în continuare. Astfel, două anse de 10  $\mu$ L din tulpina de interes sunt incubate cu două discuri de meropenem într-un mL de apă pură sterilă timp de jumătate de oră. La finalul timpului de incubare, tubul se centrifughează iar supernatantul este recuperat și adăugat peste 2,5 mL de inocul de 1 McFarland din tulpina indicator în mediu TSB. Tubul nefelometric ce conține tulpina indicator și supernatantul se reincubează timp de două ore. O creștere de peste 0.5 McFarland este considerată sugestivă pentru producția de carbapenemaze.

Pentru validarea restului, am realizat un studiu retrospectiv în care am testat 113 tulpini de enterobacterii bine caracterizate din colecția Centrului Național de Referință pentru Rezistența la Antibiotice (CNR) din Paris, Franța. Acestea au inclus 85 de tulpini producătoare de carbapenemaze și 28 ne-producătoare de carbapenemaze. Între tulpinile de enterobacterii producătoare de carbapenemaze, am inclus 19 tulpini producătoare de enzime de clasă A (10 KPC, 3 IMI, 2 GES, 1 FRI-1, 2 SME și 1 NmcA), 27 de clasă B (12 NDM, 8 VIM, 6 IMP și 1 GIM) și 39 de clasă D (17 OXA-48 și 22 de variante OXA-48-like, inclusiv enzime cu capacitate slabă de hidroliză cum sunt OXA-181 și OXA-244). Toate tulpinile au fost repicate din criotuburi stocate la  $-80$  °C pe mediul UriSelect™ 4 (BioRad, Marne-la-Coquette, Franța) la 37 °C pentru 24 de ore. După validarea din cadrul studiului retrospectiv, am realizat și un studiu prospectiv ce a inclus toate tulpinile primite pentru expertiză de către CNR pe o perioadă de două săptămâni. Pentru a putea avea un reper real de comparație în practica clinică a caracteristicilor testului rCIM, am efectuat în paralel testele CIM și CarbaNP.

Pentru a confirma acuratețea testului, au fost realizate testări triplicate pentru câte 10 tulpini producătoare de carbapenemaze din fiecare clasă Ambler și 10 tulpini neproducătoare de carbapenemaze.

Rezultatele rCIM, CIM și CarbaNP au fost comparate cu cele obținute folosind o metodă in-house de secvențiere tip PCR, folosită drept standard de aur. Genele carbapenemazelor țintă au fost *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>KPC-like</sub>, *bla*<sub>NDM-like</sub>, *bla*<sub>IMP-like</sub>, *bla*<sub>IMI-like</sub>, *bla*<sub>VIM-like</sub> și *bla*<sub>GES-like</sub>. ADN-ul bacterian a

fost extras din colonii folosind kitul Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Ozyme, Saint-Quentin, Franța), urmărind instrucțiunile producătorului.

Caracteristicile operaționale ale testului (sensibilitate, specificitate, valoare predictivă pozitivă și negativă) au fost calculate alături de intervalele de confidență de 95% cu ajutorul programului statistic R, varianta R v. 3.4.1 și epiR v. 0.9–87. Sensibilitățile și specificitățile au fost comparate folosind testul McNemar's  $\chi^2$  test din pachetul de bază R.

### 4.3. Rezultate

În cadrul studiului pilot, s-a observat faptul că la o oră jumate distincția dintre tulpinile producătoare și neproducătoare de carbapenemaze este deja sesizabilă, la două ore aceasta fiind evidentă.

În cazul studiului retrospectiv, în cazul a 82/85 de tulpini producătoare de carbapenemaze, s-au înregistrat valori peste pragul de 0.5 McFarland la 1.5 ore. Singurele tulpini care nu au condus la o creștere de peste 1 McFarland au fost 3 tulpini de *E. coli* OXA-244 și o tulpină producătoare de IMI-2. O tulpină de *E. cloacae* hiperproducătoare de cefalosporinază a testat pozitiv inițial iar apoi negativ de două ori. Astfel, sensibilitatea testului rCIM a fost de 99% (95% CI 94%–100%) iar specificitatea de 100% (95% CI 88%–100%), utilizând *cut-off*-ul de 0.5 unități McFarland la 2 ore.

Cele 101 de tulpini incluse în studiul prospectiv au cuprins carbapenemaze (45 OXA-48-like, 10 NDM-like, 5 VIM-like, 2 KPC-like și 2 enzime IMI-like), 15 cefalosporinaze hiperproduse, 12 ESBL-uri, 4 cefalosporinaze hiperproduse + ESBL iar alte 6 au avut alte mecanisme non-enzimatice de rezistență la carbapeneme. După secvențierea întregului genom bacterian (*whole genome sequencing*, WGS), cele două tulpini de *E. asburiae* producătoare de enzime IMI-like au fost identificate drept aceeași tulpină, conținând o nouă variantă enzimatică a carbapenemazei IMI, motiv pentru care a fost numărată o singură dată în cadrul studiului. Această enzimă a fost înregistrată în GenBank sub numele de IMI-17.

Folosind același *cut-off* din studiul retrospectiv, sensibilitatea testului rCIM a fost de 98% (95% CI 89%–99%) iar specificitatea de 95%. Două tulpini de *E. cloacae* hiperproducătoare de cefalosporinază au prezentat rezultate fals-pozitive în timp ce tulpina de *E. asburiae* producătoare a noii variante a enzimei IMI, a dat un rezultat fals negativ. Rezultatele globale sunt prezentate în Figura 4.1.

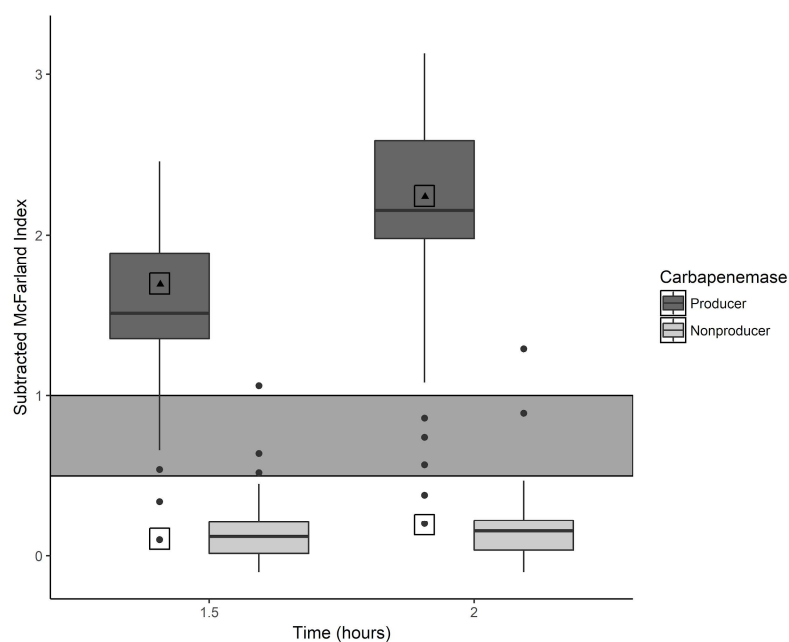


Figura 4.1. Experiența globală cu testul rCIM. Grafic tip *box and whiskers* ce arată experiența globală cu testul rCIM (n=213). Rezultate prezentate pentru incubarea tulpinii indicator pentru 1.5 și 2 ore. Tulpinile producătoare și ne-producătoare de carbapenemaze sunt prezentate în paralel pentru fiecare măsurătoare în timp. Zona gri marcată între 0.5 și 1 McFarland reprezintă o zonă de incertitudine ce necesită teste suplimentare. Punctele reprezintă valori aflate în afara mediei. Pătratele subliniază noua variantă producătoare de IMI când este testată direct de pe un mediu cromogen. Triunghiurile hașurate reprezintă rezultatele obținute de noua variantă IMI ce exprimă un rezultat rCIM pozitiv când este testat de pe mediul CarbaSmart.

Dacă după 2 ore de incubare, rezultatele corectate în funcție de indicele McFarland de bază se situează între 0.5 și 1, se recomandă testarea suplimentară a tulpinilor prin metode de imunocromatografie sau moleculare. Comparativ cu alte teste similare (CIM, mCIM etc.), principalul avantaj al testului este timpul scurt până la obținerea rezultatelor (sub 3 ore). Acest lucru îl transformă într-un bun candidat pentru testarea de rutină în cadrul laboratoarelor de microbiologie medicală, rezultatul putând fi comunicat în aceeași zi clinicianului.

#### 4.5. Concluzii

Testul rCIM este o metodă cantitativă, cu un preț comparabil (<1\$ per test) cu alte metode similare (CIM, mCIM) și un timp de detecție comparabil cu cel al testului CarbaNP utilizat la ora actuală ca test de referință, făcându-l accesibil chiar și în laboratoare cu posibilități reduse.

## 5. Optimizarea testului rCIM pentru detecția carbapenemazelor în tulpini hiperproducătoare natural de cefalosporinaze

### 5.1. Introducere

O serie de bacili Gram-negativi aparținând complexului *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Morganella morganii* sau *Providencia* spp. produc în mod natural o beta-lactamază inductibilă codificată cromozomial de tip AmpC. În cazul hiperexpresiei sale, spectrul de hidroliză se lărgiște iar fenotipic aceasta se poate confunda cu producția de carbapenemaze. Enzimele de tip AmpC nu sunt inhibate de inhibitorii clasici de beta-lactamaze (cum este, de exemplu, acidul clavulanic) ci de alți compuși cum sunt cloxacilina sau acidul 3-aminofenilboronic. (7)

### 5.2. Material și metodă

Optimizarea testului a constat în adăugarea de cloxacilină alături de meropenem în cadrul perioadei inițiale de incubare. După incubare și centrifugare, supernatantul obținut a fost adăugat peste o tulpină sensibilă de *E. coli* (ATCC 25922) adusă la un indice McFarland de 1. Creșterea bacteriană a fost evaluată în dinamică, nefelometric, la 1.5 și 2 ore. Pentru validarea rezultatelor au fost folosite un control pozitiv (*K. pneumoniae* ATCC BAA-1705) și negativ (*K. pneumoniae* ATCC BAA-1706).

Caracteristicile operaționale ale testului (sensibilitate, specificitate, valoare predictivă pozitivă și negativă) au fost calculate alături de intervalele de confidență 95%, folosind programul R v 4.0.2. și epiR v 2.0-19.

Rezultatele ce prezentau discrepanțe între caracterizarea deja existentă și rezultatele testului rCIM-A au fost caracterizate suplimentar prin WGS folosind un ADN library pregătit cu ajutorul kitului Nextera XT (Illumina, Paris, Franța) și ulterior rulat pe sistemul automat NextSeq500 (Illumina).

Optimizarea s-a realizat pe patru seturi diferite de tulpini: 48 de tulpini bine caracterizate, producătoare de AmpC și reprezentative pentru fiecare dintre cele 13 clustere ale complexului *Enterobacter cloacae* provenite dintr-o colecție a spitalului din Caen (dintre care 15 hiperproducătoare de AmpC și una producătoare de OXA-204), oferită de către domnul profesor F. Guérin, 82 de tulpini de *Enterobacter* spp. provenite de la CNR (dintre care 32 de tulpini producătoare de carbapenemaze), 52 de enterobacterii de grup 3, dintre care

27 producătoare de carbapenemaze provenite de la CNR și alte 67 de tulpini de enterobacterii care nu aparțineau grupului 3, dintre care 48 producătoare de carbapenemaze.

### 5.3. Rezultate

Pentru tulpinile din Caen, protocolul standard de rCIM a avut o specificitate de 91.49% (95% CI: 79.62%–97.63%). Testul rCIM a prezentat patru rezultate fals pozitive: două tulpini cu rezultat CarbaNP nedeterminat și două alte tulpini din clusterelor IV și V. Adăugarea de cloxacilină (400 μL/mL) crește specificitatea testului rCIM-A la 100% (95% CI: 92.45%–100%). Ambele protocoale rCIM au putut identifica prezența enzimei OXA-204.

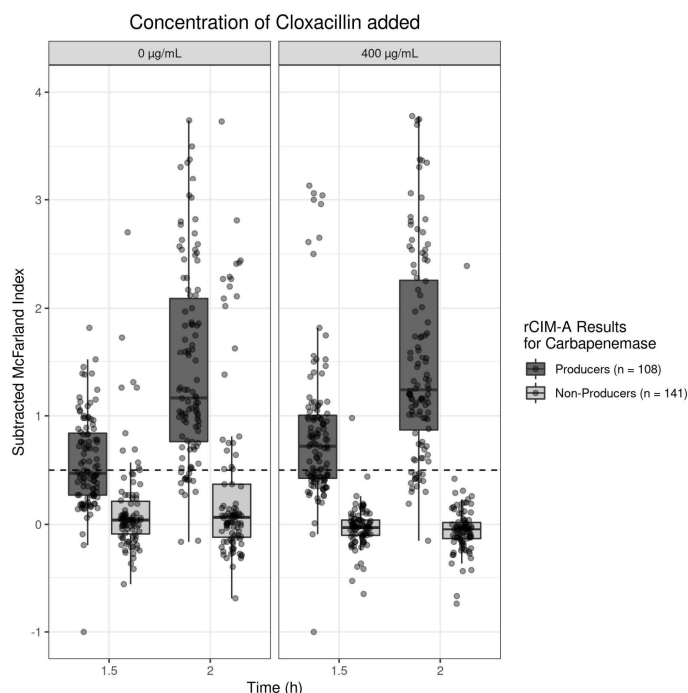
Pentru tulpinile de *Enterobacter* spp. de la CNR, testul rCIM a prezentat o sensibilitate și o specificitate de 84.38% (95% CI: 67.21%–94.72%) și, respectiv, 62% (95% CI: 47.17%–75.35%). Adăugarea de cloxacilină a condus la o ușoară scădere a sensibilității (81.25% cu 95% CI: 63.56%–92.79%) dar o îmbunătățire evidentă a specificității (98% cu 95% CI: 89.35%–99.95%). Nici testul rCIM și nici testul rCIM-A nu au reușit să identifice o serie de tulpini producătoare de IMI (IMI-6, IMI-13 și 2 tulpini de IMI-17). Studiul a inclus și 10 tulpini de *E. kobei* ST125 producătoare a enzimei codificate cromozomial, ACT-28. Testul rCIM-A a identificat corect lipsa activității de carbapenemază pentru toate tulpinile evaluate.

Pentru enterobacteriile de grup 3 de la CNR, testul rCIM a prezentat o sensibilitate și o specificitate de 92.59% (95% CI: 75.71%–99.09%) și, respectiv, 84% (95% CI: 63.92%–95.46%) în timp ce testul rCIM-A a prezentat o ușoară scădere a sensibilității 88.89% (95% CI: 70.84%–97.65%) dar o specificitate de 100% (95% CI: 86.28%–100%). O tulpină de *M. morganii* producătoare de NDM-1 a avut un rezultat pozitiv al testului rCIM dar s-a negativat în urma adăugării de cloxacilină (400 μg/mL). În mod similar, o altă tulpină de *M. morganii* producătoare de NDM a prezentat rezultate negative ale testelor rCIM și un rezultat nedeterminat al testului CarbaNP. În ambele cazuri, realizarea testului rCIM-A cu colonii recoltate de pe medii ce conțin carbapeneme (CarbaSmart), de pe mediul UriSelect™4 sau direct de pe antibiogramă (din jurul discului de meropenem) a prezentat rezultate pozitive, probabil datorită inducției. De asemenea, o tulpină de *Citrobacter freundii* producătoare de LMB-1 a testat negativă în ambele teste rCIM dar s-a pozitivat dacă a fost recoltată din creșterea de lângă discul de imipenem.

În ceea ce privește testarea altor enterobacterii din afara grupului 3, sensibilitatea și specificitatea pentru testele rCIM și rCIM-A au fost de 83.33% (95% CI: 69.78%–92.52%) și 100% (95% CI: 82.35%–100%). Testul rCIM-A a putut identifica corect enzimele OXA-162,



OXA-181, OXA-204 și OXA-232. Niciunul dintre testele rCIM nu au putut identifica în mod corect tulpinile de *Proteus mirabilis* producătoare de OXA-23 (n=10).



**Figura 5.1.** Grafic ce prezintă rezultatele generale pentru rCIM (0 µg/mL Cloxacilină) și protocolul modificat (400 µg/mL Cloxacilină). Rezultatele sunt prezentate ca măsurători nefelometrice, corectând pentru indicele McFarland bazal. Rezultatele sunt prezentate unul lângă altul, indicând măsurătorile la 1.5 și 2 ore. O linie orizontală întreruptă marchează *cut-off*-ul de 0.5 McFarland.

#### 5.4. Discuții

Principala limită a testului rCIM-A este necesarul de cloxacilină. Cu toate acestea, în locul cloxacilinei pure poate fi folosită pudra de cloxacilină utilizată pentru tratamentele injectabile.

#### 5.5. Concluzii

Deoarece cloxacilina permite inhibarea eficientă a enzimelor de tip AmpC, specificitatea testului rCIM crește la utilizarea acesteia. Astfel, testul rCIM-A este o metodă rapidă, ieftină și simplă ce poate fi ușor implementată în laboratoare cu resurse limitate pentru detecția carbapenemazelor în toate tulpinile de enterobacterii, inclusiv cele producătoare de AmpC.

## 6. Optimizarea testului rCIM pentru detecția carbapenemazelor la bacili Gram-negativi ne-fermentativi

### 6.1. Introducere

Atât *Pseudomonas aeruginosa* cât și *Acinetobacter baumannii* sunt germeni ce prezintă rezistență intrinsecă față de un număr mare de molecule datorată pe de o parte impermeabilității acestora (mutații de porine, sisteme de eflux) cât și producției unei cefalosporinaze cromozomiale de tip AmpC.(1) Cel mai frecvent mecanism de rezistență la carbapeneme întâlnit la *Pseudomonas aeruginosa* este deficiența porinei OprD în timp ce la *Acinetobacter baumannii* este producția de carbapenemaze(16–18).

Deoarece caracteristicile testului rCIM clasic în cazul BGN-NF erau nesatisfăcătoare, acesta a fost optimizat pentru a putea detecta mai fiabil producția de carbapenemaze și în cazul acestor patogeni. Astfel, testul rCIM pentru BGN-NF (rCIM-NF) permite detecția producției de carbapenemaze în mai puțin de 4 ore.

### 6.2. Material și metodă

În mod similar studiilor preliminare pentru enterobacterii, pentru a stabili protocolul care să ofere cele mai bune performanțe ale testului în cazul BGN-NF, au fost alese 20 de tulpini de *P. aeruginosa* și 20 de tulpini de *A. baumannii* rezistente la carbapeneme, cuprinzând atât tulpini producătoare de carbapenemaze cât și tulpini rezistente prin alte mecanisme. Acestea au fost testate în mai multe condiții. Astfel, pornind de la structura de bază a testului rCIM au fost evaluate diferite perioade de incubare inițială (între 30 de minute și 2 ore), diferite carbapeneme (meropenem și imipenem) dar și concentrații diferite de carbapenem (un disc versus două discuri de antibiotic). Datorită producției intrinseci de AmpC a BGN-NF, în urma experienței pozitive cu testul rCIM-A, a fost evaluată și adăugarea de cloxacilină (suspensie de 400 - 4000 μg/mL). De asemenea, pentru a crește sensibilitatea detecției tulpinilor de clasă B, s-a încercat adăugarea de sulfat de zinc în primul pas de lucru.

Pentru evaluarea testului rCIM-NF au fost testate în total 169 de tulpini bacteriene (103 *Pseudomonas* spp., 65 *A. baumannii* și un *A. junii*). Dintre tulpinile de *Pseudomonas* spp. testate, 72 erau producătoare de carbapenemaze în timp ce dintre cele de *Acinetobacter* spp., 51 de tulpini au fost producătoare de carbapenemaze.

Detecția moleculară și analiza statistică s-a realizat în mod similar metodelor descrise în capitolele anterioare.

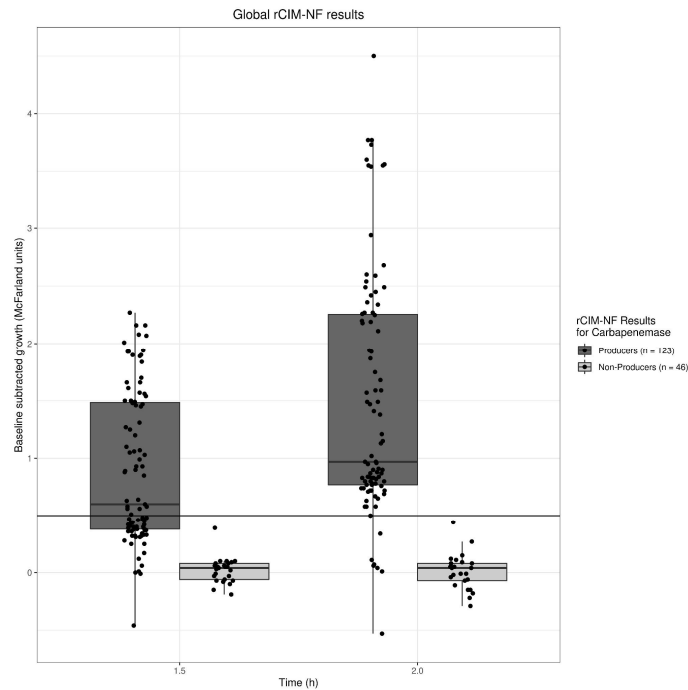
### 6.3. Rezultate

În urma evaluării inițiale a fost ales timpul optim de incubare (1 oră), a fost ales discul de carbapenem cu cele mai bune performanțe (imipenem) și au fost adăugate soluții de cloxacilină (4000 μg/mL) și ZnSO<sub>4</sub> (0.1 mM).

În cazul tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizând acest protocol, au fost obținute 4 rezultate fals negative și 2 rezultate fals pozitive, în ciuda utilizării de cloxacilină. Cele 4 rezultate fals negative au inclus 2 tulpini producătoare de GES-2, o tulpină producătoare de GIM-1 și o tulpină producătoare de IMP-13. Între tulpinile fals-pozitive, o tulpină era producătoare de OXA-21 în timp ce cealaltă a fost secvențiată. Fișierul FASTA a fost evaluat cu ajutorul softului ResMiner care poate identifica beta-lactamaze naturale, codificate cromozomial. Acesta a identificat producția de AmpC și de OXA-396, o variantă de OXA-50. În urma incubării de o oră a tulpinilor de *Pseudomonas* spp., testul rCIM a prezentat o sensibilitate de 90% (95% CI = [76-97%]) și o specificitate de 100% (95% CI = [69-100%]).

În ceea ce privește tulpinile de *Acinetobacter* spp., au fost 3 rezultate fals-negative. Între tulpinile fals-negative s-au numărat o tulpină producătoare de ISAbal-OXA-51 + SHV-50, un OXA-64 + AmpC + SHV, un OXA-77 + AmpC. Acestea au fost investigate ulterior prin PCR și secvențiere. Metodele moleculare au confirmat prezența enzimelor OXA-51, OXA-66 și OXA-77. De asemenea, în urma testării, au fost identificate trei tulpini potențial fals-pozitive: una producătoare de GES-12, una producătoare de SHV-5 și una co-producătoare de FAV-1 și PER-2. Tulpinile au fost trimise pentru secvențierea întregului genom. Fișierul FASTA a fost analizat cu ajutorul programului ResMiner care a identificat faptul că tulpina producătoare de GES-12 co-producea OXA-82, cea producătoare de SHV-5 co-producea OXA-113 și OXA-396 în timp ce ultima tulpină co-producea OXA-58. Pentru tulpinile de *Acinetobacter* spp., testul rCIM a prezentat o sensibilitate de 94% [84 - 99%] și o specificitate de 100% (95% CI = [78-100%]).

Rezultatele globale sunt prezentate în Figura 6.1.



**Figura 6.1. Dinamica generală a creșterii tulpinii indicator *E. coli* în testul rCIM-NF pentru tulpinile de *Pseudomonas spp.* și *Acinetobacter spp.*** Grafic de tip box and whiskers ce arată rezultatele creșterii tulpinii indicator *E. coli* ATCC 25922 pentru tulpinile de BGN-NF (n=103). Măsurătorile au fost realizate la o oră jumate și două ore după adăugarea supernatantului peste tulpina indicator. Tulpinile producătoare și ne-producătoare de carbapenemaze sunt prezentate în paralel pentru fiecare măsurătoare în timp. Rezultatele reprezintă creșterea tulpinii indicator corectată în funcție de indicele McFarland bazal și sunt exprimate în unități McFarland. Punctele reprezintă valori aflate în afara mediei. O linie orizontală a fost utilizată pentru a marca valoarea aleasă a cut-off-ului de 0.5 McFarland

#### 6.4 Discuții

În cadrul experimentelor inițiale pentru testul rCIM-NF, cele mai bune performanțe au fost obținute utilizând imipenem în locul meropenemului. Acest lucru a fost descris și în cadrul altor studii.(19,20)

#### 6.5 Concluzii

Testul rCIM-NF este un test cantitativ, ieftin și cu performanțe aparent mai bune comparativ cu alte teste fenotipice pentru detecția producției de carbapenemaze la BGN-NF.

## **7. Utilizarea testului rCIM într-un spital clinic din România - studiu pilot**

### **7.1. Introducere**

În România, studiile privind ecologia rezistenței la antibiotice sunt foarte limitate. Prima raportare a unor enterobacterii producătoare de carbapenemaze în România a avut loc în anul 2013, prin publicarea unui studiu ce a avut loc în perioada 2010-2012 în Târgu Mureș (21). În cazul microorganismelor non-fermentative, în anul 2011 sunt descrise primele tulpini de *Acinetobacter baumannii* producătoare de OXA-23 și OXA-58 (22) colectate în perioada 2009-2010 în Timișoara iar în anul 2015 apare primul studiu care atestă producția de VIM-2 în cazul unor tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* izolate din două spitale din București în perioada 2011-2012. (23)

Scopul acestui capitol a fost de a contribui cu mai multe date epidemiologice referitoare la microorganismele producătoare de carbapenemaze de la noi din țară și de a valida testul rCIM în condiții de practică clinică reală.

### **7.2. Materiale și metodă**

În perioada Iulie 2018 - Iulie 2019, s-a efectuat o evaluare a tuturor tulpinilor izolate de laboratorul de Microbiologie al Spitalului Clinic "Prof. Dr. Theodor Burghele". Tulpinile trimise pentru investigare în cadrul prezentului studiu au fost re-evaluate utilizând MALDI-ToF-MS.

Tulpinile purificate, au fost supuse unui screening folosind un set de 7 antibiotice pentru depistarea producătorilor de carbapenemază: Ticarcilină, Cefoxitin, Aztreonam, Cefotaxim, Ceftazidim, Ticarcilină-Clavulanat (folosit la distanță de 20 mm pentru identificarea tulpinilor producătoare de BLSE, eventual atunci când există sinergie cu alte mecanisme care pot conduce la rezistență). Antibiograma de screening a fost efectuată atât pe placa cu Mueller Hinton cât și cu MH cu adaos de Cloxacilină (250 mg/L), pentru inactivarea cefalosporinazelor de tip AmpC.

Antibiograma extinsă a cuprins un set de 32 de antibiotice, atât din clasa beta-lactaminelor, cât și o serie de antibiotice (din clasa chinolonelor, aminoglicozidelor, etc). Această antibiogramă extinsă s-a efectuat pentru lectura fenotipică și evaluarea antibioticelor ce pot fi folosite pentru tratarea infecțiilor cu tulpinile producătoare de carbapenemaze.

În urma screeningului inițial prin antibiogramă și mediu MH suplimentat cu cloxacilină, tulpinile suspecte pentru producția de carbapenemaze au fost investigate prin testul CarbaNP, testul rCIM și prin metode imunocromatografice. Tulpinile rezistente la carbapeneme, înalt sugestive pentru producția de carbapenemaze dar cu test imunocromatografic negativ, se află în curs de investigare prin WGS.

Tulpinile au fost stocate pe termen îndelungat într-un ultracongelator la -80 °C pentru studii ulterioare și pentru realizarea unei colecții personale/instituționale de tulpini bine caracterizate producătoare de carbapenemaze.

### 7.3. Rezultate

În perioada menționată au fost evaluate 288 de tulpini de bacili Gram negativi, cu rezistență la cefalosporine de generația a 3-a și/sau care prezentau criteriile de screening pentru producția de carbapenemaze, conform ghidului EUCAST.

Diferențele între metodele clasice de identificare bacteriană și cele de nouă generație au fost substanțiale. În mod particular, tulpinile de *Enterobacter cloacae* nu sunt detectate prin metode convenționale, fiind în mod repetat identificate greșit drept tulpini de *Klebsiella pneumoniae*.

Din cele 290 tulpini de Enterobacterales incluse pentru screening, 98 au fost investigate suplimentar prin antibiograma difuzimetrică extinsă. Toate cele 98 tulpini au fost evaluate suplimentar prin CarbaNP și rCIM. Din cele 98 tulpini investigate prin rCIM, 70 au avut un rezultat pozitiv și au fost investigate ulterior prin imunocromatografie. Rezultatele testelor imunocromatografice sunt prezentate în Figura 7.1.

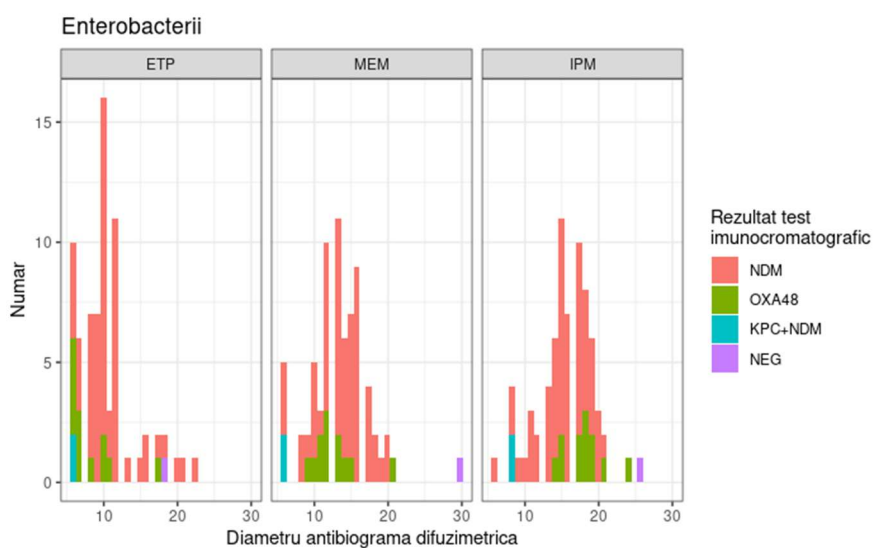


Figura 7.1. Rezultatul testelor imunocromatografice, în funcție de diametrul de inhibiție a carbapenemelor a tulpinilor evaluate suplimentar pentru enterobacterii.

Screening-ul tulpinilor de BGN-NF s-a realizat doar prin antibiograma difuzimetrică standardizată. Deoarece BGN-NF prezintă rezistență naturală față de ertapenem, s-a realizat doar evaluarea imipenemului și a meropenemului.

Din 70 tulpini de *Pseudomonas spp.* identificate, 54 au fost investigate suplimentar prin CarbaNP și rCIM. În cadrul evaluării prin rCIM, 15 tulpini au fost identificate drept producătoare de carbapenemaze și 39 drept ne-producătoare de carbapenemaze. Cele 15 de tulpini cu un rezultat pozitiv al testului rCIM, au fost investigate ulterior și prin imunocromatografie. Marea majoritate a tulpinilor investigate au prezentat rezultate negative, în ciuda unui rezultat pozitiv al testelor CarbaNP sau rCIM (n=9). Acestea sunt în curs de investigație prin WGS. Dintre tulpinile producătoare de carbapenemaze, 5 erau producătoare de enzime de tip VIM și o tulpină era producătoare de NDM. De asemenea, o parte din tulpinile investigate imunocromatografic nu au prezentat carbapenemaze în ciuda unui diametru mic al carbapenemelor.

#### **7.4 Discuții**

Tulpinile investigate în acest studiu au fost colectate, caracterizate și vor putea servi pentru dezvoltarea unor teste ulterioare sau în cadrul altor studii.

#### **7.5 Concluzii**

Testul rCIM poate fi utilizat cu succes în laboratoarele de microbiologie clinică din țară fiind un test ieftin, ușor de realizat, ce nu necesită personal specializat sau aparatură suplimentară. Performanțele sale sunt comparabile cu testul fenotipic utilizat la ora actuală ca metodă de referință, CarbaNP.

### **Concluzii și contribuții personale**

#### **1. Concluzii**

Obiectivele cercetării științifice au fost atinse întrucât:

- au fost elaborate, în etape, mai multe protocoale de lucru care permit:
  - detecția producției de carbapenemaze la enterobacterii

- detecția producției de carbapenemaze la enterobacterii natural producătoare de AmpC
- detecția producției de carbapenemaze la BGN-NF
- a fost realizat un studiu epidemiologic prospectiv în colaborare cu un partener clinic (Spitalul Clinic „Prof. Dr. Theodor Burghele”)

## 2. Contribuții proprii

Teza prezintă o serie de studii care au abordat problema producției de carbapenemaze la diferite microorganisme.

Studiile au condus la:

- două publicații în reviste cu factor de impact peste 5 (date prezentate în capitolele 4 și 5)
- diseminarea informației în cadrul participării la congrese naționale și internaționale
- realizarea unei colecții de tulpini rezistente la carbapeneme, bine-caracterizate din România
- formarea unui nucleu de cercetare a carbapenemazelor în Institutul Cantacuzino
- stabilirea unei legături și continuarea colaborării cu parteneri din Franța

## Bibliografie

1. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! Trends Mol Med. 2012 May;18(5):263–72.
2. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, et al. Beta-lactamase database (BLDB) - structure and function. J Enzyme Inhib Med Chem. 2017 Dec;32(1):917–9.
3. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. J Antimicrob Chemother. 2005 Jun;55(6):1050–1.
4. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Mar;54(3):969–76.
5. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005 Oct;18(4):657–86.
6. Meini S, Tascini C, Cei M, Sozio E, Rossolini GM. AmpC  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacterales: what a clinician should know. Infection. 2019 Jun;47(3):363–75.
7. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009 Jan;22(1):161–82.
8. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol Rev. 2003 Dec;67(4):593–656.



9. Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Feb;65(2):249–51.
10. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS ONE.* 2015 Mar 23;10(3):e0123690.
11. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Dec;56(12):6437–40.
12. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infect Dis.* 2012 Sep;18(9):1503–7.
13. Dortet L, Bréchar d L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from blood cultures. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Apr;20(4):340–4.
14. Dortet L, Poirel L, Errera C, Nordmann P. CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2014 Jul;52(7):2359–64.
15. Simner PJ, Johnson JK, Brasso WB, Anderson K, Lonsway DR, Pierce VM, et al. Multicenter Evaluation of the Modified Carbapenem Inactivation Method and the Carba NP for Detection of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2018;56(1).
16. Rodríguez-Martínez J-M, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Nov;53(11):4783–8.
17. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Sep;12(9):826–36.
18. Bonnin RA, Nordmann P, Poirel L. Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*: a state of the art. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013 Jun;11(6):571–83.
19. Gutiérrez S, Correa A, Hernández-Gómez C, De La Cadena E, Pallares C, Villegas MV. Detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2019 Dec;37(10):648–51.
20. Jing X, Zhou H, Min X, Zhang X, Yang Q, Du S, et al. The Simplified Carbapenem Inactivation Method (sCIM) for Simple and Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. *Front Microbiol.* 2018 Oct 30;9:2391.
21. Székely E, Damjanova I, Jánvári L, Vas KE, Molnár S, Bilca DV, et al. First

- description of bla(NDM-1), bla(OXA-48), bla(OXA-181) producing Enterobacteriaceae strains in Romania. *Int J Med Microbiol.* 2013 Dec;303(8):697–700.
22. Bonnin RA, Poirel L, Licker M, Nordmann P. Genetic diversity of carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Romanian hospitals. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Oct;17(10):1524–8.
  23. Gheorghe I, Novais Â, Grosso F, Rodrigues C, Chifiriuc MC, Lazar V, et al. Snapshot on carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in Bucharest hospitals reveals unusual clones and novel genetic surroundings for blaOXA-23. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Apr;70(4):1016–20.