

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

***Emergența Enterobacteriaceaelor producătoare
de carbapenemaze și impactul asupra terapiei
antibiotice a infecțiilor determinate de acestea***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. STREINU-CERCEL ADRIAN

Student-doctorand:

TĂLĂPAN DANIELA

ANUL 2018

*“SANS LABORATOIRES
LES SAVANTS SONT
DES SOLDATS SANS ARMES”*

Louis Pasteur

Bulletin de la Société de Gynécologie et d'Obstétrique de Paris (1923)

CUPRINS

Lista cu lucrările științifice publicate	6
Lista cu abrevieri și simboluri	8
Introducere.....	11
I PARTEA GENERALA	15
Capitolul 1. Familia Enterobacteriaceae.....	15
Capitolul 2. Rezistența la carbapeneme	16
2.1. Rezistența la carbapeneme prin producerea de carbapenemaze	17
2.1.1. Beta-lactamaze clasa A	18
2.1.2. Beta-lactamaze clasa B.....	18
2.1.3. Beta-lactamaze clasa D	20
2.2. Rezistența la carbapeneme prin alte mecanisme.....	20
Capitolul 3. Epidemiologie	22
3.1. Distribuție	22
3.1.1. Carbapenemaze din clasa A/ KPC.....	22
3.1.2. Carbapenemaze din clasa B/ NDM/VIM/IMP.....	23
3.1.3. Carbapenemaze din clasa D/ OXA-48.....	24
3.2. Factori de risc	26
3.2.1. Factori de risc comunitari	26
3.2.1.1. Mediul înconjurător	26
3.2.1.2. Caracteristicile genei sau bacteriei	27
3.2.1.3. Contact direct.....	28
3.2.1.4. Călătoriile.....	28
3.2.2. Factori de risc în instituții de îngrijire a persoanelor bolnave.....	28
3.2.2.1. Antibioterapie.....	28
3.2.2.2. Manevrela invazive.....	29
3.2.2.3. Asocierea de boli cronice și comorbidități	29
3.2.2.4. Turismul medical.....	29
3.3. Origine și transmitere	30
Capitolul 4. Metode curente de detectare a carbapenemazelor.....	33
4.1. Screening.....	33
4.1.1. Testarea sensibilității la antibiotice	33
4.1.2. Utilizarea de medii de cultură cromogene.....	35
4.2. Teste fenotipice	36
4.2.1. Testul Hodge modificat (MHT).....	36
4.2.2. Metode difuzimetrice de detectare a MBL.....	37
4.2.3. Metode difuzimetrice de detectare a KPC.....	37
4.2.4. Metode difuzimetrice de detectare a OXA-48.....	38
4.2.5. Metode directe pentru determinarea producerii de carbapenemază.....	38
4.2.5.1. Teste enzimatic	38
4.2.5.2. Teste imunocromatografice	39
4.2.5.3. Spectrometria de masă.....	40
4.3. Teste genotipice	40
Capitolul 5. Contribuția carbapenemazelor la producerea de Enterobacteriaceae multirezistente la antibiotice.....	42
Capitolul 6. Tratament.....	44
II. CONTRIBUTIA PERSONALA	48

Capitolul 7. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	48
7.1. Scopul cercetării	48
7.2. Obiective principale.....	48
7.3. Obiective secundare.....	48
Capitolul 8. Materiale și metode	49
8.1. Design-ul studiului	49
8.2. Lotul studiat	49
8.2.1. Tulpinile bacteriene	49
8.2.1.1. Determinarea concentrației minime inhibitorii prin metoda Etest	51
8.2.1.2. Determinarea mecanismului de rezistență prin producerea de ESBL	51
8.2.1.3. Determinarea mecanismului de rezistență prin producerea de AmpC dobândită	53
8.2.1.4. Determinarea fenotipică a producerii de carbapenemază utilizând testul Hodge modificat (MHT).....	54
8.2.1.5. Determinarea fenotipică a producerii de carbapenemază utilizând combinația de discuri	55
8.2.1.6. Determinarea fenotipică a producerii de carbapenemază tip OXA-48 utilizând testul imunocromatografic	58
8.2.1.7. Determinarea fenotipică a producerii de carbapenemază utilizând testul enzimatic	59
8.2.1.8. Determinarea genotipică a producerii de carbapenemază.....	61
8.2.1.9. Cercetarea rezistenței la colistin prin detectarea genei mcr-1.....	62
8.2.2. Informații despre pacienți.....	63
8.3. Controlul calității	63
8.4. Stocarea informațiilor	63
8.5. Analiza statistică.....	64
8.6. Finanțarea proiectului	64
Capitolul 9. Rezultate	65
9.1. Lotul studiat	65
9.1.1. Tulpinile bacteriene	65
9.1.2. Informații despre pacienți.....	68
9.2. Testarea sensibilității la antibiotice	70
9.2.1. Rezultatele antibiogramelor prin determinarea concentrației minime inhibitorii în sistem automat MicoScan sau plăci Sensititre.....	70
9.2.2. Determinarea concentrației minime inhibitorii la ertapenem prin metoda Etest.....	76
9.3. Depistarea mecanismelor de rezistență: ESBL și AmpC.....	77
9.4. Determinarea producerii de carbapenemază la Enterobacteriaceae	78
9.4.1. Testul Hodge modificat.....	78
9.4.2. Combinația de discuri – KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit®	79
9.4.3. Testul imunocromatografic OXA-48 K-SeT®	79
9.4.4. Testul enzimatic Rapidec® Carba NP	80
9.4.5. Confirmarea genotipică.....	81
9.5. Determinarea sensibilității, specificității, a valorii predictive pozitive, negative și a acurateții fiecărui test fenotipic.....	82
9.5.1. Testul Hodge modificat (MHT).....	82
9.5.2. Combinația de discuri – KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit®	83
9.5.3. Testul imunocromatografic OXA-48 K-SeT®	83
9.5.4. Testul enzimatic Rapidec® Carba NP	84
9.6. Enterobacteriaceae producătoare de carbapenemază	85
9.6.1. Tulpinile bacteriene	85
9.6.2. Pacienții.....	91
9.6.3. Sensibilitatea la antibiotice	96
9.6.3.1. Rezultatele antibiogramelor prin determinarea concentrației minime inhibitorii în sistem automat MicoScan sau plăci Sensititre	96
9.6.3.2. Determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) prin metoda Etest la enterobacteriile producătoare de carbapenemază	103

9.6.4. Sensibilitatea testelor fenotipice în determinarea carbapenemazelor la Enterobacteriaceae	106
Capitolul 10. Discuții	107
10.1. Lotul studiat	107
10.2. Testarea sensibilității la antibiotice	109
10.3. Determinarea producerii de carbapenemază la Enterobacteriaceae	110
Capitolul 11. Concluzii și contribuții personale	119
Bibliografie.....	122
Anexe	145

Introducere

Rezistența la antibiotice, inclusiv la cele beta-lactam apare de obicei în 2-3 ani de la introducerea acelui antibiotic în utilizarea clinică. (Hall BG, 2004) Primul carbapenem lansat pe piață a fost imipenem (1985, Merck), urmat de meropenem (1996, AstraZeneca) și ertapenem (2005 Merck) (Oelschlaeger P, 2010), iar doripenemul în 2005 (Shionogi Co. și Johnson & Johnson), fiind aprobat de FDA (Food and Drug Administration, Statele Unite ale Americii, SUA) în 2007. (Song JH, 2008)

Deși cea mai mare cantitate de antibiotic se utilizează în comunitate, concentrația cea mai ridicată a utilizării per pacient este în spitale, acesta fiind motivul pentru care patogenii intraspitalicești tind să fie mai rezistenți. (French GL, 2010)

Întrucât infecțiile produse de patogenii rezistenți la antibiotice sunt asociate cu morbiditate și mortalitate mai mare decât cele produse de patogenii sensibili, impactul global al creșterii rezistenței reprezintă o îngrijorare la nivel mondial. (Isturiz R, 2008)

Carbapenemele sunt antimicrobiene importante în tratarea infecțiilor nosocomiale adesea amenințătoare de viață, cum sunt la pacienții care au suferit operații de transplant, cei spitalizați în unități de terapie intensivă și chirurgie, iar emergența rezistenței la carbapeneme pune în pericol chiar dezvoltarea tehnicilor moderne în medicină. (Nordmann P, 2012a) “Edificiul medicinei moderne depinde de abilitatea de a trata infecțiile. Dacă această abilitate este pierdută datorită rezistenței la antibiotice a microorganismelor, acest edificiu – de la transplant la tratamente anticanceroase, imunosupresive, la medicina de terapie intensivă – devine instabil și va ceda”. (Livermore D. , 2012)

Emergența carbapenemazelor la Enterobacteriaceae este, spune Livermore în 2012, îngrijorătoare din două motive: sunt patogeni mai frecvenți ca non-fermentativi și tipurile de enzime sunt foarte diverse, fapt care complică recunoașterea lor, tratamentul și răspunsul la acesta.

În studiul TEST (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial) derulat în perioada ianuarie 2004 – august 2006 în bazinul Asia/Pacific, America de Nord și de Sud și Europa au fost testate la antibiotice tulpinile izolate din infecții asociate îngrijirilor medicale. Cel mai activ antimicrobian, cu peste 99% sensibilitate în fiecare regiune a fost imipenemul; deasemenea, acesta împreună cu tigeciclina au fost cei mai activi pe tulpinile de *Klebsiella pneumoniae* producătoare de ESBL. Rezistența la carbapeneme a *Klebsiella pneumoniae* a rămas scăzută până la izbucnirile epidemice din câteva spitale din New York în 2003, când au fost implicate tulpini multirezistente producătoare de KPC, pentru care au fost eficiente

tigeciclina și polimixina B/rifampicina. În studiul TEST nu a fost detectată cu rezistență la carbapeneme nici o tulpină de *Escherichia coli*. (Reinert RR, 2007)

Emergența rezistenței la carbapeneme la Enterobacteriaceae este îngrijorătoare pentru că poate fi asociată cu rezistența la multe antibiotice beta-lactam și non-beta-lactam, aceasta determinând limitarea regimurilor terapeutice eficiente. (Isturiz R, 2008)

Deși tulpinile de Enterobacteriaceae producătoare de carbapenemaze în anii 2009 erau încă în număr redus, este foarte probabil ca acestea să fi fost mult subestimate, întrucât nu existau scheme active de supraveghere a acestora. (Wilcox MH, 2009)

Adaptabilitatea genetică conferă bacteriilor un avantaj imens față de omenire. În 2010 Walsh preciza că încă avem lipsuri în înțelegerea în detaliu a modului în care, și de ce bacteriile împărtășesc informația genetică și prin urmare, achiziționează și exprimă genele care codifică producerea de carbapenemaze. Carbapenemazele achiziționate cu ajutorul elementelor genetice mobile sunt frecvent asociate cu rezistența la nivelul tulpinilor patogene, iar cele care sunt exprimate în mod natural de o specie bacteriană sunt irelevante din punct de vedere clinic, cu excepția unor circumstanțe excepționale. (Walsh TR, 2010)

În anul 2009 Gould spunea că sunt pierdute zilele în care toți doctorii “puteau prescrie ce doreau, când doreau”, deoarece microorganismele se adaptează și vor domina cele rezistente, menținând pe loc dezvoltările din medicina modernă. (Gould IM, 2009) Încă din 1945, Alexander Fleming atrăgea atenția asupra faptului că “va veni timpul când penicilina va putea fi achiziționată de oricine din magazin și atunci va apare pericolul ca oamenii ignoranți să-și subdozeze tratamentul și să-și expună microorganismele la doze neletale de antibiotic, făcându-le rezistente”. (Fleming A, 1964) După 65 de ani, în 2010, Ian Gould menționează că antibioticele beta-lactam cu spectru extins și chinolonele, după pierderea patentului, vor fi consumate în număr mai mare, consum stimulat de creșterea numărului de fabrici care produc mai ieftin. Această creștere a consumului va fi în zonele cu îngrijiri de sănătate și igienă foarte slabe, determinând creșterea urgenței și transmiterii a noi determinanți de rezistență. (Gould I.M, 2010) Apariția *Klebsiella pneumoniae* producătoare de KPC în SUA (New York, 2003) și a *Klebsiella pneumoniae* producătoare de NDM în Suedia (la un pacient transferat din New Delhi, India, 2008) ar putea fi două exemple care să ilustreze previziunile lui Fleming și Gould. Aceste două carbapenemaze sunt notabile printre carbapenemazele de la Enterobacteriaceae întrucât conferă rezistență de nivel înalt la carbapeneme și genele care codifică producerea enzimelor sunt cel mai frecvent situate pe plasmide și s-au răspândit între diferitele specii de Enterobacteriaceae peste tot în lume. (Wang J-T, 2015)

Emergența în ultima decadă a rezistenței la carbapeneme la bacilii Gram negativi incluzând Enterobacteriaceae, *Pseudomonas spp.* și *Acinetobacter spp.*, a devenit o criză majoră de sănătate publică la nivel mondial datorită răspândirii rapide a acestora și lipsei dezvoltării unor noi antibiotice. (Diene & Rolain, 2014) Cea mai recentă și îngrijorătoare este creșterea rapidă a OXA-48, în special la *Klebsiella pneumoniae*. Aceasta nu este o carbapenemază potentă și spre deosebire de alte carbapenemaze la Enterobacteriaceae, se bazează pe alte mecanisme sinergistice pentru a media rezistența la carbapeneme. (Walsh TR, 2010) În acest moment este foarte probabil ca mecanisme de rezistență cum ar fi producerea de carbapenemaze să fie nedetectate. Pentru o supraveghere corespunzătoare este necesar să se pună la punct teste standardizate de detecție. (Gould IM, 2008)

Această lucrare cuprinde 11 capitole. **Capitolul 1** cuprinde noțiuni generale despre familia Enterobacteriaceae. **Capitolul 2** descrie modalitatea de apariție a rezistenței la carbapeneme (prin producerea de carbapenemaze și prin alte mecanisme), **capitolul 3** descrie epidemiologia celor mai importante (din punct de vedere medical) clase de carbapenemaze abordând distribuția, factorii de risc, originea și transmiterea acestora. **Capitolul 4** prezintă metodele curente de detectare a carbapenemazelor descrise în literatura de specialitate (screening, teste fenotipice, teste genotipice). **Capitolul 5** descrie contribuția carbapenemazelor la producerea de Enterobacteriaceae multirezistente la antibiotice (a fost caracterizat **rezistomul** NDM-1 la *Escherichia coli* – Poirel L, 2011b; termenul de **mobilom** a fost utilizat în 2016 la Enterobacteriaceaele producătoare de carbapenemaze pentru a descrie conținutul integral al elementului genetic mobil – He S, 2016). **Capitolul 6** descrie opțiunile terapeutice în cazul infecțiilor cu enterobacterii rezistente la carbapeneme. **Capitolul 7** enunță ipoteza de lucru și obiectivele lucrării. **Capitolul 8** prezintă materialele și metodele utilizate în vederea atingerii obiectivelor acestei lucrări. **Capitolul 9** cuprinde rezultatele cercetării, **capitolul 10** prezintă discuțiile iar **capitolul 11** concluziile și contribuțiile personale.

Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Scopul cercetării

Lucrarea își propune să evalueze prezența și caracteristicile Enterobacteriaceaelor producătoare de carbapenemaze și impactul lor asupra terapiei antibiotice a infecțiilor determinate de acestea în arealul deservit de Institutul Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș”, instituție spitalicească cu 740 paturi, care dispune de secții medicale (adulți și copii) și secții de terapie intensivă (adulți și copii). Deasemenea, în urma consulturilor interdisciplinare se decide uneori evaluarea microbiologică de prelevate clinice recoltate de la pacienți internați în alte spitale din București, astfel încât putem evalua prezența/tipul carbapenemazelor la Enterobacteriaceae și în alte spitale din București (fără a le putea preciza).

Obiective principale

Două sunt obiectivele principale ale lucrării:

1. Evaluarea incidenței carbapenemazelor aferente enterobacteriilor în determinarea rezistenței la carbapeneme
2. Sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor producătoare de carbapenemaze și opțiuni terapeutice

Obiective secundare

Obiectivele secundare sunt următoarele:

1. Care sunt tipurile de carbapenemaze în arealul nostru? Datele publicate din România sunt puține iar unele publicații externe sugerează că țările balcanice (printre care este inclusă și România) ar reprezenta a doua sursă de carbapenemază NDM, după India (Cantón R, 2012)
2. Identificarea celei mai eficiente metode fenotipice de detectare a carbapenemazelor la Enterobacteriaceae
3. Mecanismul rezistenței la colistin – prin gena *mcr-1*?

Materiale și metode

Studiul pentru cercetarea Enterobacteriaceaelor producătoare de carbapenemaze este unul prospectiv, observațional, longitudinal, realizat în Institutul Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș” și Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau” din București în perioada 01.01.2014 – 31.12.2015. Toate testele de determinare fenotipică a

producerii de carbapenemază au fost realizate în laboratorul de Microbiologie al Institutului Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș”, iar confirmarea genotipică s-a realizat atât în laboratorul de Genetică al Institutului cât și în Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau”.

În studiu au fost incluse toate tulpinile de Enterobacteriaceae din perioada de derulare a studiului (câte una per pacient) cu sensibilitate diminuată la unul sau mai multe carbapeneme conform ghidului EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2013) izolate din 01.01.2014 și până în 31.12.2015 (total 212 tulpini).

Retrospectiv, s-au testat pentru prezența genei *mcr-1* toate tulpinile de Enterobacteriaceae care aveau CMI la colistin >2 µg/ml (96 tulpini) împreună cu colegii de la Laboratorul de Bacteriologie al Spitalului de Boli Infecțioase și Tropicale “Dr. Victor Babeș”, București.

Izolarea și identificarea tulpinilor s-au realizat în conformitate cu procedurile operaționale de lucru ale Laboratorului de Microbiologie al Institutului Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș”, utilizându-se medii de cultură bioMérieux (Franța) și Oxoid (Marea Britanie). Identificarea bacteriilor s-a realizat în sistem automat MicroScan WalkAway 96 Plus (Beckman Coulter Diagnostics, Brea – California, SUA) și MALDI Biotyper (Bruker Corporation, Germania), iar testarea sensibilității la antibiotice s-a efectuat prin determinarea concentrației minime inhibitorii în sistem automat MicroScan și Sensititre AIM Automated Inoculation Delivery System (ThermoFisher Scientific, SUA).

Ulterior, la toate tulpinile incluse în studiu s-a determinat CMI la ertapenem prin metoda Etest (bioMérieux, Marcy L’Étoile, Franța). Depistarea producerii de AmpC s-a realizat utilizând testul gradientului AmpC (banda de Etest pentru depistarea AmpC - bioMérieux, Franța - care conține la un capăt cefotetan și la celălalt capăt cefotetan + cloxacilină). Confirmarea producerii de ESBL s-a realizat prin metoda testului singergiei dublu disc. (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2013)

Patru teste fenotipice au fost utilizate pentru a determina producerea de carbapenemază la Enterobacteriaceae. Testul Hodge modificat (Lee K, 2001) recomandat de gidul american Clinical and Laboratory Standards Institute (2014) a fost unul dintre ele, două teste recomandate de European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2013: combinația de discuri (în acest studiu s-a utilizat trusa KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit® – Rosco Diagnostica, Taastrup, Danemarca) și testul enzimatic Carba NP (s-a utilizat trusa Rapidec® Carba NP, bioMerieux, Franța). A mai fost utilizat un test

imunocromatografic apărut pe piață abia în 2015: OXA-48 K-Set[®], Coris BioConcept – Gembloux, Belgia, menționat în ghidul European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2017).

Pentru determinarea genelor care codifică producerea de carbapenemaze s-au utilizat metodele PCR simplu cuplat cu electroforeza în gel (PFGE) – realizat la Institutul de Virusologie Ștefan S. Nicolau (detectare gene *bla*_{OXA-48} și *bla*_{NDM}) și PCR multiplex – realizat în Laboratorul de Genetică din cadrul Institutului Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș” după metodologia expusă de Poirel și colaboratorii (Poirel L, 2011e) pentru detectare gene *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM} și *bla*_{KPC}.

După ce testele fenotipice și genotipice de determinare a producerii de carbapenemază s-au efectuat, la toate tulpinile producătoare de carbapenemază s-a determinat CMI la meropenem și imipenem prin aceeași metodă (Etest).

Pentru toate tulpinile din studiu care au avut CMI la colistin >2 µg/ml prin determinarea în sistem automat MicroScan sau Sensititre (diluții în bulion), s-a determinat CMI prin metoda Etest și genotipic, s-a căutat gena *mcr-1* care codifică rezistența la colistin. ADN-ul bacterian a fost extras utilizând MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre, Illumina, SUA), iar prezența genei *mcr-1* a fost investigată folosind Primer *mcr-1* (Primerdesign Ltd, Marea Britanie) și LightScanner32 (Idaho Technology Inc, SUA).

Rezultate

Lotul studiat

În perioada 1 ianuarie 2014 – 31 decembrie 2015 în Institutul Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș” a fost izolat un număr de 4741 Enterobacteriaceae (4575 de la bolnavi și 166 de la purtători). Numărul de tulpini incluse în studiu (sensibilitatea diminuată la unul sau mai multe carbapeneme) a fost 212, după cum urmează: 179 izolate din prelevate clinice de la bolnavii internați și 33 de la purtători. Cea mai frecventă bacterie a fost *Klebsiella pneumoniae* (176/212), urmată la distanță de *Enterobacter cloacae* (12/212), *Escherichia coli* (11/212), *Serratia marcescens* (7/212), *Citrobacter freundii* și *Providencia stuartii* (câte 2 tulpini), *Enterobacter aerogenes* și *Morganella morganii* (câte 1 tulpină).

Tulpinile bacteriene incluse în acest studiu (suspectate a fi producătoare de carbapenemază) au fost izolate în număr semnificativ statistic mai mare din spută și aspirat

bronșic ($p<0,001$), lichid de sonicare ($p=0,015$), cateter venos central ($p=0,040$) și tampon rectal ($p<0,001$) comparativ cu alte prelevate clinice. Microorganismele au provenit în proporție de 62,74% (133/212) de la persoanele internate în secțiile medicale de adulți ale Institutului, urmate de cele izolate de la persoane internate în alte spitale (19,81%, 42/212) și apoi de cele de la terapie intensivă adulți (14,62%, 31/212). Din secția medicală copii au fost incluse 2,36% (5/212) dintre tulpini și 0,47% (1/212) din secția terapie copii.

Tulpinile de Enterobacteriaceae suspectate a fi producătoare de carbapenemază izolate de la pacienții din secția terapie intensivă adulți versus total Enterobacteriaceae izolate în această secție au fost într-un procent (8,35%, 31/371) mai mare decât de la cei internați în alte secții: medicală adulți (5%, 133/2660), alte spitale (3,52%, 42/1192), terapie copii (1,54%, 1/65) și medicală copii (1,10%, 5/453).

Mediana vârstei persoanelor de la care s-au recoltat prelevatele clinice a fost 64 ani (2 zile, 94 ani). Cele mai multe tulpini (73,58%, 156/212) au fost izolate de la persoane cu vârsta de peste 50 de ani.

Testarea sensibilității la antibiotice

Enterobacteriile suspectate a fi producătoare de carbapenemază au o rezistență semnificativ statistic mult mai mare la toate antibioticele testate comparativ cu restul Enterobacteriaceaelor (exemple: amoxicilină + acid clavulanic 100% versus 37,41%, cefepim 96,23% versus 28,13%, ciprofloxacina 95,28% versus 34,31%, amikacină 42,45% versus 11,03%, meropenem 46,7% versus 4,67%, colistin 39,62% versus 9,36%, fosfomicină 44,81% versus 12,7%, tigeciclină 33,02% versus 8,6%).

La tulpinile incluse în studiu nu există diferențe semnificative între tulpinile izolate de la pacienți și cele de la purtători, în ceea ce privește susceptibilitatea la antibiotice. Nu există diferențe semnificative între cei doi ani la tulpinile rezistente și intermediare la antimicrobiene, cu excepția carbapenemelor și colistinului. Tulpinile intermediare la meropenem și imipenem au crescut de la 5,68%, respectiv 13,64% în 2014 la 16,94%, respectiv 34,68% în 2015 (scor $Z=-2,4613$, $p=0,013$, respectiv $Z=-3,4439$, $p<0,001$). Deasemenea, tulpinile rezistente la meropenem au crescut de la 21,59% la 43,55% (scor $Z=-3,3154$, $p<0,001$). Rezistența la colistin a crescut între 2014-2015 de la 29,55% la 45,97% (scor $Z=-2,4139$, $p=0,015$).

La toate tulpinile incluse în studiu ($n=212$) s-a determinat CMI la ertapenem prin metoda Etest. Un număr de 6 de tulpini (2,83%) sunt sensibile, din punct de vedere clinic

la ertapenem, după valoarea CMI determinată prin *Etest* (între 0,125 și 0,5 µg/ml), deși sistemul MicroScan le-a interpretat ca având sensibilitatea diminuată (intermediare).

Depistarea mecanismelor de rezistență: ESBL și AmpC

Majoritatea tulpinilor incluse în studiu sunt producătoare de ESBL (93,87%) și doar 4,72% dintre acestea sunt producătoare de AmpC.

Determinarea producerii de carbapenemază la Enterobacteriaceae

Tulpinile de Enterobacteriaceae incluse în studiu sunt în procent de 63,20% (134/212) producătoare de carbapenemază (genotipic). Dintre acestea, cel mai frecvent tip de carbapenemază este OXA-48 (71,64%), urmat de NDM (10,45%) și KPC (4,48%) dintre carbapenemazele unice. Într-un număr destul de mic de tulpini (18 din 134) au fost depistate gene care codifică producerea a două (OXA-48 + KPC, OXA-48 + NDM și KPC + NDM) sau chiar trei carbapenemaze (OXA-48 + KPC + NDM).

Din totalul Enterobacteriaceaelor izolate în perioada 2014-2015 în Institutul Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș” de la bolnavi (n=4575), 2,51% au fost producătoare de carbapenemază, iar de la purtători (n=166) 11,45%, diferența fiind semnificativă statistic (scor Z= -6,8215, p<0,001). De la bolnavi, procentual, cele mai multe Enterobacteriaceae producătoare de carbapenemază au fost izolate de la nivelul cateterului venos central (2/12, 16,67%), urmate de cele din spută/ aspirat bronșic (17/114, 14,91%), lichid de ascită (2/18, 11,11%), secreție plagă (23/363, 3,58%), urină (123/2792, 2,61%) și sânge (9/284, 2,11%).

Riscul ca o tulpină de Enterobacteriaceae dintre cele cu sensibilitatea diminuată la unul sau mai multe carbapeneme să fie producătoare de carbapenemază este semnificativ statistic mai mare la tulpinile izolate din spută/ aspirat bronșic (scor Z=3,28, p<0,001) comparativ cu cele izolate din alte prelevate clinice. Deasemenea, din totalul enterobacteriilor izolate în perioada 2014-2015 din diverse prelevate clinice, tulpinile producătoare de carbapenemază au fost izolate îndeosebi de la nivelul cateterului venos central (scor Z=2,8637, p=0,004), din spută/ aspirat bronșic (scor Z=7,7896, p<0,001), lichid pleural (scor Z=2,0236, p=0,043), lichid de ascită (scor Z=9,0959, p=0,035) și tampon rectal (scor Z=6,145, p<0,001).

Procentual, dintre enterobacteriile izolate de la bolnavi, cele mai multe tulpini producătoare de carbapenemază au fost *Klebsiella pneumoniae* și *Providencia stuartii* (11,64%, respectiv 11,76%), urmate de *Serratia marcescens* (6,02%), *Enterobacter aerogenes* (4,34%), *Enterobacter cloacae* (3,70%) și *Escherichia coli* (0,22%).

Din totalul Enterobacteriaceaelor izolate în perioada 2014-2015, *Klebsiella pneumoniae* (scor $Z=21,2927$, $p<0,001$) și *Providencia stuartii* (scor $Z=2,1983$, $p=0,027$) au avut cea mai mare probabilitate de a produce carbapenemază. La polul opus se situează *Escherichia coli* (scor $Z=-10,3759$, $p<0,001$), cu cel mai scăzut risc de a produce carbapenemază.

Klebsiella pneumoniae este unica bacterie care a codificat producerea carbapenemazei KPC (6/113; 5,31%), iar *Enterobacter cloacae* este singurul microorganism producător de 3 carbapenemaze simultan (OXA-48 + NDM + KPC) și de combinația KPC+NDM dintre tulpinile producătoare de două carbapenemaze.

Dintre cele 212 tulpini incluse în studiu, tulpinile confirmate a fi producătoare de carbapenemază comparativ cu cele neconfirmate au fost izolate în număr semnificativ statistic de la pacienți aparținând grupei de vârstă sub 30 ani (20/134 versus 2/78, scor $Z=2,8461$, $p=0,004$).

Tulpinile cu sensibilitate diminuată la carbapeneme incluse în studiu ($n=6$), izolate din secțiile de copii (medicale și terapie intensivă), au fost în totalitate producătoare de carbapenemază OXA-48. Dintre tulpinile izolate de la adulți (alte spitale și terapie intensivă adulți), 2/3 au fost producătoare de carbapenemază.

Factorii de risc asociați cu achiziția de gene care codifică producerea de carbapenemaze la enterobacteriile suspectate, depistați în acest studiu, sunt vârsta sub 30 ani (scor $Z=2,8461$, $p=0,004$) și manevrele invazive (scor $Z=2,3134$, $p=0,020$).

Dacă raportăm enterobacteriile producătoare de carbapenemaze per secția din care au fost izolate la numărul enterobacteriilor izolate în fiecare secție dar care nu au fost suspectate a produce carbapenemază, observăm că pacienții internați în secția terapie intensivă adulți sunt la risc de a face infecții cu astfel de microorganisme: scor $Z=3,4852$, $p<0,001$ (tabelul 9.32.). Cel mai scăzut risc se observă la pacienții internați în secția medicală copii (scor $Z=-2,3731$, $p=0,017$).

Toate tulpinile incluse în studiu (producătoare, $n=134$ și neproducătoare de carbapenemază, $n=78$) au un procent mare de producere de ESBL. Cele 6 tulpini carbapenemază pozitive dar ESBL negative (8,97%) sunt *Providencia stuartii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* și *Serratia marcescens*. Din punct de vedere al producerii de carbapenemază, 5 tulpini din cele 6 sunt NDM pozitive. Tulpinile

neproducătoare de carbapenemază sunt în procent de 95,52% producătoare de ESBL, acest fapt explicând parțial diminuarea sensibilității la carbapeneme.

Sensibilitatea la fluorochinolone a enterobacteriilor producătoare de carbapenemază (n=134) a fost scăzută și fără diferențe semnificative comparativ cu tulpinile neproducătoare de carbapenemază (n=78): 5,22% versus 3,85%. Dintre aminoglicozide, la amikacină tulpinile producătoare de carbapenemază au avut sensibilitatea cea mai ridicată (48,51%), dar mai mică decât a celor neproducătoare (73,08%).

Nicio tulpină producătoare de carbapenemază nu a fost sensibilă la ertapenem prin testarea de rutină (MicroScan) și doar 7,69% dintre cele neproducătoare au fost intermediare. La meropenem și imipenem, diferența în sensibilitate a celor două categorii de enterobacterii este importantă, fiind mai mică la tulpinile producătoare de carbapenemază (meropenem: 29,85% versus 93,59%, imipenem: 36,57% versus 97,44%). Un procent de 5,22% dintre tulpinile producătoare de carbapenemază a fost sensibil la aztreonam.

La alte antimicrobiene testate și utilizate în clinică, sensibilitatea enterobacteriilor producătoare de carbapenemază variază. Cea mai mare sensibilitate este la tigeciclină (68,66%), urmată de fosfomicină (55,22%), colistin (47,01%) și trimetoprim/sulfametoxazol (31,34%). O diferență semnificativă se observă la colistin, tulpinile producătoare de carbapenemază având o sensibilitate mult diminuată în comparație cu cele neproducătoare: 47,01% versus 83,33% (scor Z=5,4091, p<0,001).

Dintre tulpinile incluse în studiu (n=212), rezistența la colistin (39,62%) s-a înregistrat doar la tulpini de *Klebsiella pneumoniae* și nu s-a datorat achiziției de genă *mcr-1*, aceasta nedetectându-se la niciuna dintre tulpinile studiate. Cele mai multe tulpini de *Klebsiella pneumoniae* rezistente la colistin au fost OXA-48 (n=55) și 20 dintre acestea au avut CMI=4 μg/ml, urmate de câte 9 tulpini cu CMI=6 μg/ml și CMI=8 μg/ml.

Tulpinile producătoare de carbapenemază tip OXA-48 sunt mai puțin rezistente la antibiotice decât cele producătoare de alte tipuri de carbapenemază la: amikacină (45,83% versus 71,43%), trimetoprim/sulfametoxazol (60,42% versus 83,33%) și tigeciclină (27,08% versus 41,67%) și sunt cele mai rezistente la colistin (61,46% versus 33,33%). Tulpinile producătoare de carbapenemază KPC și cele care produc două sau trei carbapenemaze simultan sunt mai rezistente decât cele producătoare de OXA-48 și NDM la meropenem 83,33% (versus 67,71% și 64,29%), imipenem 87,50% (versus 60,42% și

57,14%), fosfomicină 50% (versus 44,79% și 35,71%) și tigeciclină 41,67% (versus 27,08% și 35,71%).

Diferențe semnificative statistic se observă la unele antibiotice între tulpinile producătoare de carbapenemază OXA-48 și NDM: trimetoprim/ sulfametoxazol (scor $Z=-2,9097$, $p=0,003$) și colistin (scor $Z=2,3238$, $p=0,020$) – tulpinile OXA-48 fiind mai puțin rezistente la trimetoprim/ sulfametoxazol și mai rezistente la colistin comparativ cu cele producătoare de carbapenemază tip NDM; între cele producătoare de OXA-48 și altele (fără NDM) la imipenem (scor $Z=-2,5022$, $p=0,012$), trimetoprim/ sulfametoxazol (scor $Z=-2,1053$, $p=0,034$) și colistin (scor $Z=2,4817$, $p=0,013$), cele OXA-48 având o rezistență mai scăzută la trimetoprim/ sulfametoxazol și imipenem și mai mare la colistin; diferențe semnificative în ceea ce privește rezistența la antibiotice între tulpinile producătoare de carbapenemază NDM și cele producătoare de alte carbapenemaze (exclusiv OXA-48) se observă la imipenem (scor $Z=-2,1233$, $p=0,034$) și fosfomicină (scor $Z=-2,2016$, $p=0,027$), cele producătoare de NDM având o rezistență mai mică.

La toate tulpinile producătoare de carbapenemază s-a determinat CMI pentru carbapeneme (meropenem și imipenem, pe lângă ertapenem) prin metoda *Etest*. Rezultatele au arătat că dintre tulpinile pozitive pentru producerea de carbapenemază, nici una nu a avut *Etest* la ertapenem sub valoarea prag de detecție a enzimei inactivatoare de carbapeneme. Dacă am fi utilizat meropenemul ca marker (aceeași valoare prag ca și pentru ertapenem $>0,125 \mu\text{g/ml}$), am fi pierdut două tulpini producătoare de OXA-48, două de NDM și o tulpină producătoare concomitent de două carbapenemaze: OXA-48 și NDM. CMI la ertapenem a tulpinilor producătoare de OXA-48, KPC și multiple carbapenemaze s-a concentrat la valoarea de peste $32 \mu\text{g/ml}$ (69/96, 5/6 și respectiv 12/18).

Din punct de vedere al interpretării după breakpoint-ul clinic, nicio tulpină producătoare de carbapenemaze nu a fost sensibilă la ertapenem, dar la meropenem au fost 39 (29 tip OXA-48, 5 NDM, 1 KPC și 4 producătoare de două și trei carbapenemaze) iar la imipenem 50 (39 tip OXA-48, 6 NDM, 1 KPC și 4 producătoare de două și trei carbapenemaze).

Dintre testele fenotipice utilizate, cea mai bună sensibilitate pentru determinarea oricărui tip de carbapenemază este la testul Rapidec[®] Carba NP (97,92% pentru OXA-48 și 100% pentru toate celelalte din studiu), urmat de combinația de discuri Rosco KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit[®] (96,88% pentru OXA-48, mai slabă pentru combinația de carbapenemaze – 83,33% și 100% pentru NDM și KPC). Testul Hodge modificat (MHT)

are o sensibilitate de 93,75% pentru OXA-48, doar 85,71% pentru NDM și 100% pentru KPC și tulpinile producătoare de două sau mai multe carbapenemaze.

Discuții

Lotul studiat

În perioada 2014-2015, un număr de 212 tulpini bacteriene au întrunit criteriul de includere (sensibilitate diminuată la unul sau mai multe carbapeneme) în grupul Enterobacteriaceaelor suspectate pentru producerea de carbapenemază. Toate tulpinile incluse în studiu au avut sensibilitatea diminuată la ertapenem; nu a existat nici o tulpină cu sensibilitatea diminuată la meropenem sau imipenem și sensibilă la ertapenem. Explicația acestui fapt poate fi tropismul acestor enzime pentru ertapenem (dintre carbapeneme) (Bulik CC, 2011) și alți cercetători constatând că CMI la ertapenem este de obicei mai mare decât la meropenem sau imipenem (Nordmann P, 2012c).

În aceeași perioadă de doi ani, numărul total al enterobacteriilor izolate din prelevate clinice de la bolnavi a fost 4575, respectiv 166 de la purtători, astfel încât procentul Enterobacteriaceaelor suspectate pentru producerea de carbapenemază a fost 3,91% (212/4575) la bolnavi și 19,88% (33/166) la purtători, asemănător datelor din literatură pentru bolnavi: 5% (57/1135) într-un studiu din Taiwan (Wang J-T, 2015), 2,0% (280/14286) în studiul efectuat în perioada 2010-2013 în 18 state din UE, România având un procent de 5,00 (8/157), Polonia: 17,3 (70/405), Italia: 7,5 (130/1743), Grecia: 7,4 (45/605) (Sader HS, 2015). Nivelul mai scăzut de la noi derivă din ponderea mare a infecțiilor comunitare într-un spital de boli infecțioase (chiar dacă unele probe proveneau din alte spitale – probabil infecții nosocomiale – dar puține).

La purtători, în studiile din literatură raportarea s-a făcut la numărul de probe și nu la numărul de enterobacterii izolate, astfel încât nu poate fi comparat procentul destul de ridicat rezultat din prezentul studiu (19,88%). Dacă însă raportăm și noi cele 33 tulpini suspectate la numărul de probe pentru portaj prelucrate în perioada 2014-2015 (n=690), rezultatul este 4,78%, similar studiilor lui Cunha CB (4,6%) și Zhao Z-C (6,6%). (Cunha CM, 2016; Zhao Z-C, 2014).

Cele mai multe Enterobacteriaceae suspectate a fi producătoare de carbapenemază din prezentul studiu au aparținut speciei *Klebsiella pneumoniae* (176/212, 83,02%), urmată la distanță de *Enterobacter cloacae* (12/212, 5,66%) și *Escherichia coli* (11/212, 5,19%).

Datele din literatură prezintă tot *Klebsiella pneumoniae* ca fiind cea mai frecventă enterobacterie suspectată pentru producerea de carbapenemaze: 86,4% (Sader HS, 2015), 74% (Marchaim D, 2011), 57,39% (Sekyere JO, 2016). Aceasta este urmată de speciile de *Enterobacter*: 7,9% (Sader HS, 2015), 10,14% (201/1983) (Sekyere JO, 2016), 16,30% (Marchaim D, 2011) și *Escherichia coli*: 2,17% (2/74) (Marchaim D, 2011) sau *Serratia marcescens*: 5,45%, 108/1983 (Sekyere JO, 2016).

Raportate la totalul speciilor de același tip izolate în aceeași perioadă de timp de la bolnavi, tulpinile de *Klebsiella pneumoniae* au prezentat riscul cel mai mare de a produce carbapenemază (152/842, 18,05%), urmate de *Providencia stuartii* (2/17, 11,76%), *Enterobacter cloacae* (10/108, 9,26%), *Serratia marcescens* (7/83, 8,43%), *Citrobacter freundii* (1/18, 5,56%), *Enterobacter aerogenes* (1/23, 4,35%) și *Escherichia coli* (6/2307, 0,26%). Unele studii prezintă rezultate similare cu ale noastre: *Klebsiella pneumoniae* cu valori între 0,9% și 38,8% (procentul cel mai mare în Italia – 38,8%, urmat de Polonia – 32,5%) și pentru *Escherichia coli* 0,1%. (Jones RN, 2014) Altele, sunt diferite semnificativ, *Klebsiella pneumoniae* fiind suspiciată a produce carbapenemază în 57/128 tulpini (44,5%), speciile de *Enterobacter* 4/16 (25%) și *Escherichia coli* 187/278 (67,26%). (Yusuf I, 2014)

Prelevatul clinic din care s-au izolat cele mai multe tulpini de la bolnavi incluse în studiu a fost urina (123/212, 58,02%), urmată de secreția plagă (23/212, 10,85%) și sputa/ aspiratul bronșic (17/212, 8,02%). Raportat la numărul de enterobacterii izolate din fiecare prelevat clinic, tulpinile suspectate a fi producătoare de carbapenemaze au fost izolate în număr mai mare semnificativ statistic din spută/ aspirat bronșic (17/212 versus 97/4529, $p<0,001$), cateter venos central (2/212 versus 10/4529, $p=0,040$) și de la purtători, din tampon rectal (33/212 versus 166/4529, $p<0,001$). Aceasta sugerează că: (1) manevrele invazive reprezintă un factor de risc în achiziția de astfel de microorganisme – lucru demonstrat în acest studiu și prezentat în altele (Feldman N, 2013; Prasad N, 2016) și (2) portajul de Enterobacteriaceae care produc carbapenemaze reprezintă un alt factor de risc important de luat în considerare, în special dacă persoana internată este transferată dintr-o altă instituție de îngrijire (Chmelnitsky I, 2014; Fedorowsky R, 2015), deși există microorganisme în natură care codifică producerea acestor enzime și pot deasemenea coloniza persoanele în comunitate – de exemplu *Schewanella xiamenensis* care codifică producerea de OXA-48 (Antonelli A, 2015).

Testarea sensibilității la antibiotice

Rezultatul testării la antibiotice al tulpinilor incluse în studiu (n=212) a arătat o rezistență crescută, îngrijorătoare, la toate antibioticele testate, fiind 100% la beta-lactamine și aproape 100% la cefalosporine (94,78% la ceftazidim, 95,65 la cefepim), 95,28% la ciprofloxacin, cea mai mică rezistență fiind la tigeciclină (33,02%), colistin (39,62%), imipenem (41,8%), amikacin (42,45%), fosfomicină (44,81%) și meropenem (46,7%). Într-un studiu publicat în 2014 asupra unor Enterobacteriaceae izolate din 21 state europene printre care și România, cel mai activ antibiotic era, ca și la noi, tigeciclina (95,8-99%), urmat de colistin (96,7%), meropenem (91,3-91,5%) și amikacina (83,6-90,9%). (Jones RN, 2014)

Tulpinile izolate de la bolnavi au o sensibilitate mai mică la colistin în comparație-cu cele izolate de la purtători (44,35% vs 63,16%), situația fiind invers în ceea ce privește sensibilitatea la tigeciclină (73,04% vs 57,89%) și fosfomicină (57,39% vs 42,11%). Se cunoaște că rezistența la colistin apare *in vivo* prin inactivarea genei *mgrB* în cursul expunerii la colistin (Canatelli A, 2014), iar portajul nu se tratează, aceasta putând fi explicația pentru sensibilitatea diminuată la colistin la tulpinile izolate de la bolnavi în comparație cu cele de la purtători.

Un procent de 93,87% (199/212) dintre tulpinile incluse în studiu a fost producător de ESBL, asemănător cu rezultatul studiului SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends): 89,70% (627/699) (Sheng W-H, 2013) iar producerea de AmpC a fost 4,72 %, deasemenea scăzută și în alte studii: 5,2% (Luk S, 2013).

Determinarea producerii de carbapenemază la Enterobacteriaceae

Din totalul tulpinilor incluse în studiu, 63,2% (134/212) au fost producătoare de carbapenemază, similar unui studiu din Africa de Sud publicat în anul 2016: 812/1193 (68%) (Singh-Moodley A, 2016), dar un procent mai mare decât cel obținut în alte studii, spre exemplu la tulpinile non-susceptibile la ertapenem izolate în anul 2015 în 5 spitale din Coreea de Sud, procent comunicat de 20,1% (79/393). (Jeong SH, 2016)

Dacă raportăm tulpinile producătoare de carbapenemază la totalul Enterobacteriaceaelor izolate în perioada 2014-2015, constatăm că producerea de carbapenemază este 2,83% (134/4741), cu 2,51% la bolnavi (115/4575) și 11,45% la purtători (19/166). Din totalul probelor recoltate de la pacienții internați cu anumite probleme care au determinat testarea portajului intestinal, 2,75% (19/690) au fost pozitive pentru Enterobacteriaceae producătoare de carbapenemaze, asemănător rezultatului unui

studiu efectuat în Canada – 1,1% din 442 probe (Ahmed-Bentley J, 2013) și mai puțin decât rezultatele unui studiu efectuat în Italia – 10,2% din 1427 probe (Rossini A, 2016).

Cele mai frecvente carbapenemaze au fost OXA-48 (71,64%), urmate de NDM (10,45%) și KPC (4,48%), iar dintre tulpinile producătoare de două sau trei carbapenemaze, cea mai frecventă a fost combinația OXA-48 + NDM (6,72%), urmată de OXA-48 + KPC (3,73%), și în procent egal (1,49%) KPC + NDM și OXA-48 + KPC + NDM. Un studiu din Spania (34 spitale, februarie-mai 2013) publicat în 2016 are ca rezultat o stratificare similară celei de la noi, cu 74% OXA-48, 24% MBL și 2% KPC. (Palacios-Baena ZR, 2016) În literatura de specialitate, în țări din Uniunea Europeană ca Belgia, Olanda, Germania, Turcia, carbapenemaza tip OXA-48 este cea mai frecventă, urmată de VIM și KPC (Belgia), KPC și NDM-1 (Olanda), KPC și VIM (Germania). (Cantón R, 2012) În alte zone pe glob, procentul de carbapenemaze diferă: VIM (10,7%), OXA-48 (9,7%), IMP (6,1%), KPC (5,1%), NDM-1 (2,6%) – în Uganda (Okoché D, 2015), KPC-2 (44/65), IMP (24/65) – în China (Li H, 2014), IMP-8 (37/57), KPC-2 (17/57), VIM-1 (2/57) și NDM-1 (1/57) – în Taiwan (Wang J-T, 2015).

Producerea de două sau mai multe carbapenemaze este mai rar citată în literatură, OXA-48 + NDM care la noi se află pe primul loc între combinațiile de două carbapenemaze (6,72% din totalul carbapenemazelor) fiind întâlnită și în țările din Golf (Zowawi HM, 2014), Arabia Saudită (Shibl A, 2013), Tunisia (Nasr AB, 2013), Canada (Fattouh R, 2016). Trei carbapenemaze produse de aceeași tulpină este o situație mult mai rară; dintre enterobacteriile incluse în studiu au fost doar 2 tulpini de *Enterobacter cloacae* izolate, una din tampon rectal de la un pacient de 48 de ani admis în secția de terapie intensivă și una dintr-o probă de secreție plagă recoltată de la un pacient internat în alt spital (victimă a “cazului Colectiv”). În anul 2014 într-un articol din Kathmandu, Nepal, a fost prezentată o tulpină de *Escherichia coli* ESBL pozitivă care avea și genele care codifică producerea de carbapenemază IMP, VIM și NDM-1. (Pokhrel RH, 2014)

Dintre tulpinile incluse în studiu, cele izolate din spută/ aspirat bronșic ca și cele de la nivelul cateterului venos central, lichid pleural, lichid de ascită și secreția otică au fost integral producătoare de carbapenemaze. Totuși, riscul ca o tulpină de Enterobacteriaceae dintre cele cu sensibilitatea diminuată la unul sau mai multe carbapeneme să fie producătoare de carbapenemază este semnificativ statistic mai mare la tulpinile izolate din spută/ aspirat bronșic (scor $Z=3,28$, $p<0,001$) comparativ cu cele izolate din alte prelevate clinice.

Din totalul tulpinilor producătoare de carbapenemaze izolate de la bolnavi, cele mai

multe au fost izolate din urină (73/115, 63,48%), spută/ aspirat bronșic (17/115, 14,78%), plagă (13/115, 11,30%) și sânge (6/115, 4,48%). Într-un studiu multicentric publicat de o echipă din Spania, majoritatea enterobacteriilor producătoare de carbapenemaze au fost izolate din urină (43%), urmate de cele din secreții plagă (21%) și sânge (10%) (Palacios-Baena ZR, 2016), asemănător cu un alt studiu realizat în Singapore: urină (72,3%), secreții plagă (19,4%) și sânge (8,3%) (Choudhury S, 2015). Constatăm faptul că procentul de tulpini izolate din sânge la noi este la jumătate comparativ cu studiile menționate.

Speciile bacteriene confirmate a produce carbapenemază au fost, în ordine descrescătoare următoarele: *Klebsiella pneumoniae* (113/134, 84,33%), *Escherichia coli* (7/134, 5,22%), *Serratia marcescens* și *Enterobacter cloacae* (fiecare cu 5/134, 3,73%), *Providencia stuartii* (2/134, 1,49%) și *Enterobacter aerogenes* (1/134, 0,75%). Asemănător celor obținute, alte lucrări comunică tot specia *Klebsiella pneumoniae* în topul microorganismelor producătoare de carbapenemază: 61,54% (Li H, 2014), 52,2% (Okoché D, 2015).

Dintre tulpinile izolate la adulți, 2/3 au fost producătoare de carbapenemaze, iar cele de la copii în totalitate (6 tulpini). Vârsta sub 30 ani (scor $Z=2,8461$, $p=0,004$) și manevrele invazive (scor $Z=2,3134$, $p=0,020$) au fost factorii de risc asociați cu prezența de gene care codifică producerea de carbapenemaze la Enterobacteriaceaele incluse în studiu. Prin raportarea tulpinilor producătoare de carbapenemaze la totalul enterobacteriilor izolate per secție, persoanele internate în secția terapie adulți prezintă riscul cel mai mare de a face o infecție cu astfel de microorganisme (scor $Z=3,4852$, $p<0,001$), rezultat constatat și în alte studii (Chmelnitsky I, 2014) la polul opus fiind pacienții din secția medicală copii (scor $Z=-2,3731$, $p=0,017$).

Având în vedere faptul că 78/212 tulpini de Enterobacteriaceae incluse în studiu nu au fost producătoare de carbapenemază dar au fost producătoare aproape în totalitate de ESBL (95,52%), sugerează faptul că producerea de enzimă care hidrolizează beta-lactamii cuplată cu modificarea porinelor membranei externe stă la baza diminuării sensibilității la carbapeneme a acestora, conform studiilor din literatură. (Martinez-Martinez L, 2008; Pages JM, 2008; Ruppe E, 2015)

Tratamentul infecțiilor determinate de tulpini producătoare de carbapenemază pune adesea probleme datorită rezistenței multiple la antibiotice. Studiile arată că terapia combinată este mai bună decât monoterapia, iar dacă la cel puțin unul dintre antibioticele administrate tulpina bacteriană este sensibilă, șansele de eradicare a infecției cresc. Dintre

combinațiile medicamentoase utilizate, mortalitatea a fost între 0% și 67% la utilizarea unui carbapenem + colistin (25 pacienți, 4 studii). (Falagas ME, 2014) Carbapenemele pot fi utilizate în terapie și sunt chiar recomandate; într-un studiu pe tulpini de *Klebsiella pneumoniae* producătoare de OXA-48, s-a constatat efect sinergic între fosfomicină și imipenem (42%), meropenem (33%), și tigeciclină (33%) și efect antagonistic între tigeciclină și colistin. (Evren E, 2013)

Studiul lui Martirosov și Lodise arată că dacă valoarea CMI la meropenem este ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$, atunci se asociază cu colistin, tigeciclină, fosfomicină și/sau aminoglicozide. Concluzia este că sunt mai bune combinațiile decât monoterapia și combinațiile cu carbapeneme sunt mai bune decât cele fără acestea, dacă CMI la carbapenem este ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$. (Martirosov DM, 2016) Tigeciclina cu CMI ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ (în doză mare) asociată cu meropenem cu CMI ≤ 16 $\mu\text{g/ml}$ (în perfuzie continuă) a avut efect reducător asupra microorganismelor în testarea *in vitro*, dar în combinație cu meropenem cu CMI=64 $\mu\text{g/ml}$, efectul benefic nu s-a mai observat. (Wiskirchen DE, 2011) În studiul nostru avem un număr de 67 (50%) tulpini cu CMI ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ și 29 (21,64%) tulpini cu CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$, prin urmare jumătate dintre tulpinile producătoare de carbapenemază pun probleme serioase de terapie a infecțiilor determinate de acestea.

Dintre testele fenotipice utilizate pentru determinarea carbapenemazelor la Enterobacteriaceae, sensibilitatea cea mai bună s-a constatat pentru testul Rapidec® Carba NP: 97,92% pentru OXA-48 și 100% pentru toate celelalte carbapenemaze din studiu, asemănător altor studii: 100% sensibilitate și specificitate (Girlich D, 2013b; Vasoo S, 2013), 72,5% sensibilitate (Tijet N, 2013).

Combinația de discuri KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit® a avut sensibilitate asemănătoare testului enzimatic utilizat: 96,88% pentru OXA-48, mai slabă pentru combinația de carbapenemaze (la 3 tulpini nu a detectat co-producerea de OXA-48 pe lângă o altă carbapenemază) – 83,33% și 100% pentru NDM și KPC. Și aceste rezultate sunt similare altor studii publicate, cum este cel al lui van Dijk în care sensibilitatea cea mai bună a fost pentru detectarea carbapenemazelor din clasa D (100%), 95% pentru KPC și 90% pentru NDM. (van Dijk K, 2014)

Testul Hodge modificat a avut o sensibilitate de 93,75% pentru OXA-48, doar 85,71% pentru NDM și 100% pentru KPC și tulpinile producătoare de două sau mai multe carbapenemaze. Puține studii îi atribuie sensibilitate și specificitate 100% (Anderson KF, 2007), altele îi atribuie o sensibilitate de 50% pentru depistarea tulpinilor producătoare de

NDM-1 (Girlich D, 2012a), sau 12% pentru detectarea MBL (NDM, VIM, IMP), 98% pentru KPC și 93% pentru OXA-48 (Doyle D, 2012).

Concluzii și contribuții personale

În perioada 2014-2015 au fost confirmate 134 Enterobacteriaceae producătoare de carbapenemaze dintre cele 212 incluse în studiu. Acestea reprezintă 2,83% din totalul enterobacteriilor (n=4741) izolate în perioada menționată în Laboratorul de Microbiologie al Institutului Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș”. Tulpinile bacteriene au fost izolate de la bolnavi (2,51%, 115/4575) și de la purtători (11,45%, 19/166); portajul de Enterobacteriaceae producătoare de carbapenemaze din totalul probelor recoltate pentru determinarea stării de portaj (n=690) a fost de 2,75%.

Cele mai frecvente tipuri de carbapenemază au fost OXA-48 (71,64%), urmate de NDM (10,45%) și KPC (4,48%), iar dintre tulpinile producătoare de două sau trei carbapenemaze, cea mai frecventă a fost combinația OXA-48 + NDM (6,72%), urmată de OXA-48 + KPC (3,73%), și în procent egal (1,49%) KPC + NDM și OXA-48 + KPC + NDM. Prin aceasta demonstrăm că deși există suspiciunea că țările din regiunea Balcanică ar constitui, după unele studii menționate în review-ul publicat în 2012 de către Rafael Canton și colaboratorii (Cantón R, 2012), a doua sursă de carbapenemaze tip NDM, în România (cel puțin zona de sud a țării), carbapenemazele NDM nu sunt cele mai frecvente, dar există suficiente izolate (peste 20%), așa încât trebuie supravegheată în continuare evoluția acestora.

Factorii de risc pentru prezența carbapenemazelor la Enterobacteriaceaele incluse în studiu au fost vârsta sub 30 de ani și manevrele invazive, fapt care se corelează și cu frecvența ridicată a cazurilor de infecții sau portaje în secția de terapie intensivă unde pacienții au adesea nevoie de suport mecanic pentru a supraviețui.

Cea mai frecventă specie producătoare de carbapenemaze dintre tulpinile cu sensibilitate diminuată la carbapeneme este *Klebsiella pneumoniae*.

Din totalul Enterobacteriaceaelor izolate în perioada 2014-2015 (n=4741), *Klebsiella pneumoniae* și *Providencia stuartii* au avut cea mai mare probabilitate de a produce carbapenemază. La polul opus se situează *Escherichia coli*, cu cel mai scăzut risc de a produce carbapenemază.

Riscul ca o tulpină de Enterobacteriaceae dintre cele cu sensibilitatea diminuată la unul sau mai multe carbapeneme să fie producătoare de carbapenemază este semnificativ

statistic mai mare la tulpinile izolate din spută/ aspirat bronșic comparativ cu cele izolate din alte prelevate clinice.

Tulpinile de Enterobacteriaceae producătoare de carbapenemaze sunt mai rezistente la antibiotice (cu diferențe semnificative statistic) decât cele cu sensibilitatea diminuată la carbapeneme dar neproducătoare de carbapenemaze la: meropenem, imipenem, colistin și amikacină. Un procent de 91,03% dintre tulpinile producătoare de carbapenemaze au fost producătoare de ESBL și 4,48% producătoare de AmpC.

Jumătate dintre tulpinile producătoare de carbapenemaze au avut concentrația minimă inhibitorie la meropenem ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ și 21,64% dintre acestea, ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$.

Rezistența la colistin a fost mai mare pentru tulpinile producătoare de carbapenemaze în comparație cu cele neproducătoare (56,64% versus 17,46%) și doar tulpini de *Klebsiella pneumoniae* au fost rezistente. Rezistența nu s-a datorat prezenței genei *mcr-1*, cercetată, fiind probabil determinată prin inactivarea genei *mgrB*.

Ertapenemul este un marker sensibil pentru detecția Enterobacteriaceaelor producătoare de carbapenemază, cinci tulpini având CMI la meropenem (antibioticul recomandat de ghidurile europene) $< 0,125$ $\mu\text{g/ml}$ (valoarea prag de includere în studiu) fiind producătoare de carbapenemază. În concluzie: (1) având în vedere că proporția de carbapenemaze OXA-48 (carbapenemază nu foarte puternică) este mare la noi (71,64%) și am fi putut pierde 3,73% (5/134) dintre tulpinile producătoare de carbapenemază, este recomandabil să utilizăm ertapenemul (cum recomandă ghidurile americane) și nu meropenemul (cum recomandă ghidurile europene) ca marker pentru suspiciunea producerii de carbapenemază la Enterobacteriaceae și (2) alegerea valorii prag (concentrația minimă inhibitorie) pentru screening este bine să fie valoarea cut-off-ului epidemiologic (așa cum recomandă ghidurile europene) și nu cel clinic (cum recomandă cele americane), întrucât 29,10% (39/134) dintre tulpinile producătoare de carbapenemază au fost sensibile la meropenem (29/39 producătoare de carbapenemază OXA-48), nici una la ertapenem și 37,31%, 50/134 la imipenem (39/50 producătoare de OXA-48).

Dintre toate testele fenotipice realizate, testul enzimatic Rapidec® Carba NP a avut cea mai mare sensibilitate (97,92% pentru detecția tulpinilor producătoare de OXA-48 și 100% pentru toate celelalte din studiu) și se recomandă a fi utilizat pentru rezultatele sale sigure și rapide (în ore – sub 2 ore), ajutând la eficientizarea programului de control al infecțiilor asociate îngrijirilor medicale, fiind cunoscut că depistarea producerii de carbapenemază este deosebit de utilă din punct de vedere epidemiologic și nu clinic. Deasemenea, un alt avantaj al acestui test îl constituie faptul că depistează orice tip de

carbapenemază, chiar nedetectată încă – lucru imposibil de realizat prin PCR, care detectează țintit, genele cunoscute.

Testul fenotipic care se bazează pe combinația de discuri (KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit®) a avut deasemenea sensibilitate foarte bună (96,88% pentru OXA-48, mai slabă pentru combinația de carbapenemaze – 83,33% și 100% pentru NDM și KPC). Dezavantajul lui este că obținerea rezultatului durează 18-20 de ore, dar avantajul este că poate determina tipul de carbapenemază dintre cele 3, mai importante medical (KPC, MBL și OXA-48).

Testul Hodge modificat a avut sensibilitatea cea mai mică dintre cele trei teste prezentate (93,75% pentru detectarea carbapenemazelor tip OXA-48, 85,71% pentru NDM și 100% pentru KPC și tulpinile producătoare de două sau mai multe carbapenemaze). Avantajul major al acestuia este că este ieftin (nu necesită o trusă specială) și în situația în care laboratorul nu are alt test la dispoziție se poate utiliza, trebuind ulterior ca tulpina să fie trimisă la un laborator de referință pentru a se confirma sau infirma producerea de carbapenemază.

Teza conține 64 figuri (toate, originale), 37 tabele și 301 referințe bibliografice. Pe parcursul elaborării tezei de doctorat au fost publicate 2 articole (unul ISI și unul BDI, ambele în calitate de autor principal) și au fost comunicate 7 lucrări sub formă de prezentare orală sau poster la conferințe naționale și internaționale.

Bibliografie selectivă

- Antonelli A, Di Palo DM, Galano A, Becciani S, Montagnani C et al. Intestinal carriage of *Shewanella xiamenensis* simulating carriage of OXA-48-producing Enterobacteriaceae, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 82:1-3, 2015
- Arana DM, Saez D, García-Hierro P, Bautista V, Fernández-Romero S, Ángel de la Cal M et al. Concurrent interspecies and clonal dissemination of OXA-48 carbapenemase, *Clin Microbiol Infect*, 21:148.e1–148.e4, 2015
- Bush K, Jacoby G A și Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother*, 39(6):1211-1233, 1995
- Cannatelli A, Giani T, D'Andrea M-M, Di Pilato V, Arena F et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(10):5696–5703, 2014
- Cantón R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(5):413–431, 2012
- Choudhury S, Yeng JLW, Krishnan PU. In vitro susceptibilities of clinical isolates of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae to fosfomycin and tigecycline. *Clin Microbiol Infect*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.06.005>, 2015
- Cunha CB, Kassakian SZ, Chan R, Tenover FC, Ziakas P et al. Screening of nursing home residents for colonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae admitted to acute care hospitals: incidence and risk factors. *American Journal of Infection Control*, 44:126-130, 2016
- Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang T-D, Nordmann P. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing β -Lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(9):3463–3464, 2008
- Daikos GL, Markogiannakis A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect*, 17:1135–1141, 2011
- de Maio Carrilho CMD, Marques de Oliveira L, Gaudereto J, Perozin JS, Ragassi Urbano M et al. A prospective study of treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections and risk factors associated with outcome. *BMC Infectious Diseases*, 16:629, 2016
- de Maio Carrilho CMD, Gaudereto JJ, Ruedas Martins RC, de Castro Lima VAC, de Oliveira LM et al. Colistin-resistant Enterobacteriaceae infections: clinical and molecular characterization and analysis of in vitro synergy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 87(3):253–257, 2017
- Delgado-Valverde M, Sojo-Dorado J, Pascual A, Rodriguez-Bano J. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Ther Adv Infect Dis*, 1(2):49-69, 2013

- Di Luca MC, Sørum V, Starikova I, Kloos J, Hülter N, Naseer U et al. Low biological cost of carbapenemase-encoding plasmids following transfer from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 27(1):85-89, 2017
- Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide Dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *BioMed Research International*, Article ID 249856, 12 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/249856>, 2014
- Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JDD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol*, 50(12):3877–3880, 2012
- Fattouh R, Tijet N, McGeer A, Poutanen SM, Melano RG, Patel SN. What is the appropriate meropenem MIC for screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in low-prevalence settings? *Antimicrob Agents Chemother*, 60(3):1556-1559, 2016
- Fedorowsky R, Peles-Bortz A, Masarwa S, Liberman D, Rubinovitch B, Lipkin V. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae carriers in acute care hospitals and postacute-care facilities: The effect of organizational culture on staff attitudes, knowledge, practices, and infection acquisition rates. *American Journal of Infection Control*, 43:935-939, 2015
- Girmenia C, Serrao A și Canichella M. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in mediterranean countries. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 8(1): e2016032, 2016
- Hrabak J, Chudackova E și Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect*, 20:839–853, 2014
- Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2):161–168, 2016
- Martirosov DM, Lodise TP. Emerging trends in epidemiology and management of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 85:266–275, 2016
- Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect*, 18:432–438, 2012c
- Palacios-Baena ZR, Oteo J, Conejo C, Nieves Larrosa M, Bou G et al. Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain. *Journal of Infection*, 72:152-160, 2016
- Potter FR, D'Souza AW, Dantas G. The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Drug Resistance Updates*, 29:30–46, 2016

Singh-Moodley A, Perovic O. Antimicrobial susceptibility testing in predicting the presence of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae in South Africa. *BMC Infectious Diseases*, 16(536):1-10, 2016

Tischendorf J, Almeida de Avila R, Safdar N. Risk of infection following colonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A systematic review, *American Journal of Infection Control*, 44:539-543, 2016

van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin Microbiol Infect*, 20:345–349, 2014

Lista cu lucrările științifice publicate

I. Articole publicate în reviste de specialitate

1. Rafila A, **Talapan D**, Dorobat OM, Popescu GA, Pitigoi D et al. Emergence of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, a Public Health Threat: a Romanian Infectious Disease Hospital Based Study. *Rev Romana Med Lab*, 23(3):295-301, 2015

Factor impact (2016): 0,325

<http://www.rrml.ro/articole/articol.php?year=2015&vol=3&poz=4>

2. **Talapan D**, Dorobat OM, Bleotu C, Aldea I, Necula L et al. Evaluation of four phenotypic tests for the detection of OXA-48-type carbapenemase in Enterobacteriaceae. *Romanian Journal of Infectious Diseases*, XIX(4):245-249, 2016

https://view.publitas.com/amph/rjid_2016_4_en_art-06/page/1

II. Lucrări prezentate la manifestări științifice organizate de asociații profesionale naționale

1. **Talapan D**, Dorobăț OM, Streinu-Cercel Adrian, Rafila A. Enterobacteriaceae producătoare de carbapenemaze izolate în 2014 într-un spital clinic din București. 1st Congress of the Romanian Association of Laboratory Medicine with International Participation, mai 20-23, 2015 Sighișoara, România

http://www.rrml.ro/articole/2015/2015_1_supliment.pdf

2. **Talapan D**, Streinu-Cercel A, Bleotu C. Emergența Enterobacteriaceaelor producătoare de carbapenemaze. Sesiunea de încheiere a proiectului: “Cercetarea doctorală și postdoctorală prioritate a învățământului superior românesc (Doc-Postdoc)” POSDRU/159/1.5/S/137390 nov 2015, București, România

<http://www.doc->

[postdoc.umf.ro/uploads/nnnn/Newsletter%20noiembrie%202015.pdf](http://www.doc-postdoc.umf.ro/uploads/nnnn/Newsletter%20noiembrie%202015.pdf)

3. **Tălăpan D**, Dorobăț OM, Bleotu C, Aldea I, Necula L et al. Evaluarea a patru teste fenotipice pentru detectarea carbapenemazelor de tip OXA-48 la Enterobacteriaceae. A IX-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie, oct 20-22, 2016 Brașov, Romania
http://www.srm.ro/pdf/Caiet%20Volum%20Rezumate_A%209-a%20Conf%2016%20oct.pdf
4. **Tălăpan D**, Dorobăț OM, Popoiu M, Mihai A, Iovănescu D et al. 19 luni de supraveghere a microorganismelor multirezistente la antibiotice (MDRO) prin detectarea portajului. A 12-a ediție a Zilelor Științifice ale Institutului Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș”, nov 23-25, 2016 București, România
<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/supplements/volume-16-supplement-4>
5. **Tălăpan D**, Dorobăț OM, Bleotu C, Popescu GA, Florea D et al. Overview on carbapenemase production of Enterobacteriaceae strains isolated between 2014-2015 in a tertiary care hospital from Bucharest, Romania. A 13-a ediție a Zilelor Științifice ale Institutului Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș”, nov 8-10, 2017 București, România
http://apps.mateibals.ro/ZileInbi2017/docs/volum_rezumate_zileINBI2017.pdf

III. Lucrări prezentate la manifestări științifice organizate de asociații profesionale internaționale

1. **Talapan D**, Dorobat OM, Streinu-Cercel A, Rafila A. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a clinical hospital from Bucharest, Romania. International Meeting on Infectious Diseases and Surveillance – IMED 2014, oct 31 – nov 3, 2014 Vienna, Austria
<http://www.isid.org/events/archives/IMED2014/index.shtml>
2. **Tălăpan D**, Dorobăț OM, Bleotu C, Aldea I, Necula L et al. Comparison of four phenotypic tests for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases – ECCMID apr 22-25, 2017 Vienna, Austria
https://www.escmid.org/fileadmin/eccmid/2017/media/documents/ECCMID_Final_Programme_Vienna_Web.pdf