MINISTERUL EDUCAȚIEI NAȚIONALE ȘI CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE

UNIVERSITATEA PETROL- GAZE DIN PLOIEȘTI

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

"STUDIUL FENOTIPIC ȘI MOLECULAR AL FACTORILOR DE VIRULENȚĂ DE NATURĂ ENZIMATICĂ LA TULPINI MICROBIENE GRAM POZITIVE, GRAM NEGATIVE ȘI LEVURI DE INTERES CLINIC"

DOCTORAND: Ing.Chim. Nicoleta MEREZEANU (HAGIANU)

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC:

Prof.univ.Dr.Chim. Octav PÂNTEA

PLOIEȘTI, 2016

CUPRINS

INTRODUCERE ... 3

CAPITOLUL I. DEFINIȚIA, CLASIFICAREA ȘI DISTRIBUȚIA TOXINELOR MICROBIENE LA DIFERITE SPECII DE INTERES CLINIC ... 4

CAPITOLUL II. MECANISME DE REZISTENȚA ALE COCILOR GRAM POZITIVI ȘI BACILILOR GRAM NEGATIVI LA ANTIBIOTICELE B-LACTAMICE ... 5

CONTRIBUȚII PERSONALE ... 6

CAPITOLUL III: INVESTIGAREA ASPECTELOR DE VIRULENȚĂ ALE UNOR TULPINI MICROBIENE IZOLATE DIN DIFERITE PRODUSE PATOLOGICE ȘI INFECȚII NOSOCOMIALE ... 7

OBIECTIVUL 1. EVIDENȚIEREA FENOTIPICĂ A UNOR FACTORI DE VIRULENȚĂ ENZIMATICI, PRODUȘI DE TULPINI DE *S.AUREUS, E.COLI, KLEBSIELA SP., PROTEUS SP., PS. AERUGINOSA* ȘI *C. ALBICANS,* DIN DIFERITE PRODUSE PATOLOGICE. ... 7

INTRODUCERE ... 7

MATERIALE ȘI METODE: ... 7

REZULTATE ȘI DISCUȚII ... 8

CONCLUZII ... 14

OBIECTIVUL 2: STUDIUL MARKERILOR GENOTIPICI DE VIRULENȚĂ LA TULPINI NOSOCOMIALE GRAM POZITIVE ȘI GRAM NEGATIVE IZOLATE DIN DIFERITE PRODUSE PATOLOGICE ... 15

MATERIALE ȘI METODE ... 15

REZULTATE ȘI DISCUȚII ... 16

CONCLUZII ... 22

CAPITOLUL IV: INVESTIGAREA ASPECTELOR DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICELE β-LACTAMICE LA TULPINI NOSOCOMIALE DE *S. AUREUS* ȘI *PS. AERUGINOSA* ... 23

OBIECTIVUL 1. EVIDENȚIEREA GENOTIPICĂ A MARKERILOR DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICELE β-LACTAMICE LA TULPINI NOSOCOMIALE DE *S. AUREUS* ȘI *PS. AERUGINOSA* ... 23

MATERIALE ȘI METODE ... 23

REZULTATE ȘI DISCUȚII ... 24

CONCLUZII ... 30

CONCLUZII GENERALE ... 31

LUCRARI PUBLICATE PE PARCURSUL ELABORARII TEZEI ... 32

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ ... 33

INTRODUCERE

Incidența tot mai ridicată din ultimii ani, pe plan mondial, a infecțiilor bacteriene soldate cu eșec terapeutic se explică prin: câștigarea unui număr tot mai mare de factori de virulență de către tulpinile bacteriene, utilizarea nejustificată a antibioticelor și diseminarea factorilor de antibiorezistență (AR), utilizarea metodelor de investigație invazive, creșterea numărului de pacienți imunocompromiși, răspândirea rapidă a microorganismelor în mediul ambiant (prin facilitarea globalizării și a mijloacelor moderne de transport).

În prezent, infecțiile cu *Staphilococcus aureus* apar a fi produse de un agent patogen microbian multirezistent (MR) la o gamă foarte largă de antibiotice utilizate în mediul spitalicesc (tulpini MRSA și VRSA).

În România, în 2014, s-a raportat că 50% din tulpinile de *S.aureus* izolate din hemoculturi și LCR prezentau fenotipul MRSA, multirezistent la antibiotice, dar se consideră de fapt că numărul infecțiilor intraspitalicești era mult mai mare decât cel raportat.

De asemeni, conform raportului de la *European Center Diseases Control,*din 2000, România era una dintre țările europene cu cele mai înalte procente de multirezistență (MR) la antibiotice (inclusiv la carbapeneme) la izolatele clinice de *Ps.aeruginosa* și *Acinetobacter.*

În prezent, în țară există încă date foarte limitate referitoare la caracterizarea genetică a tulpinilor de *Ps.aeruginosa* circulante, rezistente la carbapeneme.

Date publicate la sfârșitul lui septembrie 2014 privind consumul de antibiotice în statele Uniunii Europene, de către specialiștii comisiilor internaționale implicate, arată că România este una dintre țările europene cu cel mai mare consum de antibiotice și prezintă o AR mai mare de 50% la tulpini (alături de Grecia, Italia, Spania) prin comparație cu țările nordice (Norvegia, Suedia, Finlanda) cu cel mai mic consum de antibiotice și cea mai scăzută AR.

Dacă pe harta Europei, în 2012, România apărea notată drept zona portocalie (AR moderată), din 2013, zona a devenit roșie (AR înaltă). Situația este cu atât mai îngrijorătoare cu cât se consideră

că un număr mare de infecții intraspitalicești rămân încă neraportate (existând încă în țară județe cu raportare zero).

În acest context, prezenta lucrare are drept **scop-** studiul capacității potențial- patogene a unui număr de tulpini bacteriene și fungice izolate din infecții nosocomiale, prin evidențierea atât a sintezei a unor toxine și, respectiv, a unor enzime cu potențial rol în virulență, cât și investigarea mecanismelor de antibiorezistență la antibioticele β-lactamice a acestor tulpini.

Partea teoretică este structurată în două capitole :

CAPITOLUL I. DEFINIȚIA, CLASIFICAREA ȘI DISTRIBUȚIA TOXINELOR MICROBIENE LA DIFERITE SPECII DE INTERES CLINIC

Aici sunt prezentate trei tipuri de clasificări ale toxinelor, în funcție decriteriile luate în considerare:

-după compoziția chimică (toxine proteice și lipo-polizaharidice),

-după localizarea celulară (toxine de natură proteică, de natură LPS, exotoxine propriu-zise și toxine de natură proteică cu localizare mixtă),

-după mecanismele de acțiune (toxine cu conformație tip A-B, toxine formatoare de pori, citolizinele,toxinele RTX, toxinele cu activitate ADP-ribozilantă, toxine termostabile,toxine proteolitice,toxine cu acțiune asupra citoscheletului celulei gazdă,exoenzime și moleculele înrudite, endotoxinele).

În continuare este prezentată distribuția toxinelor microbiene la diferite specii microbiene de interes clinic și anume, la tulpinile bacteriene gram pozitive de *Staphylococcus aureus,* la bacilii gram negativi fermentativi (*Enterobacteriaceae* și anume, *E. Coli, Salmonella sp., Shigella sp.,Proteus sp*.) și non-fermentativi patogeni oportuniști (specia *Ps. aeruginosa*) și la tulpinile levurice genul *Candida.*

Referitor la toxigeneza tulpinilor de *S.aureus* sunt prezentate foarte sistematic: adezinele, alfa-,beta-, gama- și delta-toxinele, coagulaza, hemolizinele, exoenzimele (proteazele, nucleazele, lipazele și lecitinazele, hialuronidaza, colagenaza).

În cazul tulpinilor de bacili gram-negativi de interes medical sunt prezentate hemolizinele beta ale tulpinilor de *E. Coli* nefropatogene, enterotoxina labilă ETEC și enterotoxina termostabilă TS de la *E. Coli* ,exotoxina termolabilă (toxina *Shiga*) cu acțiune toxică de la *Sh.disenteriae.*

Pentru tulpinile de *Ps.aeruginosa* oportunist patogene, implicate frecvent în infecții nosocomiale, sunt prezentate și analizate proteaza (responsabilă de aderența bacteriană la nivelul tractului respirator, elasaza, colagenaza, fibrinolizina, exotoxina S și exotoxina A(cu rol în diseminarea infecției).

Pentru tulpinile de *Candida,* foarte frecvent implicate în infecții la pacienții imunocompromiși, sunt prezentate lipazele și proteazele, factori de virulență ce favorizează progresia infecției, formarea hifelor și evitarea mecanismelor de apărare ale gazdei.

CAPITOLUL II. MECANISME DE REZISTENȚA ALE COCILOR GRAM POZITIVI ȘI BACILILOR GRAM NEGATIVI LA ANTIBIOTICELE B-LACTAMICE

În acest capitol sunt tratate foarte sistematic mecanismele de rezistență naturală și a celei dobândite (prin determinanți genetici cromozomali, plasmidiali și prin secvențe de ADN excedentare de tip transpozoni, integroni, integrate prin recombinare.

Sunt analizate cele patru clase de antibiotice β-lactamice în funcție de structura chimică, specii producătoare, mod de acțiune, spectru de activitate.

Sunt analizate mecanismele de antibiorezistență la tulpinile de *S. Aureus,*cu mențiunea că 80% din aceste tulpini (MRSA) produc β-lactamaze (datorită prezenței unor gene de tip blaZ, mecA, de la nivelul casetei cromozomale SCCmec) devenind astefel rezistente la penicilină (tip meticilină, oxacilină). Este subliniată marea diversitate a casetelor SCCmec care a impus clasificarea acestora în patru clase, cu tipuri și subtipuri.

Referitor la rezistența bacililor gram negativi la antibioticele β-lactamice sunt prezentate patru mecanisme de acțiune (inhibarea sintezei peretelui celular, inhibiția transportului transmembranar, a sintezei acizilor nucleici și a proteinelor și anume, a proceselor de transcriere și traducere a materialului genetic.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Partea de contribuții personale cuprinde două capitole cu, respectiv, două și un obiectiv.

CAPITOLUL III:

Investigarea aspectelor de virulență ale unor tulpini microbiene izolate din diferite produse patologice și infecții nosocomiale.

Obiectivul 1. Evidențierea fenotipică a unor factori de virulență enzimatici produși de tulpini de *S. aureus, E. coli, Klebsiela sp., Proteus sp., Ps.aeruginosa* și *C. albicans* din diferite produse patologice.

Obiectivul 2. Studiul markerilor genotipici de virulență la tulpini Gram-pozitive și Gram-negative izolate din diferite produse patologice.

CAPITOLUL IV:

Investigarea aspectelor de rezistență la antibioticele β-lactamice, la tulpini nosocomiale de *S. aureus* și *Ps. aeruginosa*.

Obiectivul 1. Evidențierea genotipică a markerilor de rezistență la antibioticele β-lactamice, la tulpini nosocomiale de *S. aureus* și *Ps. aeruginosa.*

CAPITOLUL III: INVESTIGAREA ASPECTELOR DE VIRULENȚĂ ALE UNOR TULPINI MICROBIENE IZOLATE DIN DIFERITE PRODUSE PATOLOGICE ȘI INFECȚII NOSOCOMIALE.

OBIECTIVUL 1. EVIDENȚIEREA FENOTIPICĂ A UNOR FACTORI DE VIRULENȚĂ ENZIMATICI, PRODUȘI DE TULPINI DE *S.AUREUS, E.COLI, KLEBSIELA SP., PROTEUS SP., PS. AERUGINOSA* ȘI *C. ALBICANS,* DIN DIFERITE PRODUSE PATOLOGICE.

INTRODUCERE

Din numărul mare de microorganisme existente, un număr redus sunt patogene la om. Patogenitatea microorganismelor constă în capacitatea acestora de a determina un proces infecțios atunci când pătrund în organismul gazdă sensibil. Pentru a determina un proces infecțios, microorganismele trebuie să exprime anumiți factori de virulență, necesari colonizării gazdei, supraviețurii și diseminării lor în organism.

MATERIALE ȘI METODE:

A. Materiale:

1. Tulpini bacteriene

În acest studiu s-au utilizat 56 tulpini bacteriene din colecția de culturi microbiene a Facultății de Biologie din cadrul Universitatii din Bucuresti, Departamentul Microbiologie (anexa 1-4), provenite din secțiile de terapie intensivă a Institutului de boli cardiovasculare "Prof.C.C.Iliescu"din București (48 tulpini bacteriene și 8 tulpini levurice).

Înainte de studiul factorilor de virulență ,tulpinile au fost reconfirmate din punct de vedere al diagnosticului de specie, prin metoda VITEK-2.

2. Alte materiale

- anse cu fir metalic;
- Medii de cultură: - Mediu geloză nutritivă;
  - Mediu **Y**east **P**eptone **G**lucose (YPG);
  - Mediu cu amidon – evidenţiază amilaza;

- Mediu cu lapte (conţine cazeină) – evidenţiază cazeinaza;
- Mediu cu gelatină – evidenţiază gelatinaza;
- Mediu cu tween – evidenţiază producerea de lipaze;
- Mediu cu esculină – evidenţiază producerea de molecule siderofor – like (ex.: esculetorul);
- Mediu cu lecitină (gălbenuş de ou) – evidenţiază lecitinaza (fosfolipază);
- Mediu cu ADN – evidenţierea DNA – zelor;
- Mediu cu geloza sânge – evidenţierea hemolizinelor.

- soluție HCl 1N;
- pipete.

B. Metode:

Evidențierea fenotipică a expresiei de factori enzimatici solubili implicaţi în virulenţă

Tulpinile microbiene au fost însămanțate în spot pe medii de cultură cu diferite substraturi, pentru exprimarea anumitor enzime: hemolizine, amilaza, cazeinaza, gelatinaza, producerea de esculinază, DN-ază, lipază şi lecitinază.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Studiul de față a cuprins un numar de 56 de tulpini bacteriene, dintre care: coci Gram pozitivi (*Staphylococcus* sp.), enterobacterii (*E. coli, Klebsiella* sp. și *Proteus* sp.,), alți bacili Gram negativi (*Pseudomonas aeruginosa*), dar și levuri (*Candida albicans*) a căror distrubuție pe specii este redată în Figura 1. Cele mai numeroase tulpini analizate sunt reprezentate de *P. aeruginosa* (36%), urmat de tulpini de *E. coli* (23%), diferite specii aparținând genului *Staphylococcus* (18%), *C. albicans* (14%) și, în procent mai mic, diferite tulpini: *Klebsiella* (5%) și *Proteus* (4%).

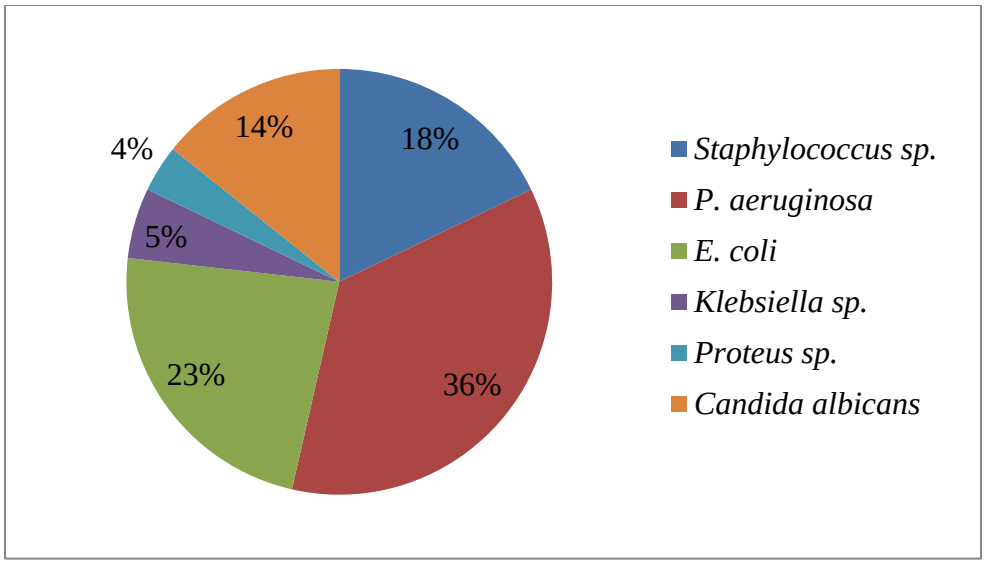

Fig.1. Reprezentarea diagramatică procentuală a distribuției speciilor analizate.

În ceea ce priveste sursele de izolare ale tulpinilor analizate, au predominat tulpinile izolate din secreție de plagă (48%), urocultură (18%), hemocultură (7%), secreție traheală (7%) și, în proporție mai redusă, abces și coprocultură (câte 2%) (Fig.2).

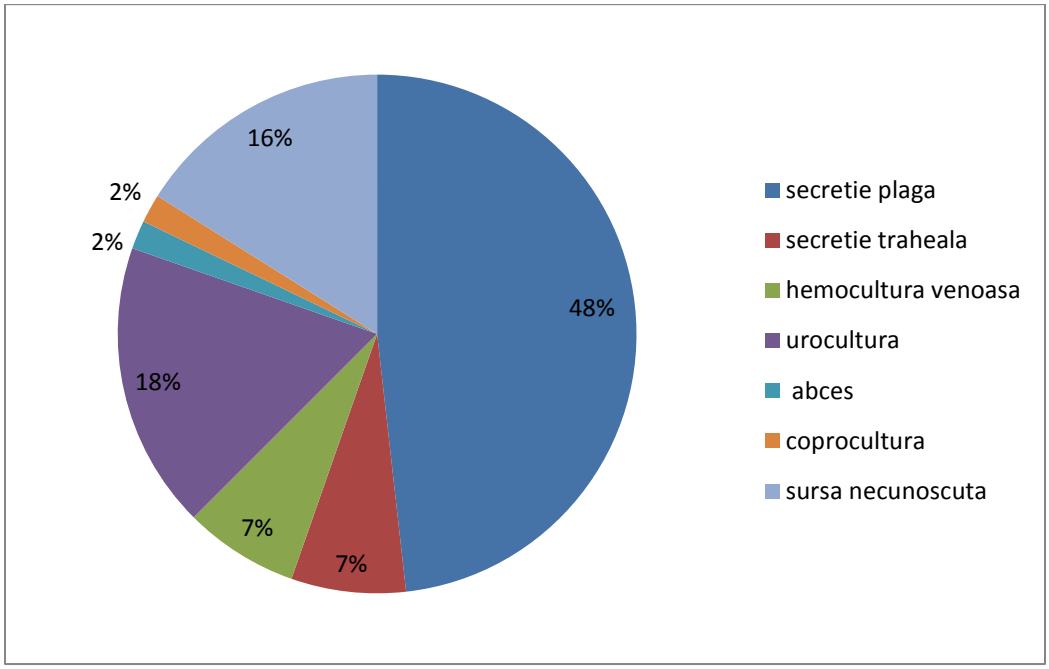

Fig. 2. Reprezentarea diagramatică procentualăa distribuției surselor de izolare ale tulpinilor analizate.

În ceea ce privește distribuția factorilor de virulență la tulpinile Gram pozitive analizate, respectiv la tulpinile de *Staphylococcus* sp.,se observă că lecitinaza și hemolizinele sunt cel mai frecvent exprimati, urmat de gelatinază și, în masură mai mică, DN-aza, cazeina și esculinaza. (Fig.3).

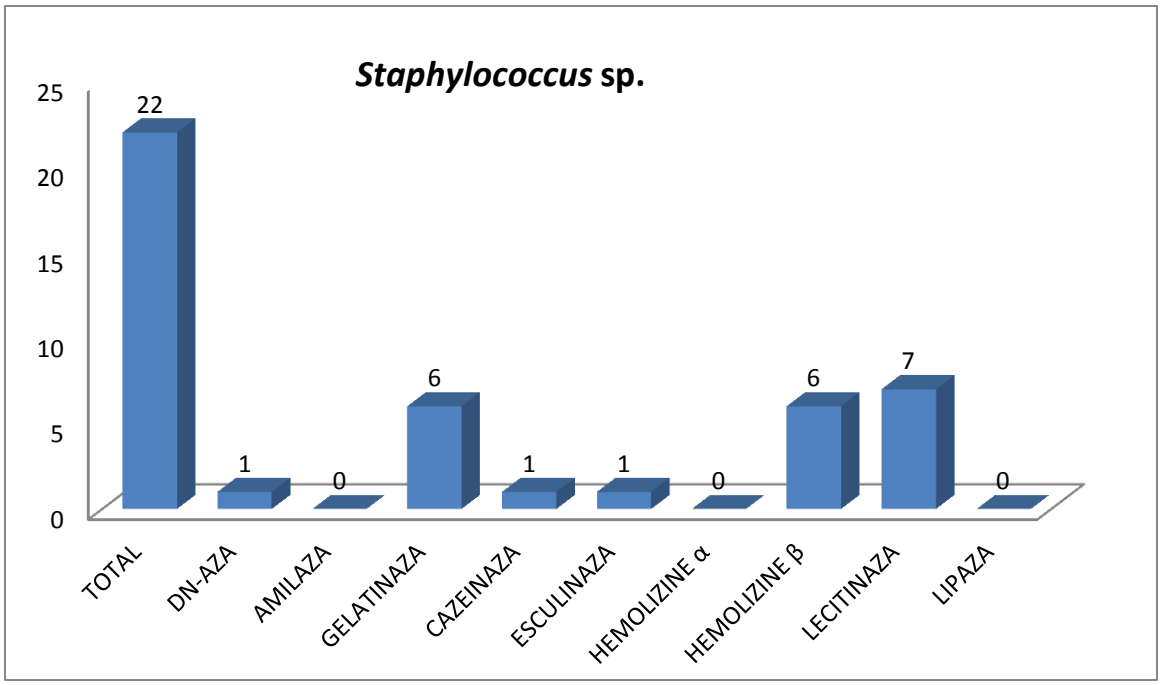

Fig.3. Reprezentarea diagramatică a distribuției factorilor de virulență exprimați de tulpinile de *Staphylococcus sp*. analizate.

La tulpinile familiei *Enterobacteriaceae* predomină expresia gelatinazei și esculinazei, urmat de lecitinază și hemolizinele β apoi, hemolizinele α și, în măsură mai mică, amilaza, cazeinaza, DN-aza și lipaza (Fig. 4).

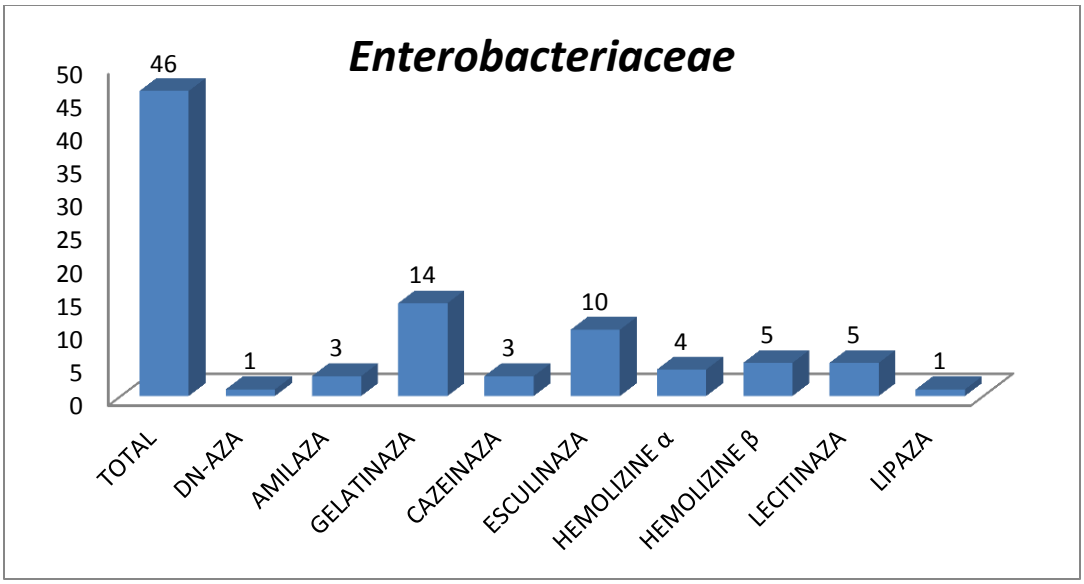

Fig. 4. Reprezentarea diagramatică a distribuției factorilor de virulență exprimați de tulpinile de *Enterobacteriaceae*analizate.

La tulpinile de *Ps. aeruginosa* se remarcă expresia de hemolizine, urmat în masură mai mică de lipază, lecitinază și esculinază, apoi DN-ază, gelatinază și cazeinază (Fig.5).

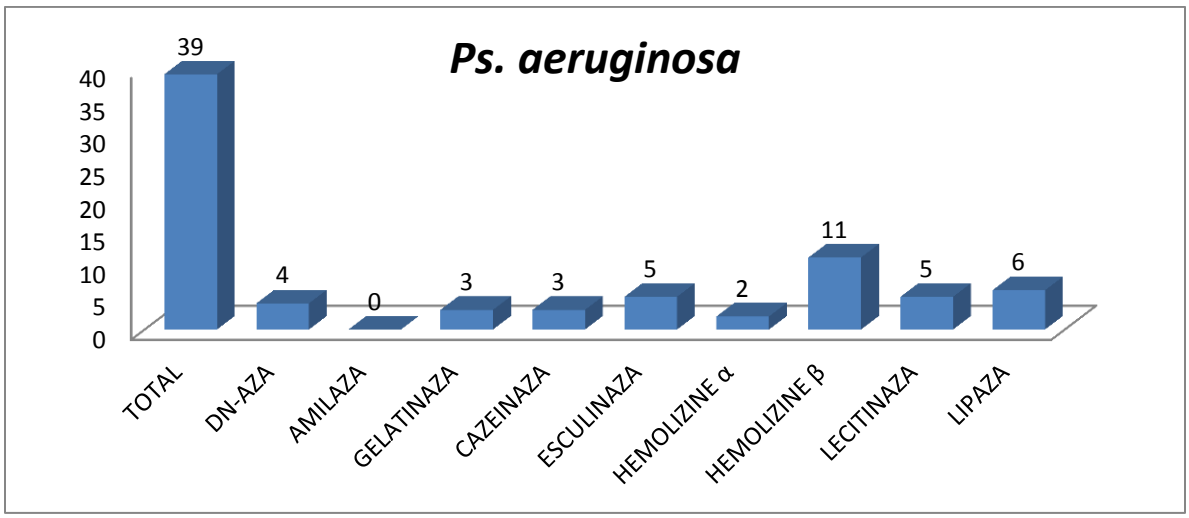

Fig. 5. Reprezentarea diagramatică a distribuției factorilorde virulență exprimați de tulpinile de *Ps. aeruginosa* analizate.

În cazul tulpinilor fungice analizate (*C. albicans*), producerea factorilor de virulență este mai redusă, gelatinaza fiind cel mai frecvent factor exprimat și în procent mai redus, DN-aza, esculinaza și hemolizine (Fig.6).

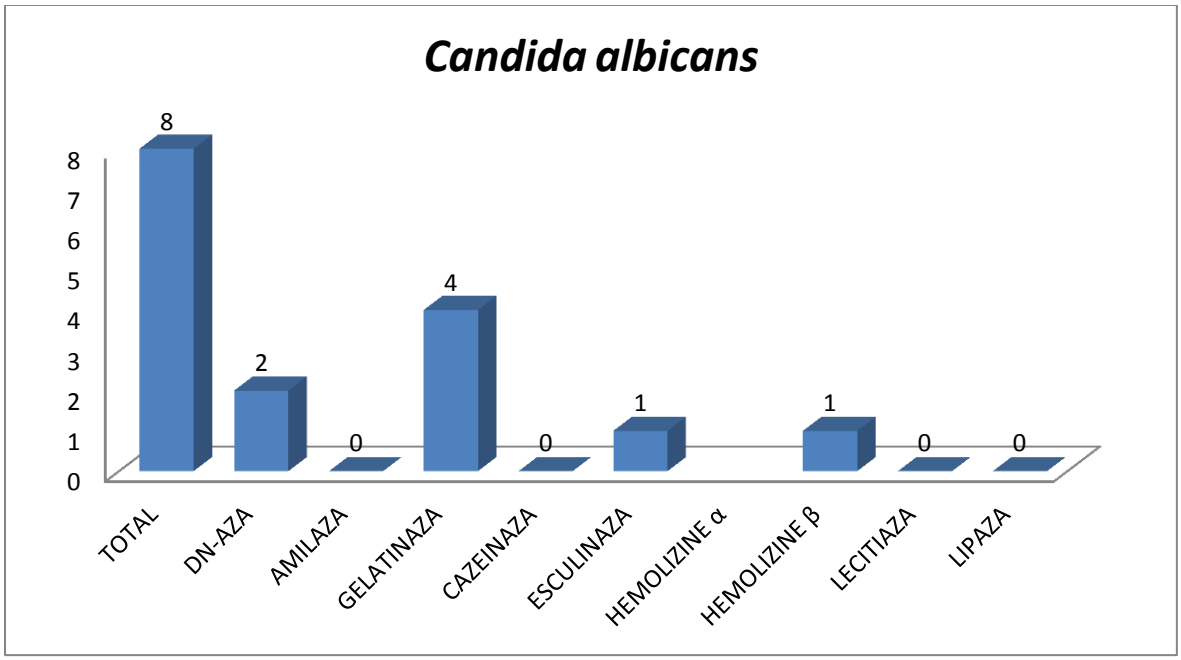

Fig. 6. Reprezentarea diagramatică a distribuției factorilor de virulență exprimați de tulpinile de *C. Albicans* analizate.

Cazeinaza este o enzimă proteolitică ce hidrolizează cazeina, principala proteină din lapte (Chifiriuc și colab., 2011). Numeroase studii au arătat că proteazele sintetizate de microorganismele patogene pot contribui la simptome severe ale infecției.

Lecitinazele, lipazele și β-hemolizinele se remarcă prin rolul lor de toxine formatoare de pori. Acestea acționează asupra membranei celulei bacteriene determinand pori la nivelul acesteia, mecanism prin care are loc diseminarea infecției în organismul uman (Chifiriuc și colab., 2011).

Esculinaza sau β-D-glucozidază hidrolizează esculina la esculetin și glucoză. Esculetinul se remarcă prin legarea de ionii de fier și astfel se formează un complex cu implicații însemnate atât în creșterea bacteriilor, cât și în virulența acestora. Fierul este un compus esențial creșterii și virulenței microorganismelor. În mediul extracelular, fierul se află într-o formă care nu poate fi asimilată de către celula bacteriană, pentru absorbția acestuia fiind necesari sideroforii (precum transferina). S-a dovedit că agenții chelatori ai fierului pot fi fixați de esculetol, așa că esculinaza are un rol important în asimilarea fierului necesar activării unor gene bacteriene și exprimării unor factori de virulență (Mihaescu și colab., 2007).

DN-azele asigură reducerea vâscozității secrețiilor în care se acumulează ADN din celulele lizate, pemițând diseminarea bacteriilor și asigurandu-le totodată și mononucleotide pentru propriile sinteze (Chifiriuc și colab., 2011).

Toate aceste enzime produse de tulpinile analizate dovedesc potențialul de virulență al acestora.

În Fig.7 sunt prezentate imagini ale aspectului fenotipic al unor factori de virulență investigați la tulpinile prezentului studiu.

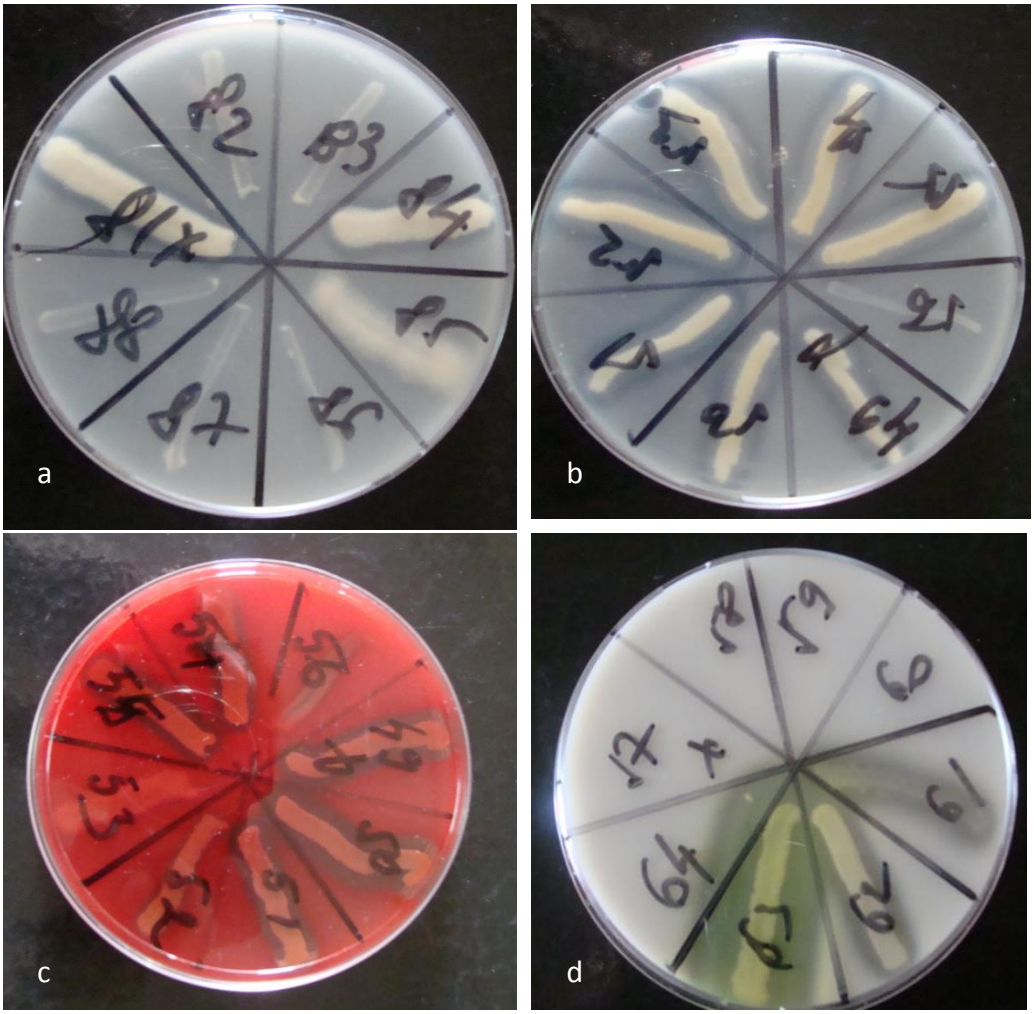

Fig. 7. Aspecte fenotipice ale unor factori de virulență produși de tulpinile analizate a, b) mediu cu lecitină: aspect pozitiv pentru lecitinază- producere de precipitat si halou, c) mediu cu sânge: aspect pozitiv pentru hemolizine- halou, d) mediu cu cazeină: aspect pozitiv pentru cazeinază – halou.

CONCLUZII

1. Expresia fenotipică a factorilor de virulență la tulpinile microbiene analizate a fost variabilă**,** în funcție de sursa de izolare și de specia testată.
2. Tulpinile de *Staphylococcus* sp. și *Pseudomonas* sp. au exprimat mai ales toxine formatoare de pori, respectiv hemolizine implicate atât în invazie cât și în evitarea răspunsului imun al gazdei.
3. Tulpinile genului *Staphylococcus* au exprimat, de asemenea, frecvent lecitinaza, iar dintre proteaze, gelatinaza.
4. Tulpinile aparținând familiei *Enterobacteriaceae* și levurile *(Candida)* au produs cel mai frecvent proteaze, la enterobacterii predominând exprimarea gelatinazei, urmată de esculinază, iar la tulpinile de *Candida*, care au exprimat un număr mai redus de factori de virulență solubili, gelatinaza a fost, de asemenea, cel mai frecvent exprimată.

OBIECTIVUL 2: STUDIUL MARKERILOR GENOTIPICI DE VIRULENȚĂ LA TULPINI NOSOCOMIALE GRAM POZITIVE ȘI GRAM NEGATIVE IZOLATE DIN DIFERITE PRODUSE PATOLOGICE

În urma observării fenotipurilor bacteriene obţinute cu ajutorul testelor anterioare, s-a realizat verificarea existenţei câtorva gene de virulență, utilizând mixul de reacţie - GoTaq® Green Master Mix (Jena Bioscience, Germany). Pentru amplificarea acestor gene, au fost folosiţi primeri descrişi în literatura de specialitate.

MATERIALE ȘI METODE

Extracția AND bacterian

Obţinerea ADN bacterian pentru *screening*-ul genelor s-a realizat utilizând metoda de extracție alcalină a ADN. Pentru aceasta, 1-5 colonii din culturile bacteriene au fost suspendate în 20 µl soluție NaOH(0.05M)+ SDS(0,25%). În etapa următoare s-a realizat amplificarea la 95°C, 5 min, urmată de adăugarea a 180 µl soluție tampon TE1x în fiecare tub Eppendorf, centrifugare 3min. la 13000 r.p.m. și păstrare la -4ºC. Verificarea produsului obţinut s-a realizat prin electroforeză în gel de agaroză 1,5% și 2%, 45min la 90V, colorat cu bromură de etidium3,5µg/ml.

Reacția PCR (*Polymerase Chain Reaction*= Reacțiade polimerizare în lanț) este o metodă de amplificare enzimatică *in vitro* a unei anumite secvențe de ADN. Din punct de vedere chimic, reacția PCR este constituită din cicluri succesive de replicare ADN *in vitro*, folosind 2 primeri oligonucleotidici ce hibridizează cu cele două catene ale matriței. Diferența esențială între o asemenea reacție de replicare și un proces de replicare ADN *in vivo*, este reprezentată de faptul că în reacția PCR, etapa de desfacere a dublului helix matriță și respectiv, cea de atașare a primerilor, nu sunt realizate enzymatic, ci prin parcurgerea unor trepte de temperatură, iar singura enzimă folosită în reacție este o ADN polimerază dependentă de ADN (Vassu și colab., 2001).Odată cu apariția PCR, științele biologice au evoluat radical din momentul descoperirii acestei tehnologii.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

La nivel genotipic au fost luate în lucru doar tulpinile care au exprimat factori de virulență exprimați la nivel fenotic, tulpini izolate de la pacienți cu diferite afecțiuni cardiovasculare, internați în secțiile de terapie intensivă de Institutul de boli cardiovasculare Prof. „C.C. Iliescu" din București; unitate spitalicească cu acoperire teritorială reprezentativă, unde sosesc pacienți din întreaga țară.

1. *S.aureus*

În cazul tulpinilor de *S. aureus* a fost analizat un numar de n=10 tulpini, care au exprimat factori de virulență la nivel fenotipic, constatându-se că 50% dintre tulpini au evidențiat gena (cna) ce codifică proteina de legare a colagenului; 40% din tulpinile analizate au exprimat gene ce codifică receptine asociate suprafeței celulei bacteriene (clfA și clfB), ce mediază legarea *S. aureus* la fibrinogen (Fig.8).

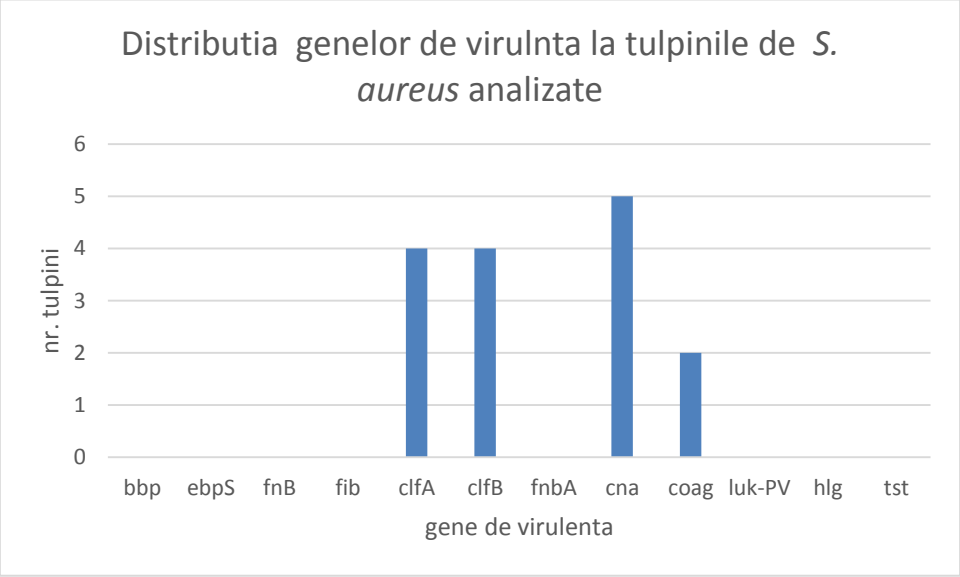

Fig. 8.Distribuția genelor de virulență la tulpinile de *S. aureus* analizate la nivel genotipic.

Analiza distribuției factorilor de virulență extracelulari a demonstrat că, 70% din tulpinile de *S. aureus* analizate au produs lecitinază (toxină formatoare de pori) ; 60% au fost

producatoare de gelatinază (activitate proteolitică) și β-hemolitice, iar numai 10% au produs cazeinază, DN-ază ,cazeinază și hidroliza esculinei.

În ceea ce privește distribuția genelor de virulență, studiile moleculare au demonstrat că 50% din tulpinile analizate au prezentat gena **cna,** 40% din tulpini au exprimat genele **clfA** și **clfB**, iar 20% din tulpini au exprimat gena **coag** (Fig. 9). Tulpinile de *S. aureus* codificate nr. 3(51) și 4(53), provenite din secreție plagă, au exprimat patru gene de virulență (cna, clfA, clfB și coag), alături de factorii de virulență - gelatinază și lecitinază (toxine formatoare de pori).

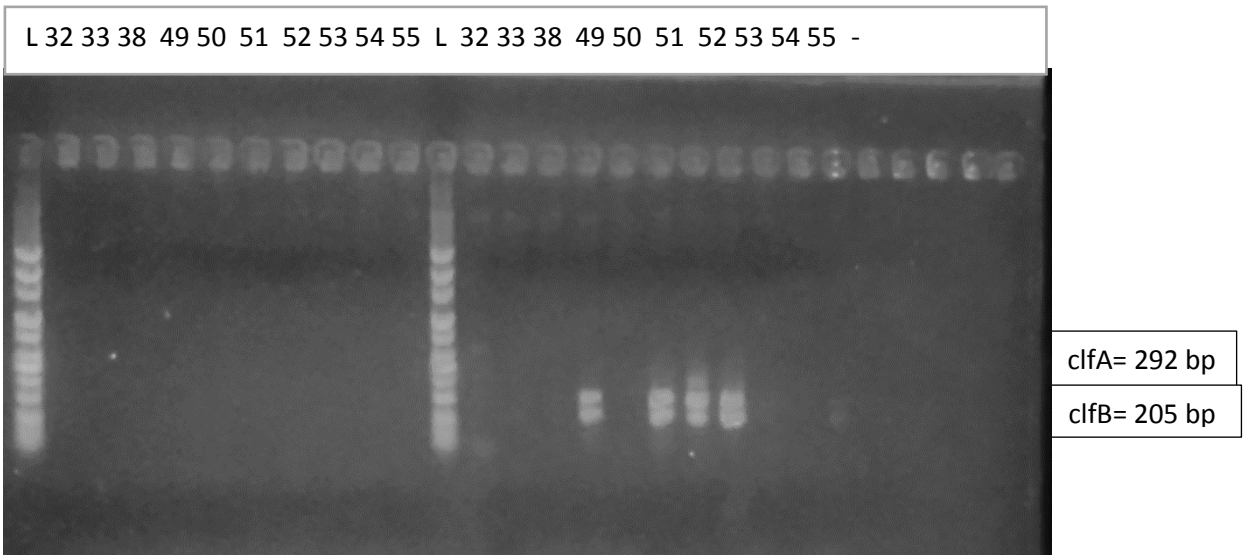

Fig.9, Electroforegrama ampliconilor obținuți prin PCR pentru gena ce codifică proteina de legare a sialoproteinei osului (bbp), gena ce codifică elastina (ebp); gena ce codifică receptine asociate suprafeței celulei bacteriene (clfA și clfB) : L- Marker de greutate moleculară GeneRuler 1400 bp (Mid Range DNA Ladder); tulpinile nr. 49; 51; 52; 53 au exprimat ambele gene analizate (clfA și clfB).

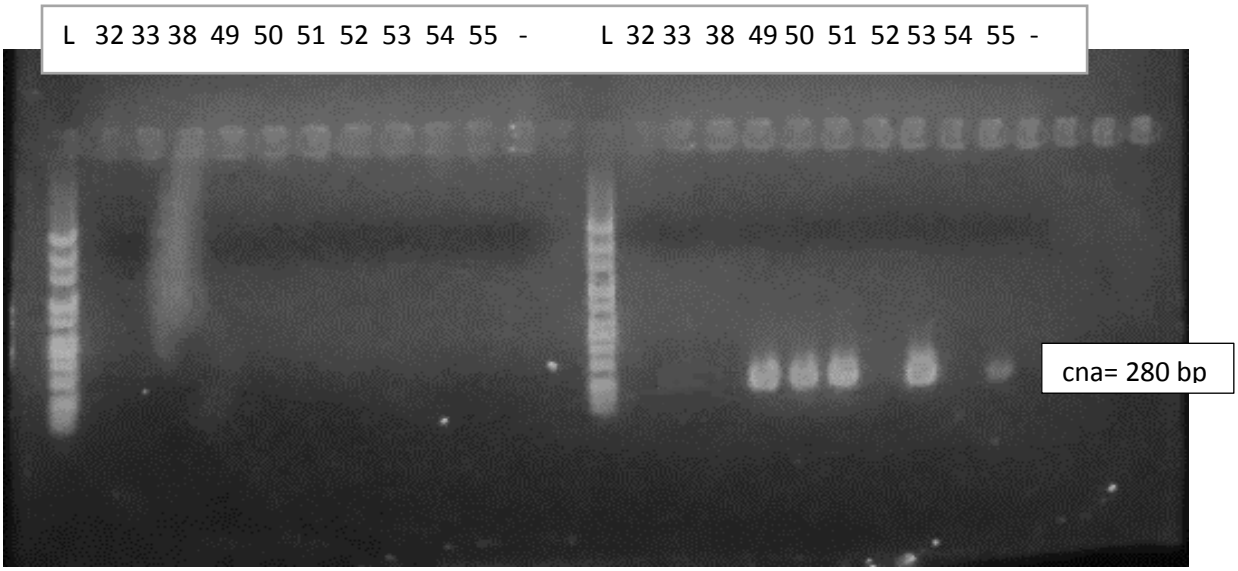

Fig. 10 Electroforegrama ampliconilor obținuți prin PCR pentru gena ce codifică adezina pentru fibronectina (fnbA) (primele 11 godeuri), gena ce codifică adezina pentru colagen (cna) (urmatoarele 11 godeuri) : L- Marker de greutate moleculară GeneRuler 1400 bp (Mid Range DNA Ladder); tulpinile nr. 49; 50; 51; 53; 55 au exprimat gena cna.

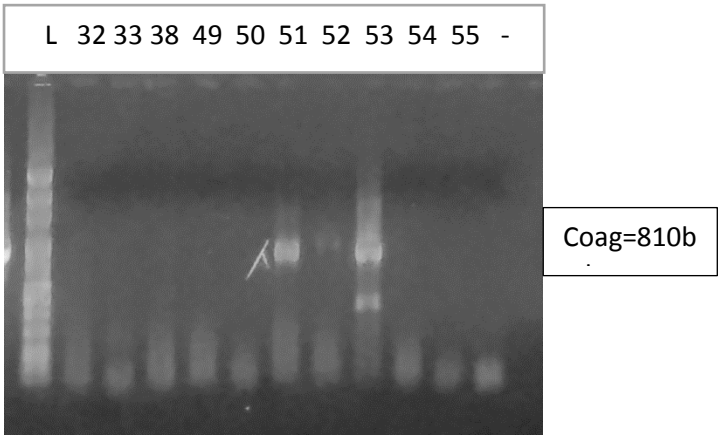

Fig. 11. Electroforegrama ampliconilor obținuți prin PCR pentru gena ce codifică coagulaza (coag) :L- Marker de greutate moleculară GeneRuler 1400 bp (Mid Range DNA Ladder); tulpinile nr. 51 si 53 au exprimat gena coag.

2. ***Ps .aeruginosa***

A fost analizat un număr de n = **18** tulpini de *P. aeruginosa* din care, **38,88%** au prezentat proteaza IV (**TCF/TCR**) (Fig. 19); **22,22%** din tulpinile analizate la nivel genotypic au prezentat exotoxina S (**Exo S**); **16,66%** au evidențiat exotoxina U (**Exo U**) și fosfolipaza C nehemolitică (**PlcN**); **11.11%** din tulpini au prezentat fosfolipaza C hemolitică (**PlcH)** și exotoxina T (**Exo T**) (Fig.12).

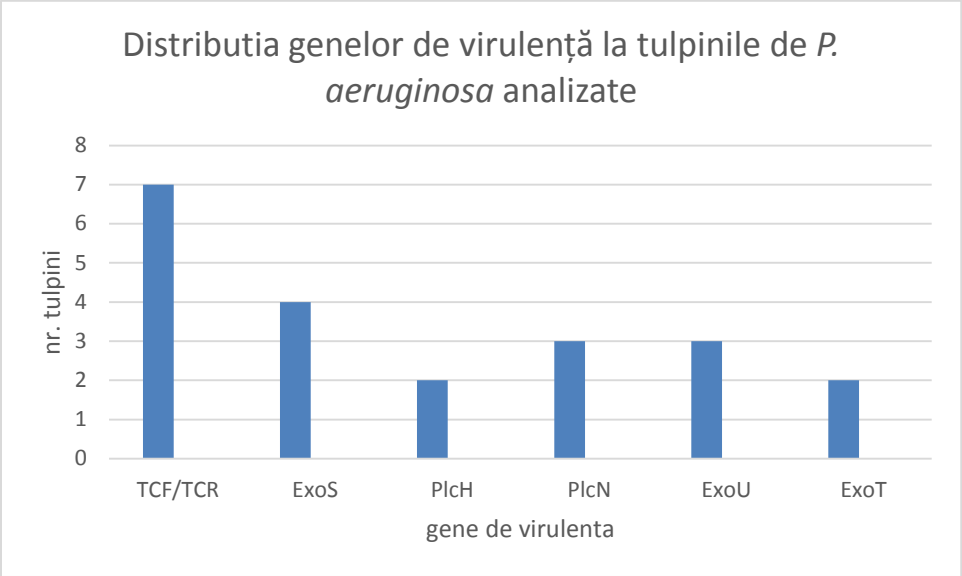

Fig. 12. Distribuția genelor de virulență la tulpinile de *P. aeruginosa* analizate.

Studiul de față a arătat că 16.16% dintre tulpinile de *P. aeruginosa* analizate au prezentat fosfolipaza C nehemolitică (PlcN) și 11,1%, fosfolipaza C hemolitică (PlcH) (Tabelul 1, Fig. 8), în comparație cu alte studii realizate la noi în țară, pe tulpinini nosocomiale de *P. aeruginosa* provenite din secreții de plagă și hemocultură, ce au evidențiat doar fosfolipaza plcH (Holban și colab., 2013). Expresia celor două gene este susținută la nivel fenotipic, aceeași tulpină (36) fiind producătoare de lipază (Tabelul 1).

Tabelul 1. Distributia factorilor de virulenta fenotipici si moleculari la tulpinile de *P. aeruginosa*.

Nr. Crt.	**Cod de laborator**	**Tulpina**	**Marker-i de virulenta** **Factorii de virulenta**														
			TCF \ TCR	***Exo S***	***plcH***	***plcN***	***Exo U***	***Exo T***		***Amil aza***	***Lipa za***	***Lecitin aza***	DN-ase	Esculin aza	Gel atin aza	Hemo lizine α, β	Cazei naza
1	16	*P.aeruginosa-353*	X	X	X	X	X										
2	17	*P.aeruginosa-164*	X	X											X	β	
3	27	*P.aeruginosa-524*														β	X
4	23	*P.aeruginosa-729*														β	X
5	24	*P.aeruginosa-53*	X			X	X						X			β	X
6	22	*P.aeruginosa-425*														β	
7	28	*P.aeruginosa-855*											X			β	
8	36	*P.aeruginosa-1101*	X		X	X	X				X					α	
9	46	*P.aeruginosa-253*												X	X	β	
10	57	*P.aeruginosa-311*												X	X		
11	58	*P.aeruginosa-361/1*	X	X				X						X			
12	59	*P.aeruginosa-262*												X			
13	31	*P.aeruginosa-238*										X				β	
14	40	*P.aeruginosa-649*	X	X				X			X			X		α	
15	44	*P.aeruginosa-428*									X	X				β	
16	45	*P.aeruginosa-296*									X	X				β	
17	25	*P.aeruginosa-940*									X	X	X				
18	26	*P.aeruginosa-31*	X								X	X	X				

Tulpinile analizate au prezentat un procent ridicat al proteazei IV (38.8% din izolate), (Tabelul 1, Fig.12), gena raportată anterior la izolate clinice de *P. aeruginosa* provenite de la pacienți aflați în secțiile de terapie cardiovasculară ai Institutului de Boli Cardiovasculare ,,Prof. CC Iliescu ,, din Bucuresti (Holban și colab., 2013).

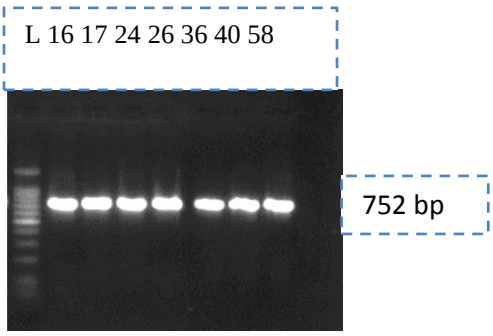

Fig. 13. Electroforegrama ampliconilor obtinuți prin PCR pentru gena ce codifică proteaza IV (TCF/TCR: L- Marker de greutate moleculară GeneRuler 1400 bp (Fermentas); tulpinile nr. 16,17,24,26,36,40,58 – pozitive.

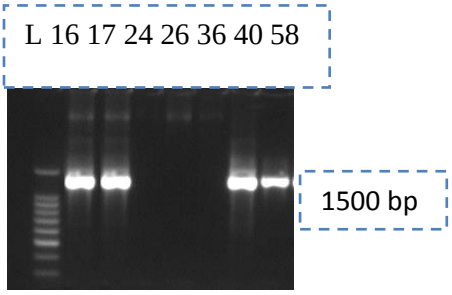

Fig. 14, Electroforegrama ampliconilor obținuți prin PCR pentru gena ce codifică exotoxina S: L- Marker de greutate moleculară GeneRuler 1400 bp (Fermentas); tulpinile nr. 16,17,40,58 – pozitive pentru Exo S

Este demonstrat că exotoxinele ExoS, ExoY si ExoT inhibă invazia celulară, în timp ce exotoxina ExoU conferă citotoxicitate (Feltmann și colab., 2001). ExoT și ExoS alterează funcția citoscheletului și căile de semnalizare celulară (Krall, 2000). Prezența concomitentă a exotoxinelor ExoU și ExoS a fost evidentiată la o tulpină de *P. aeruginosa* analizată (tulpina codificată nr. 16) (Tabelul 1).

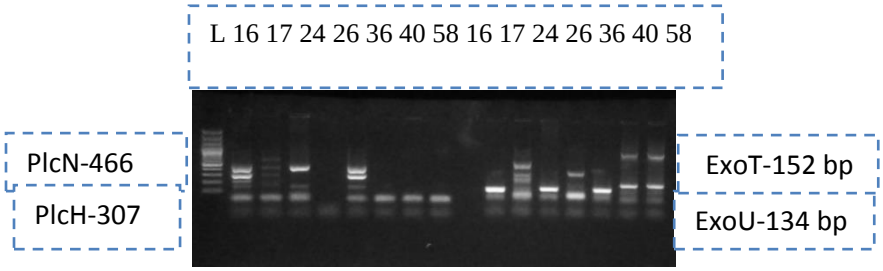

Fig. 15. Electroforegrama ampliconilor obținuți prin PCR pentru gena ce codifică fosfolipaze și exotoxinele U și T: L- Marker de greutate moleculară GeneRuler 1400 bp (Fermentas); tulpinile nr. 16, 36 – pozitive pentru fosfolipaza hemolitică (PlcH); tulpinile nr. 16, 24, 36 – pozitive pentru fosfolipaza nehemolitică (PlcN); tulpinile nr.16, 24, 36 – pozitive pentru exotoxina U (Exo U), iar tulpinile nr.40 și 58 sunt pozitive pentru exotoxina T (Exo T).

CONCLUZII

1. Tulpinile de ***S.aureus*** izolate din diferite surse clinice au exprimat în proporție foarte mare gena ce codifică pentru sinteza proteinei de legare a colagenului (adezina **cna**)- implicată în infecțiile musculo-scheletice, urmată de gena ce codifică sinteza de receptine asociate suprafeței celulei bacteriene, **ClfA, ClfB** ce mediază legarea *S.aureus* la fibrinogen.
2. Deși apartenența la specia *aureus* a tulpinilor de *Staphylococccus* este confirmată prin testul producerii coagulazei, cu rol în formarea cheagului de fibrină, ducând la coagularea plasmei, cu rol în invazie și evitarea efectorilor sistemului imunitar, tulpinile analizate au prezentat în mică măsură gena ce codifică pentru sinteza coagulazei (**coag**).
3. Tulpinile de ***Ps. aeruginosa*** izolate din diferite surse clinice au prezentat, în proporție mai mare, genele ce codifică pentru sinteza **proteazei IV (TCF/TCR)** cu rol în adeziunea bacteriană și favorizarea colonizării inițiale a țesuturilor, urmate de gene ce codifică pentru sinteza **exotoxinei S**-implicată în inducerea leziunilor tisulare și în diseminarea bacteriană.
4. Genele care codifică pentru sinteza **fosfolipaza C nehemolitică (plcN) și exotoxina U (Exo U), fosfolipaza C hemolitică (plcH)** și **exotoxina T (Exo T),** cu rol în distrugerea hematiilor și a țesuturilor infectate, au fost exprimate în proporție mai mică.

CAPITOLUL IV: INVESTIGAREA ASPECTELOR DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICELE β-LACTAMICE LA TULPINI NOSOCOMIALE DE *S. AUREUS* ȘI *PS. AERUGINOSA*

OBIECTIVUL 1. EVIDENȚIEREA GENOTIPICĂ A MARKERILOR DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICELE β-LACTAMICE LA TULPINI NOSOCOMIALE DE *S. AUREUS* ȘI *PS. AERUGINOSA*

MATERIALE ȘI METODE

Tulpini bacteriene

După testarea fenotipică a rezistenței la β-lactamice, prin metoda VITEK-2, au fost selectate și analizate un număr de 10 de tulpini de *S. aureus* cu fenotip MRSA și 18 tulpini de *Ps. aeruginosa* multirezistente, izolate în anul 2014 de la pacienţi spitalizaţi în *Institutul de Boli Cardiovasculare "Prof. Dr. C.C. ILIESCU*"din București. Tulpinile de *S. aureus* au fost izolate din diverse surse clinice, majoritatea (90%) provenind din secreţii de plagă și doar 10%, din hemoculturi venoase. In ceea ce privește sursele de izolare ale tulpinilor de *P. aeruginosa* s-a constatat că majoritatea tulpinilor au provenit din secreție plagă (66,66%), 22,22% din tulpinile analizate au provenit din secreție traheală, iar câte 5,5% din tulpini au provenit din hemoculturi venoase și coproculturi.

Caracterizarea genotipică a tipurilor de casete SCC*mec* prezente la tulpinile de *S. aureus* izolate s-a realizat folosindu-se metoda PCR (*simplex* şi *multiplex*) pentru identificarea mai multor gene, în vederea elucidării structurii acestor elemente genetice şi obţinerea unor date relevante din punctul de vedere epidemiologic.

S-au efectuat două reacţii *multiplex* PCR folosindu-se cinci, respectiv patru perechi de primeri specifici pentru diferite secvenţe de la nivelul casetelor SCC*mec*, în vederea detectării simultane a unor elemente constitutive necesare clasificării acestora. Secvenţele primeri-lor utilizaţi precum şi parametrii de desfăşurare ai reacţiilor au urmărit protocolul elaborat de Miheirico şi colab. (2007).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

1. *S.aureus*

Tulpinile de *S. aureus* au fost izolate de la pacienţi spitalizaţi cu diferite afecţiuni cardiovasculare, din diferite surse clinice, majoritatea provenind din secreţii de plagă. Utilizarea metodei PCR (*multiplex* şi *simplex)* a urmărit evidenţierea unor gene şi regiuni specifice prezente la nivelul elementelor SCC*mec* în vederea clasificării şi caracterizării acestora.

Rezultatele experimentelor PCR privind investigarea rezistenței la meticilină, au aratat că **29%** din tulpini (49,53,52,54) au prezentat gena **mecI**; câte **21,5%** din izolate au prezentat gena **CIF2** (49,53,54) și gena **ccrC** (49,52,32), urmată de genele **ccrB2** (tulpinile 50,52) și **SCCmecVJ** (tulpinile 51,55),(câte **14%** din tulpini), rezultate redate în Figurile nr. 16, 17, 18 și 19.

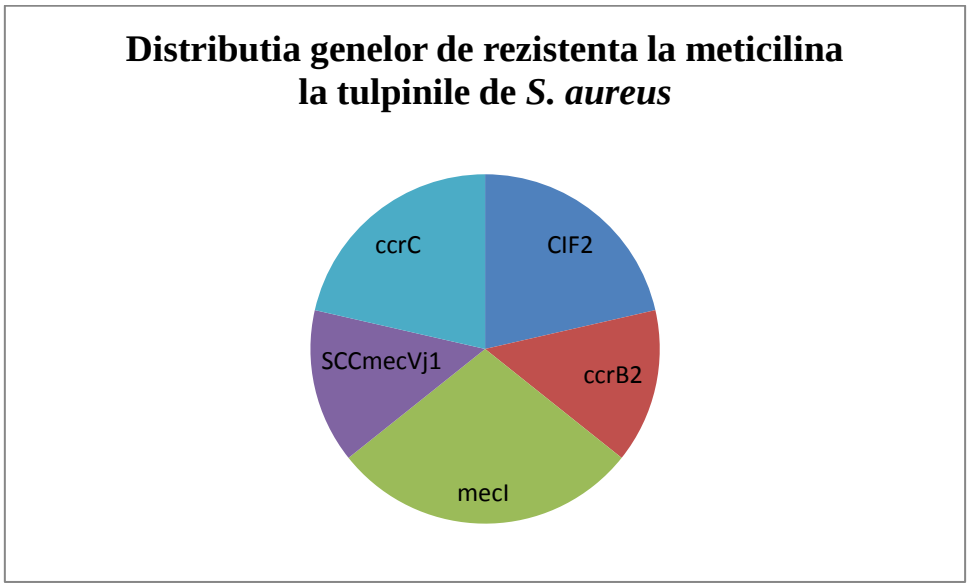

Fig. 16. Distributia genelor de rezistenta la meticilina la tulpinile *S. aureus* analizate.

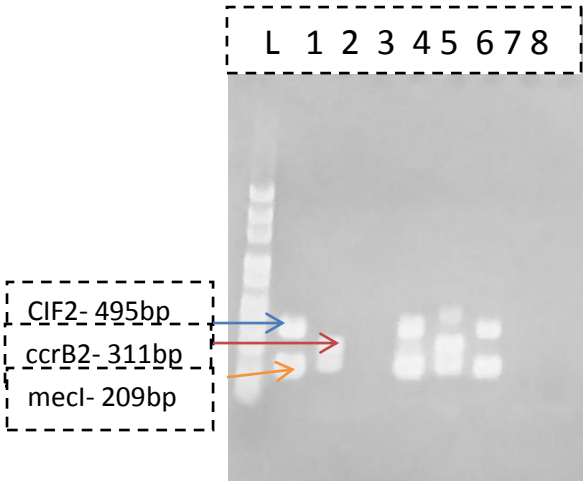

Fig. 17. . Electroforegrama ampliconilor obținuți prin PCR pentru genele CIF2, ccrB2, mecI, mecA si RIF5: L- Marker de greutate moleculară GeneRuler 1400 bp (Mid Range DNA Ladder); tulpinile nr. 1(49), 4(53), 6(54) au exprimat gena CIF2 ; tulpinile nr. 2(50) ;5(52) au exprimat gena ccrB2, iar tulpinile nr. 1(49) ; 4(53) ; 5(52) ; 6(54) au prezentat gena mecI.

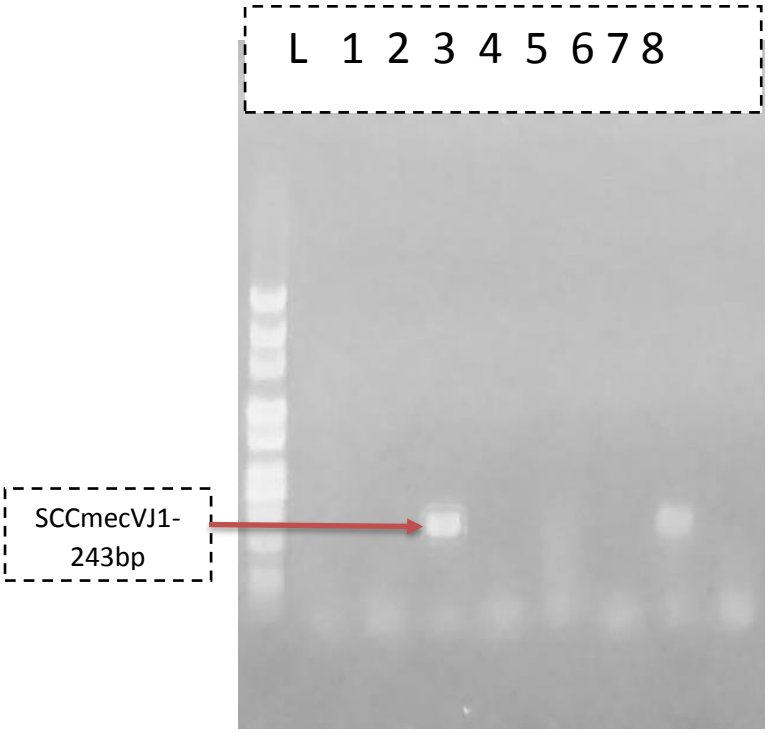

Fig. 18. Electroforegrama ampliconilor obținuți prin PCR pentru genele SCCmecVJ1, dcs, kdp, SCCmecIIIJ1 : L- Marker de greutate moleculară GeneRuler 1400 bp (Mid Range DNA Ladder); tulpinile nr. 3(51), 7(55) au exprimat gena SCCmecVJ1.

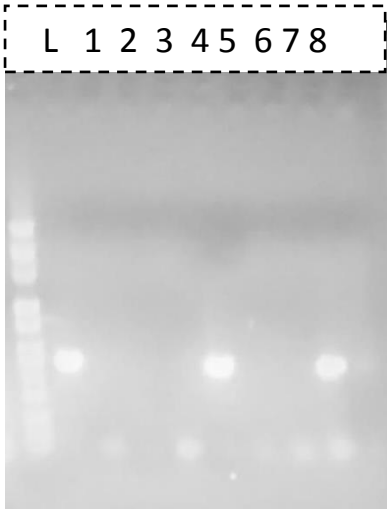

Fig. 19. Electroforegrama ampliconilor obținuți prin PCR pentru genele ccrC : L- Marker de greutate moleculară GeneRuler 1400 bp (Mid Range DNA Ladder); tulpinile nr. 1(49), 5(52), 8(32) au exprimat gena ccrC.

Rezultatele testelor PCR obţinute folosind perechi primeri cu specificitate pentru diferite elemente ale casetelor SCC*mec*, atât din regiuni codificatoare, cât şi din regiuni necodificatoare, a permis tiparea unui număr de 8 tulpini de *S. aureus*, restul fiind non-tipabile prin metodele utilzate.

Rezultatele obţinute cu ajutorul metodei propuse de Zhang şi colab. (2005), confirmă apartenenţa la casetele SCC*mec*. Se remarcă, prezenţa genei *ccrC* (specifică *SCCmec* V) la 21,5% din tulpini, prezenţa a 2 tulpini care conţine atât gena *ccrB2* (specifică SCC*mec* II şi IV) cât şi gena *ccrC* ceea ce indică posibilitatea prezenţei casetei SCC_{Hg}, alături de SCC*mec* III, integrate în tandem la nivelul cromosomului bacterian.

Analiza *pattern*-urilor de rezistenta fenotipica a aratat ca 80% din tulpinile analizate au prezentat fenotip MRSA asociat cu MLSBi, fapt care confirma incidenta tot mai ridicată a tulpinilor multirezistente de *S. aureus*. Incidența ridicată a fenotipului MLSBi la tulpini MSRA a fost, de asemenea, raportată la noi în țară într-un studiu cu tulpini nosocomiale provenite de la pacienți spitalizați în Brașov în perioada 2004-2005, de către Ionescu și colab., în 2010.

Studiul genotipic al rezistenței la meticilină a demonstrat că 40% din tulpinile de *S.aureus* au prezentat gena mecI; 30 % au evidentiat gena CIF2 și gena ccrC. In ceea ce privește distribuția casetelor SCCmec la tulpinile de *S. aureus* s-a constatat că 20% din tulpini au exprimat gena SCCmecVJ1 (Tabelul 2). Tulpinile 49(1) și 52(5) de *S. aureus* provenite din

secreție plagă, au exprimat alături de genele de rezistență ccrC și mec 1, și gene de virulență - clfA, clfB ,iar cna -doar 49, precum și următorii factori de virulență - gelatinază, lecitinază și hemolizine-β, ceea ce demonstrează capacitatea ridicată de invazivitate, agresivitate și rezistență a acestora.

Tabelul 2. Distribuția genelor de rezistență la meticilină, a genelor de virulență și a factorilor de virulență solubili la tulpinile de *S. aureus* analizate.

Tulpini bacteriene	**Casete SCCmec**						**Gene de virulență**				**Factori de Virulență solubili**					
	ccr B2	***mec I***	***mec A***	***CI F2***	***ccr C***	***SCCmec VJ1***	***cna***	***clf A***	***clfB***	***coag***	DN-ase	Aesculin hydrolysis	Gelatinase	β type haemolysis	Lecithinase	Caseinase
S.a. 1(49) MRSA/MLSBi		X		X	X		X	X	X				X	X	X	
S.a. 2(50) MRSA/MLSBi	X						X						X	X	X	
S.a.3(51) MRSA/MLSBi						X	X	X	X	X			X	X	X	
S.a.4(53) MRSA/MLSBi		X		X			X	X	X	X			X		X	
S.a.5(52) MRSA/MLSBi	X	X			X			X	X				X	X	X	
S.a.6(54) MRSA/MLSBi		X		X									X	X	X	
S.a.7(55) MRSA/MLSBi						X	X							X	X	
S.a.8(32) MRSA/MLSBi					X						X					
S.a.9(33)												X				
S.a.10(38)																X

Tulpina nr.53 prezintă, pe lângă genele de virulență cna, clfA, clfB, coag și urmatoarele gene de rezistență la β-lactamice- mec1 și CIF2, alături de factorii de virulență gelatinază și lecitinază, iar tulpina nr.51, prezintă doar gena de rezistență SCCmec VJ1, alături de aceleași gene de virulență (Fig. 8, Tabelul 2). Nici una dintre tulpinile de *S. aureus* analizate nu au exprimat gene ce codifică proteine de legare a elastinei, fibronectinei și sialoproteinei.

2. *Ps. aeruginosa*

La tulpinile de *Ps. aeruginosa* screening-ul genotipic al rezistenței la carbapeneme a demonstrat prezența genei bla_{IMP} (*Imipenemase*) la 22,22% din tulpinile analizate (Fig. 20). Enzimele de tip **IMP** descrise în urma cu 34 de ani (Cornaglia și colab., 2011) în Japonia s-au răspândit rapid la nivel mondial atât la reprezentanți ai familiei *Enterobacteriaceae* cât și la non-*Enterobacteriaceaea* (*P. aeruginosa*). Până în prezent au fost descrise 20 varinate ale genei bla_{IMP} (Cornaglia și colab., 2011), gena fiind raportată și în Romania, în 2007 (Cernat și colab.) cu varianta IMP-1 la izolate de *A. baumannii* provenite de la pacienți ai Institutului de Cardiologie din București izolate în perioada 2003-2006 ; iar în 2013 la izolate clinice de *P. aeruginosa* de la pacienți proveniți din cinci spitale din Iași (Mereuță și colab., 2013) cu varianta IMP-13.

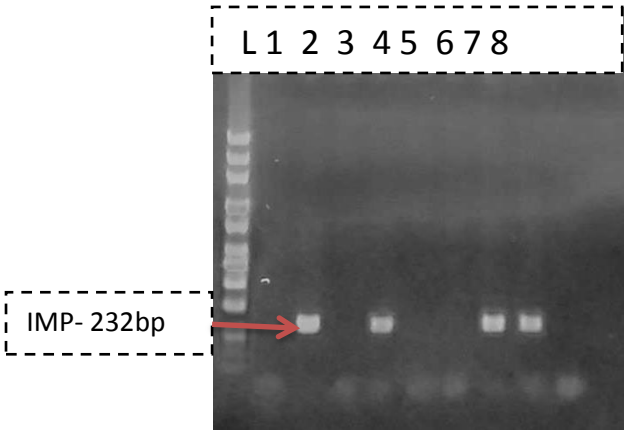

Fig. 20. Electroforegrama ampliconilor obținuți prin PCR pentru genele$bla_{VIMlike}$ si $bla_{IMPlike}$: L- Marker de greutate moleculară GeneRuler 1400 bp (Mid Range DNA Ladder); tulpinile nr. 2(17), 4(23), 7(28), 8(36) au exprimat gena $bla_{IMPlike}$

Studiul genotipic al rezistenței la antibiotice β-lactamice a mai evidențiat prezența BLSE $bla_{TEMlike}$ la 5,55% din tulpinile de *P. aeruginosa* analizate (Fig. 21). În prezent se cunosc 196 variante ale genei $bla_{TEMlike}$ (Poirel și colab., 2012), majoritatea fiind determinante de fenotipuri BLSE (http://www.lahey.org./studies) și clasificate în patru grupe după caracteristicile biochimice (Poirel și colab., 2012): β-lactamaze de spectru larg (ex. TEM-1) ce hidrolizează penicilinele și cefalosporinele de primă generație; β-lactamaze TEM rezistente la inhibitori (prezintă spectru similar de hidroliză cu prima categorie însă nu sunt inhibate de acidul clavulanic, (Salverda și colab., 2010); BLSE TEM ce hidrolizează penicilinele,

cefalosporinele, inclusiv ceftazidimul și cefoxitimul (Robin și colab., 2007); β-lactamaze TEM de spectru extins ce hidrolizează cefalosporinele și inhibitorii (Partridge, 2011).

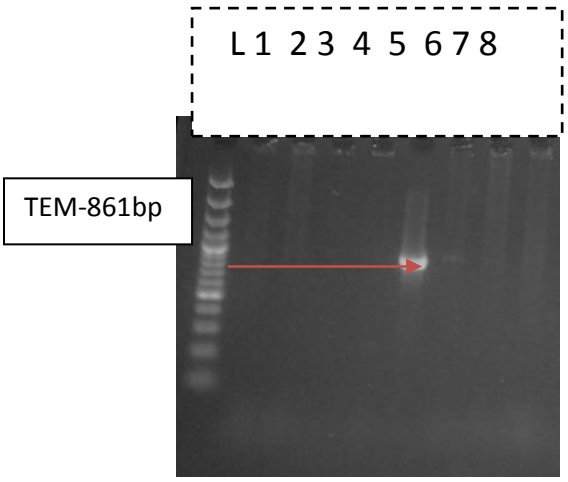

Fig. 21. Electroforegrama ampliconilor obținuți prin PCR pentru gena $bla_{TEMlike}$: L- Marker de greutate moleculară GeneRuler 1400 bp (Mid Range DNA Ladder); tulpina nr. 6(22) a exprimat gena $bla_{TEM.}$

CONCLUZII

1. Studiul realizat pe tulpinile de coci gram pozitivi, bacili gram negativi şi pe tulpini levurice, izolate din diferite infecţii din mediul spitalicesc, a condus la stabilirea profilurilor fenotipice şi genetice ale factorilor de virulenţă solubili, cât şi la cea a profilurilor de rezistenţă la antibioticele β-lactamice la tulpini de coci gram pozitivi şi bacili gram negativi aparţinând unor specii de importanţă medicală.
2. Prezenţa genelor ce codifică sinteza factorilor enzimatici de natură proteică analizată la tulpinile luate în studiu a dovedit existenţa potenţialului de invazie şi toxicitate al acestora.
3. Apariţia tulpinilor MRSA asociate infecţiilor comunitare face cu atât mai importantă înţlegerea bazelor genetice ale fenotipului MRSA, cât şi pe cele ale mecanismelor de transmitere orizontală,intra şi inter-specii a elementelor genetice responsabile de aceste aspecte.
4. Casetele cromozomale stafilococice SCCmec sunt elemente genetice purtătoare ale unor determinanţi de rezistenţă atât la antibioticele β-lactamice, cât şi la alte clase de substanţe cu efect antimicrobian.
5. Tulpinile bacteriene analizate se remarcă prin heterogenitetea structurală a casetelor SCCmec, fiind clasificate în categoria casetelor SCCmec tip II, III şi I, ceea din urmă categorie, deşi pâna nu de mult considerată caracteristică tulpinior stafilococice de origine comunitară, a apărut în prezent, din ce în ce mai des raportată ca prezentă, în contexte clinice.
6. Studiul de faţă a demonstrat prezenţa metalo-β-lactamazei IMP la 22,22% din tulpinile de *Ps.aeruginosa* (tuplini rezistente la imipenem) ceea ce limitează, în asemenea cazuri, obţiunile terapeutice doar la colistin, impunând măsuri de prevenire atât ainfecţiilor nosocomiale,c ât şi a transferului orizontal al acestor bacterii.

CONCLUZII GENERALE

1. **1.**Deşi aproximativ 25% din populația sănătoasă a globului este purtătoare permanentă sau intermitentă de *S.aureus* de-a lungul vieții, tulpinile acestei specii sunt responsabile de un număr semnificativ de infecții cu grade diferite de severitate
2. În contextul emergenței unui număr semnificativ de tulpini stafilococice multirezistene la antibiotice, printre care domină tulpinile MRSA, înțelegerea mecanismelor responsabile de acest tip de rezistență devine esențială.
3. **3.**Prezentul studiu a demonstrat că tulpinile bacteriene izolate din infecții nosocomiale au prezentat niveluri înalte de rezistență la antibioticele β-lactamice,mediate atât enzimatic de către β-lactamaze de diferite tipuri, dar și ne-enzimatic, prin modificarea țintei antibioticelor β-lactamice. Această acumulare de diferite mecanisme de antibiorezistență poate explica (conduce la) apariția unor infecții severe ce evoluează cu complicații, cu dificultăți de eradicare a infecției,având drept consecință persistența tulpinilor producătoare de β-lactamaze în mediul spitalicesc.
4. Prezentul studiu demonstrează necesitatea monitorizării fenomenului de antibiorezistență, fenomen comparabil cu procesul de "microspeciație", cu influiență asupra proprietății de "fitness" a agenților infecțioși oportuniști, capabili să determine infecții severe la pacienții imunocompromiși.

LUCRARI PUBLICATE PE PARCURSUL ELABORARII TEZEI

Articole ISI

1. Merezeanu Nicoleta[#], Irina Gheorghe [#,] Mariana Carmen Chifiriuc, Pântea Octav, Veronica Lazăr, Otilia Banu, Alexandra Bolocan, Raluca Grigore, Șerban Vifor Bertești eanu. 2016. Phenotypic and genotypic investigation of resistance and virulence features of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospitalized patients . Romanian Biotecnological Letters. Acceptat spre Publicare.

2. Merezeanu Nicoleta[#], Marcela Popa, Mariana Carmen Chifiriuc, Pântea Octav, Veronica Lazăr, Otilia Banu, Alexandra Bolocan, Raluca Grigore, Șerban Vifor Bertești eanu. 2016. Virulence and resistance features of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cardiovascular diseases. Biointerface Research in Applied Chemistry. Acceptat spre publicare.

Alte articole
Participari la conferinte:
5-7 noiembrie,2015 "ZILELE MEDICALE PRAHOVENE",
Ch.Hagianu Nicoleta , 2015 , Evidențierea profilurilor de exotoxine și exoenzime implicate în virulența diferitelor specii microbiene

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Chifiriuc M.C., Mihăescu G., Lazăr V. 2011. *Microbiologie și virologie medicală*. Editura Universității din București. pp. 747.
2. Vassu T., Csutak O., Stoica I., Mușat F. 2001. *Genetica microorganismelor și inginerie genetică microbiană*. Editura Petrion. București.
3. Holban A.M., Chifiriuc M.C., Cotar A.I., Bleotu C., Grumezescu A.M., Banu O., Lazar V. 2013.Virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitalacquired infections occurred in patients with underlying cardiovasculardisease. Rom Biotechnol Letters., **18**. 8843-8854.
4. Feltman H., Schulert G., Khan S., Jain M., Peterson L., Hauser A.R. 2001. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol*. **147**. 2659-2669..
5. Krall R.G., Schmidt K.A., Barbierij T.2000. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPaseactivating protein. *InfectImmun.***68**. 6066-6068.
6. Wang L.X., Hu Z.D., Hu Y.M., Tian B., LI J., Wang F.X., Yang H., Xu H.R., Li Y.C., Li J. 2013. Molecular analysis and frequency of *Staphylococcus aureus* virulence genes isolated from bloodstream infections in a teaching hospital in Tianjin, China, Genet. Mol. Res.. **12**:646-654.
7. Miheirico, C., Oliveira, D.C., de Lencastre, H. 2007b. Multiplex PCR strategy for subtyping the stapyhlococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, J Antimicrob. Chemother, 60:42-28.
8. Ionescu R., Mediavilla J.R., Chen L., Grigorescu D.O., Idomir M., et al. 2010. Molecular characterization and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* from a multidisciplinary hospital in Romania. Microb Drug Resist. **16**: 263–272.
9. Cornaglia G., Giamarellou H., Rossolini G.M. 2011. *Metallo-β-lactamases: a last frontier for β-lactams*? Lancet Infect Dis. **11**:381-93.
10. Mereuță A.I., Bădescu A.C., Dorneanu O.S., Iancu L.S., Tuchiluș C.G. 2013. *Spread of VIM-2 metallo-beta-lactamase in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii clinical isolates from Iași, România*. Revista Română de Medicină de Laborator. **21**(4): 389-396.
11. Poirel L., Bonnin R., Nordmann P. 2012. *Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β-lactamases in Gram negative rods*. Infection, Genetics and Evolution. **12**: 883-893.
12. Partidge S.R., Tsafnat G., Coiera E., Iredell R. 2009. *Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons.* FEMS Microbiol Rev. **33**: 757-784.