



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII  
AL REPUBLICII MOLDOVA



**ANSP**  
AGENȚIA NAȚIONALĂ  
PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ



UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ  
ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU”  
DIN REPUBLICA MOLDOVA

# GHID

## DETECTAREA MECANISMELOR DE REZISTENȚĂ LA ANTIMICROBIENE, INTERPRETAREA ȘI APLICAREA CLINICĂ A REZULTATELOR





MINISTERUL SĂNĂTĂȚII  
AL REPUBLICII MOLDOVA



**ANSP**  
AGENCIA NAȚIONALĂ  
PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ



UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ  
ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU”  
DIN REPUBLICA MOLDOVA

# GHID

**DETECTAREA MECANISMELOR  
DE REZISTENȚĂ LA ANTIMICROBIENE,  
INTERPRETAREA ȘI APLICAREA CLINICĂ  
A REZULTATELOR**

Aprobat la ședința Consiliului de Experți al Ministerului Sănătății al Republicii Moldova din 19.12.2023, proces verbal nr. 3.

Aprobat prin Ordinul Ministerului Sănătății al Republicii Moldova nr. 1239 din 29.12.2023, cu privire la aprobarea Ghidului „Detectarea mecanismelor de rezistență la antimicrobiene, interpretarea și aplicarea clinică a rezultatelor”.

**Colectivul de autori:**

*Olga Burduniuc,* dr. hab. șt. med., conf. cercet., Agenția Națională pentru Sănătate Publică  
*Greta Bălan,* dr. hab. șt. med., conf. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”  
*Tiberiu Holban,* dr. hab. șt. med., prof. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”  
*Gheorghe Plăcintă,* dr. hab. șt. med., conf. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”  
*Olga Sofronie,* asistent universitar, USMF „Nicolae Testemițanu”  
*Livia Țapu,* cercetător științific stagiar, Agenția Națională pentru Sănătate Publică  
*Maria Anton,* cercetător științific stagiar, Agenția Națională pentru Sănătate Publică

**Recenzenți:**

*Valeriu Rudic,* dr. hab. șt. biol., prof. univ., academician, USMF „Nicolae Testemițanu”  
*Lilia Cojuhari,* dr. șt. med., conf. univ., USMF „Nicolae Testemițanu”

**Ghidul a fost examinat, avizat și aprobat de:**

Structura/instituția	Prenume, nume, funcția
Consiliul științific al Agenției Naționale pentru Sănătate Publică	<i>Nicolae Jelamschi,</i> dr. șt. med., master în sănătate publică, președinte
Comisia științifico-metodică de profil „Medicină comunitară” a USMF „Nicolae Testemițanu”	<i>Gheorghe Plăcintă,</i> dr. hab. șt. med., conf. univ., președinte
Catedra de medicină de laborator, USMF „Nicolae Testemițanu”	<i>Anatolie Vișnevschi,</i> dr. hab. șt. med., prof. univ., șef catedră
Catedra de medicină de familie, USMF „Nicolae Testemițanu”	<i>Ghenadie Curocichin,</i> dr. hab. șt. med., prof. univ., șef catedră
Catedra de farmacologie și farmacologie clinică, USMF „Nicolae Testemițanu”	<i>Nicolae Bacinschi,</i> dr. hab. șt. med., prof. univ., șef catedră
Agenția Medicamentului și Dispozitivelor Medicale	<i>Dragoș Guțu,</i> director general
Compania Națională de Asigurări în Medicină	<i>Ion Dodon,</i> director general
Consiliul de Experți al Ministerului Sănătății	<i>Aurel Grosu,</i> dr. hab. șt. med., prof. univ., președinte

Acest ghid a fost elaborat în cadrul proiectului de cercetare 20.80009.8007.09 „Studierea rezistenței bacililor gramnegativi la antimicrobiene în vederea fortificării sistemului național de supraveghere și control al bolilor transmisibile”.

Tipar:

**DESCRIEREA CIP A CAMEREI NAȚIONALE A CĂRȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA**

Tiraj – ex.

ISBN

# CUPRINS

Lista abrevierilor .....	5
Scopul, obiective, utilizatori .....	6
I. Introducere – Prezentarea mecanismelor de rezistență prezente la microorganismele prioritare .....	7
1.1. Beta lactamaze cu spectru extins (extended-spectrum $\beta$ -lactamase – BLSE) produse de <i>Enterobacteriaceae</i> .....	7
1.2. <i>Enterobacterales</i> producătoare de carbapenemaze .....	11
1.3. <i>Salmonella</i> spp. rezistentă la fluorochinolone .....	12
1.4. <i>Staphylococcus aureus</i> rezistent la meticilinum (MRSA) .....	12
1.5. <i>Enterococcus faecium</i> și <i>Enterococcus faecalis</i> rezistent la vancomycinum .....	15
1.6. <i>Streptococcus pneumoniae</i> non-sensibil la penicilinum .....	16
II. Testarea sensibilității la antibiotice .....	17
III. Detectarea mecanismelor de rezistență prin metode fenotipice .....	24
3.1. Metode recomandate pentru detectarea carbapenemazelor la <i>Enterobacterales</i> .....	24
3.2. Metode de detecție a BLSE la <i>Enterobacteriaceae</i> .....	26
3.2.1. Screening-ul BLSE pentru <i>Enterobacteriaceae</i> .....	27
3.2.2. Metode fenotipice de confirmare .....	28
3.2.3. Considerații speciale în interpretare .....	30
3.2.4. MALDI-TOF MS .....	32
3.2.5. Confirmarea mecansimelor prin tehnici de biologie moleculară .....	33
3.2.6. Metode bazate pe cultură .....	35
3.3. <i>Enterobacterales</i> producătoare de AmpC $\beta$ -lactamază .....	36
3.4. Rezistența speciilor de <i>Salmonella</i> la fluorochinolone .....	37
IV. Metode de confirmare a <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino-rezistent .....	38
V. Metode de determinare a rezistenței la vancomycinum pentru <i>Enterococcus faecium</i> și <i>Enterococcus faecalis</i> .....	41
VI. Metode de determinare a <i>Streptococcus pneumoniae</i> non-sensibil la penicilinum .....	43
VII. Fenotipuri preconizate .....	45
VIII. Asigurarea controlului calității (CC) în testarea sensibilității la antimicrobiene .....	47
Referințe bibliografice .....	52
Anexe .....	53



# LISTA ABREVIERILOR

<b>ADN</b>	Acidul dezoxiribonucleic
<b>AMS</b>	Asistența medicală spitalicească
<b>AMSA</b>	Asistență medicală specializată de ambulatoriu
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BCT</b>	Testul Blue-Carba
<b>BGN</b>	Bacili Gramnegativi
<b>BLSE</b>	Extended spectrum beta-lactamase
<b>BORSA</b>	Borderline Oxacillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>CDT</b>	Test disc combinat
<b>CFI</b>	Concentrație minimă inhibitorie
<b>CTX-M</b>	Active on Cefotaximum, First Isolated at Munich
<b>DDST</b>	Test de sinergie dublu disc
<b>ECOFF</b>	Epidemiological cut-off value
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing/ Comitetul European pentru Testarea Sensibilitatii la Antimicrobiene
<b>GES</b>	Guyana ESBLs
<b>HLAR</b>	High-level aminoglycoside resistance/Nivel înalt de rezistență la aminoglicozide
<b>hVISA</b>	<i>S. aureus</i> heterogen intermediar la vancomycinum
<b>IBC</b>	Integron – Borne Cephalosporinase
<b>IMI</b>	Imipenemaza
<b>IMP</b>	Active on Imipenem, first carbapenemase
<b>KPC</b>	<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase
<b>MALDI-TOF MS</b>	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry/ Spectrometrie de masa MALDI-TOF
<b>MRSA</b>	Meticillin resistant <i>S. aureus</i> / <i>S. aureus</i> rezistent la meticillinum
<b>NDM</b>	New Delhi metallo-beta-lactamase
<b>NMC</b>	Non-metallo carbapenemaza
<b>OMS</b>	Organizația Mondială a Sănătății
<b>OXA</b>	Oxacillinase (hydrolyze oxacillin)
<b>PBP</b>	Penicillin-binding protein
<b>PCC</b>	Plan Control Calitate
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction/Reacția de polimerizare în lanț
<b>PER</b>	<i>Pseudomonas</i> Extended Resistant
<b>POS</b>	Procedură Operațională Standard
<b>RAM</b>	Rezistența la antimicrobiene
<b>SCN</b>	Stafilococii coagulazo-negativi
<b>SGB</b>	Streptococul de grup B
<b>SHV</b>	Sulphydryl Reagent Variable
<b>SFO</b>	<i>Serratia fonticola</i> resistant to carbapenems/ <i>Serratia fonticola</i> rezistentă la carbapenemaze
<b>TEM</b>	Named after patient Temoniera
<b>TSA</b>	Testarea sensibilității la antimicrobiene
<b>UFC</b>	Unități formatoare de colonii
<b>VEB</b>	Vietnam ESBLs
<b>VIM</b>	Verona Integron metallo-beta-lactamase
<b>VISA</b>	<i>S. aureus</i> intermediar la vancomycinum
<b>VRE</b>	Vancomycin resistant enterococci/Enterococi rezistenți la vancomycinum
<b>VRSA</b>	Vancomycin-resistant <i>S. aureus</i> / <i>S. aureus</i> rezistent la vancomycinum

## Scopul, obiective, utilizatori

**Scopul ghidului** este de a standardiza metodele de rutină pentru testarea sensibilității la antimicrobiene și metodele de detecție a mecanismelor de rezistență la microorganismele izolate din biosubstratele clinice, a produse și probe de origine animalieră și elemente de mediu, interpretarea și raportarea rezultatelor pentru îmbunătățirea managementului pacienților cu maladii transmisibile și spreavegherea integrată a rezistenței la antimicrobiene prin prisma conceptului. „O singură sănătate.

### Obiectivele ghidului:

- Descrie metodele de rutină pentru testarea sensibilității la antibiotice a bacteriilor izolate în mod uzual în laboratoarele clinice;
- Prezintă metodele de detecție a mecanismelor de rezistență;
- Recomandări pentru asigurarea calității testării sensibilității la antimicrobiene;
- Aplicarea clinică a rezultatelor și ghidarea medicilor clinicieni în opțiunile de tratament.

Metoda de testare recomandată prin acest ghid național este metoda difuzimetrică EUCAST (*eng. EUCAST disk diffusion method*). Pentru tehnica referitor la metoda microdiluțiilor, metoda gradient și unele aspecte de interpretare se vor urma indicațiile din insertul testelor comerciale utilizate.

Ghidul este destinat specialiștilor de laborator din sectorul uman și veterinar, medicilor clinicieni din asistența medicală primară, specializată și de staționar, specialiștilor în prevenirea și controlul infecțiilor cauzate de microorganisme rezistente la antimicrobiene.

### Utilizatorii ghidului sunt:

- Prestatorii de servicii de AMSA (specialiști de laborator, medicii din instituțiile/secțiile consultative);
- Prestatorii de servicii de AMS (secțiile de boli infecțioase, reanimare și de terapie intensivă ale spitalelor raionale/municipale, spitalele de boli contagioase, specialiștii în prevenirea și controlul infecțiilor cauzate de microorganisme rezistente la antimicrobiene.

**Notă:** Ghidul la necesitate poate fi utilizat și de alți specialiști, inclusiv în procesul didactic în formarea studenților, medicilor rezidenți și în educația medicală continuă a medicilor și personalului medical cu studii medii.

Totodată, va servi ca suport metodologic laboratoarelor din sectorul uman și veterinar, în implementarea, validarea și pregătirea documentației pentru acreditare.



#### 1.1. Beta lactamaze cu spectru extins (extended-spectrum $\beta$ -lactamaze – BLSE) produse de *Enterobacteriaceae*

**Definiție.** BLSE sunt enzime care hidrolizează majoritatea penicilinelor și cefalosporinelor, inclusiv compușii oxyimino- $\beta$ -lactamici (cefuroximum, cefalosporine din a treia și a patra generație, plus aztreonamum\*), dar nu cefamicinele și carbapenemele.

BLSE sunt definite ca  $\beta$ -lactamaze care conțin serină în situsul lor activ și aparțin clasei A sau D din clasificarea Ambler și grupei 2be din clasificarea Bush-Jacoby. Majoritatea BLSE aparțin clasei A a  $\beta$ -lactamazelor după Ambler și *in vitro* sunt inhibitate de inhibitori ai  $\beta$ -lactamazei (acidum clavulanicum\*, sulbactamum, tazobactamum) și de diazabiciclooctanone (avibactam).

Genele structurale sunt purtate de elemente genetice mobile cum ar fi plasmidele, integronii și transpozonii. Aceste elemente sunt transferabile între tulpini ale aceleiași specii și între specii. Spre deosebire de cefalosporinaze de tip AmpC (neinhibate de inhibitori ai  $\beta$ -lactamazei), BLSE nu hidrolizează cefamicinele precum cefoxitinum\*, dar pot inactiva cefalosporinele de generația a patra (cefepimum).

#### Clasificarea Beta-lactamazelor

Beta-lactamazele sunt clasificate în mod obișnuit în conformitate cu două scheme generale: clasificarea moleculară Ambler și clasificarea funcțională Bush-Jacoby-Medeiros. Schema Ambler clasifică  $\beta$ -lactamazele în patru clase în funcție de omologia proteinelor enzimelor.

Beta-lactamazele din clasa A, C și D sunt serinice, iar enzimele din clasa B sunt metalo- $\beta$ -lactamaze (conțin zinc). Schema funcțională Bush-Jacoby-Medeiros se bazează pe proprietățile funcționale ale enzimelor, adică profilurile de substrat și inhibitori.

Enzimele BLSE aparțin claselor Ambler A și D în majoritatea cazurilor, cele din clasa A Ambler fiind în mare parte sensibile la inhibitori precum acidum clavulanicum\*. Exemple relevante de  $\beta$ -lactamaze în Enterobacterales din fiecare clasă sunt prezentate în Anexa 1.

Există mai multe grupuri de BLSE cu comportament similar, dar diferite istorii evolutive. Cele mai mari grupuri sunt mutații  $\beta$ -lactamazelor TEM și SHV, cu peste 150 de membri. Mutațiile care afectează un număr mic de aminoacizi critici măresc situsul activ al enzimei și îi permit să devieze înlocuitorii oxyimino, care în mod normal protejează inelul  $\beta$ -lactamic. Ca rezultat, în timp ce enzimele clasice TEM și SHV sunt incapabile să hidrolizeze în mod semnificativ oxyimino cefalosporinele, mutații pot face acest lucru, conferind rezistență tulpinilor gazdă.

## Familia SHV

Familia SHV de  $\beta$ -lactamaze pare a fi derivată din *Klebsiella* spp. Progenitorul clasei de enzime SHV, SHV-1, se găsește universal la *K. pneumoniae*. La multe tulpini de *K. pneumoniae*, gena care codifică SHV-1 sau precursorul său aparent, LEN-1, se află și în cromozomul bacterian; s-ar putea ca gena pentru  $\beta$ -lactamaza SHV-1 să fi evoluat ca genă cromozomială în *Klebsiella* și ulterior să fi fost încorporată într-o plasmidă care s-a răspândit la alte specii de enterobacterii.

SHV-1 conferă rezistență penicilinelor cu spectru larg, cum ar fi ampicilinum, tigecyclinum și piperacilinum, dar nu și cefalosporinelor substituie cu oxyimino. Beta-lactamaza SHV-1 este responsabilă pentru cca 20% din rezistența la ampicilinum mediată de plasmide la speciile de *K. pneumoniae*.

## Familia TEM

TEM-1, raportat pentru prima dată dintr-un izolat de *E. coli* în 1965, are profiluri de substrat și inhibare similare cu cele ale SHV-1. TEM-1 este capabil să hidrolizeze penicilinele și cefalosporinele din prima generație, dar este incapabil să atace oxyimino cefalosporinele.

Prima variantă TEM cu activitate crescută împotriva cefalosporinelor cu spectru extins a fost TEM-3. TEM-2, primul derivat al TEM-1, a avut o singură substituție de aminoacizi din  $\beta$ -lactamaza originală. Acest lucru a provocat o schimbare a punctului izoelectric, dar nu a modificat profilul substratului.

TEM-3, raportat inițial în 1989, a fost prima  $\beta$ -lactamază de tip TEM care a prezentat fenotipul BLSE. Retrospectiv, este posibil ca TEM-3 să nu fi fost primul BLSE de tip TEM.

*Klebsiella oxytoca*, adăpostind o plasmidă care poartă o genă ce codifică rezistența la cef-tazidimum, a fost izolată pentru prima dată în Liverpool, Anglia, în 1982. B-lactamaza responsabilă a fost ceea ce acum se numește TEM-12. Interesant este că tulpina provine dintr-o unitate neonatală care a fost afectată de un focar de *K. oxytoca* producător de TEM-1. Acesta este un exemplu bun al apariției BLSE ca răspuns la presiunea selectivă indusă de cefalosporinele cu spectru extins.

## Familia CTX-M

Un alt mare grup de BLSE sunt enzimele CTX-M. Beta-lactamazele CTX-M se găsesc exclusiv în grupa funcțională 2 (Bush-Jacoby) și din genele BLSE cromozomiale găsite în *Kluyvera* spp., un agent patogen oportunist al *Enterobacteriaceae*, găsit în mediu. Primele proteine CTX-M au fost descoperite la sfârșitul anilor 1980 și astăzi au fost secvențiate peste 100 de variante.

Pe baza secvențelor de aminoacizi, acestea pot fi împărțite în cinci grupuri (CTX-M grup 1, 2, 8, 9 și 25). Speciile de *Enterobacteriaceae* (majoritatea *Escherichia coli*) care produc enzimele CTX-M au fost identificate, predominant din comunitate, ca fiind cauza infecțiilor tractului urinar. Diverse rapoarte sugerează că BLSE de tip CTX-M pot fi acum cel mai frecvent tip de BLSE la nivel mondial.



Această familie nouă de  $\beta$ -lactamaze care hidrolizează preferențial cefotaximum, a fost găsită în izolate de *Salmonella enterica* serovar, *Typhimurium*, *E. coli* în principal și alte specii de *Enterobacteriaceae*. Acestea nu sunt foarte strâns legate de  $\beta$ -lactamazele TEM sau SHV. În plus, față de hidroliza rapidă a cefotaximum, o altă caracteristică unică a acestor enzime este că acestea sunt mai bine inhibitate de tazobactamum, decât de sulbactamum și clavulanicum.

Originea enzimelor CTX-M este diferită de cea a BLSE TEM și SHV. În timp ce SHV și TEM au fost generate de substituții de aminoacizi ale enzimelor primare, CTX-M a fost dobândită prin transferul orizontal de gene de la alte bacterii, utilizând forme genetice precum plasmidele sau transposonii.

Studiile au arătat că  $\beta$ -lactamazele de tip CTX-M hidrolizează cefalotinum\* sau cefaloridinum mai bine decât benzylpenicillinum și hidrolizează preferențial cefotaximum. Deși există o anumită hidroliză a ceftazidimumului de către aceste enzime, de obicei nu este suficientă pentru a oferi rezistență clinică microorganismelor gazdă.

## Familia OXA

Beta-lactamazele de tip OXA sunt denumite astfel datorită abilităților lor de hidrolizare a oxacilinei. Ele apar predominant la *Pseudomonas aeruginosa*, dar au fost detectate la multe alte bacterii gram-negative. BLSE de tip OXA au fost descoperite inițial la izolatele *Pseudomonas aeruginosa* din Turcia.

Evoluția  $\beta$ -lactamazelor de tip OXA din enzimele primare cu spectru mai îngust are multe paralele cu evoluția BLSE de tip SHV și TEM. OXA-10 hidrolizează slab cefotaximum, ceftriaxonum și aztreonamum\*, conferind majorității microorganismelor o sensibilitate redusă la aceste antibiotice; dar OXA-11, -14, -16, -17, -19, -15, -18, -28, -31, -32, -35 și -45 conferă rezistență la cefotaximum și uneori ceftazidimum, aztreonamum\*.

Beta-lactamazele OXA prezintă rezistență la ampicillinum și cefalotinum\* și se caracterizează prin activitatea lor hidrolitică ridicată împotriva oxacilinei și cloxacilinei și faptul că sunt slab inhibitate de acidum clavulanicum\*. Producerea simultană a unei metalo-enzime hidrolizante a carbapenemelor și a unei enzime OXA hidrolizante a aztreonamumului\* poate duce cu ușurință la rezistență pentru toate antibioticele  $\beta$ -lactamice.

În ultimii ani, s-au descoperit o varietate de alte  $\beta$ -lactamaze (grup PER, VEB, GES, BES, BEL, TLA, SFO, IBC) care sunt enzime de clasă A mediate de plasmide sau asociate cu integroni. Ele nu sunt simple derivați mutați ai oricăror  $\beta$ -lactamaze cunoscute și au fost găsite în diferite locații geografice. Au fost de asemenea descrise noi enzime BLSE codificate cromozomial.

## Grup PER

BLSE de tip PER împărtășesc doar aproximativ 25-27% omologie cu BLSE de tip TEM și SHV cunoscute. PER-1  $\beta$ -lactamaza hidrolizează eficient penicilinele și cefalosporinele, este inhibată de acidum clavulanicum\*. PER-1 a fost detectată mai întâi la *P. aeruginosa*, iar mai târziu în *S. enterica* serovar *Typhimurium* și izolatele de *Acinetobacter*.

În Turcia, până la 46% din izolatele nosocomiale de *Acinetobacter* spp. și 11% din *P. aeruginosa* s-au dovedit a fi producătoare de PER-1. PER-2, care împarte 86% omologie cu PER-1, ce a fost detectat la *S. enterica* serovar Typhimurium, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* și *Vibrio cholerae* O1 El Tor.

## Grup GES

GES-1 a fost descris inițial într-un izolat de *K. pneumoniae* și are activitate hidrolitică împotriva penicilinelor și cefalosporinelor cu spectru extins, dar nu împotriva cefamicinelor sau carbapenemelor, fiind inhibată de inhibitori ai  $\beta$ -lactamazei. Aceste proprietăți enzimactice seamănă cu cele ale altor BLSE din clasa A; astfel, GES-1 a fost recunoscut ca membru al BLSE.

Au fost descrise și alte enzime neobișnuite cu BLSE (de ex. BES, BEL, VEB, TLA, SFO), aceste enzime noi se găsesc rar.

## Importanța epidemiologică și clinică

Producția de  $\beta$ -lactamaze nu este un fenomen nou, deoarece acest mecanism există în natură. Primele enzime au fost descoperite cu mult înainte de utilizarea clinică a penicilinei. Cu toate acestea, în timpul unei perioade de utilizare intensă a  $\beta$ -lactamelor, în special de la introducerea cefalosporinelor cu spectru larg la începutul anilor 80,  $\beta$ -lactamazele bacteriene au evoluat foarte mult – către o mai mare diversificare.

Extinderea spectrului de activitate și răspândirea s-a realizat printre numeroase specii de enterobacterii și bacili nefermentativi, cum ar fi *Pseudomonas* spp. și *Acinetobacter* spp. În prezent există mai mult de 350 de BLSE-uri diferite.

Răspândirea beta-lactamazelor cu spectru extins (BLSE) la tulpinile de enterobacterii asociate asistenței medicale și dobândite în comunitate este o provocare pentru clinicieni, deoarece opțiunile terapeutice pentru aceste microorganisme sunt limitate.

Infecțiile cauzate de microorganismele producătoare de BLSE sunt asociate cu creșterea mortalității, durata spitalizării și creșterea costurilor. O terapie empirică inadecvată pentru infecțiile grave cauzate de aceste microorganisme este independent asociată cu creșterea mortalității.

Carbapenemele sunt medicamentele de alternativă pentru infecțiile grave cauzate de organismele producătoare de BLSE, dar utilizarea excesivă a acestora este un motiv de îngrijorare.

Povara rezistenței antimicrobiene la bacilii Gram negativi (BGN) este o provocare zilnică pentru medicii din unitățile de terapie intensivă. Într-adevăr, BGN sunt responsabili pentru 45-70% din pneumonia asociată ventilației, 20-30% din infecțiile de flux sangvin legate de cateter și cauzează sepsis dobândit în unitățile de terapie intensivă.

În astfel de situații, administrarea în timp util a unui tratament adecvat cu antibiotice este un factor crucial pentru vindecarea pacientului, mai ales atunci când sunt prezente criterii pentru sepsis. Cu toate acestea, ratele de rezistență alarmante sunt acum raportate la nivel mondial, iar tendințele în creștere pot provoca îngrijorări pentru următorii ani.



Aproape exclusiv limitată la spital până la începutul secolului, această problemă se aplică din ce în ce mai mult la pacienții cu infecții asociate asistenței medicale și chiar infecțiilor dobândite în comunitate. Enterobacteriaceae și BGN nefermentativi (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* și *Stenotrophomonas maltophilia*) reprezintă cea mai mare parte a problemei. Multe studii au analizat factorii de risc pentru pacienții spitalizați care dobândesc o tulpină producătoare de BLSE (prin colonizare sau infecție).

În general, pacienții grav bolnavi sunt cei care dobândesc infecții bacteriene producătoare de BLSE, după spitalizarea prelungită și după expunerea la proceduri invazive (catetere intravenoase, catetere vezicale sau tuburi endotraheale). Alți factori de risc includ malnutriția, hemodializa, nutriția parenterală totală, admiterea în terapie intensivă sau spitalizare prealabilă.

Terapia cu antibiotice au fost frecvent un factor de risc asociat cu apariția tulpinilor BLSE și anume: expunere prealabilă la cefalosporine de generația a treia (de asemenea, la fluoro-chinolone, aminoglicozide și co-trimoxazol), numărul de antibiotice administrate și durata tratamentului.

O ședere într-un centru de îngrijire pe termen lung a fost, de asemenea, considerată a fi un factor de risc în anumite țări. Aceste centre pot deveni rezervoare a tulpinilor multiresistente de *E. coli* și *Klebsiella* spp.

Tratamentul oral cu chimioterapice antimicrobiene sintetice precum cotrimoxazolul și fluoro-chinolonele facilitează colonizarea prin acest tip de tulpină la rezidenții centrelor de îngrijire pe termen lung. Răspândirea bacteriilor producătoare de BLSE în acest context este asociată cu dificultate în aplicarea măsurilor de igienă precum purtarea mănușilor sau dezinfectarea mâinilor. Vârsta avansată, infecțiile urinare repetate, diabetul și tratamentul cu fluoro-chinolone sunt recunoscute ca fiind factori de risc la pacienții nespitalizați.

Acest fapt explică de ce, tulpinile producătoare de BLSE se găsesc într-un număr mare de cazuri la pacienții internați în geriatrie, reabilitare, hematologie, secții de oncologie, terapie intensivă sau pneumologie.

## 1.2. *Enterobacterales* producătoare de carbapenemaze

**Definiție.** Carbapenemazele sunt  $\beta$ -lactamaze care hidrolizează penicilinele, în cele mai multe cazuri cefalosporinele și în diferite grade carbapenemele și monobactamele (acestea din urmă nu sunt hidrolizate de metalo- $\beta$ -lactamaze).

Carbapenemazele sunt o sursă de îngrijorare deoarece pot conferi rezistență practic tuturor  $\beta$ -lactamelor și sunt ușor transferabile. Mai mult, tulpinile producătoare de carbapenemază posedă frecvent mecanisme de rezistență la o gamă largă de agenți antimicrobieni și infecțiile cu *Enterobacterales* producătoare de carbapenemaze sunt asociate cu rate înalte de mortalitate.

Infecțiile cu bacterii producătoare de BLSE au fost tratate cu succes cu carbapeneme, dar utilizarea masivă a acestei clase de antibiotice a accelerat diseminarea celui de-al doilea

grup important de  $\beta$ -lactamaze, carbapenemazele. Aceste enzime aparțin claselor Ambler A, B, D și diferă prin modelul de rezistență pe care îl induc.

Clasa A include serin  $\beta$ -lactamaze, precum *Klebsiella pneumoniae* carbapenemaza (KPC-2), non-metallo carbapenemaza (NMC), imipenemaza (IMI) și altele. Carbapenemele din clasa B sunt metalo-proteine și sunt capabile să hidrolizeze toate antibioticele, cu excepția monobactamelor.

Exemple bine cunoscute includ NDM-1, VIM și IMP. Oxacilinazele și derivații OXA-48 sunt clasificați ca și carbapenemaze din clasa D. Activitatea lor hidrolitică împotriva carbapenemelor și a unor cefalosporine din a treia generație este mai mică comparativ cu alte carbapenemaze și nu sunt inhibitate de acidum clavulanicum\* și de tazobactamum.

Odată cu utilizarea crescândă a antibioticelor, apariția ulterioară a enterobacteriilor MDR pare inevitabilă. Consumul ridicat de antibiotice în sănătatea umană și a animalelor, precum și mobilitatea crescută reprezintă doar doi acceleratori în acest proces, care este însoțit de o evoluție continuă a plasmidelor de rezistență și a elementelor genetice mobile.

Detectarea îmbunătățită și rapidă a izolatelor MDRE permite izolarea rapidă a pacienților colonizați sau infectați cu aceste microorganisme și poate permite o terapie specifică cu antibiotice după determinarea tiparelor de sensibilitate. Ambii pași pot reduce răspândirea rezistențelor, de exemplu, în spitale. Cu toate acestea, nu numai metodele de detectare rapidă și sensibilă, ci și parametrii preanalitici afectează rezultatele și succesul final al tratamentului.

### 1.3. *Salmonella* spp. rezistentă la fluorochinolone

Tulpinele de *Salmonella* spp. non-sensibile sau intermediare, în special la ciprofloxacinum, levofloxacinum, ofloxacinum, pefloxacinum sau acidum nalidixicum\*, pot fi asociate cu eșec terapeutic sau răspuns întârziat la pacienții cu salmoneloză tratați cu fluorochinolone.

Există dovezi clinice ce demonstrează acțiunea slabă a ciprofloxacinumului în cazul infecțiilor sistemice cauzate de *Salmonella* spp. cu rezistență scăzută la ciprofloxacinum (CMI > 0,06 mg/l). Datele disponibile se referă în principal la *Salmonella* Typhi, dar există, de asemenea, rapoarte de caz privind acțiunea slabă a ciprofloxacinei și asupra altor specii de *Salmonella*.

De asemenea, numeroase studii au adus dovezi privind eșecul clinic al terapiei cu fluorochinolone atunci când izolatul a dobândit una sau mai multe mutații țintă în gena *gyrA*. Dovezile se referă în principal la ciprofloxacinum.

### 1.4. *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilinum (MRSA)

**Definiție.** Izolatele de *S. aureus* cu o proteină auxiliară de legare a penicilinei (PBP2a sau alternativă, recent descoperită PBP2 codificată de *mecC*) pentru care agenții  $\beta$ -lactamici au afinitate scăzută, excepție fiind clasa nouă de cefalosporine cu activitate anti-MRSA.



Mecanismele de rezistență la *S. aureus* sunt diverse și includ inactivarea enzimatică a antibioticului (enzime de modificare a penicilinazei și aminoglicozidelor), modificarea țintei cu afinitate scăzută pentru antibiotic (de exemplu proteina de legare a penicilinei BP2a pentru *S. aureus* rezistent la meticilinum și D-Ala-D-Lac a precursorilor peptidoglicanului pentru tulpinile rezistente la vancomycinum), captării antibioticului (pentru vancomycinum și, eventual, daptomycinum) și a pompelor de eflux (fluorochinolone și tetracyclinum).

Matrice genetice complexe (elemente cromozomiale *mec* stafilococice sau operonul *vanA*) au fost dobândite de *S. aureus* prin transfer orizontal de gene, în timp ce s-a dezvoltat rezistență la alte antibiotice, inclusiv unele dintre cele mai recente (de exemplu, fluorochinolone, linezolidum și daptomycinum) prin mutații spontane și selecție pozitivă.

Detectarea mecanismelor de rezistență și a bazelor genetice ale acestora reprezintă un sprijin important pentru supravegherea rezistenței la antimicrobiene în cazul *S. aureus*.

Meticilinum a fost prima penicillinum rezistentă la penicilinază și a fost utilizată pe scară largă în testarea sensibilității *S. aureus* la agenții beta-lactamici rezistenți la penicilinază. În ciuda faptului că meticilina nu mai este disponibilă, iar oxacillinum și cefoxitinum\* au înlocuit-o în testarea sensibilității, tulpinile rezistente sunt cunoscute sub denumirea de MRSA.

În baza sensibilității la antibiotice, rezistența la meticilinum a *S. aureus* este definită ca o concentrație minimă de inhibiție a oxacillinum (CMI) mai mare sau egală cu 4 μ/ml. Infecția cu MRSA este una dintre principalele cauze ale infecțiilor dobândite în spital și este frecvent asociată cu morbiditate și mortalitate semnificativă, creșterea duratei de spitalizare și costurilor.

Tulpinile MRSA pot cauza erupții și focare inclusiv în comunitate. Screening-ul la MRSA este un mijloc de identificare a pacienților și a personalului medical care poate fi expus riscului de infecție și/sau implicat în transmiterea microorganismului.

## Clasificare

Infecțiile cu MRSA se clasifică în două tipuri:

- 1) MRSA asociat asistenței medicale, – expunerea la tulpini de MRSA are loc datorită spitalizării, intervenției chirurgicale, hemodializă etc., și este cel mai des rezistent la clindamycinum;
- 2) MRSA comunitar – tulpini ce pot infecta persoane sănătoase, care nu au avut contact cu instituțiile medicale și nu este sensibil la orice antibiotic β-lactamic.

## Importanța clinică

*S. aureus* rezistent la meticilinum este o cauză majoră de morbiditate și mortalitate la nivel mondial. Infecțiile cu MRSA sunt endemice atât în instituții spitalicești, cât și în comunitate.

Factorii de risc asociați frecvent pentru infecția cu MRSA sunt similare altor infecții bacteriene și anume: spitalizarea de durată, terapia intensivă, utilizarea antibioticelor, colonizarea și portajul de MRSA, proceduri invazive, infecția cu HIV, leziuni deschise, proceduri de hemodializă și folosirea cateterelor venoase sau urinare pe o perioadă mai lungă.

O incidență mai mare a infecției cu MRSA se observă și în rândul lucrătorilor din domeniul sănătății care vin în contact direct cu pacienții infectați cu acest microorganism. MRSA poate provoca o serie de infecții specifice, cele mai frecvente fiind infecții ale pielii și țesuturilor subcutanate, de asemenea infecții invazive, cum ar fi osteomielita, meningita, pneumonia, abcesul pulmonar și empiemul. Endocardita infecțioasă cauzată de MRSA este asociată cu morbiditate și mortalitate ridicate.

Studiile au arătat că majoritatea pacienților de la care este izolat MRSA sunt mai des purtători sănătoși, decât infectați cu microorganismul dat. Riscul de colonizare care duce la infecție crește în prezența oricărei leziuni a pielii, cum ar fi plăgile chirurgicale și dispozitivele care pătrund în piele, de exemplu proteze și catetere. Eradicarea portajului nazal al *S. aureus* poate fi benefică în anumite condiții clinice, cum ar fi furunculoză recurentă.

## Mecanism de rezistență

*S. aureus* rezistent la penicilinum a produce o penicilază codificată de plasmidă, care hidrolizează inelul  $\beta$ -lactamic al penicilinei, care este esențial pentru activitatea sa antimicrobiană.

În 1959, celbenina sau numită în prezent meticillinum – penicillinum semisintetic a fost dezvoltată pentru a lupta cu mecanismul de rezistență la antimicrobiene. În 1961 a fost identificată prima tulpină de *S. aureus* rezistentă la meticillinum în Marea Britanie, aceasta s-a dovedit a fi rezistentă la toate antibioticele  $\beta$ -lactamice, inclusiv cefalosporine și carbapeneme.

*S. aureus* rezistent la meticillinum conține gena *mecA*, care este determinantul esențial al rezistenței la meticillinum. *MecA* este un segment de 2 130 perechi de baze de ADN care codifică o proteină care leagă penicilina (PBP2 'sau PBP2a) caracterizată printr-o afinitate scăzută pentru majoritatea beta-lactamicelor și care se consideră că preia funcțiile tuturor celorlalte PBP, atunci când sunt saturate de meticillinum sau alte antibiotice beta-lactamice.

*S. aureus* sensibil la meticillinum (MSSA) nu produce această proteină și ADN-ul lui nu se va hibridiza cu o sondă specifică pentru gena *mecA* sau *mecC*.

Determinantul genetic al PBP2a și PBP2c este transcris în toate celulele microorganismului MRSA și în toate clasele fenotipice ale MRSA, dar expresia rezistenței la meticillinum poate fi afectată de factori suplimentari.

Acest tip de rezistență este transferat de către bacteriofagi, unul dintre singurele exemple relevante din punct de vedere medical de rezistență la antibiotice mediată de cromozomi prin transducție de fagi. Gena *mecA* face parte dintr-un element genetic mobil, SCCmec, care este încorporat în cromozomi.

Douăsprezece tipuri distincte de SCCmec au fost descrise până în prezent, fiind numerotate de la I la XI. Unele tipuri (I, II sau III) sunt asociate asistenței medicale (HA-MRSA), în timp ce cele mai multe tipuri sunt comunitare (CA-MRSA) – tipurile IV sau V, deși EMRSA-15 codifică tipul IV. Mai recent, a fost descris omologul *mecA* care arată doar 69% omologie cu *mecA*.

Gena este acum cunoscută sub numele de *mecC* și este transportată de către un element mobil cunoscut sub numele de SCCmecXI care a fost identificat la tulpinile MRSA izolate de la oameni și animale domestice și sălbatice.



Prezența genelor *mecA* și *mecC* și valori înalte ale CMI la oxacilinum, meticilinum sau zone de inhibiție mici la cefoxitinum\*, conform breakpoint-urilor recomandate de metodele validate la nivel național și internațional, sunt criterii acceptate pentru rezistența la meticilinum.

Pot fi întâlnite unele tulpini de *Staphylococcus aureus* care sunt *mecA* și *mecC* negative, dar care prezintă o rezistență la limită – *S. aureus* sensibil la limită sau Borderline Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA). Acest lucru se poate datora hiperproducției de beta-lactamază (deosebit de evidentă la testarea sensibilității la oxacilinum) sau modificării în PBP515.

Izolatele *mecA* pozitive de *S. aureus* care sunt sensibile atât la cefoxitinum\*, cât și la oxacilinum (OS MRSA) datorită inactivării *mecA* au fost descrise în diferite părți ale lumii. Aceste tulpini sunt diferite de MRSA rezistente heterogen, care sunt, de asemenea, sensibile la oxacilinum, dar care sunt rezistente la cefoxitinum\*.

Frecvența acestor izolate este estimată la aproximativ 3% în funcție de rezultatele fenotipice convenționale combinate și rezultatele PCR pozitive pentru *mecA*. Detectarea exactă a rezistenței la oxacilinum/meticilinum poate fi dificilă din cauza prezenței a două subpopulații (una sensibilă și cealaltă rezistentă) care pot coexista într-o cultură de stafilococi.

Toate celulele dintr-o cultură pot transporta informații genetice (*mecA*, *mecC*) pentru rezistență, însă doar un număr mic poate exprima rezistența *in vitro*. Acest fenomen se numește heterorezistență și apare la stafilococi rezistenți la penicilinele stabile la penicilază, cum ar fi oxacilina.

## 1.5. *Enterococcus faecium* și *Enterococcus faecalis* rezistent la vancomycinum

**Definiție.** *Enterococcus faecium* sau *Enterococcus faecalis* rezistenți la vancomycinum (VRE) sunt acele tulpini la care CMI a vancomycinumului este 4 mg/L.

Enterococii sunt bacterii Gram pozitive care fac parte din microbiota intestinală a majorității oamenilor. În ultimele 2 decenii, mai multe rapoarte au documentat că cele mai importante două specii, *Enterococcus faecalis* și *Enterococcus faecium*, se numără printre principalele cauze ale mai multor infecții umane, inclusiv bacteriemie, sepsis, endocardită, infecții ale tractului urinar, infecții de plagă, sepsis neonatal și meningite.

În plus, apariția enterococilor rezistenți la doze mari de aminoglicozide (HLAR) și a enterococilor rezistenți la vancomycinum (VRE) provoacă mari dificultăți în terapia antiinfecțioasă. Primele izolate de VRE au fost izolate în Regatul Unit și Franța în 1988, din cauza răspândirii rapide și a opțiunilor limitate pentru VRE, aceste izolate sunt unele dintre cele mai importante tulpini ce provoacă infecții nosocomiale la nivel mondial, asociate cu morbiditate și nivel înalt de mortalitate.

## 1.6. *Streptococcus pneumoniae* non-sensibil la penicillinum

*S. pneumoniae* conține șase proteine ce leagă penicilina (PBP), dintre care PBP2x este ținta principală a penicilinei. *S. pneumoniae* dezvoltă rezistență la penicillinum prin recombinarea cu alte tulpini de *S. pneumoniae* ce sunt rezistente la penicillinum sau specii de streptococi strâns înrudite, ce își modifică proteinele de legare a penicilinei și iau parte la dezvoltarea rezistenței la acest preparat antimicrobian.

Prezența „genelor mozaic” care codifică PBP-uri cu afinitate scăzută este rezultatul transferului orizontal de gene de la *Streptococcus viridans* comensal. Nivelul de rezistență la  $\beta$ -lactame nu depinde numai de PBP-urile cu afinitate scăzută prezente în izolate, dar și de modificarea PBP-urilor specifice care sunt esențiale pentru *S. pneumoniae*.

Cu toate acestea *S. pneumoniae* care nu este sensibil la penicillinum rămâne a fi o problemă clinică majoră din punct de vedere al sănătății publice, deși acesta spre deosebire de alte microorganisme nu este asociat cu răspândirea în instituțiile medicale.



Testarea sensibilității microorganismelor la antibiotice este o etapă importantă a oricărui examen bacteriologic pozitiv în care s-a izolat și identificat o tulpină bacteriană relevantă clinic, etapă în care se va stabili dacă aceasta este sensibilă, intermediar sensibilă sau rezistentă la antibioticele testate.

Această testare poate fi realizată prin metode calitative (metoda difuzimetrică Kirby-Bauer), metode cantitative (metoda microdiluțiilor, teste gradient) și prin metode moleculare. De rutină, cea mai utilizată metodă de testare a sensibilității la antibiotice în laboratoarele clinice rămâne a fi metoda difuzimetrică.

Această metodă poate fi utilizată pentru testarea majorității bacteriilor patogene și nu necesită echipament special.

Valorile de interpretare ale diametrelor zonelor de inhibiție utilizate în cadrul metodei sunt publicate în ghidul EUCAST. Pentru a obține rezultate veridice, tehnica descrisă trebuie respectată fără excepții.

Metodele cantitative (metoda microdiluțiilor, teste gradient) permit determinarea concentrației minime inhibitorii. Pentru unele antibiotice sau bacterii singura metodă acceptabilă este metoda microdiluțiilor (de ex. testarea sensibilității față de colistinum, testarea *Streptococcus pneumoniae* la penicillinum, testarea *Staphylococcus aureus* la vancomycinum).

Metodele moleculare detectează prezența unor markeri genetici asociați rezistenței și pot fi teste preliminare sau complementare testelor fenotipice.

### Prepararea și depozitarea mediilor

Pentru testarea sensibilității microorganismelor la antimicrobiene este utilizat agarul Mueller-Hinton, care are o valoare nutritivă ce permite dezvoltarea optimă a unei mari varietăți de bacterii și nu conține inhibitori ai acțiunii unor antibiotice.

Mediul se prepară respectând indicațiile producătorului. Pentru microorganismele pretențioase nutritiv, mediul este suplimentat cu diverse componente care sunt indicate în standardul EUCAST.

Mediul în plăci trebuie să aibă o înălțime de  $4\pm 0,5$  mm. Volumul trebuie calculat corect în raport cu dimensiunile plăcii Petri utilizate, care pot varia în funcție de producător (Tab. 1).

**Tabelul 1. Cantitatea de mediu în dependență de diametrul plăcii Petri**

Diametrul plăcii	Volumul de agar Mueller-Hinton
90 mm	25 mL
100 mm	31 mL
150 mm	71 mL

Plăcile cu agar, utilizate pentru testarea sensibilității la antimicrobiene, sunt disponibile comercial sau sunt preparate "in house". Acestea sunt depozitate în pungi de plastic sau în containere ermetice.

Înainte de utilizare, suprafața plăcilor trebuie să fie uscată, nu trebuie să fie picături de apă pe suprafața mediului, sau în interior, pe capac. Această precauție este necesară, deoarece umeditatea în exces poate avea ca efect apariția unor zone de inhibiție difuze sau a unui vâl în interiorul zonelor de inhibiție.

Plăcile se usucă la 20-25°C peste noapte, sau la 35°C, înlăturând capacul timp de 15 minute.

Plăcile preparate "in house" se depozitează la întuneric la temperatura de 4-8°C. Evitați congelarea și supraîncălzirea.

Pentru plăcile preparate "in house", condițiile de depozitare și păstrare, uscarea plăcilor, trebuie incluse în programul de asigurare a calității al laboratorului.

Plăcile preparate după cerințele comerciale trebuie depozitate după recomandările producătorului și folosite până la termenul de expirare indicat de producător.

### **Metoda difuzimetrică Kirby-Bauer**

Procedura Kirby-Bauer se bazează pe difuziunea în mediu a substanțelor antimicrobiene impregnate pe discuri de hârtie. Această metodă utilizează discuri cu o singură concentrație a agentului antimicrobian, iar diametrele zonelor sunt corelate cu concentrațiile minime inhibitorii.

#### ***Prepararea inoculului***

Inoculul se prepară utilizând metoda suspensionării directe a coloniilor în soluție fiziologică pentru a obține o suspensie bacteriană cu o densitate ce corespunde standardului de turbiditate 0,5 McFarland (~1-2 x 10<sup>8</sup> UFC/ml).

Metoda suspensionării directe a coloniilor este valabilă pentru toate speciile microbiene, inclusiv și cele pretențioase.

Pentru prepararea inoculului se folosește un tampon steril sau o ansă sterilă cu care se repică colonii dintr-o cultură de 18-24 de ore, crescută pe un mediu neselectiv. Se repică colonii cu morfologie asemănătoare pentru a evita selectarea unei variante atipice. Coloniile suspendate în soluție fiziologică se amestecă bine până la omogenizare.



Densitatea suspensiei se ajustează corespunzător standardului de turbiditate 0,5 McFarland. O concentrație inadecvată a inoculului poate duce la rezultate eronate. Zonele de inhibiție pot fi prea mici dacă inoculul este prea dens și pot fi prea mari și dificil de determinat dacă inoculul este de o densitate mai mică.

Pentru ajustarea densității suspensiei se recomandată utilizarea unui dispozitiv spectrofotometric, care trebuie calibrat față de un standard 0,5 McFarland în conformitate cu indicațiile producătorului.

Ca alternativă, densitatea suspensiei poate fi comparată vizual cu un standard 0,5 McFarland. Pentru a ușura compararea vizuală, se compară testul pe un fundal alb cu linii negre.

Inocul de *Streptococcus pneumoniae* se prepară, de preferință, de pe o placă cu agar-sânge, iar densitatea trebuie să corespundă standardului 0,5 McFarland.

În cazul în care inoculul de *Streptococcus pneumoniae* se prepară de pe o placă cu agar-chocolat, acesta trebuie să aibă densitatea corespunzătoare standardului 1,0 McFarland.

Suspensia standardizată trebuie folosită timp de 15 min până la 60 de minute de la preparare, regula 15-15-15 minute: însămânțarea inoculului în 15 minute de la preparare, aplicarea discurilor în 15 minute de la însămânțare, incubarea plăcilor la 15 minute de la aplicarea discurilor.

### ***Inocularea plăcilor cu agar***

Înainte de inoculare, plăcile cu agar trebuie preîncălzite la temperatura camerei. În suspensia de microorganisme prealabil pregătită se introduce un tampon steril.

Pentru bacteriile Gram-negative, tamponul se apasă și se rotește în interiorul tubului pentru înlăturarea excesului de fluid și evitarea supra-inoculării. Această procedură nu este valabilă pentru bacteriile Gram-pozitive.

Dacă din aceeași suspensie sunt inoculate mai multe plăci cu agar, procedura se repetă pentru fiecare placă.

Plăcile se inoculează fie utilizând un dispozitiv automat, fie prin însămânțare în trei direcții. Inoculul se repartizează uniform pe întreaga suprafață a mediului, fără a lăsa spații libere între striuri (în special pentru bacteriile Gram-pozitive).

Se aplică discurile pe suprafața mediului în 15 min de la inoculare.

Dacă plăcile inoculate sunt lăsate la temperatura camerei pentru un timp îndelungat înainte ca discurile să fie aplicate, microorganismul poate să înceapă să se dezvolte înainte de aplicarea discurilor, rezultând zone de inhibiție eronate prin reducerea diametrelor de inhibiție.

### ***Aplicarea discurilor cu antimicrobiene***

Discurile cu antimicrobiene ce urmează a fi utilizate, vor fi lăsate să ajungă la temperatura camerei înainte de a desigila cartușele sau containerele utilizate pentru depozitarea acestor

tora. Această precauție este necesară pentru a preveni formarea condensului ce poate duce la deteriorarea rapidă a unor antimicrobiene.

Discurile se aplică ferm pe suprafața plăcilor inoculate, deoarece ele trebuie să fie în contact strâns și uniform cu suprafața agarului și nu trebuie mutate odată ce au fost aplicate, deoarece difuzia antibioticului începe imediat.

Numărul discurilor de pe o placă trebuie să fie limitat pentru a evita suprapunerea zonelor de inhibiție și interferarea agenților antimicrobieni. Este important ca diametrele zonelor de inhibiție să fie măsurate exact. De regulă, pe o placă circulară cu diametrul de 90 mm sunt aplicate maximum 6 discuri și maximum 12 discuri pe o placă circulară cu diametrul de 150 mm.

Pentru a putea depista rezistența inductibilă la clindamycinum a stafilococilor și streptococilor, discurile cu erythromycinum și clindamycinum trebuie plasate la o distanță de 12-20 mm între margini pentru stafilococi și 12-16 mm între margini pentru streptococi.

Reducerea activității agenților antimicrobieni per disc are ca rezultat micșorarea diametrelor zonelor de inhibiție și este cauza obținerii unor rezultate eronate.

#### *De reținut:*

Depozitarea discurilor, inclusiv cele din dispenser, se face în containere sigilate care conțin un desicant și ferite de lumină (unii agenți sunt inactivați dacă sunt expuși îndelungat la lumină, ex. metronidazolom, chloramphenicolom, fluorochinolonele).

Rezervele de discuri se depozitează în conformitate cu indicațiile producătorului. Unii agenți sunt mai labili (ex. amoxicilinum + acidum clavulanicum\*, cefaclorum și carbapenemele) și pot exista indicații specifice ale producătorului.

Discurile de lucru se depozitează conform indicațiilor producătorului. După ce au fost desigilate containerele cu discuri, discurile trebuie utilizate în limitele de timp specificate de producător.

Controlul calității se face frecvent, pentru a verifica dacă discurile cu antimicrobiene nu și-au pierdut activitatea în timpul depozitării.

La data de expirare indicată de producător, discurile se aruncă.

Cerințele privind conținutul discurilor sunt listate în tabelele cu Valori de interpretare și Controlul calității în standardele EUCAST.

#### ***Incubarea plăcilor***

Plăcile pregătite se întorc cu capacul orientat în jos având grijă ca discurile să nu cadă de pe suprafața mediului. Plăcile se incubează în maxim 15 minute după ce au fost aplicate discurile cu antibiotic. Dacă plăcile sunt lăsate la temperatura camerei după ce discurile au fost aplicate, antibioticele pot difuza în mediu înainte de incubare, rezultând zone de inhibiție mărite în mod eronat.



Modul de aranjare a plăcilor în incubator poate influența rezultatele datorită încălzirii neuniforme. Incubatoarele sunt foarte diferite, de aceea controlul incubării, incluzând numărul optim de plăci dintr-un teanc, trebuie inclus în programul de asigurare a calității al laboratorului. Numărul potrivit de plăci într-un teanc este de maximum 5, pentru majoritatea incubatoarelor.

Trebuie de evitat depășirea timpului recomandat de incubare, deoarece se pot dezvolta colonii în zona de inhibiție și izolatele se vor raporta ca rezistente.

În cazul speciilor de *Enterococcus*, pentru testele de sensibilitate la glicopeptide, coloniile rezistente pot să nu fie vizibile după 16-20 ore. Cu toate acestea, după 16-20 ore se poate raporta orice semn de rezistență, dar plăcile cu izolate ce par a fi sensibile trebuie reincubate și recitite la 24 de ore.

Dezvoltarea unui strat de creștere confluent pe suprafața mediului denotă că inocul a fost preparat și repartizat corect.

Dacă inoculul a avut o densitate mică, se pot observa colonii izolate și testul trebuie repetat. Creșterea bacteriilor trebuie să fie uniformă pe toată suprafața mediului pentru ca marginile zonelor de inhibiție obținute să fie uniforme și circulare.

Condițiile de incubare sunt specificate în tabelele cu valorile de interpretare în standardul EUCAST.

### ***Măsurarea zonelor de inhibiție și interpretarea rezultatelor***

Diametrul zonei de inhibiție a creșterii trebuie citit din punctul unde există inhibiție totală, care se apreciază cu ochiul liber, ținând placa la 30 cm distanță de la ochi.

Plăcile cu agar nesuplimentat sunt citite dinspre partea posterioară a plăcii, pe un fundal închis, în lumină reflectată.

Plăcile cu agar suplimentat se citesc înlăturând capacul, în lumină reflectată.

Nu va fi folosită lumina directă (cu placa îndreptată spre lumină), sau lupa, dacă nu este specificat.

Diametrul zonei de inhibiție se măsoară până la ultimul mm, folosind o riglă gradată. Dacă se folosește un cititor automat, acesta trebuie calibrat la citirea manuală.

Diametrele zonelor de inhibiție sunt încadrate în categorii de sensibilitate, în conformitate cu tabelele de interpretare stipulate în standardul EUCAST. Valorile de interpretare, folosite trebuie să fie în concordanță cu ultima versiune a standardului EUCAST. Acest ghid include și instrucțiuni de citire pentru diferite asocieri specifice de agent antimicrobian- microorganism, precum și imagini care explică citirea diametrelor zonelor de inhibiție.

Se verifică dacă zonele de inhibiție obținute în cazul tulpinilor utilizate pentru controlul calității se încadrează în limitele acceptate de standardul EUCAST.

### Instrucțiuni specifice de citire:

În cazul apariției coloniilor izolate în zona de inhibiție sau a zonelor duble de inhibiție, se verifică puritatea culturilor și se repetă testul dacă este necesar.

Dacă culturile sunt pure, coloniile izolate trebuie luate în considerare atunci când se măsoară diametrul zonei de inhibiție.

Datorită antagoniștilor din mediu, pentru trimethoprimum și sulfamethoxazolum + trimethoprimum, poate fi prezentă o creștere slabă până lângă disc, care trebuie ignorată. Măsurarea diametrului zonei de inhibiție trebuie să se facă începând din cea mai pronunțată margine a zonei de inhibiție.

Pentru testarea tulpinilor de *Enterobacteriales* la ampicillinum, ampicillinum + sulbactamum și amoxicillinum + acidum clavulanicum\* se ignoră creșterea bacteriană ce se prezintă ca un film subțire, care produce o zonă de inhibiție internă pe unele loturi de agar Mueller-Hinton.

În cazul testării unei tulpini de *Escherichia coli* la mecillinamum, nu se iau în considerare coloniile izolate din zona de inhibiție.

Pentru *Achromobacter xylosoxidans* și *Burkholderia pseudomallei* cu sulfamethoxazolum + trimethoprimum, un izolat care prezintă orice urmă de zonă de inhibiție mai mare sau egală cu punctul de ruptură pentru categoria Sensibil trebuie să fie raportat ca Sensibil. De reținut că poate exista o creștere substanțială în interiorul zonelor de inhibiție. În aceeași situație, tulpinile de *Stenotrophomonas maltophilia* se raportează sensibil la expunere crescută.

Se citește ca absența zonei de inhibiție doar dacă există o creștere până la disc și nu există urme de zonă de inhibiție.

Pentru enterococi și vancomycinum, se examinează marginea zonei cu atenție din partea din față a plăcii cu placa ținută la lumină (lumină directă). Marginile neclare ale zonei de inhibiție și coloniile din interior indică rezistența la vancomycinum și investigația trebuie să fie continuată. Izolatele nu trebuie raportate sensibile înainte de 24 de ore de incubație.

Pentru beta-lactame și *Haemophilus influenzae*, se citește marginea exterioară a zonelor acolo unde există o zonă de creștere în jurul unei zone de inhibiție altfel clară.

În cazul *Proteus* spp. se ignoră fenomenul de invazie și se măsoară cu exactitate diametrul zonei de inhibiție a creșterii.

Pentru testarea sensibilității *Staphylococcus aureus* la benzylpenicillinum\*, se examinează marginea zonei de inhibiție de aproape, cu placa orientată spre lumină (lumină directă). Izolatele cu zonele de inhibiție mai mari ca punctul de ruptură pentru sensibilitate, dar cu margini precise ale zonei de inhibiție trebuie considerate rezistente.

Când se folosește testarea la cefoxitinum\* pentru evidențierea rezistenței la meticillinum a *S. aureus*, se măsoară zona evidentă și se examinează cu atenție placa, în lumină, pentru a decela dacă există colonii izolate în interiorul zonei de inhibiție. Acestea pot fi fie expresia unei contaminări, fie a rezistenței heterogene la meticillinum.



Pentru testarea sensibilității enterococilor la vancomycinum, se examinează marginea zonei de inhibiție cu placa orientată către lumină (lumină directă). Marginile difuze și coloniile crescute în zona de inhibiție indică rezistență la vancomycinum și necesită investigații suplimentare. Izolatele nu trebuie declarate sensibile înainte de 24 de ore de incubare.

Pentru testarea sensibilității la antimicrobiene pentru tulpini hemolitice de streptococ pe agar Mueller-Hinton suplimentat, se citește diametrului zonei de inhibiție și nu al zonei de hemoliză. Hemoliza de tip  $\beta$  este de obicei independentă de creștere, în timp ce hemoliza de tip  $\alpha$  și creșterea bacteriană de obicei coincid. Se înclină placa înainte și înapoi pentru a diferenția mai bine hemoliza de creștere.

În cazul testării tulpinilor de *Escherichia coli* la fosfomicinam coloniile izolate din zona de inhibiție se ignoră și se citește începând de la marginea zonei.

Seturile de preparate antimicrobiene recomandate pentru testare în funcție de agentul microbial izolat sunt prezente în Anexa 2.

### ***Principii de raportare selectivă a rezultatelor testării sensibilității***

Raportarea selectivă a rezultatelor antibioticogramei se realizează cu scopul limitării prescrierii antimicrobienelelor cu spectru larg în cazul izolatelor sălbatice (fără mecanism de rezistență).

În cazul izolatelor provenite de la agenți microbieni cu mecanisme de rezistență se raportează toate antimicrobienele semnificative față de care se obține rezistență și la nevoie se extinde lista de antimicrobiene. Lista deplină a antimicrobienelelor și clasificarea acestora după structura chimică este reprezentată în Anexa 3.

În cazul în care sunt izolate mai multe specii agenți microbieni semnificativi dintr-o probă, setul antimicrobienelelor raportate se extinde astfel, încât să fie posibilă alegerea antimicrobienelelor eficiente contra tuturor sau majorității speciilor bacteriene identificate.

Trebuie remarcat faptul că unele mecanisme de rezistență nu conferă întotdeauna rezistență clinică. Acest fapt s-ar putea datora mecanismelor care nu sunt exprimate sau exprimate doar la un nivel scăzut, ceea ce nu va da naștere rezistenței fenotipice.

Prin urmare, în timp ce detectarea acestor mecanisme poate fi relevantă pentru controlul infecțiilor și sănătatea publică, este posibil să nu fie necesară în scopuri clinice.

Astfel în fișa privind rezultatul microbiologic ar trebui indicate comentarii interpretative în funcție de condiția bacteriană sau situația întâlnită (alte izolate decât cele urinare, alte izolate decât cele sistemice, ITU necomplicate, toate situațiile) privind fenotipurile de rezistență mai importante stipulate în EUCAST.

În consecință, pentru unele mecanisme, în special  $\beta$ -lactamazele cu spectru extins și carbapenemazele produse de bacili Gram negativi, detectarea mecanismului nu conduce automat la clasificarea izolatului ca rezistent clinic.

### 3.1. Metode recomandate pentru detectarea carbapenemazelor la *Enterobacterales*

#### Screening pentru producția de carbapenemază

CMI-urile la carbapeneme pentru *Enterobacterales* producătoare de carbapenemaze pot fi sub valorile clinice de interpretare. Cu toate acestea, pot fi utilizate valorile ECOFF definite de EUCAST pentru a detecta microorganismele producătoare de carbapenemaze.

Meropenemum oferă cel mai bun compromis între sensibilitate și specificitate în ceea ce privește detectarea producătorilor de carbapenemază. Ertapenemul este cel mai sensibil carbapenem, dar are specificitate redusă, în special la specii precum *Enterobacter* spp., datorită stabilității relativ reduse la  $\beta$ -lactamazele cu spectru extins (BLSE) și  $\beta$ -lactamazele *AmpC* în combinație cu pierderea porinelor (Tab. 2).

**Tabelul 2. Valorile de alertă pentru detectarea enterobacteriilor producătoare de Carbapenemaze**

Carbapenem	Cut-off pentru screening CMI (mg/L)	Cut-off pentru screening Diametru (mm) pentru discuri de 10 $\mu$ g
Meropenemum	> 0.125	< 28
Ertapenem	> 0.125	< 25



### **Metoda de testare a discurilor combinate**

Această metodă este disponibilă comercial de la mai mulți producători și a fost primul test fenotipic care a devenit disponibil (MAST, Marea Britanie; Rosco, Danemarca). Discurile sau comprimatele conțin meropenemum ± diverși inhibitori. Acidul boronic inhibă carbapenemazele din clasa A, acidul dipicolinic și acidul etilendiaminotetraacetic (EDTA) inhibă carbapenemazele din clasa B. Mai mult, OXA-48 este inhibat de avibactam, care până acum nu a fost inclus în testele fenotipice. Cloxacilina, care inhibă  $\beta$ -lactamazele AmpC, a fost adăugată testelor pentru a diferenția între hiperproducția AmpC plus pierderea de porină și producția de carbapenemază.

### **Testul Hodge**

Utilizarea testului Hodge modificat nu este recomandată în prezent, deoarece rezultatele sunt dificil de interpretat, specificitatea este slabă și, în unele cazuri, sensibilitatea este, de asemenea, scăzută.

### **Teste biochimice – colorimetrice**

Testul CarbaNP este un test rapid (<2 ore) pentru detectarea hidrolizei carbapenemului, care dă naștere la o modificare a pH-ului rezultând o schimbare a culorii de la roșu la galben cu soluție roșie de fenol.

Testul Carba NP a fost validat cu colonii bacteriene crescute pe plăci de agar Mueller-Hinton, plăci cu agar din sânge, plăci cu agar tripticază-soia și cele mai multe medii selective utilizate în screeningul producătorilor de carbapenemaze. Testul Carba NP nu trebuie efectuat cu colonii bacteriene cultivate pe plăci de agar Drigalski, CLED sau McConkey. Diferitele etape ale metodei trebuie să fie respectate întocmai pentru a obține rezultate reproductibile.

Un derivat al testului CarbaNP, testul Blue-Carba (BCT) este un test biochimic rapid (<2 ore) pentru detectarea producției de carbapenemaze. Se bazează pe hidroliza *in vitro* a imipenemului prin creștere bacteriană (inoculare directă fără liză prealabilă), care este detectată prin modificări ale pH-ului, evidențiate de indicatorul albastru bromtimol (albastru spre verde/galben sau verde spre galben). Într-o evaluare amplă efectuată de Pasteran și colab., dar efectuat într-un singur laborator, testul s-a dovedit a avea o sensibilitate excelentă pentru enzimele de clasă A și B, dar sensibilitate scăzută pentru detectarea enzimelor OXA-48.

Un al treilea test biochimic este testul  $\beta$  CARBA™, care poate fi efectuat și în mai puțin de 2h. Testul este realizat prin amestecarea a 1 până la 3 colonii în reactiv. Citirile trebuie făcute după maximum 30 min de incubație.

Schimbarea culorii de la galben la portocaliu, roșu sau violet indică o reacție pozitivă. Testul  $\beta$  Carba™ a arătat performanțe excelente pentru a detecta CPE și mai ales OXA-48. Cu toate acestea, capacitatea de a detecta alte carbapenemaze de clasa A trebuie verificată în continuare și unele rezultate fals pozitive au apărut cu alte  $\beta$ -lactamaze, cum ar fi supraproducția de K1  $\beta$ -lactamaza în *Klebsiella oxytoca*.

### **Metoda de inactivare a carbapenemului**

Principiul acestei metode este de a detecta hidroliza enzimatică prin incubarea unui carbapenem cu o suspensie bacteriană. Testul utilizează discuri de testare a sensibilității la antibiotice ca substrat. După două ore de incubare a unei anse de cultură bacteriană cu un disc de meropenemum, discul este plasat pe un agar inoculat cu *Escherichia coli* ATCC 25922.

Inactivarea enzimatică nu va produce nicio zonă, în timp ce lipsa activității carbapenemazice se va evidenția prin prezența unei zone de inhibiție, semn că meropenemumul din disc nu a fost hidrolizat. Testul a avut performanțe variabile în diferite studii, dar rămâne o alternativă posibilă, deși valoarea predictivă negativă a testului nu este încă clară. Un dezavantaj principal al acestei tehnici este că necesită de obicei cel puțin 18 ore pentru a obține rezultatele.

### **Detectarea hidrolizei carbapenemului cu MALDI-TOF**

Principiul este de a detecta prin tehnica de spectrometrie de masă (MALDI-TOF) scăderea sau dispariția anumitor spike-uri specifice de carbapeneme într-un spectru de masă, după o incubare cu carbapenem.

### **Test imunocromatografic**

Testul se bazează pe captarea imunologică a epitopilor enzimei carbapenemază, folosind nanoparticule de aur coloidale legate de o membrană de nitroceluloză într-un dispozitiv cu flux lateral.

Principiul testului este că anticorpii monoclonali anti-carbapenemază sunt selectați ca reactivi de captare specifici, pentru identificarea directă a enzimei. Testul durează aproximativ patru minute și a fost evaluat atât din culturi bacteriene cât și din flacoane de hemocultură pozitive.

## **3.2. Metode de detecție a BLSE la *Enterobacteriaceae***

Detectarea și caracterizarea BLSE este recomandată în scopul controlului infecției. Strategia recomandată pentru detectarea BLSE la *Enterobacteriaceae* este pe baza rezistenței la oximino-cefalosporine, urmată de teste de confirmare fenotipice (în unele cazuri, genotipice).

Pentru screening se recomandă utilizarea următoarelor cefalosporine: cefotaximum, ceftriaxonum, ceftazidimum și cefpodoximum, în conformitate cu liniile directe emise de EUCAST și CLSI.

Cefpodoximum este cel mai sensibil indicator individual pentru detectarea producției BLSE și poate fi utilizat pentru screening. Cu toate acestea, este mai puțin specific decât combinația de cefotaximum (sau ceftriaxonum) și ceftazidimum, acești compuși fiind utilizați și în testele de confirmare.



Diametrele zonelor corespunzătoare pentru cefalosporinele indicator sunt prezentate în tabelul 3.

**Tabelul 3. BLSE, metode de screening pentru Enterobacteriaceae**

Metoda	Antibiotic	Se efectuează testarea BLSE dacă
Diluție în bulion/agar*	Cefotaximum/Ceftriaxonum și Ceftazidimum	CMI >1 mg/l pentru fiecare
	Cefpodoximum	CMI >1 mg/L
Disc difuzie*	Cefotaximum (5 µg) sau Ceftriaxonum (30 µg) și Ceftazidimum (10 µg)	Zona de inhibiție <21 mm Zona de inhibiție <23 mm Zona de inhibiție <22 mm
	Cefpodoximum (10 µg)	Inhibition zone <21 mm

\* Cu toate metodele, se testează cefotaximum sau ceftriaxonum și ceftazidimum SAU cefpodoximum, singur.

### 3.2.1. Screening-ul BLSE pentru Enterobacteriaceae

1.1. Screening pentru grupul 1 Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Raoultella* spp., *P. mirabilis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.).

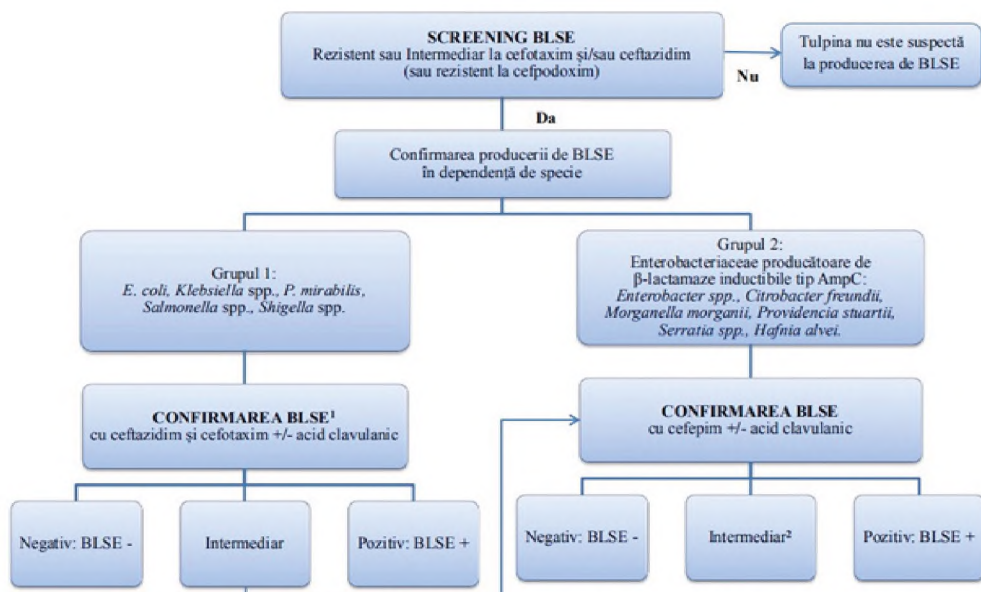
Metodele recomandate pentru screeningul BLSE din grup 1 Enterobacteriaceae sunt: diluții în bulion, disc difuzie sau sistemele automatizate. Este necesar ca atât cefotaximum (sau ceftriaxonum), cât și ceftazidimum să fie utilizate ca cefalosporine indicatoare, deoarece pot exista diferențe mari în CMI ale cefotaximumului (sau ceftriaxonumului) și ceftazidimumului pentru diferite tulpini producătoare de BLSE.

Algoritmul pentru screening și metodele fenotipice de confirmare BLSE pentru grupul 1 Enterobacteriaceae care sunt pozitive la testele de screening sunt descrise în Fig. 1, Tab. 4.

Screening pentru grupul 2 Enterobacteriaceae (*Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Hafnia alvei*)

Pentru *Enterobacteriaceae* din grupul 2, se recomandă efectuarea screening-ului și metodelor fenotipice de confirmare BLSE conform tehnicilor descrise mai sus pentru Enterobacteriaceae din grup 1 (Fig. 1, Tab. 5).

Cu toate acestea, un mecanism foarte comun de rezistență la cefalosporine este β-lactamaza AmpC cromozomială la aceste specii. Deoarece cefepimum este stabil la hidroliza AmpC, poate fi utilizat în testarea fenotipică cu acidum clavulanicum\*.



<sup>1</sup> Dacă cefoxitina a fost testată și are o CMI > 8 mg/L, efectuați testul de confirmare cu cefepim +/- acid clavulanic.

<sup>2</sup> Tulpina nu poate fi determinată ca fiind BLSE pozitivă sau negativă (de exemplu, dacă banda E-Test nu poate fi citită din cauza creșterii dincolo de intervalul CMI al benzii sau nu există o sinergie clară în testele discurilor combinate și dublu disc). În cazul în care confirmarea cu cefepim +/- acid clavulanic este neclară, atunci este necesară testarea genotipică.

**Figura 1. Algoritm de detecție fenotipică a BLSE**

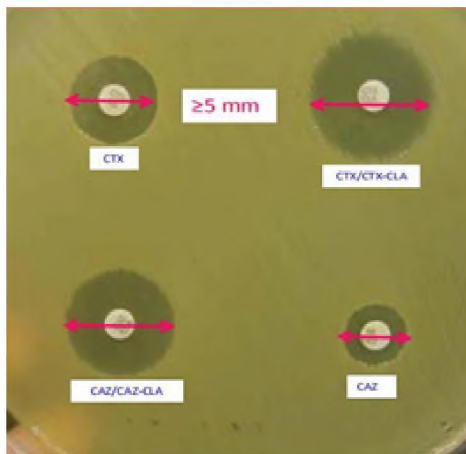
### 3.2.2. Metode fenotipice de confirmare

Pentru confirmarea BLSE sunt recomandate patru din multiplele metode fenotipice bazate pe inhibarea *in vitro* a activității BLSE de către acidum clavulanicum\*: testul disc combinat (CDT), testul de sinergie disc dublu (DDST), testul gradientului BLSE și microdiluție în bulion.

Într-un studiu de meta-analiză, CDT a arătat o specificitate mai bună decât BLSE test de gradient, dar cu sensibilitate comparabilă. Producătorii de sisteme automate de testare a sensibilității au implementat teste de detecție bazate pe inhibarea enzimelor BLSE de către acidum clavulanicum\*. Performanța metodelor de confirmare diferă în diferite studii, în funcție de colecția de tulpini testate și echipamentul utilizat.

#### 1. Test disc combinat

Pentru fiecare test, se aplică discuri sau tablete care conțin cefalosporine (cefotaximum, ceftazidim, cefepim) și în combinație cu



**Figura 2. Test disc combinat**



acidum clavulanicum\*. Zona de inhibiție din jurul discului sau tabletei cefalosporinei combinată cu acidum clavulanicum\* este comparată cu zona din jurul discului sau tabletei cu cefalosporina singură. Testul este pozitiv dacă diametrul zonei de inhibare este  $\geq 5$  mm mai mare la discul/tableta cu acidum clavulanicum\* decât fără (Fig. 2).

### 2. Test de sinergie dublu disc

Discurile care conțin cefalosporine (cefotaximum, ceftazidimum, cefepimum) sunt aplicate pe plăcă lângă un disc cu acidum clavulanicum\* (amoxicillinum + acidum clavulanicum\*). Un rezultat pozitiv este indicat atunci când zonele de inhibare din jurul oricăruia dintre discurile de cefalosporină sunt mărite sau când există un „orificiu de cheie” în direcția discului care conține acidum clavulanicum\*. Distanța dintre discuri este critică și s-a constatat că 20 mm centru-la-centru este optimă pentru discurile cu cefalosporine de 30  $\mu$ g; cu toate acestea, poate fi redus (15 mm) sau extins (30 mm) pentru tulpini cu niveluri foarte ridicate sau scăzute de rezistență. Recomandările trebuie reevaluate pentru discurile cu conținut mai scăzut de cefalosporină, așa cum este utilizat în metoda disc-difuzimetrică EUCAST (Fig. 3).

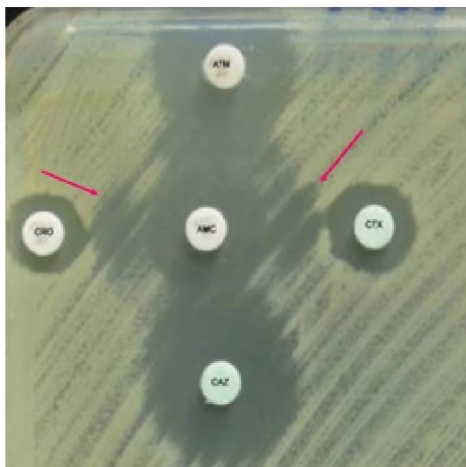


Figura 3. Test de sinergie dublu disc combinat

### 3. Metoda de test gradient

Testele de gradient specifice pentru BLSE sunt configurate, citite și interpretate în conformitate cu instrucțiunile producătorului. Testul este pozitiv dacă se observă o reducere de 8 ori a CMI cefalosporinei combinată cu acidum clavulanicum\* în comparație cu CMI a cefalosporinei singure sau dacă este prezentă o zonă fantomă sau o elipsă deformată (a se vedea instrucțiunile producătorului pentru ilustrații) (Fig. 4, 5).

Rezultatul testului este nedeterminat dacă banda nu poate fi citită din cauza creșterii dincolo de intervalul CMI al benzii. În toate celelalte cazuri, rezultatul testului este negativ. Potrivit producătorului, testul gradientului BLSE ar trebui utilizat numai pentru confirmarea producției de BLSE și nu este fiabil pentru determinarea CMI clinic.

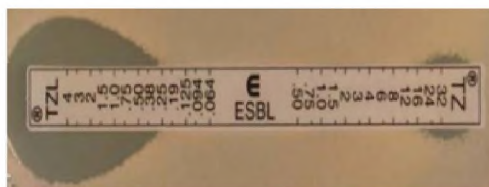


Figura 4. Reducerea CMI a ceftazidimum de  $\geq 3$  diluții în prezența clavulanatului sau raport ceftazidimum + clavulanat / ceftazidimum  $\geq 8$

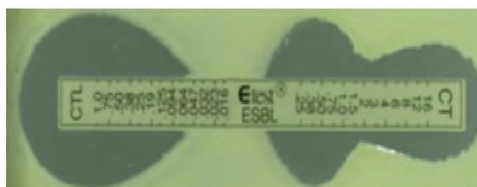


Figura 5. Elipsă deformată între cefotaximum/cefotaximum + clavulanat

#### 4. Microdiluția în bulion

Microdiluția în bulion se efectuează cu bulion Mueller-Hinton (ajustat cu cationi) care conține două diluții seriale de cefotaximum, ceftazidim și cefepim la concentrații cuprinse între 0,25 și 512 mg/l, cu și fără acidum clavulanicum\* la o concentrație fixă de 4 mg/l. Testul este pozitiv dacă se observă o reducere de 8 ori a CMI a oricăreia dintre cefalosporinele combinate cu acidum clavulanicum\* comparativ cu CMI al acelei cefalosporine fără acidum clavulanicum\*, altfel rezultatul testului este interpretat ca negativ (Fig. 6).

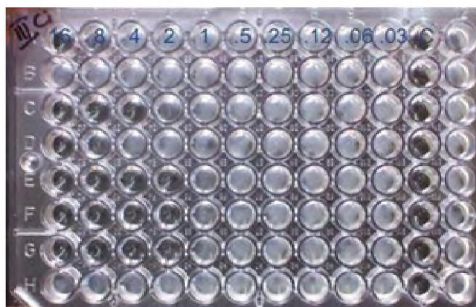


Figura 6. Microdiluție în bulion

#### 5. Testarea biochimică (colorimetrică)

Testul BLSE NDP a fost descris mai întâi în 2012 și folosește cefotaximum ca indicator antimicrobian, cu tazobactam ca inhibitor. Se realizează în plăci cu 96 de godeuri sau în tuburi separate. Schimbarea culorii de la roșu la galben este considerată un test pozitiv. Testul a fost, de asemenea, utilizat direct pe probe de pacienți. Au fost descrise sensibilități și specificități excelente, dar testul nu a fost evaluat în niciun studiu multicentric.

Hidroliza cefotaximumului de către BLSE duce la formarea acidului carboxilic care induce o schimbare a culorii de la roșu la galben. În cazul BLSE, această reacție poate fi inhibată de tazobactam (fig. 7).

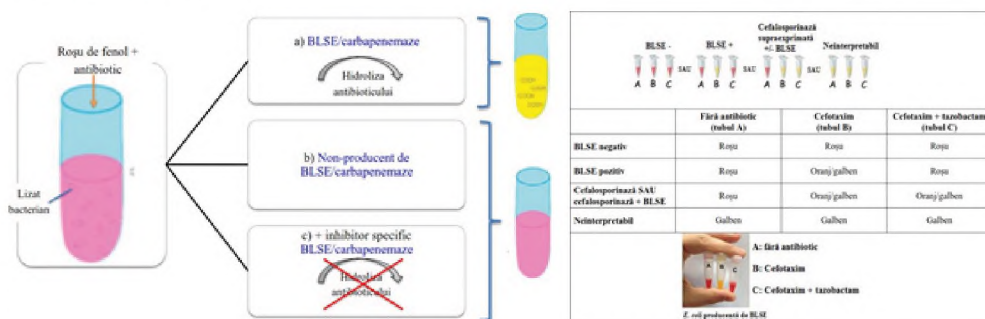


Figura 7. Principiul testării biochimice și interpretarea rezultatelor

### 3.2.3. Considerații speciale în interpretare

Testele de confirmare BLSE care utilizează cefotaximum ca indicator al cefalosporinei pot fi fals pozitive pentru tulpinile *Klebsiella oxytoca* cu hiperproducție a β-lactamazelor K1 cromozomiale (de tip OXY).

Un fenotip similar poate fi întâlnit și la *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Citrobacter koseri* și *Kluyvera* spp. și la unele specii legate de *C. koseri* precum *C. sedlakii*, *C. farmeri* și *C. amalonaticus*, care au β-lactamaze cromozomiale care sunt inhibitate de acidum clavulanicum\*.



O altă cauză posibilă a rezultatelor fals pozitive este hiperproducerea  $\beta$ -lactamazelor cu spectru larg asemănător cu SHV-1, TEM-1 sau OXA-1 combinate cu permeabilitatea modificată. Probleme similare cu rezultatele testelor fals pozitive pentru *K. oxytoca* producătoare de K1 sau pentru *E. coli* producătoare de OXA-1 pot apărea, de asemenea, atunci când se utilizează teste de confirmare bazate doar pe cefepimum.

**Tabelul 4. Metode de confirmare BLSE pentru *Enterobacteriaceae* grup 1, care sunt pozitive la screening-ul BLSE**

Metoda	Substanța antimicrobiană	Confirmarea BLSE (+) dacă
BLSE gradient test	Cefotaximum +/- acidum clavulanicum*	CMI $\geq 8$ sau prezența elipsei deformate
	Ceftazidimum +/- acidum clavulanicum*	CMI $\geq 8$ sau prezența elipsei deformate
Test disc difuzie combinat	Cefotaximum (30 $\mu$ g) +/- acidum clavulanicum* (10 $\mu$ g)	$\geq 5$ mm mărire a zonei de inhibiție
	Ceftazidimum (30 $\mu$ g) +/- acidum clavulanicum* (10 $\mu$ g)	$\geq 5$ mm mărire a zonei de inhibiție
Microdilutii în bulion	Cefotaximum +/- acidum clavulanicum* (4 mg/l)	CMI $\geq 8$
	Ceftazidimum +/- acidum clavulanicum* (4 mg/l)	CMI $\geq 8$
	Cefepimum +/- acidum clavulanicum* (4 mg/l)	CMI $\geq 8$
Test sinergic dublu disc	Cefotaximum, ceftazidimum și cefepimum	Extinderea zonei de inhibiție a cefolosporinelor către discul de amoxicilinum/acidum clavulanicum*

**Tabelul 5. Metode de confirmare BLSE pentru *Enterobacteriaceae* grup 2 care sunt pozitive în screening-ul BLSE**

Metoda	Substanța antimicrobiană	Confirmarea BLSE (+) dacă
BLSE gradient test	Cefepimum +/- acidum clavulanicum*	CMI $\geq 8$ sau prezența elipsei deformate
Test disc difuzie combinat	Cefepimum (30 $\mu$ g) +/- acidum clavulanicum* (10 $\mu$ g)	$\geq 5$ mm mărire a zonei de inhibiție
Microdilutii în bulion	Cefotaximum +/- acidum clavulanicum* (4 mg/l)	CMI $\geq 8$
	Ceftazidimum +/- acidum clavulanicum* (4 mg/l)	CMI $\geq 8$
	Cefepimum +/- acidum clavulanicum* (4 mg/l)	CMI $\geq 8$
Test sinergic dublu disc	Cefotaximum, ceftazidimum și cefepimum	Extinderea zonei de inhibiție a cefolosporinelor către discul de amoxicilinum/acidum clavulanicum*

## Detectarea fenotipică a BLSE în prezența altor $\beta$ -lactamaze care maschează sinergia

Rezultatele testelor nedeterminate și rezultatele testelor fals negative (Test disc difuzie combinat, Test sinergic dublu disc, Etest® și microdiluție de bulion) pot rezulta din expresia la nivel înalt a  $\beta$ -lactamazelor AmpC, care maschează prezența BLSE.

Izolate cu expresie la nivel înalt de  $\beta$ -lactamaze AmpC de obicei prezintă o rezistență clară la cefalosporinele de generația a treia. În plus, rezistența la cefamicină, de ex. CMI a cefoxitinului\* >8mg/l, poate fi indicativă pentru exprimarea la nivel înalt a  $\beta$ -lactamazelor AmpC, excepție fiind  $\beta$ -lactamazele ACC, care nu conferă rezistență la cefoxitinum\*.

Pentru a confirma prezența BLSE în izolatele cu expresie la nivel înalt de  $\beta$ -lactamaze AmpC, se recomandă efectuarea unui test suplimentar de confirmare a BLSE cu cefepimum ca indicator al cefalosporinei, deoarece cefepimum nu este în general hidrolizată de  $\beta$ -lactamaze AmpC. Cefepimum poate fi utilizată în toate formatele CDT, DDST, gradient test sau microdiluții în bulion.

Abordările alternative includ utilizarea cloxacilinei, care este un bun inhibitor al enzimelor AmpC. Formatele de testare includ CDT cu discuri care conțin cei doi indicatori de cefalosporină (cefotaximum și ceftazidimum) cu acidum clavulanicum\* și cloxacillinum împreună și CDT standard sau DDST pe plăci de agar suplimentate cu 200-250 mg/l cloxacillinum.

Sunt prezente comercial discuri sau tablete gata de utilizare care conțin atât acidum clavulanicum\*, cât și cloxacillinum, dar există o validare insuficientă a acestor produse.

Prezența BLSE poate fi, de asemenea, mascată de carbapenemaze, cum ar fi MBL sau KPC (excepție OXA-48) și/sau defecte severe de permeabilitate. Dacă detectarea este încă considerată relevantă în astfel de cazuri, ar trebui utilizate metode moleculare pentru detectarea BLSE.

### 3.2.4. MALDI-TOF MS

Metodă utilizată recent pentru detectarea rezistenței mediate de  $\beta$ -lactamaze printre bacteriile Gram negative. MALDI-TOF-MS a fost o revoluție în domeniul identificării speciilor. Este adoptată din ce în ce mai mult pentru detectarea rezistenței antimicrobiene (RAM), iar această aplicație va deveni probabil o parte esențială de rutină a laboratorului în viitorul apropiat.

În ceea ce privește detectarea MDR *Enterobacteriales*, există trei abordări promițătoare pentru aplicația MALDI-TOF MS disponibile: detectarea activității  $\beta$ -lactamazei, estimarea efectului antibioticelor asupra creșterii bacteriilor și detectarea directă a biomarkerilor (de exemplu, enzime sau modificări ale țintei) asociate cu RAM.

Testul de hidroliză MALDI-TOF-MS este efectuat cu cefotaximum și în combinație cu acidum clavulanicum\*, este o metodă utilă rapidă, ieftină și ușor de realizat pentru detectarea bacteriilor gram negative producătoare de BLSE, care oferă informații valoroase pentru stabilirea timpurie a unui tratament adecvat (Fig. 8).



Această metodă oferă o bună sensibilitate și specificitate în cazul hemoculturii pozitive sau microorganismelor din culturi. Sensibilitatea poate fi redusă la probele de urină, explicată printr-o cantitate insuficientă de bacterii obținute din probă directă. Pentru realizarea acestui test din probele clinice directe este necesară o optimizare suplimentară a testului de hidroliză.

Protocoloalele pentru *Enterobacteriales* nu sunt încă validate pentru utilizarea de rutină în laborator, dar sunt abordări promițătoare pentru viitorul apropiat. Deocamdată, biomarkerii permit detectarea câtorva determinanți de rezistență selectați și, prin urmare, este încă necesară confirmarea rezultatelor negative prin metode de testare fenotipice.

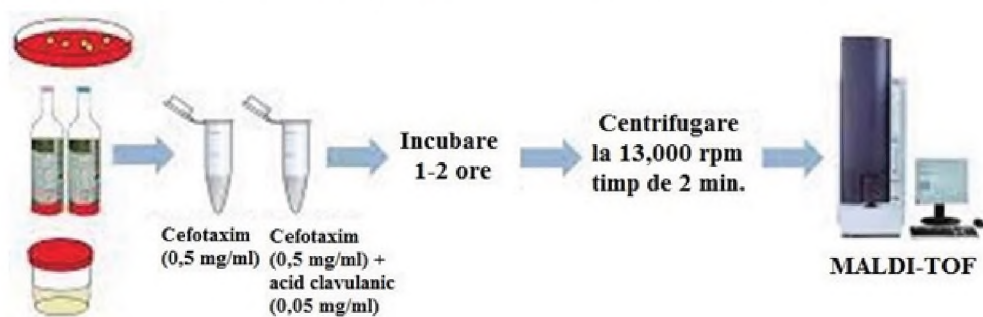


Figura 8. Tehnica de detecție a BLSE prin MALDI-TOF

### 3.2.5. Confirmarea mecanismelor prin tehnici de biologie moleculară

Pentru confirmarea genotipică a prezenței genelor BLSE există o serie de posibilități disponibile, de la PCR și secvențierea parțială la secvențierea întregului genom, urmată de cartografierea în silico a genelor de rezistență. Există, de asemenea, diferite microarrays disponibile. Există atât metode comerciale, cât și metode interne, dar acestea nu au fost examinate în mod sistematic și, prin urmare, nu vor fi detaliate în acest document.

Metodele moleculare au cea mai mare sensibilitate și specificitate pentru detectarea genelor de rezistență și pot fi aplicate izolatelor cultivate sau direct specimenelor clinice. Ele pot oferi informații exacte despre tipul enzimei BLSE sau carbapenemază și au un timp relativ scurt până la rezultat.

Deși metodele moleculare au dezavantajul de a necesita personal calificat și suportă costuri ridicate pentru echipamente tehnice și consumabile, numărul laboratoarelor care utilizează aceste tehnici este în creștere. Acest lucru se datorează în parte numărului în continuă creștere de metode și teste diferite disponibile în comerț. În special, screening-urile BLSE și carbapenemaze la internarea în spital beneficiază de rezultate rapide fără pași de cultivare prealabili.

Pentru detectarea simultană a mai multor gene țintă, PCR multiplex și microarrays sunt metodele de alegere. Aceste teste oferă o imagine mai cuprinzătoare a peisajului de rezistență al unui izolat, deoarece multe izolate adăpostesc gene de rezistență multiple.

Un avantaj major al detectării genelor de rezistență este că nivelurile scăzute de expresie și activitățile catalitice nu influențează rezultatul, permițând detectarea β-lactamazelor cu activitate scăzută.

Un dezavantaj este că numai genele vizate în test pot fi detectate. Prin urmare, testele multiplex PCR și microarray trebuie să fie îmbunătățite și extinse continuu odată cu apariția de noi gene de rezistență. La fel, există un risc de raportare a rezistenței excesive datorită genelor inactivate sau neexprimate și nu este potrivit pentru detectarea expresiei genelor.

În detectarea directă, genele de rezistență pot fi transportate prin microorganismele comensale.

Pentru a detecta pacienții care adăpostesc bacterii MDR la internarea în spital, este util să se selecteze teste care pot fi efectuate direct din tampoane rectale. Un exemplu este kitul BLSE ELITE MGB (ELITechGroup, Puteaux, Franța). Este un test multiplex RT-PCR pentru detectarea genelor CTX-M și poate fi utilizat pe hemoculturi sau tampoane rectale. Testul a avut rezultate bune, prezentând 100% sensibilitate și 96,6% specificitate.

Un alt test multiplex PCR în timp real specific pentru detectarea bacteriilor producătoare de BLSE este Check-Direct BLSE pentru BD MAX care poate detecta familiile de gene BLSE CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9 și SHV-BLSE. Cu toate acestea, sensibilitatea acestui test a fost de 95,2%, dar a fost evaluată doar pe un număr mic de eșantioane pozitive BLSE (n = 21). Specificitatea a fost ușor mai mare de 97,6%.

Next generation sequencing (NGS) este din ce în ce mai utilizată în laboratoarele microbiologice, în principal în instituțiile de referință și cercetare. Secvența ADN-ului unui genom bacterian poate fi obținută într-o singură etapă de secvențiere și este folosită cu mare succes în determinarea genelor de rezistență la antibiotice (GRA) și la tipizarea agenților patogeni în focarele din spital.

NGS poate fi utilizată pentru analiza aprofundată a izolatelor individuale, dar permite, de asemenea, identificarea fără culturi a bacteriilor și GRA direct din probe complexe, cum ar fi mase fecale.

Noile instrumente bioinformatiche inovatoare nu numai că permit detectarea GRA-urilor bine descrise, dar permit și identificarea genelor de rezistență necaracterizate anterior din datele de secvențiere metagenomică a microbiotei umane.

Pe de altă parte, genotipul unui izolat bacterian nu se traduce precis în fenotipul său de rezistență. Până în prezent, nu există dovezi suficiente pentru a deduce sensibilitatea la antibiotice din datele secvențiale ale întregului genom pentru a ghida luarea deciziilor clinice.

Toate aceste aplicații fac din NGS un instrument valoros pentru identificare, supraveghere și cel mai probabil pentru luarea deciziilor clinice viitoare în ceea ce privește MDRE. Odată cu scăderea costurilor pentru investiția inițială într-o platformă NGS, scăderea costurilor pe parcurs și dezvoltarea unui software bioinformatic accesibil, această tehnică va fi inevitabil încorporată în practica microbiologică de rutină.



Cu toate acestea, standardizarea protocoalelor, problemele de control al calității și capacitățile bioinformatice sunt obstacole serioase care trebuie abordate înainte ca de a implementa pe o scară mai largă în laboratoarele de microbiologie clinică.

Antibiograma moleculară nu poate fi privită ca un test independent, care înlocuiește antibiograma convențională, însă mai degrabă ca un test adițional care poate furniza câteva informații suplimentare utile. Investigația moleculară a RAM este un instrument cheie pentru a înțelege mai bine prezența și diseminarea clonelor bacteriene cu risc ridicat, mecanismele de rezistență și orice elemente genetice mobile asociate.

### 3.2.6. Metode bazate pe cultură

#### Screening cu medii selective cromogene și necromogene

Ghidul ESCMID privind gestionarea bacteriilor gram-negative multirezistente (GNB) consideră tampoane rectale, urină sau secreții respiratorii ca specimen adecvat privind colonizarea cu enterobacterii MDR.

Mediile selective sunt adecvate pentru screeningul probelor de pacienți pentru enterobacteriile care produc BLSE și carbapenemază. Frecvent, mediile sunt suplimentate cu cromogeni care permit identificarea prezumtivă a speciilor folosind enzime specifice speciei, și anume  $\beta$ -galactozidaza,  $\beta$ -glucuronidaza și deaminaza.

Sunt disponibile mai multe medii agarizate pentru detectarea BLSE, inclusiv CHROMagar BLSE (CHROMagar, Franța), agar chromID BLSE (bioMérieux, Franța), agar cromogen BLSE (Condalab, Spania), agar cromogen BLSE (SGL, UK), BLSE ChromoSelect Agar (Merck, Germania), CHROMagar TM BLSE (Mast Group, UK), Agar cromatic BLSE (Liofilchem, Italia), Brilliance BLSE agar (Oxoid, UK), BLSE agar (AES Laboratoire, Franța) și altele.

Majoritatea mediilor cromogene de screening a BLSE conțin o cefalosporină cu spectru extins (de exemplu, cefpodoximum) și un amestec de antibiotice pentru a inhiba creșterea bacteriilor care nu produc BLSE. Unele medii (de ex., CHROMagar BLSE, chromID BLSE și Brilliance BLSE) conțin, de asemenea, inhibitori AmpC suplimentari.

Evident, performanța diferitelor medii cromogene de screening poate varia în funcție de tipul de  $\beta$ -lactamază și de organismul analizat. Prin urmare, alegerea corectă a agarului cromogen trebuie adaptată obiectivelor specifice și peisajului epidemiologic al instituției medicale. În timp ce ușurința de utilizare și experiența în laboratoarele de microbiologie sunt argumente bune în favoarea agarului cromogen, această tehnică are unele dezavantaje.

Acestea includ o frecvență relativ ridicată de creștere nespecifică pe plăci, rezultând o prelucrare considerabilă ulterioară, probleme în detectarea unor  $\beta$ -lactamaze (de ex., OXA-48 like) și lipsa de informații cu privire la tipul de  $\beta$ -lactamază prezent. Prin urmare, este necesar un lucru suplimentar pentru a evalua sensibilitatea și a identifica varianta de BLSE sau carbapenemază.

### 3.3. *Enterobacterales* producătoare de AmpC $\beta$ -lactamază

Cefalosporinazele de tip AmpC sunt  $\beta$ -lactamaze Ambler clasa C. Hidrolizează penicilinele, cefalosporinele (inclusiv a treia generație, dar în general nu a patra generație) și monobactami. În general, enzimele de tip AmpC sunt slab inhibate de inhibitori clasici ai BLSE, în special acidum clavulanicum\*.

Numeroase *Enterobacterales* și alți bacili Gram-negativi produc AmpC naturale, fie constitutiv la un nivel jos (de exemplu, *E. coli*, *Shigella* spp.), fie inductibil (de exemplu, *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*). Depresarea sau hiperproducția AmpC-urilor naturale se datorează diferitelor modificări genetice și conferă rezistență la nivel înalt la cefalosporine și la combinațiile penicilinelor cu inhibitori ai  $\beta$ -lactamazei.

#### Metode recomandate pentru detectarea AmpC dobândită la *Enterobacterales*

Un CMI la cefoxitinum\* > 8 mg/L (diametrul zonei <19 mm) combinat cu rezistența fenotipică la ceftazidimum și/sau cefotaximum (așa cum este definită de punctele de ruptură) poate fi utilizată drept criteriu fenotipic pentru investigarea producției de AmpC la *Enterobacterales* din grupa 1, deși această strategie nu va detecta ACC-1, o AmpC mediată de plasmide care nu hidrolizează cefoxitinum\*. Trebuie remarcat faptul că rezistența la cefoxitinum\* se poate datora și deficitului de porine.

#### Rezistența bacililor Gram-negativi la polymyxinum B

Rezistența dobândită la polymyxinum la *Enterobacterales* a apărut în ultimii ani în întreaga lume.

Este în special îngrijorătoare apariția rezistenței mediate de plasmide atât la animale, produse alimentare și oameni, deoarece există o tendință accentuată spre diseminare orizontală.

Laboratoarele trebuie să utilizeze întotdeauna metoda microdiluțiilor în bulion pentru testarea sensibilității la colistinum și să utilizeze întotdeauna sulfat de colistinum. Mai exact, difuzimetria cu disc și testele de gradient nu trebuie utilizate, deoarece acestea sunt asociate cu un risc ridicat de erori mari și foarte mari ("major error" și "very major error").

Controlul calității trebuie efectuat atât cu o tulpină de control sensibilă (*E. coli* ATCC 25922 sau *P. aeruginosa* ATCC 27853) și *E. coli* rezistent la colistinum NCTC 13846 (mcr-1 pozitiv). Pentru *E. coli* NCTC 13846, valoarea țintă a CMI este de 4 mg/L și doar ocazional poate fi 2 sau 8 mg/L.



### 3.4. *Salmonella* spp. rezistentă la fluorochinolone

Fluorochinolonele (FQ) se enumeră printre medicamentele de elecție pentru tratamentul infecțiilor cu *Salmonella*. Cu toate acestea, rezistența la fluorochinolone este în creștere la tulpinile de *Salmonella* din cauza mutațiilor cromozomiale în regiunile care determină rezistența la chinolone (QRDR) ale genelor topoizomerazei *gyrA*, *gyrB*, *parC* și *parE* și/sau mecanisme de rezistență la chinolone mediată de plasmide (PMQR), inclusiv variantele *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* și *oqxAB*.

Unele dintre aceste mutații provoacă doar creșteri subtile ale CMI, adică CMI variind de la 0,12 la 0,25 mg/l pentru ciprofloxacinum (chiar peste CMI de tip sălbatic de  $\leq 0,06$  mg/l). Aceste izolate sunt dificil de detectat prin metoda discdifuzimetrică cu utilizarea discului de ciprofloxacinum, iar rezistența mediată de plasmide, cum ar fi *qnr*, nu este adesea detectată de testul de screening cu acidum nalidixicum\*.

Pentru detectarea mecanismelor de rezistență la fluorochinolone, metoda de screening cu pefloxacinum 5  $\mu$ g s-a dovedit a fi mai sensibilă decât utilizarea acidului nalidixic sau a altor chinolone.

Testele cu un disc de ciprofloxacinum 5  $\mu$ g nu vor detecta în mod fiabil rezistența scăzută a *Salmonella* spp. Pentru a testa rezistența la ciprofloxacinum a *Salmonella* spp., este indicată utilizarea metodei disc-difuzimetrică cu pefloxacin 5  $\mu$ g. ( $S \geq 24$ ).

**Testul disc-difuzimetric cu Cefoxitinum\* 30 $\mu$ g**

Se realizează efectuând antibiograma prin metoda disc-difuzimetrică (MDD) cu Cefoxitinum\* 30 $\mu$ g, care este cel mai bun inductor al genei *mecA*, iar testele cu cefoxitinum\* dau rezultate mai reproductibile și precise decât testele cu oxacilinum. Metoda disc-difuzimetrică cu oxacilinum nu este binevenită, iar diametrele zonelor de interpretare nu mai sunt incluse în tabelul valorilor de referință EUCAST din cauza corelației slabe cu prezența *mecA*.

Dacă se testează la oxacilinum și interpretarea diferă de cefoxitinum\*, se recomandă efectuarea investigațiilor fenotipice sau genotipice la *mecA* sau *mecC*. Dacă diametrul zonei de inhibiție a cefoxitinum\* (30  $\mu$ g) < 22 mm, izolatul este evaluat ca metilino-rezistent, dacă este mai >22 mm, izolatul este metilino-sensibil (Tab. 6).

**Tabelul 6. Testul cu cefoxitinum\* pentru suspecția prezenței genei *mecA***

	Zona în jurul cefoxitinului* (mm)	
	Rezistent	Sensibil
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤21*	≥22**
<i>Staphylococcus coagulazo-negativ</i> (SCN)	≤24*	≥25**

\*Se raportează ca rezistent la oxacilinum

\*\*Se raportează ca fiind sensibil la oxacilinum

Există situații în care rezultatul obținut la testarea cu cefoxitinum\* este verificat cu un test suplimentar: zonă de inhibiție la cefoxitinum\* de 21-23 mm și în cazul infecțiilor invazive; pentru aceste situații se consideră drept rezultat final cel al testului suplimentar:

- determinarea CMI la oxacilinum
- detectarea prezenței PBP2a
- detectarea prezenței *mecA* sau *mecC*

Dacă gena *mecA* este detectată aleatoriu sau datorită screening-ului izolatul trebuie întotdeauna raportat rezistent, din cauza eșecului terapeutic probabil.

**Metoda determinării concentrației minim inhibitoare (CMI)**

Dacă CMI la cefoxitinum\* este >4 mg/l, izolatul este evaluat ca metilino-rezistent. Testul poate fi efectuat prin benzi E-test, microdiluție în bulion sau metode automatizate.

Etest este o bandă de hârtie subțire, inertă și poroasă acoperită cu antibiotic în gradient de concentrație de la 0,016 mcg/ml până la 256 mcg/ml. Ambele părți ale benzii sunt imprimate cu scara de citire a CMI în mcg/ml și cu simbolul antibioticului imprimat pe partea superioară a benzii.



Tehnica efectuării:

- Se aplică banda "E-TEST" pe suprafața unei plăci cu mediu agarizat, preînsămânțată cu tulpina testată.
- Se incubează la 35-37°C timp de 18 ore.
- După incubare, va apărea o elipsă care intersectează srala de citire CMI (în µg/ml), unde concentrația antibioticului testat inhibă creșterea microorganismelor.

Interpretare:

Valoarea CMI poate fi citită acolo unde marginea elipsei de inhibare intersectează partea laterală a benzii, concentrația înscrisă pe bandă la acest nivel indică valoarea CMI.

### ***Detectarea MRSA cu test rapid imunocromatografic***

Testarea rapidă în infecțiile cu MRSA este esențială pentru a identifica cât mai devreme și să fie luate măsuri pentru a asigura implementarea corectă a tratamentului. Testarea rapidă a MRSA ajută la reducerea utilizării empirice a vancomicei și permite luarea deciziilor rentabile pentru un management optim al pacientului.

Testul rapid este un test imunocromatografic care folosește anticorpi monoclonali pentru a ajuta la detectarea MRSA direct din izolatele bacteriene în cinci minute. Rezultatul este disponibil cu cel puțin o zi mai devreme, decât testele standart de sensibilitate la antimicrobiene și a fost creat pentru a modifica și îmbunătăți eficient regimurile de tratament pentru pacienți cu infecții cauzate de *S. aureus*.

### ***Metoda detectării calitative directe pe medii cromogene a MRSA***

Mediile cromogene (ex. CHROMagar MRSA, CHROMID MRSA, Chromogenic MRSA Screening Agar, BBL-CHROMagar MRSA) conțin unii agenți selectivi ce inhibă creșterea microorganismelor gram-negative, a levurilor și a unor coci gram pozitivi.

Amestecul cromogen constă din substraturi artificiale (cromogeni), ce se eliberează, când sunt hidrolizate de enzimele specifice, un compus colorat insolubil. Aceasta facilitează etectarea și diferențierea *S. aureus* de alte microorganisme. *S. aureus* utilizează unul din substraturile cromogene, producând colonii specifice mediului utilizat.

### ***Test latex-aglutinare pentru PBP2'***

Acest test este un test rapid de latex-aglutinare pentru detectarea PBP2' (numit și PBP2a), din izolatele de *Staphylococcus*, ca ajutor în identificarea MRSA și stafilococilor coagulazo-negativi rezistenți la meticilinum. Testul de latex aglutinare are avantajul unui timp de răspuns rapid de la izolarea unui microorganism până la determinarea sensibilității. Testul furnizează rezultate în maxim 20 de minute și a gestionează cu ușurință procesarea simultană a unui număr mare de probe.

## Metode moleculare genetice pentru detecția MRSA

Testul PCR este considerat a fi standardul de aur pentru detectarea MRSA. Cu toate acestea, această metodă necesită prea mult timp și este costisitoare pentru a fi practică într-un laborator de microbiologie clinică.

Testele de amplificare a acidului nucleic, cum ar fi reacția de polimerizare în lanț (PCR), pot fi utilizate pentru detectarea directă a genei *mecA*, cea mai frecventă genă care mediază rezistența la oxacilinum la stafilococi. Cu toate acestea, testele *mecA* PCR nu vor detecta noi mecanisme de rezistență, cum ar fi *mecC* sau fenotipuri neobișnuite, cum ar fi rezistența la limită a oxacilinei la limită (BORSA).

### ***Staphylococcus aureus* rezistent la vancomycinum**

VRSA: *S. aureus* rezistent la vancomycinum: *S. aureus* cu rezistență la nivel înalt la vancomycinum (CMI > 8 mg/L).

VISA: *S. aureus* intermediar la vancomycinum: *S. aureus* cu rezistență scăzută la vancomycinum (CMI 4 – 8 mg/L).

hVISA: *S. aureus* heterogen intermediar la vancomycinum: *S. aureus* sensibil la vancomycinum (CMI ≤ 2 mg/L), dar cu populații minoritare (1 din 106 celule) cu CMI la vancomycinum > 2 mg/L, observat prin analiza profilului populației bacteriene.

Trebuie remarcat faptul că, deși acești termeni se utilizează în continuare, toate categoriile menționate mai sus trebuie considerate rezistente din punct de vedere clinic.

CMI trebuie determinat întotdeauna atunci când se utilizează vancomycinum pentru a trata un pacient cu infecție severă cu *S. aureus*. În cazuri selectate, de ex. când este suspectat eșecul terapeutic, în special în infecții sistemice, testarea pentru hVISA poate fi, de asemenea, justificată (prezența hVISA este considerat factor de prognostic pentru o evoluție nefavorabilă). Datorită complexității confirmării hVISA, supravegherea antimicrobiană este axată pe detectarea VISA și VRSA.

## Metode recomandate pentru detectarea rezistenței la vancomycinum

Metoda disc difuzimetrică nu poate fi utilizată pentru a detecta hVISA, VISA, sau VRSA.

**Determinarea CMI** – Metoda microdiluțiilor în bulion recomandată de EUCAST (ISO 20776-1) este standardul de aur.

Trebuie remarcat faptul că rezultatele obținute prin metoda gradientului pot fi cu 0,5-1 diluții duble mai mari decât rezultatele obținute prin microdiluția în bulion. Valorile de interpretare pentru rezistența la vancomycinum la *S. aureus* este CMI > 2 mg/L. Izolatele cu CMI confirmat > 2 mg/L (conform metodei microdilutiei în bulion) trebuie trimise la laboratorul de referință.

Fenotipul hVISA nu poate fi detectat prin determinarea CMI.



## V

## Metode de determinare a rezistenței la vancomycinum pentru *Enterococcus faecium* și *Enterococcus faecalis*

Mecanismul rezistenței la vancomycinum la enterococi este bine studiat. Există nouă tipuri identificate de gene de rezistență la vancomycinum: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* și *vanN*. Cel mai predominant tip la nivel mondial este *vanA*. Gena *vanA* conferă un grad înalt de rezistență la vancomycinum și teicoplaninum și este asociată în principal cu *Enterococcus faecium* rezistent la vancomycinum. Gena *vanB* conferă enterococilor un grad ridicat de rezistență la vancomycinum, dar sunt sensibili la alte glicopeptide precum teicoplaninum, deoarece numai vancomycinum poate să inducă tipul de rezistență *vanB*.

**Tabelul 7. Valorile concentrației minime inhibitorii ale glicopeptidelor la tulpinile de VRE în funcție de substratul genetic.**

Glicopeptide	CMI (mg/L)	
	VanA	VanB
Vancomycinum	64 – 1024	4 – 1024
Teicoplaninum	8 – 512	0.06 – 1

Alte specii de enterococi (*E. raffinosus*, *E. gallinarum* și *E. casseliflavus*) pot conține genele *vanA*, *vanB* sau alte gene *van* care codifică enzimele enumerate mai sus, dar aceste tulpini se întâlnesc relativ rar. Enzimele VanC codificate cromozomial se găsesc la toate izolatele de *E. gallinarum* și *E. casseliflavus*. *VanC* mediază rezistența la vancomycinum de nivel scăzut (CMI 4-16 mg/L), dar acest fenomen nu este considerat important din punct de vedere al controlului infecției.

Rezistența la vancomycinum poate fi detectată prin determinarea CMI, metoda disc difuzimetrică și metoda punctelor de ruptură în agar. Pentru toate cele trei metode, este esențial ca plăcile să fie incubate timp de 24 de ore. Toate cele trei metode detectează cu ușurință rezistența mediată de *vanA*. Detectarea rezistenței mediată de *vanB* este mai dificilă. Determinarea CMI prin diluții în agar sau în bulion nu este întotdeauna fiabilă pentru *VanB*.

Atunci când se interpretează rezultatele testului CMI (Tab. 7) sau disc difuzimetric, este importantă verificarea că izolatul nu este *E. gallinarum* sau *E. casseliflavus*, care pot fi identificați în mod eronat ca *E. faecium*.

**Determinarea CMI** poate fi efectuată prin diluții în agar, microdiluții în bulion sau gradient CMI. Microdiluția în bulion se realizează conform standardului ISO 20776-1, așa cum este recomandat de EUCAST.

Pentru metoda disc difuzimetrică, se inspectează zonele pentru margini neclare și/sau microcolonii cu lumină transmisă. Tulpinile la care diametrul este mai mare valoarea indicată în tabelele EUCAST și marginile zonei de inhibiție sunt clar delimitate pot fi raportate ca fiind sensibile la vancomycinum. Izolatele cu marginile zonei de inhibiție neclare sau colonii în interiorul zonei sunt rezistente indiferent de dimensiunea zonei și nu se raportează sensibile fără confirmare prin determinarea CMI. Metoda disc difuzimetrică este efectuată în conformitate cu metodologia testării la antimicrobiene pentru microorganismele nepretențioase. Este nevoie de incubare pentru 24 de ore pentru a detecta rezistența.

**Metoda diluțiilor în agar** utilizează agar infuzie cord-creier și 6 mg/L vancomycinum. Plăcile pot fi obținute de la producători comerciali sau preparate în laborator. Testul se realizează prin aplicarea a  $1 \times 10^5$  –  $1 \times 10^6$  UFC (10  $\mu$ l dintr-o suspensie de 0,5 McFarland) pe agarul infuzie cord-creier suplimentat cu vancomycinum. Este necesară incubarea timp de 24 de ore la  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  în atmosferă aerobă pentru a detecta rezistența la izolatele cu rezistență inductibilă. Creșterea mai multor colonii este considerată ca test pozitiv.

**Testarea genotipică** – rezistența la vancomycinum poate fi detectată de asemenea prin utilizarea PCR care vizează genele *vanA* și *vanB* folosind metode interne "in house" sau comerciale.



1. Metode screening
  - a) Disc-difuzimetrică cu oxacilinum;
  - b) Test gradient pentru determinarea CMI a penicilinei (Banda E-test).
  - c) Determinarea CMI cu diluții în agar
2. Metode molecular-genetice.

### Metoda disc-difuzimetrică

Metoda disc difuzimetrică cu oxacilinum 1 $\mu$ g este un screening eficient pentru detectarea pneumococilor non-sensibili la penicilinum. Metoda este foarte sensibilă, dar nu este specifică pentru tulpinile cu diametrele zonei de inhibiție  $\leq 19$  mm, ce pot avea sensibilitate variabilă la penicilinum. La astfel de tulpini trebuie determinată CMI a benzylpenicillinum\*, cât și pentru toate izolatele care nu sunt sensibile la testul de screening. Pentru  $\beta$ -lactame altele decât benzylpenicillinum\* diametrul zonei de inhibiție a oxacilinei poate fi utilizat pentru a exclude toate mecanismele de rezistență la  $\beta$ -lactame.

- a) *Screening-ul rezistenței la  $\beta$ -lactame a *S. pneumoniae* prin metoda disc-difuzimetrică (disc cu oxacilinum 1 $\mu$ g).*

### Oxacilinum $\geq 20$ mm

Toți agenții  $\beta$  lactamici pentru care sunt disponibile valori de interpretare (inclusiv cele cu „Notă”) din EUCAST, se raportează sensibili indiferent de indicația clinică, cu excepția cefalorumului, care trebuie raportat, “sensibil, cu expunere înaltă” (I).

### Oxacilinum $< 20$ mm

Benzylpenicillinum\* (meningită) și phenoxymethylpenicillinum (toate indicațiile) se raportează ca rezistente; benzylpenicillinum\* (alte indicații decât meningita) se determină întotdeauna CMI la penicilinum și se raportează în conformitate cu valori clinice de interpretare conform EUCAST.

### Oxacilinum $\geq 8$ mm

Se raportează sensibil următoarele antimicrobiene: ampicillinum, amoxicillinum și piperacillinum (cu și fără inhibitor de  $\beta$ -lactamază), cefepimum, cefotaximum, ceftarolinum, cef-tobiprolul și ceftriaxonum.

### Oxacilinum $< 8$ mm și alți agenți $\beta$ -lactamici

Se determină CMI și se analizează în funcție de valorile clinice de interpretare, conform EUCAST. Pentru ampicillinum, amoxicillinum și piperacillinum (fără și cu inhibitor de  $\beta$ -lactamază) sensibilitatea se deduce din CMI a ampicillinum.

Valorile clinice de interpretare ale penicilinei au fost concepute pentru a asigura succesul terapiei în meningita pneumococică. Cu toate acestea studiile clinice au demonstrat că rezultatul pneumoniei pneumococice cauzate de tulpinile cu sensibilitate intermediară la penicilinum, tratată cu penicilinum parenterală nu a fost diferit de cel al pacienților tratați cu alte preparate antimicrobiene.

- b) *Screening-ul rezistenței la β-lactame a S. pneumoniae cu bandă E-test sau altă metodă de determinare a CMI*

Raportarea sensibilității la benzylpenicillinum* în meningită și non-meningită
Benzylpenicillinum* (non-meningită) $S \leq 0,06-2'R$ .
Benzylpenicillinum* (meningită) $S \leq 0,06'R$ .

## Controlul calității

Tulpina utilizată pentru controlul calității testelor de sensibilitate la benzylpenicillinum\* este *S. pneumoniae* ATCC 49619 mosaic PBP, CMI benzylpenicillinum\* 0,5 mg /l.

## 2. Metode molecular-genetice.

Testul disc-difuziometric cu oxacilinum nu este potrivit pentru depistarea pneumococilor rezistenți și intermediar-rezistenți, deși este relevant pentru detectarea tulpinilor sensibile. Gena *PBP2x* a fost detectată la toate tulpinile rezistente, de aceea putem concluziona că această genă codifică nivelul ridicat de rezistență. Identificarea claselor de rezistență genotipică a β-lactamelor se efectuează prin PCR real time.



Informația privind rezistența intrinsecă și fenotipurile neobișnuite este de a servi ca instrument pentru validarea identificării speciilor și/sau a rezultatelor testelor de sensibilitate. Absența rezistenței intrinseci sau prezența unui fenotip neobișnuit indică faptul că laboratorul ar trebui să verifice identificarea speciilor, rezultatele testului de sensibilitate sau ambele.

## Definiții ale „fenotipurilor preconizate”

### Fenotipuri preconizate

Tabelele EUCAST cu fenotipuri preconizate au rolul de a servi drept instrument de validare a identificării speciilor, de a ajuta la validarea rezultatelor testelor de sensibilitate și pentru a preveni testarea inutilă a sensibilității. Prezența unui fenotip neașteptat indică faptul că laboratorul trebuie să verifice identificarea speciei, rezultatele testului de sensibilitate sau ambele.

Un microorganism este listat ca „fenotip preconizat” pentru un agent (sau un grup de agenți) deoarece marea majoritate a izolatelor sunt rezistente (fenotip rezistent preconizat) sau, în alt caz, sensibil (fenotip sensibil preconizat).

**Fenotip rezistent preconizat** (clasificat anterior ca „rezistență intrinsecă”). Atunci când izolatele unei specii (sau grup de specii) sunt în general și universal rezistente (>90% din toate izolatele, indiferent de origine, prezintă un mecanism de rezistență caracteristic sau valori ale CMI peste valorile de interpretare PK/PD enumerate în tabelele EUCAST), un rezultat sensibil trebuie privit cu suspiciune. În mod normal, ar trebui evitată testarea și laboratorul nu va raporta niciun rezultat, în caz contrar izolatul se raportează ca fiind rezistent fără testare. Se recomandă clinicienilor să nu folosească agentul antimicrobian cu rezistență intrinsecă pentru specia în cauză. În tabele, unde este specificat R – rezistent orice alt rezultat este irelevant.

**Fenotip sensibil preconizat.** În cazul în care se așteaptă ca izolatele unei specii (sau grup de specii) să fie sensibile (>99% din toate izolatele sensibile la antimicrobian, indiferent de origine, deoarece nu au fost raportate mecanisme de rezistență cu semnificație clinică și/sau valorile CMI sunt în mod constant sub valorile de interpretare PK/PD enumerate în tabelele EUCAST), un rezultat rezistent trebuie privit cu suspiciune. Rezultatele discordante indică o problemă în ceea ce privește identificarea speciei și/sau testarea sensibilității și acestea trebuie confirmate cu metode alternative. În cazul în care se consideră că rezultatul rezistent reflectă un mecanism de rezistență dobândit, acesta trebuie să fie confirmat prin metodologia de referință și, de preferință, și prin secvențierea genomului.

Regulile fenotipurilor preconizate sunt sfaturi generale privind sensibilitatea sau rezistența unei specii (sau a unui grup de specii) împotriva unuia sau mai multor agenți, care pot fi deduse de la nivelul de rezistență sau sensibilitate la unul/mai mulți agenți sau de la identificarea unui mecanism de rezistență. Cel mai adesea regulile indică când să se evite utilizarea antimicrobienelor care pot duce la eșecul tratamentului. În plus, oferă sfaturi cu privire la modul de gestionare a situațiilor care sunt în prezent controversate sau nerezolvate.

Regulile date reprezintă date și dovezi privind modul de interpretare, fenotipurile rezistente așteptate și fenotipurile sensibile așteptate, care ar trebui aplicate la testarea sensibilității antimicrobiene pentru a reduce testarea, a reduce erorile și a face recomandări adecvate privind raportarea anumitor tulpini rezistente.



Controlul calității în testarea sensibilității la antimicrobiene și detectarea mecanismelor de rezistență este o componentă critică a unui plan de control al calității pentru a asigura rezultate fiabile.

Procedurile CC efectuate în mod corespunzător monitorizează precizia unui sistem de testare (adică repetabilitate și reproductibilitate), acuratețea și performanța reactivilor de testare; precum și performanța personalului de laborator care testează și raportează rezultatele.

Control intern al calității – testări regulate cu tulpinile de referință și compararea rezultatelor cu intervalele de valori acceptabile (CMI sau diametrele zonelor de inhibiție).

Se aplică la toate metodele utilizate de laborator: disc-difuzie; CMI gradient; automatizate (sisteme comerciale); metode suplimentare pentru detectarea mecanismelor specifice de rezistență.

Controlul intern al calității monitorizează precizia și acuratețea zilnică a metodologiilor, personalului și instrumentelor.

#### *Controlul calității de rutină*

Pentru a monitoriza performanța testelor (investigațiilor) se recomandă de utilizat un set de tulpini pentru controlul calității de rutină (vezi EUCAST QC Tables).

Pentru a controla componenta inhibitorie a discurilor care conțin combinații de  $\beta$ -lactame cu inhibitori de  $\beta$ -lactamaze, se recomandă utilizarea tulpinilor producătoare de  $\beta$ -lactamaze, iar acest aspect trebuie să fie inclus în controlul calității de rutină. Componenta activă a acestor discuri este verificată cu tulpini de control standard.

#### *Controlul calității extins*

Tulpinile de control cu mecanisme de rezistență definite pot fi utilizate pentru a confirma capacitatea de a detecta rezistența la antimicrobiene (vezi EUCAST QC Tables).

Se utilizează tulpinile de referință disponibile pentru controlul calității privind evaluarea performanțelor testului. Principalele tulpini recomandate pentru control sunt sensibile, dar se pot utiliza și tulpini rezistente pentru a confirma dacă metoda va detecta rezistența prin mecanisme cunoscute.

Pentru a verifica componenta inhibitorie a discurilor cu asocieri  $\beta$ -lactam – inhibitor de  $\beta$ -lactamază se recomandă utilizarea unor tulpini producătoare de  $\beta$ -lactamaze. Acest aspect trebuie să facă parte din controlul de rutină al calității. Compusul activ, antibioticul, este testat utilizând o tulpină sensibilă.

Tulpinile de control se stochează în condiții care să le asigure viabilitatea și păstrarea caracteristicilor. Stocarea pe criobile la  $-70^{\circ}\text{C}$  reprezintă o metodă convenabilă. Microorganismele nepretențioase pot fi păstrate la  $-20^{\circ}\text{C}$ . Trebuie păstrate două tuburi cu fiecare tulpină de control, unul pentru utilizare, iar altul de rezervă, pentru înlocuirea celui în uz, la nevoie.

În fiecare săptămână, trebuie subcultivată o bilă din tubul utilizat, pe un mediu neselectiv și verificată puritatea.

Când se face subcultivarea unei tulpini de control, se utilizează mai multe colonii pentru a evita selectarea unei colonii mutante. Se verifică dacă rezultatele obținute pentru tulpinile de control se încadrează în limitele acceptabile înscrise în tabelele de control EUCAST.

În tabelele de control al calității EUCAST sunt indicate atât limitele de acceptabilitate cât și valorile țintă. Repetarea testării tulpinilor de control EUCAST trebuie să genereze rezultate aleatorii încadrate în limitele recomandate. Dacă numărul de teste este  $\geq 10$ , media diametrelor zonelor de inhibiție trebuie să fie apropiată de valoarea țintă (la o diferență de  $\pm 1$  mm față de valoarea țintă).

Se folosesc tulpinile de control recomandate pentru a monitoriza performanțele testului. Testele de control trebuie efectuate și verificate zilnic, sau de cel puțin 4 ori pe săptămână pentru antibioticele ce fac parte din panelul utilizat pentru testarea de rutină.

În fiecare zi în care se efectuează testări, se verifică rezultatele ultimelor 20 de teste consecutive. Examinează rezultatele pentru a observa tendințele și rezultatele care sunt constant sub sau peste valoarea țintă. Dacă două sau mai multe rezultate din 20 de teste sunt în afara limitelor, este necesară investigarea cauzelor.

Dacă două teste consecutive sunt în afara intervalului sau dacă mai multe discuri sunt în afara intervalului într-o zi, se investighează cauzele înainte de a raporta rezultatele testelor de sensibilitate pentru izolatele de la pacienți. Este posibil să fie necesar ca testele să fie repetate.

Dacă rezistența unei tulpini de control rezistente nu este recunoscută, atunci se suprimă rezultatele testelor de sensibilitate pentru izolatele clinice, se investighează și se retestează.

Atunci când sunt investigate posibile surse de erori în difuzia discului, se iau în considerare probleme legate de discuri antimicrobiene, medii de cultură, condiții de testare și calitatea tulpinilor de control.

Pe lângă efectuarea controlului calității de rutină, se testează fiecare lot nou de agar Mueller-Hinton pentru a se asigura că toate zonele de inhibiție sunt în interiorul limitelor.

Aminoglicozidele pot indica o variație inacceptabilă a cationilor bivalenți în mediu. Tigecyclinum poate indica o variație a magneziului, sulfamethoxazolom + trimethoprimum va decela probleme ale concentrației de timină, iar erythromycinum un pH inadecvat.

Adâncimea agarului mai mare sau mai mică decât limitele acceptabile vor avea ca rezultat diametre de zonă mai mici sau mai mari.



Zone de inhibiție pentru aminoglicozide cu *P. aeruginosa* ATCC 27853 sub sau peste limitele de control al calității pot indica concentrații mari sau scăzute de cationi bivalenți ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ).

Excesul de timină și timidină poate fi indicat de zonele de inhibiție pentru sulfamethoxazolium + trimethoprimum și *E. faecalis* ATCC 29212 sub limitele de control.

## Asigurarea controlului calității în testarea TSA/RAM

- Producătorii de sisteme TSA au responsabilitatea de a urma procese bune de fabricație care asigură integritatea produsului și țin cont de potența antimicrobiană, stabilitatea și etichetarea.
- Laboratoarele (utilizatorii) sistemelor TSA au un set diferit de responsabilități, inclusiv:
  - a. Depozitarea cardurilor, discurilor, benzilor Etest în condițiile de mediu recomandate de producător;
  - b. Competența (de ex., formarea și evaluarea periodică a competențelor) a personalului de laborator care efectuează și raportează rezultatele;
  - c. Utilizarea standardelor actuale EUCAST/CLSI și/sau instrucțiunilor producătorului;
  - d. Urmărirea procedurilor stabilite pentru TSA;
  - e. Respectarea cerințelor agențiilor locale și naționale de reglementare și acreditare.

## Controlul intern și extern al calității

**Controlul intern al calității** monitorizează precizia și acuratețea zilnică a metodologiilor, personalului și instrumentelor.

**Controlul extern al calității** menține acuratețea pe termen lung (PT/Programe de competență).

Unele beneficii cheie ale participării la un program de competență includ:

1. demonstrarea competenței tehnice
2. identificarea domeniilor potențiale de îmbunătățire
3. creșterea încrederii în acuratețea rezultatelor testelor de laborator
4. verificarea eficacității antrenamentului

Nici controlul intern de calitate, nici cel extern nu ar trebui să fie singura metodă de verificare a testărilor de laborator. Programele interne și externe de control al calității se completează reciproc.

## Evaluarea externă a calității (competență testare)

- Laboratoarele trebuie să participe în mod regulat la teste de competență (PT), relevante pentru domeniul lor de acreditare.
- Participarea la schemele de testare a competenței este obligatorie, cu condiția să fie disponibile scheme adecvate. Dacă nu este cazul, laboratorul ar trebui să participe

la comparații interlaboratoare organizate de un număr suficient de alte laboratoare pe baza unui protocol bine documentat.

## Control intern de calitate

### ■ Implementarea metodei

**Elaborare POS** – testarea sensibilității la antimicrobiene/Instrucțiuni de lucru/elaborarea fișelor pentru a menține datele de realizare a CC/elaborare registre – date intermediare.

### ■ Includerea în PCC acțiuni legate de TSA

- Controlul mediului/Controlul discurilor cu antibiotice
- Controlul kiturilor utilizate pentru detecția anumitor mecanisme de rezistență/ TSA antibiotic (colistinum).
- Controlul benzilor Etest – CMI (ex. Vancomycinum – *S. aureus*)
- Material de control:

*Tulpini de referință – sensibile, fără mecanisme de rezistență* ( Tab. 8)

*Tulpini de referință – rezistente, cu mecanisme de rezistență* (Tab. 9)

- Probe neidentificate/oarbe – activitate complementară în care testele de rutină sunt repetate în aceeași zi.

### ■ Verificarea echipamentului implicat în realizarea TSA.

### ■ Instruirea personalului/evaluarea competenței privind TSA.

### ■ Control intern al calității – testări regulate cu tulpinile de referință și compararea rezultatelor cu intervalele de valori acceptabile (CMI sau diametrele zonelor de inhibiție).

**Se aplică la toate metodele utilizate de laborator:**

- 1) Disc – difuzie
- 2) CMI gradient
- 3) Automatizată (sisteme comerciale)
- 4) Metode suplimentare pentru detectarea mecanismelor specifice de rezistență

### 1. Tulpini de referință pentru controlul de rutină

1. *E. coli* ATCC 25922
2. *P. aeruginosa* ATCC 27853
3. *S. aureus* ATCC 29213
4. *E. faecalis* ATCC 29212
5. *S. pneumoniae* ATCC 49619
6. *H. influenzae* ATCC 49766
7. *Campylobacter jejuni* ATCC 3356



**Tabelul 8. Tulpini de referință pentru controlul calității de rutină**

Tulpini de control	Scop	Microorganisme de interes	Mecanisme de rezistență	Mediul utilizat
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CC Testarea sensibilității la Enterobacterales	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>K. pneumoniae</i>	-	Agar Muller-Hinton
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	CC Testarea sensibilității la <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. aureus</i> , alți stafilococi	Slab producător de betalactamaze (rezistent la penicilinum)	Agar Muller-Hinton
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CC Testarea sensibilității la <i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp. ( <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> )	-	Agar Muller-Hinton
<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	CC Testarea sensibilității la <i>C. jejuni</i> și <i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> și <i>C. coli</i>	-	Agar Muller-Hinton + 5% sânge de cal defibrinat și 20 mg/L B-NAD (MH-F)

■ **Controlul calității de rutină (fungi)**

1. *Candida krusei* ATCC 6258
2. *Candida parapsilosis* ATCC 22019

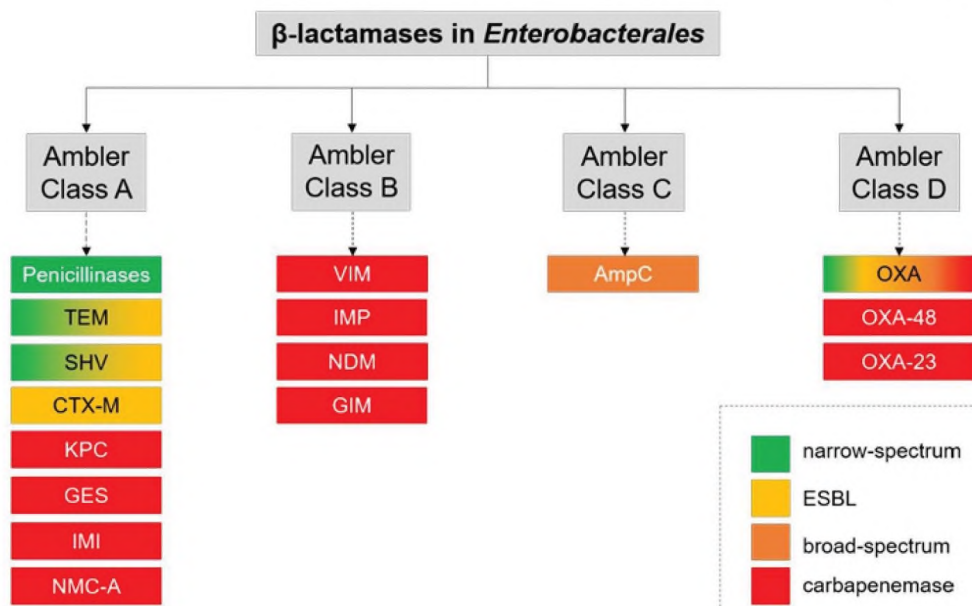
**Tabelul 9. Tulpini de control al calității pentru detectarea mecanismelor de rezistență**

Tulpini de control	Scop	Microorganisme de interes	Mecanisme de rezistență	Mediul utilizat
<i>E. coli</i> NCTC 12846 ( <i>mcr-1</i> ) <i>E. coli</i> ATCC 25922 sensibilă	TSA CC	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>K. pneumoniae</i>	Rezistența la colistinum ( <i>mcr-1</i> pozitiv)	Test comercial (microdiluții) Colistinum CMI
<i>S. aureus</i> NCTC 12493	TSA CC extins <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. aureus</i> , alți stafilococi	<i>MecA</i> pozitiv, Meticilin rezistent	Agar Muller-Hinton, disc cu Cefoxitinum* 30µg
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	TSA CC extins Enterobacterales	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>K. pneumoniae</i>	BLSE pozitiv	Agar Muller-Hinton, Aztreonamum*, Ceftazidimum, Cefotaximum, Cefpodoximum, Ceftriaxonum
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 (Nivel înalt de rezistență la gentamicinum și streptomycină) <i>E. faecalis</i> ATCC 51299 (vanB)	CC testarea sensibilității la <i>Enterococcus</i> spp.	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	Nivel înalt de rezistență la aminoglicozide și rezistent la Vancomycinum (vanB)	Agar Muller-Hinton Gentamicinum 30 µg Streptomycină 300 µg Vancomycinum 5 µg

## Referințe bibliografice

1. Boulestreau H., Bousseau A., Castel O. et al. Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé – Guide de bonnes pratiques, 2016.
2. Rawlinson S., Ciric L., Cloutman-Green E. How to carry out microbiological sampling of healthcare environment surfaces? A review of current evidence. *J Hosp Infect.* 2019, 103:363-374.
3. Campos-Madueno EI., Moser AI., Jost G., Maffioli C., Bodmer T., Perreten V., et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Switzerland: human and non-human settings may share high-risk clones. *J Global Antimicrob Resist Elsevier.* 2022;28:206–15.
4. Giske G., et al. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, version 2.0, dec. 2017.
5. Joseph P. Lynch I., Nina M., George G. Zhanel Escalating antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae: focus on carbapenemases, *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 2021, 22:11, 1455-1474, DOI: 10.1080/14656566.2021.1904891
6. Park J., Shin E., Hwang G.R., et al. Dissemination of the high-risk clone ST147 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from a local tertiary care hospital in the Republic of Korea. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 22, 76 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00601-2>.
7. Peirano G., Chen L., Kreiswirth BN., Pitout JD. Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk *Klebsiella pneumoniae* Clones ST307 and ST147. 2020. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>.
8. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, et al. The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev.* 2019;33(1):e00102-19.
9. Uzeh R.E., Adewumi F., Odumosu B.T. Antibiotic resistance and plasmid analysis of Enterobacteriaceae isolated from retail meat in Lagos Nigeria. *One Health Outlook.* 2021, 3, 10. <https://doi.org/10.1186/s42522-021-00042-x>
10. Yo S., Yukihiko A., Hideharu H., Noriko S., Dan T., Kumar SR. et al. Spreading Patterns of NDM-Producing Enterobacteriaceae in Clinical and Environmental Settings in Yangon, Myanmar. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* American Society for Microbiology; 2022;63:e01924-18. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.01924-18>.
11. Zloch M., Pomastowski P., Peer M., et al. Study on carbapenemase-producing bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization approach. *Plos one.* 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247369>
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, CLSI supplement M100S. 28th editi. Wayne, PA.: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022.
13. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2021. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2022.
14. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1, 2023. <http://www.eucast.org>.





## Seturile de preparate antimicrobiene recomandate pentru testare

Tabel nr. 1. Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Enterobacterales*

Denumirea preparatului antimicrobian	
De bază, standard	Suplimentar
<b>Peniciline</b>	
Ampicillinum Amoxicillinum + acidum clavulanicum Piperacillinum + tazobactamum	
<b>Cefalosporine</b>	
Cefuroximum Cefoxitinum* Cefotaximum sau ceftriaxonum Ceftazidimum Cefepimum	Ceftazidimum/avibactamum Ceftolozanum/tazobactamum
<b>Carbapeneme</b>	
Imipenemum Meropenemum Ertapenemum	Imipenemum/relebactamum Azithromycinum ( <i>Salmonella Typhi</i> , <i>Shigella</i> spp.)
<b>Tetracyclinum</b>	
	Tigecyclinum (difuzimetric se testează doar pentru <i>Escherichia coli</i> )
<b>Macrolide</b>	
	Azithromycinum ( <i>Salmonella Typhi</i> , <i>Shigella</i> spp.)
<b>Aminoglicozide</b>	
Amikacinum Gentamicinum	Tobramycinum (pentru administrare locală)
<b>Fluorochinolone</b>	
Ciprifloxacinum	Levofloxacinum Norfloxacinum (Izolate urinare)
<b>Monobactami</b>	
	Aztreonamum*
<b>Alți agenți antimicrobieni</b>	
Sulfamethoxazolum + Trimethoprimum	Colistinum (doar microdiluții) Cloramfenicolum (pentru administrare locală) Nitrofurani (Izolate urinare) Fosfomicinum (Izolate urinare)



Tabel nr. 2: Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Pseudomonas aeruginosa*

Denumirea preparatului antimicrobian	
Lista de bază, standard	Lista suplimentară
<b>Peniciline</b>	
Piperacillinum + tazobactamum	
<b>Cefalosporine</b>	
Ceftazidimum	Ceftazidimum-avibactamum**
Cefepimum Ceftazidimum-avibactamum* Ceftolozanum-tazobactamum*	Ceftolozanum-tazobactamum**
<b>Carbapeneme</b>	
Imipenemum Meropenemum	Imipenemum/relebactamum
<b>Aminoglicozide</b>	
Tobramycinum (pentru administrare locală) Amikacinum	
<b>Fluorochinolone</b>	
Ciprofloxacinum	Levofloxacinum
<b>Monobactami</b>	
	Aztreonamum*
<b>Alți agenți antimicrobieni</b>	
Colistinum*	Colistinum** Fosfomicinum

\*În cazul izolatelor din tractul respirator, hemocultură sau LCR

\*\*În cazul altor izolate decât cele menționate la lista standard

Tabel nr. 3: Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Acinetobacter* spp.

Denumirea preparatului antimicrobian	
Lista de bază, standard	Lista suplimentară
<b><i>Carbapeneme</i></b>	
Imipenemum Meropenemum	
<b><i>Aminoglicozide</i></b>	
Gentamicinum Tobramycinum Amikacinum	
<b><i>Fluorochinolone</i></b>	
Ciprofloxacinum Levofloxacinum	
<b><i>Alți agenți antimicrobieni</i></b>	
Sulfamethoxazolum + Trimethoprimum Colistinum	

Tabel nr. 4: Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Stenotrophomonas maltophilia*

Denumirea preparatului antimicrobian
Lista de bază, standard
<b><i>Alți agenți antimicrobieni</i></b> Sulfamethoxazolum + Trimethoprimum

Tabel nr. 5: Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Burkholderia pseudomallei*

Denumirea preparatului antimicrobian
Lista de bază, standard
<b><i>Peniciline</i></b> Amoxicillinum + acidum clavulanicum
<b><i>Cefalosporine</i></b> Ceftazidimum
<b><i>Carbapeneme</i></b> Meropenemum Imipenemum
<b><i>Tetracyclinum</i></b> Tetracyclinum
<b><i>Alți agenți antimicrobieni</i></b> Sulfamethoxazolum + Trimethoprimum



Tabel nr. 6: Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Staphylococcus* spp.

Denumirea preparatului antimicrobian	
Lista de bază, standard	Lista suplimentară
<b><i>Peniciline</i></b>	
Penicilina G (Benzylpenicillinum)	
<b><i>Cefalosporine</i></b>	
	Ceftarolinum – doar la MRSA
Cefoxitinum* (citire interpretativă, se raportează Oxacillinum + fenotip)	
<b><i>Aminoglicozide</i></b>	
Gentamicinum	Tobramycinum (pentru administrare locală)
<b><i>Tetracyclinum</i></b>	
	Tetracyclinum Tigecyclinum
<b><i>Oxazolidone</i></b>	
	Linezolidum
<b><i>Glicopeptide</i></b>	
	Vancomycinum Teicoplaninum
<b><i>Macrolide, Lincosamide</i></b>	
Erythromycinum Clindamicinum	Kanamycinum (pentru administrare locală, determinarea sensibilității față de amikacinum)
<b><i>Fluorchinolone</i></b>	
Levofloxacinum	
<b><i>Alți agenți antimicrobieni</i></b>	
Acidum fusidicum Sulfamethoxazolum + Trimethoprimum Rifampicinum	Daptomycinum – doar la MRSA Chloramphenicolum (pentru administrare locală) Nitrofurantoinum (pentru infecții urinare) Mupirocinum (pentru administrare locală) Fosfomicinum (pentru infecții urinare)

Tabel nr. 7: Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Enterococcus* spp.

Denumirea preparatului antimicrobian	
Lista de bază, standard	Lista suplimentară
<b><i>Peniciline</i></b>	
Ampicillinum	
<b><i>Aminoglicozide</i></b>	
Gentamicinum	
<b><i>Glicopeptide</i></b>	
Vancomycinum Teicoplaninum	
<b><i>Carbapeneme</i></b>	
	Imipenemum
<b><i>Fluorchinolone</i></b>	
	Ciprofloxacinum (infecții urinare)
<b><i>Tetracyclinum</i></b>	
	Tigecyclinum
<b><i>Oxazolidone</i></b>	
	Linezolidum
<b><i>Alți agenți antimicrobieni</i></b>	
	Nitrofurantoinum (infecții urinare) Fosfomicinum Daptomicinum – pentru VRE

Tabel nr. 8: Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Streptococcus pneumoniae*

Denumirea preparatului antimicrobian	
Lista de bază, standard	Lista suplimentară
<b>Peniciline</b>	
Oxacillinum (pentru screening la penicillinum)	Benzylpenicillinum* (CMI) Ampicillinum sau amoxicillinum (CMI) Alte beta-lactamine
<b>Cefalosporine</b>	
	Cefotaximum sau ceftriaxonum (CMI)
<b>Glicopeptide</b>	
Vancomycinum sau Teicoplaninum	
<b>Macrolide</b>	
Erythromycinum	
<b>Lincosamide</b>	
Clindamycinum	
<b>Fluorochinolone</b>	
Norfloxacinum (screening)	Levofloxacinum sau moxifloxacinum
<b>Tetracyclinum</b>	
Tetracyclinum	
<b>Aminoglicozide</b>	
	Gentamicinum
<b>Alți agenți antimicrobieni</b>	
	Doxycyclinum Cloramfenicolum Rifampicinum Sulfamethoxazolom + Trimethoprimum

Pentru izolatele invazive se determină CMI pentru benzylpenicillinum\*, cefotaximum sau ceftriaxonum.



Tabel nr. 9: Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea Streptococi grup A, B, C

Denumirea preparatului antimicrobian	
Lista de bază, standard	Lista suplimentară
<b>Peniciline</b>	
	Benzylpenicillinum* (infecții invazive)
<b>Glicopeptide</b>	
	Vancomycinum Teicoplaninum
<b>Macrolide</b>	
Erythromycinum	
<b>Lincosamide</b>	
Clindamycinum	
<b>Fluorochinolone</b>	
	Norfloxacinum (doar screening – nu se raportează) Dacă screening-ul cu norfloxacinum este pozitiv se testează moxifloxacinum și levofloxacinum
<b>Tetracyclinum</b>	
Tetracyclinum	Tigecyclinum
<b>Oxazolidone</b>	
	Linezolidum
<b>Alți agenți antimicrobieni</b>	
	Sulfamethoxazolum + Trimethoprimum Chloramphenicolum Rifampicinum Nitrofurantoinum (infecții urinare SGB)

Tabel nr. 10: Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea altor streptococi

Denumirea preparatului antimicrobian	
Lista de bază, standard	Lista suplimentară
<b><i>Peniciline</i></b>	
Penicilina G (Benzylpenicillinum) Ampicillinum	Alte beta-lactame
<b><i>Glicopeptide</i></b>	
	Vancomycinum Teicoplaninum
<b><i>Cefalosporine</i></b>	
Cefotaximum sau ceftriaxonum	
<b><i>Macrolide</i></b>	
Erythromycinum	
<b><i>Lincosamide</i></b>	
Clindamicinum	
<b><i>Fluorochinolone</i></b>	
	Moxifloxacinum
<b><i>Tetracyclinum</i></b>	
	Tigecyclinum
<b><i>Oxazolidone</i></b>	
	Linezolidum
<b><i>Alți agenți antimicrobieni</i></b>	
	Sulfamethoxazolum + Trimethoprimum
	Cloramfenicolum Rifampicinum

Tabel nr. 11 Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Listeria monocytogenes*

<b>Denumirea preparatului antimicrobian</b>
<b>Lista de bază, standard</b>
<b><i>Peniciline</i></b>
Penicilina G (Benzylpenicillinum) Ampicillinum
<b><i>Carbapeneme</i></b>
Meropenemum
<b><i>Macrolide</i></b>
Erythromycinum
<b><i>Alți agenți antimicrobieni</i></b>
Sulfamethoxazolum + Trimethoprimum

Tabel nr. 12 Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Corynebacterii*

<b>Denumirea preparatului antimicrobian</b>	
<b>Lista de bază, standard</b>	<b>Lista suplimentară</b>
<b><i>Peniciline</i></b>	
Penicilina G (Benzylpenicillinum)	
<b><i>Glicopeptide</i></b>	
Vancomycinum	
<b><i>Lincosamide</i></b>	
Clindamycinum	
<b><i>Fluorochinolone</i></b>	
Ciprofloxacinum Moxifloxacinum	
<b><i>Tetracyclinum</i></b>	
Tetracyclinum	
<b><i>Oxazolidone</i></b>	
Linezolidum	
<b><i>Alți agenți antimicrobieni</i></b>	
Rifampicinum	



Tabel nr. 13 Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Haemophilus* spp.

Denumirea preparatului antimicrobian	
Lista de bază, standard	Lista suplimentară
<b>Peniciline</b>	
Penicilina G (Benzylpenicillinum) (screening) Ampicillinum Amoxicillinum + acidum clavulanicum	
<b>Aminoglicozide</b>	
	Gentamicinum
<b>Cefalosporine</b>	
	Cefiximum (dacă screeningul cu penicillinum este pozitiv) Cefotaximum, ceftriaxonum (dacă screeningul cu penicillinum este pozitiv)
<b>Carbapeneme</b>	
	Meropenemum (dacă screeningul cu penicillinum este pozitiv)
<b>Fluorochinolone</b>	
Acidum nalidixicum* (screening)	Moxifloxacinum, ciprofloxacinum, levofloxacinum (dacă screeningul de Acidum nalidixicum* este pozitiv)
<b>Tetracyclinum</b>	
Tetracyclinum	Doxycyclinum (numai prin metode cantitative)
<b>Alți agenți antimicrobieni</b>	
Sulfamethoxazolom + Trimethoprimum	Cloramfenicolum Rifampicinum

Tabel nr. 14 Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Moraxella catarrhalis*

Denumirea preparatului antimicrobian	
Lista de bază, standard	Lista suplimentară
<b>Peniciline</b>	
Amoxicillinum + acidum clavulanicum	
<b>Cefalosporine</b>	
	Cefiximum Cefotaximum
<b>Macrolide</b>	
Erythromycinum	
<b>Fluorochinolone</b>	
Acidum nalidixicum* (screening)	Ciprofloxacinum
<b>Tetracyclinum</b>	
Tetracyclinum	
<b>Alți agenți antimicrobieni</b>	
Sulfamethoxazolum + Trimethoprimum	Cloramfenicolum

Tabel nr. 15 Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Pasteurella multocida*

Denumirea preparatului antimicrobian	
Lista de bază, standard	Lista suplimentară
<b>Peniciline</b>	
Penicilina G (Benzylpenicillinum) Amoxicillinum + acidum clavulanicum	
<b>Cefalosporine</b>	
	Cefotaximum
<b>Tetracyclinum</b>	
Tetracyclinum	

Tabel nr. 16 Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Helicobacter pylori*

Denumirea preparatului antimicrobian
Lista de bază, standard
<b><i>Peniciline</i></b>
Amoxicillinum
<b><i>Fluorochinolone</i></b>
Levofloxacinum
<b><i>Macrolide</i></b>
Clarithromycinum
<b><i>Alți agenți antimicrobieni</i></b>
Metronidazolum

Tabel nr. 17 Lista preparatelor antimicrobiene pentru testarea *Campylobacter* spp.

Denumirea preparatului antimicrobian
Lista de bază, standard
<b><i>Macrolide</i></b>
Erythromycinum
<b><i>Fluorochinolone</i></b>
Ciprofloxacinum
<b><i>Tetracyclinum</i></b>
Tetracyclinum



**Antimicrobiene raportate selectiv în cazul izolatelor bacteriene  
fără mecanisme de rezistență**

Grupele și preparatele antimicrobiene raportate	Comentarii, observații
<b>Enterobacterii</b>	
<u>Penicilină</u> Ampicillinum	
<u>Cefalosporine</u> Cefuroximum	
<u>Aminoglicozide</u> Gentamicinum	
<u>Fluorochinoloe</u> Norfloxacinum	Se raportează doar în ITU necomplicat Se raportează doar în ITU necomplicat
<u>Alți agenți</u> Nitrofurantoinum  Fosfomicinum  Sulfamethoxazolum + Trimethoprimum	Se raportează doar pentru <i>E. coli</i> în ITU necomplicat Cu administrare orală, se raportează doar pentru <i>E. coli</i> în ITU necomplicat Se raportează doar în ITU
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	
<u>Peniciline</u> Piperacillinum/tazobactamum	
<u>Cefalosporine</u> Ceftazidimum	
<u>Aminoglicozide</u> Amikacinum	
<u>Fluorochinolone</u> Ciprofloxacinum	Doar în ITU
<b><i>Staphylococcus spp:</i></b>	
<u>Peniciline</u> Penicillinum Oxacillinum	
<u>Macrolide</u> Erythromycinum <u>Lincozamide</u> Clindamycinum	
<u>Fluorochinolone</u> Norfloxacinum	Se raportează doar în ITU

Grupele și preparatele antimicrobiene raportate	Comentarii, observații
Alți agenți Sulfamethoxazolum + Trimethoprimum Nitrofurantoinum	Se raportează doar în ITU
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	
Peniciline Ampicillinum	
Fluorochinolone Ciprofloxacinum	Se raportează doar în ITU
<b><i>Enterococcus faecium</i></b>	
Se raportează integral	
<b><i>Acinetobacter baumannii</i></b>	
Carbapeneme Imipenemum Meropenemum	
Aminoglicozide Gentamicinum	
<b><i>Streptococcus pneumoniae</i></b>	
Peniciline Penicillinum	
Macrolide Erythromycinum	
Alți agenți Sulfamethoxazolum + Trimethoprimum	
<b>Streptococi de grup viridans</b>	
Peniciline Penicillinum Ampicillinum	În endocardită se comunică și valoarea CMI
<b><i>Haemophilus spp.</i></b>	
Peniciline Ampicillinum	
Alți agenți Sulfamethoxazolum + Trimethoprimum	

ITU – infecție de tract urinar

CMI – concentrația minimă inhibitorie

## Clasificarea antimicrobienelor

Clasa de antimicrobiene	Subclasa de antimicrobiene	Preparate antimicrobiene
<b>1. Beta-lactame</b>		
<b>1.1 Peniciline</b>	Peniciline	Benzylpenicillinum*
	Aminopeniciline	Amoxicillinum Ampicillinum
	Carboxipeniciline	Carbenicillinum* Ticarcillinum Temocillinum
	Carboxipeniciline + inhibitori de beta-lactamaze	Ticarcilina + Acidum clavulanicum
	Peniciline stabile la penicilinaze	Cloxacillinum Dicloxacillinum Flucloxacillinum Oxacillinum
	Aminopeniciline + inhibitori de beta-lactamaze	Amoxicillinum + Acidum clavulanicum Ampicillinum + Sulbactamum
	Ureidopeniciline	Azlocillinum* Mezlocillinum Piperacillinum
	Ureidopeniciline + inhibitori de beta-lactamaze	Piperacillinum + Tazobactamum
	Amidinopeniciline	Mecillinamum
<b>1.2 Cefeme</b>	Cefalosporine gen. I	Cefaclorum Cefadroxilum* Cefalexinum Cefalotinum* Cefazolinum Cefapirinum*
	Cefalosporine gen. II	Cefamandolum* Cefuroximum Cefuroximum Axetil Loracarbefum
	Cefamicine	Cefmetazolum* Cefotetanum* Cefoxitinum*
	Cefalosporine gen. III 3 (orale)	Cefditorenium* Cefiximum Cefpodoximum



Clasa de antimicrobiene	Subclasa de antimicrobiene	Preparate antimicrobiene
		Ceftibutenum Cefditorenium* Cefdinirum
	Cefalosporine gen. III	Cefmenoximum* Cefoperazonum Cefotaximum Ceftazidimum Ceftizoximum Ceftriaxonum Cefodizimum* Cefsulodina
	Cefalosporine gen. IV	Cefepimum Cefozopranum Cefpiromum
	Cefalosporine gen. IV + inhibitori de beta-lactamaze	Cefepimum + Acidum clavulanicum*
	Oxacefeme	Latamoxefum Flomoxefum
<b>1.3 Monobactami</b>		Aztreonamum*
<b>1.4 Peneme</b>	<b>Carbapeneme</b>	Doripenemum Ertapenemum Imipenemum Meropenemum Panipenemum
	<b>Peneme</b>	Faropenemum
<b>2. Glicopeptide</b>		Vancomycinum
	Lipoglicopeptide	Dalbavancinum Daptomycinum Teicoplaninum Telavancinum
<b>3. Lipopeptide</b>		Daptomycinum
	Polimixine	Colistinum Polimyxinum B
<b>4. Fosfomicine</b>		Fosfomicinum
<b>5. Aminoglicozide</b>		Amikacinum Gentamicinum Isepamicinum Kanamicinum Netilmicinum

Clasa de antimicrobiene	Subclasa de antimicrobiene	Preparate antimicrobiene
		Tobramycinum Neomycinum Spectinomycinum
<b>6. Macrolide/ lincosamide/ streptogramine</b>	Macrolide	Azithromycinum Clarithromycinum Erythromycinum Josamycinum Oleandomycinum Roxithromycinum Spiramycinum
	Ketolide	Telithromycinum
	Lincosamide	Clindamycinum Lincomycinum
	Streptogramine	Pristinamycinum Quinupristinum/Dalfopristinum
<b>7. Amfenicoli</b>		Chloramphenicolium Tiamphenicolium
<b>8. Tetracyclinum</b>		Doxycyclinum Minocyclinum Tetracyclinum Tigecyclinum
<b>9. Oxazolidinone</b>		Linezolidum
		Tidezolidum
<b>10. Acidum fusidicum</b>		Acidum fusidicum
<b>11. Nitroimidazoli</b>		Metronidazolum
<b>12. Nitrofurani</b>		Nitrofurantoinum
<b>13. Chinolone</b>	Chinolone gen. I	Cinoxacinum Acidum nalidixicum* Acidum pipemidicum* Acidum oxolinicum* Flumequinum
	Fluorochinolone	Ciprofloxacinum Enoxacinum Fleroxacinum Gemifloxacinum Levofloxacinum Lomefloxacinum Moxifloxacinum Norfloxacinum

Clasa de antimicrobiene	Subclasa de antimicrobiene	Preparate antimicrobiene
		Ofloxacinum Pefloxacinum Enrofloxacinum Trovafoxacinum Clinafloxacinum Grepafloxacinum
14. Sulfamide		Trimethoprimum
		Sulfamethoxazolum + Trimethoprimum
		Sulfamethoxazolum Sulfamethizolum Sulfafurazolum
15. Ansamicine		Rifampicinum
16. Diverse	Mupirocinum	Mupirocinum
	Nitroxolinum	Nitroxolinum
	Novobiocinum	Novobiocinum



