

Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca
Facultatea de Medicină, Disciplina – Microbiologie

**SITUAȚIA ACTUALĂ A FENOMENULUI DE REZISTENȚĂ LA
ANTIBIOTICE A TULPINILOR DE STAFILOCOCC**

Teză de doctorat

- REZUMAT -

Coordonator științific
Prof. Dr. Lia Monica Junie

Doctorand
Mihaela Ariana Almaș

2011

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	4
PARTEA I. Stadiul actual al cunoașterii	4
Capitolul 1. Genul <i>Staphylococcus</i> . Generalități	4
1.1 Istoric	4
1.2 Taxonomie. Clasificare	4
1.3 Descrierea genului	5
1.4 Habitat	6
Capitolul 2. Patogenie. Infecții produse	7
2.1 Factori de patogenitate ai <i>S. aureus</i>	7
2.2 Factori de patogenitate ai stafilococilor coagulazo-negativi	8
2.3 Infecțiile stafilococice	9
2.3.1 Infecțiile produse de <i>S. aureus</i>	9
2.3.2 Infecțiile produse de stafilococi coagulazo-negativi	11
Capitolul 3. Rezistența stafilococilor la antibiotice	13
3.1 Determinismul genetic al antibioretistenței	13
3.2 Principalele fenotipuri de rezistență și mecanisme de dobândire a rezistenței la antibiotice a stafilococilor	14
3.3 Epidemiologia rezistenței la antibiotice a stafilococilor: prevalență, profile de sensibilitate, tendințe ale rezistenței	24
3.3.1 Introducere	24
3.3.2 Epidemiologia rezistenței la antibiotice a speciei <i>S. aureus</i>	25
3.3.3 Epidemiologia rezistenței la antibiotice a speciilor de stafilococi coagulazo - negativi	24
3.3.3.4 Strategii de prevenție a răspândirii rezistenței la antibiotice	26
Capitolul 4. Metodele fenotipice utilizate pentru testarea sensibilității la antibiotice a speciilor de stafilococ	28
Capitolul 5. Metodele genotipice utilizate pentru depistarea rezistenței la antibiotice	34
PARTEA II. Cercetări personale	36
Studiul 1. Fenotipuri de rezistență ale tulpinilor de <i>S. aureus</i>	36
1.1 Scop	36
1.2 Obiective	36
1.3 Material și metodă	36
1.4 Rezultate	36
1.5 Discuții	67
1.6 Concluzii	81
Studiul 2. Fenotipuri de rezistență ale tulpinilor de stafilococi coagulazo-negativi	86
2.1 Scop	86
2.2 Obiective	86
2.3 Material și metodă	86
2.4 Rezultate	86
2.5 Discuții	123
2.6 Concluzii	139
Studiul 3. Investigarea la nivel molecular a unor mecanisme de rezistență la antibiotice a stafilococilor	143
3.1 Scop	143

3.2 Obiective	143
3.3 Material și metodă	143
3.4 Rezultate	148
3.5 Discuții	168
3.6 Concluzii	179
CONCLUZII GENERALE	182
REFERINȚE	185

CUVINTE CHEIE: *S. aureus*, stafilococi coagulazo-negativi, rezistență la antibiotice, fenotipuri de rezistență, gene de rezistență: *mecA*, *femA*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermF*, *ermG*, *msrA*, *mphC*, *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa*.

INTRODUCERE

Literatura actuală de specialitate asociată rezistenței bacteriene multiple la antibiotice subliniază importanța testării cu acuratețe a sensibilității la antibiotice și faptul că rolul de santinelă pentru detectarea microorganismelor rezistente revine laboratorului de microbiologie clinică. Astfel, testarea sensibilității antimicrobiene este una dintre cele mai importante proceduri de laborator în ceea ce privește managementul bolilor infecțioase. Totodată, supravegherea globală a rezistenței la antibiotice, prin intermediul unor programe precum ICARE, SENTRY, MYSTIC, EARSS, atenționează asupra importanței implementării unor studii locale sau programe naționale de supraveghere pentru a evidenția fenotipurile circulante, în scopul ghidării terapiei antibacteriene empirice în situațiile clinice care, impun inițierea unei terapii antibacteriene precoce.

Situarea stafilococilor pe primele locuri în etiologia infecțiilor bacteriene, creșterea anuală a numărului de tulpini de stafilococi meticilino-rezistenți și apariția unor tulpini rezistente la antibioticele antistafilococice de rezervă, încadrează această patologie în rândul bolilor infecțioase emergente. Practic problematica rezistenței la antibiotice a tulpinilor de stafilococi se concentrează în cinci direcții: 1. creșterea continuă a numărului de tulpini meticilino-rezistente, 2. apariția tulpinilor VISA (*Staphylococcus aureus* intermediar sensibil la Vancomicină), 3. raportarea unor tulpini VRSA (*S. aureus* rezistent la Vancomicină), 4. existența unor tulpini *S. aureus* și stafilococi coagulazo-negativi rezistente la Linezolid și la Quinupristin/Dalfopristin, 5. creșterea numărului de tulpini multirezistente.

Astfel, scopul propus de a identifica fenotipurile de rezistență circulante printre tulpinile de stafilococi în arealul nostru geografic și dovedirea mecanismului intim molecular determinant al rezistenței, prin detectarea prezenței anumitor gene responsabile de exprimarea acestor fenotipuri, își argumentează importanța, ca și aport la efortul comun de combatere a fenomenului de rezistență, în strânsă relație cu abordarea terapeutică optimă.

Stadiul actual al cunoașterii

Stadiul actual al cunoașterii, expus în prima parte a tezei, structurat în cinci capitole, rezumă considerentele teoretice referitoare la genul *Staphylococcus*, accentul fiind pus asupra rezistenței la antibiotice abordată fenotipic și din prisma determinantilor genetici implicați.

Cercetări personale

Partea a doua a tezei, de cercetări personale, expune în cadrul a trei studii distincte prezentarea contribuțiilor personale.

Studiul 1. Fenotipuri de rezistență ale tulpinilor de *S. aureus*

A avut ca **scop** evidențierea distribuției fenotipurilor de rezistență/sensibilitate la antibiotice a tulpinilor de *S. aureus* izolate în Laboratorul Clinicii de Boli Infecțioase Cluj-Napoca în perioada ianuarie 2008 – decembrie 2010. **Obiectivele** studiului au fost: (i) izolarea și identificarea corectă a tulpinilor de *S. aureus* cuprinse în studiu; (ii) testarea sensibilitatii/rezistenței la antibiotice prin metoda difuzimetrică și metoda CMI cu ajutorul sistemului Vitek 2 Compact a tulpinilor de *S. aureus* cuprinse în studiu; (iii) detectarea principalelor fenotipuri de rezistență la antibiotice a tulpinilor de *S. aureus* incluse în studiu; (iv) compararea rezultatelor obținute cu date din literatura de specialitate.

Material și metodă. În perioada ianuarie 2008 – decembrie 2010 în Laboratorul Clinicii de Boli Infecțioase Cluj-Napoca s-a realizat identificarea și testarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor de *S. aureus* izolate din diverse produse patologice provenite de la pacienți spitalizați în regim ambulator sau continuu (inclusiv secția de terapie intensivă) în cadrul clinicii, dar și din secții cu profil medical, chirurgical, terapie intensivă ale altor clinici care se adresează acestui laborator. Tulpinile au fost izolate din: sânge, secreții din plăgi, urini, lichide dren, lichide peritoneale, lichide pleurale, lichide pericardice, lichide articulare, spute, secreții traheale, secreții otice, secreții conjunctivale, vârfuri de cateter, valve cardiace, secreții vaginale, secreții uretrale. Izolarea produselor patologice s-a făcut pe medii selective și neselective adecvate, iar identificarea tulpinilor de *S. aureus* izolate s-a făcut prin metode convenționale, semiautomate (Api – bioMerieux) și automate (Vitek 2 Compact – bioMerieux). Testarea sensibilității la antibiotice s-a realizat prin metoda difuzimetrică și metoda de determinare a CMI cu ajutorul sistemului Vitek 2 Compact, pentru un număr de 414 tulpini selectate pe baza unor criterii de includere stabilite.

Rezultate. În urma testării sensibilității la β -lactamine a tulpinilor de *S. aureus* s-a observat că, 34,3% dintre tulpini au fost MRSA. Testarea tulpinilor la macrolide și lincosamide a demonstrat că, dintre tulpinile de *S. aureus* 47,1% au fost rezistente față de Eritromicină, 42,3% față de Clindamicină și că fenotipul de rezistență predominant a fost MLSBi. Studiul rezistenței față de aminoglicozide a demonstrat că, 16,7% din totalul tulpinilor au fost rezistente la Gentamicină și 47,1% la Kanamicină. Aprecierea fenotipurilor de rezistență/sensibilitate a tulpinilor de *S. aureus* a dovedit faptul că 52,9% dintre tulpini au avut fenotip sălbatic, pe când 47,1% au fost rezistente, prezentând fenotipurile K/APH(3')-III, KT/ ANT(4')(4") și KTG/APH(2")+AAC(6'). Testarea față de Tetraciclină a dovedit un nivel ridicat de rezistență (54,1%). Procente de rezistență moderat crescute s-au constatat la testarea tulpinilor față de Ciprofloxacină (20,3%) și Rifampicină (15,7%). Niveluri

scăzute de rezistență s-au observat la testarea tulpinilor la Acid Fusidic (6,2%), Trimetoprim/Sulfametoxazol (3,9%) și Cloramfenicol (4,6%). Toate tulpinile de *S. aureus* testate s-au dovedit sensibile la glicopeptide și antibioticele antistafilococe de rezervă: Linezolid, Quinupristin/Dalfopristin.

Discuții. În această parte a studiului au fost interpretate și discutate rezultatele obținute prin raportare la cercetări asemănătoare.

Concluzii. Dintre concluziile desprinse în urma acestui studiu menționez:

1. Testarea sensibilității/rezistenței față de β lactamine a tulpinilor de *S. aureus* a evidențiat că, cel mai frecvent fenotip de rezistență a fost meticilino-sensibil cu rezistență la Penicilină.
2. Tulpinile MRSA au reprezentat o treime din tulpinile testate (34,3%), procent apropiat de cel raportat de România pentru anul 2009 către rețeaua europeană de supraveghere a rezistenței – EARS-Net (35,6%).
3. Trimetoprim/Sulfametoxazol, a cărui eficiență clinică nu este pe deplin dovedită, recomandat însă de către ghidurile terapeutice, poate constitui o opțiune terapeutică în cazul tulpinilor de *S. aureus* multirezistente ținând cont de sensibilitatea ridicată la testarea *in vitro*, fapt constatat și la tulpinile cuprinse în studiul de față, unde doar 3,9% din totalul tulpinilor studiate și 7,1% dintre cele MRSA au fost rezistente.
4. Datele din prezentul studiu demonstrează diversitatea tulpinilor de *S. aureus* circulante în areale geografice diferite și larga variabilitate a fenotipurilor de rezistență la diverse clase de antibiotice printre tulpinile de *S. aureus*.

Studiul 2. Fenotipuri de rezistență ale tulpinilor de stafilococi coagulazo-negativi

Desfășurat după același design ca și primul studiu, a avut primele trei părți (**scop, obiective, material și metodă**) similare primului studiu, vizând însă speciile de stafilococi coagulazo-negativi (SCN). Tulpinile au fost izolate din: sânge, urini, lichide dren, lichide peritoneale, lichide pleurale, lichide pericardice, valve cardiace, vârfuri de cateter. Testarea sensibilității la antibiotice s-a făcut pentru un număr de 182 tulpini de stafilococi coagulazo-negativi selectate pe baza unor criterii de includere stabilite.

Rezultate. Testarea sensibilității la β -lactamine a tulpinilor de SCN a evidențiat o rezistență față de Penicilină de 95,1% și o rezistență la Meticilină de 79,1%. Principalele specii de SCN izolate au prezentat rezistență la Meticilină după cum urmează: 80,6% *S. epidermidis*, 94,9% *S. haemolyticus* și 92,9% *S. hominis*. Testarea tulpinilor la macrolide și lincosamide a demonstrat că, 66,4% din tulpinile de SCN au fost rezistente față de Eritromicină și 42,8% față de Clindamicină, fenotipurile

de rezistență MLSBi și MLSBc s-au observat la 21,4%, respectiv 20,3% dintre tulpini, iar fenotipul MS_B s-a remarcat la 24,7% dintre tulpini. Testarea tulpinilor de SCN la aminoglicozide a evidențiat rezistență la Kanamicină la 70,3 % dintre tulpini, la Tobramicină la 52,7% și la Gentamicină la 34,6% dintre tulpini. Dintre tulpinile de *S. haemolyticus* 97,3% au fost rezistente la Kanamicină 86,5% la Tobramicină și 73% la Gentamicină. Fenotipul de rezistență KTG/APH(2'')+AAC(6') s-a observat la 34,6% dintre tulpinile de SCN.

Testarea tulpinilor de SCN față de Tetraciclină și Ciprofloxacină a dovedit un nivel ridicat de rezistență (59,9%, respectiv 59,3%), cele mai rezistente specii dovedindu-se *S. haemolyticus*, la testarea la Ciprofloxacină (94,9%) și *S. hominis* la testarea la Tetraciclină (82,1%). Procente moderat crescute s-au observat la testarea la Rifampicină (17,7%), la Cloramfenicol (19,4%), la Acid fusidic (31,2%) și la Trimetoprim/Sulfametoxazol (36,6%).

Față de antibioticele antistafilococice de rezervă, Linezolid, Quinupristin/Dalfopristin toate tulpinile de SCN testate au fost sensibile. Testarea sensibilității/rezistenței tulpinilor de SCN studiate față de glicopeptide a pus în evidență sensibilitatea tuturor tulpinilor la Vancomicină, mai puțin la Teicoplanină, față de care trei tulpini de *S. epidermidis* au fost intermediar sensibile.

Rezistența la mai multe clase de antibiotice a fost evidențiată la toate speciile de SCN testate, cu precădere la *S. haemolyticus*.

Dintre **concluziile** desprinse în urma acestui studiu menționez:

1. Cele 182 tulpini de SCN studiate, pentru care s-a făcut testarea față de diferite clase de antibiotice, au fost izolate în principal din sânge (38,5%), urini (21,4%) și vârfuri de cateter (15,9%), de la pacienți internați în servicii cu profil chirurgical (36,3%). Speciile cel mai frecvent izolate au fost *S. epidermidis* (51,1%), *S. haemolyticus* și *S. hominis*.
2. Nivelul de rezistență la Meticilină a fost ridicat, fiind observat la trei pătrimi dintre tulpini (79,1%), mai ales la specia *S. haemolyticus* (94,9%). Pe parcursul celor trei ani procentul tulpinilor MR a înregistrat o tendință ascendentă, de la 73,2% în anul 2008 la 82,4% în 2010.
3. Fenotipul sălbatic la grupa MLSB s-a evidențiat la o treime din totalul tulpinilor de SCN (32,9%), iar fenotipurile de rezistență s-au observat în proporții relativ egale (21,4% MLSBi, 20,3% MLSBc și 24,7% MS_B). Aceeași distribuție relativ egală a fenotipurilor de rezistență s-a constatat și printre tulpinile MR (24,3% MLSBi, 24,3% MLSBc și 24,3% MS_B), mai puțin printre tulpinile meticulo-sensibile, unde fenotipul sălbatic a fost majoritar (57,9%), iar fenotipul de rezistență predominant observat a fost cel MS_B (24,3%).

4. Testarea sensibilității la aminoglicozide a demonstrat că, fenotipul sălbatic s-a întâlnit la aproape o treime (29,7%) dintre tulpinile de SCN, cel mai frecvent fiind observat la specia *S. epidermidis* (31,2%). Fenotipul de rezistență preponderent observat a fost KTG/APH(2'')+AAC(6'), fenotip găsit la 34,6% dintre tulpinile de SCN, cu precădere la specia *S. haemolyticus* (71,8%).

5. Studiul privind tulpinile de SCN asupra valorilor CMI a Vancomicinei și Teicoplaninei a demonstrat prezența a patru tulpini cu valori CMI ridicate, situate la limita maximă a sensibilității – 4 μg/ml pentru Vancomicină, iar la 8,8% dintre tulpini, cu precădere la speciile *S. epidermidis* și *S. haemolyticus*, s-au observat valori CMI ridicate, situate la limita maximă a sensibilității – 8 μg/ml pentru Teicoplanină.

Studiul 3. Investigarea la nivel molecular a unor mecanisme de rezistență la antibiotice a stafilococilor

Scopul studiului a fost detectarea la nivel molecular a prezenței unor gene responsabile de rezistența stafilococilor față de β lactamine, aminoglicozide, grupa macrolide – lincosamide – streptogramine B (MLS_B), studiu limitat la evaluarea speciilor *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*. **Obiectivele** studiului au vizat: 1. Detectarea rezistenței la β lactamine a stafilococilor prin determinarea prezenței genei *mecA*, a proteinei PBP_{2a} și genei *femA* ca factor de exprimare a rezistenței la Meticilină a *S. aureus*; 2. Detectarea rezistenței la grupa de antibiotice MLS_B prin analiza prezenței genelor *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermF*, *ermG*, *msrA*, *mphC* la fenotipurile de rezistență MLS_{Bi}, MLS_{Bc}, MS_B și fenotipul sălbatic; 3. Detectarea prezenței determinantilor de rezistență la aminoglicozide – *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, gene inductoare a fenotipurilor de rezistență K, KT, KTG; 4. Compararea rezultatelor obținute cu date din literatura de specialitate.

Material și metodă. Pentru a evalua la nivel molecular prezența genelor responsabile de exprimarea fenotipurilor de rezistență la β lactamine, aminoglicozide, grupa MLS_B, au fost selectate tulpini de *S. aureus* și stafilococi coagulazo-negativi aparținând speciilor *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* dintre tulpinile incluse în **studiul 1** și **studiul 2**. Selecția tulpinilor s-a făcut din rândul celor ale căror fenotipuri de rezistență/sensibilitate la antibioticele testate au fost mai frecvent întâlnite (74 tulpini, 35 *S. aureus* și 39 SCN, pentru evaluarea rezistenței la β lactamine și 69 tulpini, 34 *S. aureus* și 35 SCN, pentru evaluarea rezistenței la grupa de antibiotice MLS_B și aminoglicozide). Detectarea genelor prin metoda PCR s-a făcut în cadrul laboratorului de genetică moleculară al Facultății de Biologie din cadrul Universității Babeș-Bolyai Cluj-Napoca.

Rezultate. Analiza celor 74 tulpini de stafilococi din punct de vedere a prezenței genelor *mecA*, *femA* a evidențiat prezența genei la *mecA* la toate tulpinile MR, însă și la două tulpini de *S. aureus* observate fenotipic ca fiind sensibile la Meticilină; gena *femA* s-a remarcat la 65,7% dintre tulpinile de *S. aureus*. Printre cele 69 tulpini de stafilococi pentru care s-a făcut analiza unor gene de rezistență implicate în rezistența la grupa MLSB și la aminoglicozide s-a constatat că: determinanții *erm* s-au întâlnit la 41,2% dintre tulpinile de *S. aureus* și la 45,5% dintre cele de SCN cu rezistență la Eritromicină; gena *msrA* s-a observat la 20,6% dintre tulpinile de *S. aureus* și la 69,7% dintre cele de SCN cu rezistență la Eritromicină; gena *mphC* s-a evidențiat la 11,8% dintre tulpinile de *S. aureus* și la 66,7% dintre cele de SCN cu rezistență la Eritromicină; dintre cele 50 de tulpini cu rezistența la cel puțin una dintre aminoglicozidele testate 52% au avut prezentă gena *aph(3')-IIIa* și 70% gena *aac(6')-Ie-aph(2'')*.

Dintre **concluziile** desprinse în urma acestui studiu menționez:

1. Analiza celor 74 de tulpini de stafilococi investigate pentru prezența genei *mecA* au evidențiat că, gena *mecA* este dovada rezistenței la Meticilină, demonstrând totodată și o corelație bună a testelor fenotipice de detecție a meticilino-rezistenței cu cele moleculare (100% la tulpinile de stafilococi coagulazo-negativi și de 94,3% la cele de *S. aureus*), însă detectarea celor două tulpini OS-MRSA a demonstrat că gena nu se exprimă întotdeauna fenotipic.
2. Privitor la determinanții de rezistență *erm*, studiul a demonstrat existența cu precădere a genei *ermC*, însă și existența unor gene *erm* mai puțin cunoscute și răspândite la speciile de stafilococi, precum genele *ermB*, *ermF*, *ermG*.
3. Determinantul *msrA* s-a găsit la 20,6% dintre tulpinile de *S. aureus* și la peste două treimi dintre cele de stafilococi coagulazo-negativi (69,7%), remarcându-se prezența acestuia la toate tulpinile de *S. haemolyticus* și la peste jumătate dintre cele de *S. epidermidis* rezistente la Eritromicină (56,3%).
4. Printre tulpinile de stafilococi rezistente la cel puțin una dintre aminoglicozidele testate, gena cea mai frecvent observată a fost gena *aac(6')-Ie-aph(2'')*, întâlnită la peste două treimi dintre acestea (70%). Gena *aph(3')-IIIa* a fost găsită la peste jumătate dintre tulpini (52%), iar prezența genei *ant(4')-Ia* a fost observată doar la două tulpini de SCN.

CURRICULUM VITAE

Nume: ALEXANDRU, căsătorită ALMAȘ

Prenume: MIHAELA ARIANA

Data și locul nașterii: 25 octombrie 1973, Târgu-Mureș

Cetățenie: română

Starea civilă: căsătorită

Limbi străine: engleză, franceză

E-mail: ari295@yahoo.com

Studii:

1992 – absolventă a Liceului Teoretic Bolyai Farkas profilul matematică – fizică, Târgu Mureș

1998 – absolventă a Facultății de Medicină Generală, UMF Târgu-Mureș

1999-2000 – medic stagiar Spitalul Clinic Județean Târgu-Mureș

Ianuarie 2000: examen de intrare în rezidențiat București

2000-2001 – medic rezident medicină de laborator – UMF Târgu Mureș

2002-2005 – medic rezident medicină de laborator – UMF Cluj-Napoca

2005 – obținerea gradului de medic specialist medicină de laborator

2005-2010 – medic specialist medicină de laborator în cadrul laboratorului SCBI Cluj-Napoca

2010 – examen pentru obținerea gradului de medic primar medicină de laborator

2010- prezent – medic primar medicină de laborator în cadrul laboratorului SCBI Cluj-Napoca

2006 – doctorand disciplina de Microbiologie UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

Membru în societăți profesionale:

Colegiul Medicilor din România

Societatea Română de Microbiologie

Societatea Română de Micologie Medicală și Micotoxicologie

European Society of Microbiology and Infectious Disease

Cursuri postuniversitare:

2002 – „Actualități în rezistența bacteriană la antibiotice” curs organizat de UMF Cluj-Napoca

2003 – „Investigația de laborator în infecții determinate de bacteriile anaerobe”, curs organizat de UMF „Gr. T. Popa” Iași

2003 – „Citologie oncologică”, curs organizat de UMF Cluj-Napoca

2006 – „Diagnosticul de Laborator al infecțiilor fungice invazive”, Institutul de Boli Infecțioase „Matei Balș” București și Spitalul de Boli Infecțioase și Tropicale „Victor Babeș”, București

2006 – „Algoritm de diagnostic și tratament în patologia pleuro-pulmonară” curs organizat de Catedra de Pneumologie a UMF Cluj-Napoca.

Activitate științifică

Lucrări publicate în extenso:

1. **Almaș A**, Flonta M, Petrașcu M, Năstase V. Sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor de *Staphylococcus aureus* izolate din infecții ale tegumentelor și părților moi. Clujul Medical 2011;84(2):173-7.
2. **Almaș A**, Flonta M, Petrașcu M, Năstase V, Colosi I. Staphylococcus species and their Methicillin-Resistance in 7424 Blood Cultures for Suspected Bloodstream Infections. Applied Medical Informatics 2011;28(2):22-30.
3. Flonta M, Crăciunaș C, Lupșe M, **Almaș AM**, and Cârștina D- Extended-spectrum β -lactamases (ESBL)- producing *Escherichia coli* strains in blood cultures. HVM Bioflux 2011;3(2):83-8.
4. Flonta M, **Almaș A**. Phenotypic methods for detection of beta-lactamase-mediated resistance in *E.coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Therapeutics Pharmacology and Clinical Toxicology 2011;XV(1):7-12.
5. Flonta M, Lupșe M, Crăciunaș C, **Almaș A**, Cârștina D. Ertapenem resistance among Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates. Therapeutics Pharmacology and Clinical Toxicology 2011;vol XV(2):1-5.
6. Petrașcu M, Flonta M, and **Almaș AM**. Fenotipuri de rezistență pentru tulpini de *Escherichia coli* și *Klebsiella pneumoniae* producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (BLSE), izolate din infecții urinare. Clujul Medical 2011;84(3):371-7.
7. Petrașcu M, Flonta M, and **Almaș AM**. The genetic characteristics of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from urine. HVM Bioflux 2011;3(2):58-65.
8. Crăciunaș C, Butiuc-Keul A, Flonta M, **Almaș A**, Brad A, Sigartău M. Development of a PCR assay for identification of antibiotic resistance determinants *Staphylococcus aureus*. Analele Universității din Oradea - Fascicula Biologie 2010;XVII(2):248-52.

Lucrări publicate în volum de rezumate:

1. Flonta M, Crăciunaș C, **Almaș A**, Lupșe M, Cristea M. Caracterizarea moleculară a unor tulpini de *P. aeruginosa* – Conferința Națională de Boli Infecțioase, Cluj-Napoca, 23 – 25 septembrie 2010.
2. Slavcovici A, Horvat M, Mișuțiu M, Flonta M, Cismaru C, Olteanu S, **Almaș A**, Marcu C, Aștilean A, Sabou M. Rezistența tulpinilor de *E.coli* și consumul de antibiotice în Spitalul Clinic de Boli Infecțioase Cluj-Napoca- Zilele Științifice ale Institutului Național de Boli Infecțioase „Prof. Dr. Matei Balș” 13 –16 octombrie 2010 București.
3. Flonta M, **Almaș A**, Han A, Matu D. Prevalența și profilul de sensibilitate al tulpinilor de *E.coli* și *Klebsiella spp.* producătoare de β -lactamaze izolate în hemoculturi. Al X-lea Congres Național de Boli Infecțioase Cluj-Napoca 4 – 7 iunie 2008.
4. **Almaș A**, Flonta M. Prevalența speciilor de stafilococi izolați din hemoculturi și rezistența lor la beta-lactamine. A XII-a Conferință Națională de Microbiologie Sibiu 30 octombrie – 1 noiembrie 2008.

5. Mareş M, Flonta M, **Almaş A**, Dan M, Cârlan M, Bazgan O, Malic LI, Dorneanu O, Coman G, Buiuc D. Fungiscope- first Romanian multicentre study on fungaemia: preliminary results- 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases-Barcelona, Spain 19-22 April 2008.
6. Slavcovici A, Lupse M, Flonta M, Zanc V, Taşulescu D, **Almaş A**, Carstina D. Antimicrobial resistance of major Gram-negative bacterial pathogens during a 7-year period. 16-th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Nice 2006.
7. Flonta M, **Almas A**, Colosi I. Study about increasing resistance to the antibiotics of *Pseudomonas* strains. 4th Balkan Conference of Microbiology, Bucharest 23-26 November 2005.
8. Flonta M, Rebreanu C, **Alexandru A**. Antibiotic resistance of Salmonella and Shigella from January 1st 2002 to october 1st 2004. Al 4-lea Simpozion Național de Medicină de Laborator, Al 2-lea Simpozion de Asigurare a Calității in Medicina de Laborator Cluj-Napoca 18-21 Noiembrie 2004.
9. Pațiu M, Telcian A, Cucuianu A, Petrașcu M, **Alexandru A**, Selicean C, Csereoka G, Oprea O, Statnic L, Petris A, Tripon G, Nicorici C. Tumora mieloida primara pleuro-pericardica – Prezentare de caz și revizuirea datelor din literatură. Al 4-lea Simpozion Național de Medicină de Laborator, Al 2-lea Simpozion de Asigurare a Calității in Medicina de Laborator Cluj-Napoca 18-21 Noiembrie 2004.
10. Pațiu M, Selicean C, Csereoka G, Petrașcu M, **Alexandru A**, Tripon G, Oprea O, Statnic L, Petris A, Telcian A, Nicorici C. Interesări hematologice în tumori maligne solide. Al 4-lea Simpozion Național de Medicină de Laborator, Al 2-lea Simpozion de Asigurare a Calității in Medicina de Laborator Cluj-Napoca 18-21 Noiembrie 2004.

Activitate didactică:

Stagiu practic cu rezidenți în specialitatea Medicină de Laborator

Experiența acumulată în alte proiecte de cercetare:

1. Membru partener 3 în proiectul: Studiul variabilității unor gene implicate în rezistența multiplă la antibiotice la principalii agenți bacterieni cauzatori ai infecțiilor nozocomiale în vederea elaborării și implementării clinice a diagnosticului molecular 2007-2010 UBB Cluj-Napoca (Parteneriate în domeniile prioritare)
2. Membru partener 5 în proiectul: Endocardita infecțioasă bacteriană-dezvoltarea unui model funcțional de supraveghere și caracterizare a agenților etiologici, bazat pe metode moleculare și imunologice 2008-2011 INCDMI (Parteneriate în domeniile prioritare)

Studii:

1. 2006 – prezent: membru în grupul de studiu SRMMM pentru fungemii
2. Investigator: SENTRY 2011

**”Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca,
Faculty of Medicine, Department of Microbiology**

**ACTUALITIES IN THE ANTIBIOTIC RESISTANCE PHENOMENON
OF STAPHYLOCOCCUS STRAINS**

PhD Thesis

- ABSTRACT -

Scientific Supervisor

Prof. Lia Monica Junie, MD, PhD

PhD Student

Mihaela Ariana Almaș, MD

2011

Keywords: *S. aureus*, coagulase-negative staphylococci, antibiotic resistance, resistance phenotypes, resistance genes: *mecA*, *femA*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermF*, *ermG*, *msrA*, *mphC*, *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa*.

INTRODUCTION

The specialized literature related to multidrug resistant bacteria underlines the importance of accurately testing sensitivity to antibiotics and the fact that the sentinel role for detecting of resistant microorganisms is assigned to clinical microbiology laboratory. Thus, the antimicrobial susceptibility testing is one of the most important laboratory procedures in the management of infectious diseases. However, global surveillance of antibiotic resistance through programs such as ICAR, SENTRY, MYSTIC, EARSS, warns of the importance of local studies or implementation of national surveillance programs to highlight the circulating phenotypes for empirical guidance antibacterial therapy in clinical situations that require early initiation of antibacterial therapy.

A ranking location of staphylococci in the etiology of bacterial infections, the annual increase in the number of methicillin-resistant *Staphylococcus* strains and the emergence of resistant strains to second line antistaphylococcal antibiotics place this pathology among emerging infectious diseases. Practically, the problem of antibiotic resistance of *Staphylococcus* strains is focused in five trends: 1. the continuous rise of methicillin-resistant strains, 2. the emergence of VISA strains (intermediate sensitive *Staphylococcus aureus* to vancomycin), 3. the reports of VRSA strains (Vancomycin-resistant *S. aureus*), 4. the existence of *S. aureus* and coagulase-negative staphylococcus strains resistant to Linezolid and quinupristin / dalfopristin, 5. the increase of the number of multidrug-resistant strains.

Thus, the proposed aim to identify the resistant phenotypes among circulating *Staphylococcus* strains in our geographical area and the proof of the intimate molecular mechanism that determines the resistance by detection of the presence of certain genes responsible for expression of these phenotypes, arguing its importance as a contribution to the common effort to combat the resistance phenomenon, in close relation with optimal therapeutic approach.

Literature review

The literature review exposed in the first part of the thesis, structured in five chapters, summarizes the theoretical considerations related to *Staphylococcus* genus, with a focus on antibiotic resistance phenotypically covered and by terms of involved genetic determinants.

Personal contributions

The second part of the thesis exposes in three separate studies the presentation of the personal contributions.

The first study. Resistance phenotypes of *S. aureus* strains

The aim of this study was to reveal the distribution of antibiotics resistance/susceptibility phenotypes of *S. aureus* strains isolated in the Laboratory Department of the Infectious Diseases Hospital Cluj-Napoca between January 2008 - December 2011. **The objectives** of the study were: (i) the isolation and correct identification of *S. aureus* strains included in the study; (ii) antibiotic susceptibility/resistance testing by disk diffusion method and MIC method by Vitek 2 Compact system of the *S. aureus* strains comprised in the study; (iii) the detection of the main antibiotic resistance phenotypes of the *S. aureus* strains included in the study; (iv) comparing results with the data from the specialized literature.

Material and methods. Between January 2008 – December 2010 in the Laboratory Department of the Infectious Diseases Hospital was performed the identification and antibiotic susceptibility testing of *S. aureus* strains isolated from different pathological products from ambulatory or continuously hospitalized patients (including ICU department) in this Hospital, but also from medical, surgical, intensive care wards of other medical units addressing this laboratory. The strains were isolated from blood, wounds, urine, drain fluids, peritoneal fluids, pleural fluids, pericardial fluids, joint fluids, sputum, tracheal secretions, ear discharge, conjunctival discharge, catheter tips, heartvalves, vaginal discharge, urethral secretions. Isolation of specimens was completed on appropriated and non-selective media and the identification of the isolated *S. aureus* strains was made by conventional methods, semiautomatic (Api – bioMérieux) and automated methods (Vitek 2 Compact – bioMérieux). The antibiotic susceptibility testing was realized by disk diffusion method and by determining MICs with Vitek 2 Compact System for a total of 414 strains selected on the basis of established inclusion criteria.

Results. Following β lactam antibiotics susceptibility testing of *S. aureus* isolated strains, it was noticed that 34.3% of strains were MRSA. Testing strains to macrolides and lincosamides showed that, of the *S. aureus* tested strains 47.1% were resistant to erythromycin, 42.3% to clindamycin and that the MLSBi resistance phenotype was predominated. The study of the resistance to aminoglycosides showed that 16.7% of all strains were resistant to gentamicin and 47.1% to kanamycin. Assessing the resistance/susceptibility phenotypes of *S. aureus* strains it was observed that 52.9% of the strains had wild type phenotype, and 47.1% were resistant, showing phenotypes

K/APH(3')-III, KT/ANT(4')(4'') and KTG/APH(2'')+AAC(6'). Testing the strains to tetracycline has proved a high level of resistance (54.1%). Moderately increased percentages of resistance were found by testing the strains to ciprofloxacin (20.3%) and rifampicin (15.7%). Low levels of resistance were observed by testing the strains to fusidic acid (6.2%), trimethoprim/sulfamethoxazole (3.9%) and chloramphenicol (4.6%). All the *S. aureus* strains tested to glycopeptide antibiotics and the second line antistaphylococcal antibiotics: linezolid, quinupristin/dalfopristin were found sensitive.

Discussions. In this part of the study the achieved results were interpreted and discussed by comparing them to similar research.

Conclusions. Among the conclusions drawn from this study, I will only mention some of these:

1. Testing the sensitivity/resistance to β lactams of *S. aureus* strains showed that the most frequent resistance phenotype was the methicillin-susceptible penicillin resistant one.
2. The MRSA strains accounted for one third of the tested strains (34.3%), a percentage close to that reported by Romania in 2009 to the European network of resistance surveillance - EARS-Net (35.6%).
3. Trimethoprim/sulfamethoxazole, whose clinical effectiveness is not fully proved, but recommended by therapeutic guidelines, might be a therapeutic option for multidrug-resistant *S. aureus* strains, given the high sensitivity in case of in vitro testing, a fact concluded at strains included in this study, where only 3.9% of all studied strains and 7.1% of the MRSA were resistant.
4. The data from this study demonstrate the diversity of *S. aureus* circulating strains in different geographical areas and the wide variability of resistance phenotypes to various classes of antibiotics among *S. aureus* strains.

The second study. Resistance phenotypes of coagulase-negative staphylococci strains

Held by the same study design as the first one, the first three parts (**aim, objectives, materials and methods**) were similar to the first study, but targeting the coagulase-negative staphylococci species (CNS). The strains were isolated from: blood, urine, drain fluids, peritoneal fluids, pleural fluid, pericardial fluid, heart valves and catheter tips. The antibiotic susceptibility testing was realized for a number of 182 coagulase-negative staphylococci strains selected on the basis of established inclusion criteria.

Results. The susceptibility testing of SCN strains to β -lactam antibiotics showed a resistance to penicillin in amount of 95.1% and to methicillin 79.1%. The main isolated SCN species showed

methicillin-resistance as follows: *S. epidermidis* 80.6%, *S. haemolyticus* 94.9% and *S. hominis* 92.9%.

Testing CNS strains to macrolides and lincosamides showed that 66.4% of strains were resistant to erythromycin and 42.8% to clindamycin, the MLSBi and MLSBc resistance phenotypes were observed to 21.4%, respectively 20.3% of strains, and the MS_B phenotype was observed to 24.7% of strains. Testing CNS strains to aminoglycosides showed that 70.3 % of strains were resistant to kanamycin, 52.7% to tobramycin and 34.6% of strains to gentamicin. Among *S. haemolyticus* strains 97.3% were resistant to kanamycin, 86.5% to tobramycin and 73% to gentamicin. The KTG/APH(2'')+AAC(6') resistance phenotype was observed in 34.6% of SCN strains.

Testing CNS strains to tetracycline and ciprofloxacin showed a high level of resistance (59.9% and 59.3%), the most resistant species proved to be *S. haemolyticus* by testing to ciprofloxacin (94.9%) and *S. hominis* while tested to tetracyclines (82.1%). Moderately to highly increased percentage were noticed by testing to rifampicin (17.7%), to chloramphenicol (19.4%), to fusidic acid (31.2%) and to trimethoprim/sulfamethoxazole (36.6%).

All SCN strains tested to second line antistaphylococcal antibiotics, linezolid, quinupristin/dalfopristin were sensitive. The susceptibility testing of SCN studied strains to glycopeptides revealed that, all strains were sensitive to vancomycin, less to teicoplanin to which, three *S. epidermidis* strains were intermediate sensitive.

The resistance to several classes of antibiotics has been noticed in all SCN species tested, especially in *S. haemolyticus*.

Among the **conclusions** drawn from this study, I will only mention some of these:

1. The 182 SCN studied strains, which were tested against different classes of antibiotics have been isolated mainly from blood (38.5%), urine (21.4%) and catheter tips (15.9%) from patients admitted to surgical services (36.3%). The most frequently isolated species were *S. epidermidis* (51.1%), *S. haemolyticus* and *S. hominis*.
2. The methicillin resistance level was high, observed in three quarters of the strains (79.1%), especially at *S. haemolyticus* species (94.9%). During the three years study the percentage of MR strains showed an upward trend, from 73.2% in 2008 to 82.4% in 2010.
3. The wild type phenotype to MLSB antibiotics group was showed by a third of all CNS strains (32.9%) and resistance phenotypes were observed in relatively equal proportions (MLSBi 21.4%, MLSBc 20.3% and MS_B 24.7%). The same relatively equal distribution of resistance phenotypes was found among MR strains (MLSBi 24.3%, MLSBc 24.3% and MS_B 24.3%), less among methicillin-

sensitive, where wild type phenotype was predominant (57.9%) and the resistance phenotype was observed predominantly at MS_B (24.3%).

4. Aminoglycoside susceptibility testing showed that wild type phenotype was met in almost a third (29.7%) of SCN strains, and the most frequently was observed to *S. epidermidis* species (31.2%). The mainly resistance phenotype observed was KTG/APH(2'')+AAC(6') phenotype, found in 34.6% of CNS strains, particularly in *S. haemolyticus* species (71.8%).

5. The study regarding vancomycin and teicoplanin MICs of SCN strains showed the presence of four strains with high MICs values, located at maximum sensitivity – 4 µg/ml for vancomycin and of 8.8% strains, especially to the species *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*, high MICs values were observed located at the maximum sensitivity – 8 µg/ml for teicoplanin.

The third study. Investigation at molecular level of some staphylococcus antibiotic resistance mechanisms

The aim of the study was to detect at molecular level the presence of some genes responsible for resistance to β lactam antibiotics, aminoglycosides, macrolides - lincosamides - streptogramins B antibiotics group (MLSB) of staphylococci. The study was restricted to the assessment of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* species. The study objectives pursued: 1. Detection of resistance to β lactam antibiotics of staphylococci by determining the presence of *mecA* gene, PBP2a protein and the *femA* gene as a factor of expression of *S. aureus* resistance to methicillin; 2. Detection of MLSB antibiotics group resistance by analyzing the presence of *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermF*, *ermG*, *msrA*, *mphC* genes, to MLSB_i, MLSB_c and MS_B resistance phenotypes and wild type phenotype; 3. Detection of the presence of aminoglycosides resistance determinants - *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, inducers genes of K, KT, KTG resistance phenotypes; 4. Comparing results with the data from the specialized literature.

Materials and methods. To evaluate at molecular level the presence of genes responsible for resistance to β lactam antibiotics, aminoglycosides, MLSB antibiotics group there were selected *S. aureus* and CNS strains belonging to *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* species from the strains included in the first and second study. The selection of strains was among those whose resistance/susceptibility phenotypes to tested antibiotics were most common (74 strains, 35 *S. aureus* and 39 SCN, to evaluate resistance to β lactams and 69 strains, 34 *S. aureus* and 35 SCN, for evaluating resistance to MLSB antibiotics group and aminoglycosides). Genes detection by PCR method was completed in the molecular genetics laboratory of the Faculty of Biology, Babeş-Bolyai University Cluj-Napoca.

Results. The analysis of the 74 staphylococci strains in terms of the presence of *mecA*, *femA* genes showed the presence of the *mecA* gene in all MR strains, but also in two *S. aureus* strains observed phenotypically as susceptible to methicillin; the *femA* gene was noted in 65.7% of *S. aureus* strains. Among the 69 staphylococci strains for which the analysis of resistance genes involved in resistance to aminoglycosides and MLSB antibiotics group was found that: *erm* determinants were found in 41.2% of *S. aureus* strains and 45.5% of SCN strains with resistance to erythromycin; *msrA* gene was observed in 20.6% of *S. aureus* strains and 69.7% of SCN strains with resistance to erythromycin; *mphC* gene has been detected in 11.8% of *S. aureus* strains and 66.7% of SCN strains with resistance to erythromycin; of the 50 strains with resistance to at least one of the tested aminoglycosides 52% presented the *aph(3')-IIIa* gene and 70% the *aac(6')-Ie-aph(2'')* gene.

Among the **conclusions** drawn from this study, I will only mention some of these:

1. The analysis of 74 staphylococci strains investigated for the presence of *mecA* gene showed that, the *mecA* gene is the evidence of methicillin resistance, showing also a good correlation of phenotypic tests for detection of methicillin-resistance with the molecular ones (100% in the case of staphylococcus coagulase negative strains and 94.3% in the case of *S. aureus*), but detection of the two OS-MRSA strains showed that the gene is not always phenotypically expressed.
2. Regarding the *erm* resistance determinants the study demonstrated the existence especially of *ermC* gene, but also of less known and widespread *erm* genes at *Staphylococcus* species, such as *ermB*, *ermF*, *ermG* genes.
3. The *msrA* determinant was found in 20.6% of *S. aureus* strains and in over two thirds of those of coagulase-negative staphylococci (69.7%), pointing out its presence in all strains of *S. haemolyticus* and over half of those of erythromycin-resistant *S. epidermidis* (56.3%).
4. Among staphylococcus strains with resistance to at least one of the tested aminoglycosides the most frequently observed gene was *aac(6')-Ie-aph(2'')*, seen in over two-thirds of these (70%). The *aph(3')-IIIa* gene was found in more than half of the strains (52%), and the presence of *ant(4')-Ia* gene was observed only in two strains of SCN.

CURRICULUM VITAE

Last name: ALEXANDRU, spoused ALMAȘ

First name: MIHAELA ARIANA

Date and place of birth: October 25th, 1973, Târgu-Mureș

Citizenship: Romanian

Marital status: married

Languages: English, French

E-mail: ari295@yahoo.com

Education:

1992 – graduated at “Bolyai Farkas” High School, Târgu Mureș

1998 – graduated at UMF Târgu-Mureș, Faculty of General Medicine

1999-2000 – Physician trainee, County Hospital, Târgu-Mureș

January 2000: exam for national contest for Resident physician, Bucharest

2000-2001 – Laboratory Medicine Resident physician, UMF, Târgu Mureș

2002-2005 – Laboratory Medicine Resident physician, „Iuliu Hațieganu” UMF, Cluj-Napoca

2005 – Specialist degree in Laboratory Medicine

2005-2010 – Laboratory Medicine Specialist physician at Laboratory Department Infectious Diseases Hospital, Cluj-Napoca

2010 – exam for principal degree in Laboratory Medicine

2010- present – MD activity in Laboratory Medicine SCBI Cluj-Napoca

2006 – PhD student discipline Microbiology „Iuliu Hațieganu” UMF, Cluj-Napoca

Membership in professional and scientific societies:

Romanian College of Physicians

Romanian Society of Microbiology

Romanian Society of Medical Mycology and Mycotoxicology

European Society of Microbiology and Infectious Disease

Postgraduated courses:

2002 – „Actualities in bacterial antibiotic resistance" course organized by „Iuliu Hațieganu” UMF, Cluj-Napoca

2003 – „Laboratory Investigation in anaerobic bacteria infections, course organized by „Gr.T. Popa” UMF, Iași

2003 – „Oncological citology” " course organized by „Iuliu Hațieganu” UMF, Cluj-Napoca

2006 – „Laboratory diagnosis of invasive fungal infections”, „Matei Balș” Infective Diseases Institute, Bucharest and „Victor Babeș” Infectious and Tropical Diseases Hospital, Bucharest

2006 – „Diagnosis and Treatment Algorithm in pleuro-pulmonary pathology " course organized by „Iuliu Hațieganu” UMF, Cluj-Napoca.

Scientific activity

Papers published in full text:

1. **Almaş A**, Flonta M, Petraşcu M, Năstase V. Sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor de *Staphylococcus aureus* izolate din infecții ale tegumentelor și părților moi. Clujul Medical 2011;84(2):173-7.
2. **Almaş A**, Flonta M, Petraşcu M, Năstase V, Colosi I. Staphylococcus species and their Methicillin-Resistance in 7424 Blood Cultures for Suspected Bloodstream Infections. Applied Medical Informatics 2011;28(2):22-30.
3. Flonta M, Crăciunaş C, Lupşe M, **Almaş AM**, and Cârstina D- Extended-spectrum β -lactamases (ESBL)- producing *Escherichia coli* strains in blood cultures. HVM Bioflux 2011;3(2):83-8.
4. Flonta M, **Almaş A**. Phenotypic methods for detection of beta-lactamase-mediated resistance in *E.coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Therapeutics Pharmacology and Clinical Toxicology 2011;XV(1):7-12.
5. Flonta M, Lupşe M, Crăciunaş C, **Almaş A**, Cârstina D. Ertapenem resistance among Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates. Therapeutics Pharmacology and Clinical Toxicology 2011;vol XV(2):1-5.
6. Petraşcu M, Flonta M, and **Almaş AM**. Fenotipuri de rezistență pentru tulpini de *Escherichia coli* și *Klebsiella pneumoniae* producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (BLSE), izolate din infecții urinare. Clujul Medical 2011;84(3):371-7.
7. Petraşcu M, Flonta M, and **Almaş AM**. The genetic characteristics of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from urine. HVM Bioflux 2011;3(2):58-65.
8. Crăciunaş C, Butiuc-Keul A, Flonta M, **Almaş A**, Brad A, Sigartău M. Development of a PCR assay for identification of antibiotic resistance determinants *Staphylococcus aureus*. Analele Universității din Oradea - Fascicula Biologie 2010;XVII(2):248-52.

Papers published as abstracts:

1. Flonta M, Crăciunaş C, **Almaş A**, Lupşe M, Cristea M. Caracterizarea moleculară a unor tulpini de *P. aeruginosa* – Conferința Națională de Boli Infecțioase, Cluj-Napoca, 23 – 25 septembrie 2010.
2. Slavcovici A, Horvat M, Mihuțu M, Flonta M, Cismaru C, Olteanu S, **Almaş A**, Marcu C, Aștilean A, Sabou M. Rezistența tulpinilor de *E.coli* și consumul de antibiotice în Spitalul Clinic de Boli Infecțioase Cluj-Napoca- Zilele Stiințifice ale Institutului Național de Boli Infecțioase „Prof. Dr. Matei Balș” 13 –16 octombrie 2010 București.
3. Flonta M, **Almaş A**, Han A, Matu D. Prevalența și profilul de sensibilitate al tulpinilor de *E.coli* și *Klebsiella spp.* producătoare de β -lactamaze izolate în hemoculturi. Al X-lea Congres Național de Boli Infecțioase Cluj-Napoca 4 – 7 iunie 2008.
4. **Almaş A**, Flonta M. Prevalența speciilor de stafilococi izolați din hemoculturi și rezistența lor la beta-lactamine. A XII-a Conferință Națională de Microbiologie Sibiu 30 octombrie – 1 noiembrie 2008.

5. Mareş M, Flonta M, **Almaş A**, Dan M, Cârlan M, Bazgan O, Malic LI, Dorneanu O, Coman G, Buiuc D. Fungiscope- first Romanian multicentre study on fungaemia: preliminary results- 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases-Barcelona, Spain 19-22 April 2008.
6. Slavcovici A, Lupse M, Flonta M, Zanc V, Taşulescu D, **Almaş A**, Carstina D. Antimicrobial resistance of major Gram-negative bacterial pathogens during a 7-year period. 16-th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Nice 2006.
7. Flonta M, **Almas A**, Colosi I. Study about increasing resistance to the antibiotics of *Pseudomonas* strains. 4th Balkan Conference of Microbiology, Bucharest 23-26 November 2005.
8. Flonta M, Rebreanu C, **Alexandru A**. Antibiotic resistance of Salmonella and Shigella from January 1st 2002 to october 1st 2004. Al 4-lea Simpozion Național de Medicină de Laborator, Al 2-lea Simpozion de Asigurare a Calității in Medicina de Laborator Cluj-Napoca 18-21 Noiembrie 2004.
9. Pațiu M, Telcian A, Cucuianu A, Petrașcu M, **Alexandru A**, Selicean C, Csereoka G, Oprea O, Statnic L, Petris A, Tripon G, Nicorici C. Tumora mieloida primara pleuro-pericardica – Prezentare de caz și revizuirea datelor din literatură. Al 4-lea Simpozion Național de Medicină de Laborator, Al 2-lea Simpozion de Asigurare a Calității in Medicina de Laborator Cluj-Napoca 18-21 Noiembrie 2004.
10. Pațiu M, Selicean C, Csereoka G, Petrașcu M, **Alexandru A**, Tripon G, Oprea O, Statnic L, Petris A, Telcian A, Nicorici C. Interesări hematologice în tumori maligne solide. Al 4-lea Simpozion Național de Medicină de Laborator, Al 2-lea Simpozion de Asigurare a Calității in Medicina de Laborator Cluj-Napoca 18-21 Noiembrie 2004.

Teaching activity:

Internship with residents in the specialty Laboratory Medicine

Experience in national programs:

1. Partner 3 member in the project: Study of genes variability involved in multiple antibiotic resistance in bacteria causing nosocomial infections in developing and implementing a clinical molecular diagnostic 2007-2010 UBB Cluj-Napoca (Parteneriate în domeniile prioritare)
2. Partner 5 member in the project: Bacterial endocarditis, developing a functional model of supervision and characterization of etiologic agents based on molecular and immunological methods 2008-2011 INCDMI (Parteneriate în domeniile prioritare)

Studies:

1. Member in the study group SRMMM for invasive fungal infections: 2006 – present
2. Investigator: SENTRY 2011