

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
«IULIU HAȚIEGANU» CLUJ-NAPOCA

STUDIUL ASUPRA GERMEILOR GRAM NEGATIVI PRODUCĂTORI  
DE BETA-LACTAMAZE IMPLICAȚI ÎN ETIOLOGIA UNOR INFECȚII  
SEVERE

TEZĂ DE DOCTORAT

2011

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC

Prof. Dr. Dumitru Cârștina

DOCTORAND

Mirela Maria Margareta Flonta

## CUPRINS

1	INTRODUCERE	4
2	STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	5
2.1	FAMILIA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> – GENERALITĂȚI	5
2.1.1	Habitat	6
2.1.2	Caractere morfologice	10
2.1.3	Caractere de cultură	10
2.1.4	Caractere biochimice	10
2.2	ANTIBIOTICE BETA - LACTAMINE	10
2.3	REZISTENȚA BACTERIANĂ	14
2.4	BETA-LACTAMAZE	15
2.4.1	Clasificarea funcțională	18
2.4.2	Clasificarea moleculară	20
2.4.2.1	Beta – lactamaze cu spectru extins	20
2.5	GENETICA BETA-LACTAMAZELOR	21
2.5.1	Beta – lactamaze TEM	22
2.5.2	Beta – lactamaze SHV	23
2.5.3	Beta – lactamaze CTX-M și Toho	24
2.5.4	Beta – lactamaze OXA	25
2.5.5	Beta – lactamaze PER	26
2.5.6	Beta – lactamaze VEB	26
2.5.7	Alte ESBL-uri	26
2.5.8	Cefalosporinaze grup 1	27
2.5.9	Enzime AmpC mediate plasmidic (clasă C)	27
2.5.10	Carbapenemaze (clasa A, B și D)	28
2.6	EPIDEMIOLOGIA ESBL	30
2.7	FACTORI DE RISC PENTRU COLONIZARE ȘI INFECȚIE CU MICROORGANISME PRODUCĂTOARE DE ESBL	33
2.8	Diagnostic bacteriologic	35
3	CERCETĂRI PERSONALE	38
3.1	SCOP ȘI OBIECTIVE	38
3.2	MATERIAL ȘI METODĂ	39
3.2.1	Recoltarea produselor patologice	39
3.2.2	Izolarea germenilor	39
3.2.3	Identificarea tulpinilor de <i>E.coli</i> și <i>K.pneumoniae</i>	41
3.2.4	Păstrarea tulpinilor bacteriene	43
3.2.5	Testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase	43
3.2.6	Metode fenotipice de determinare a beta-lactamazelor la Enterobacterii	48
3.2.6.1	Determinarea prezenței ESBL	48
3.2.6.2	Determinarea prezenței AmpC	56
3.2.6.3	Teste screening și de confirmare pentru prezența carbapenemazelor	58
3.2.6.4	Teste complementare pentru detecția beta-lactamazelor	62
3.2.7	Metode moleculare de determinare a beta-lactamazelor la Enterobacterii	64
3.2.8	Analiza statistică și prelucrarea datelor	66
3.3	REZULTATE	67
3.3.1	Evaluarea fenotipurilor de rezistență la betalactamine la tulpini de <i>E.coli</i> și <i>K.pneumoniae</i>	67
3.3.1.1	Rezultate <i>E.coli</i>	67
3.3.1.2	Rezultate <i>K.pneumoniae</i>	78

3.3.1.2.1	Discuții	95
3.3.1.2.2	Concluzii	106
3.3.2	Analiza fenotipică a tulpinilor izolate din hemoculturi	108
3.3.2.1	Rezultate <i>E.coli</i>	111
3.3.2.2	Rezultate <i>K.pneumoniae</i>	114
3.3.2.2.1	Discuții	118
3.3.2.2.2	Concluzii	121
3.3.3	Analiza fenotipică a tulpinilor izolate din urină	122
3.3.3.1	Rezultate <i>E.coli</i>	123
3.3.3.2	Rezultate <i>K.pneumoniae</i>	130
3.3.3.2.1	Discuții	137
3.3.3.2.2	Concluzii	140
3.3.4	Studii comparative a metodelor de detecție a beta-lactamazelor	141
3.3.4.1	Studiu 1	141
3.3.4.1.1	Discuții	153
3.3.4.1.2	Concluzii	157
3.3.4.2	Studiu 2	157
3.3.4.2.1	Discuții	161
3.3.4.2.2	Concluzii	165
3.3.5	Analiza genotipică a tulpinilor de <i>E.coli</i> și <i>K.pneumoniae</i>	166
3.3.5.1	Tulpinile de <i>E.coli</i> din hemoculturi	166
3.3.5.2	Tulpinile de <i>K.pneumoniae</i> din hemoculturi	168
3.3.5.3	Tulpinile de <i>K.pneumoniae</i> cu rezistență la carbapenemi	172
3.3.5.4	Tulpini <i>E.coli</i> din urină	173
3.3.5.5	Tulpini <i>K.pneumoniae</i> din urină	174
3.3.5.5.1	Discuții	176
3.3.5.5.2	Concluzii	184
4	CONCLUZII GENERALE	186

**Cuvinte cheie:** *E.coli*, *K.pneumoniae*, rezistență, beta-lactamaze, ESBL, AmpC, carbapenemaze, TEM, SHV, CTX-M

## INTRODUCERE

Infecțiile produse de microorganisme rezistente determină un nivel înalt de morbiditate și mortalitate datorită eșecurilor terapeutice și costuri tot mai ridicate pentru îngrijirile medicale. În cazul Enterobacteriaceaelor rezistența la beta-lactami se datorează în cea mai mare parte beta-lactamazelor iar răspândirea rapidă a acestui tip de rezistență se datorează faptului că genele codante se găsesc pe plasmide transmisibile sau mobilizabile.

Cele mai cunoscute variante de ESBL (extended spectrum beta-lactamases) sunt de tip TEM și SHV dar tot mai mult apar atât în comunitate cât și în spital ESBL tip CTX-M. Beta-lactamazele de tip AmpC (cefalosporinază cromozomială) sunt un grup emergent de determinanți de rezistență. În ultimii ani au apărut un număr mare de carbapenemaze care inhibă acțiunea carbapenemilor.

Tipul exact de beta-lactamază nu este posibil a fi detectat cu ajutorul testelor de rutină. Asocierea mai multor tipuri de beta-lactamaze la același microorganism face și mai dificilă depistarea corectă.

În ultimii 20 de ani au fost propuse metode alternative care să înlocuiască sau să completeze metodele fenotipice tradiționale. Cele mai utilizate dintre aceste metode sunt testele PCR standard și secvențierea de gene.

Detectarea corectă a tulpinilor producătoare ESBL, AmpC și de carbapenemaze rămâne o provocare pentru laboratorul de microbiologie și este foarte importantă pentru a evita eșecul clinic datorat unei terapii antibiotice neadecvate cât și apariția infecțiilor nozocomiale.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Stadiul actual al cunoașterii a fost structurat în opt subcapitole (2.1-2.8) și prezintă o sinteză asupra cunoștințelor privind *E.coli* și *K.pneumoniae* și rezistența acestora la antibiotice beta-lactam prin intermediul beta-lactamazelor. Această sinteză a fost realizată prin studiul literaturii de specialitate.

## CERCETĂRI PERSONALE

### **Capitolul 3.3.1** Evaluarea fenotipurilor de rezistență la betalactamine la tulpini de *E.coli* și *K. pneumoniae*

În perioada ianuarie 2007- decembrie 2010 au fost identificate un număr de 1661 tulpini de *E.coli* și un număr de 1029 tulpini de *K.pneumoniae* izolate din variate produse patologice. Majoritatea tulpinilor de *E.coli* 1274 (77%) au fost izolate din urina, apoi 127 (8%) din hemoculturi, 93 (6%) din colecții purulente iar 73 (4%) din sputa iar cea mai mare parte a tulpinilor de *K.pneumoniae* (65%) au fost izolate din urină.

Folosind metodele fenotipice am împărțit tulpinile de *E.coli* și *K.pneumoniae* din acest studiu în funcție de rezistența la beta-lactamine în mai multe fenotipuri.

Analizând evoluția fenotipurilor de rezistență în perioada 2007- 2010 pentru tulpinile izolate am observat următoarele aspecte: la tulpinile de *E.coli* a scăzut procentul tulpinilor cu fenotip sălbatic și penicilinază dobândită, crescând totodată numărul tulpinilor cu ESBL iar pentru *K.pneumoniae* în aceeași perioadă a scăzut constant numărul de tulpini cu penicilinază dobândită și a crescut numărul de tulpini cu ESBL și impermeabilitate la cefamicine. Totodată în cazul tulpinilor de *K.pneumoniae* a fost evidențiată rezistența la carbapenemi.

Procentul de tulpini cu fenotip sălbatic a fost apropiat cu ușoară preponderență pentru tulpinile de *E.coli* (26,73%) comparativ cu cele de *K.pneumoniae* (21%) ( $p=0.0088$ ) iar tendința a fost de scădere a numărului de tulpini cu acest fenotip atât pentru *E.coli* cât și pentru *K.pneumoniae*. Tulpinile de *E.coli* au prezentat reducerea sensibilității la quinolone fapt care ridică suspiciunea prezenței clonei ST131 foarte răspândită pe glob și care ulterior a achiziționat gene pentru ESBL în special de tip CTX-M-15.

Fenotipul IRT (inhibitor-resistent TEM) caracterizat prin rezistență la aminopeniciline, carboxipeniciline și mai puțin la ureidopeniciline a fost întâlnit la un număr mic de tulpini atât de *E.coli* (1,6%) cât și de *K.pneumoniae* (0,4%).

Fenotipul cu ESBL a predominat clar între tulpinile de *K.pneumoniae* (46,4%) comparativ cu tulpinile de *E.coli* (24,7%) ( $p=0.0001$ ) deși urmărind tendința am constatat că numărul de tulpini de *E.coli* cu ESBL a crescut în perioada luată în studiu.

Fenotipul cu cefalosporinază de nivel înalt a apărut tot mai mult după 1980. În Europa acest fenotip se întâlnește la 5- 40% din Enterobacteriile izolate în spital. Un procent mic de tulpini atât de *E.coli* (1%) cât și de *K.pneumoniae* (0,59%) au prezentat acest fenotip. Din păcate acest fenotip pune probleme serioase în ceea ce privește diagnosticul iar combinația între ESBL și AmpC se descrie tot mai mult, fapt care reduce tot mai mult posibilitățile de terapie. Un alt mecanism care determină scăderea sensibilității la cefamicine, cefalosporine de generația I și II și mai puțin la cele de generația III, datorat unor deficiențe la nivelul porinelor, asociat în același timp cu reducerea sensibilității sau rezistență la quinolone, cloramfenicol, tetracicline și trimethoprim/sulfamethoxazol a fost întâlnit la 16% dintre tulpinile noastre de *K.pneumoniae* afectând în mod special cefoxitinul.

Un număr de 69 (7%) tulpini de *K.pneumoniae* au prezentat alături de ESBL și rezistență la carbapenemi în special ertapenem. Majoritatea tulpinilor de *K.pneumoniae* suspecte de producerea de carbapenemaze au fost izolate în anul 2008 (33) urmate de anul 2009(23). Cel mai mic număr de tulpini au fost izolate în 2007 (4) și 2010 (6). Toate tulpinile au provenit de la pacienți internați, iar dintre aceștia 55 (80%) au fost internați pe secții cu profil chirurgical, 10 (14%) pe secții ale SCBI iar restul de 4 pacienți au fost internați 3 pe terapie intensivă iar unul pe secție cu profil mixt medical și chirurgical. Majoritatea tulpinilor 60 (87%) au fost izolate din urină, 2 (3%) din hemoculturi iar restul de 7 tulpini au fost izolate din aspirat traheal, colecție purulentă și dren.

Nu am găsit date privind studii de evaluare a metodelor fenotipice privind detecția rezistenței la carbapenemi în România, studiul nostru reprezentând o premieră.

La tulpinile luate în studiu 49 (71%) au avut testul Hodge negativ, 18 (26%) au avut testul Hodge pozitiv iar 2 (3%) tulpini au avut rezultat indeterminat. În etapa următoare am încercat alte metode fenotipice pentru a evalua rezistența la carbapenemi. Niciuna dintre tulpinile noastre nu a prezentat sinergism între discurile de ertapenem, meropenem și imipenem cu discul de EDTA, iar rezultatul la Etestele cu imipenem și EDTA a fost deasemenea negativ. La testul de sinergie între discurile de ertapenem, meropenem și imipenem cu discul de acid fenilboronic 400 μg un număr de 8 (12%) dintre tulpini au prezentat rezultat pozitiv iar restul de 61(88%) tulpini au avut rezultat negativ.

Am evidențiat un profil diagnostic: CMI ertapenem > CMI meropenem > CMI imipenem, profil observat și la tulpini din UK și Italia.

Toate datele ne sugerează ca în cazul nostru este vorba de tulpini de *K.pneumoniae* cu deficit de permeabilitate care a împiedicat concentrarea ertapenemului prin inactivarea genelor care codează pentru proteinele OmpK35 și OmpK36 din membrana externă. Așa cum s-a dovedit și în alte studii aceste tulpini sunt sporadice, au diseminare clonală limitată deoarece impermeabilitatea le face mai puțin competitive.

### **Capitolul 3.3.2** Analiza fenotipică a tulpinilor izolate din hemoculturi

Majoritatea tulpinilor de *E.Coli* și *K.pneumoniae* izolate au provenit de la pacienți adulți cu precizarea că am izolat mai multe tulpini de *E.coli* de la pacienți de sex feminin (55%) și mai multe tulpini de *K.pneumoniae* de la pacienți de sex masculin (52%).

Procentul de tulpini de *K.pneumoniae* cu ESBL izolate din terapie intensivă variază în alte studii între 9-59% în cazul nostru fiind de 38%. Variațiile locale depind de terapia antibiotică dar pot reflecta și capacitatea laboratoarelor de microbiologie de a identifica astfel de tulpini. Totodată pacienții din terapie intensivă au un număr mai mare de factori de risc pentru colonizare sau infecție cu *K.pneumoniae*.

Datele noastre sugerează că acest patogen important în spitale peste tot în lume variază sezonally în ceea ce privește prezența în hemoculturi, în cazul nostru tulpinile de *K.pneumoniae* fiind izolate din hemoculturi mai ales în lunile iunie, iulie, august.

Această observație nu a fost valabilă pentru tulpinile izolate din alte produse patologice și nici pentru tulpinile de *E.coli* deși alte studii descriu variația sezonală și în cazul altor microorganisme Gram negative.

Deși am izolat un număr mai mare de tulpini de *E.coli*, numărul mai mare de tulpini producătoare de ESBL le-am regăsit între *K.pneumoniae* (78,75%). Pentru tulpinile de *E.coli* avem trei profile de rezistență la beta-lactamine care predomină: tulpini cu fenotip sălbatic, tulpini cu penicilinaze dobândite și tulpini cu ESBL (24%), iar în cazul tulpinilor de *K.pneumoniae* doar două profile și anume ESBL (78,75%) și fenotip sălbatic. În ultimele date EARSS pentru România proporția tulpinilor de *E.coli* ESBL pozitive din hemoculturi este apreciată ca fiind între 10-25%. Spre deosebire de tulpinile de *E.coli* la tulpinile de *K.pneumoniae* am întâlnit și rezistență la carbapenemi adevărat în procent mic (3%) comparativ cu alte studii unde regăsim un procent de 10,8%.

### **Capitolul 3.3.3** Analiza fenotipică a tulpinilor izolate din urină

În cadrul studiului nostru am analizat 1271 tulpini de *E.coli* și 658 tulpini de *K.pneumoniae* izolate în uroculturi în perioada ianuarie 2007- decembrie 2010.

Pentru *E.coli* majoritatea tulpinilor au fost izolate de la pacienți adulți 1216 tulpini față de 52 tulpini de la copii, sexul feminin predominând atât la adulți (832 tulpini) cât și la copii (42 tulpini). Există trei fenotipuri care predomină: 332 (26%) tulpini au fenotip sălbatic, 307 (24%) tulpini producătoare de ESBL și 556 (44%) tulpini producătoare de penicilinază dobândită. Un număr de 24 (1,9%) tulpini prezintă fenotip IRT iar 11 (0,87%) tulpini prezintă AmpC. Restul de 38 (3%) tulpini prezintă combinații între mai multe tipuri de beta-lactamaze.

Faptul că tulpinile cu fenotip sălbatic la beta-lactamine se însoțesc de reducerea sensibilității la quinolone ne sugerează că între tulpinile noastre circulă o clonă ST131 fără ESBL, date în concordanță cu alți autori.

Tulpinile își păstrează sensibilitatea în proporție de 83% la nitrofurantoin care rămâne o variantă utilă pentru terapia infecțiilor urinare cu *E.coli* ESBL+.

Analizând tulpinile de *K.pneumoniae* se poate observa că spre deosebire de cele de *E.coli* acestea au fost izolate mai ales de la persoane de sex masculin internate pe secții ale SCBI și secții cu profil chirurgical. Pe secțiile cu alte profile tulpinile de *K.pneumoniae* au fost izolate mai ales de la persoane de sex feminin.

Comparativ cu *E.coli* mult mai puține tulpini de *K.pneumoniae* au fenotip sălbatic și un procent important prezintă o mare varietate de beta-lactamaze, astfel tulpinile de *K.pneumoniae* ridicând mai multe probleme pentru terapie. Dintre tulpinile de *K.pneumoniae* 85% produc cel puțin o beta-lactamază cu 45% din ele producătoare de ESBL procent ridicat întâlnit și în alte studii. Asocierea dintre ESBL și impermeabilitatea la cefamicine a fost prezentă la 22% dintre tulpini iar 8% au avut rezistență la carbapenemi. Rezistența la carbapenemi este dificil de dovedit și apare frecvent la tulpini de *K.pneumoniae* izolate la pacienți cu sonde urinare iar la unele tulpini se descrie rezistență la colistin așa cum este și cazul tulpinilor noastre.

#### **Capitolul 3.3.4 Studii comparative a metodelor de detecție a beta-lactamazelor**

**Studiul 1:** Am analizat un număr de 22 tulpini de *E.coli* și 65 tulpini de *Klebsiella pneumoniae* izolate între decembrie 2008- septembrie 2009 pentru care am evaluat mai multe metode: aproximarea discului, metoda discului combinat (cefalosporine și acid clavulanic), Etest, antibiogramă automată Vitek.

În urma studiului de față putem afirma că metoda lui Jarlier este simplă, nu presupune costuri suplimentare, este ușor de efectuat și interpretat chiar în cazul antibiogramei de rutină dacă se are în vedere utilizarea și amplasarea în mod corect a discurilor de cefalosporine și acid clavulanic. Standardele indică utilizarea mai multor discuri de cefalosporine pentru screening. În acest studiu se observă că cea mai bună cefalosporină indicator pentru detecția ESBL este cefpodoxim. Pe de altă parte ceftazidimul are o rată scăzută de identificare în testele screening și de confirmare. Din studiul nostru rezultă că nu putem să ne bazăm pe rezistența la cefotaxim și ceftriaxonă și sensibilitatea la ceftazidim când încercăm să diagnosticăm o tulpină CTX-M datorită multiplelor interferențe cu alte beta-lactamaze.

Rezistența la discurile de ceftaxitin și sensibilitatea la discurile de cefepim sunt un marker bun pentru prezența beta-lactamazelor tip AmpC.

Studiul nostru a arătat că în cazul tulpinilor de *E.coli* utilizarea doar a discului de ceftazidim în testul screening nu ar fi identificat corect 9,6% dintre tulpini la fel și utilizarea discului de cefepim singur. Utilizarea discurilor de cefpodoxim și cefotaxim ar fi identificat corect toate tulpinile.

Pentru *K.pneumoniae* utilizarea doar a discului de cefotaxim în testul screening nu ar fi identificat corect 6,5% dintre tulpini iar a discurilor de ceftazidim și cefepim câte 13% dintre tulpini. Discul de cefpodoxim a identificat toate tulpinile. Discul de cefotaxim a identificat corect 20% dintre tulpini iar discul de ceftazidim 30% dintre tulpini.

Metoda de confirmare cu discul combinat recomandată de CLSI este de asemenea ușor de efectuat și interpretat dar necesită o zi în plus, discurile fiind destinate doar acestui scop și nu

sunt incluse în antibiograme de rutină. În toate cazurile luate în studiu prezența ESBL a fost confirmată cu ajutorul discurilor duble.

Etestele cer o bună tehnică de laborator, precizie și corectitudine în interpretarea rezultatelor și din nou o zi suplimentară.

**Studiul 2:** Am evaluat discurile MAST 4-Disc, metoda sinergiei cu acid fenilboronic și cloxacilină comparativ cu metode curent utilizate în laborator, metoda Vitek2 compact și metoda discurilor duble. Pentru aceasta am luat în studiu 78 tulpini din care 23 *E.coli* și 58 *K.pneumoniae*

Tehnicile de laborator pentru detecția beta-lactamazelor tip AmpC în particular cele mediate plasmidic sunt limitate și nu apar clar redactate în standardele utilizate la ora actuală. Problema detecției este mult îngreunată în momentul în care se asociază ESBL cu AmpC.

Am stabilit încă o dată rolul discului de cefepim în detecția ESBL în prezența AmpC. Sensibilitatea la cefepim în cadrul testului screening și rezistența la cefoxitin ne ridică suspiciunea prezenței AmpC.

În studiul nostru pentru identificarea tulpinilor AmpC, efectul sinergic cu acid boronic s-a manifestat doar la două tulpini și a fost dificil de interpretat. În concluzie considerăm că nu este o metodă ușor de introdus în practica curentă deoarece depinde foarte mult de concentrația discului de acid boronic și de distanța între discuri și are efect de inocul.

Discul de cloxacilină utilizat în cazul studiului nostru a oferit doar rezultate negative în contradicție cu numeroase alte studii care susțin o sensibilitate și o specificitate de peste 90% pentru această metodă de depistare a beta-lactamazelor tip AmpC.

Testul MAST 4-Disc este rapid, ușor de realizat și de interpretat și în studiul nostru a identificat ușor beta-lactamazele de tip AmpC și este singurul dintre testele utilizate care a reușit să identifice tulpinile cu asociere de ESBL și AmpC. Totuși metoda este lipsită de specificitate deoarece la tulpinile cu rezistență la carbapenemi și la unele tulpini cu impermeabilitate nu a detectat prezența ESBL. O altă lipsă a metodei este faptul că este mai scumpă decât metodele clasice cu discuri ( dar totuși mai ieftină decât Etestele) și necesită o zi în plus.

Ar fi de mare utilitate a se utiliza constant o astfel de metodă de detecție care folosește un substrat adaptat acestor tulpini cu o mare varietate de beta-lactamaze, tulpini dificil de identificat cu ajutorul metodelor utilizate până acum în tehnicile de rutină

### **Capitolul 3.3.5** Analiza genotipică a tulpinilor de *E.coli* și *K.pneumoniae*

Realizarea acestei părți a studiului nostru a pus probleme deosebite deoarece există date genotipice izolate privind tulpinile de *E.coli* și *K.pneumoniae* și rezistența lor la beta-lactamine în România

În cursul anului 2011 am analizat din punct de vedere molecular un număr de 21 tulpini *E.coli* izolate din hemoculturi, 38 tulpini *K.pneumoniae* izolate din hemoculturi și 13 tulpini de *K.pneumoniae* suspecte de producerea de carbapenemaze.

Investigarea la nivel molecular a arătat că tulpinile de *E.coli* care prezentau fenotipul ESBL dețineau fie gena  $bla_{TEM-1}$ , fie  $bla_{CTX-M-15}$ , fie ambele. Astfel 54,2% dintre tulpini prezentau ambele gene, gena  $bla_{TEM-1}$  lipsea la 38% dintre tulpini iar gena  $bla_{CTX-M-15}$  nu era prezentă la 9,5% dintre tulpinile analizate. Se poate constata că majoritatea tulpinilor



testate care prezentau fenotipul ESBL dețineau ambele gene. Gena *bla*SHV-1 nu a fost detectată la nici una dintre tulpinile de *E. coli* analizate.

Gena *bla*SHV-1 a fost detectată la toate tulpinile de *K. pneumoniae* analizate. Gena *bla*CTX-M-15 a fost detectată la 34 (89%) dintre tulpinile analizate. Dintre tulpinile analizate 30 (79%) au prezentat asocierea dintre genele *bla*SHV-1, *bla*TEM-1 și *bla*CTX-M-15. Am considerat necesară testarea tulpinile de *K. pneumoniae* pentru genele *bla*KPC-1, *bla*KPC-2, *bla*KPC-9. Nu am detectat însă prezența nici uneia din aceste gene la tulpinile analizate. Am testat tulpinile noastre și pentru prezența genelor care codează alte carbapenemaze: *bla*OXA-48, *bla*GES-4 dar rezultatele obținute au fost negative. Rezistența la carbapenemi poate să apară și ca urmare a hiperproducției altor tipuri de beta-lactamaze. Ca urmare am testat tulpinile pentru: *bla*TEM-1, *bla*TEM-2, *bla*SHV-1, *bla*CTX-M-15, *bla*OXA-2, *bla*VEB. Așa cum ne așteptam toate tulpinile au fost pozitive pentru *bla*SHV-1, 12 tulpini au fost pozitive pentru *bla*TEM-1, *bla*TEM-2, *bla*CTX-M-15. Toate tulpinile au fost negative pentru genele *bla*OXA-2 și *bla*VEB care codează ESBL-uri.

Deoarece fenotipic tulpinile erau descrise ca având impermeabilitate la cefamicine iar rezistența la carbapenemi poate să apară prin modificarea porinelor din membrana externă (Omp) și anume OmpK35, OmpK36, OmpK37 în combinație cu producția de ESBL sau AmpC am testat tulpinile noastre pentru OmpK36, rezultatul fiind indeterminat la toate tulpinile.

În perioada ianuarie 2007-decembrie 2010 am ales un număr de 71 tulpini de *E. coli* și un număr de 76 tulpini de *K. pneumoniae* izolate din urină. Fenotipic aceste tulpini au demonstrat prezența ESBL. Toate tulpinile au fost testate pentru genele *bla*OXA, *bla*CTX-M, *bla*TEM și *bla*SHV printr-un PCR multiplex folosindu-se primeri universali (metoda descrisă în capitolul 3.2.7).

Pentru *E. coli* genele *bla*CTX-M au fost întâlnite la 68% dintre tulpini, genele *bla*TEM la 65% dintre tulpini, genele *bla*OXA la 60% dintre tulpini iar genele *bla*SHV la 34% dintre tulpini. La 3 (4%) dintre tulpini nu s-au putut evidenția niciuna din cele 4 gene. Dintre tulpini 12 (17%) au prezentat doar gena *bla*TEM, iar 6(8%) tulpini au asociat *bla*TEM cu *bla*CTX-M-15.

Pentru *K. pneumoniae* genele *bla*CTX-M au fost întâlnite la 68% dintre tulpini, genele *bla*TEM la 95% dintre tulpini, genele *bla*OXA la 59% dintre tulpini iar genele *bla*SHV la 100% dintre tulpini. La 3 (4%) tulpini au fost detectate doar gena *bla*SHV, la 11 (14%) tulpini gene *bla*TEM și *bla*SHV, iar la 11(14%) tulpini *bla*CTX-M-15, *bla*TEM și *bla*SHV.

Dintre cele 48 tulpini producătoare de CTX-M-15, 37 (77%) tulpini produc gene *bla*OXA, 47 (98%) gene *bla*TEM, 48(100%) gene *bla*SHV. La 22 (75%) tulpini a fost demonstrată asocierea dintre genele *bla*CTX-M-15, *bla*OXA, *bla*TEM, *bla*SHV.

Tulpinile de *E. coli* izolate din urină au prezentat asocierea dintre cele patru beta-lactamaze testate. Au predominat enzimele CTX-M, urmate de cele de tip TEM și OXA, iar cele mai puține au fost enzimele SHV.

Pentru tulpinile de *K. pneumoniae* din urină am identificat enzime de tip SHV la toate tulpinile. Pe locul doi ca frecvență au fost enzimele de tip TEM și abia pe locul trei enzimele tip CTX-M. La mai mult de jumătate dintre tulpini am izolat și gene de tip OXA.

La tulpinile de *K. pneumoniae* la fel ca și la tulpinile de *E. coli* am întâlnit asocierea dintre cele patru tipuri de enzime, rezultând astfel complexitatea tulpinilor.

## CONCLUZII GENERALE

Dintre concluziile generale menționez câteva.

1. Existența tulpinilor de *E.coli* și *K.pneumoniae* la care se asociază prezența ESBL și AmpC împreună cu rezistența la fluoroquinolone și aminoglicozide arată complexitatea mecanismelor de rezistență, ceea ce impune măsuri constante de urmărire a răspândirii acestor tulpini.
2. Rezultatele studiului nostru confirmă faptul că pentru ESBL cel mai bun indicator este discul de cefpodoxim, iar ceftazidimul are cea mai mare rată de eșec atât pentru *E.coli* cât și pentru *K.pneumoniae*. Pentru screening este de preferat asocierea dintre cefpodoxim, ceftazidim și cefotaxim. Pentru tulpinile cu AmpC recomandăm screeningul cu cefepim și cefoxitin mai ales când există asocierea cu ESBL.
3. Între metodele de confirmare pentru ESBL metoda discului dublu este de preferat față de metoda de sinergie fiind ușoară și precisă chiar dacă prețul este mai ridicat. Metoda E-test fiind prea scumpă este prohibită pentru majoritatea laboratoarelor.
4. Metoda de confirmare cu cele patru discuri MAST, după știința noastră, a fost utilizată pentru prima dată în laborator în țară în cazul acestui studiu. Este o metodă ușor de utilizat, sensibilă și are avantajul de a identifica prezența simultană a ESBL și AmpC fapt pe care nici o altă metodă nu îl evidențiază. Este propunerea noastră pentru aplicarea de rutină în laborator.
5. Cercetările noastre au evidențiat că screeningul cu discul de ertapenem și testele de confirmare cu EDTA, acid boronic și testul Hodge modificat sunt utile în evidențierea fenotipică a rezistenței la carbapenemi.
6. Ca o noutate studiul nostru oferă o imagine asupra caracteristicilor genetice ale tulpinilor de *E.coli* și *K.pneumoniae* producătoare de beta-lactamaze izolate din infecții severe. Studii asemănătoare ar trebuie efectuate și în alte părți ale țării pentru a cunoaște genotipurile enzimelor ESBL în scopuri epidemiologice.
7. Tulpinile de *E.coli* ESBL pozitive au prezentat dominația enzimelor CTX-M .
8. Pentru tulpinile de *K.pneumoniae* ESBL pozitive am identificat enzime de tip SHV-1, TEM și abia pe locul trei cele pentru enzimele tip CTX-M.
9. Gena *bla*CTX-M-15 a fost cea mai răspândită atât la tulpinile de *E.coli* cât și de *K.pneumoniae* izolate din infecții sistemice.
10. La un număr redus de tulpini de *K.pneumoniae* deși fenotipic s-a documentat reducerea sensibilității față de carbapenemi în special ertapenem, genotipic nu s-au evidențiat gene *bla*KPC, *bla*GES-4, *bla*OXA-48 , *bla*VIM codante pentru carbapenemaze nici gene *bla*OXA-2 sau *bla*VEB în schimb am identificat *bla*TEM-1, *bla*TEM-2, *bla*SHV-

1, blaCTX-M 15. În această situație carbapenemii pot fi folosiți atunci când astfel de tulpini sunt implicate în infecții severe.

11. Rezultatele studiului actual sunt un început promițător în vederea unei corecte evaluări a sensibilității la antibiotice, astfel ca laboratorul de microbiologie să ofere date cât mai exacte în vederea stabilirii unei antibioterapii adecvate.

REFERINȚE 191 titluri

## CURRICULUM VITAE

**NUME ȘI PRENUME:** FLONTA Mirela Maria Margareta

**DATA ȘI LOCUL NAȘTERII:** 25 martie 1963 Cluj

**NAȚIONALITATE :** română

**STARE CIVILĂ:** necăsătorită

### **STUDII:**

1981- absolventă Liceul de Matematică –Fizică “Nicolae Bălcescu” Cluj-Napoca

1987- absolventă a Facultății de Medicină Generală IMF Cluj-Napoca

1987-1990: medic stagiar

Octombrie 1990: București examen de intrare în secundariat

1991-1994: secundar microbiologie, Spitalul Clinic de Boli Infectioase Cluj-Napoca

1994: obținerea gradului de medic specialist microbiologie și parazitologie

1994-1998: medic specialist microbiologie și parazitologie în cadrul laboratorului SCBI Cluj-Napoca

1998: examen pentru obținerea gradului de medic primar microbiologie și parazitologie

1998- prezent: medic primar microbiologie și parazitologie în cadrul laboratorului SCBI Cluj-Napoca

2004- prezent: medic șef Laborator analize medicale SCBI Cluj-Napoca

2004-doctorand disciplina de Boli Infectioase UMF Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca

### **COMPETENȚE :**

Mai 2005- Managementul Serviciilor de Sanatate

### **MEMBRĂ ÎN ASOCIAȚIILE PROFESIONALE :**

Colegiul Medicilor din România

Societatea Română de Microbiologie

Societatea Română de Micologie Medicală și Micotoxicologie

European Society of Microbiology and Infectious Disease

American Society of Microbiology

### **LIMBI STRĂINE CUNOSCUTE:**

Engleză, franceză, italiană

### **CURSURI POSTUNIVERSITARE :**

Noiembrie 1995- Cours International sur les Hepatites Virales organise par le Reseau international des Instituts Pasteur et Instituts Associes au Centre D'enseignement et de documentation "Jacques Monod" de L'Institut Catacuzene, Bucarest

Aprilie 1998- Actualități în diagnosticul clinic al bolilor infecțioase, Institutul Cantacuzino , București

Octombrie 1998- INCHEBA Convention Center, Bratislava, Slovak Republic-14-th International Short- Courses Series: Antimicrobial Resistance Surveillance and Susceptibility Testing

Martie 1999- stagiul Clinical Microbiology & Public Health Laboratory, Leicester Royal Infirmary NHS Trust , England

Iunie 1999- Rezistența la antibiotice în Franța și România- seminar organizat de către Institutul de Boli Infecțioase «Matei Balș», Spitalul Villeneuve St. Georges (Franța), Universitatea Paris VI și Institutul Cantacuzino București, sub egida Ambasadei Franței la București și a Societății Române de Microbiologie, la Centrul de Învățământ și Documentare "Jaques Monod" din Institutul Cantacuzino

Iunie- iulie 1999- cursul "Actualități în Diagnosticul clinic și de laborator al bolilor infecțioase", organizat de către Fundația Româno-Americană de Educație Medicală și Institutul «Cantacuzino București», în cadrul Centrului de Învățământ și Documentare "Jaques Monod"

Noiembrie 2005- Curs "Cerințe și recomandări pentru biosiguranță și îmbunătățirea calității în laboratoarele de diagnostic HIV din România", București

Noiembrie 2006 București- « Diagnosticul de Laborator al infecțiilor fungice invazive », Institutul de Boli Infecțioase "Matei Balș" București și Spitalul de Boli Infecțioase și Tropicale "Victor Babeș" București

Septembrie 2007 București- « Utilizarea tehnicii PCR în diagnosticul și epidemiologia bolilor infecțioase », INCDMI Cantacuzino

Decembrie 2008- INCDMI București- Actualități în diagnosticul gripei

Mai 2010 Cluj-Napoca - Laboratoare medicale Cerințe particulare pentru calitate și competență. Auditarea sistemelor de management

Octombrie 2010- „Studiul mecanismelor de rezistență la germeni comunitari și nozocomiali în sistem automat de identificare și antibiogramă” din cadrul Proiectului Național realizat în colaborare cu BioMerieux- Franța „Bacterial resistance detection , a new challenge for the laboratory to fight HAI !”

Noiembrie 2010 Munster, Germany, Institut of Medical Microbiology of the University Hospital Munster- Workshop Laboratory Diagnostics of Nosocomial Pathogens

Februarie 2011 Nimegen, The Netherlands- Radboud University Nijmegen Medical Center- Workshop Laboratory Diagnosis of Invasive Fungal Diseases

#### **ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ :**

##### **Lucrări publicate în extenso :**

1. **Flonta M**, Crăciunaș C, Lupșe M, Almaș A M, and Cârștina D- Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases(ESBL)- producing *Escherichia coli* strains in blood cultures- - HVM Bioflux, 2011, Volume 3, Issue 2; pg: 83-88

2. Petrașcu M, **Flonta M**, and Almaș A M- The genetic characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from urine- - HVM Bioflux, 2011, Volume3, Issue 2; pg: 58-65
3. Petrascu M, **Flonta M**, Almaș A M- 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 Vol 84-nr-3; pg:371-377
4. Almaș A, **Flonta M**, Petrașcu M, Năstase V, Coloși I- *Staphylococcus* species and their Methicillin- Resistance in 7424 Blood Cultures for Suspected Bloodstream Infections- - Applied Medical Informatics Vol 28, No. 2/2011, pp:22-30
5. **Flonta M**, Lupșe M, Crăciunaș C, Almaș A, Cârștina D- Ertapenem resistance among Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates- - Therapeutics Pharmacology and Clinical Toxicology volume XV, number 2 June 2011 pg: 1-5
6. 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 vol. 84, nr.2, pg 173-177
7. **Flonta M**, Almaș A- Phenotypic methods for detection of beta-lactamase-mediated resistance in *E.coli* and *Klebsiella pneumoniae*- Therapeutics Pharmacology and Clinical Toxicology volume XV, number 1 March 2011 pg: 7-12
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 Tom. XVII, Issue: 2, 2010, pp. 248-252
9. Crăciunaș C, Butiuc-Keul A, **Flonta M**, Brad A, Sigartău M- Application of molecular techniques to the study of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Cluj-Napoca, Romania- - Analele Universității din Oradea - Fascicula Biologie Tom. XVII, Issue: 2, 2010, pp. 243-247
10. Hagău N, **Flonta M**, Slavcovici A, Studnicska D , Cocu S, Mleşnițe M, Găvrus R, Laslo C. Prospective study of central venous catheter colonization and catheter-related bloodstream infection in intensive care unit, echocardiographic follow-up after catheter removal. Eur J Anaesth 2006; 23(suppl 37): A-774
11. Hagău N, **Flonta M**, Slavcovici A, Studnicska D , Cocu S, Mleşnițe M, Găvrus R, Laslo C. Studiu prospectiv al colonizării și infecției de cateter venos central într-o unitate de terapie intensivă. Evaluare ecocardiografică a pacienților cu catetere. J Rom ATI 2006;13(2):85-88.
12. Slavcovici A, Lupșe M, **Flonta M**, Zanc V, Cârștina D, Dicea A, Vesbianu D- Evoluția sensibilității la antibiotice a tulpinilor de *E. coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp* și *P. aeruginosa*.- Revista Română de Boli Infecțioase, 2006, vol IX, nr 1-2 pg:4-9

#### **Lucrări publicate în rezumat:**

1. Straut M, Banu O, Dobreanu D, Dobreanu M, Ionac A, **Flonta M**, Surdeanu M, Dinu S, Badescu D, Lerescu L, Ungureanu V, Ginghina C, Man A, Szekely E, Lupse M, Oprea M și toți membrii consorțiului Endobact- Proiect ENDOBACT: Endocardita infecțioasă bacteriană- dezvoltarea unui model funcțional de supraveghere, bazat pe metode moleculare și imunologice- A II-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie, Sinaia 14-16 octombrie 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 Stiințifice ale Institutului Național de Boli Infecțioase’’ Prof. Dr. Matei Balș’’ 13-16 octombrie 2010 București
3. **Flonta M**, Crăciunaș C, Almaș A, Lupșe M, Cristea M- Caracterizare moleculară a unor tulpini de *P.aeruginosa* – Conferința Națională de Boli Infecțioase, Cluj-Napoca, 23-25 septembrie 2010
4. Almaș A, **Flonta M**\_ Prevalența speciilor de stafilococi izolați din hemoculturi și rezistența lor la beta-lactamine- A XII-a Conferința Națională de Microbiologie Sibiu 30 octombrie-1 noiembrie 2008
5. **Flonta M**, Almaș A, Han A, Matu D- Prevalența și profilul de sensibilitate al tulpinilor de *E.coli* și *Klebsiella spp.* producătoare de  $\beta$ -lactamaze izolate în hemoculturi - Al X-lea Congres Național de Boli Infecțioase Cluj-Napoca 4-7 iunie 2008

#### **ACTIVITATE DIDACTICĂ:**

Colaborator la cursurile postuniversitare ale Catedrei de Boli Infecțioase

Lucrări practice de microbiologie cu studenții Facultății de Medicină Generală anului VI

Stgiu practic cu rezidenți în specialitatea Medicină de Laborator

#### **EXPERIENȚĂ ACUMULATĂ ÎN PROGRAME NAȚIONALE:**

1.Responsabil 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.Responsabil 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 :**

Investigator studiu clinic: A population-based surveillance of Haemophilus influenzae typ b invasive disease-meningitis-in children less than five years of age:Glaxo Smith Kline Biologicals 2006-2007

Membru: Grupul de studiu SRMMM pentru fungemii- 2006- present

Investigator: SENTRY 2011

#### **PREMII:**

Premiu de excelență pentru lucrarea susținută în cadrul Conferinței Naționale de Boli Infecțioase, «Infecția azi. Terapia încotro?» septembrie 2010

UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY

«IULIU HAȚIEGANU» CLUJ-NAPOCA

STUDY ON BETA-LACTAMASE PRODUCING GRAM-NEGATIVE  
BACTERIA INVOLVED IN THE ETIOLOGY OF SEVERE INFECTIONS

PhD Thesis

2011

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Dumitru Cârstina

PhD Student

Mirela Maria Margareta Flonta

Keywords: *E.coli*, *K.pneumoniae*, resistance, beta-lactamases, ESBL, AmpC, carbapenemases, TEM, SHV, CTX-M

## INTRODUCTION

Infections produced by resistant organisms cause a high level of morbidity and mortality due to treatment failure and increased costs for medical care. In *Enterobacteriaceae* beta-lactam resistance is due mostly to beta-lactamases and the rapid spread of this type of resistance is the result of the fact that genes responsible for this resistance are situated on transmissible or movable plasmids. The most popular versions of ESBL (extended spectrum beta-lactamases) are TEM and SHV type but CTX-M type ESBL increasingly occurring in both community and hospitals. AmpC type beta-lactamases (chromosomal cephalosporinases) are a group of emerging resistance determinants. In recent years there have appeared a large number of carbapenemases that inhibit the action of carbapenems.

The specific type of beta-lactamase is not likely to be detected by routine tests. Combination of several types of beta-lactamases in the same microorganism makes the correct detection more difficult.

In the past 20 years there have been proposed alternative methods to replace or supplement traditional phenotypic methods. The most used of these methods are standard PCR tests and sequencing of genes.

Correct detection of ESBL, AmpC and carbapenemases producing strains remains a challenge for the microbiology laboratory and it is very important to avoid clinical failure due to inadequate antibiotic therapy and nosocomial infections.

## LITERATURE REVIEW

The literature review was structured in eight chapters (2.1-2.8) and outlines a synthesis of current knowledge regarding *E. coli* and *K.pneumoniae* and their resistance to beta-lactam antibiotics due to beta-lactamases. This synthesis was achieved by studying national and international literature.

## PERSONAL CONTRIBUTIONS

**Chapter 3.3.1** Evaluation of resistance phenotypes to beta-lactams in *E. coli* and *K. pneumoniae* strains

During January 2007 - December 2010 were identified a number of 1661 *E. coli* and 1029 *K.pneumoniae* strains isolated from various clinical samples. Most strains of *E.coli* 1274 (77%) were isolated from urine, 127 (8%) from blood cultures, 93 (6%) from purulent collections, 73 (4%) from sputum and most strains of *K.pneumoniae* (65%) were isolated from urine.

Using phenotypic methods we have divided *E.coli* and *K.pneumoniae* strains in this study in several phenotypes based on resistance to beta-lactams .

Analyzing the evolution of resistance phenotypes during 2007- 2010 we observed the following aspects: for the *E.coli* strains the percentage of strains with acquired penicillinase phenotype, and wild type phenotype decreased, while the number of ESBL strains increase and for the same period the percentage of *K.pneumoniae* strains with acquired penicillinase decreased constantly and increased the number of strains with ESBL and impermeability to cefamicins. Also for *K.pneumoniae* strains resistance to carbapenems was highlighted.



The percentage of strains with wild type phenotype was close with slight predominance in *E.coli* strains (26.73%) compared with *K.pneumoniae* (21%) ( $p = 0.0088$ ) and the trend was the decrease in the number of strains with this phenotype in both *E.coli* and *K.pneumoniae*.

*E.coli* strains showed reduced susceptibility to quinolones which raises suspicion of ST131 clone presence, clone widespread in the world and which subsequently can acquire ESBL genes particularly CTX-M-type 15.

IRT phenotype (inhibitor-resistant TEM) characterized by resistance to aminopenicillins, carboxipenicillins and less ureidopenicillins was seen in a small number of strains of both *E.coli* (1.6%) and the *K.pneumoniae* (0.4 %).

ESBL phenotype clearly prevailed between *K.pneumoniae* strains (46.4%) compared with *E.coli* strains (24.7%) ( $p = 0.0001$ ) while following the trend we found that the number of *E.coli* strains with ESBL increased during the study period.

High level cephalosporinase phenotype appeared increasingly after 1980. In Europe this phenotype occurs in 5-40% of Enterobacteria isolated in hospitals. A small percentage of *E.coli* (1%) and *K.pneumoniae* (0.59%) strains showed this phenotype. Unfortunately, this phenotype is very problematic in terms of diagnosis and the combination of ESBL and increasingly described AmpC, reduce the possibilities of therapy. Another mechanism that lowers the sensitivity to cefamicine, first and second generation cephalosporins and less to the third generation, due to porins modification, associated simultaneously with reduce sensitivity or resistance to quinolones, chloramphenicol, tetracycline and trimethoprim / sulfamethoxazole was found in 16% of *K.pneumoniae* strains affecting especially ceftazidime.

A total of 69 (7%) *K.pneumoniae* strains showed ESBL resistance combined with carbapenems resistance especially ertapenem. Most *K.pneumoniae* strains suspected of producing carbapenemases were isolated in 2008 (33) followed by 2009 (23). A small number of strains were isolated in 2007 (4) and 2010 (6) All strains were isolated from hospitalized patients and of these 55 (80%) were admitted on surgical wards, 10 (14%) on SCBI wards and the remaining 4 patients were hospitalized as follow three in intensive care and one on a mix ward with medical and surgical profile. Most strains 60 (87%) were isolated from urine, 2 (3%) from blood cultures and the remaining 7 strains were isolated from tracheal aspirate, and drains. No data was found about evaluation studies of phenotypic methods for detecting resistance to carbapenems in Romania, so our study represents a first. Modified Hodge test was negative in 49 (71%) strains, positive in 18 (26%) strains and 2 (3%) strains had indeterminate results. In the next step we tried other methods to assess phenotypic resistance to carbapenems. None of our strains showed synergy between ertapenem, meropenem and imipenem disks with EDTA disc and the result with imipenem and EDTA Etest was also negative. The synergy test between ertapenem, meropenem and imipenem disks with 400 mg fenilboronic acid disc was positive in 8 (12%) strains and the remaining 61 (88%) strains were negative. We have found a diagnostic profile: ertapenem MIC > MIC meropenem > imipenem MIC, profile observed in strains from UK and Italy.

All data suggest that in our case *K.pneumoniae* strains had lack of permeability that prevented ertapenem concentration by inactivating genes coding for external membrane proteins OmpK36 and OmpK35. As shown in other studies these strains are sporadic, have limited clonally dissemination as impermeability makes them less competitive.

### **Chapter 3.3.2** Phenotypic analysis of blood culture isolates

Most of *E.coli* and *K.pneumoniae* strains were isolated from adults with an indication that we have isolated several *E.coli* strains from female (55%) and several *K.pneumoniae* strains from male (52%). The percentage of *K.pneumoniae* ESBL strains isolated from intensive care varies between 9- 59% in other studies, in our case is 38%. Local variations depend on antibiotic therapy but may reflect the ability of microbiology laboratories to identify such strains. Also the intensive care patients have a greater number of risk factors for colonization or infection with *K.pneumoniae*.

Our data suggest that this important pathogen in hospitals worldwide varies seasonally regarding the presence in blood cultures, in our case *K.pneumoniae* strains were isolated from blood cultures especially in June, July, and August. This observation was not available for strains isolated from other type of samples or for *E.coli* strains although other studies describe seasonal variation for other Gram negative.

Although we have isolated a large number of *E.coli* strains, higher number of ESBL-producing strains we have found between *K.pneumoniae* (78.75%). For *E.coli* strains we had three profiles of resistance to beta-lactams predominating: wild type strains, strains with acquired penicillinases and ESBL strains (24%), and only two profiles for *K.pneumoniae* strains namely ESBL (78.75%) and wild phenotype. The last EARSS data for Romania showed that the percentage for ESBL *E.coli* strains isolated from blood cultures is considered to be between 10- 25%. Unlike *E.coli* strains in *K.pneumoniae* strains we met resistance to carbapenems really in small percentage (3%) compared with other studies where there is a percentage of 10.8%.

### **Chapter 3.3.3** Phenotypic analysis of strains isolated from urine

In our study we analyzed 1271 *E.coli* and 658 *K.pneumoniae* strains isolated in urine cultures during January 2007- December 2010.

For *E.coli* most strains were isolated from adult 1216 strains and 52 strains from children, female gender predominantly in adults (832 strains) and children (42 strains). There are three prevailing phenotypes: 332 (26%) wild phenotype strains, 307 (24%) ESBL-producing strains and 556 (44%) acquired penicillinase strains.

A total of 24 (1.9%) strains had IRT phenotype and 11 (0.87%) strains had AmpC. The remaining 38 (3%) strains had combinations of several types of beta-lactamases.

The fact that strains with beta-lactams wild phenotype are accompanied by reduced sensitivity to quinolones suggests that among our non-ESBL strains we have a clone ST131, data in accordance with other authors.

Strains retain sensitivity rate of 83% to nitrofurantoin, which remains a useful option for treatment of urinary infections with *E.coli* ESBL positive.

Looking at *K.pneumoniae* strains we can see that unlike the *E.coli* were isolated mainly from males admitted to SCBI wards and surgical wards. On other wards *K.pneumoniae* strains were isolated mainly from the female sex.

Compared with *E.coli*, far fewer *K.pneumoniae* strains were wild type phenotype and a significant percentage have a wide variety of beta-lactamases, and such strains raise more problems for therapy. 85% of *K.pneumoniae* strains had beta-lactamase and at least 45% of these ESBL, high percentage found also in other studies. The association between ESBL and

impermeability to cefamicins was present in 22% of strains and 8% of strains were resistant to carbapenems. Resistance to carbapenems is difficult to prove and appears frequently in strains isolated from patients with urinary *K.pneumoniae* strains and in some strains we described resistance to colistin like in other studies.

#### **Chapter 3.3.4** Comparative studies of methods for detection of beta-lactamases

**Study 1:** we analyzed a total of 22 *E.coli* and 65 *K.pneumoniae* strains isolated between December 2008 - September 2009 for which we evaluated several methods: disk approximation, combined disk method (cephalosporins and clavulanic acid), Etest, Vitek2.

Following this study we can say that Jarlier's method is simple, requires no additional cost, is easily performed and interpreted even in routine antibiogram if we take into account properly use and location of the cephalosporin and clavulanic acid disks. Standards show that several cephalosporins disks are need for screening. In this study we see that the best cephalosporin for detecting ESBL is cefpodoxim. On the other hand, ceftazidime has a low rate of identification and confirmation. From our study we can say that we cannot rely on cefotaxime and ceftriaxone resistance and susceptibility to ceftazidime when trying to diagnose a strain with CTX-M beta-lactamases due to multiple interference.

Cefoxitin resistance and sensitivity to cefepim are markers for the presence of AmpC beta-lactamases.

Our study showed that in *E.coli* strains using ceftazidim disc alone would have led to lack of identification of 9.6% of strains as well as use of cefepim disc alone. Using cefpodoxim and cefotaxim disks all strains were correctly identified.

For *K.pneumoniae* using cefotaxim disc alone would have led to lack of identification in 6.5% of strains and using ceftazidime and cefepim discs, each lack 13% of strains. Cefpodoxim disc identified all strains. Cefotaxim disc would have correctly identified 20% of strains and ceftazidim disc 30% of strains.

Combination disc method recommended by CLSI is also easy to perform and interpret but requires an extra day, because discs designed for this purpose are not included in routine susceptibility tests. In all cases the presence of ESBL was confirmed using double discs.

Etests require good laboratory technique, precision and accuracy in interpreting the results and again an additional day.

**Study 2:** we evaluated MAST 4-Disc disk, fenilboronic acid synergy method and cloxacillin synergy method, compared with current methods used in the laboratory, Vitek2 compact and combined discs. For this study we analyzed 78 strains, 58 *E.coli* and 23 *K.pneumoniae* strains.

Laboratory techniques for detection of AmpC beta-lactamases in particular plasmid-mediated AmpC are limited and do not appear clearly written in the standards used today. Detection is more difficult when AmpC are associated with ESBL.

We set again cefepim role in detecting ESBL in the presence of AmpC. Sensitivity to cefepim and resistance to cefoxitin in screening test show the possibility of the presence of AmpC.

In our study for identifying AmpC strains, synergistic effect with boronic acid discs was manifested only in two strains and was difficult to interpret. In conclusion we consider that this is not an easy method to use in current practice because it depends very much on the concentration of boronic acid disc and the distance between the discs and the inoculum effect.

Cloxacillin disk used in our study gave only negative results in contradiction with numerous other studies supporting the sensitivity and specificity of 90% for this method to detect AmpC beta-lactamases.

MAST 4-Disc test is fast, easy to perform and to interpret and easily identified in our study AmpC beta-lactamases and is the only test that used to identify strains that had ESBL association with AmpC beta-lactamases. However the method lacks specificity because in strains resistant to carbapenems and some strains with impermeability did not detect the presence of ESBL. Another lack of the method is that it is more expensive than routine disc (but still cheaper than Etests) and requires an extra day.

It would be very useful to use constantly such a detection method that uses a substrate adapted to these strains with a wide variety of beta-lactamases, strains difficult to identify by the methods used until now as routine techniques.

### **Chapter 3.3.5** Genotypic analysis of *E.coli* and *K.pneumoniae* strains

The achievement of this part of our study has put particular problems because there are few genotypic data on *E.coli* and *K.pneumoniae* strains and their resistance to beta-lactams in Romania.

During 2011 we analyzed from the molecular point of view a number of 21 *E.coli* strains isolated from blood cultures, 38 *K.pneumoniae* strains isolated from blood cultures and 13 *K.pneumoniae* strains suspected of producing carbapenemases.

Investigation at the molecular level showed that *E.coli* ESBL strains had either *bla*TEM-1 gene or *bla*CTX-M-15, or both. Thus 54.2% of strains had both genes, *bla*TEM-1 gene was missing in 38% of strains and *bla*CTX-M-15 was not present in 9.5% of the strains analyzed. Can be noticed that most ESBL strains had both genes. *Bla*SHV-1 gene was not detected in any of the *E.coli* strains.

*Bla*SHV-1 gene was detected in all *K.pneumoniae* strains. *Bla*CTX-M-15 gene was detected in 34 (89%) of the strains. Of the 30 strains analyzed (79%) showed an association between *bla*SHV-1, *bla*TEM-1 and *bla*CTX-M-15. We considered necessary to test *K.pneumoniae* for *bla*KPC-1, *bla*KPC-2, *bla*KPC-9. However we did not detect the presence of any of these genes in strains analyzed. We tested our strains for the presence of genes encoding other carbapenemase: *bla*OXA-48, *bla*GES-4 but the results were negative.

Resistance to carbapenems can occur due to overproduction of other types of beta-lactamases. Therefore we tested the strains for: *bla*TEM-1, *bla*TEM-2, *bla*SHV-1, *bla*CTX-M-15, *bla*OXA-2, *bla*VEB. As expected all strains were positive for *bla*SHV-1, 12 strains were positive for *bla*TEM-1, *bla*TEM-2, *bla*CTX-M-15. All strains were negative for *bla*OXA-2 and *bla*VEB ESBL genes.

Because phenotypically strains were described as having impermeability to cefamicins and carbapenem resistance may occur by outer membrane porins modification (OMP), namely OmpK35, OmpK36, OmpK37 in combination with ESBL or AmpC overproduction we tested our strains for OmpK36, but indeterminate results were obtained in all strains.

From January 2007 to December 2010 we selected a number of 71 *E.coli* and 76 *K.pneumoniae* strains isolated from urine. Phenotypically these strains showed ESBL presence. All strains were tested for *bla*OXA, *bla*CTX-M, *bla*TEM and *bla*SHV by multiplex PCR using universal primers (method described in Chapter 3.2.7)

For *E.coli* *bla*CTX-M have been reported in 68% of strains, *bla*TEM in 65% of strains, *bla*OXA in 60% of strains and *bla*SHV to 34% of strains. In 3 (4%) strains we could not highlight any of the four genes. *bla*TEM was found at 12 (17%) strains, and 6 (8%) strains associated *bla*TEM with *bla*CTX-M-15.

For *K.pneumoniae* *bla*CTX-M genes were found at 68% of strains, *bla*TEM at 95% of strains, *bla*OXA to 59% of strains and *bla*SHV to 100% of strains. In 3 (4%) strains were detected only *bla*SHV gene, at 11 (14%) *bla*TEM and *bla*SHV genes and at 11 (14%) strains *bla*CTX-M-15, *bla*TEM and *bla*SHV.

Among the 48 strains producing CTX-M-15, 37 (77%) strains produce *bla*OXA genes, 47 (98%) *bla*TEM genes, 48 (100%) *bla*SHV genes. 22 (75%) strains have shown an association between *bla*CTX-M-15, *bla*OXA, *bla*TEM, *bla*SHV.

*E. coli* strains isolated from urine showed the association of the four beta-lactamases tested. CTX-M enzymes predominated, followed by TEM and OXA type and the SHV enzymes were fewer.

For *K.pneumoniae* strains isolated from urine we identified SHV-type enzymes in all strains. Second most common type enzymes were TEM and only the third CTX-M type enzymes. At more than half of the strains we isolated OXA-type gene.

At *K.pneumoniae* strains like *E.coli* strains we have met the association of the four types of enzymes.

#### GENERAL CONCLUSIONS

Among the general conclusions I point out a few.

1. The presence of *E.coli* and *K.pneumoniae* strains with ESBL an AmpC associated with the presence of resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides shows the complexity of mechanisms of resistance, requiring constant monitoring measures to avoid the spread of these strains
2. Our results confirm that the best indicator for ESBL is cefpodoxim disc and ceftazidime has the highest failure rate for both *E.coli* and for *K.pneumoniae*. For screening is preferable a combination of cefpodoxim, ceftazidime and cefotaxime. For strains with AmpC we recommend the screening with cefoxitin and cefepim especially when there is association with ESBL
3. Among ESBL confirmatory methods, double disc method is preferable to the synergy method being easy and precise even if the price is higher. E-test method is prohibited for most laboratories being too expensive.
4. As far as we know confirmatory method with the MAST 4-disc, was first used in the laboratory in our country in this study. It is a method easy to use, sensitive and has the advantage of simultaneously identifying the presence of ESBL and AmpC fact that no other method does . It is our proposal for routine laboratory application.
5. Our research showed that ertapenem disk screening and confirmatory tests with EDTA, modified Hodge test and boronic acid disc are useful in highlighting phenotypic evidence of resistance to carbapenems.
6. As a novelty our study offers an insight into genetic characteristics of *E.coli* and *K.pneumoniae* beta-lactamase producing strains isolated from severe infections. Similar studies should be conducted in other parts of the country in order to know the ESBL enzyme genotypes for epidemiological purposes.

7. *E.coli* ESBL positive strains had CTX-M enzymes domination.
8. For *K.pneumoniae* ESBL positive strains we identified enzymes SHV-1, TEM and only in third place CTX-M type enzymes.
9. *bla*CTX-M-15 gene was the most common in both *E.coli* and *K.pneumoniae* strains isolated from systemic infections.
10. In a small number of *K.pneumoniae* strains although phenotypically was documented reduced susceptibility to carbapenems particularly ertapenem, genotype analyze did not reveal genes *bla*KPC, *bla*GES-4, *bla*OXA-48, *bla*VIM nor *bla*OXA-2 or *bla*VEB gene instead we identified *bla*TEM-1, *bla*TEM-2, *bla*SHV-1, *bla*CTX-M-15. In this situation carbapenems can be used when such strains are involved in severe infections.
11. The current findings are a promising start for a correct assessment of sensibility to antibiotics, such as microbiology laboratory to provide accurate data to establish an appropriate antibiotic therapy.

REFERENCES 191 titles

## CURRICULUM VITAE

**Name:** FLONTA Mirela Maria Margareta

**Date and place of birth:** March 25, 1963, Cluj-Napoca

**Marital status:** single

**Nationality:** Romanian

**Languages:** English, French, Italian (intermediate level)

### **EDUCATION:**

1981 - Graduate School of Mathematics and Physics "Nicolae Bălcescu" Cluj-Napoca

1987 - graduated from the Faculty of Medicine IMF Cluj-Napoca

1987-1990: physician trainee

October 1990: Bucharest national contest for resident

1991-1994: resident Microbiology, Infectious Diseases Hospital Cluj-Napoca

1994: specialist degree in microbiology

1994-1998: specialist in microbiology Infectious Diseases Hospital Cluj-Napoca (laboratory)

1998: exam for principal degree in microbiology

1998-2005: MD activity in microbiology laboratory SCBI Cluj-Napoca

2004-present: Medical Laboratory chief physician Infectious Diseases Hospital Cluj-Napoca

2004-PhD student discipline Infectious Diseases UMF «Iuliu Hatieganu »Cluj-Napoca

### **EXPERTISE:**

May 2005 - Health Service Management

### **MEMBERSHIP IN PROFESSIONAL AND SCIENTIFIC SOCIETIES**

Romanian College of Physicians

Romanian Society for Microbiology

Romanian Society of Medical Mycology and Micotoxicology

European Society of Microbiology and Infectious Disease

American Society of Microbiology

## **LANGUAGE SKILLS**

English-very good, French-very good, Italian-good

## **POSTGRADUATE COURSES**

Novembre 1995- Cours International sur les Hépatites Virales organise par le Réseau international des Instituts Pasteur et Instituts Associes au Centre D'enseignement et de documentation "Jacques Monod" de L'Institut Cantacuzène, Bucarest

April 1998- "News in the clinical diagnosis of infectious diseases", Cantacuzène Institut, Bucarest

Octobre 1998- INCHEBA Convention Center, Bratislava, Slovak Republic-14-th International Short- Courses Series: Antimicrobial Resistance Surveillance and Susceptibility Testing

March1999- Training Stage in Clinical Microbiology&Public Health Laboratory, Leicester Royal Infirmary NHS Trust, England

June 1999- " Antibiotic resistance in France and Romania" – Course organized by «Matei Balş» Institut of Infectious diseases, Hospital Villeneuve St. Georges (France), University Paris VI and INCDMI Cantacuzino Bucharest, French Embassy in Bucharest, Romanian Society of Microbiology, "Jaques Monod" Centre, Cantacuzino Institut

June- July 1999- Course "News in Clinical and Laboratory Diagnosis of innfectious diseases", organized by Romanian-American Foundation for Medical Education and Cantacuzino Institut Bucharest, "Jaques Monod" Centre

November 2005- Course "Requirements and recommendations for biosafety and quality improvement in HIV diagnostic laboratories in Romania ", Bucharest

November 2006 Bucuresti- « Laboratory diagnosis of invasive fungal infections», "Matei Balş" Institut of Infectious Diseases, Bucharest and Infectious and Tropical Diseases Hospital "Victor Babeş" Bucharest

September 2007 Bucuresti- « Using the PCR technique in diagnosis and epidemiology of infectious diseases », INCDMI Cantacuzino

December 2008- INCDMI Bucuresti- News in the diagnosis of influenza

May 2010 Cluj-Napoca - Particular requirements for quality and competence in medical laboratories. Auditing of management systems.

October 2010-, Study of resistance mechanism in comunitary and nosocomial pathogens by automatic sistem for identification and antibiogram" National Project with BioMerieux-France „Bacterial resistance detection, a new challenge for the laboratory to fight HAI !”

November 2010 Munster, Germany, Institut of Medical Microbiology of the University Hospital Munster- Workshop Laboratory Diagnostics of Nosocomial Pathogens

February 2011 Nijmegen, The Netherlands- Radboud University Nijmegen Medical Center- Workshop Laboratory Diagnosis of Invasive Fungal Diseases

## **SCIENTIFIC ACTIVITY**

### **Papers published in full text :**

1.**Flonta M**, Crăciunaş C, Lupşe M, Almaş A M, and Cârstina D- Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases(ESBL)- producing *Escherichia coli* strains in blood cultures- - HVM Bioflux, 2011, Volume 3, Issue 2; pg: 83-88

2. Petrașcu M, **Flonta M**, and Almaș A M- The genetic characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from urine- - HVM Bioflux, 2011, Volume3, Issue 2; pg: 58-65
3. Petrascu M, **Flonta M**, Almaș A M- 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 Vol 84-nr-3; pg:371-377
4. Almaș A, **Flonta M**, Petrașcu M, Năstase V, Coloși I- *Staphylococcus* species and their Methicillin- Resistance in 7424 Blood Cultures for Suspected Bloodstream Infections- - Applied Medical Informatics Vol 28, No. 2/2011, pp:22-30
5. **Flonta M**, Lupșe M, Crăciunaș C, Almaș A, Cârștina D- Ertapenem resistance among Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates- - Therapeutics Pharmacology and Clinical Toxicology volume XV, number 2 June 2011 pg: 1-5
6. 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 vol. 84, nr.2, pg 173-177
7. **Flonta M**, Almaș A- Phenotypic methods for detection of beta-lactamase-mediated resistance in *E.coli* and *Klebsiella pneumoniae*- Therapeutics Pharmacology and Clinical Toxicology volume XV, number 1 March 2011 pg: 7-12
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 Tom. XVII, Issue: 2, 2010, pp. 248-252
9. Crăciunaș C, Butiuc-Keul A, **Flonta M**, Brad A, Sigartău M- Application of molecular techniques to the study of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Cluj-Napoca, Romania- - Analele Universității din Oradea - Fascicula Biologie Tom. XVII, Issue: 2, 2010, pp. 243-247
10. Hagău N, **Flonta M**, Slavcovici A, Studnicska D, Cocu S, Mleşnițe M, Găvrus R, Laslo C. Prospective study of central venous catheter colonization and catheter-related bloodstream infection in intensive care unit, echocardiographic follow-up after catheter removal. Eur J Anaesth 2006; 23(suppl 37): A-774
11. Hagău N, **Flonta M**, Slavcovici A, Studnicska D, Cocu S, Mleşnițe M, Găvrus R, Laslo C. Studiu prospectiv al colonizării și infecției de cateter venos central într-o unitate de terapie intensivă. Evaluare ecocardiografică a pacienților cu catetere. J Rom ATI 2006;13(2):85-88.
12. Slavcovici A, Lupșe M, **Flonta M**, Zanc V, Cârștina D, Dicea A, Vesbianu D- Evoluția sensibilității la antibiotice a tulpinilor de *E. coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp* și *P. aeruginosa*.- Revista Română de Boli Infecțioase, 2006, vol IX, nr 1-2 pg:4-9

**Papers published as abstract:**

1. Straut M, Banu O, Dobreanu D, Dobreanu M, Ionac A, **Flonta M**, Surdeanu M, Dinu S, Badescu D, Lerescu L, Ungureanu V, Ginghina C, Man A, Szekely E, Lupse M, Oprea M și toți membrii consorțiului Endobact- Proiect ENDOBACT: Endocardita infecțioasă bacteriană- dezvoltarea unui model funcțional de supraveghere, bazat pe metode moleculare și imunologice- A II-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie, Sinaia 14-16 octombrie 2010



2. Slavcovici A, Horvat M, Mihuțiu 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 Stiințifice ale Institutului Național de Boli Infecțioase’’ Prof. Dr. Matei Balș’’ 13-16 octombrie 2010 București
3. **Flonta M**, Crăciunaș C, Almaș A, Lupșe M, Cristea M- Caracterizare moleculară a unor tulpini de *P.aeruginosa* – Conferința Națională de Boli Infecțioase, Cluj-Napoca, 23-25 septembrie 2010
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. **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

#### **TEACHING ACTIVITY :**

Collaborator in postgraduate courses of the Department of Infectious Diseases  
 Practical activities of Microbiology with students of the Faculty of Medicine VI<sup>th</sup> year  
 Internship with residents in the specialty Laboratory Medicine

#### **EXPERIENCE IN NATIONAL PROGRAMS:**

1. Responsible partner 3 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. Responsible partner 5 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:**

Investigator clinical study: A population-based surveillance of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease- meningitis- in children less than five years of age: Glaxo Smith Kline Biologicals 2006-2007

Member: Study Group SRMMM for invasive fungal infections- 2006- present

Investigator: SENTRY 2011

#### **PRIZE:**

Award of excellence for the work presented at National Conference of Infectious Disease "Infection today. Therapy where?" September 2010