

PROIECT TE 135
CARACTERIZAREA PATTERN-URILOR DE VIRULENȚĂ ȘI REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE A
TULPINILOR DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ȘI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IZOLATE DIN
INFECȚII NOSOCOMIALE
SINTEZA LUCRARILOR
FAZA II

În cursul acestei faze au fost stabilite, cu ajutorul metodelor fenotipice și genotipice, profilurile de sensibilitate la antibiotice la tulpini de *S. aureus* și de *Ps. aeruginosa* izolate din infecții aparute la pacienți cu afecțiuni cardiovasculare, spitalizați în diferite secții ale Institutului de Boli Cardiovasculare Prof. C.C. Iliescu, al căror *pattern*-uri de virulență au fost stabilite în faza anterioară a proiectului.

Materiale și metode

Pentru testele fenotipice și de analiză statistică, au fost selectate 357 tulpini de *S. aureus* și 206 de *Ps. aeruginosa* reprezentând un procent semnificativ, de 48% din totalul etiologiilor identificate prin analiză unui număr total de 1166 tulpini cu potențial patogen izolate din produse patologice diverse, recoltate de la pacienți cu afecțiuni cardiovasculare (fig. 1).

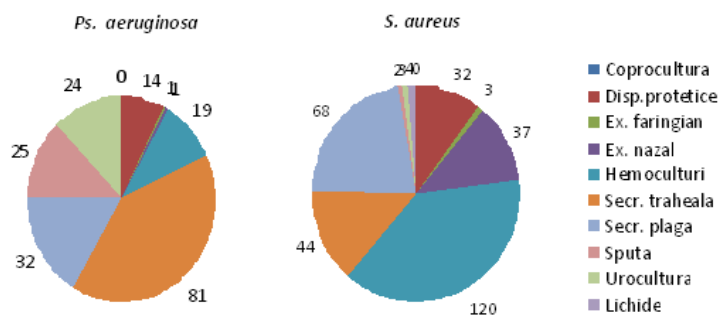


Fig. 1. Distribuția tulpinilor analizate în funcție de sursa de izolare

Pentru fiecare dintre tulpinile aparținând celor două specii analizate, a fost testată sensibilitatea la antibiotice în conformitate cu standardele CLSI 2011 și EUCAST 2011, folosind metodele disc-difuzimetrică și CMI (sistem automat -Vitek 2 Compact). Citirea interpretativă a antibiogramei a permis identificarea unor mecanisme de rezistență fenotipică la antibioticele β -lactamice (rezistența la metilina evidențiată cu ajutorul disacului de cefoxitin, teste de synergism și antagonism pentru evidențierea beta-lactamazelor de spectru larg, β -lactamazelor inductibile și carbapenemazelor) și macrolide (rezistența inductibilă la macrolide, lincosamide și streptogramine B revelată prin aplatizarea zonei de inhibiție a discului cu clindamicină adiacent discului cu eritromicină, rezultând forma „D” a zonei de inhibiție. De asemenea detectarea fenotipului producător de beta-lactamaza de spectru larg s-a realizat cu ajutorul E-test PM/PML, iar a fenotipului producător de metalobeta-lactamaza cu E-test IP/IPI (1, 2, 3, 4).

Metodele moleculare au fost utilizate pentru detectarea la tulpinile studiate prin PCR a genelor responsabile de apariția unor fenotipuri specifice de rezistență la antibiotice: β -lactamaze: clasa A (familiile PSE, CARB, TEM), clasa B – metalo- β -lactamaze - MBL (familiile IMP, VIM, SPM), clasa C - AmpC, β -lactamaze cu spectru extins (ESBL); pierderea unei porine (proteina de membrana externă) (OprD); expresia unor pompe de eflux multidrug, precum și rezistența la fluoroquinolone: mutații în genele cromosomale ce codifică ADN-giraza și/sau ADN-topoizomeraza; și/sau supraexpresia unor pompe de eflux multidrug (la *Ps. aeruginosa*), respectiv rezistența la: beta-lactami prin alterarea tinte, macrolide-lincosamide și streptogramine tip B (MLSb) prin alterarea tinte ribosomale sau prin mecanismul de eflux activ, precum și la tetracicline (la *S. aureus*).

Pentru detectarea genelor responsabile de fenotipurile de rezistenta identificate s-a extras ADN genomic din tulpinile studiate cu kit-ul Wizard Genomic DNA Purification (Promega, U.S.) conform cu recomandarile producatorului. La *S. aureus* au fost utilizate: teste PCR individuale pentru detectarea genei care codifica rezistenta la beta-lactami (*mecA*), respectiv a genei care codifica rezistenta la macrolide si la steptograminele de tip B prin mecanismul de eflux activ (gena *msrA*); doua teste multiplex-PCR pentru stabilirea determinismului genetic al rezistentei la tetraciclina (genele *tetK*, *tetM*), si al fenotipului de rezistenta MLSb inductibila sau constitutiva (genele *ermA*, *ermC*).

Reactii PCR individuale au fost utilizate pentru detectarea la *Ps. aeruginosa* a genelor care codifica sinteza de ESBL (*bla_{ampC}*, *bla_{TEM grup}*, *bla_{SHV grup}*, *bla_{PSE grup}* (PSE-1, PSE 4, CARB-3)), respectiv a genei *bla_{IMP}*, care codifica aparitia fenotipului MBL. Un multiplex-PCR a fost utilizat pentru detectarea genelor *bla_{VIM}*, *bla_{SIM}* si *bla_{SPM}*, care codifica fenotipul MBL. Stabilirea determinismului genetic al rezistentei la ciprofloxacina a tulpinilor studiate s-a realizat prin PCR pentru a testa prezenta unor mutatii in genele *gyrA*, sau *parC*, respectiv prezenta genelor *mexB*, *mexD*, *mexF* si *mexY*, care codifica sinteza unor pompe de eflux multidrug.

Secventele primerilor specifici utilizati in testele PCR si greutatea moleculara a ampliconilor obtinuti sunt listate in tabelul 1. Produsii de amplificare au fost verificati prin electroforeza in gel de agaroză 1,5% colorat cu bromură de etidiu (10µg/ml) si identificati pe baza dimensiunilor caracteristice cu ajutorul unor markeri de greutate moleculara specifici.

Tabelul 1. Secventele primerilor utilizati in PCR pentru detectarea genelor de rezistenta la antibiotice la tulpinile de *S. aureus* si *P. aeruginosa* studiate (5-9).

<i>S. aureus</i>			
Gena	Primeri	Secventa de nucleotide	Dimensiune amplicon
<i>ermA</i>	ermA-F ermA-R	5'-AAG CGG TAA ACC CCT CTG A-3' 5'-TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC-3'	190 bp
<i>ermC</i>	ermC-F ermC-R	5'-AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT-3' 5'-TAA TCG TGG AAT ACG GGT TTG-3'	299 bp
<i>tetK</i>	tetK-F tetK-R	5'-GTA GCG ACA ATA GGT AAT AGT-3' 5'-GTA GTG ACA ATA AAC CTC CTA-3'	360 bp
<i>tetM</i>	tetM-F tetM-R	5'-AGT GGA GCG ATT ACA GAA-3' 5'-CAT ATG TCC TGG CGT GTC TA-3'	158 bp
<i>mecA</i>	mecA-F mecA-R	5'-ACGAGTAGATGCTCAATATAA- 3' 5'-CTTAGTCTTTAGCGATTGC- 3'	263 bp
<i>Ps. aeruginosa</i>			
<i>bla_{ampC}</i>	ampC-PA-F ampC-PA-R	5'-CTTCCACACTGCTGTTTCGCC-3' 5'- TTGGCCAGGATCACCAGTCC-3'	1063 bp
<i>bla_{TEM grup}</i>	TEMgrup-F TEMgrup-R	5'-ATGAGTATTCAACATTTTC CG -3' 5'-CTGACAGTTACCAATGCTTA-3'	867 bp
<i>bla_{SHV grup}</i>	SHVgrup-F SHVgrup-R	5'-GGTTATGCGTTATATTCGCC-3' 5'-TTAGCTTTGCCAGTGCTC-3'	865 bp
<i>bla_{PSE grup}</i>	PSEgrup-F PSEgrup-R	5'-ACCGTATTGAGCCTGATTTA-3' 5'-ATTGAAGCCGTGTTTGAGC-3'	321 bp
<i>bla_{IMP}</i>	IMP-A IMP-B	5'-GAAGGYGTTTATGTTTCATAC-3' 5'-GTAMGTTTCAAGAGTGATGC-3'	587 bp
<i>bla_{VIM}</i>	VIMgen-F2 VIMgen-R2	5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3' 5'-AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'	382 bp
<i>bla_{SIM}</i>	SIM-F1 SIM-R1	5'-GTACAAGGGATTTCGGCATCG-3' 5'-TGGCCTGTTCCCATGTGAG-3'	569 bp
<i>bla_{SPM}</i>	SPM-F1 SPM-R1	5'-CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG-3' 5'-CCTTTTCCGCGACCTTGATC-3'	798 bp
<i>oprD</i>	OprD-F OprD-R	5'-GCTCGACCTCGAGGCAGGCCA-3' 5'-CCAGCGATTGGTCGGATGCCA-3'	242 bp
<i>gyrA</i>	gyrA5 -F gyrA5 -R	5'-GGC CTG AAG CCG GTG CAC-3' 5-'CAC GGC GAT ACC GCT GGA-3'	410 bp

<i>parC</i>	parC6 –F parC6 –R	5'-TCC AAG CAA GAA ACT G-3' 5'-AGC AGC ACC TCG GAA TAG-3'	227 bp
<i>mexB</i>	mexB-F mexB-R	5' -CCATGGTGCTCTCGGCGGTATTCCT-3' 5'-CTGTTCTCGCCACCGGGACGCTCTT-3'	591 bp
<i>mexD</i>	mexD-F mexD-R	5'-GCCAACGCGATCCAGACCCTACCCT3' 5'-CGCGCCACCAGCTTCGAGTTGAG-3'.	715 bp
<i>mexF</i>	mexF-F mexF-R	5'-CCAGGTCAACGTGCCGAGAT-3' 5'CCTCCTGCTTGTCTTGGCGAACTC-3'	707 bp
<i>mexY</i>	mexY-F mexY-R	5'-CCCGGCCAAGCTGACCTCGATGAAC-3' 5'-CCCAGGCCGAGCATC ACCGTG AAG-3'	594 bp

Rezultate si discutii

Tulpinile de *Ps. aeruginosa* studiate au prezentat atat fenotipuri de rezistență intrinsecă la majoritatea compușilor antimicrobieni, datorită capacității selective de a elimina moleculele care penetrează membrana externă, cat si fenotipuri de rezistență dobândită realizată prin mai multe mecanisme, care atunci când funcționează simultan, conferă caracterul de multirezistență (10-12) (Tabelul 2). Rezistența la asocierile de peniciline cu inhibitori, ca si la cefalosporinele de generația a treia si aminoglicozide a fost foarte ridicată. Rezistența la carbapenemi, este semnificativă, cu o prevalență de peste 11%. Tulpini multirezistente de *Ps. aeruginosa* au prezentat frecvent rezistența combinată la doua, trei patru, cinci sau chiar toate clasele de antibiotice testate (Tabelul 1.).

Tabelul 2. Fenotipurile de rezistență pentru tulpinile de *Ps. aeruginosa* analizate (n= 206)

Fenotipul de rezistență	% din totalul tulpinilor analizate
Sensibilitate	11,4
Rezistența unică (la antibiotice dintr-o singură clasă)	
Rezistența la două clase de antibiotice	
FQ+AG	28,7
TZP+CAZ	25,1
FQ+CAR	21,4
TZP+FQ	28,3
TZP+CAR	20,5
TZP+AG	27,3
AG+CAR	20,5
CAZ+CAR	20,09
FQ+CAZ	27,3
CAZ+AG	27,3
Rezistența la trei clase de antibiotice (MDR)- multi-drug resistance	
FQ+AG+CAR	20,5
TZP+FQ+AG	26,4
TZP+CAZ+CAR	19,6
TZP+FQ+ CAZ	26,02
FQ+ CAZ +AG	26,4
TZP+FQ+ CAR	20,9
FQ+ CAZ + CAR	20,9
TZP +AG+CAR	21,4
TZP+CAZ+ AG	27,3
CAZ +AG+CAR	21,0
Rezistența la patru clase de antibiotice (MDR)	
TZP+FQ+AG+ CAR	18,7
FQ+ CAZ + AG +CAR	19,6
TZP+FQ+ CAZ + AG	22,3
TZP+FQ+ CAZ + CAR	19,7
TZP + CAZ + AG +CAR	20,9
Rezistența la cinci clase de antibiotice (XDR)- extended drug resistance	

TZP+FQ+ CAZ + AG+ CAR	19,7
Rezistenta la toate clasele de antibiotice (PDR)- pan drug resistance	0,9

Rezistența la β -lactamine a tulpinilor de *S. aureus* este variabila in functie de produsul analizat, dar se mentine la un nivel de peste 30%, fenotipul MLSb a fost observat cu o frecventa de 30%, rezistenta la rifampicina este de 20%, iar rezistenta la mupirocin de 20% (Tabelul 3).

Tabelul 3. Fenotipurile de rezistenta pentru tulpinile de *S. aureus* analizate (n= 357)

Fenotipul de rezistenta	% din totalul tulpinilor analizate
Sensibilitate	0
Rezistenta unica (la antibiotice dintr-o singura clasa)	
Betalactamice (BL)	30-80
MLSb	30
Rezistenta la doua clase de antibiotice	
BL+Mupirocin (MUP)	20
Rezistenta la trei clase de antibiotice (MDR)- multi-drug resistance	
BL+Tetraciline (Te)+Macrolide (Ma)	30
Rezistenta la patru clase de antibiotice (MDR)	20
BL+TE+quinolone (CIP)+aminoglicozide (AG)	
Rezistenta la cinci clase de antibiotice (XDR)- extended drug resistance	
BL+TE+MA+AG+CIP+MUP (mupirocin)	10
BL+TE+MA+AG+CIP+RIF (rifampicina)	10
BL+TE+MA+AG+CIP+C (cloramfenicol)	20
Rezistenta la sapte clase de antibiotice (XDR)- extended drug resistance	
BL+MA+TE+biseptol (SXT)+RIF+MUP+C	10
BL+TE+MA+AG+CIP+RIF+SXT	10
Rezistenta la toate clasele de antibiotice (PDR)- pan drug resistance	0

In ceea ce priveste studiul corelatiilor dintre nivelul de rezistenta si sursa de izolare a tulpinilor, rezistența tulpinilor de *S. aureus* la β -lactamine este cuprinsa intre 40% (la izolatele din secretii de plaga), peste 60% (la izolatele din dispozitive protetice si hemoculturi) si peste 80% (in izolatele din secretii traheale. Aparitia rezistentei la rifampin (peste 20% in secretii traheale si hemoculturi), constituie un semnal de alarma, in conditiile in care acest antibiotic se utilizeaza in combinatie cu alte antibiotice in tratamentul infectiilor stafilococice. Tot mai des se remarcă prezenta fenotipului MLSb (rezistență inducibilă la macrolide, lincosamine, streptogramine), peste 30% la izolatele din secretii traheale si de plaga și rezistență de nivel înalt la mupirocin (peste 20 % la tulpinile izolate din infectii asociate dispozitivelor protetice si secretii traheale (Fig. 2).

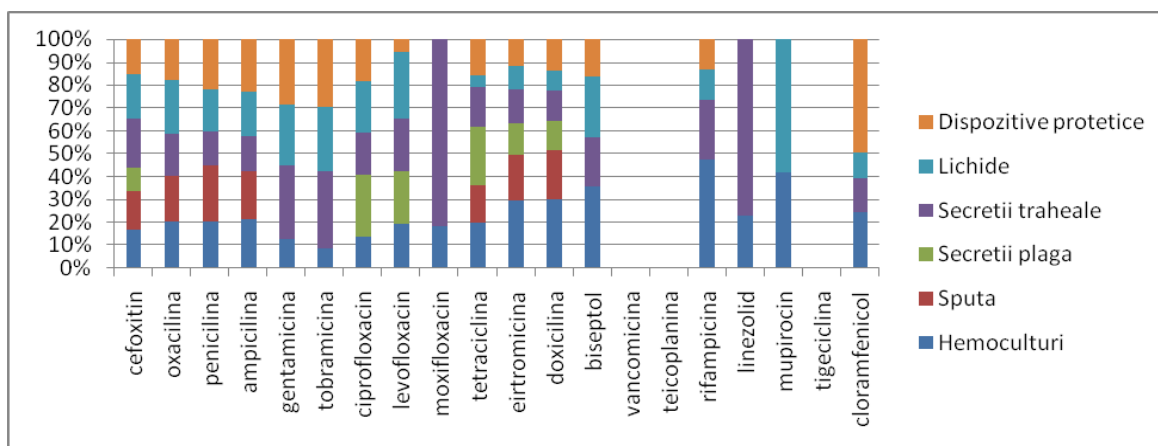


Fig. 2. Distributia fenotipurilor de rezistenta la antibiotice la tulpinile de *S. aureus* in functie de sursa de izolare

În ceea ce privește tulpinile de *Ps. aeruginosa* acestea au manifestat fenotipuri similare, indiferent de sursa de izolare acestora, cu excepția tulpinilor izolate din hemoculturi care au fost înalt rezistente la colistin (Co) (Fig. 3).

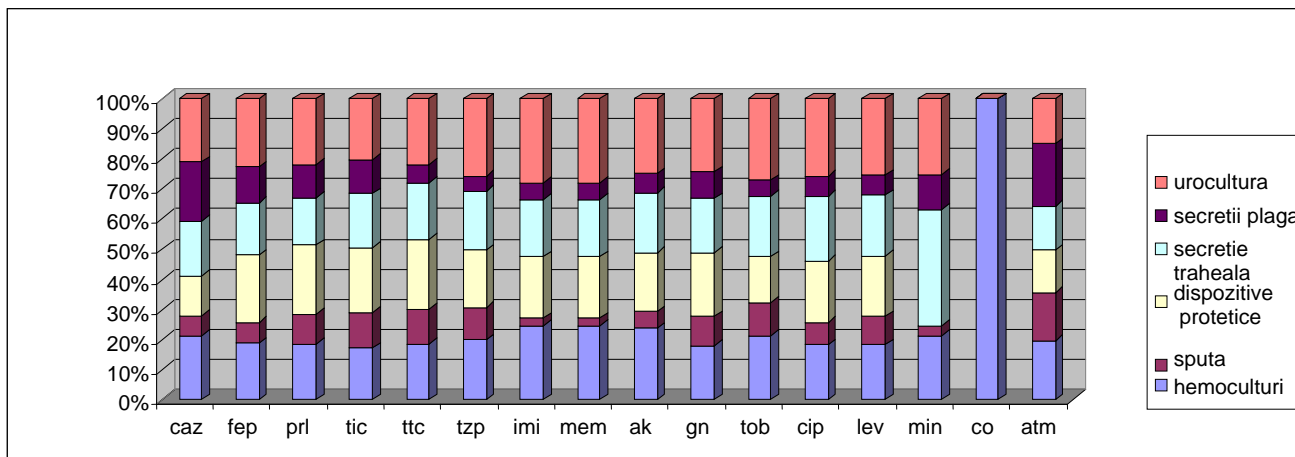


Fig. 3. Distribuția fenotipurilor de rezistență la antibiotice la tulpinile de *Ps. aeruginosa* în funcție de sursa de izolare

Se remarcă predominanța fenotipului ESBL la tulpinile izolate din uroculturi și a celui MBL la cele izolate din secreții traheale (Fig. 4).

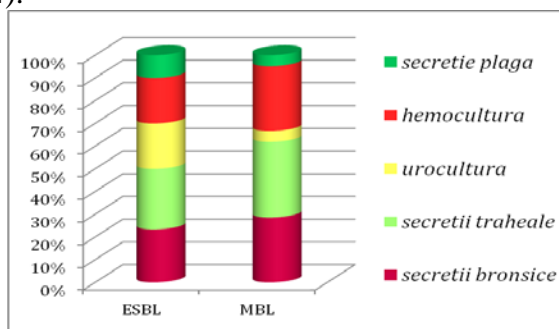


Fig. 4. Distribuția fenotipurilor fenotipurilor ESBL și MBL la tulpinile de *Ps. aeruginosa* studiate în funcție de sursa de izolare.

În ceea ce privește determinismul genetic al rezistenței la tetraciclină la tulpinile de *S. aureus*, rezultatele testelor PCR au arătat prezența genei *tetK* la toate tulpinile rezistente la tetraciclină analizate, în timp ce gena *tetM* nu a fost identificată la nicio tulpină (Fig. 5).

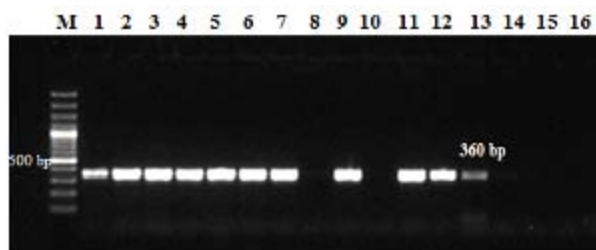


Fig. 5. Electroforeza în gel de agaroză - multiplex PCR – genele *tetK* și *tetM*. M - GeneRuler 100bpPlus (Fermentas); liniile 1 – 14 – probe de ADN de la tulpini de *S. aureus*.

Rezistența la penicilinele stabile la penicilinaze a fost denumită în trecut rezistența la meticilină. În prezent se folosește termenul MRSA (*methicillin resistant Staphylococcus aureus*) sau *S. aureus* rezistent la oxacilină. Analiza rezultatelor PCR a arătat prezența genei *mecA* la toate tulpinile cu fenotip MRSA, ceea ce demonstrează că mecanismul de rezistență la meticilină este datorat sintezei unei proteine anormale de legare a penicilinei, denumită PBP2a sau PBP2', codificată de gena *mecA* (Fig. 7).

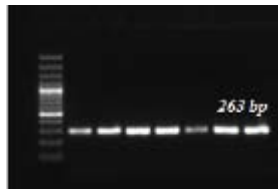


Fig. 7. Electroforeza in gel de agaroză a produsilor de amplificare a genei *mecA* la tulpini de *S. aureus*

Este cunoscut faptul că complexul genei *mecA* conține situsuri de inserție pentru plasmide și transpozoni, ceea ce facilitează achiziția de gene de rezistență și la alte clase de antibiotice. Transferul orizontal al genei *mecA* la tulpinile MSSA reprezintă cel mai important mecanism de răspândire a rezistenței la meticilină la tulpinile de *S. aureus*.

Analiza rezultatelor PCR privind prezenta genelor *ermA* și *ermC*, responsabile de apariția fenotipului MLSb la tulpinile de *S. aureus* a arătat că tulpinile provenite din secreții de plagă, exsudat faringian și secreții respiratorii au genele *ermC*, în timp ce tulpinile izolate din hemoculturi au genele *ermA* (Fig. 8).

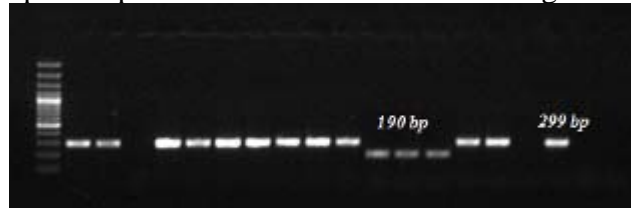


Fig. 8. Electroforeza in gel de agaroză - multiplex PCR – genele *ermA* și *ermC* la tulpini de *S. aureus*. M - GeneRuler 100bpPlus (Fermentas).

Analiza rezultatelor PCR a permis stabilirea determinismului genetic a unor fenotipuri de rezistență la antibiotice la *Ps. aeruginosa* detectate prin metoda disc-difuzimetrică Kirby-Bauer. Astfel, gena *gyrA* a fost detectată la toate tulpinile care fenotipic au manifestat rezistență la ciprofloxacin, în timp ce gena *parC* nu a fost detectată la nicio tulpină (Fig. 9). De asemenea, toate tulpinile au prezentat genele *mexB*, *mexD*, *mexF* și *mexY*, care intră în complexul genelor ce codifică pompele de eflux *mexAB-oprM*, *mexEF-oprN10* și *mexCD-oprJ*, ce sunt responsabile de rezistența la fluoroquinolone, dar și la alte clase de antibiotice (carbapenemi, aminoglicozide) (Fig. 10).

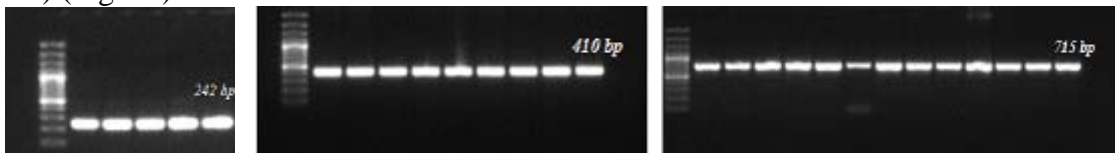


Fig. 9. Electroforeza in gel de agaroză a produsilor de amplificare a genelor *oprD*, *gyrA* și *mexD* la tulpinile de *Ps. aeruginosa*.



Fig. 10. Electroforeza in gel de agaroză a produsilor de amplificare a genelor *mexB* și *mexY* la tulpinile de *Ps. aeruginosa*.

La tulpinile care au manifestat rezistență fenotipică la ticarcilina și piperacilina, precum și fenotipul ESBL, detectat cu Etest PMPML, la nivel molecular au fost detectate cu frecvențe diferite alelele *blaSHV* (60%), *blaTEM* (33%) și *blaPSE* (7%) (Fig. 11, 12).

În ceea ce privește determinismul genetic al rezistenței la carbapenemi, 60% dintre 21 tulpinile cu rezistență fenotipică la imipenem posedă gena *blaVIM* responsabilă de sinteza unei MBL (fig. 12), în timp ce celelalte trei gene *blaIMP*, *blaSIM* și *blaSPM*, responsabile de fenotipul MBL, nu au fost detectate. Producerea enzimelor MBL poate conferi rezistență la aproape toate tipurile de β-lactami utilizați în clinică, astfel că răspândirea continuă a MBL constituie o problemă majoră de interes în clinică (13-16). Detectarea rapidă a tulpinilor producătoare de MBL poate fi utilă în scopuri epidemiologice și pentru monitorizarea emergentei acestor tulpini în clinică (17-18). La restul tulpinilor rezistente la imipenem se poate datora pierderii porinei

OprD, supraproductiei AmpC, sau expresiei pompei de eflux multidrug mexAB-oprM. Cu exceptia genelor blaPSE evidentiata exclusiv la tulpinile izolate din urocultiuri si bla SHV detectata la tulpini izolate din urocultiuri si secretii traheale, toate celelalte gene au fost evidentiata la tulpini cu diferite surse de izolare (Fig. 13).

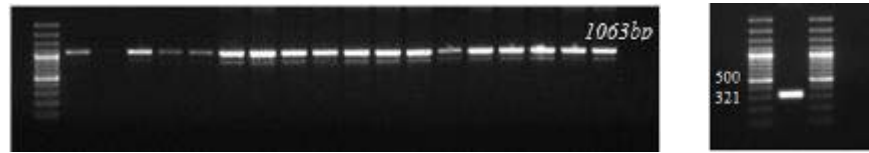


Fig. 11. Electroforeza in gel de agaroz a produsilor de amplificare a genelor *bla_{ampC}* si *bla_{PSE}* la tulpinile de *Ps. aeruginosa*.

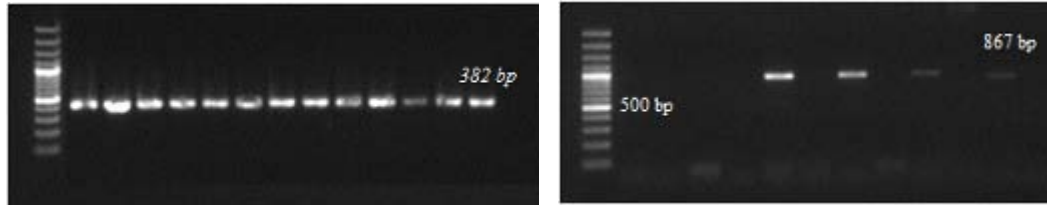


Figura 12. Electroforeza in gel de agaroz a produsilor de amplificare a genelor *bla_{VIM}* si *bla_{TEM}* la tulpinile de *Ps. aeruginosa*.

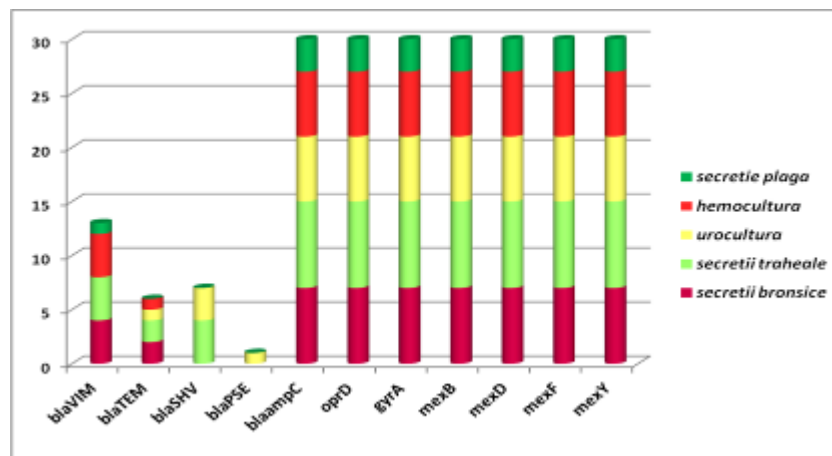


Figura 13. Distributia genelor de rezistenta la antibiotice la tulpinile de *Ps. aeruginosa* studiate in functie de sursa de izolare.

Concluzii

Atat tulpinile de *Ps. aeruginosa*, cat si cele de *S. aureus* au prezentat rate ridicate de rezistenta la antibiotice, variabile in functie de sursa de izolare a acestora si fenotipuri de interes epidemiologic (MRSA, MLSbi, rezistenta la rifampicina si mupirocin la tulpinile de *S. aureus*, respectiv producerea de MBL si ESBL, multi-rezistenta, rezistenta extinsa si pan-rezistenta la cele de *Ps. aeruginosa*). Metodele moleculare au permis stabilirea determinismului genetic al mecanismelor de rezistenta la antibiotice evidentiata prin metode fenotipice la tulpinile de *Ps. aeruginosa* si *S. aureus* analizate. Astfel toate tulpinile cu fenotip MRSA au prezentat gena *mecA*, gena *tetK* a fost detectata la toate tulpinile rezistente la tetracicilina. La tulpinile de *S. aureus* izolate din secretii de plaga si de tract respirator fenotipul MLSb este asociat cu prezenta genei *ermC*, in timp ce la tulpinile izolate din hemocultiuri cu gena *ermA*. La tulpinile de *Ps. aeruginosa*, rezistenta la quinolone este codificata de gena *gyrA*. Prezenta genelor *mexB*, *mexD*, *mexF* si *mexY* ce codifica pompele de eflux poate fi responsabila atat de rezistenta la fluoroquinolone, cat si de aparitia fenotipurilor de multirezistenta intilnite la aceste tulpini. Rezistenta la peniciline, cefalosporine si fenotipul ESBL au fost corelate la nivel molecular cu prezenta alelelor *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* si *bla_{PSE}*. Un procent de 60% dintre tulpinile cu rezistenta fenotipica la imipenem poseda gena *bla_{VIM}* responsabila de sinteza unei MBL. In ceea ce priveste asocierea specifica dintre prezenta unei anumite gene de rezistenta si originea clinica a tulpinilor analizate, alelele *bla_{PSE}* par a fi prezente exclusiv la tulpinile izolate din urocultiuri, in timp ce cele *bla_{SHV}* preferential la tulpini izolate din urocultiuri si secretii bronho-traheale, iar *bla_{TEM}* la tulpini izolate din secretii bronho-traheale, toate celelalte

gene au fost evidentiata cu frecvente similare la tulpini cu diferite surse de izolare. Mecanismele de rezistenta identificate constituie o problema majora de interes in clinica, deoarece pot anula eficienta terapeutica a majoritatii antibioticelor disponibile si pot fi transferate pe orizontala, ceea ce demonstreaza necesitatea identificarii unor metode moleculare de detectare rapida a tulpinilor rezistente, utile in scopuri epidemiologice si pentru monitorizarea emergentei acestor tulpini in clinica.

Bibliografie selectiva

1. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (2008, 2010, 2011).
2. CLSI, EUCAST, Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T. and Monnet, D. L. (2011), Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. Article first published online: 27 JUL 2011).
3. Tenover, F.C. & J. Hindler. 2010. Reporting antimicrobial susceptibility testing results. *In Antibiogram*. P.Courvalin, R.LeClercq & L.B.Rice, Eds.: 89–98. ASM Press. Washington, DC
4. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1121–1122.
5. Paterson David L, Doi Y. A step closer to extreme drug resistance (XDR) in gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 1179–1181.
6. Jose´-Manuel Rodríguez-Martínez, Laurent Poirel, And Patrice Nordmann. Molecular Epidemiology And Mechanisms Of Carbapenem Resistance In *Pseudomonas Aeruginosa*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 2009, 53(11): 4783–4788.
7. Livermore DM, Johnson AP, Tillotson GS. Antimicrobial Susceptibility Of Gram-Positive Bacteria: What's Current, What's Anticipated? *J Hosp Infect.*, 2001, Dec;49 Suppl A:S3-11. Review
8. Livermore DM., Beta-Lactamases In Laboratory And Clinical Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995, Oct;8(4):557-84. Review.
9. Papadichelakis E, kontopidou F, Antoniadou A et al. “Screening For Resistant Gram-Negative Microorganisms To Guide Empiric Therapy Of Subsequent Infection”. *Intensive Care Med.* 2008: 34:169-2175.
10. Gamero Delgado MC, García-Mayorgas AD, Rodríguez F, Ibarra A, Casal M., Susceptibility And Resistance Of *Pseudomonas Aeruginosa* To Antimicrobial Agents. *rev Esp Quimioter.* Jun; 2007, 20(2):230-3. Spanish.
11. McGowan JJE. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med* 2006; 119 (suppl 1): 29–36
12. Paterson DL. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis* 2006; 43 (suppl 2): 43–48.
13. Giacometti, F. M. Siquini, O. Cirioni, S. Petroni, G. Scalise. Imipenem And Meropenem Induced Resistance To Beta-Lactam Antibiotics In *pseudomonas Aeruginosa*. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. Volume 13, Number 4, 1994 315-318, DOI: 10.1007/BF01974609
14. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 102–111.
15. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo- β -Lactamase. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3824–3828.
16. Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 159–166;
17. Gould IM. The epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32 (suppl 1): 2–9).
18. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1–12.