

ARTICOL DE CERCETARE

Studiu microbiologic și molecular al rezistenței patogenilor gram-negativi în complicațiile infecțioase tratate cu carbapenemi, tehnici de combatere

Oleksandr Adamovych Nazarchuk^{1*}¹Departamentul de microbiologie, Universitatea Națională de Medicină Memorială Pirogov, Vinnytsya, Ucraina.

Data primirii manuscrisului: 22.07.2017

Data acceptării spre publicare: 15.09.2017

Autor corespondent:

Oleksandr Adamovych Nazarchuk, dr. șt. med., lector superior
 Departamentul de microbiologie
 Universitatea Națională de Medicină Memorială Pirogov
 str. Pirogov, 56, Vinnytsya, Ucraina, 21018
 e-mail: nazarchuk@vnmnu.edu.ua

RESEARCH ARTICLE

Microbiological and molecular research of the resistance in gram-negative pathogens of infectious complications to carbapenem antibiotics, approaches to its combating

Oleksandr Adamovych Nazarchuk^{1*}¹Department of microbiology, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine.

Manuscript received on: 22.07.2017

Accepted for publication on: 15.09.2017

Corresponding author:

Oleksandr Adamovych Nazarchuk, PhD, senior lecturer
 Department of microbiology
 National Pirogov Memorial Medical University
 56, Pirogov str., Vinnytsya, Ukraine 21018
 e-mail: nazarchuk@vnmnu.edu.ua

Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Nu este cunoscută proporția de bacterii gram-negative din cadrul complicațiilor infecțioase la pacienții critici cu arsuri, care sunt rezistente la carbapenemi, precum și mecanismele moleculare ale rezistenței date.

Ipooteza de cercetare

Combinarea antisepticului decamethoxinum în concentrații minimale subinhibitorii cu carbapenemi restabilește *in vitro* sensibilitatea agenților patogeni gram-negativi rezistenți.

Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Rezistența la carbapenemi a fost confirmată la 27,41% din totalul celor 642 de tulpini de patogeni gram-negativi (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*), izolați de la pacienții cu arsuri, aflați în stare critică. Mecanismele moleculare au fost preponderent, producția de metalo- β -lactamază, codificate de genele VIM. Decamethoxinum reduce CMI al carbapenemelor de 3,09-7,07 ori prin distrugerea genelor VIM.

Rezumat

Introducere. În zilele noastre, o provocare majoră și actuală în medicină reprezintă problema prevenirii complicațiilor infecțioase, cauzate de bacteriile gram-negative multi-rezistente la antibiotice. Rezistența emergentă a agenților patogeni predominanți, ca *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacteria*, *Pseudomonas aeruginosa*, corespunde producției de metalic-

What is not known yet, about the topic

The proportion of carbapenem-resistant gram-negative bacteria in infectious complications in critical patients with burns is still unknown, and molecular mechanisms of resistance is poor understood.

Research hypothesis

Combining the antiseptic decamethoxinum in minimal subinhibitory concentrations with carbapenems restores, *in vitro*, the sensitivity of resistant gram-negative pathogens.

Article's added novelty on this scientific topic

Resistance to carbapenems was confirmed in 27.41% of the 642 strains of gram-negative pathogens (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*) isolated from critically ill patients with burns. Molecular mechanisms were predominantly the production of metal- β -lactamase, encoded by VIM genes. Decamethoxinum reduces carbapenem MIC by 3.09-7.07 times by destroying VIM genes.

Abstract

Introduction. Nowadays, the problem of prevention of infectious complications, caused by multi-antibiotic-resistant opportunistic Gram-negative bacteria is of great importance and actuality in medicine. The emerging resistance of leading pathogens as *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacteria*, *Pseudomonas aeruginosa* corresponds to the production of

β -lactamază (M β L), hidrolizei carbapenemelor, fiind frecvent codificată de genele VIM.

Material și metode. Pe parcursul anilor 2011-2016, au fost izolate tulpini clinice de microorganisme, anterior de inițierea terapiei antibacteriene, de la pacienți în stare critică ($n=441$) cu arsuri de gradul IIb și III. Au fost utilizate metode standard de identificare. Testarea sensibilității antimicrobiene la imipenem și meropenem a tulpinilor de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* a fost efectuată conform normativelor ghidurilor EUCAST. Screening-ul pentru producția de M β L a fost realizat, utilizând testul *Double Disk Synergy*. Genele VIM în tulpinile izolate de bacterii au fost identificate molecular prin reacția de polimerizare în lanț în timp real. A fost studiată influența utilizării combinate a concentrațiilor inhibitorii sub-minime (sub-MIC) de antiseptic decamethoxinum (diclorură de 1,10-decametilen-bis (N, N-dimetil mentoxicarbonil-metil-amoniu) asupra sensibilității tulpinilor clinice la carbapeneme.

Rezultate. Studiul de șase ani a relevat patogenii predominanți în complicațiile infecțioase: *A. baumannii* ($n=220$; 34,26%), *P. aeruginosa* ($n=127$; 19,78%) și *P. mirabilis* ($n=34$; 5,30%) dintre totalul de 642 de tulpini clinice, obținute de la pacienți cu arsuri, în stare critică. Rezistența la carbapenem a fost confirmată în 27,41% de tulpini izolate clinic dintre totalitatea de agenți patogeni înregistrați. Apariția rezistenței la imipenem și meropenem s-a constatat în tulpinile clinice de *A. baumannii* ($n=111$ și, respectiv, $n=126$), *P. aeruginosa* ($n=43$ și, respectiv, $n=48$) și *P. mirabilis* ($n=1$ și $n=2$, respectiv). Dintre acestea, rezistența fenotipică la carbapenem, asociată cu producerea de M β L, a fost demonstrată la *A. baumannii* (36,81%), *P. aeruginosa* (33,86%) și *P. mirabilis* (8,82%). Rezistența mediată de M β L s-a dovedit a fi legată de gena VIM în *A. baumannii* (1,36%), *P. aeruginosa* (4,72%), *P. mirabilis* (8,82%). A fost constatată recuperarea sensibilității bacteriilor gram-negative studiate la imipenem și meropenem de 3,09-7,07 ori, după ce a fost utilizat sub-MIC de decamethoxinum. De asemenea, după utilizarea sub-MIC de DCM în culturile izolate, a fost înregistrată dispariția genelor VIM, detectate, initial, prin PCR.

Concluzie. Bacilii gram-negativi: *A. baumannii* (34,26%), *P. aeruginosa* (19,78%) și *P. mirabilis* (5,30%), cauzează frecvent complicații infecțioase la pacienții cu arsuri și dezvoltă rezistență la carbapeneme, asociată genelor VIM, care codifică M β L. Combinația sub-MIC de antiseptic decamethoxinum cu carbapeneme demonstrează în mod semnificativ eficacitatea, *in vitro*, împotriva bacteriilor gram-negative rezistente.

Cuvinte cheie: antibiotice, antiseptice, imipenem, meropenem, rezistență, PCR.

Introducere

Infecția reprezintă una dintre cele mai problematice complicații care survine la pacienți, conducând, frecvent, la ineficiența tratamentului, morbiditate și mortalitate în unitățile chirurgicale și de terapie intensivă (UTI). Managementul optim antimicrobian pentru astfel de pacienți rămâne dificil în medicina practică, în pofida utilizării substanțiale a unei game largi de antibiotice pentru ameliorarea rezultatelor în lupta cu infecția [1].

metallic- β -lactamase (M β L), hydrolysing carbapenems, frequently encoded by VIM gens.

Material and methods. From critically ill patients ($n=441$) with 2nd and 3rd degree burns clinical strains of microorganisms had been isolated before antibiotic therapy in 2011-2016 years. They were identified accordingly to standard methods. The antimicrobial susceptibility testing to imipenem and meropenem was done in all received strains of *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* according to guidelines EUCAST expert rules. Screening for M β L production was done employing Double Disk Synergy Test. In isolated strains of bacteria the molecular identification of VIM gens, was carried out by real-time polymerase chain reaction. The influence of combined use of sub-minimal inhibitory concentrations (sub-MIC) of antiseptic decamethoxinum (1,10-dekametilen-bis (N,N-dimethyl mentoksikarbonilmetil)-ammonium dichloride) on the susceptibility of clinical strains to carbapenem antibiotics.

Results. The six-year trial demonstrated that *A. baumannii* ($n=220$; 34.26%), *P. aeruginosa* ($n=127$; 19.78%) and *P. mirabilis* ($n=34$; 5.30%) were predominant causative agents of infection complications among total of 642 clinical strains, received from critical patients with burns. Carbapenem resistance was confirmed in 27.41% of clinical isolates of totally registered pathogens. The occurrence of resistance to imipenem and meropenem was found in clinical strains of *A. baumannii* ($n=111$ and $n=126$, respectively), *P. aeruginosa* ($n=43$ and $n=48$, respectively), *P. mirabilis* ($n=1$ and $n=2$, respectively). Among them the phenotypic resistance, related with production of M β L to carbapenems was proved in *A. baumannii* (36.81 %), *P. aeruginosa* (33.86%) and *P. mirabilis* (8.82%). The M β L-mediated resistance was proved to be related with VIM-gens in *A. baumannii* (1.36%), *P. aeruginosa* (4.72%), *P. mirabilis* (8.82%). There was found the retrieval of the susceptibility of studied Gram-negative bacteria to imipenem and meropenem in 3.09-7.07 times after sub-MIC of decamethoxinum had been used. We also registered the disappearance of VIM gens after the use of sub-MIC of DCM in cultures of those isolates, which primarily had been detected by the PCR.

Conclusion. Gram-negative bacteria as *A. baumannii* (34.26%), *P. aeruginosa* (19.78%) and *P. mirabilis* (5.30%), frequently cause infection complications in patients with burns, and obtain resistance to carbapenems related with VIM genes, coding for M β L. The combination of sub-MIC of antiseptic decamethoxinum with carbapenems significantly reveals *in vitro* their effectiveness against resistant Gram-negative bacteria.

Key words: antibiotics, antiseptics, imipenem, meropenem, resistance, PCR.

Introduction

Infection belongs to the most problematic complications, happening in patients, which frequently leads to treatment failure, morbidity and mortality in the surgical and intensive care units (ICU). Optimum antimicrobial management for such patients has remained still difficult in practical medicine, despite a substantial use of wide range of antibiotics in outcomes improvement of infection struggling [1].

Problema prevenirii complicațiilor infecțioase și lupta cu microorganismele care au obținut rezistență la antibiotice a devenit o prioritate în medicină și o confruntare majoră în sănătatea publică la nivel mondial. Dovezi recente au arătat extinderea multirezistenței la antibiotice. Creșterea dificultăților terapeutice, datorate obținerii unui profil de multidrog rezistență la grupurile majore de agenți antimicrobieni de către diverse specii bacteriene, în special, gram-negative, care sunt agenți etiologici dominanți ai complicațiilor infecțioase, a devenit o preocupare clinică considerabilă. *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacteria*, *Pseudomonas aeruginosa* sunt predominant izolate de la pacienții critic bolnavi. O problemă suplimentară reprezintă multirezistența acestor bacterii la antibiotice [2-3].

Mai mult, caracteristica îngrijorătoare a emergenței rezistenței corespunde producției de metalo- β -lactamaze (M β L), hidrolizei carbapenemelor, care sunt considerate ultima linie de terapie eficientă a infecțiilor severe. Rezistența la acești agenți reduce opțiunile terapeutice clinice și duce, frecvent, la eșecul tratamentului. Cu toate acestea, în diferite țări ale lumii, a fost înregistrată M β L dobândită la reprezentanții *P. aeruginosa*, *A. baumannii* și *Enterobacteriaceae*. Recent, în mai multe țări europene și asiatice, au fost înregistrate carbapenemaze de tip VIM, aparținând clasei B de M β L-carbapenemaze dobândite, izolate din *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterobacteria* [4-8].

Îmbunătățirile tratamentului pacienților critici cu complicații infecțioase pot aduce rezultate benefice datorită detectării rezistenței printr-un screening inițial, urmat de confirmarea fenotipică și genotipică pentru înțelegerea detaliată a mecanismelor moleculare de antibioticorezistență a tulpinilor clinice bacteriene [4, 5, 9, 10].

În zilele noastre, s-au depus multiple eforturi pentru a găsi remedii eficiente de prevenire și tratament al complicațiilor infecțioase, legate de bacterii antibioticorezistente. Unele studii au demonstrat eficacitatea utilizării antisepticelor împotriva microorganismelor oportuniste, rezistente la antibiotice. Prin urmare, cercetarea referitor la utilizarea combinată a antisepticelor și antibioticelor în optimizarea luptei antimicrobiene împotriva agenților patogeni gram-negativi, rezistenți la carbapenem, este foarte actuală [14].

În această lucrare, a fost cercetată prin analiza fenotipică și genotipică rezistența la carbapeneme a agenților patogeni gram-negativi larg răspândiți în complicațiile infecțioase la pacienții cu arsuri grave; a fost evaluată, *in vitro*, eficiența depășirii rezistenței lor prin administrarea sinergică a antibioticelor active și a antisepticului decamethoxinum.

Material și metode

În cadrul cercetării, s-au studiat proprietățile biologice ale agenților patogeni dominanți în complicațiile infecțioase, care au fost izolați de la pacienții cu arsuri. Toți pacienții, care au fost incluși în cercetare, au urmat tratament în Centrul de Arsuri din Spitalul Clinic Regional Vinnytsya, numit în memoria lui N. I. Pirogov. Studiul observațional a durat o perioadă de șase ani (2011-2016). Au fost înrolați pacienții critici ($n=441$), cu arsuri de gradul 2b și 3 (suprafața totală a corpului ars de

The problem of prevention of infectious complications and struggling microorganisms, which have obtained resistance to antibiotics, has become a priority in medicine and a worldwide major public health issue. Recent evidence has shown the expansion of multi-antibiotic-resistance. Increasing therapeutic difficulties due to the acquisition of a profile of multidrug resistance to major groups of antimicrobial agents by various bacterial species, especially Gram-negative ones, been leading in etiological structure of infectious complications, have become a serious clinical concern. *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacteria*, *Pseudomonas aeruginosa* are known to be predominantly isolated from critically ill patients. Additional problem of these bacteria is related with their multi-antibiotic resistance [2-3].

Furthermore, worrisome emerging resistance feature corresponds to the production of metallo- β -lactamases (M β L), hydrolysing carbapenems, which are considered as the last line of effective therapy of severe infections. The resistance to these agents reduces clinical therapeutic choices and frequently leads to treatment failure. Nevertheless, an acquired M β L emerged in *P. aeruginosa*, *A. baumannii* and *Enterobacteriaceae* representatives has been registered in different countries of the World. Recently carbapenemases of VIM types, belonging to a B class of acquired M β L-carbapenemases, have been recorded from *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterobacteria* isolates in several European and Asian countries [4-8].

Improvements in the treatment of critically ill patients with infectious complications can bring beneficial results due to detection of resistance in an initial screening followed by phenotypic and genotypic confirmation for detailed understanding of molecular mechanisms of resistance to antibiotics in clinical strains of bacteria [4, 5, 9, 10].

Nowadays many efforts have been made to find out effective remedies of prevention and treatment of infection complications, related with bacteria, resistant to antibiotics. Some trials have proved the efficacy of the use of antiseptics against antibiotic resistant opportunistic microorganisms. As follows, the research of combined use of antiseptics and antibiotics in optimization of antimicrobial struggle against Gram-negative carbapenem-resistant pathogens is too actual [14].

In this work we aimed to research by the way of phenotypic and genotypic analysis the resistance of widely-spread Gram-negative pathogens of infection complications in patients with severe burns to carbapenems; evaluate *in vitro* the effectiveness of overcoming his resistance by synergic administration of activity of antibiotics and decamethoxinum antiseptic.

Material and methods

In the research there were studied biological properties of prominent pathogens of infectious complications, had been received from patients with burn trauma. All patients, been enrolled in the research, underwent treatment in Burn Centre of Vinnytsya Regional Clinical Hospital named after N. I. Pirogov. We had being carried out our research observation during the period of six years (2011-2016). From critically ill patients ($n=441$) with 2ndb - 3rd degree burns (total burned body surface area from 17.1 \pm 0.6% to 6.5 \pm 7.6%. All patients

la $17,1 \pm 0,6\%$ la $65,0 \pm 7,6\%$). Toți pacienții au fost tratați conform protocoalelor de tratament al arsurilor. Ei au fost supuși intervenției chirurgicale: necrectomia timpurie în primele trei zile după traumă și plastica cu xenodermograft. Toți au beneficiat de terapie intensivă (perfuzie echilibrată și terapie transfuzională, administrare simptomatică complexă pentru stabilizarea homeostaziei) și tratamente antimicrobiene sistemice și topice cu antiseptice și remedii de vindecare a plăgilor.

Izolatele clinice de microorganisme obținute au fost transportate la Laboratorul de Bacteriologie al Departamentului de microbiologie al Universității Naționale de Medicină Memorială Pirogov, Vinnytsya, unde au fost detaliat studiate proprietățile lor tinctoriale, culturale, biochimice, conform abordărilor și tehnicilor generale aprobate în practica microbiologică. Microorganismele au fost izolate de la pacienți înainte de administrarea antibioticelor. În cadrul studiului, au fost implicate tulpini clinice de *A. baumannii* ($n=220$), *P. aeruginosa* ($n=127$) și *Proteus mirabilis* ($n=34$), fiind testată sensibilitatea lor la carbapeneme și antiseptice. Toate tulpinile clinice primite de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* au fost supuse testării sensibilității antimicrobiene la imipenem și meropenem [5].

Eficacitatea antimicrobiană a antibioticelor menționate împotriva *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, a fost estimată în funcție de cantitatea (%) tulpinilor sensibile, intermediare și rezistente din totalitatea probelor. Testarea sensibilității antimicrobiene a tulpinilor bacteriene studiate a fost efectuată prin utilizarea testelor standard de difuzie în agar cu discuri de antibiotice și teste de dublă diluție, în conformitate cu normativele ghidurilor EUCAST referitor la testarea sensibilității antimicrobiene și CLSI [6, 7].

S-a efectuat screening-ul producției de MBL printre toate izolatele clinice de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, care, inițial, au fost determinate rezistente la carbapeneme, prin intermediul unui test standard de difuzie pe disc. Izolatele au fost evaluate fenotipic la prezența de metalo-beta-lactamaze (MBL), utilizând agentul de chelatare a metalului acidul etilendiaminetetraacetic (EDTA). Screening-ul pentru producția de MBL a fost realizat, utilizând testul Double Disk Synergy (DDST). DDST a fost efectuat conform lui Lee și colab. [15].

Pe scurt, s-a diluat o cultură de peste noapte a izolatelor clinice rezistente la carbapeneme. S-a preparat suspensia bacteriană cu turbiditate echivalentă cu 0,5 McFarland standard și s-a cultivat pe agar Mueller-Hinton cu tampon steril. Au fost aplicate, separat, două discuri cu imipenem și două cu meropenem [IMP (10 µg), MEM (10 µg)] (*Farmaktiv*, Ucraina) pe suprafața agarului de 4-5 cm (centru la centru). Un disc filtrant gol de 6 mm (*HiMedia Laboratories*, India) a fost, ulterior, plasat în apropierea unuia dintre discurile cu imipenem la o distanță de 1,0 până la 1,5 cm și, separat, două discuri cu meropenem au fost plasate prin metodă analogică la aceeași distanță față de acest disc filtrant gol. S-a preparat, în prealabil, o soluție sterilă de EDTA 0,5 M (pH 8,0) pe discul gol. Placa a fost incubată la 35°C peste noapte. Prezența unei zone inhibitoare sinergice a fost considerată ca MBL-pozitivă (Figura 1b) [8, 10, 15].

Printre tulpinile de bacterii, izolate clinic, identificarea mo-

were treated according to protocols of the treatment of burn disease. They underwent surgery: early necrectomy in primary three days after trauma and xenodermograft pastics were used. All of them received intensive care management (balanced infusion and transfusion therapy, complex symptomatic administrations for stabilization of their homeostasis) and systemic antimicrobials and topical treatment with antiseptics and wound healing remedies.

Clinical isolates of microorganisms were received, transported to the Bacteriological laboratory of the Department of Microbiology of National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, where they were studied in detail by their tinctorial, culture, biochemical properties, according to the generally approved approaches and techniques in microbiological practice. Microorganisms from patients had been isolated before antibiotics were administered. In the research there were involved clinical strains of *A. baumannii* ($n=220$), *P. aeruginosa* ($n=127$) and *Proteus mirabilis* ($n=34$), in which we have attempted to find out the sensitivity to carbapenem antibiotics and antiseptics. The antimicrobial susceptibility testing to imipenem and meropenem was carried out in all received clinical strains of *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* [5].

Antimicrobial effectiveness of mentioned antibiotics against *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* was estimated according to the quantity (%) of sensitive, intermediate and resistant strains of their total sample. The antimicrobial susceptibility testing of strains of studied bacteria species was done by using standard agar diffusion assays with antibiotic disks and double dilution tests according to guidelines EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing and CLSIs [6, 7].

We performed MBL-producing screening among all clinical isolates of *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, which were primarily found as carbapenem resistant by means of standard disk-diffusion test. The isolates were evaluated phenotypically for the presence of a metallo-β-lactamase (MBL), using the metal chelating agent: ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Screening for MBL production was done employing Double Disk Synergy Test (DDST). DDST was performed according to Lee *et al.* [15].

Briefly, an overnight culture of a carbapenem resistant clinical isolates were diluted with The bacterial suspension with turbidity equivalent to 0.5 McFarland standard was prepared and cultured on Mueller-Hinton agar with sterile swab. Two imipenem and two meropenem [IMP (10 µg), MEM (10 µg)] (*Farmaktiv*, Ukraine) discs were applied on the surface of the agar 4-5 cm (center to center) apart. A sterile 6-mm blank filter disk (*HiMedia Laboratories*, India) was subsequently placed near one of the imipenem disks at the distance from 1.0 to 1.5 cm, and apart two meropenem discs with the same distance from this blank filter disk were placed by analogic manner. Primarily prepared sterile solution of 0.5 M EDTA (pH 8.0) was applied onto the blank disk. The plate was incubated at 35°C overnight. The presence of a synergistic inhibitory zone was regarded as MBL positive (Figure 1b) [8, 10, 15].

Among isolated clinical strains of bacteria the molecular identification of such determinants of resistance to carbape/

leculară a unor astfel de determinanți ai rezistenței la carbapeneme, ca genele VIM, care codifică β -lactamazele din clasa B, a fost realizată prin intermediul reacției de polimerizare în lanț (PCR) în timp real (RT). Amplificarea a fost efectuată prin tehnici „BioRad iQ 5” identificarea finală a genelor VIM în cultura pură a tulpinilor clinice de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* a fost realizată cu un set de reactivi pentru determinarea ADN, folosind PCR-RT în conformitate cu instrucțiunile producătorului (01784-RT-C; OOO NPF „Litech”).

A fost determinată concentrația minimă de inhibiție (MIC) pentru tulpinile rezistente la imipenem și meropenem prin testul de diluție în serie, conform standardelor CLSI. Tulpinile clinice, la care s-a depistat valoarea MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$, au fost considerate ca fiind rezistente. *A. baumannii* ATCC 15151, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. mirabilis* NCTC 10975 au fost utilizate ca tulpini control de referință pentru testul de susceptibilitate [14].

Concomitent, utilizând testul de diluție în serie, a fost studiată sensibilitatea izolatelor clinice la antisepticul decamethoxinum (diclorură de 1,10-decimetilen-bis (N, N-dimetil mentoxicarbonilmetil)-amoniu diclorid, certificat de înregistrare № UA/12180/01/01 din 29.03. 2017, Ordinul Ministerului Sănătății al Ucrainei № 341). A fost interesant de studiat influența antisepticului decamethoxinum (DCM) asupra sensibilității la imipenem, meropenem a tulpinilor clinice de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, care au obținut rezistență la carbapeneme și au fost selectate din numărul total de probe cercetate. Pentru aceasta, în experiment, au fost utilizate concentrații sub-inhibitorii (sub-MIC) de DCM pe medii cu concentrații diluate în serie de carbapeneme. Influența DCM asupra sensibilității bacteriene la carbapeneme a fost estimată prin analiza comparativă a concentrațiilor inhibitorii minime (MIC) ale unui antibiotic, obținut prin testul de diluție dublă în serie pe bulionul nutritiv, cu acelea obținute pe bulionul nutritiv, conținând concentrații inhibitorii sub-minime de DCM (sub-MIC).

În afară de aceasta, de asemenea, a fost testată influența sub-MIC de DCM asupra exprimării genelor VIM în culturile bacteriene ale izolatelor clinice, în care aceste gene au fost identificate anterior și în generația următoare, după utilizarea antisepticului. Identificările VIM au fost efectuate prin reacții PCR, așa cum s-a menționat mai devreme.

În studiu a fost utilizată analiza statistică variațională. Media aritmetică (M), eroarea medie a mediei aritmetice (m), eroarea medie (t), fiabilitatea rezultatelor diferenței (p) s-au calculat cu softul statistica 6.0.

Rezultate

Pe parcursul unei perioade de 6 ani de cercetare microbiologică, printre totalul de 642 de probe din eșantioanele clinice cu o gamă largă de factori cauzali oportunistici, au fost identificați: *A. baumannii* ($n=220$, 34,26%), *P. aeruginosa* ($n=127$; 19,78%) și *P. mirabilis* ($n=34$; 5,30%). Aceștia au fost predominant obținuți de la 441 de pacienți în stare critică cu arsuri.

Au fost confirmate 155-176 (24,14–27,41%) de izolate clinice din totalul de 642 de agenți patogeni înregistrați în complicațiile infecțioase la pacienți, ca potențiali rezistenți la

nems, as VIM gens, encoding β -lactamases of B class, was carried out by means of real-time (RT) polymerase chain reaction (PCR). The amplification was done by means of „BioRad iQ 5” techniques and final identification of VIM-gens in pure culture of clinical strains of *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* was carried out with a set of reagents for DNA determination using the PCR-RT accordingly to the manufacturer’s instructions (01784-RT-C; OOO NPF „Litech”).

We carried out the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for imipenem and meropenem resistant strains by serial dilution test according to CLSI standards. Clinical strains, in which MIC value of ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ were screened, were considered as resistant ones. *A. baumannii* ATCC 15151, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. mirabilis* NCTC 10975 were used as a control referens-strains for the susceptibility testing [14].

Simultaneously, we also studied by serial dilution test the sensitivity of clinical isolates to antiseptic decamethoxinum (1,10-Dekametilen-bis (N,N-dimethyl mentoksikarbonilmetil)-ammonium dichloride, registration certificate № UA/12180/01/01 since 29.03.2017, Order of Ministry of Health of Ukraine № 341). There was interesting to study the influence of antiseptic decamethoxinum (DCM) on the sensitivity to imipenem, meropenem in clinical strains of *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, which had been obtained carbapenem resistance and were selected from the total number of research samples. For this we conducted the experiment with the use of sub-inhibitory concentrations (sub-MIC) DCM in the media with serial diluted concentrations of carbapenems. The influence of DCM on the sensitivity of bacterium to carbapenems was estimated while comparative analysis of minimal inhibitory concentrations (MIC) of an antibiotic, been received in double serial dilution test in the nutrient broth, with those ones, been obtained in the nutrient broth, containing sub-minimal inhibitory concentrations of DCM (sub-MIC).

Besides this we also testified the influence sub-MIC of DCM on the expression of VIM gens in the bacterial cultures of clinical isolates, in which these gens had been previously identified, and in their next generation after the use of antiseptic. VIM identifications had been carried out by means of PCR reactions as mentioned earlier.

The variation-statistical analysis was used in the research. The arithmetic mean (M), the average error of the arithmetic mean (m), the average error (t), the reliability of results the difference (p) were calculated by means of Statistica 6.0.

Results

During an 6-years period of microbiological research, among total of 642 samples of clinical specimens of wide variety of opportunistic causative agents were identified as *A. baumannii* ($n=220$; 34.26%), *P. aeruginosa* ($n=127$; 19.78%) and *P. mirabilis* ($n=34$; 5.30%). They were predominantly received from 441 critically ill patients with burns.

There were confirmed 155-176 (24.14-27.41%) clinical isolates of the 642 totally registered pathogens of infectious complications in patients as potentially carbapenem resistant ones in the result of standard disc-diffusion test with imipenem and meropenem disks. Occurrence of resistant to carbap-

carbapenem, în rezultatul testului standard de difuzie cu discuri de imipenem și meropenem. Apariția tulpinilor rezistente la carbapeneme a fost următoarea: 111 rezistente la imipenem și 126 rezistente la meropenem din 220 de *A. baumannii*; 43 rezistente la imipenem și 48 rezistente la meropenem din 127 de *P. aeruginosa*; 1 rezistentă la imipenem și 2 rezistente la meropenem din 34 de *P. mirabilis*.

În general, în rezultatul studiului de șase ani, tulpinile clinice de *A. baumannii* s-au dovedit a fi rezistente la imipenem în $58,94 \pm 5,35\%$ din cazuri. Rezistența la meropenem a fost înregistrată în $64,34 \pm 7,97\%$ din tulpini. Numai $35,53 \pm 6,62\%$ dintre *A. baumannii* au fost susceptibile la imipenem și $32,66 \pm 6,73\%$ – la meropenem. În cadrul cercetării, au fost înregistrate tendințe de scădere a susceptibilității *A. baumannii* la imipenem și meropenem în perioada 2011-2016. Au fost determinate rate crescute ale rezistenței *A. baumannii* la ambele carbapeneme (Figura 1, 2).

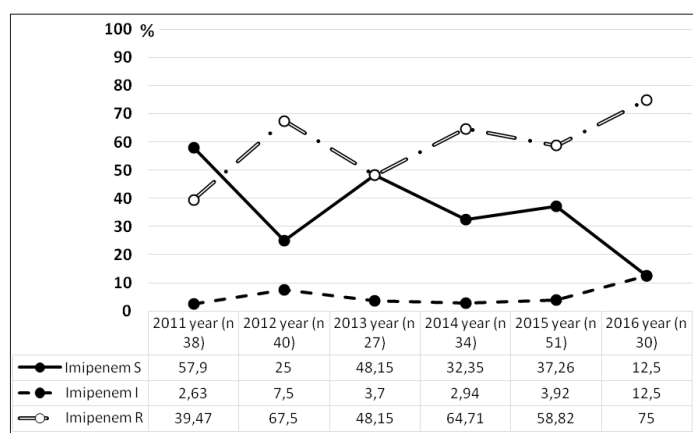


Fig. 1 Sensibilitatea la imipenem a tulpinilor clinice de *A. baumannii*, izolate de la pacienții cu arsuri în perioada 2011-2016, (%); S – sensibil, I – intermediar, R – rezistent.

Fig. 1 The susceptibility to imipenem of clinical strains of *A. baumannii*, isolated from patients with burns in 2011-2016, (%); S – sensitive, I – intermediate, R – resistant.

Referitor la tulpinile clinice de *P. aeruginosa*, au fost determinate sensibilități descendente analogice la imipenem și meropenem. După șase ani de studiu, în izolatele clinice de *Pseudomonas*, nu a fost înregistrată sensibilitate la meropenem mai mare de $52,86 \pm 6,82\%$. Eficacitatea imipenemului a fost demonstrată doar împotriva la $59,35 \pm 5,92\%$ din izolatele *P. aeruginosa*. „Curbele» ratei de sensibilitate la carbapeneme printre tulpinile clinice de *P. aeruginosa* par a fi în scădere în perioada 2011-2016. Cantitatea de tulpini de *P. aeruginosa* rezistente la imipenem și meropenem a crescut până la sfârșitul anului 2016 (Figura 3, 4).

În acest studiu, au fost găsite două tulpini clinice de *P. mirabilis*, rezistente la meropenem și una – rezistentă la imipenem (Figura 5).

Tulpinile clinice de *P. mirabilis* au fost implicate în cercetările ulterioare, datorită faptului că acest agent patogen a fost singurul reprezentant al *Enterobacteriei*, care a obținut rezistență la carbapeneme, la pacienții studiați cu arsuri.

enems isolates was as follows: 111 imipenem-resistant and 126 meropenem-resistant of 220 *A. baumannii*; 43 imipenem-resistant and 48 meropenem-resistant of 127 *P. aeruginosa*; 1 imipenem-resistant and 2 meropenem-resistant of 34 *P. mirabilis*.

Generally, in the result of six-year trial, clinical strains of *A. baumannii* were found to be resistant to imipenem in $58.94 \pm 5.35\%$ cases. Resistance to meropenem was registered in $64.34 \pm 7.97\%$ of strains. Only $35.53 \pm 6.62\%$ of *A. baumannii* were susceptible to imipenem and $32.66 \pm 6.73\%$ – to meropenem. In the research the decreasing tendencies of *A. baumannii* susceptibility to imipenem and meropenem had been registered during 2011-2016. But the increased rates of *A. baumannii* resistance to both carbapenem antibiotics were determined (Figures 1, 2).

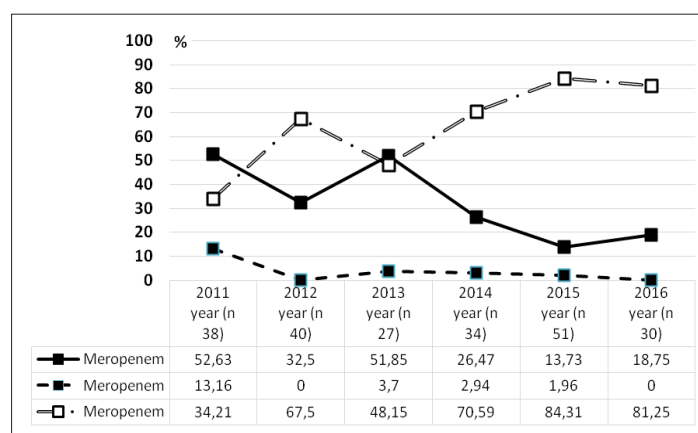


Fig. 2 Sensibilitatea la meropenem a tulpinilor clinice de *A. baumannii*, izolate de la pacienții cu arsuri grave în perioada 2011-2016, (%); S – sensibil, I – intermediar, R – rezistent.

Fig. 2 The susceptibility to meropenem of clinical strains of *A. baumannii*, isolated from patients with severe burns in 2011-2016, (%); S – sensitive, I – intermediate, R – resistant.

As for clinical strains of *P. aeruginosa*, the analogical decreasing sensitivities to imipenem and meropenem were found. After six years of the trial the susceptibility in clinical isolates of *Pseudomonas* to meropenem was registered no more than $52.86 \pm 6.82\%$. And the effectiveness of imipenem was proved only against $59.35 \pm 5.92\%$ of *P. aeruginosa* isolates. The “curves” of sensitivity rate to carbapenems among clinical strains of *P. aeruginosa* seemed about its decreasing in 2011-2016. Amount of resistant to imipenem and meropenem *P. aeruginosa* isolates had risen by the end of 2016 (Figures 3, 4).

In our research we found two clinical strains of *P. mirabilis* been resistant to meropenem and one of them – resistant to imipenem (Figure 5).

We involved clinical strains of *P. mirabilis* in further research because of the fact, that this pathogen was the only representative of *Enterobacteria*, which obtained resistance to carbapenems in observed burn patients.

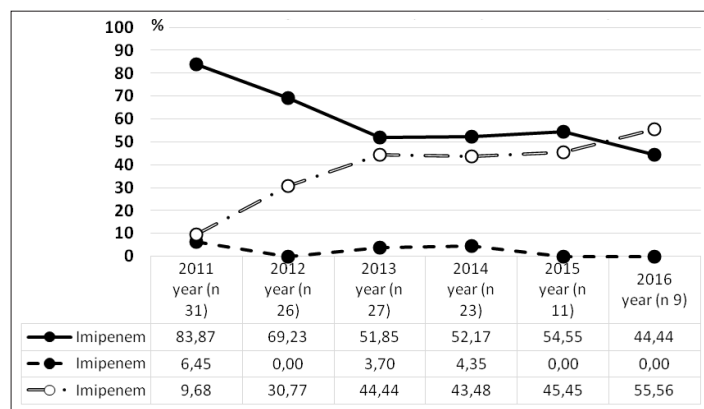


Fig. 3 Sensibilitatea la imipenem a tulpinilor clinice de *P. aeruginosa*, izolate de la pacienții cu arsuri grave în perioada 2011-2016 (%); S – sensibil, I – intermediar, R – rezistent.

Fig. 3 The susceptibility to imipenem of clinical strains of *P. aeruginosa*, isolated from patients with severe burns in 2011-2016, (%); S – sensitive, I – intermediate, R – resistant.

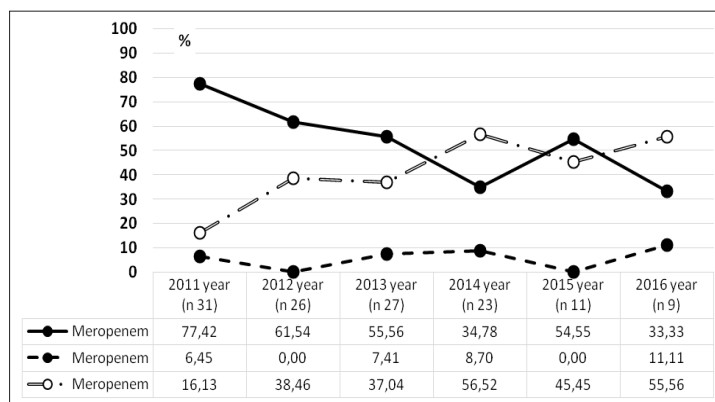


Fig. 4 Sensibilitatea la meropenem a tulpinilor clinice de *P. aeruginosa*, izolate de la pacienții cu arsuri grave în 2011-2016 (%); S – sensibil, I – intermediar, R – rezistent.

Fig. 4 The susceptibility to meropenem of clinical strains of *P. aeruginosa*, isolated from patients with severe burns in 2011-2016, (%); S – sensitive, I – intermediate, R – resistant.

Tabelul 1. Distribuția organismelor producătoare de metalo-beta-lactamază.

Microorganism	Numărul total de tulpini izolate	Cantitatea de tulpini cu fenotipul MβL*		Cantitatea de tulpini producătoare de MβL, codificate de VIM	
		n	%	n	%
<i>A. baumannii</i>	220	81	36,81	3	1,36
<i>P. aeruginosa</i>	127	43	33,86	6	4,72
<i>P. mirabilis</i>	34	3	8,82	3	8,82
Total	381	127	79,49	12	14,9

Notă: *- metalo-β-lactamază.

În cadrul studiului, a fost demonstrată rezistența fenotipică la carbapeneme, legată de producerea metalo-β-lactamazei (MβL). Prin intermediul tehnicilor de double-disk synergy,

Table 1. Distribution of metallic-β-lactamase-producing organisms.

Microorganism	Total number of isolated strains	Quantity of strains with MβL*-producing phenotype		Quantity of strains with VIM-encoded MβL-producing	
		n	%	n	%
<i>A. baumannii</i>	220	81	36.81	3	1.36
<i>P. aeruginosa</i>	127	43	33.86	6	4.72
<i>P. mirabilis</i>	34	3	8.82	3	8.82
Total	381	127	79.49	12	14.9

Note: *- metallic-β-lactamase.

In the research there was proved phenotypic resistance to carbapenems, related with production of metallic-β-lactamase (MβL). By means of double disk-synergy techniques imipe-

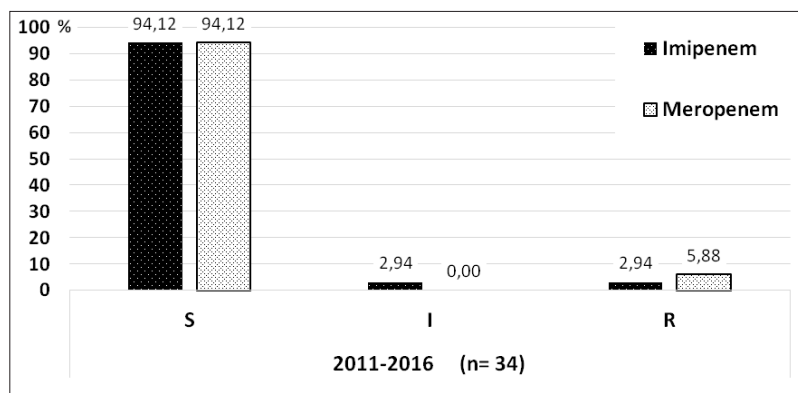


Fig. 5 Sensibilitatea la carbapeneme la tulpinile clinice de *P. mirabilis*, izolate de la pacienții cu arsuri grave în 2011-2016 (%); S – sensibil, I – intermediar, R – rezistent.

Fig. 5 The susceptibility to carbapenems in clinical strains of *P. mirabilis*, isolated from patients with severe burns in 2011-2016, (%); S – sensitive, I – intermediate, R – resistant.

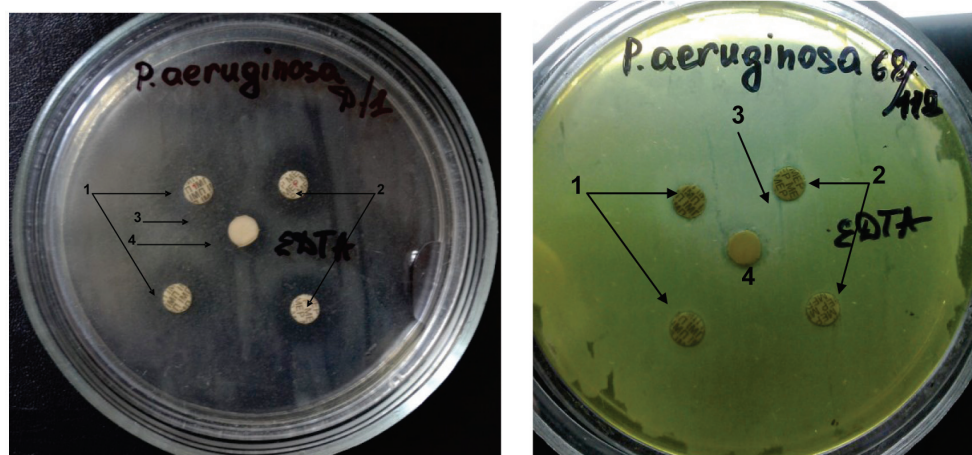


Fig. 6 Screeningul producției de metalo- β -lactamază prin testele fenotipice cu imipenem și meropenem EDTA teste double-disk synergy (DDST): 1 – discuri cu imipenem; 2 – discuri cu meropenem; 3 – zona sinergică de inhibare, care înconjoară discurile cu imipenem și EDTA (a, b) și cu meropenem și EDTA (b), indicând activitatea M β L.

Fig. 6 Screening of metallic- β -lactamase production by phenotypic tests imipenem- and meropenem- EDTA double-disk synergy test (DDST): 1 – disks with imipenem; 2 – disks with meropenem; 3 – synergistic zone of inhibition surrounding imipenem and EDTA disks (a, b) and meropenem and EDTA disks (b) indicating M β L activity.

izolatele clinice rezistente la imipenem și meropenem de *A. baumannii* ($n=126$), *P. aeruginosa* ($n=48$), *P. mirabilis* ($n=3$) au fost testate la producerea de M β L. Acest studiu a constatat prevalența fenotipului producător de M β L la izolatele clinice de *A. baumannii* (36,81%), *P. aeruginosa* (33,86%). La izolatele expuse de *P. mirabilis* a fost demonstrat doar în 8,82% (Tabelul 1).

Toate tulpinile clinice, dovedite fenotipic ca producătoare de M β L, au fost testate prin PCR pentru a determina rezistența la carbapeneme, asociată cu VIM. A fost determinată prevalența generală a rezistenței la carbapeneme, mediate de VIM în cazul tulpinilor de *P. aeruginosa* ($n=6$), *A. baumannii* ($n=3$), *P. mirabilis* ($n=3$) (Tabelul 1). Printre agenții patogeni, care au provocat complicații infecțioase la pacienții cu arsuri, a fost demonstrată asocierea rezistenței *A. baumannii* (1,36%), *P. aeruginosa* (4,72%), *P. mirabilis* (8,82%) cu genele-VIM, care codifică producția de metalo- β -lactamaze din clasa B.

Tabelul 2. Eficacitatea antimicrobiană a antibioticelor și a anti-septicului decamethoxinum și activitatea lor combinată împotriva tulpinilor clinice rezistente la carbapenem ale microorganismelor nefermentative.

Antibiotic	<i>A. baumannii</i> , ($n=81$)	<i>P. aeruginosa</i> , ($n=43$)
	MIC (M \pm m, μ g/ml)	
Imipenem	90,74 \pm 11,65	110,69 \pm 14,62
Meropenem	105,03 \pm 14,54	90,47 \pm 10,65
DCM*	36,36 \pm 4,79	106,83 \pm 14,90
DCM+ Imipenem**	20,90 \pm 3,64	19,24 \pm 3,22
DCM+ Meropenem**	19,16 \pm 2,42	16,48 \pm 1,90

S-a constatat că susceptibilitatea *A. baumannii* la antibiotice a avut tendința de scădere a MIC de meropenem de 7,07 \pm 0,87 ori, iar valorile MIC ale imipenemului au scăzut de

nem- and meropenem-resistant clinical isolates of *A. baumannii* ($n=126$), *P. aeruginosa* ($n=48$), *P. mirabilis* ($n=3$) were screened for producing M β L. In our study, we found prevalence of M β L-producing phenotype in clinical isolates of *A. baumannii* (36.81%), *P. aeruginosa* (33.86%). Only in 8.82% of the exhibited isolates of *P. mirabilis* it was proved (Table 1).

All phenotypically proved M β L-producing clinical strains were screened by PCR to find out the VIM-related resistance to carbapenem antibiotics in observed pathogens. We determined the overall prevalence of VIM-mediated resistance to carbapenems among M β L-positive isolates of *P. aeruginosa* ($n=6$), *A. baumannii* ($n=3$), *P. mirabilis* ($n=3$) (Table 1). Among pathogens, which had caused infection complications among burn patients the resistance of *A. baumannii* (1.36%), *P. aeruginosa* (4.72%), *P. mirabilis* (8.82%) was proved to be related with VIM-gens, encoding the production of metallic- β -lactamases of B-class.

Table 2. The antimicrobial efficacy of antibiotics and decamethoxinum antiseptic and their combined activity against carbapenem resistant clinical strains of non-fermenting microorganisms.

Antibiotic	<i>A. baumannii</i> , ($n=81$)	<i>P. aeruginosa</i> , ($n=43$)
	MIC, (M \pm m, μ g/ml)	
Imipenem	90.74 \pm 11.65	110.69 \pm 14.62
Meropenem	105.03 \pm 14.54	90.47 \pm 10.65
DCM*	36.36 \pm 4.79	106.83 \pm 14.90
DCM+ imipenem**	20.90 \pm 3.64	19.24 \pm 3.22
DCM+ meropenem**	19.16 \pm 2.42	16.48 \pm 1.90

There was found, that the susceptibility of *A. baumannii* to antibiotics had the tendency of the decreasing of MIC of meropenem in 7.07 \pm 0.87 times and MIC values of imipenem

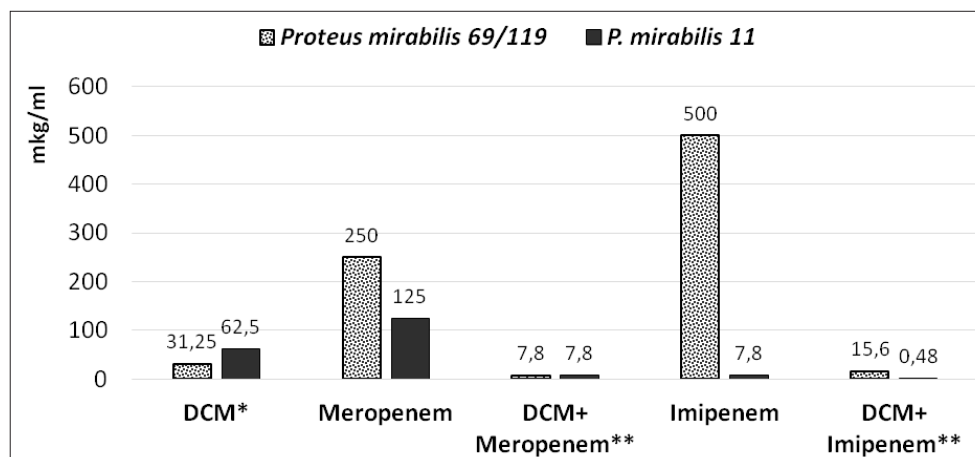


Fig. 7 Eficacitatea antimicrobiană a antibioticelor și a antisepticului decamethoxinum și activitatea lor combinată împotriva izolatelor de *P. mirabilis* rezistente la carbapenem.

Fig. 7 The antimicrobial efficacy of antibiotics and decamethoxinum antiseptic and their combined activity against carbapenem resistant isolates of *P. mirabilis*.

3,09±0,19 ori după utilizarea sub-MIC de DCM. Aceeași eficacitate a utilizării combinate a sub-MIC de DCM și a carbapenemelor a fost exprimată, în special, în tulpinile clinice rezistente de *P. aeruginosa*. Aceasta a dus la scăderea MIC a antibioticelor imipenem și meropenem de 7,5-7,7 ori. Administrarea sub-MIC de DCM, de asemenea, a îmbunătățit semnificativ sensibilitatea izolatelor de *P. mirabilis*, producătoare de MβL, la carbapeneme (Tabelul 2; Figura 7).

Este interesant faptul dispariției genelor VIM după utilizarea sub-MIC de DCM în culturile izolatelor, care au fost, inițial, detectate prin PCR ca fiind VIM-pozitive, în comparație cu probele de control ale aceluiași tulpini. Au fost detectate, ulterior, genele VIM la generația de tulpini bacteriene VIM-pozitive din următoarele 24 de ore, care au suferit influență sub-MIC de DCM și apoi au fost recultivate.

Discuții

Semnificația clinică a complicațiilor infecțioase cauzate de bacterii gram-negative este strâns dependentă de dificultățile de tratament, cauzate de rezistența la antibiotice [1, 3]. *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, au fost considerați drept cei mai frecvenți agenți patogeni ai infecției nosocomiale în caz de arsuri, fiind recunoscuți ca producători de MβL. În diferite studii, producția de MβL de *P. aeruginosa* a fost cuprinsă între 7% și 65%. Este cunoscut faptul că *A. baumannii* exprimă rezistență mare la carbapenem [4, 5, 7, 10].

Printre agenții patogeni predominanți ai complicațiilor infecțioase la pacienții critici cu arsuri, microorganismele gram-negative, MβL-pozitive au prezentat diferite rate de apariții ale rezistenței la carbapeneme, codificată de VIM. La tulpinile clinice de *P. aeruginosa*, acești determinanți moleculari de rezistență s-au depistat mai frecvent [4, 5, 9, 16].

Datele primite în studiu au arătat incidența rezistenței la imipenem (2,94%) și meropenem (5,88%) în cazul *P. mira-*

decreased in 3.09±0.19 times after sub-MIC of DCM had been used. The same efficacy of combined use of sub-MIC of DCM and carapenems were particularly expressed in clinical strains of resistant *P. aeruginosa*. This resulted in the decreasing of MIC of imipenem and meropenem antibiotics in 7.5-7.7 times. Administration of sub-MIC of DCM also improved significantly the susceptibility of MβL-producing isolates of *P. mirabilis* to carbapenems (Table 2; Figure7).

The interesting fact of the disappearance of VIM genes after the use of sub-MIC of DCM in cultures of those isolates, which primarily had been detected by the PCR as VIM-positive ones in comparison with control samples of the same strains. Further detecting of VIM genes in the next 24-hour generation of VIM-positive bacterial strains, which had underwent influence of sub-MIC of DCM and then were re-cultivated.

Discussion

Clinical significance of Gram-negative bacterium infectious complications due to these is closely dependent on difficulties of treatment due to antibiotic resistance [1, 3]. *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, been supposed as the most frequent nosocomial pathogens of burn infection, have been recognized as MβL-producing ones. In various studies *P. aeruginosa* has been reported to obtain MβL production ranging from 7% to 65%. *A. baumannii* has been known to express high carbapenem resistance too [4, 5, 7, 10].

Among prominent pathogens of infectious complications in critically ill patients with burns, potentially MβL-positive Gram-negative microorganisms showed different occurrences of VIM-encoded resistance to carbapenems. *P. aeruginosa* clinical strains have been supposed to obtain these molecular determinants of resistance more frequently than others [4, 5, 9, 16].

The data, received in our study, seemed the incidence of

bilis, care coloniza plăgile arse. Conform datelor cercetărilor ulterioare, o astfel rată de producție de M β L a fost prea mare și nu era tipică pentru reprezentantul *Enterobacteria*. Determinarea moleculară a genelor VIM în toate izolatele clinice de *P. mirabilis* rezistente la carbapenem, a arătat schimbarea plasmidelor VIM între bacteriile non-fermentative și speciile *Enterobacteria*. Acest fapt poate fi explicat, în primul rând, prin presiunea selectivă a antibioticelor, utilizate pentru tratamentul infecțiilor cauzate de aceste microorganisme [16-18].

Având în vedere extinderea multi-antibiotico-rezistenței la bacteriile gram-negative, s-au făcut multe eforturi pentru a reduce agenții patogeni producători de M β L și pentru a preveni răspândirea lor. Unele studii au demonstrat eficacitatea utilizării antisepticelor împotriva microorganismelor oportuniste, rezistente la antibiotice. Aceste abordări au avut succes în majoritatea cazurilor [11].

Conform datelor acestui studiu, privind utilizarea combinată a antisepticelor și a carbapenemelor, a fost despistată efectiv activitatea meropenemului față de *A. baumannii* (de 3,46 \pm 0,26 ori), *P. aeruginosa* (de 7,58 \pm 0,77 ori). Tulpinile rezistente de *P. mirabilis* au prezentat, *in vitro*, sensibilitate la carbapeneme în 32 de cazuri după utilizarea DCM. Explicația acestui fapt poate fi strâns legată de proprietățile bine cunoscute ale unor antiseptice, cum ar fi decamethoxinum, aethonium, de a elimina plasmidele de rezistență din bacterii, prin scurgerea lor prin membrană, investind considerabil în optimizarea eficacității antibioticelor contra agenților patogeni rezistenți [17, 18]. Înregistrat prin intermediul RT-PCR, faptul că bacteriile pierd genele VIM după utilizarea DCM la toate izolatele clinice M β L-rezistente, de asemenea, completează, în mod substanțial, dovezile științifice privind eficiența ridicată a utilizării combinate a antisepticului DCM și a carbapenemelor în combaterea antimicrobiană a agenților patogeni rezistenți în complicațiile infecțioase.

Concluzii

1) Bacteriile oportuniste gram-negative *A. baumannii* (34,26%), *P. aeruginosa* (19,78%) și *P. mirabilis* (5,30%) cauzează frecvent complicații infecțioase la pacienți cu arsuri grave, cu creșterea incidenței rezistenței la imipenem și meropenem. Acestea au fost predominant primite de la 441 de pacienți în stare critică cu arsuri.

2) Expresia fenotipică a mecanismului de rezistență la carbapeneme, asociat metalo- β -lactamazei, a fost predominant depistat în izolate clinice de *A. baumannii* (36,81%), *P. aeruginosa* (33,86%), comparativ cu *P. mirabilis* (8,82%).

3) *A. baumannii* (1,36%), *P. aeruginosa* (4,72%), *P. mirabilis* (8,82%), agenți patogeni ai complicațiilor infecțioase la pacienții cu arsuri, au devenit rezervorul diferitor gene VIM, transmise de plasmidă, codificatoare de metalo- β -lactamaze din clasa B, care hidrolizează imipenemul și meropenemul.

4) Combinația sub-MIC de antiseptic decamethoxinum cu imipenem și meropenem demonstrează, în mod semnificativ, eficacitatea, *in vitro*, față de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* rezistente la carbapenem, care poate apărea ca rezultat

the resistance to imipenem (2.94%), meropenem (5.88%) among *P. mirabilis*, colonizing burn wounds. According to the data of late researches, such rate of M β L production was too high and not typical to *Enterobacteria* representative. The molecular determination of VIM-gens in all carbapenem-resistant clinical isolates of *P. mirabilis* may seem the exchange of VIM plasmids between non-fermentation bacteria and *Enterobacteria* species. However, it can be explained first of all, by the selective pressure of antibiotics, used for the treatment of infections caused by these microorganisms [16-18].

Under the expansion of multi-antibiotic-resistance among Gram-negative bacteria, many efforts have been made to reduce M β L-producing pathogens and prevent their spread. Some trials proved the efficacy of antiseptics use against antibiotic resistant opportunistic microorganisms. These approaches were success in the majority of cases [11].

As follows, in the result of our research of combined use of antiseptics and carbapenem antibiotics the effective reveal of the activity of meropenem was found against *A. baumannii* (in 3.46 \pm 0.26 times), *P. aeruginosa* (in 7.58 \pm 0.77 times). But resistant strains of *P. mirabilis* were found *in vitro* to reveal their susceptibility in 32 times to carbapenems after the DCM had been used. The explanation of this fact may be closely related to well-known properties of some antiseptics like decamethoxinum, aethonium to eliminate plasmids of resistance from bacteria by the way of their leakage though the auto-membrane seriously invest into the optimization of antibiotics efficacy among resistant pathogens [17, 18]. Registered by means of RT-PCR the fact of the loss of VIM genes by bacteria after the DCM had been used in all studied M β L-resistant clinical isolates, also substantially complements scientific evidence of high effectiveness of combined use of antiseptic DCM and carbapenems on the way of antimicrobial combating resistant pathogens of infectious complications.

Conclusions

1) Gram-negative opportunistic bacteria *A. baumannii* (34.26%), *P. aeruginosa* (19.78%) and *P. mirabilis* (5.30%), frequently cause infection complications originating in patients with severe burns, with increasing incidence of resistance to imipenem and meropenem. They were predominantly received from 441 critically ill patients with burns.

2) The phenotypic expression of metallic- β -lactamases-related mechanism of resistance to carbapenems is predominantly conferred in clinical isolates of *A. baumannii* (36.81%), *P. aeruginosa* (33.86%) than in *P. mirabilis* (8.82%) ones.

3) *A. baumannii* (1.36%), *P. aeruginosa* (4.72%), *P. mirabilis* (8.82%) pathogens of infection complications among burn patients has become the reservoir of diverse plasmid-borne VIM genes, coding for metallic- β -lactamases of B-class that hydrolyse imipenem and meropenem.

4) The combination of sub-MIC of antiseptic decamethoxinum with imipenem and meropenem significantly reveal *in vitro* their effectiveness against carbapenem resistant *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, that may occur as a result

al pierderii, de către bacterii, a genelor VIM după utilizarea de decamethoxinum.

Declarația de conflict de interese

Nimic de declarat.

of the loss of VIM gens by bacteria after the decamethoxinum use.

Declaration of conflicting interests

Nothing to declare.

Referințe / references

- Hranjec T, Sawyer R. Management of infections in critically ill patients. *Surgical infections*, 2014; 15 (5): 474-478.
- Nagajchuk V, Nazarchuk O, Paliy V. *et al.* The study of qualities of microflora from burn surfaces in patients with burns. *Biomedical and Biosocial Anthropology*, 2014; (1): 194-199.
- Bondar M., Pylypenko M., Kharchenko L. *et al.* Evolution of the microbial landscape and current trends of antibiotic resistance formation in pathogenic microorganisms in general intensive care units. *Emergency medicine*, 2017; 1 (80): 102-105.
- Tängden T, Giske C. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control The Association for the Publication of the Journal of Internal Medicine. *Journal of Internal Medicine*, 2015; (277): 501-512; doi: 10.1111/joim.12342.
- Owlia P, Azimi L, Gholami A, Asghari B, Lari A. ESBL- and MBL-mediated resistance in *Acinetobacter baumannii*: a global threat to burn patients. *Le Infezioni in Medicina*, 2012; (3): 182-187.
- Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Med. Mal. Infect.*, 2014; (44): 51-56. doi: 10.1016/j.medmal.2013.11.007.
- Rao S., Kumar E. Antimicrobial resistance and metallo- β -lactamases in gram-negative isolates of hospital-acquired burn wound infections. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 2013; 2 (3): 181-185.
- Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Richter S., Palù G. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible *Enterobacteriaceae*. *Gut Pathogens*, 2014; (6): 13. <http://www.gutpathogens.com/content/6/1/13>
- Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2013; (68): 487-489. doi: 10.1093/jac/dks426.
- Khosravi Y, Loke M., Chua E., Tay S., Vadivelu J. Phenotypic detection of metallo- β -lactamase in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Scientific World Journal*, 2012, Article ID 654939, 7 pages. <http://dx.doi.org/10.1100/2012/654939>.
- Nazarchuk O, Paliy D. Substantiation of overcoming of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical strains by usage of decamethoxinum. *Annals of Mechnikovs Institute*, 2017; (2): 28-33.
- Decamethoxinum®. State register of medicines Ministry of Health of Ukraine. Registration certificate № UA/14444/01/01 since 24.06.2015. Order № 373.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control as recommended by EUCAST. Version 5.0, 2015. <http://www.eucast.org>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24 (ISBN 1-56238-897-5 [Print]; ISBN 1-56238-898-3 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2014.
- Lee K., Lim Y. S., Yong D., Yum J. H., Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *Journal of Clinical Microbiology*, 2003; 41 (10): 4623-4629.
- Jayanthi S., Jeya M. Plasmid profile analysis and bla VIM Gene Detection of metallo β -lactamase (MBL) producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical samples. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2014; 8 (6): DC16-DC19.
- Moncada E. Student Poster Competition Saturday Morning, Cellular and Molecular Biology Plasmid Elimination from *Klebsiella pneumoniae* using Anti-plasmid Compounds. AAAS 2016 Annual meeting Global Science Engagement, February 11-15, 2016, Washington DC. <https://www.aaas.org/abstract/plasmid-elimination-klebsiella-pneumoniae-using-anti-plasmid-compounds/>.
- Rudenko S. The influence of heterocyclic aminosugarchinoline derivants on elimination of antibiotic resistance plasmids. *Annals of Mechnikov's Institute*, 2008; (4): 69-79. http://www.imi-amn.org.ua/journal/4_2008/zmist4_2008.htm.