

FENOTIPURILE DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE
ALE TULPINILOR BACTERIENE ÎZOLATE DIN ULCERE
GAMBIERE, PE DURATA A 5 ANI, ÎNTR-UN
DEPARTAMENT DE DERMATOLOGIE

ANTIBIOTICS RESISTANCE PHENOTYPES
OF THE BACTERIAL STRAINS ISOLATED
FROM LEG ULCERS DURING 5 YEARS
IN A DERMATOLOGY DEPARTMENT

MARA MĂDĂLINA MIHAI*, MIRCEA IOAN POPA*, LILIANA GABRIELA POPA*,**, ALEXANDRA VICTORIA ION**, ANDREEA CĂLUGĂREANU**, IULIA SOLOMON**, CĂLIN GIURCĂNEANU*,**

Rezumat

Rezistența la antibiotice reprezintă o reală problemă la nivel internațional. Date recente epidemiologice evidențiază o prevalență mai înaltă a infecțiilor cu microorganisme multi-rezistente în mediu spitalicesc în România comparativ cu alte state europene. Vindecarea întârziată a ulcerelor gambiere determină spitalizări frecvente, iar curele repetate cu antibiotice cresc riscul dezvoltării rezistenței. Cu scopul de a identifica profilul fenotipic de sensibilitate la antibiotice al microorganismelor izolate de la nivelul ulcerelor gambiere, s-a efectuat un studiu retrospectiv în Departamentul de Dermatologie al Spitalului Universitar de Urgență „Elias”, în perioada ianuarie 2011 - decembrie 2015. 340 de pacienți au fost diagnosticați cu ulcere gambiere (venoase, arteriale, diabetice sau cu etiologie mixtă). 227 de examene bacteriologice efectuate din prelevate au avut un rezultat pozitiv, cu identificarea a 257 de tulpini bacteriene. Profilul de sensibilitate la antibiotice a fost testat conform ghidului Institutului de Standardizare pentru Laboratoare și Clinici (CLSI) și cu ajutorul sistemelor automate (Vitek2C/

Summary

Antibiotics resistance is a real problem at the international level. Recent epidemiological data show a higher incidence of infections with multiresistant hospital microorganisms in Romania than in the other European countries. The delayed healing of the leg ulcers causes frequent hospitalizations and the repeated antibiotic treatments increase the risk of developing resistance. In order to identify the antibiotic sensitivity phenotypical profile of the microorganisms that were isolated from leg ulcers, a study was performed retrospectively at the Dermatology Department of the Emergency University Hospital „Elias” from January 2011 to December 2015. 340 patients were diagnosed with leg ulcers (venous, arterial, diabetics or with mixed etiology). 227 bacteriological examinations had a positive result with the identification of 257 bacterial strains. The antibiotic sensitivity profile was tested according to the guide of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and by using automated systems (Vitek2C/Phoenix BD). A D-test was performed as well. Out of a total of 22 bacterial species,

* Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București, România.
„Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania.

** Departamentul de Dermatologie „Elias”, Spitalul Universitar de Urgență București, România.
Dermatology Department, „Elias” University Emergency Hospital, Bucharest, Romania

Phoenix BD). S-a efectuat și testul D. Dintr-un total de 22 de specii bacteriene, cele mai frecvent izolate au fost *Staphylococcus aureus* (121 tulpini, 47%) și *Pseudomonas aeruginosa* (51 tulpini, 19.8%). Asocierea acestor specii într-un prelevat a fost mai frecventă comparativ cu alte asocieri microbiene. Aproximativ o jumătate dintre tulpinile *S. aureus* a prezentat un fenotip de multi-rezistență la antibiotice (56 tulpini, 46.3%), iar 35.5% au fost metilino- rezistente (MRSA). Rezistența la macrolide, lincosamide și streptogramină B a fost mai înaltă la tulpinile MRSA (69.7%), comparativ cu cea a tulpinilor de *S. aureus* metilino-sensibile. Pe durata studiului s-a observat o rezistență în creștere la metilina. Mai mult, a fost detectată o prevalență înaltă a rezistenței la antibiotice a tulpinilor izolate. Rezultatele acestui studiu evidențiază importanța monitorizării sensibilității la antibiotice, care permite administrarea unui tratament adecvat, dar și controlul epidemiologic al infecțiilor nozocomiale.

Cuvinte cheie: Rezistență la antibiotice, MRSA, ulcer gambier.

Intrat în redacție: 25.11.2016

Acceptat: 15.12.2016

the most frequently isolated were *Staphylococcus aureus* (121 strains, 47%) and *Pseudomonas aeruginosa* (51 strains, 19.8%). The association of these species in a sample was more frequent than other microbial associations. Almost half of the *S. aureus* strains showed an antibiotic multiresistant phenotype (56 strains, 46.3%), and 35.5% were methicillin-resistant (MRSA). There was a higher resistance towards macrolides, lincosamides and streptogramin B for the MRSA strains (69.7%) than for the methicillin-sensitive *S. aureus* strains. During the study an increasing resistance towards methicillin was observed. Moreover, a high incidence of antibiotic resistance of the isolated strains was detected. The results of this study highlight the importance of monitoring the antibiotic sensitivity, which allows the administration of an adequate treatment and the epidemiological control of the nosocomial infections.

Key-words: antibiotic resistance, MRSA, leg ulcer.

Received: 25.11.2016

Accepted: 15.12.2016

Introducere

Ulceralele membrelor inferioare sunt patologii frecvente, cu un impact semnificativ asupra calității vieții pacienților, atât prin evoluția de lungă durată, cât și prin dezvoltarea unor complicații severe. Tratamentul presupune costuri crescute, iar dezvoltarea rezistenței la antibiotice și antiseptice a microorganismelor ce colonizează leziunile comportă un înalt risc epidemiologic.

În contextul spitalizărilor repetate și al terapiei îndelungate cu antibiotice la pacienții cu ulcere cronice se ridică o altă problemă importantă, aceea a emergenței tulpinilor rezistente la multiple clase de antibiotice.

Grupate sub acronimul ESKAPE, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., alături de alte specii bacteriene precum *Escherichia coli*, *Proteus* spp. *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, sunt recunoscute pentru capacitatea de a dezvolta rezistență multiplă la antibiotice și de a determina infecții persistente, care nu răspund la schemele terapeutice standard. Aceste microorganisme reprezintă izolate frecvente de la nivelul plăgilor cutanate cronice, atât la nivel internațional [1], cât

Introduction

Leg ulcers are high-incidence pathologies with a significant impact on the patient's life quality, both through the long-term evolution, and through the development of severe complications. The treatment involves high costs, and the development of antibiotic and antiseptic resistance of the microorganisms colonizing the lesions represents a high epidemiological risk.

Through repeated hospitalizations and prolonged antibiotic therapies, another important issue arises for the chronic ulcers patients: the emergence of multiple class antibiotic resistant strains.

Also known as ESKAPE, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., together with other bacterial species such as *Escherichia coli*, *Proteus* spp. *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, have a recognized capability to develop multiple resistance towards antibiotics and to cause persistent infections that do not respond to standard therapeutic schemes. These microorganisms are frequent isolates from the chronic cutaneous plagues, internationally [1] and in Romania as well [1,2,3]. Antibiotic multiresistant

și în România [1,2,3]. Tulpinile bacteriene multirezistente la antibiotice pot contribui la dezvoltarea infecțiilor cronice cutanate, afectând capacitatea de vindecare a ulcerelor gambiere. Mai mult, pacienții cu potențial de apărare imună redus, pot dezvolta complicații sistemice severe. Modalitățile de abordare terapeutică sunt limitate, având un impact important asupra șanselor de vindecare și/ sau supraviețuire.

Cele mai recente date cu privire la incidența infecțiilor sistemice cu tulpini multirezistente în România este îngrijorătoare: mai mult de 50% dintre tulpinile de *P. aeruginosa* raportate au fost rezistente la ceftazidim, piperacilină/ tazobactam, carbapeneme și/sau fluoroquinolone și mai mult de 50% dintre tulpinile de *S. aureus* au fost rezistente la Oxacilină/ Meticilină (MRSA) [4]. Agenții antimicrobieni enumerați sunt utilizați frecvent în tratamentul pacienților diagnosticați cu ulcere gambiere suprainfectate.

Material și metodă

Pe baza foilor de observație și a informațiilor existente în baza electronică de date a Spitalului Universitar de Urgență "Elias", au fost identificați pacienții diagnosticați cu ulcere ale membrelor inferioare, care s-au prezentat în Clinica de Dermatologie și Alergologie, în perioada ianuarie 2011-decembrie 2015. A fost luată în considerare fiecare reinternare a pacienților, dacă aceasta a avut loc pe durata desfășurării studiului. Pacienții au fost clasificați în funcție de diagnosticul stabilit la internare în 4 categorii: ulcer venos, ulcer arterial, ulcer mixt, ulcer gambier de altă etiologie. Au fost analizate date epidemiologice despre patologia pacienților incluși în studiu precum: prevalența fiecărui diagnostic de boală care a necesitat internare, incidența internărilor în funcție de anotimp, frecvența internărilor în spital. Au fost analizate date demografice precum sexul, vârsta la prezentare, mediul de proveniență.

S-au analizat rezultatele examenelor microbiologice ale produselor patologice prelevate de la nivelul plăgilor cutanate, în perioada ianuarie 2011-decembrie 2015, din arhiva computerizată a Spitalului Universitar de Urgență "Elias". Au fost identificate rezultatele pozitive ale examenelor bacteriologice și tulpinile izolate din secrețiile prelevate de la pacienții incluși în studiu.

bacterial strains can contribute to the development of the chronic cutaneous infections, affecting the healing ability of the leg ulcers. Moreover, the patients with low immune defense can develop severe systemic complications. The therapeutic approaches are limited, significantly impacting the healing and/or surviving chances.

The most recent data regarding the incidence of systemic infections with multiresistant strains in Romania is concerning: more than 50% of the reported *P. aeruginosa* strains were resistant towards ceftazidime, piperacillin/tazobactam, carbapenems and/or fluoroquinolones and more than 50% of the *S. aureus* strains were resistant towards oxacillin/ methicillin (MRSA) [4]. The mentioned antimicrobial agents are frequently used for the treatment of the patients diagnosed with superinfected leg ulcers.

Material and methods

Based on the observation sheets and on the information available in the electronic data bank of the „Elias” University Emergency Hospital, there were identified patients who were diagnosed with leg ulcers and investigated at the Clinic for Dermatology and Allergology from January 2011 to December 2015. Each rehospitalization was taken into account, if it took place within the study’s time frame. Based on the diagnostic set at the hospitalization, the patients were classified in 4 categories: venous ulcer, arterial ulcer, mixed ulcer, leg ulcer of different etiology. The epidemiological data about the pathology of the patients included in the study was analysed, i.e. the incidence of each disease diagnostic that required hospitalization, the season when the hospitalization took place, the frequency of hospitalizations. Demographic data such as gender, age and background was analysed.

The results of the microbiological examinations of the samples from cutaneous plagues that were present in the digital archive of „Elias” University Emergency Hospital were analysed. The positive results of the bacteriological examinations and the isolated strains from the secretions collected from the patients included in the study were identified. The bacterial strains were isolated and identified at the Laboratory for Microbiology at „Elias” University Emergency

Tulpinile bacteriene au fost izolate și identificate în Laboratorul de Microbiologie al Spitalului Universitar de Urgență „Elias”, conform schemelor standard de diagnostic microbiologic, identificarea biochimică utilizând sistemul automat Vitek 2 și truse API. În vederea studiului fenotipic al profilurilor de rezistență la antibiotice s-au interpretat rezultatele obținute prin metoda antibiografei difuzimetrice standardizate Kirby-Bauer, pe agar Mueller-Hinton, conform ghidului CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)[5] și cu sisteme automate (Vitek2C / Phoenix BD). Au fost de asemenea efectuate D-teste pentru evaluarea rezistenței inductibile la clindamicină pentru *S. aureus*, conform recomandărilor producătorului.

Pentru a stabili gradul de rezistență la antibiotice al fiecărei tulpini au fost detectate microorganismele MDR (Multi Drug Resistant; multirezistente la antibiotice), XDR (Extensively Drug Resistant; extensiv rezistente la antibiotice) și PDR (Pan Drug Resistant; pan-rezistente la antibiotice) conform definițiilor ghidului ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) [6]. Termenul de MDR este definit ca rezistența concomitentă a unei tulpini la cel puțin un agent antimicrobian din trei sau mai multe clase de antibiotice, stabilite pentru fiecare specie în parte, excluzând rezistența intrinsecă a fiecărei specii [6]. Rezistența extinsă (XDR) reprezintă rezistența unei tulpini microbiene la cel puțin un agent antimicrobian din mai multe clase de antibiotice, stabilite pentru fiecare specie în parte, cu conservarea sensibilității la una sau maxim două clase de antibiotice [6]. Panrezistența (PDR) reprezintă rezistența unei tulpini bacteriene la toți agenții antimicrobieni din toate clasele de antibiotice recomandate pentru a fi testate pentru specia respectivă [6].

Rezultate

1. Date epidemiologice

S-au identificat 340 pacienți diagnosticați cu ulcer al membrilor inferioare, internați în Clinica de Dermatologie și Alergologie, a Spitalului Universitar de Urgență „Elias”, în perioada ianuarie 2011-decembrie 2015. Din aceștia 206 au fost diagnosticați cu ulcer venos gambier.

Hospital, according to the standard microbiological diagnostic schemes, and for the biochemical identification, the automated system Vitek 2 and API test kits were used. In order to perform the phenotypical study of the antibiotic resistance profiles, the results obtained through the standardized diffusion antibiogram Kirby-Bauer method on Mueller-Hinton agar plates and with the automatized systems (Vitek2C/ Phoenix BD) were interpreted according to the CLSI guide (Clinical and Laboratory Standards Institute)[5]. D-tests were performed as well, in order to evaluate the inducible clindamycin resistance in *S. aureus*, according to the recommendations of the manufacturer.

To identify the degree of the antibiotic resistance of each strain, the MDR (Multi Drug Resistant), XDR (Extensively Drug Resistant) and PDR (Pan Drug Resistant) micro-organisms were detected according to the definitions of the ECDC guide (European Centre for Disease Prevention and Control) [6]. MDR is defined as the simultaneous resistance of a strain towards at least an antimicrobial agent from three or more different antibiotic classes that are specific for each particular species, excepting the intrinsic resistance of each species [6]. Extensive Drug Resistance (XDR) represents the resistance of a microbial strain towards at least an antimicrobial agent from more antibiotic classes that are specific for each particular species, while the sensitivity towards one or maximum two antibiotic classes is preserved [6]. Panresistance (PDR) represents the resistance of a bacterial strain towards all the antimicrobial agents from all the antibiotic classes recommended for testing for that particular species [6].

Results

1. Epidemiological data

340 patients diagnosed with leg ulcers and hospitalized from January 2011 to December 2015 in the Clinic for Dermatology and Allergology of the „Elias” University Emergency Hospital were identified. 206 of these were diagnosed with leg venous ulcer.

The patients distribution according to gender was very balanced with a 169 to 171 female to male ratio. It was noticed that most of the

Distribuția pacienților în funcție de sex a fost foarte echilibrată cu un raport sex feminin/sex masculin de 169/171. S-a constatat că majoritatea pacienților provin din mediul urban (71%) de 2.4 ori mai mult comparativ cu mediul rural (29%). Vârsta medie la internare a fost de 64.6 ani (mediană 64 ani) la pacienții de sex feminin, 68.4 ani (mediană 71 ani) la pacienții de sex masculin. Vârsta maximă a fost de 95 de ani, iar cea minimă de 31 de ani.

Pe durata celor 5 ani, pacienții incluși în studiu au fost internați într-un număr total de 646 de ori, incluzând 415 prezentări pentru diagnosticul și/sau tratamentul ulcerelor de etiologie venoasă, 145 prezentări pentru complicații ale insuficienței venoase cronice (celulită gambieră, eczemă de stază, tromboză venoasă), 2 pentru complicații neoplazice ale ulcerelor venoase și 84 de prezentări pentru ulcere ale membrelor inferioare de altă etiologie (ulcere mixte, ulcere arteriale, ulcere diabetice).

Aproximativ două treimi (67%) din pacienți au fost internați o singură dată. O proporție semnificativă (10%) a prezentat un număr de internări mai mare de 4 în Clinica de Dermatologie și Alergologie, numărul maxim fiind de 18 internări la un pacient cu ulcer venos ce a suferit recurențe infecțioase frecvente.

Pacienții cu ulcere venoase cronice au avut o proporție mai mare a recurențelor, comparativ cu pacienții care sufereau de ulcere gambiere de etiologie diferită: 10.4% din pacienți au revenit la spital de 2 ori, față de 7.8% în a doua categorie; alți 15.6% au revenit de cel puțin 3 ori în perioada ianuarie 2011-decembrie 2016, raportat la 11.7%.

În ceea ce privește perioada anului în care s-a internat pacienții incluși în studiu, a existat o predominanță în sezonul cald, 30% din pacienți au fost internați vara, 24.34% primăvara și 24.92% toamna, comparativ cu 20.28% iarna.

2. Identificarea rezultatelor examenelor microbiologice de interes

În perioada ianuarie 2012-decembrie 2015, au fost efectuate 227 de examene microbiologice ale prelevatelor de la nivelul plăgilor cutanate, izolându-se 257 tulpini bacteriene, aparținând unui număr total de 22 specii bacteriene. 33 de rezultate bacteriologice au fost negative. Cea mai frecventă specie bacteriană a fost *S. aureus*,

patients come from urban areas (71%), representing 2.4 times more than the ones coming from rural areas (29%). The average hospital admission age was 64.6 years (64 years median) for female patients and 68.4 years (71 years median) for male patients. The maximal age was 95, and the minimal one 31.

During the 5 years, the patients included in the study were admitted in the hospital 646 times, including 415 visits for the diagnostic and/or the treatment of the ulcers of venous etiology, 145 visits for complications of the chronic venous insufficiency (calf cellulite, stasis dermatitis, venous thrombosis), 2 for neoplastic complications of the venous ulcers and 84 for leg ulcers of different etiology (mixed ulcers, arterial ulcers, diabetes ulcers).

Approximately two thirds (67%) of the patients were only once hospitalized. A significant percentage (10%) showed more than 4 hospital admissions in the Clinic for Dermatology and Allergology, with a maximum of 18 hospital admissions for a patient with venous ulcer suffering frequent reinfections.

The chronic venous ulcer patients had a higher recurrence than the patients with calv ulcers of different etiology: 10.4% of the patients came again twice to the hospital, whereas only 7.8% from the second group; other 15.6% came again at least 3 times in the period January 2011-December 2016, in comparison to 11.7%, respectively.

With respect to the season when the patients included in the study were admitted in the hospital, there was a higher incidence in the warm than in the cold season: Summer (30%), Spring (24.34%), Autumn (24.92%) and only 20.28% in Winter.

2. Identifying the relevant microbiological examinations results

From January 2012 to December 2015, 227 microbiological examinations were performed on samples collected from cutaneous plaques, from which 257 bacterial strains belonging to 22 bacterial species were isolated. 33 bacteriological results were negative. The most frequent bacterial species was *S. aureus*, representing approximately half of the isolates from the leg plaques (121 strains, 47%). The second frequent

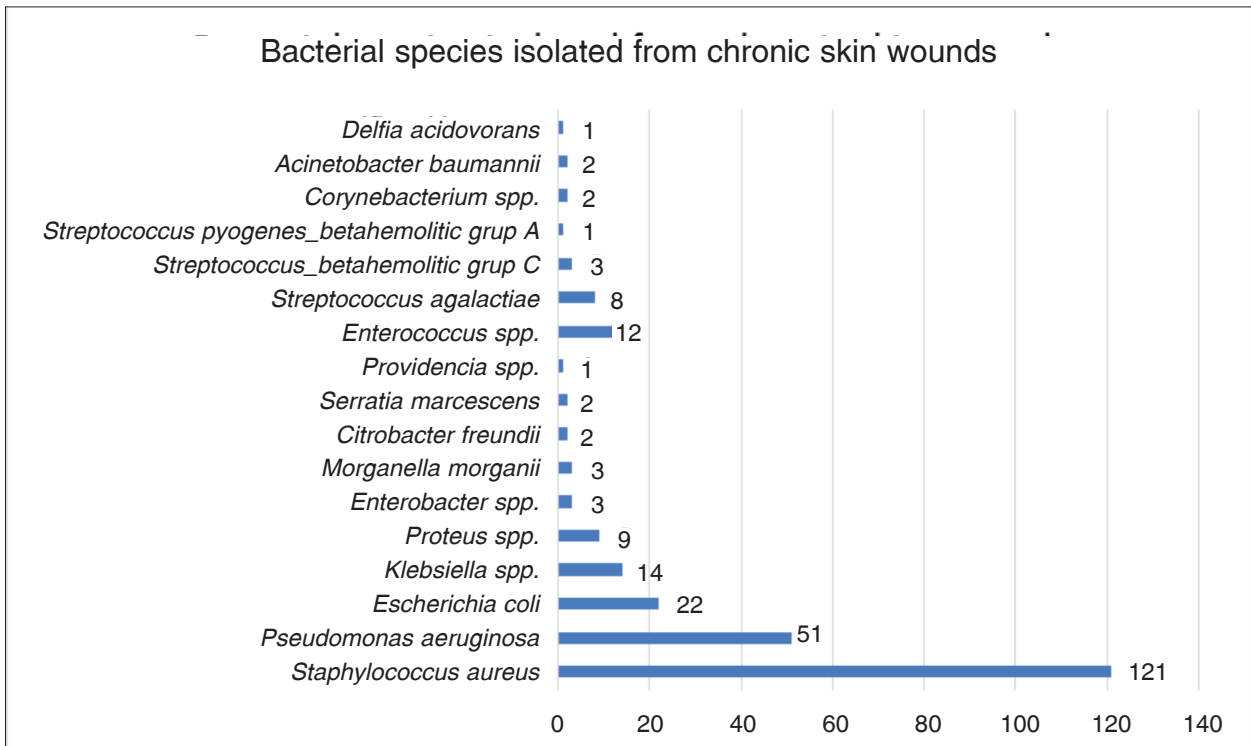


Fig. 1. Specii bacteriene identificate în prelevatele din ulcere cronice gambiere

Fig. 1. Bacterial species isolated from chronic lower limb wounds

reprezentând aproximativ o jumătate dintre izolatele de la nivelul plăgilor membrilor inferioare (121 tulpini, 47%). A fost urmată de *P. aeruginosa* (51 tulpini, 19.8%), cu o proporție de aproximativ 1/5 din totalul tulpinilor bacteriene. Enterobacteriile au fost reprezentate de *E. coli* (22 tulpini), *Klebsiella spp.* din care 13 tulpini de *K. pneumoniae* și 1 tulpină *K. oxytoca*, 9 tulpini de *Proteus spp.*, urmate în proporții mai mici de *Enterobacter spp.* (3) *Morganella morganii* (3), *Citrobacter freundii* (2), *Serratia marcescens* (2) și *Providencia spp.* (1). Speciile de *Enterococcus* au fost depistate la 12 pacienți cu ulcere cutanate, iar speciile de *Streptococcus* au fost reprezentate predominant de *Streptococcus agalactiae*, urmate de streptococii β-hemolitici de grup G (3 tulpini) și de grup A (1 tulpină). Alte specii bacteriene identificate mai puțin frecvent au fost *Corynebacterium spp.* (2), *Acinetobacter baumannii* (2) și *Delfia acidovorans* (1) (Fig. 1).

Din punctul de vedere al numărului de specii bacteriene identificate în cadrul unui examen microbiologic, s-a observat faptul că în

was *P. aeruginosa* (51 strains, 19.8%), a fifth of the total bacterial strains. The identified Enterobacteriaceae were *E. coli* (22 strains), *Klebsiella spp.* of which 13 strains of *K. pneumoniae* and one strain of *K. oxytoca* and 9 strains of *Proteus spp.* The following were present with a lower incidence: *Enterobacter spp.* (3 strains) *Morganella morganii* (3), *Citrobacter freundii* (2), *Serratia marcescens* (2) and *Providencia spp.* (1). The *Enterococcus* species were identified at 12 patients with cutaneous ulcer, while the *Streptococcus* species were mostly represented by *Streptococcus agalactiae*, followed by Group G β-hemolytic streptococcus (3 strains) and Group A β-hemolytic streptococcus (1 strain). Other bacterial species that were identified with a lower incidence were *Corynebacterium spp.* (2 strains), *Acinetobacter baumannii* (2) and *Delfia acidovorans* (1) (Fig. 1).

With respect to the number of the identified bacterial species by a microbiological examination, in most of the cases a single strain was identified (135, 59.5%), followed by the

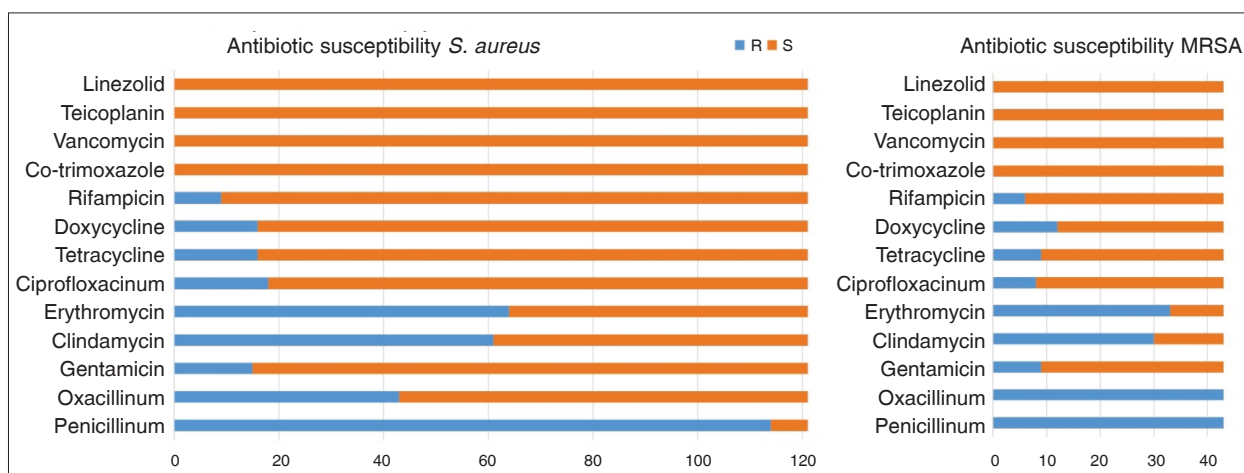


Fig. 2. Sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor de *S. aureus* izolate din ulcere cronice gambiere
 Fig. 2. Antibiotic susceptibility for *S. aureus* strains isolated from chronic lower limb wounds

majoritatea cazurilor a fost identificată o singură tulpină (135, 59.5%), urmată de asocierea a două microorganisme (50, 22%) și, mai rar, a trei specii bacteriene (8, 3.5%). Într-un singur caz de ulcer venos au fost identificate 4 specii bacteriene diferite. Cea mai frecvent întâlnită asociere microbială a fost *P. aeruginosa* și *S. aureus* în rezultate bimicrobiene (12 din totalul de 50), trimicrobiene (4 din totalul de 8), cât și în singurul rezultat cu 4 tulpini bacteriene (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. freundii*, streptococ beta-hemolitic de grup G). Aceste asocieri pot avea un impact important atât asupra rezistenței, cât și a toleranței la tratamentul antibiotic.

3. Studiul fenotipic al profilurilor de rezistență la antibiotice al tulpinilor bacteriene identificate

3.1. *Staphylococcus aureus*

În perioada ianuarie 2011- decembrie 2015, au fost identificate 121 tulpini de *S. aureus* în prelevate ce au provenit de la nivelul ulcerelor cutanate ale membrilor inferioare. Din total, aproximativ două treimi au fost sensibile la metilicină (78 tulpini, 64.4%). Mai mult, 7 tulpini au fost sensibile la penicilină, antibiotic care nu este recomandat în mod standard în infecțiile stafilococice, considerându-se ineficient datorită frecvenței crescute a rezistenței (Fig. 2).

Din totalul izolatelor *S. aureus*, aproape jumătate au prezentat un fenotip de multirezistență la antibiotice MDR, conform

asociația de două microorganisme (50, 22%) and in rather rare cases, the association of three bacterial species (8, 3.5%). In a single case of venous ulcer 4 different bacterial species were identified. The most common microbial association was that of *P. aeruginosa* and *S. aureus* in bimicrobial (12 out of the total of 50) and trimicrobial results (4 out of the total of 8), with a single result with 4 bacterial strains (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. freundii*, Group G beta-homolytic streptococcus). These associations can have an important impact on the resistance and on the tolerance of the antibiotic treatment as well.

3. The phenotypical study of the antibiotic resistance profiles of the identified bacterial strains

3.1. *Staphylococcus aureus*

In the time-frame January 2011- December 2015, 121 strains of *S. aureus* were identified in samples collected from cutaneous leg ulcer. Approximately two thirds of the total were methicillin sensitive (78 strains, 64.4%). Moreover, 7 strains were penicillin sensitive, antibiotic that is not commonly recommended in staphylococcal infections, since it is considered ineffective because of its frequent resistance (Fig. 2).

Almost half of the *S. aureus* isolates showed a multiresistance phenotype towards MDR antibiotics, according to the definition above (56 strains, 46.3%). 43 of these strains (35.53%) were

definiției de mai sus (56 tulpini, 46.3%). Din acestea, 43 de tulpini au fost rezistente la metilicilină (MRSA) (35.53% din total). Toate tulpinile de stafilococ metilicilino-sensibil, dar MDR (13 tulpini) au fost izolate de la pacienți diagnosticați cu ulcere venoase. Nu au existat tulpini XDR sau PDR (Figura nr. 4).

Aproximativ o jumătate din tulpinile de *S. aureus* (61 tulpini, 50.4%) a prezentat fenotipul de rezistență inductibilă la macrolide-lincosamide-streptogramine (MLS_{bi}), evidențiat prin testul D. Această rezistență încrucișată a fost exprimată la 69.7% din tulpinile de MRSA, mai intens comparativ cu tulpinile metilicilino-sensibile, unde s-a observat o frecvență de 39.7%.

MRSA au fost rezistente la alte 4 clase de antibiotice în următoarele proporții: aminoglicozide (9/43), fluorochinolone (8/43), tetraciclone (12/43), ansamicine (rifampicină) (6/43). Toate tulpinile MRSA au fost sensibile la inhibitorii căii folatilor (Cotrimoxazol/ Trimetoprim-Sulfametoxazol), glicopeptidele Vancomycin și Teicoplanin, precum și la oxazolidinone (Linezolid) (Figura nr. 5).

Analizând evoluția în timp a marker-ilor de rezistență la antibiotice a tulpinilor de *S. aureus*, s-a observat o frecvență de aproximativ 5 ori mai mare, a izolatelor MRSA în perioada mai 2014-decembrie 2015 (un an și jumătate), față de perioada ianuarie 2011-aprilie 2014 (trei ani și jumătate), cu un raport de 25 la 6 tulpini. Acest rezultat evidențiază o rezistență în creștere a tulpinilor *S. aureus*, la pacienții spitalizați în Clinica de Dermatologie, a Spitalului Universitar de Urgență "Elias", pe durata ultimilor doi ani (Fig. 3).

3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

În perioada ianuarie 2011- decembrie 2015, 51 tulpini de *P. aeruginosa* au fost identificate în prelevate de la nivelul ulcerelor cutanate ale membrilor inferioare, dintre care 42 au provenit de la nivelul ulcerelor venoase.

Evaluarea profilurilor de rezistență pentru tulpinile de *P. aeruginosa* a arătat că majoritatea au manifestat un nivel de rezistență scăzut la clasele de antibiotice testate. 18 tulpini bacteriene au prezentat rezistență la cel puțin un agent antimicrobian testat, pe când 33 de tulpini au fost sensibile la toate antibioticele testate. 4 tulpini *P.*

methicillin- resistant (MRSA) . All the methicillin sensitive staphylococcal strains were isolated from patients diagnosed with venous ulcers. No XDR or PDR strains were present (Fig. 4).

Almost half of the *S. aureus* strains (61 strains, 50.4%) showed a macrolide-lincosamide-streptogramine (MLS_{bi}) inducible resistance phenotype, highlighted through the D-test. This cross-resistance was expressed at 69.7% of the MRSA strains in a more intensive way in comparison to the methicillin-sensitive strains, where an occurrence rate of 39.7% was observed.

MRSA were resistant towards other 4 antibiotic classes as following: aminoglycosides (9/43), fluoroquinolones (8/43), tetracyclines (12/43), ansamycins (rifampicin) (6/43). All the MRSA strains were sensitive towards the inhibitors of the folate pathway (cotrimoxazol/ trimethoprim-sulfamethoxazole), the glycopeptides vancomycin and teicoplanin, and towards oxazolidones (linezolid) (Fig. 5).

By analysing the time evolution of the antibiotic resistance markers of the *S. aureus* strains, a 5 times higher occurrence of the MRSA isolates was observed from May 2014 to December 2015 (1.5 years) than from January 2011 to April 2014 (3.5 years), with a ratio of 25 to 6 strains. This result highlights an increasing resistance of the *S. aureus* strains at the patients hospitalized in the Clinic for Dermatology of the „Elias“ University Emergency Hospital during the last two years (Fig. 3).

3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

From January 2011 to December 2015, 51 *P. aeruginosa* strains were identified in samples collected from the cutaneous leg ulcers, of which 42 were venous ulcers.

The evaluation of the resistance profiles for *P. aeruginosa* strains demonstrated that most of them showed low resistance towards the tested antibiotic classes. 18 bacterial strains showed resistance towards at least one tested antimicrobial agent, whereas 33 strains were sensitive towards all the tested antibiotics. 4 *P. aeruginosa* strains isolated from venous ulcers showed an extended antibiotic resistance spectrum (XDR). These were resistant towards antibacterial agents from 6 antibiotic classes that are definity for this profile: aminoglycosides,

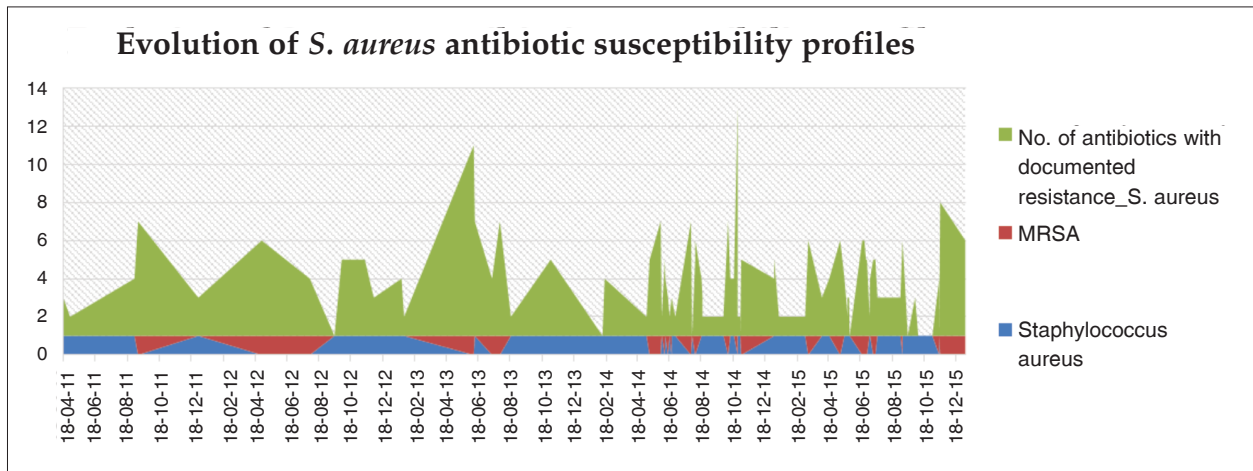


Fig 3. Evoluția în timp a marker-ilor de rezistență la antibiotice la tulpini de *S. aureus*.
Fig 3. Evolution of *S. aureus* antibiotic susceptibility profiles.

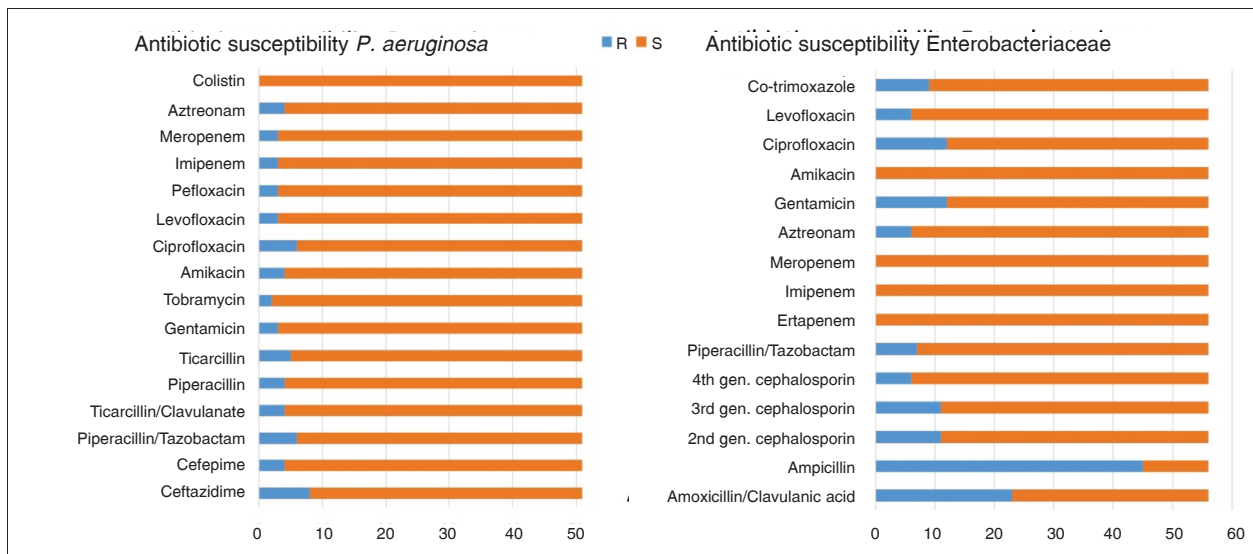


Fig. 4. Sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor de *P. aeruginosa* și Enterobacteriaceae izolate din ulcere cronice gambiere
Fig. 4. Antibiotic susceptibility for *P. aeruginosa* and Enterobacteriaceae strains isolated from chronic lower limb wounds

aeruginosa izolate de la nivelul ulcerelor venoase, au prezentat spectru extins de rezistență la antibiotice (XDR). Acestea au fost rezistente la agenți antibacterieni din 6 clase de antibiotice definitorii pentru acest profil: aminoglicozide, carbapeneme anti- *Pseudomonas*, cefalosporine anti- *Pseudomonas*, peniciline anti- *Pseudomonas* și inhibitori de β -lactamaze, monobactami, fluoroquinolone anti- *Pseudomonas* [6]. Singurul antibiotic testat față de care microorganismele și-au conservat sensibilitatea este Colistin (Fig. 4, Fig. 5).

anti- *Pseudomonas* carbapenems, anti- *Pseudomonas* cephalosporins, anti- *Pseudomonas* penicillins and β -lactamases, monobactams, anti- *Pseudomonas* fluoroquinolones [6]. The only antibiotic that was tested against the microorganisms that preserved their sensitivity is colistin (Fig. 4, Fig. 5).

It is very probable that the two *P. aeruginosa* XDR strains that were isolated during the hospital admission of a female patient diagnosed with venous ulcer are identical, given the fact that the patient's evolution under the antibiotic treatment was severe and lead to death by sepsis.

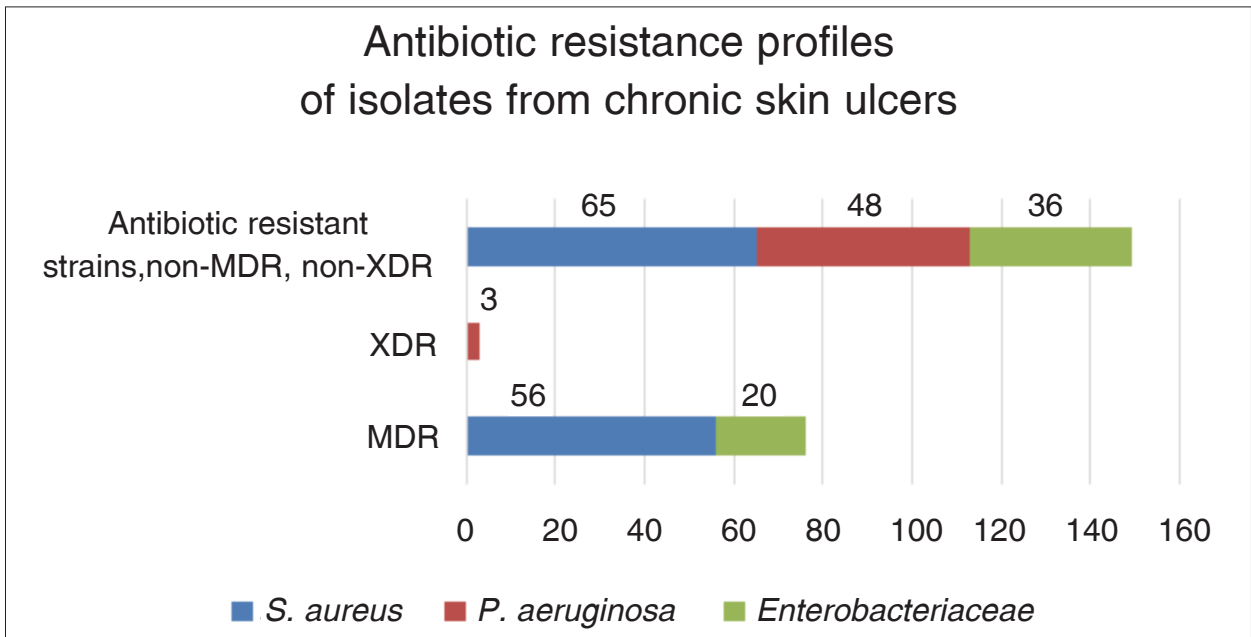


Fig. 5. Profilurile de rezistență la antibiotic ale tulpinilor izolate din ulcere cronice cutanate
Fig. 5. Antibiotic resistance profiles of isolates from chronic skin ulcers

Este foarte probabil ca cele două tulpini de *P. aeruginosa* XDR izolate pe durata internării la o pacientă diagnosticată cu ulcer venos să fie identice, important cu atât mai mult cu cât evoluția pacientei sub tratament antibiotic a fost severă, fiind soldată cu deces prin sepsis. S-a observat faptul că tulpinile izolate de la pacienți cu ulcere venoase au prezentat un grad mai înalt de rezistență la antibiotice comparativ cu plăgile cutanate de altă etiologie. Din ultima categorie, doar două tulpini au prezentat rezistență la Ceftazidim, respectiv Ceftazidim și Levofloxacin și, interesant, au provenit din ulcere de etiologie mixtă venoasă și arterială. Toate tulpinile testate au fost sensibile la Colistin.

Analizând evoluția în timp a profilurilor de rezistență pentru tulpinile de *P. aeruginosa*, la pacienți internați în aceeași Clinică de Dermatologie, s-a observat că nu a existat o creștere constantă a spectrului de rezistență la antibiotice, ci, periodic, cazuri izolate de tulpini cu rezistență înaltă (XDR) au determinat infecții la pacienții cu ulcere ale membrilor inferioare.

3.1.3.3. *Enterobacteriaceae*

În perioada ianuarie 2011- decembrie 2015, au fost identificate în prelevate de la nivelul

It was observed that the strains which were isolated from patients with venous ulcers showed a higher resistance towards antibiotics in comparison to the cutaneous plagues of different etiology. From the last category, only two strains showed resistance towards ceftazidime, ceftazidime plus levofloxacin, respectively, and more interesting, they were both collected from ulcers of mixed venous and arterial etiology. All the tested strains were sensitive towards colistin.

By analyzing the time evolution of the resistance profiles for the *P. aeruginosa* strains from the patients hospitalized in the same Clinic for Dermatology, it was noticed that there was no constant expansion of the antibiotic resistance spectrum. However, periodically isolated cases of high resistance (XDR) strains caused infections to the patients with leg ulcers.

3.1.3.3. *Enterobacteriaceae*

From January 2011 to December 2015, 56 strains collected from cutaneous leg ulcers and belonging to the *Enterobacteriaceae* family were identified, of which 40 were collected from venous ulcers. *E. coli* was most frequently isolated (22 strains, 39%), followed by *Klebsiella* spp. (14 strains, of which 13 strains were *K.*

ulcerelor cutanate ale membrelor inferioare, 56 tulpini care au aparținut familiei *Enterobacteriaceae* dintre care 40 au provenit de la nivelul ulcerelor venoase. Din total, *E.coli* a fost izolată cel mai frecvent (22 tulpini, 39%), urmată de *Klebsiella* spp. (14 tulpini, din care 13 tulpini au fost *K. pneumoniae*, 25%), *Proteus* spp. (9 tulpini, 16%), *Enterobacter* spp. și *Morganella morganii* în proporții egale (3.5%) și altele.

Majoritatea enterobacteriilor identificate au fost rezistente la Ampicilină (45 tulpini, 80.4%), urmată de rezistența la combinația peniciline și inhibitori de β -lactamaze, în particular, Amoxicilină-Clavulanat (41.1%). De asemenea microorganismele au prezentat rezistență la aminoglicozide (Gentamicină-12 tulpini), fluorochinolone (Ciprofloxacina-12 tulpini, Levofloxacina 6 tulpini), cefalosporine fără un spectru extins, de generația 2 (11 tulpini), cefalosporine cu spectru extins, de generații 3 și 4 (11, respectiv 6 tulpini), monobactami (Aztreonam- 6 tulpini) și inhibitori ai căii folatilor (Trimetoprim-Sulfametoxazol, 9 tulpini). Toate tulpinile studiate au fost sensibile la carbapeneme (Meropenem, Imipenem, Ertapenem) (Fig. 4).

Microorganismele producătoare de ESBL, cu un număr total de 9 tulpini, au aparținut, în ordinea descrescătoare a frecvenței, speciilor bacteriene *E.coli* (5 tulpini), *Proteus mirabilis* (2 tulpini), *K. pneumoniae* (1 tulpină) și *Morganella morganii* (1 tulpină). Microorganismele MDR, într-un număr total de 20 au aparținut, în ordinea descrescătoare a frecvenței, următoarelor specii bacteriene *E.coli* (11 tulpini), *K. pneumoniae* (4 tulpini), *Proteus mirabilis* (3 tulpini), *Morganella morganii* (1 tulpină) și *Enterobacter* spp. (1 tulpină).

La pacienții diagnosticați cu ulcere venoase s-a observat un număr de 3 ori mai mare al enterobacteriilor MDR, comparativ cu acelea care au avut drept origine ulcere ale membrelor inferioare de altă etiologie (15/5) (Fig. 5). Microorganismele MDR, într-un număr total de 20 au aparținut, în ordinea descrescătoare a frecvenței, următoarelor specii bacteriene *E.coli* (11 tulpini), *K. pneumoniae* (4 tulpini), *Proteus mirabilis* (3 tulpini), *Morganella morganii* (1 tulpină) și *Enterobacter* spp. (1 tulpină).

Din punctul de vedere al evoluției în timp a profilurilor de rezistență pentru tulpinile de

pneumoniae, 25%), *Proteus* spp. (9 strains, 16%), *Enterobacter* spp. and *Morganella morganii* in equal percentages (3.5%) and others.

Most of the identified enterobacteria were ampicillin-resistant (45 strains, 80.4%), followed by resistance towards the penicilline and β -lactamases inhibitors mixture, in particular, amoxicillin-clavulanate (41.1%). The microorganisms also showed resistance towards aminoglycosides (gentamicin- 12 strains), fluoroquinolones (ciprofloxacin- 12 strains, levofloxacin- 6 strains), cephalosporines without an extended spectrum of second generation (11 strains), extended- spectrum cephalosporines of third and fourth generation (11 and 6 strains, respectively), monobactams (aztreonam- 6 strains) and folate pathway inhibitors (trimetoprim-sulfamethoxazole, 9 strains). All the studied strains were sensitive towards carbapenems (meropenem, imipenem, ertapenem) (Figure 4).

ESBL producing microorganisms with a total of 9 strains belonged to the following bacterial species: *E.coli* (5 strains), *Proteus mirabilis* (2 strains), *K. pneumoniae* (1 strain) and *Morganella morganii* (1 strain). The MDR microorganisms, in totally 20 strains, belonged to the following bacterial species: *E.coli* (11 strains), *K. pneumoniae* (4 strains), *Proteus mirabilis* (3 strains), *Morganella morganii* (1 strain) and *Enterobacter* spp. (1 strain).

At patients diagnosed with venous ulcers, 3 times more MDR enterobacteria were observed than at the ones with leg ulcers of different etiology (15/5) (Fig. 5). The MDR microorganisms, in totally 20 strains, belonged to the following bacterial species: *E.coli* (11 strains), *K. pneumoniae* (4 strains), *Proteus mirabilis* (3 strains), *Morganella morganii* (1 strain) and *Enterobacter* spp. (1 strain).

From the time evolution perspective of the *Enterobacteriaceae* strains resistance profiles at the patients hospitalized in the same Clinic for Dermatology, it was noticed a relatively uniform time distribution of the MDR strains, except for the period July 2014- July 2015, when such microorganisms were not isolated from leg ulcers. In this study, no information regarding the changes in the treatment schemes of these patients or in the antiseptic and asepsis protocol followed in that period was analysed, although

Enterobacteriaceae, la pacienții internați în aceeași Clinică de Dermatologie, s-a observat distribuția relativ uniformă în timp a tulpinilor MDR, cu excepția perioadei iulie 2014- iulie 2015, când nu au existat astfel de microorganisme izolate de la nivelul ulcerelor membrelor inferioare. În acest studiu nu au fost analizate informații cu privire la modificarea schemelor de tratament la acești pacienți sau a protocolului de asepsie și antisepsie utilizat din acea perioadă, factori care ar putea influența evoluția microbiologică a pacienților.

Discuții

Patologia venoasă a reprezentat cauza majoritară a ulcerelor membrelor inferioare.

Pacienții au avut adeseori recurențe, ceea ce evidențiază atât impactul individual al ulcerelor cronice, care prin internările repetate în spital și întreruperea activității profesionale afectează semnificativ calitatea vieții, cât și impactul economic important asupra sistemului sanitar pe care îl determină recidivele sau complicațiile ulcerelor membrelor inferioare.

În ceea ce privește perioada anului în care s-au internat pacienții incluși în studiu, a existat o predominanță în sezonul cald. Această fluctuație dependentă de anotimp este confirmată de observații din literatura de specialitate în ceea ce privește frecvența semnificativ mai mare a dezvoltării ulcerelor venoase în perioada aprilie-octombrie [7]. Mai mult a fost sugerată și o evoluție diferită în funcție de anotimpul în care a debutat boala, mai severă la pacienții care au dezvoltat ulcere venoase vara sau iarna și o vindecare mai rapidă la cei care s-au îmbolnăvit primăvara sau toamna [7]. Aceste variații sezoniere pot fi explicate atât de agravarea insuficienței venoase în sezonul cald, cât și de modificarea răspunsului imun în funcție de anotimp [7]. Alți factori implicați sunt reprezentați de expunerea crescută în sezonul cald la traumatisme (lovituri, înțepături de insecte etc.) și la agenți infecțioși (îmbrăcămintea care nu protejează membrele inferioare).

Distribuția pacienților în funcție de sex a fost foarte echilibrată cu un raport aproximativ egal sex feminin/sex masculin. Aproximativ o treime din pacienți au avut vârsta mai mică de 62 de ani, fiind în continuare activi din punct de vedere

these factors could have influenced the microbiological evolution of the patients.

Discussion

The venous pathology represented the major cause of leg ulcers.

The patients showed often recurrences, which highlights both the individual impact of the chronic ulcers, that through rehospitalization and interruption of the professional activities significantly affect the life quality, and the important economic impact on the healthcare system determined by recurrences or by the complications of the leg ulcers.

Regarding the season when the hospitalizations of the patients included in this study took place, there was a higher occurrence in the warm season. This season dependent fluctuation is confirmed by observations included in the scientific literature, that highlight a significantly higher frequency of the venous ulcers development from April to October [7]. Moreover, a different evolution depending on the season in which the disease started was also suggested: more severe for the patients whose venous ulcers started in Summer and in Winter and a faster healing of the patients whose disease started in Spring and in Autumn [7]. These season variations can be explained both through the aggravation of the venous insufficiency during the warm season, and through the change in the immune system depending on the season [7]. Other factors are represented by the increased exposure towards traumatism (hits, insect bites etc.) and towards infectious agents (the clothing that does not protect the legs) during the warm season.

The patients distribution according to the gender was balanced with an approximately equal female to male ratio. Approximately a third of the patients were younger than 62 years old, all professionally active, fact that highlights the important impact of venous ulcers on life quality.

The scientific literature comprises numerous studies on cutaneous samples, noticing variable incidences of the different isolated bacterial species. However, these are very similar to the present study.

profesional, ceea ce evidențiază impactul important pe care ulcerul venoasă îl are asupra calității vieții.

În literatura de specialitate există numeroase studii care au observat prelevatele de la nivelul ulcerelor cutanate, observându-se incidențe variabile ale diferitor specii bacteriene izolate, dar asemănătoare cu rezultatele prezentului studiu.

Într-un studiu retrospectiv din Italia, coordonat de Bessa LJ și colab. (2015), s-au izolat din 312 prelevate de la nivelul plăgilor de diverse etiologii 28 de specii bacteriene, dintre care cele mai frecvente au fost *S. aureus* (37%), urmată de *P. aeruginosa* (17%) și de enterobacteriile *Proteus mirabilis* (10%) și *E. coli* (6%). În aproximativ un sfert din rezultate a fost depistată infecția polimicrobiană, cea mai frecventă asociere fiind *S. aureus* și *P. aeruginosa* [8].

Într-un studiu din Polonia, în care s-au analizat rezultatele a 173 examene microbiologice ale secrețiilor ulcerelor membrelor inferioare, efectuate pe o durată de 5 ani (1998-2002), *S. aureus* a fost de asemenea principalul contaminant al leziunilor cutanate, în mai mult de jumătate din cazuri (56.57%), urmat de *P. aeruginosa* (37.14%), de *Enterococcus faecalis* (22.29%) și enterobacteriile *Proteus mirabilis* (13.71%) și *E. coli* (12.57%) [9]. A fost raportată și prezența fungilor *Candida* spp. în 6.86% din cazuri [9].

În România, într-un studiu prospectiv, din perioada iulie 2013- aprilie 2014, Georgescu și colab. (2014) au identificat speciile bacteriene din prelevate de la nivelul ulcerelor cronice cutanate, observând o predominanță a tulpinilor de *S. aureus* (14 tulpini), *Enterococcus faecalis* (8 tulpini) și a speciilor de stafilococi coagulazo-negativi (11 tulpini) [10]. *P. aeruginosa* a fost identificată în 4% din prelevate [10]. Lotul studiat a fost unul redus, de 40 de pacienți, ceea ce poate explica ordinea diferită în funcție de frecvență a speciilor bacteriene.

Într-o altă clinică de Dermatologie din București, s-a efectuat un studiu retrospectiv care a inclus un număr de 259 de rezultate ale examenelor bacteriologice ale prelevatelor de la nivelul ulcerelor cutanate, în perioada ianuarie 2009 - decembrie 2011 [3]. S-a evidențiat următoarea distribuție a speciilor bacteriene

Într-un studiu retrospectiv realizat în Italia sub coordonarea lui Bessa LJ et al. (2015), din 312 probe colectate din plăgi de diferite etiologii, 28 de specii bacteriene au fost izolate, dintre care cele mai frecvente au fost următoarele: *S. aureus* (37%), *P. aeruginosa* (17%) și enterobacteriile *Proteus mirabilis* (10%) și *E. coli* (6%). În aproape un sfert din rezultate a fost identificată infecția polimicrobiană, cu *S. aureus* și *P. aeruginosa* ca cea mai comună asociație [8].

Într-un studiu din Polonia, în care au fost analizate rezultatele a 173 de examinări microbiologice ale secrețiilor din plăgi, realizate pe o perioadă de 5 ani (1998-2002), *S. aureus* a fost de asemenea principalul contaminant al leziunilor cutanate în mai mult de jumătate din cazuri (56.57%), urmat de *P. aeruginosa* (37.14%), *Enterococcus faecalis* (22.29%) și enterobacteriile *Proteus mirabilis* (13.71%) și *E. coli* (12.57%) [9]. Prezența *Candida* spp. a fost raportată în 6.86% din cazuri [9].

Într-un studiu retrospectiv realizat în România în perioada iulie 2013 - aprilie 2014, Georgescu et al. (2014) au identificat speciile bacteriene din probele colectate din plăgi cutanate cronice, observând o prevalență mai mare a *S. aureus* (14 tulpini), *Enterococcus faecalis* (8 tulpini) și a stafilococilor coagulazo-negativi (11 tulpini) [10]. *P. aeruginosa* a fost identificată în 4% din probe [10]. Lotul studiat a fost unul mic, cu doar 40 de pacienți, ceea ce poate explica ordinea diferită a speciilor bacteriene în funcție de frecvență.

Un studiu retrospectiv care a inclus 259 de rezultate ale examenelor bacteriologice ale prelevatelor din plăgi cutanate cronice, realizat în București în perioada ianuarie 2009 - decembrie 2011 [3], a evidențiat următoarea distribuție a speciilor bacteriene: *S. aureus* (55 pacienți, 26.3%), urmat de enterobacteriile *Enterobacter* spp. (17.2%), *Proteus* spp. (15.8%), *E. coli* (14.8%) și *P. aeruginosa* (15.3%) [3]. Au fost raportate doar 2 cazuri de *Enterococcus* spp. și un caz de *Candida albicans* la un pacient suferind de diabet [3]. Nu există date recente care să permită observarea evoluției microbiologice a pacienților cu plăgi cutanate cronice din perioada ianuarie 2012 - decembrie 2015.

identificate: *S. aureus* (55 pacienți, 26.3%), urmat de enterobacteriile *Enterobacter* spp.(17.2%), *Proteus* spp. (15.8%), *E. coli* (14.8%) și de *P. aeruginosa* (15.3%) [3]. Au existat doar 2 cazuri cu *Enterococcus* spp. și un singur caz de infecție *Candida albicans* la un pacient diabetic [3]. Nu există date mai recente prin care să fie monitorizată evoluția microbiologică a pacienților cu ulcere cutanate în perioada ianuarie 2012- decembrie 2015.

Din punctul de vedere al depistării infecțiilor polimicrobiene la nivelul ulcerelor venoase, s-a observat faptul că acestea au fost mai frecvente în lotul de interes, comparativ cu ulceretele membrilor inferioare de altă etiologie, cea mai frecvent întâlnită fiind asocierea speciilor *P. aeruginosa* și *S. aureus*.

În literatura de specialitate aceasta este raportată drept cea mai frecventă infecție polimicrobiană a ulcerelor cronice [11]. DeLeon S și colab. (2014) au observat o creștere a gradului de toleranță la antibiotice al coinfecției *P. aeruginosa* și *S. aureus*, atât *in vitro* prin cultivarea concomitentă planctonică, cât și *in vivo* prin testarea într-un model de plagă conceput de autori[11]. Mai mult, această infecție polimicrobiană poate să întârzie vindecarea plăgilor cutanate, prin reducerea producției factorului de creștere keratinocitar 1 (keratinocyte growth factor 1- KGF1) [12,13]. Există date în literatură care sugerează o creștere a virulenței *S. aureus* în prezența *P. aeruginosa*, *in vitro*, prin exprimarea genelor *pvl* și *hla*, fapt care ar putea confirma corelația observată *in vivo* dintre patogenitatea bacteriană și cronicitatea ulcerelor infectate [12,13].

S-a observat un fenotip de rezistență crescut la antibiotice al tulpinilor bacteriene izolate de la nivelul ulcerelor venoase. Aproximativ jumătate din tulpinile de *S. aureus*, identificate la pacienții cu ulcere venoase, au prezentat un fenotip de multirezistență la antibiotice MDR, și o treime rezistență la meticilină (MRSA). Deși evaluarea profilurilor de rezistență pentru tulpinile de *P. aeruginosa* a arătat că majoritatea au manifestat un nivel de rezistență scăzut la clasele de antibiotice testate, 4 tulpini de *P. aeruginosa*, izolate de la nivelul ulcerelor venoase, au prezentat spectru extins de rezistență la antibiotice (XDR). Mai mult, o treime din

With respect to discovering the polymicrobial infections in venous ulcers, it was noticed that these were more frequent in the lot of interest than in the leg ulcers of different etiology, having *P. aeruginosa* and *S. aureus* as the most common association.

The scientific literature also reports this as the most common polymicrobial infection of the chronic ulcers [11]. DeLeon S et al. (2014) noticed an antibiotic tolerance increase of the co-infection *P. aeruginosa* and *S. aureus*, both *in vitro*, by simultaneous plankton culture, and *in vivo* by tests in a plague model designed by the authors [11]. Moreover, this polymicrobial infection can delay the healing of the cutaneous plagues by decreasing the production of the keratinocyte growth factor 1- KGF1 [12,13]. There is literature data that suggests an increase of the *S. aureus* virulence in the presence of *P. aeruginosa*, *in vitro*, by expressing the *pvl* and *hla* genes, which could confirm the correlation observed *in vivo* between the bacterial pathogenicity and the chronicity of the infected ulcers [12,13].

An increased antibiotic resistance phenotype was observed at the strains isolated from the venous ulcers. Almost half of the *S. aureus* strains that were identified at patients with venous ulcers, showed an antibiotic multiresistance phenotype (MDR) and a third resistance towards methicillin (MRSA). Although the evaluation of the resistance profiles for *P. aeruginosa* strains showed that most of them had a low resistance towards the tested antibiotic classes, 4 *P. aeruginosa* strains, that were isolated from venous ulcers, showed an extended antibiotic resistance spectrum (XDR). Moreover, a third of the *Enterobacteriaceae* strains identified at hospitalized patients were MDR. All these results raise the alarm about the danger of spreading of these bacteria inside the hospitals, with severe implications both on the health of the immunosuppressed patients who could develop acute infections, and on the epidemiological level, through the nosocomial spread of the resistance.

From the point of view of the evolution of the microorganisms resistance, we noticed an increasing general resistance of the *S. aureus* strains at patients diagnosed with leg ulcer

tulpinile de *Enterobacteriaceae* identificate la pacienți spitalizați au fost MDR. Toate aceste rezultate ridică un semnal de alarmă asupra pericolului de răspândire în mediu spitalicesc al acestor bacterii, cu implicații grave atât asupra stării de sănătate a pacienților imunosupresați, care ar putea dezvolta infecții severe, cât și din punct de vedere epidemiologic, prin răspândirea nosocomială a rezistenței.

Din punctul de vedere al evoluției rezistenței microorganismelor, am observat o rezistență generală în creștere a tulpinilor *S. aureus*, la pacienții diagnosticați cu ulcere ale membrilor inferioare, spitalizați în Clinica de Dermatologie, a Spitalului Universitar de Urgență "Elias", pe durata ultimelor 20 luni de studiu.

Nu a existat o creștere constantă a spectrului de rezistență la antibiotice al *P. aeruginosa*, ci, periodic, cazuri izolate de tulpini cu rezistență înaltă (XDR) au determinat infecții la pacienții cu ulcere ale membrilor inferioare. Aceasta ar putea sugera absența factorului nozocomial în dezvoltarea rezistenței.

Prin analiza comparativă a prelevatelor de la nivelul plăgilor cutanate, în mediu spitalicesc versus ambulatoriu, un grup de cercetători din Serbia a observat recent faptul că nu au existat diferențe semnificative în ceea ce privește numărul tulpinilor de *P. aeruginosa* izolate și nici în profilul acestora de rezistență la antibiotice [14], ceea ce corespunde observațiilor noastre.

Analiza din punctul de vedere al rezistenței la antibiotice a izolatelor de *P. aeruginosa*, pe o durată de 10 ani, într-un spital din Portugalia a relevat o scădere în timp a frecvenței tulpinilor MDR și o creștere a celor XDR, proporțiile din fiecare tip fiind de 39.9%, respectiv 2.9% [15].

Conform celui mai recent raport ECDC, în România, ponderea tulpinilor rezistente la antibiotice, din totalul tulpinilor de *P. aeruginosa* izolate din sânge și lichid cefalorahidian, depășește valoarea de 50%, pentru principalele clase de substanțe antimicrobiene [4].

În studiul nostru nu au fost depistate *P. aeruginosa* MDR, iar microorganismele XDR au fost identificate în ultimii 3 ani, perioada ianuarie 2013- septembrie 2015, reflectând, posibil, o asociere cu incidența generală în creștere a tulpinilor bacteriene extensiv rezistente.

hospitalized at the Clinic for Dermatology of the „Elias“ University Emergency Hospital over the last 20 months of the study.

There was no constant enlargement of the antibiotic resistance spectrum of *P. aeruginosa*, but periodically, isolated cases of high resistance strains (XDR) caused infections at the patients with leg ulcers. This can suggest the absence of the nosocomial factor on the development of the resistance.

Through the comparative analysis of the samples from the cutaneous plagues in hospitals versus ambulatory care, a group of researchers in Serbia observed recently that there are no significant differences with respect to the number of *P. aeruginosa* strains isolated, nor in their antibiotic resistance profile [14], which corresponds to our observations.

The analysis with respect to antibiotic resistance of the isolated strains of *P. aeruginosa* during 10 years in a hospital in Portugal revealed a decrease in time of the MDR incidences (representing 39.9%) and an increase of the XDR (representing 2.9%) [15].

According to the most recent ECDC report, the percentage of the antibiotic resistant strains from all the *P. aeruginosa* strains isolated from blood and cerebrospinal fluid, is above 50% for the main classes of antimicrobial substances [4].

In the present study *P. aeruginosa* MDR were not identified, whereas the XDR microorganisms were identified in the last 3 years, from January 2013 to September 2015, revealing a possible association with the increasing general incidence of the extensively resistant bacterial strains.

Joseph NM et al. (2013) observed the lowering incidence of the *P. aeruginosa* resistant strains, including MDR, isolated from the cutaneous plagues of different etiologies at the hospitalized patients from June 2007 to June 2012 from 37.9% to 23.7%. There are no more recent data to observe the microbiological evolution in 2012-2015 [16].

A decreasing resistance of the *Enterobacteriaceae* strains was noticed at the patients diagnosed with leg ulcers who were hospitalized in the Clinic for Dermatology of the „Elias“ University Emergency Hospital during the last 18 months of the study.

Joseph NM și colab. (2013) au observat o scădere a frecvenței tulpinilor rezistente *P. aeruginosa*, inclusiv MDR, izolate de la nivelul plăgilor cutanate de diferite etiologii, la pacienți internați în spital, în perioada iunie 2007- iunie 2012, de la 37.9% la 23.7%. Nu există date mai recente pentru a observa evoluția microbiologică în perioada 2012-2015 [16].

S-a observat o rezistență în scădere a tulpinilor de *Enterobacteriaceae*, la pacienții diagnosticați cu ulcere ale membrelor inferioare, spitalizați în Clinica de Dermatologie, a Spitalului Universitar de Urgență "Elias", pe durata ultimelor 18 luni de studiu.

Concluzii

Lipsa datelor din țara noastră, evidențiază necesitatea studierii aprofundate a compoziției microbiotei ulcerelor cutanate, pe un lot mai mare de pacienți români.

Patogeneza infecțiilor de la nivelul ulcerelor cronice este multifactorială prin implicarea în colonizarea și invazia microbiană a unui număr mare de factori de virulență parietali sau extracelulari. Elucidarea mecanismelor patogenice, la nivel molecular este crucială în lupta împotriva agenților bacterieni care determină infecții cronice și împiedică procesul fiziologic de vindecare al ulcerelor cutanate. Ținta finală este aceea de a descoperi noi agenți terapeutici care să determine evoluția favorabilă a patologiei pacienților.

Rezultatele acestui studiu evidențiază importanța monitorizării sensibilității la antibiotice, care permite administrarea unui tratament adecvat, dar și controlul epidemiologic al infecțiilor nozocomiale.

Mențiuni

Această lucrare este parțial sprijinită de către Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București, România, prin bursa de cercetare „Proiecte Tineri Cercetători”. Autorii ar dori să mulțumească Dr. Marilena Filipov și Dr. Mariana Buzea pentru efectuarea testelor microbiologice.

Conclusions

The lack of data from our country highlights the need of an in-depth study of the microbiota composition of the cutaneous ulcers on more patients.

The pathogenicity of the infections in chronic ulcers is multifactorial by implying the microbial colonization and invasion of a high number of parietal or extracellular virulence factors. Clarifying the pathogenic mechanisms at the molecular level is critical in the battle against the bacterial agents that cause chronic infections and hinder the physiological healing process of the cutaneous ulcers. The final target is the discovery of new therapeutic agents that can favorably influence the evolution of the patient pathogenicity.

The results of this study highlight the importance of monitoring the antibiotic sensitivity, which allows the administration of an adequate treatment and the epidemiological control of the nosocomial infections.

Acknowledgements

This work is partially supported by „Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania through the research grant „Young Researchers Projects”. The authors would like to thank Dr. Marilena Filipov and Dr. Mariana Buzea for performing the microbiological tests.

Bibliografie/Bibliography

1. Rhoads D D, Cox S B, Rees E Jet al. Clinical identification of bacteria in human chronic wound infections: culturing vs. 16S ribosomal DNA sequencing. *BMC Infect Dis* 2012; p 321.
2. Mihai M M, Holban A M, Giurcaneanu Cet al. Identification and phenotypic characterization of the most frequent bacterial etiologies in chronic skin ulcers. *Rom J Morphol Embryol* 2014; p 1401-1408.
3. Salavastru C M, Nedelcu L E, Tiplica G S. Management of leg ulcers in patients with chronic venous insufficiency: the experience of a Dermatology Clinic in Bucharest, Romania. *Dermatol Ther* 2012; p 304-313.
4. Control. E C f D P a. *Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. Stockholm: ECDC; 2015.* Retrieved from
5. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. USA: CLSI: M100-S16. Wayne, PA; 2006. p.
6. Magiorakos A P, Srinivasan A, Carey R Bet al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; p 268-281.
7. Simka M. Seasonal variations in the onset and healing rates of venous leg ulcers. *Phlebology* 2010; p 29-34.
8. Bessa L J, Fazii P, Di Giulio Met al. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *Int Wound J* 2015; p 47-52.
9. Zmudzinska M, Czarnicka-Operacz M, Silny W. Analysis of antibiotic susceptibility and resistance of leg ulcer bacterial flora in patients hospitalized at Dermatology Department, Poznan University Hospital. *Acta Dermatovenerol Croat* 2005; p 173-176.
10. Georgescu M M L, Trifu V, Marinescu V, Toropoc I, Chirita DA, Poenaru M, Darmanescu SM, Costache D, Chifiriuc MC. The profile of chronic skin wound microbiota in hospitalized dermatology patients. *Biointerface Res. Appl. Chem* 2014; p 6.
11. DeLeon S, Clinton A, Fowler Het al. Synergistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an in vitro wound model. *Infect Immun* 2014; p 4718-4728.
12. Gjodsbol K, Christensen J J, Karlsmark Tet al. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J* 2006; p 225-231.
13. Bertesteanu S, Triaridis S, Stankovic Met al. Polymicrobial wound infections: pathophysiology and current therapeutic approaches. *Int J Pharm* 2014; p 119-126.
14. Nedeljkovic N S, Tiodorovic B, Kocic Bet al. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes and resistance to antibiotics from wound swabs. *Vojnosanit Pregl* 2015; p 996-1003.
15. Pereira S G, Marques M, Pereira Jet al. Multidrug and extensive drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a Portuguese central hospital: 10-year survey. *Microb Drug Resist* 2015; p 194-200.
16. Joseph N M, Devi S, Shashikala Pet al. Changing Trend in the Antibiotic Resistance Pattern of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Wound Swabs of Out-Patients and in-Patients of a Tertiary Care Hospital. *J Clin Diagn Res* 2013; p 2170-2172.

Conflict de interes
NEDECLARATE

Conflict of interest
NONE DECLARED

Adresa de corespondență:

Mara Mădălina Mihai, Str. Dionisie Lupu nr. 37, București, Sector 2,
CP 020021, Romania; Tel.: 0040213180719; Fax: 0040213180730
E-mail: drmaramihai@gmail.com

Correspondance address:

Mara Mădălina Mihai, Dionysius Lupu Street. 37, Bucharest, District 2
CP 020021, Romania; Tel.: 0040213180719; Fax: 0040213180730
E-mail: drmaramihai@gmail.com