

MECANISME DE REZISTENȚĂ LA ANTIMICROBIENE CARACTERISTICE BACILILOR GRAM-NEGATIVI DE IMPORTANȚĂ CLINICĂ

CZU: 615.281.015.8:616-07

DOI: <https://doi.org/10.52673/18570461.22.4-67.04>Doctor în științe medicale, conferențiar universitar **Greta BĂLAN**^{1,2}E-mail: greta.balan@usmf.mdORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3704-3584>Asistent universitar **Olga SOFRONIE**^{1,2}E-mail: olga.sofronie@gmail.comORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1783-148X>**Irina-Felicia RUSU**¹E-mail: irinafelicia26.rusu@gmail.comORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3381-8514>Cercetător științific **Livia ȚAPU**^{1,2}E-mail: liviatapu@gmail.comORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4424-3501>Doctor în științe medicale, conferențiar cercetător **Olga BURDUNIUC**^{1,2}E-mail: olga.burduniuc@ansp.gov.mdORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6944-0800>¹Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”²Agencia Națională pentru Sănătate Publică

ANTIMICROBIAL RESISTANCE MECHANISMS CHARACTERISTIC OF CLINICALLY IMPORTANT GRAM-NEGATIVE BACILLI

Summary. Antimicrobial resistance is a global public health issue and one of the most serious threats to the mankind today. Some bacterial strains have acquired resistance to most antimicrobial drugs and, therefore, new antibacterial agents that would overcome resistant strains are needed. In 2017, the World Health Organization published a list of priority antimicrobial-resistant pathogens. Most of these agents are gram-negative bacteria. Due to their structure, the gram-negative bacteria are more resistant to antimicrobials than gram-positive bacteria and cause significant morbidity and mortality worldwide. The main resistance mechanisms are: restricted drug absorption, modification of the target attack, inactivation of the antimicrobial drug by production of hydrolyzing enzymes and active drug efflux. These mechanisms may be innate or acquired by microorganisms, and understanding those mechanisms may create new treatment options for infectious pathology and may contribute to the development of new antimicrobial drugs that counter the microbial attempts to become resistant.

Keywords: gram-negative bacilli, resistance mechanisms, antimicrobials, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*.

Rezumat. Rezistența la antimicrobiene reprezintă o problemă globală de sănătate publică și una dintre cele mai grave amenințări cu care se confruntă astăzi omenirea. Unele tulpini bacteriene au dobândit rezistență la majoritatea preparatelor antimicrobiene și, prin urmare, sunt necesari noi agenți antibacterieni care ar acționa activ asupra tulpinilor rezistente. În 2017, Organizația Mondială a Sănătății a publicat o listă de agenți patogeni prioritari rezistenți la antimicrobiene. Majoritatea acestor agenți constituie bacterii gram-negative. Datorită structurii lor, bacteriile gram-negative sunt mai rezistente la antimicrobiene decât bacteriile gram-pozitive și provoacă morbiditate și mortalitate semnificativă la nivel mondial. Principalele mecanisme de rezistență sunt: limitarea absorbției unui medicament, modificarea țintei de atac, inactivarea preparatului antimicrobian prin producerea de enzime hidrolizante și efluxul activ al unui medicament. Aceste mecanisme pot fi native sau dobândite de către microorganisme, iar înțelegerea mecanismelor respective poate crea noi opțiuni de tratament al patologiei infecțioase și contribui la dezvoltarea de noi preparate antimicrobiene care să reziste încercărilor microorganismelor de a deveni rezistente.

Cuvinte-cheie: bacili gram-negativi, mecanisme de rezistență, antimicrobiene, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*.

INTRODUCERE

De la descoperirea penicilinei de către Fleming în 1929, a fost obținut un număr mare de agenți antibacterieni care au avut un impact enorm atât asupra sănătății umane, cât și asupra ratelor de mortalitate din întreaga lume [1]. Utilizarea iresponsabilă și neargumentată a antimicrobienei a dus la dezvoltarea unor tulpini microbiene rezistente [2].

Povara rezistenței la antimicrobiene a bacililor gram-negativi (BGN) reprezintă o provocare zilnică pentru medicii din terapia intensivă. BGN sunt responsabili pentru 45-70 % dintre pneumoniile asociate ventilației pulmonare [3], precum și pentru 20-30 % dintre infecțiile de flux sanguin asociate cateterizării venoase [4]. Actualmente sunt raportate rate alarmante de rezistență la nivel mondial, iar tendințele în creștere pot stârni îngrijorări pentru următorii ani. Limitată, până la începutul secolului, aproape exclusiv la unitățile spitalicești, această problemă se extinde tot mai mult pentru pacienții cu infecții asociate asistenței medicale și chiar dobândite în comunitate [5]. Enterobacteriaceae și bacilii gram-negativi nefermentativi (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*) constituie cea mai mare provocare în acest sens [6; 7; 8]. Astfel, este foarte important de a elucidă mecanismele de rezistență și de a determina factorii de mediu care promovează diseminarea acestora.

MATERIALE ȘI METODE

S-a efectuat analiza publicațiilor în PubMed în perioada ianuarie-decembrie 2022 referitor la aspectele teoretice privind mecanismele de rezistență la antimicrobiene caracteristice pentru bacilii gram-negativi de interes medical, prin utilizarea termenilor „Mecanisme de rezistență”, „Gene de rezistență”, „Bacili gram-negativi”, „Preparate antimicrobiene”, „*Escherichia coli*”, „*Klebsiella pneumoniae*”, „*Pseudomonas aeruginosa*”, „*Acinetobacter baumannii*”. Din numărul total de articole găsite (87), au fost selectate și analizate 52 de articole de sinteză și meta-analiză ce reflectă mecanismele de rezistență la antimicrobiene a bacililor gram-negativi. Nu au fost stabilite limite de limbă, dar au fost prioritare articolele în limba engleză, publicate după anul 2012.

MECANISMELE DE REZISTENȚĂ CARACTERISTICE PENTRU *ESHERICHIA COLI* ȘI *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Tulpinile de *Escherichia coli* rezistente la antimicrobiene sunt responsabile de provocarea a peste 306 000 de infecții și 9 828 de decese, depășind atât

infecțiile provocate de *S. aureus*, cât și *P. aeruginosa* luate împreună. Dintre acestea, peste 297 000 de infecții și 9 000 de decese au fost cauzate de tulpinile de *E. coli* rezistente la cefalosporine de generația a III-a. În plus, alte 7 156 de infecții și 621 de decese au fost cauzate de tulpini de *E. coli* rezistente la colistină și alte 2 619 infecții și 141 de decese au fost cauzate de tulpini rezistente la carbapeneme [9].

Tulpinile de *E. coli* produc o gamă largă de β -lactamaze, inclusiv β -lactamaze cu spectru extins (BLSE), AmpC și carbapenemaze din clasele A, B și D. Primele BLSE identificate la tulpinile de *E. coli* în anii 1980 au fost variantele SHV și TEM. Cu toate acestea, distribuția BLSE la *E. coli* s-a schimbat de atunci, varianta predominantă identificată devenind CTX-M. În prezent, gena BLSE, cel mai frecvent identificată la izolatelor umane de *E. coli*, este *bla*CTX-M-15. Infecțiile cu *E. coli* producătoare de BLSE sunt larg răspândite, tulpinile BLSE pozitive au reprezentat 88,6 % dintre cele 297 000 de infecții anuale cauzate de tulpinile de *E. coli* rezistente la cefalosporine de generația a III-a [5; 9].

Un alt grup de β -lactamaze de interes pentru *E. coli* sunt β -lactamazele AmpC. AmpC β -lactamaza a fost prima penicilază identificată și raportată în anul 1940. Spre deosebire de majoritatea enterobacteriilor, *E. coli* exprimă constitutiv niveluri scăzute de β -lactamaze AmpC, deoarece regulatorul transcripțional al genei *ampC* – *AmpR* –, nu este prezent la *E. coli*. Reglarea AmpC are loc prin mecanismele promotor și atenuator. Hiperproducția de AmpC se realizează după mutații în regiunile promotor sau atenuator ale genei *ampC*, în baza achiziției unui promotor mai puternic prin elemente de inserție de la alte specii bacteriene și prin prezența unor copii suplimentare ale genei *ampC*. În plus, au fost găsite și enzime AmpC mediate plasmidic, dar care sunt mai puțin frecvente decât omologii lor codificați cromozomial [10].

Creșterea rezistenței la cefalosporine de generația a III-a, secundară prevalenței crescânde a tulpinilor producătoare de BLSE și AmpC, a condus la utilizarea sporită a carbapenemilor în infecțiile cu *E. coli*. În mod inevitabil, acest fenomen a provocat apariția tulpinilor rezistente la carbapeneme. Deși în unele cazuri rezistență la carbapeneme poate apărea datorită pompelor de eflux sau prin combinarea mutațiilor porinei cu supraexprimarea AmpC sau BLSE, în majoritatea cazurilor rezistența se datorează producerii de carbapenemaze. Cele mai răspândite variante de carbapenemază la Enterobacteriaceae sunt carbapenemazele KPC din clasa A, NDM, VIM și IMP din clasa B și OXA-48 din clasa D. Printre bacteriile *E. coli*, carbapenemazele cele mai răspândite sunt NDM și OXA-48. Subliniem că OXA-48 nu manifestă o activitate in-

trinsecă împotriva cefalosporinelor cu spectru extins, cum ar fi ceftazidima și cefepima. Acest fapt are totuși o semnificație clinică mică, deoarece marea majoritate a izolatelor sunt rezistente la antibioticele respective prin producerea de BLSE. Numărul infecțiilor cu *E. coli* rezistente la carbapeneme în UE este în creștere, de la 543 de cazuri în 2007 la 616 de cazuri în 2015, în timp ce mortalitatea atribuită a crescut de aproape cinci ori, de la 29,2 decese în 2007 la 141 de decese în 2015 [5; 7; 11; 12].

Mecanismele de rezistență la rifampicină, macrolide, fluorochinolone și tetraciline la *E. coli* sunt similare cu cele întâlnite la alți membri ai familiei Enterobacteriaceae. Rezistența la rifampicină apare prin mutații ale genei *rpoB*. Mecanismele de rezistență la macrolide includ modificarea țintei de atac de către metilaze, inactivarea macrolidelor de către esteraze sau fosfotransferaze, precum și exprimarea pompelor de eflux. Dintre acestea, cel mai frecvent mecanism la *E. coli* pare a fi producerea de fosfotransferaze. Rezistența la fluorochinolone este mediată predominant prin polimorfism cu un singur nucleotid în regiunea determinantă a rezistenței la chinolone a genei *gyrA*, în timp ce rezistența la tetraciline este mediată prin expresia pompelor de eflux codificate de genele *tet*. Rezistența la tigeciclină a fost, de asemenea, documentată și apare ca o combinație între supra exprimarea pompelor de eflux și suprimarea porinelor [13].

Rezistența la trimetoprim-sulfametoxazol, un antimicrobian utilizat pe scară largă în tratamentul infecțiilor de tract urinar comunitare, este acum larg răspândită. Mecanismele implică supraproducția de DHFR prin mutația promotorului său sau mutații în gena *DHPS* în sine, care provoacă rezistență la trimetoprim și, respectiv, sulfametoxazol. Rezistența la aminoglicozide este mediată prin producerea de enzime care modifică aminoglicozidele. Principalele enzime întâlnite la *E. coli* sunt acetiltransferazele, fosfotransferazele și nucleotidiltransferazele. Un studiu recent din Elveția a raportat că dintre 3 358 de izolate clinice, 270 (8 %) au fost rezistente la gentamicină, 311 (9,3 %) au fost rezistente la tobramicină, în timp ce în total 470 (14 %) au fost rezistente la cel puțin o aminoglicozidă. Genotiparea a 439 dintre tulpinile rezistente la aminoglicozide a arătat că 30,3 % au gene care codifică fosfotransferaze, în timp ce altele 22,8 % și 11,8 % au gene pentru diferite tipuri de acetiltransferaze [14].

Rezistența tulpinilor de *E. coli* la colistină este mediată prin modificări ale lipopolizaharidelor (LPS). *E. coli* a fost primul agent patogen la care s-a observat rezistența la colistină mediată plasmidic, prin achiziția genei *mcr-1*. Exprimarea proteinei MCR-1 duce la adăugarea unei grupări fosfoetanolamină la lipidul A.

Aceasta determină o modificare a încărcăturii LPS, care la rândul său reduce afinitatea colistinei pentru LPS. Gena *mcr-1* a fost identificat până acum în 32 de țări, inclusiv în China, India, SUA și în majoritatea țărilor din Europa de Vest, în timp ce o genă suplimentară pentru rezistența la colistină la *E. coli*, *mcr-2*, a fost identificată în Belgia [15].

Klebsiella pneumoniae este unul dintre cei mai importanți agenți patogeni implicați în dezvoltarea infecțiilor asociate asistenței medicale. Capacitatea sa de a forma biofilme, de a adera atât la suprafețe, cât și la gazdele umane îi permite să persiste și să se răspândească rapid în mediul spitalicesc și să colonizeze pacienții. Mai mult decât atât: capacitatea acestor bacterii de a achiziționa plasmide de rezistență a făcut tulpinile multirezistente de *K. pneumoniae* să devină o problemă la nivel mondial, unele țări raportând peste jumătate din izolatele clinice de *K. pneumoniae* rezistente la toate antibioticele disponibile [16-18]. În UE se estimează că tulpinile de *K. pneumoniae* rezistente la antimicrobiene au cauzat aproape 92 000 de infecții și 7 500 de decese în anul 2015. *K. pneumoniae* rezistentă la cefalosporine de generația a III-a a fost responsabilă pentru 68 588 de infecții și 3 687 de decese, în timp ce tulpinile rezistente la carbapeneme și colistină – 15 947 și 7 450 de infecții și 2 118 și 1 635 de decese [5].

Bacteriile *K. pneumoniae* posedă rezistență intrinsecă la peniciline, cum ar fi ampicilina, prin producerea mai multor β -lactamaze de prima generație, cum ar fi SHV-1 și TEM-1, și poate dobândi rezistență la cefalosporine de I-a și a II-a generație prin producerea de BLSE. Rezistența la cefalosporinele de generația a III-a și a IV-a apare prin producerea de BLSE sau AmpC [19; 20].

Cel mai semnificativ tip de rezistență la β -lactame a *K. pneumoniae* este rezistența la carbapeneme, care apare prin diferite mecanisme. Mai multe tipuri de carbapenemaze pot fi întâlnite la *K. pneumoniae*, cum ar fi KPC și NDM, precum și carbapenemaze de tip OXA. În timp ce producția de carbapenemaze rămâne cel mai important mecanism de rezistență, mecanismele non-carbapenemaze contribuie, de asemenea, în mod semnificativ la rezistența la carbapeneme, cum ar fi pierderea proteinelor membranei externe și exprimarea pompelor de eflux, care pot acționa, de asemenea, sinergic cu supraexprimarea β -lactamazelor, cum ar fi AmpC sau BLSE. De menționat că infecțiile cu tulpini de *K. pneumoniae* rezistente la carbapeneme sunt asociate cu o mortalitate semnificativă, care poate ajunge la 48 % dintre pacienții internați. În plus, dezvoltarea rezistenței la carbapeneme a tulpinilor de *K. pneumoniae* hipervirulente (tulpini capabile să provoace infecții metastatice devastatoare, inclusiv abces

hepatic și endoftalmită) este o preocupare tot mai mare [21; 22].

Rezistența la aminoglicozide a tulpinilor de *K. pneumoniae* se manifestă prin exprimarea pompelor de eflux, enzime modificatoare de aminoglicozide care funcționează prin adenilarea, acetilarea sau fosforilarea preparatelor țintă sau prin producerea de 16SrRNA metilaze, o enzimă care blochează legarea aminoglicozidelor de subunitatea ribozomală 30S. Spre deosebire de spectrul îngust de activitate al enzimelor modificatoare, 16SrRNA metilaza conferă niveluri extrem de ridicate de rezistență la aproape toate aminoglicozidele, inclusiv tobramicină, gentamicină și amikacină, care sunt utilizate în practica terapeutică [20].

A fost demonstrat că bacteriile *K. pneumoniae* exprimă toate mecanismele de rezistență la fluorochinolone descrise până acum la bacteriile gram-negative. Acestea includ mutații în gena *gyrA* a enzimei țintă pentru fluorochinolone, supraproducția pompei de eflux expresia genelor *qnr* codificate plasmidic, ce produc proteine care protejează fizic topoizomeraza IV și ADN giraza de fluorochinolone sau expresia unei acetiltransferazei bifuncționale, care, pe lângă aminoglicozide, poate cataliza acetilarea grupării piperazinil a norfloxacinii și ciprofloxacinei [23].

Rezistența la tetraciline are loc în special prin expresia pompelor de eflux, cum ar fi *tetB*. Rezistența la tigeclină a *K. pneumoniae* are loc preponderent prin supraexprimarea pompei de eflux *acrAB*, care apare fie după dezactivarea mutațiilor în represor său transcripțional, *AcrR*, fie prin dezinhibarea activatorului său transcripțional, *RamA*. Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că, în comparație cu tigeclina, minociclina (când este sensibilă) are o activitate antibacteriană *in vitro* mai pronunțată împotriva Enterobacteriaceae producătoare de KPC, inclusiv *Klebsiella* spp. [24-27].

La tulpinile de *K. pneumoniae* a fost raportată și rezistența la colistină. Mecanismele implică supraexprimarea pompei de eflux *acrAB*, modificări ale lipidului A a LPS prin calea fosfoetanolamină transferazei a *MCR-1* sau mutații în genele de bază în procesul de maturare a lipidului A, cum ar fi *lpxM*. Rifampicina este un antimicrobian cu activitate sinergică cu colistina împotriva *K. pneumoniae* producătoare de KPC. A fost raportată și rezistența la rifampicină, care apare prin producerea unei ADP-ribosiltransferaze [23; 28; 29].

În cele din urmă, unul dintre cele mai semnificative atribute ale patogenității *K. pneumoniae* este capacitatea sa de a forma biofilme, în special pe dispozitivele medicale. Biofilmele protejează *K. pneumoniae* nu numai de mecanismele de apărare ale gazdei, ci și de antibiotice, chiar și după expunerea de durată [30].

MECANISMELE DE REZISTENȚĂ CARACTERISTICE PENTRU *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ȘI *ACINETOBACTER BAUMANNII*

P. aeruginosa reprezintă unul dintre cei mai importanți patogeni gram-negativi cu rezistență multiplă (MDR) și al doilea după *E. coli* în ceea ce privește numărul de infecții și decese. Se estimează că tulpinile MDR de *P. aeruginosa* sunt responsabile de peste 72 000 de infecții și peste 4 800 de decese anuale în țările Uniunii Europene. Dintre acestea, se estimează că 61 892 de cazuri și 4 155 de decese sunt atribuite tulpinilor rezistente la carbapeneme, iar 1 262 de cazuri și 84 de decese sunt atribuite tulpinilor rezistente la colistină [5].

În timp ce unele bacterii posedă diferite mecanisme de rezistență intrinsecă pentru mai multe antimicrobiene, ceea ce le particularizează pe bacteriile *P. aeruginosa* este faptul că fiecare dintre mecanismele sale de rezistență intrinsecă conferă rezistență la mai multe antimicrobiene simultan. Membrana celulară a bacteriilor *P. aeruginosa* este impermeabilă pentru multe antimicrobiene, este de 12-100 de ori mai puțin permeabilă decât membrana *E. coli*. Antimicrobienele care ajung în celula bacteriilor *P. aeruginosa* sunt expuse pompelor de eflux și enzimelor de inactivare a acestora. În plus, prin achiziționarea de mutații, *P. aeruginosa* poate dezvolta deficiențe în porine, care îi reduc și mai mult permeabilitatea, poate face modificări ale țintelor de atac sau poate supraexprima pompele de eflux și enzimele de inactivare a antimicrobienele. Totodată, *P. aeruginosa* posedă mecanisme adaptive de rezistență la antimicrobiene, cum ar fi generarea de biofilm și celule persistente. Biofilmele constau din comunități bacteriene care există într-o matrice formată din polizaharide, ADN extracelular, carbohidrați, proteine și alte componente bacteriene. Bacteriile dintr-un biofilm sunt protejate de sistemul imunitar al gazdei, precum și de factorii de stres din mediu. Celulele persistente sunt celule latente care opresc sinteza proteinelor țintă și, ca urmare, pot rezista la concentrații mari de antimicrobiene, în pofida faptului că nu sunt rezistente genetic la acestea [6; 31].

Bacteriile *P. aeruginosa* posedă atât mecanisme intrinseci, cât și dobândite de rezistență la β -lactame. Mecanismele intrinseci cuprind pompe de aflux, precum și multiple β -lactamaze, în special β -lactamaze AmpC codificate cromozomial și β -lactamaze cu spectru extins (BLSE). Mecanismele de rezistență la β -lactame, dobândite de *P. aeruginosa*, includ mutații la nivelul porinelor, cum ar fi deficiența porinei OprD care duce la dezvoltarea rezistenței la imipenem

și alte carbapeneme; supraexprimarea enzimelor hidrolizante cum ar fi AmpC; supraexprimarea pompelor de eflux, cum ar fi MexCD – OprJ, care reduce sensibilitatea la carbapeneme; modificarea proteinelor de legare a penicinelor (PBP), care reduce sensibilitatea la mai multe β -lactame și, în sfârșit, achiziția altor β -lactamaze, cum ar fi carbapenemazele din clasa B [31]. Ultimul mecanism este asociat cu morbiditate și mortalitate înaltă, deoarece peste 85 % dintre infecțiile și decesele asociate cu bacteriile *P. aeruginosa* MDR sunt atribuite tulpinilor rezistente la carbapenem [5].

AmpC sunt cefalosporinaze, care pot hidroliza majoritatea penicinelor, cefalosporinelor din primele generații, combinații de β -lactame și inhibitori de β -lactamaze. De asemenea, aceste enzime hidrolizează aztreonamul, însă într-o măsură mai mică decât penicilina. Important este de menționat că AmpC este o enzimă inductibilă. Prin urmare, rezistența poate să se dezvolte rapid chiar și la izolatele de *P. aeruginosa* care păreau a fi sensibile la începutul tratamentului. Cefalosporinele antipseudomonas, cum ar fi ceftazidima sau cefepima, deși sunt încă sensibile la AmpC, sunt inductori slabi ai expresiei sale. Cu toate acestea, administrarea îndelungată de β -lactame antipseudomonas poate duce la selecția izolatelor de *P. aeruginosa* care produc în exces AmpC și, ulterior, la eșecul tratamentului [32].

Betalactamazele cu spectrul extins sunt o categorie largă de enzime, care include diferite tipuri de β -lactamaze de clasă A, cum ar fi Temoniera (TEM), cefotaxim β -lactamaze (CTX-M) și β -lactamaze sulfhidril variabile (SHV). Ele hidrolizează penicilinele, cefalosporinele cu spectru îngust și larg, precum și aztreonamul. Cu toate acestea, ele nu pot hidroliza cefamicinele, cum ar fi cefoxitina, sau combinațiile de β -lactame și inhibitori de β -lactamaze, care pot fi utilizate pentru a diferenția tulpinile pozitive BLSE de tulpinile pozitive AmpC. Pe lângă aceasta, spre deosebire de AmpC, BLSE sunt exprimate constitutiv. Prin urmare, atunci când antibiograma efectuată la antimicrobienele menționate anterior sugerează prezența unei tulpini pozitive BLSE, este puțin probabil ca administrarea de antimicrobiene precum cefoxitina sau combinații de β -lactame și inhibitori de β -lactamaze să ducă la dezvoltarea rezistenței în timpul tratamentului și la eșec terapeutic. Bacteriile *P. aeruginosa* produc diverse BLSE de clasă A, dar și BLSE de clasă D, cum ar fi β -lactamazele de tip oxacilinază (OXA). Acestea pot hidroliza cefotaxima, ceftazidima și aztreonamul, care, de regulă, nu sunt inhibitate de acidul clavulanic [32; 33].

Pe plan internațional, de la 10 % până la 50 % dintre tulpinile de *P. aeruginosa* prezintă rezistență la carbapeneme. Rezistența la carbapeneme este mediată prin me-

canisme multiple, cele mai frecvente fiind deficiențele porinelor sau supraexprimarea pompei de eflux, în timp ce prezența carbapenemazelor este întâlnită mai rar. Când bacteriile *P. aeruginosa* produc serin carbapenemaze, cum ar fi carbapenemazele de tip OXA, majoritatea carbapenemazelor sunt metalo- β -lactamaze (Clasa B, după Ambler). Acestea includ imipenemaze (IMP), metalo- β -lactamaza codificată cu integronul Verona (VIM), metalo- β -lactamaza din São Paulo (SPM), imipenemaza germană (GIM) și metalo- β -lactamaza din New Delhi (NDM). *P. aeruginosa* este considerată principalul rezervor al acestor metalo-carbapenemaze [34]. Metalo- β -lactamazele hidrolizează toate categoriile de β -lactame, cu excepția aztreonamului. În timp ce particularitatea dată ajută la diferențierea lor de alte carbapenemaze la efectuarea antibiogramii, ea nu este neapărat asociată cu eficacitatea terapeutică a aztreonamului în infecțiile cu acești germeni patogeni [35].

Rezistența bacteriilor *P. aeruginosa* la aminoglicozide este asociată, în mare măsură, cu impermeabilitatea lor intrinsecă, ceea ce le face pe aceste antimicrobiene incapabile să penetreze peretele celular și să atingă concentrații intracelulare suficiente [31]. În plus, alte mecanisme intrinseci de rezistență includ pompe de eflux, precum și enzime care modifică aminoglicozidele, și anume aminoglicozide fosfotransferaze, aciltransferaze și nucleotidiltransferaze. Fiecare dintre aceste enzime conferă rezistență diferitor combinații de aminoglicozide cu nucleotidiltransferaze aminoglicozidice, permițând bacteriilor *P. aeruginosa* să dezactiveze aminoglicozidele utilizate în mod obișnuit împotriva acestora, cum ar fi tobramicina, amikacina și gentamicina. Pentru a combate aceste mecanisme a fost conceput un aminoglicozid nou, plazomicina, rezistent la câteva dintre enzimele respective [36]. Mecanismele dobândite de rezistență la aminoglicozide includ supraexprimarea pompei de eflux MexXY și modificările țintei ribozomale, fie prin mutația subunității ribozomale 30S, fie prin metilarea situsului de legare pentru aminoglicozide. Este important de remarcat că mutațiile ribozomale pot conferi o rezistență înaltă la aminoglicozide [31].

O altă clasă de antimicrobiene, utilizată frecvent în tratamentul infecțiilor cu *P. aeruginosa*, sunt fluorochinolonele. Rezistența la fluorochinolone depinde de acțiunea pompelor de eflux, care fie este intrinsecă, cum ar fi pompele de eflux din familia de rezistență-nodulare-diviziune celulară (RND), fie dobândită prin mutații ale genelor care reglează producerea pompelor de eflux, provocând supraexprimarea pompelor de eflux precum MexAB-OprM [31]. Un alt mecanism important este mutația enzimelor țintă, care codifică topoizomeraza IV și ADN giraza. Astfel de mutații pot

asigura un nivel ridicat de rezistență la flurochinolone, mai ales în cazul în care genele pentru ambele enzime au suferit mutații sau există mai multe mutații punctiforme într-o singură genă [6].

Bacteriile *P. aeruginosa* sunt, de asemenea, rezistente și la alte antimicrobiene – tetraciclina, macrolidele, TMP/SMX și rifampicina. Producerea de pompe de eflux conferă rezistență la tetraciclina și într-o măsură mai mică la tigeciclină, deoarece aceasta din urmă este un substrat inferior pentru pompele de eflux ale *P. aeruginosa*. Macrolidele, precum și rezistența TMP/SMX sunt, de asemenea, mediate prin producerea de pompe de eflux [37]. Rezistența la rifampicină apare prin mutații ale genei ARN polimerazei. Colistina, un antimicrobian de rezervă pentru bacilii gram-negativi cu rezistență multiplă, acționează prin solubilizarea membranei celulare prin interacțiunea cu lipidul A [28; 38]. Rezistența la colistină se bazează pe modificarea sarcinii negative a membranei celulare, care este necesară pentru interacțiunea cu molecula de colistină încărcată pozitiv. Aceasta este mediată prin sinteza N4-aminoarabinozei, o moleculă care se leagă de lipidul A și îi neutralizează sarcina negativă [39].

A. baumannii este un microorganism implicat în infecțiile asociate asistenței medicale, caracterizat prin capacitatea sa de a se adapta rapid la presiunile selective, dezvoltând rezistența la antimicrobiene. În ultimul timp, tot mai mult sunt întâlnite tulpini de *A. baumannii* cu rezistență multiplă la antimicrobiene, iar cca 30 % dintre izolate, la nivel global, sunt rezistente la carbapeneme [40]. Un alt atribut important al bacteriilor *A. baumannii* este capacitatea lor de a supraviețui pe suprafețele din spitale, cum ar fi paturile din terapie intensivă și butoanele echipamentului medical, care servesc rezervor important pentru focarele spitalicești de *A. baumannii* [41]. Bacteriile *A. baumannii* produc diverse β -lactamaze. În primul rând, toate tulpinile de *A. baumannii* produc o cefalosporinază AmpC codificată cromozomial, care este comună tuturor tulpinilor. Deși este neinductibilă, producerea sa poate fi majorată prin achiziționarea unei secvențe de inserție, care conține un promotor și poate duce la supraexpresia AmpC, conferind rezistență la cefalosporine cu spectru extins [8]. *A. baumannii* produce, de asemenea, diverse alte β -lactamaze, precum β -lactamaze de tip TEM-1, CTX-M și SHV. Totodată, mai multe tulpini produc BLSE, cum ar fi TEM, cu o prevalență raportată de 59 % la izolatele de *A. baumannii* [42].

Sulbactamul, un inhibitor al mai multor β -lactamaze de clasă A, este un adjuvant important în infecțiile cu *A. baumannii*. Pe lângă activitatea sa împotriva β -lactamazelor, sulbactamul inhibă PBP1 și PBP3 ale *A. baumannii* (dar nu PBP2). În timp ce sulbac-

tamul este disponibil numai în combinație cu ampicilina, studiile *in vitro* au demonstrat că activitatea antibacteriană a combinației ampicilină-sulbactam împotriva *A. baumannii* se datorează componentei sulbactam. În infecțiile cu *A. baumannii*, sulbactamul se administrează în combinație cu carbapenemele sau colistina, deoarece sunt necesare doze mari de ampicilină-sulbactam pentru a obține doze adecvate de sulbactam. Un studiu de meta-analiză a relatat că tratamentele care conțin sulbactam în doză mare, în combinație cu alte antimicrobiene au demonstrat cele mai bune șanse de tratament în infecțiile cu *A. baumannii* MDR [43]. Cu toate acestea, rezistența la sulbactam poate apărea la tulpinile de *A. baumannii*, deoarece sulbactamul este mai puțin activ împotriva tulpinilor producătoare de TEM-1 sau metalo- β -lactamaze, cum ar fi VIM sau NDM [44].

Cele mai importante β -lactamaze produse de *A. baumannii* sunt carbapenemazele de clasă D asemănătoare OXA-51. Enzimele asemănătoare OXA-51, care sunt penicilinaze cu activitate carbapenemazică slabă, sunt omniprezente la *A. baumannii* și, prin urmare, servesc drept marker de identificare genetică pentru această specie. *A. baumannii* produce, de asemenea, alte carbapenemaze de tip OXA, și anume OXA-23, OXA-40 și OXA-58, ce se găsesc fie în cromozomul bacterian, fie în plasmide. În plus, *A. baumannii* poate dobândi și carbapenemaze din clasa B, cum ar fi VIM și IMP, care asigură niveluri ridicate de rezistență la carbapeneme. Totodată, modificările proteinelor și porinelor care leagă penicilinele pot contribui, de asemenea, la dezvoltarea rezistenței la carbapeneme [8].

Rezistența la tetraciclina a bacteriilor *Acinetobacter* spp. apare fie prin producerea de proteine de protecție ribozomale, fie prin producerea de pompe de eflux, cum ar fi TetA și TetB. Rezistența la tigeciclină a fost observată și este asociată cu producerea pompei de eflux AdeABC sau cu mutații în gene precum gena *plsC*, care codifică o proteină integrală din membrană, necesară pentru permeabilitatea membranei, ceea ce reduce pătrunderea tigeciclinei în celulă sau în gena *trm*, care codifică o metiltransferază, a cărei producție redusă are ca rezultat o sensibilitate mică la tigeciclină printr-un mecanism necunoscut. Cu toate acestea, pompele de eflux AdeABC nu afectează sensibilitatea *A. baumannii* la minociclină și, prin urmare, chiar și tulpinile rezistente la tigeciclină pot rămâne sensibile la minociclină. Prin urmare, în cazul infecțiilor cu *A. baumannii* rezistente la tigeciclină, sensibilitatea la minociclină trebuie testată permanent [45-48].

Rifampicina este, de asemenea, utilizată în tratamentul infecțiilor cu *A. baumannii*, de obicei în com-

binăție cu alți agenți antimicrobieni, cum ar fi colistina. Rifampicina a demonstrat sinergism cu colistina împotriva *A. baumannii*, care se bazează pe pătrunderea crescută a rifampicinei în celula bacteriană, în urma efectului colistinei asupra membranei exterioare. Rifampicina este, de asemenea, sinergică cu sulbactamul. Rezistența la rifampicină este mediată prin mutații ale genei *rpoB*, prin pompe de eflux sau prin modificarea enzimatică a rifampicinei de către o ADP riboziltransferază [49; 50].

Rezistența la aminoglicozide a *A. baumannii* apare prin producerea tuturor tipurilor de enzime modificatoare de aminoglicozide, inclusiv aminoglicozide acetiltransferaze, nucleotidiltransferaze și fosfattransferaze. Rezistența la fluorochinolone este mediată prin mutații ale genelor ADN girazei și topoizomerazei IV, reducând afinitatea acestora pentru fluorochinolone și prin producerea de proteine de protecție de tip qnr, care inhibă legarea fluorochinolonei de topoizomeraza IV și ADN giraza. Totodată, *A. baumannii* poate produce pompe de eflux și poate scădea expresia porinelor, reducând concentrațiile intracelulare de fluorochinolone. Producția pompei de eflux, cum ar fi pompa de eflux AdeABC, accentuează rezistența la mai multe antimicrobiene simultan, inclusiv la cefalosporine, carbapeneme, aminoglicozide și fluorochinolone [51].

Un șir de mecanisme de rezistență la colistină au fost descrise la *A. baumannii*, inclusiv producerea de pompe de eflux, dezvoltarea mutațiilor în genele enzimelor inițiale ale biosintezei lipopolizaharidelor (LPS) care au ca rezultat pierderea completă a producției de LPS și modificări ale structurii lipidului A. Au fost observate niveluri foarte ridicate de rezistență la colistină la *A. baumannii*, probabil mediate prin producerea de pompe de eflux. *A. baumannii* rezistent la colistină poate deține, de asemenea, și alte gene de rezistență, astfel devenind una dintre cele mai dificil de tratat infecții bacteriene asociată asistenței medicale din ultimii ani [45; 52].

CONCLUZII

Utilizarea iresponsabilă a preparatelor antimicrobiene a stimulat rezistența bacteriilor la fiecare agent utilizat. Cunoscând elementele de bază ale mecanismelor de rezistență la antimicrobiene, clinicianul poate indica un tratament antimicrobian adecvat pentru agentul patogen în cauză. În timp ce antimicrobienele noi ar putea să combată mecanismele de rezistență stabilite, administrarea neargumentată a acestora va provoca inevitabil dezvoltarea unor noi mecanisme de rezistență și împotriva lor.

BIBLIOGRAFIE

- Hutchings M., Truman A., Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future, in: Current Opinion in Microbiology. 2019, vol. 51, pp. 72-80.
- Datta P., Gupta V. Next-generation strategy for treating drug resistant bacteria: Antibiotic hybrids, in: Indian J. Med. Res. 2019, 149:97-106, doi: 10.4103/ijmr.IJMR_755_18
- Barbier F., Andremont A., Wolff M., Bouadma L. Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: recent advances in epidemiology and management, in: Curr Opin Pulm Med. 2013, 19(3):216-228.
- REA-Raisin Network. Surveillance of nosocomial infections in critically ill adult patients, France, 2012, [online] <http://www.cclinparisnord.org> (consultat: 06.09.2022).
- Cassini A., Diaz Högberg L., Plachouras D., et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis, in: Lancet Infect. Dis. 2019.
- Pang Z., Raudonis R., Glick B., Lin T., Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies, in: Biotechnol. Adv. 2019, 37, 177-192.
- Stewart A., Harris P., Henderson A., Paterson D. Treatment of infections by OXA-48-producing Enterobacteriaceae. Antimicrob, in: Agents Chemother. 2018, 62.
- Howard A., O'Donoghue M., Feeney A., Sleator R. *Acinetobacter baumannii* an emerging opportunistic pathogen, in: Virulence, 2012, 3, 5.
- Poirel L., Madec J.-Y., Lupo A., et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. In Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals; American Society of Microbiology: Washington, DC, USA, 2018; Volume 6, pp. 289-316.
- Bajaj P., Singh N., Viridi J. *Escherichia coli* β -lactamases: What really matters. Front. Microbiol. 2016, 7.
- Al-Agamy M., Aljallal A., Radwan H., Shibl A. Characterization of carbapenemases, ESBLs, and plasmid-mediated quinolone determinants in carbapenem-insensitive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh hospitals, in: J. Infect. Public Health 2018, 11, 64-68.
- Paitan Y. Current trends in antimicrobial resistance of *Escherichia coli*. In Current Topics in Microbiology and Immunology; Springer Verlag: Berlin/Heidelberg, Germany, 2018; Volume 416, pp. 181-11.
- Linkevicius M., Sandegren L., Andersson D. Mechanisms and fitness costs of tigecycline resistance in *Escherichia coli*, in: J. Antimicrob. Chemother. 2013, 68, 2809-2819.
- Bodendoerfer E., Marchesi M., Imkamp F., et al. Co-occurrence of aminoglycoside and β -lactam resistance mechanisms in aminoglycoside-non-susceptible *Escherichia coli* isolated in the Zurich area, Switzerland, in: Int. J. Antimicrob. Agents 2020, 56, 106019.
- Xavier B., Lammens C., Ruhul R., et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*,

in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016, in: Eurosurveillance 2016, 21, 30280.

16. Tzouveleakis L., Markogiannakis A., Psychogiou M., Tassios P., Daikos G. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other Enterobacteriaceae: An Evolving Crisis of Global Dimensions, in: Clin. Microbiol. Rev. 2012.

17. Arzanlou M., Chai W., Venter H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria, in: Essays Biochem. 2017, 61, 49-59.

18. Cruz-Córdova A., Esteban-Kenel V., Espinosa-Mazariego K., et al. Pathogenic determinants of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains associated with their persistence in the hospital environment. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 2014, 71, 15-24.

19. Coronell-Rodríguez W., Arteta-Acosta C., Duñas-Castell C. Interpretive reading of the antibiogram: A tool for clinical practice. In Sepsis, 3rd ed.; Springer: New York, NY, USA, 2017, pp. 95-115.

20. Wang G., Zhao G., Chao X., Xie L., Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*, in: Int. J. Environ. Res. Public Health 2020, 17, 6278.

21. Lan P., Jiang Y., Zhou J., Yu Y. A Global Perspective on the Convergence of Hypervirulence and Carbapenem-Resistance in *Klebsiella pneumoniae*, in: J. Glob. Antimicrob. Resist. 2021.

22. Girlich D., Poirel L., Nordmann P. Value of the modified hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae, in: J. Clin. Microbiol. 2012, 50, 477-479.

23. Navon-Venezia S., Kondratyeva K., Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance, in: FEMS Microbiol. Rev. 2017, 41, 252-275.

24. Ferreira R., Da Silva B., Rezende G., et al. High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit, in: Front. Microbiol. 2019, 10, 3198.

25. Sheng Z., Hu F., Wang W., Guo Q., Chen Z., Xu X., Zhu D., Wang M. Mechanisms of tigecycline resistance among *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates, in: Antimicrob. Agents Chemother. 2014, 58, 6982-6985.

26. Chen A., Smith K., Whitfield B., et al. Activity of minocycline against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae clinical isolates, with comparison to doxycycline and tigecycline, in: Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2017, 88, 365-367.

27. Warriar A., Babu R. Susceptibility of Minocycline against Carbapenem Resistant Gram-Negative Bacilli, in: J. Microbiol. Infect. Dis. 2018, 8, 140-146.

28. Aghapour Z., Gholizadeh P., Ganbarov K., et al. Molecular mechanisms related to colistin resistance in enterobacteriaceae, in: Infect. Drug Resist. 2019, 12, 965-975.

29. Tascini C., Tagliaferri E., Giani T., Leonildi A., Flammini S., Casini B., Lewis R., Ferranti S., Rossolini G., Menichetti F. Synergistic activity of colistin plus rifampin against colistin-resistant kpc-producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 2013, 57, 3990-3993.

30. Chung P. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: Carbapenem resistance and biofilm formation. FEMS Microbiol. Lett. 2016, 363.

31. Behzadi P., Baráth Z., Gajdács M. It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, in: Antibiotics 2021, 10, 42.

32. Liu Y., Wang Y., Walsh T., Yi L., Zhang R., Spencer J., Doi Y., et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study, in: Lancet Infect. Dis. 2016, 16, 161-168.

33. Kos V., McLaughlin R., Gardner H. Elucidation of mechanisms of ceftazidime resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by using genomic data, in: Antimicrob Agents Chemother. 2016; 60: 3856-3861, doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.03113-15>

34. Halat D., Moubareck C. The current burden of carbapenemases: Review of significant properties and dissemination among gram-negative bacteria, in: Antibiotics 2020, 9, 186.

35. Arias-León G. Resistance mechanisms: A problem and an approach to the solution. In Sepsis, 3rd ed.; Springer: New York, NY, USA, 2017, pp. 73-93.

36. Eljaaly K., Alharbi A., Alshehri S., Ortwine J., Pogue J. Plazomicin: A Novel Aminoglycoside for the Treatment of Resistant Gram-Negative Bacterial Infections, in: Drugs 2019, 79, 243-269.

37. Mustafa M., Khandekar S., Tunney M., Elborn J., et al. Acquired resistance to macrolides in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients, in: Eur. Respir. J. 2017, 49.

38. Andrade F., Silva D., Rodrigues A., Pina-Vaz C. Colistin update on its mechanism of action and resistance, present and future challenges, in: Microorganisms 2020, 8, 1716.

39. Bialvaei A., Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance, in: Curr. Med. Res. Opin. 2015, 31.

40. De Oliveira D., Forde B., Kidd T., Harris P., Schembri M., Beatson S., Paterson D., Walker M. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens, in: Clin. Microbiol. Rev. 2020, 33.

41. Rocha I., Xavier D., de Almeida K., de Oliveira S., Leal N. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clones persist on hospital inanimate surfaces, in: Brazilian J. Infect. Dis. 2018, 22, 438-441.

42. Abdar M., Taheri-Kalani M., Taheri K., et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from nosocomial infections in Tehran, Iran. GMS Hyg. Infect. Control 2019, 14, Doc02.

43. Liu J., Shu Y., Zhu F., Feng B., Zhang Z., Liu L., Wang G. Comparative efficacy and safety of combination therapy with high-dose sulbactam or colistin with additional antibacterial agents for multiple drug-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: A systematic review and network meta-analysis, in: J. Glob. Antimicrob. Resist. 2021, 24, 136-147.

44. Penwell W., Shapiro A., Giacobbe R., Gu R., Gao N., Thresher J., et al. Molecular mechanisms of sulbactam antibacterial activity and resistance determinants in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob*, in: *Agents Chemother*. 2015, 59, 1680-1689.

45. Jamal S., Al Atrouni A., Rafei R., Dabboussi F., Hamze M., Osman M. Molecular mechanisms of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*, with a special focus on its epidemiology in Lebanon, in: *J. Glob. Antimicrob. Resist*. 2018, 15, 154-163.

46. Chen Q., Li X., Zhou H., Jiang Y., Chen Y., Hua X., Yu Y. Decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii* mediated by a mutation in *trm* encoding SAM-dependent methyltransferase, in: *J. Antimicrob. Chemother*. 2014, 69, 72-76.

47. Li X., Liu L., Ji J., Chen Q., Hua X., Jiang Y., Feng Y., Yu Y. Tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii* mediated by frameshift mutation in *plsC*, encoding 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, in: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2015, 34, 625-631.

48. Lashinsky J., Henig O., Pogue J., Kaye K. Minocycline for the Treatment of Multidrug and Extensively Drug-Resistant *A. baumannii*, in: *A Review. Infect. Dis. Ther*. 2017, 6, 199-211.

49. Vázquez-López R., Solano-Gálvez S., Juárez Vignon-Whaley J., et al. *Acinetobacter baumannii* resistance: a real challenge for clinicians, in: *Antibiotics* 2020, 9, 205.

50. Mohammadi M., Khayat H., Sayehmiri K., et al. Synergistic Effect of Colistin and Rifampin Against Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: A Systematic Review and Meta-Analysis, in: *Open Microbiol. J*. 2017, 11, 63-71.

51. Asif M., Alvi I., Ur Rehman S. Insight into *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities, in: *Infect. Drug Resist*. 2018, 11, 1249-1260.

52. Lertsrisatit Y., Santimaleeworagun W., Thunyaharn S., Traipattanakul J. *In vitro* activity of colistin mono- and combination therapy against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, mechanism of resistance, and clinical outcomes of patients infected with colistin-resistant *A. baumannii* at a Thai university hospital, in: *Infect. Drug Resist*. 2017, 10, 437-443.

NOTĂ. Articolul a fost elaborat în cadrul proiectului 20.80009.8007.09 *Studierea rezistenței bacililor gram-negativi la antimicrobiene în vederea fortificării sistemului național de supraveghere și control al bolilor transmisibile.*



Mihail Statnii. *Pescărușul*, 2012, u., p., 65 × 73 cm.