

mgr Danuta Bińko

**Ocena typowania wielolekoopornych klinicznych
szczepów pałeczek Gram-ujemnych przy użyciu
metody MALDI-TOF MS**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Marta Wróblewska

Promotor pomocniczy: dr n. med. Dorota Żabicka

Zakład Mikrobiologii CSK UCK WUM
(obecnie: Laboratorium Mikrobiologii CSK UCML UCK WUM)



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Wielolekooporność szczepów bakterii stanowi obecnie problem terapeutyczny. Szczególnym wyzwaniem są szczepy odporne na powszechnie stosowane antybiotyki β -laktamowe. Jednym z mechanizmów oporności bakterii na te antybiotyki jest wytwarzanie enzymów (karbapenemaz) inaktywujących karbapenemy, czyli leki „ostatniej szansy”. Ze względów klinicznych i epidemiologicznych ważna jest szybka diagnostyka mikrobiologiczna, mająca na celu identyfikację szczepu kolonizującego pacjenta lub wywołującego zakażenie, określenie mechanizmów oporności tego szczepu na antybiotyki i inne leki przeciwbakteryjne oraz ustalenie pokrewieństwa wyizolowanych szczepów pod kątem możliwości ich szerzenia się w danej placówce ochrony zdrowia. Jest to szczególnie ważne w przypadku występowania ognisk epidemicznych.

Niniejsza praca dotyczy wielolekoopornych szczepów pałeczek Gram-ujemnych, ze szczególnym uwzględnieniem izolatów *Klebsiella pneumoniae* (pałeczki Gram-ujemne z rodziny *Enterobacteriaceae*, z rzędu *Enterobacterales*), wytwarzających metalo- β -laktamazy typu NDM-1. Ich typowanie wykonano metodami fenotypowymi i genotypowymi. Coraz większą rolę w ocenie pokrewieństwa szczepów bakterii w obrębie tego samego gatunku odgrywa spektrometria mas. Technika MALDI-TOF MS (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry*) opiera się na analizie mas cząsteczek białek rybosomalnych danego izolatu. Wyniki uzyskane tą metodą zostały porównane z wynikami badań molekularnych (sekwencjonowanie nanoporowe), wykonanych we współpracy z Laboratorium Genetyki Molekularnej genXone S.A. (Poznań). Badanie miało charakter retrospektywny i nieinwazyjny, było oparte na szczepach izolowanych z materiałów klinicznych od pacjentów hospitalizowanych w Samodzielnym Publicznym Centralnym Szpitalu Klinicznym w Warszawie w latach 2014-2016. Uzyskano opinię Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym dotyczącą przeprowadzonych badań naukowych.

Celem pracy była analiza występowania wielolekoopornych szczepów pałeczek Gram-ujemnych wyizolowanych z materiałów klinicznych w trakcie rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej w szpitalu klinicznym, porównanie metod ich typowania oraz określenie przydatności określania profili białkowych w typowaniu szczepów bakteryjnych. Dodatkowo przeprowadzono analizę czynników zwiększających ryzyko wystąpienia zakażenia wielolekoopornym szczepem bakterii oraz porównano wyniki typowania szczepów metodami fenotypowymi i genotypowymi.

Materiał stanowiły szczepy pałeczek Gram-ujemnych należących do rzędu *Enterobacterales* i tlenowych pałeczek Gram-ujemnych niefermentujących glukozy. Szczegółowej analizie poddano szczepy *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 (n=70) uzyskane z materiałów klinicznych pobranych od pacjentów hospitalizowanych w Samodzielnym Publicznym Centralnym Szpitalu Klinicznym (SP CSK) w Warszawie (obecnie Centralny Szpital Kliniczny, Uniwersyteckie Centrum Kliniczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, CSK UCK WUM) w latach 2014-2016. Analiza uwzględniła miejsce hospitalizacji pacjenta (oddziały zachowawcze i zabiegowe), rodzaj materiału klinicznego, z którego wyizolowano drobnoustrój odpowiedzialny za zakażenie oraz potwierdzoną (lub nie) wcześniejszą kolonizację przewodu pokarmowego pacjenta.

Po przeprowadzeniu analizy występowania wielolekoopornych szczepów pałeczek Gram-ujemnych i wyników typowania szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 sformułowano następujące wnioski:

1. W latach 2014-2016 w SP CSK w Warszawie wyhodowano 15 303 szczepy pałeczek Gram-ujemnych, wśród których było 1 671 (10,9%) szczepów wielolekoopornych (ang. *multidrug-resistant*, MDR). Izolatów z potwierdzonym mechanizmem oporności na karbapenemy, wynikającym z wytwarzania karbapenemazy było 592 (3,7%).
2. W przypadku izolatów rzędu *Enterobacterales*, na 12 446 wyizolowanych szczepów, 754 (6,1%) zostały zakwalifikowane jako MDR, w tym 525 szczepów posiadało geny odpowiedzialne za wytwarzanie karbapenemazy. W przypadku pałeczek Gram-ujemnych niefermentujących glukozy, na 2 857 wyhodowanych szczepów, 917 (32,0%) było wielolekoopornych. Oporność na karbapenemy wynikającą z wytwarzania enzymów hydrolizujących tę grupę antybiotyków wykryto u 67 izolatów.
3. W grupie 525 izolatów rzędu *Enterobacterales* wytwarzających karbapenemazy, 326 szczepów (62,1%) pochodziło z wymazów z odbytu, a 199 (37,9%) – z materiałów klinicznych. W obu grupach dominującym gatunkiem była *Klebsiella pneumoniae*, odpowiednio 297 (91,1%) i 193 (96,9%) szczepy.
4. Analiza czynników ryzyka zwiększających możliwość zakażenia drobnoustrojem wielolekoopornym w przypadku izolatów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1(+) wybranych do analizy objęła 35 dorosłych pacjentów, wśród których 37% stanowiły kobiety, a 63% mężczyźni. Wcześniejszą kolonizację szczepem *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 w przewodzie pokarmowym stwierdzono u 20 pacjentów (57%). Analiza wykazała, że najczęściej szczepów z materiałów klinicznych uzyskano z próbek moczu (14/35

szczepów, co stanowi 40,0%), przy czym największym ryzykiem infekcji byli obarczeni pacjenci oddziałów chirurgicznych (18/35 przypadków, czyli 51,4%).

U 18/35 pacjentów (51,4%) wykazano obecność tego szczepu również w innych materiałach pobieranych z miejsca infekcji. W momencie pobierania wymazów, 11 pacjentów (31,4%) było w trakcie antybiotykoterapii.

5. Wykazano pokrewieństwo wszystkich badanych par (n=35) szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 wyizolowanych w trakcie hospitalizacji od danego pacjenta z materiału klinicznego oraz z badań przesiewowych w kierunku nosicielstwa patogenów alarmowych w przewodzie pokarmowym.
6. Nie zaobserwowano istotnych zmian w profilu białkowym porównywanych par szczepów (n=35), niezależnie od różnicy w czasie – między wykryciem szczepu z wymazu z odbytu oraz wyizolowaniem z materiału klinicznego pobranego z miejsca zakażenia.
7. Wyniki typowania klinicznych szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 metodą fenotypową z zastosowaniem systemu MALDI-MS TOF (Bruker) są w 100% zgodne z wynikami typowania genetycznego metodą sekwencjonowania nanoporowego (n=6).
8. Potwierdzono możliwość stosowania techniki MALDI-TOF MS w typowaniu szczepów wielolekoopornych bakterii, która może być stosowana jako wstępna/przesiewowa metoda w dochodzeniu epidemiologicznym w ognisku zakażenia. Jest to alternatywa dla badań genetycznych, ze względu na niski koszt badania oraz krótki czas wykonania oznaczenia.