

mgr Olga Saran

**OCENA METOD WYKRYWANIA
MECHANIZMÓW OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI
KLINICZNYCH SZCZEPÓW PAŁECZEK GRAM-UJEMNYCH**

**Rozprawa doktorska 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

Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscyplin Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023

Streszczenie w języku polskim

Oporność na leki przeciwdrobnoustrojowe u bakterii Gram-ujemnych stanowi obecnie bardzo duże wyzwanie w zakresie zdrowia publicznego i jest jednym z głównych problemów współczesnej medycyny. Niezmiernie istotna jest narastająca wśród bakterii oporność na najpowszechniej stosowaną grupę leków przeciwdrobnoustrojowych – antybiotyki β -laktamowe. W ostatnich latach dotyczy to szczególnie pałeczek Gram-ujemnych wytwarzających β -laktamazy, które są przyczyną wielu zakażeń szpitalnych, zwłaszcza wśród pacjentów z obniżoną odpornością.

Obecnie najczęściej występującym mechanizmem oporności na antybiotyki β -laktamowe jest wytwarzanie przez bakterie β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ang. extended-spectrum β -lactamase, ESBL), ale najpoważniejsze zagrożenie dla zdrowia publicznego na całym świecie stanowią szczepy wytwarzające karbapenemazy, które warunkują oporność na karbapenemy – leki ostatniej szansy. Możliwości terapeutyczne zakażeń wywołanych przez te mikroorganizmy są bardzo ograniczone. Szczepy te szybko rozprzestrzeniają się w środowisku szpitalnym i są przyczyną znacznej zachorowalności i śmiertelności.

Niezmiernie ważna jest szybka i ukierunkowana diagnostyka mikrobiologiczna w celu wykrycia i zidentyfikowania czynnika etiologicznego, określenia mechanizmów oporności izolatów na leki przeciwdrobnoustrojowe i wczesnego wdrożenia skutecznej terapii antybiotykowej. Ogromne znaczenie ma również szybkie wprowadzenie działań przeciwepidemicznych mających na celu ograniczenie rozprzestrzeniania się szczepów wielolekoopornych.

W niniejszej pracy przedstawiono analizę przydatności w diagnostyce klinicznej pięciu testów wykrywających mechanizmy oporności pałeczek Gram-ujemnych na karbapenemy: test z kwasem etylenodiaminotetraoctowym (ang. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) i kwasem boronowym z zastosowaniem metody dyfuzyjno-krażkowej, test biochemiczny Carba NP, test immunochromatograficzny NG Carba 5 Multiplex, molekularny test Xpert Carba-R oraz test MBT STAR-Carba wykorzystujący technikę spektrometrii mas). Dodatkowo przeprowadzono analizę badanych szczepów bakteryjnych pod względem wrażliwości na wybrane antybiotyki, w tym nowe leki, takie jak: meropenem/waborbaktam, imipenem/relebaktam, ceftolozan/tazobaktam, ceftazydym/awibaktam oraz cefiderokol. Oznaczenia przeprowadzono zgodnie z zaleceniami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania

Lekowrażliwości (ang. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) oraz Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD).

Materiał do badania stanowiły szczepy pałeczek Gram-ujemnych, wyizolowane w trakcie rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej z wymazów z odbytu pobranych w okresie od 01.07.2017 r. do 30.09.2018 r. od pacjentów hospitalizowanych w wyskospecjalistycznym szpitalu o najwyższym stopniu referencyjności – Samodzielnym Publicznym Centralnym Szpitalu Klinicznym (SP CSK) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM) – obecnie: Centralny Szpital Kliniczny (CSK) Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego (UCK) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM).

W badanym okresie przebadano 11275 wymazów z odbytu pobranych od 4568 pacjentów. Do analizy w niniejszej pracy użyto 261 szczepów pałeczek Gram-ujemnych. Otrzymano 121 unikatowych izolatów wytwarzających β -laktamazę typu ESBL, 95 izolatów pałeczek Gram-ujemnych wytwarzających jedną z karbapenemaz, a także 22 izolaty pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae*/rzędu *Enterobacterales* oraz 23 izolaty *Pseudomonas aeruginosa* odporne lub o obniżonej wrażliwości na karbapenemy w mechanizmie innym niż enzymatyczny.

Szczepy pałeczek Gram-ujemnych ESBL(+) oraz karbapenemazo-ujemne odporne lub o obniżonej wrażliwości na karbapenemy pochodziły od pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chorób Wewnętrznych, Hematologii i Onkologii, natomiast izolaty wytwarzające karbapenemazę – od pacjentów hospitalizowanych w czterech klinikach chirurgicznych i trzech klinikach zachowawczych.

Wśród badanej grupy pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chorób Wewnętrznych, Hematologii i Onkologii stwierdzono nosicielstwo w przewodzie pokarmowym szczepów pałeczek Gram-ujemnych z mechanizmem oporności typu ESBL na poziomie 25,2% (dominowały szczepy *Escherichia coli* – 51,2% oraz *Klebsiella pneumoniae* – 40,5%). W tym okresie odsetek pałeczek Gram-ujemnych z rzędu *Enterobacterales* oraz z gatunku *Pseudomonas aeruginosa* opornych na karbapenemy w innym mechanizmie niż enzymatyczny wynosił odpowiednio 4,0% i 4,2%.

W siedmiu analizowanych klinikach 2,7% (95/3540) hospitalizowanych pacjentów było nosicielami w przewodzie pokarmowym szczepów pałeczek Gram-ujemnych wytwarzających karbapenemazy. Spośród wykrytych szczepów wytwarzających karbapenemazę 65,3% (62/95) pochodziło od pacjentów hospitalizowanych w klinikach zachowawczych, a 34,7% (33/95) w klinikach zabiegowych.

Wśród wyhodowanych 95 szczepów CPE (ang. carbapenemase-producing *Enterobacterales/Enterobacteriaceae*) 94,7% izolatów wytwarzało metalo- β -laktamazę (ang. metallo- β -lactamase, MBL), 2,1% – karbapenemazę typu KPC (ang. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), 3,2% – oksacylinazę OXA-48 (ang. oxacillinase-48). Wśród szczepów MBL(+) dominowały izolaty wytwarzające metalo- β -laktamazę NDM-1 (ang. New Delhi metallo- β -lactamase). Gen *bla*_{NDM} wykryto w przypadku 91,6% izolatów (87/95), natomiast gen *bla*_{VIM} – 3,1% szczepów (3/95).

Porównując testy wykrywające aktywność karbapenemazy stwierdzono, że testy fenotypowe, tj. test Carba NP (metoda biochemiczna), test dyfuzyjno-krażkowy z użyciem EDTA lub kwasu boronowego oraz test MBT STAR-Carba z użyciem spektrometrii mas charakteryzowały się 100,0% czułością oraz wykazywały 100,0% wartość predykcyjną dodatnią. Dwa inne testy wykrywające aktywność karbapenemazy z równoczesnym różnicowaniem typu wytwarzanej przez drobnoustrój karbapenemazy, tj. test molekularny Xpert Carba-R wykonany bezpośrednio z wymazu z odbytu, jak i z otrzymanego izolatu oraz fenotypowy test immunochromatograficzny NG Carba 5 Multiplex wykonany z otrzymanego izolatu wykazały czułość, odpowiednio, na poziomie 95,6%, 100,0% oraz 100,0%. Wartość predykcyjna dodatnia wynosiła 97,9% dla testu immunochromatograficznego NG Carba 5 Multiplex oraz 100,0% dla testu molekularnego Xpert Carba-R wykonanego z otrzymanego izolatu.

Analiza statystyczna wykazała, że test immunochromatograficzny NG Carba 5 Multiplex był wyraźnie bardziej czuły w wykrywaniu aktywności karbapenemaz niż test molekularny Xpert Carba-R wykonywany bezpośrednio z wymazu z odbytu. W przypadku testu molekularnego Xpert Carba-R wykonywanego bezpośrednio z wymazu z odbytu odnotowano zgodność z innymi wykonywanymi testami w 86 przypadkach (95,6%) natomiast w wariancie z badanego izolatu – w 92 przypadkach (100,0%). Test Xpert Carba-R wykonywany z wymazu z odbytu nie wykrył karbapenemazy typu OXA-48 w żadnym z 4 potwierdzonych przypadków.

Biorąc pod uwagę czas oczekiwania na wynik testu wykrywającego wytwarzanie karbapenemazy przez uzyskany izolat zauważono, że dwa testy: NG Carba 5 Multiplex oraz Carba NP wykrywają karbapenemazę w najkrótszym czasie 15-20 min. Dodatkowo test NG Carba 5 Multiplex różnicuje typ wytwarzanej karbapenemazy co pokazuje, że powinien on być stosowany jako jeden z pierwszych testów w schemacie diagnostycznym. Test molekularny Xpert Carba-R wykrywa i różnicuje typ karbapenemazy w ciągu 45-50 min, natomiast test z zastosowaniem spektrometrii mas MBT STAR-Carba wykrywa aktywność

karbapenemazy w ciągu około 3 godzin (długa procedura przygotowania próbki do badania). Najdłużej trwającym testem jest 18 godzinny test fenotypowy z użyciem metody dyfuzyjno-krażkowej (będący złotym standardem w diagnostyce mikrobiologicznej).

Pod uwagę wzięto również aspekt cenowy porównywanych testów. Wśród testów wykrywających aktywność karbapenemazy najtańszy był test Carba NP (przygotowywany w laboratorium), natomiast cena testu NG Carba-5 Multiplex była najniższa w grupie testów wykrywających i różnicujących typ wytwarzanej karbapenemazy.

W kolejnym etapie analizy oceniano aktywność *in vitro* wybranych leków przeciwbakteryjnych.

Zauważono, że w zakażeniach wywołanych przez pałeczki Gram-ujemne wytwarzające β -laktamazę typu ESBL, jako alternatywę wobec karbapenemów należy rozważyć dwa preparaty będące połączeniem antybiotyku β -laktamowego z inhibitorem, tj. ceftazydym z awibaktamem oraz ceftolozan z tazobaktamem (uzyskano odpowiednio 99,2% oraz 94,2% szczepów wrażliwych wśród badanej grupy izolatów). Pozostałe badane antybiotyki z grupy cefalosporyn (III i IV generacja) – ceftazydym oraz cefepim – nie mogą być brane pod uwagę przy ustalaniu schematu terapii zakażeń w/w drobnoustrojami. Uzyskano odpowiednio 14,9 % oraz 6,6% szczepów wrażliwych wśród badanej grupy.

Wśród badanych izolatów wytwarzających karbapenemazy stwierdzono 62,7% izolatów opornych *in vitro* na imipenem oraz 69,5% opornych na meropenem, Izolaty wrażliwe na imipenem stanowiły 15,3%, a na meropenem 10,2%. Dodatkowo 22,0% izolatów było wrażliwych na imipenem przy zwiększonej ekspozycji (WZE), natomiast na meropenem – 20,3%. Niniejsza praca wykazała, że 86,4% wśród wszystkich badanych izolatów było wrażliwych na meropenem/waborbaktam. Waborbaktam dołączony do meropenemu spowodował zwiększenie odsetka szczepów wrażliwych o 76,2% w stosunku do izolatów wrażliwych na sam meropenem. Należy podkreślić, że dominującym drobnoustrojem były szczepy *K. pneumoniae* wytwarzające metalo- β -laktamazę NDM-1, dla których wartości MIC_{M/V} (ang. minimal inhibitory concentration) *in vitro* wynosiły: 1,5 μ g/ml (1 izolat), 3,0 – 4,0 μ g/ml (18 izolatów), 6,0 μ g/ml (14 izolatów), 8,0 μ g/ml (1 izolat). Jednakże jest zbyt mało danych klinicznych odnośnie stosowania meropenemu z waborbaktamem w leczeniu zakażeń wywołanych przez pałeczki Gram-ujemne z rzędu *Enterobacterales* NDM(+). Podobnie dodatek relebaktamu do imipenemu zwiększył o 30,5% aktywność *in vitro* tego leku wobec badanej grupy drobnoustrojów. Wykazano, że 45,8% izolatów było wrażliwych na imipenem/relebaktam vs. 22,0% na imipenem. Odsetek szczepów wrażliwych na cefiderokol wyniósł 98,3% (wykryto jeden izolat oporny), na kolistynę – 89,0% i na fosfomicynę – 86,4%.

W odniesieniu do aminoglikozydów 25,4% izolatów było wrażliwych na amikacynę, a 40,7% – na gentamycynę. Najwyższy odsetek izolatów opornych wykryto dla ceftazydymu z awibaktamem – 88,1% oraz dla tigecykliny – 84,7%.

Uzyskane wyniki *in vitro* wskazują, że w przypadku zagrożenia życia pacjenta można rozważyć zastosowanie nowych leków tj. meropenem/waborbaktam, imipenem/relebaktam oraz ceftazydym/awibaktam w schemacie łączonym terapii ratunkowej w zakażeniach wywołanych przez drobnoustroje wytwarzające karbapenemazę, choć wciąż jest za mało danych klinicznych.