



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ, FARMACIE, ȘTIINȚE ȘI TEHNOLOGIE „GEORGE EMIL PALADE”
DIN TÂRGU MUREȘ

ȘCOALA DE STUDII DOCTORALE ÎN MEDICINĂ ȘI FARMACIE

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Titlul tezei: **Infecții cauzate de membri ai ordinului Enterobacterales producători de carbapenemaze: de la diagnostic microbiologic la implicații clinico-terapeutice**

Doctorand: **Annamária Földes**

Conducător de doctorat: **Prof. Univ. Dr. Minodora Dobreanu**

Introducere:

Variate tipuri de infecții induse de tulpini aparținând ordinului Enterobacterales producătoare de carbapenemaze (CPE) s-au propagat pe plan mondial într-un ritm alarmant, fiind asociate cu opțiuni terapeutice limitate, cu morbiditate și mortalitate semnificative, ceea ce contribuie la reducerea succesului medicinei moderne. În plus, date recente subliniază urgența rezistenței acestor patogeni la colistin, ceftazidim-avibactam, meropenem-vaborbactam, plazomicin.

Managementul acestor infecții reprezintă o provocare pentru sistemele de sănătate mondiale și are la bază diagnosticul microbiologic precis și rapid. Studiile au conturat dificultatea evidențierii diverselor tipuri de carbapenemaze, alături de provocările tehnice legate de testarea susceptibilității la colistin. Conform ghidurilor internaționale, doar metoda de referință a microdiluțiilor (BMD) este acceptată pentru testarea susceptibilității la colistin, dar aceasta este o tehnică pretențioasă, dificil de implementat în activitatea de rutină a laboratoarelor de microbiologie și nu permite decelarea heterorezistenței la colistin (hRC).

Epidemiologia acestor izolate este în dinamică, substraturile moleculare de rezistență și markerii de virulență sunt într-o permanentă evoluție, carbapenemazele nefiind în mod exclusiv asociate cu clone definite.

Structura tezei de doctorat:

A) Stadiul actual al cunoașterii:

Prezintă principalele aspecte ale subiectului raportat la cele mai recente date din literatura de specialitate.

B) Contribuția personală:

Obiectivul general: îmbunătățirea calității metodelor de diagnostic și supraveghere ale infecțiilor cauzate de CPE inclusiv a celor rezistente la colistin în cadrul laboratorului de microbiologie în concordanță cu metodologia actuală practică la nivel internațional.

Obiective specifice: caracterizarea și supravegherea infecțiilor induse de CPE prin metode fenotipice și moleculare, descrierea caracteristicilor clinice, terapeutice și a evoluției pacienților cu izolate CPE, stabilirea profilului de susceptibilitate la antibiotice ale tulpinilor CPE abordând metode standardizate incluzând BMD pentru colistin, demonstrarea posibilei înrudiri epidemiologice și a diseminării clonale ale tulpinilor CPE.

Toate obiectivele propuse au fost atinse prin realizarea a trei studii.

Studiul Nr. 1 a avut ca obiectiv evaluarea epidemiologiei moleculare și a impactului clinic al tulpinilor CPE izolate de la pacienți spitalizați în vederea obținerii unei imagini edificatoare referitor la apariția, răspândirea, caracteristicile clinice, terapeutice și evolutive. Ipoteza studiului a fost că nu există diferență între cele trei grupuri de pacienți diagnosticate cu carbapenemaze de tip metalo-betalactamaza New Delhi (NDM), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemaza (KPC) și oxacilinaza OXA-48-like.

Studiul Nr. 2 a avut ca obiectiv realizarea unei evaluări comparative a șase metode fenotipice raportate la BMD și toate discrepanțele majore (ME) (rezultatele fals rezistente) obținute față de această metodă au fost evaluate în continuare folosind metoda de analiză a profilului populațional (PAP), în vederea obținerii unui



algoritm îmbunătățit pentru identificarea fiabilă și convenabilă a izolatelor CPE rezistente la colistin în practica zilnică.

Studiul Nr. 3 a avut ca obiectiv realizarea unei caracterizări fenotipice și genomice detaliate a 10 tulpini de *K. pneumoniae* CPE rezistente la colistin (RC) și a 2 perechi de tulpini hRC (tulpinile parentale alături de mutații rezistenți corespunzători), tulpini care au fost colectate de la două spitale din România în perioada 2017 și 2021, pentru a identifica varietatea de substraturi moleculare de RC și hRC, determinanții genetici de rezistență la alte clase de antibiotice, confirmarea clonelor circulante cu risc ridicat și a plasmidelor dominante, împreună cu explorarea potențialelor opțiuni terapeutice, inclusiv noi combinații de β -lactamine/inhibitori de β -lactamaze.

Metodologie generală:

Activitatea de cercetare a prezentei teze de doctorat s-a derulat bidirecțional în perioada 01.01.2017 – 13.07.2021.

Studiul Nr. 1 s-a desfășurat retrospectiv în perioada 01.01-31.12.2017 în care am inclus toți pacienții internați consecutiv în Spitalul Județean de Urgență „Dr. Constantin Opreș” Baia Mare care au fost diagnosticați microbiologic cu tulpini clinice CPE din variate specimene biologice. Au fost incluse toate izolatele clinice CPE nonduplicate.

Studiul Nr. 2 a inclus 92 tulpini clinice CPE nonduplicate care au fost colectate din Spitalul Județean de Urgență „Dr. Constantin Opreș” Baia Mare (n=60) din ianuarie 2017 până în aprilie 2021 (o parte din tulpinile alese fiind analizate și în studiul nr. 1) și de la Spitalul Clinic Județean de Urgență Târgu Mureș (n=32) din ianuarie 2017 până în aprilie 2019.

Studiul Nr. 3 a analizat 10 tulpini clinice unice de *K. pneumoniae* CPE cu RC: 5 selectate de la pacienți internați în Spitalul Clinic Județean de Urgență „Dr. Constantin Opreș”, Baia Mare, România, între ianuarie 2017 și aprilie 2021 și 5 de la pacienți din Spitalul Clinic Județean de Urgență Târgu Mureș, România, între ianuarie 2017 și aprilie 2019. În plus, au fost incluse în studiu și 2 tulpini de *K. pneumoniae* CPE cu hRC colectate din aceeași instituție medicală din Târgu Mureș, în martie 2019, și mutații lor corespunzătoare cu RC. Această colecție de tulpini a fost în prealabil caracterizată fenotipic în studiul nr. 2.

Rezultate:

Studiul Nr. 1 a conturat rolul deținut de *K. pneumoniae* (n=25) ca agentul CPE cel mai frecvent diagnosticat. Reprezentarea carbapenemazelor tip NDM, KPC și OXA-48-like a fost aproximativ egală. Am remarcat conturarea a doi clusteri clonali printre cele 12 tulpini KPC pozitive. Toate izolatele CPE au prezentat non-susceptibilitate la carbapeneme, cefalosporine, ciprofloxacine. Infecțiile de tract respirator (n=16) și spitalizarea în secția de anestezie terapie intensivă (ATI) (n=14) s-au situat pe primele poziții. Cea mai frecventă comorbiditate detectată a fost insuficiența cardiacă congestivă (n=11). În majoritatea situațiilor (n=15) a fost adoptată monoterapia. Decesul a survenit la 18 pacienți.

Studiul Nr. 2 a dovedit că raportat la BMD Micronaut MIC-Strip Colistin, metoda eluției discurilor de colistin în bulion (CBDE) și mediul ChromID Colistin R Agar (COLR) au prezentat concordanță categorică (CA) de 100%. Comparativ cu aceeași metodă de referință, discrepanța foarte mare (VMD) (n=15) am decelat-o la metoda gradient Etest, iar rezultate fals rezistente (n=3) am notat doar pentru Rapid Polymyxin NP Test. Fenomenul hRC la două tulpini de *K. pneumoniae* CPE a fost evidențiat numai prin metoda PAP și Rapid Polymyxin NP Test.

În **studiul Nr. 3** whole-genome sequencing (WGS) a demonstrat absența genelor *mcr*, dar a evidențiat la 7 tulpini de *K. pneumoniae* CPE apariția în gena *mgrB* a secvențelor de inserție (IS) (ISKpn25 sau ISKpn26) cu rol perturbator. S-au identificat posibile mutații responsabile de RC și hRC în genele *phoP* (L4F), *phoQ* (Q426L, L26Q, L224Q, Q317K), *pmrB* (R256G, P95L, T157P, V352E), and *crpB* (P151S). Izolatele au aparținut liniilor clonale ST101 (n = 6), ST 147 (n = 5), ST258 (n = 2) și ST307 (n=1). Toate izolatele au deținut plasmidul IncF. Plasmidele IncL și IncR au fost identificate la toate izolatele OXA-48 pozitive, iar plasmidul IncC a fost prezent într-un genom *bla*_{NDM-1}.

Concluzii (generale)

Prin aplicarea complementară a unei game diverse de metode fenotipice, atât comerciale, cât și de referință BMD și PAP, alături de tehnici moleculare: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), polymerase chain



reaction (PCR) și WGS, prezenta lucrare contribuie la optimizarea diagnosticului microbiologic, o mai bună caracterizare a tulpinilor CPE, însoțită de o monitorizare mult mai eficientă a acestor tipuri de infecții pe teritoriul României, în acord cu metodologia actuală întrebuințată pe plan mondial.

Tulpinile CPE au deținut un profil multidrug-rezistent (MDR), cu variante terapeutice restânse, iar mortalitatea în rândul pacienților a fost ridicată. Monoterapia în infecțiile de tract urinar (ITU) cauzate de izolate CPE s-a dovedit a fi o strategie adecvată. Cefazidim-avibactamul rămîne o opțiune terapeutică pentru izolatele *bla*_{KPC-2} și *bla*_{OXA-48}. La unele tulpini *bla*_{KPC-2}, am constatat emergența îngrijorătoare a rezistenței la meropenem-vaborbactam, în absența unui tratament prealabil cu acest agent antimicrobian nou și promițător. Imipenem/cilastatin-relebactamul, tigecyclina, gentamicina și trimetoprim-sulfametoxazolul sunt încă agenți potențiali activi *in vitro* împotriva unora dintre agenții patogeni studiați.

Studiul actual pune în lumină provocările importante legate de diagnosticul fenotipic și genotipic al tulpinilor CPE care co-exprimă hRC. Dintre toate tehnicile fenotipice utilizate, doar Rapid Polymyxin NP Test și tehnica PAP au avut capacitatea de a decela hRC la tulpini de *K. pneumoniae* CPE, de aceea sugerăm introducerea în practica de rutină a unui algoritm îmbunătățit cu îmbinarea tuturor rezultatelor susceptibile obținute cu Vitek 2 Compact, Micronaut MIC-Strip, CBDE și COLR agar cu Rapid Polymyxin NP Test.

Tehnica WGS s-a dovedit o strategie inovatoare și promițătoare care a avut capacitatea de a pune în valoare multitudinea de determinanți de rezistență la variate clase de antibiotice, alături de caracterizarea plasmidelor, a clonelor circulante, oferind, astfel, date esențiale pentru supravegherea rezistenței la antimicrobiene. Metoda a evidențiat pe de o parte mutații recunoscute T157P, R256G, P95L în *pmrB* sau P151S în *rrrB*, și pe de altă parte șase mutații neraportate anterior, prezise ca fiind intolerante de către instrumentele bioinformatic: L4F în gena *phoP*, L224Q, L26Q, Q426L și Q317K în *phoQ* și V352E în *pmrB* care ar putea contribui la producerea RC și a hRC. Substituția nouă și rară L224Q în gena *phoQ*, a fost interpretată cu efect potențial supresor, deoarece în prezența unei gene *mgrB* modificate prin IS a condus la valori ale concentrației minime inhibitorii (CMI) scăzute la colistin conform BMD.

Tehnicile PFGE și WGS au oferit informații edificatoare referitor la gradul de înrudire epidemiologică dintre tulpini și propagarea acestora în mediul intraspitalicesc și/sau interregional (Târgu Mureș, Baia Mare). Prin WGS am dovedit diseminarea intraspitalicească silențioasă a clonelor ST147 cu hRC (Târgu Mureș), cu legături strânse cu o altă clonă ST147 din Baia Mare.

Originalitatea tezei:

Din cunoștințele noastre, principalele elemente de noutate obținute în urma cercetărilor sunt următoarele:

Studiul nr. 1 reprezintă prima cercetare derulată în România care a încercat să investigheze factorii de risc semnificativi consacrați asociați cu colonizarea și/sau infecția cu tulpini CPE, datele clinice, evoluția și tratamentul aplicat cazurilor CPE pozitive.

Studiul nr. 2 este primul care a evaluat comparativ următoarea combinație de teste fenotipice pe tulpini CPE pentru testarea susceptibilității la colistin: Vitek 2 Compact, Micronaut MIC-Strip, metoda gradient Etest pe Mueller Hinton E agar (MHE), COLR agar, Rapid Polymyxin NP Test și CBDE față de BMD. În premieră pentru România și, printre puținele studii din literatura internațională de specialitate, cu ajutorul Rapid Polymyxin NP Test și a tehnicii PAP am reușit să diagnosticăm două tulpini de *K. pneumoniae* CPE cu hRC..

În contextul unui număr limitat de astfel de studii din literatura universală, **studiul nr. 3** se înscrie ca prima cercetare românească care s-a axat pe evaluarea determinanților moleculari de rezistență la izolate de *K. pneumoniae* CPE cu RC și hRC. În premieră a pus în lumină șase mutații neraportate anterior, prezise ca fiind intolerante de către instrumentele bioinformatic, L4F în gena *phoP*, L224Q, L26Q, Q317K și Q426L în *phoQ* și V352E în *pmrB*, care ar putea contribui la RC și hRC, cu precizarea că substituția nouă L224Q ar avea un efect potențial supresor în prezența unei gene *mgrB* alterate prin IS.