



Резюме на проект по Фонд „Наука“ № 21010 – Конкурсна сесия 2021:
„Антибиотична резистентност, епидемиология и мениджмънт на инфекции,
асоциирани със *Serratia marcescens*“
Ръководител: Проф. д-р Теменуга Жекова Стоева, дм

Цел на настоящия проект е проучване на основните механизми на резистентност на клинично-значими изолати *Serratia marcescens*, получени от пациенти, хоспитализирани в три университетски болници към набор от антибактериални лекарствени средства, широко използвани в медицинската практика и да се установят генетичните основи на тази резистентност. Поради вродената полимиксинова устойчивост на *S. marcescens*, следва да се установи ролята на селективния натиск, свързан с нарастващата употреба на colistin в медицинската практика за увеличаването на честотата на свързаните с този бактериален вид заболявания. Друга цел на проекта е проучване епидемиологията на инфекциите, свързани със *S. marcescens* в условията на болничната среда и да се дадат препоръки за успешен мениджмънт на *Serratia*-асоциираните инфекции.

Задачи:

1. Изпитване чувствителността на колекцията от клинично значими изолати *S. marcescens* към набор от антибиотици;
2. Определяне генетичните механизми на резистентността към бета-лактамни антибиотици;
3. Установяване на зависимостта между употребата на colistin и честотата на инфекции, асоциирани със *S. marcescens* в болничната среда;
4. Проследяване на епидемиологичната връзка между изолатите *S. marcescens* от проучваните три болнични заведения в град Варна;
5. Изработване на алгоритъм за превенция, диагностициране и етиологична антибактериална терапия на вътреболничните инфекции, свързани със *S. marcescens*.

Материали:

Проучването се провежда върху вече сформирана колекция от 200 изолата *S. marcescens*, получени от различни клинични материали на пациенти, хоспитализирани в три лечебни заведения във град Варна – УМБАЛ „Св. Марина“, МБАЛ „Св. Анна“ и СБАГАЛ „Проф. д-р Димитър Стаматов“ в периода 2017-2021 г.

Методи:

Изпитването на чувствителността към набор от антибиотици ще се осъществи чрез дисково-дифузионния тест на Bauer-Kirby, както и чрез автоматизирани системи Phoenix100 и Vitek 2. За установяване на генетичните основи на резистентността, както

и на степента на генетично сходство между изолатите ще се използва полимеразно-верижна реакция (PCR, Polymerase Chain Reaction). За установяване на зависимостта на употребата на colistin и честотата на *S. Marcescens*-асоциираните инфекции ще се използват статистически методи като алтернативен анализ и t-тест.

Очаквани резултати:

1. Установяване на широко разпространение сред проучваните изолати на гени, кодиращи широкоспектърни бета-лактамази, вкл. карбапенемази;
2. Оценка на евентуалната взаимовръзка между употребата на полимиксиновия антибиотик colistin и честотата на инфекциите, свързани със *S. marcescens*;
3. Установяване степента на генетично сходство между проучваните изолати, което ще изясни важни детайли, касаещи епидемиологичното разпространение на *S. marcescens* в болничната среда и ще допринесе за оптимизиране на мерките по ограничаването и терапията на свързаните с този бактериален вид заболявания.

Постигнати научни резултати:

1. **Изпитване на чувствителността на колекцията от клинично значими изолати *S. marcescens* към набор от антибиотици:**

- ❖ Изпитването на чувствителността към антимикробни лекарствени средства установи висок процент на резистентност към цефалоспорини от трета и четвърта генерация (ceftriaxone 55%; ceftazidime 53.5%; cefepime 52%) в проучваната колекция от 200 изолата *S. marcescens*. Резистентността, показана във възходящ ред, е както следва: imipenem 0.5% < amikacin 28% < piperacillin/ tazobactam 38.5% < trimetoprim/ sulphomethoxazole and levofloxacin 44.5% < ciprofloxacin 46% < gentamicin 48.5%. В групата на ceftazidime и ceftriaxone резистентните изолати *S. marcescens* (n=107, 54.5%), нивото на антибиотична резистентност, показана във възходящ ред е, както следва: Imipenem 1.8% < Amikacin 21.5% < Levofloxacin 77% < sulfamethoxazole/ trimethoprim 69.7% < Piperacillin/ Tazobactam 72.5% < Ciprofloxacin 79.8% < Gentamicin 85.3% < Cefepime 93.6%.
- ❖ Изолатите *S. marcescens* от урини, както и инвазивните изолати от хемокултури демонстрират сигнификантно по-високи нива на резистентност към всички тествани антибиотици в сравнение с изолатите от други видове клинични материали. Най-високо ниво на резистентност сред тази група изолати се доказва към цефалоспорините от трета генерация ceftriaxone и ceftazidime: за изолати от хемокултури – 10.5% и от урини съответно – 27.5%. За сравнение, изолатите от раневи и респираторни секрети са със значително по-ниска резистентност към трето- и четвърто генерационните цефалоспорини – 5.5% от изолатите. И в четирите групи изолати (от кръв, урина, рани, респираторни секрети) най-активните антибиотици са imipenem и meropenem (0.5%), следвани от amikacin (28%). Карбапенем-резистентният изолат *S. marcescens* демонстрира запазена активност единствено към amikacin.

- ❖ Двойно-дисковият синергистичен тест за детекция на ESBL в изолати *S. marcescens*, както и модифицираният Hodge тест, показаха много добра чувствителност – 89% и 100% съответно.
2. **Създаване на протокол за мануална ДНК екстракция на ДНК-аза продуциращи бактерии:** за целите на проучването на генетичните механизми на резистентност в изолати *S. marcescens*, бе създаден протокол за мануална ДНК екстракция от ДНК-аза продуциращи бактерии. Протоколът беше успешно използван при всички изследвани щамове.
 3. **Определяне на генетичните механизми на резистентността към бета-лактамни антибиотици:** основният механизъм на резистентност към цефалоспорины от трета генерация в настоящата колекция от изолати *S. marcescens* се асоциира с продукцията на ESBLs, като най-чести се доказаха CTX-M бета-лактамази (68%), следвани от TEM (52%) и 0.9% SHV. Доказа се, че резистентността към карбапенемни антибиотици се медира от продукцията на KPC-карбапенемаза. Карбапенем-резистентният щам в колекцията се доказва и продуцент на още 3 бета-лактамази - CTX-M, TEM и CMY-2.
 4. **Установяване на зависимост между употребата на colistin и честотата на инфекции, асоциирани със *S. marcescens* в болничната среда:** не беше установена корелация между нарастващата употреба на colistin в болничните структури и относителния дял на асоциираните със *S. marcescens* инфекции по години.
 5. **Установяване на епидемиологичната връзка между изолатите *S. marcescens* от проучваните болнични заведения в град Варна:** Бяха тествани редица методи за епидемиологично типизиране на изолатите, причинители на инфекции с различна анатомична локализация с цел установяване на вътреболнично и между-болнично разпространение: два вида PCR: RAPD и ERIC-PCR. Използвани бяха следните праймери:
 - ❖ RAPD2: 1254 (CCGCAGCCAA) и 1283 (GCGATCCCAA), RAPD3: 1254 (3'-CCGCACCCAA-5') и HLWL 74 (3'-ACGTATCTGC-5'), RAPD5 (5'-AACGCGCAAC-3'), AB106 (TGC TCT GCC C), AB111 (GTA GAC CCG T) и AP4 (TCA CGC TGC A).
 - ❖ ERIC1R (ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C) и ERIC2 (AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC).Тези PCR базирани методи се оказаха недостатъчно надеждни за целите на епидемиологичното типизиране на *S. marcescens* (с нисък дискриминативен потенциал).
 6. **Епидемиологични аспекти на инфекциите, причинени от *S. Marcescens*:**
 - ❖ Разпределението на изолатите *S. marcescens* според анатомичната локализация на инфекцията е както следва: уроинфекции – 30.5% (n=149), раневи инфекции – 26.8% (n=131), респираторни инфекции – 25.8% (n=126), инфекции на кръвта – 9.2% (n=45), други – 7.5% (n=37).

- ❖ От анализираната епидемиологична информация за 488 пациента със *S. marcescens*-асоциирана инфекция се установи следното разпределение по пол: 59.8% мъже (n=292) и 40.2% жени (n=196), като разликата не е статистически значима.
- ❖ Медианната възраст на пациентите е 58 години (интерквартилен обхват 49-75 г.). Не се установи статистически значима разлика във възрастта на пациентите по пол: 58.4 г. (SD 24.0) за жените и 57.8 г. (24.8) за мъжете (p=0.757).
- ❖ Средният болничен престой е 11.9 дни. Видът на инфекцията (уринарна, респираторна, ранева инфекция, инфекция на кръвта, друга) се доказва като значим фактор за продължителността на болничния престой. Причина за най-продължителен болничен престой са инфекциите на кръвта с 16.4%, следван от респираторна инфекция 15.3%, друга инфекция 12.8%, ранева инфекция 9.6%, а най-нисък 9.4% при уринарна инфекция. Разликата между групите е статистически значима (p<0.001), като не се доказва наличието на разлика по пол (p=0.649).
- ❖ При 98.8% от пациентите инфекцията е вътреболнично придобита (свързана с медицинското обслужване) и в 1.2% - придобита в обществото, като разликата е статистически значима и определя хоспитализацията като главен рисков фактор за придобиване на инфекция.
- ❖ Възрастовата група 70-79 г. е с най-висока заболяемост (29.1%), а с най-ниска – групата 20-29 г. (1%). Разликата е статистически значима, което определя възрастта като значим рисков фактор за придобиване на инфекция (p< 0.042).
- ❖ Честотата на инфекциите в периода 2017- 2021 г. е съответно 2017: 1.27, 2018: 1.76, 2019: 1.28, 2020: 1.34, 2021: 0.67. Честотата е изчислена на 1000 пациенти на година.
- ❖ Най-висок относителен дял на *S. marcescens*-асоциирани вътреболнични инфекции се наблюдават в отделения с профил „Вътрешни болести“ – 38.5% (n=188), хирургически клиники – 30.7% (n=150) и интензивни клиники – 18.4% (n=90).
- ❖ Делът на пациентите със *S. marcescens* инфекция, които не са претърпели хирургическо лечение и не са имали престой в интензивно отделение, е 48.9% (239/488), този на пациентите, претърпели хирургическа интервенция, е 31.1% (152/488), а делът на пациентите с престой в интензивна структура е 12.7% (62/488).
- ❖ Сред най-честите придружаващи заболявания са: кардиологично (65.8%), ендокринно (31.6%) и урологично заболяване (13.9%).
- ❖ Най-голям брой пациенти са били с поставено чуждо тяло (централен венозен катетър, периферен венозен катетър, уретрален катетър, сърдечна клапа) (n= 392; 80%), следван от провеждането на инвазивна процедура (n= 76, 16%) и на последно място е интубация/ механична вентилация (n=20, 4%). Разликата

между групите е статистически значима, което определя наличието на чуждо тяло като водещ фактор за придобиване на инфекция ($p < 0.05$).

- ❖ 30-дневният леталитет в цялата проучвана група пациенти е 10.5% (51/488), като 98% от починалите (50/51) са диагностицирани с нозокомиална *S. marcescens* инфекция и само 2% (1/51) – с придобита в обществото.
- ❖ 30-дневният леталитет, съпътстващ *S. marcescens*-асоциираните инфекции е най- висок в групата 60-79 г. (12.6%) и най-нисък в групата 20-39 г. (4.8%). Възрастта не се доказва като статистически значим рисков фактор, оказващ влияние върху изхода от заболяването ($p=0.282$).
- ❖ 30-дневният леталитет според вида на клиниката е както следва: интензивни клиники – 33.3%, хирургически клиники и Вътрешни клиники – 5.3%.
- ❖ В 31.3% от пациентите с летален изход, инфекцията е причинена от резистентни на трета и четвърта генерация цефалоспорины *S. marcescens*.
- ❖ Наличието на предшестваща хоспитализация не оказва значим ефект върху изхода от заболяването.