



UNIwersYTET MEDYczNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Natalia Słabisz

Rozprawa doktorska w oparciu o monotematyczny cykl prac w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Epidemiologia i diagnostyka zakażeń krwi u pacjentów hospitalizowanych, wpływ nowoczesnych technik diagnostycznych na wykrycie czynnika etiologicznego i antybiotykoterapię – analiza jednośrodkowa

Epidemiology and diagnostics of bloodstream infections in hospitalized patients. Impact of advanced diagnostic techniques on detecting the etiological agent and antibiotic therapy – a single-center analysis

Promotor:

dr hab. n. farm. Urszula Nawrot

Promotor pomocniczy:

dr n. farm. Ruth Dudek-Wicher

Katedra i Zakład Mikrobiologii
Farmaceutycznej i Parazytologii

Wrocław 2024

STRESZCZENIE

Zakażenia łożyska naczyniowego (BSI, ang. bloodstream infections) są istotnym problemem zdrowotnym, szczególnie w kontekście pacjentów w stanach krytycznych. Szacuje się, że globalnie występuje około 30 milionów przypadków BSI rocznie, skutkujących około 6 milionami zgonów. Zakażenia te mogą wynikać z infekcji miejscowych lub obecności cewników naczyniowych, a komplikacje mogą prowadzić do sepsy i wstrząsu septycznego, z wysoką śmiertelnością wynoszącą od 25% do 80%. Pandemia COVID-19 znacząco wpłynęła na służbę zdrowia, zwiększając liczbę zakażeń szpitalnych ze względu na dużą liczbę hospitalizacji, nadużywanie antybiotyków i nieprzestrzeganie procedur kontroli zakażeń. Leczenie infekcji wywołanych przez drobnoustroje wielolekooporne wymaga często stosowania kombinacji kilku antybiotyków. Zastosowanie metod biologii molekularnej w diagnostyce BSI może przyspieszyć wdrożenie odpowiedniej terapii. Stosowanie testów molekularnych jest uzasadnione, gdy wyniki są szybko implementowane w ramach programu zarządzania antybiotykami.

Celem pracy była analiza zmian w epidemiologii zakażeń łożyska naczyniowego wywołanych przez pandemię COVID-19, z uwzględnieniem problemu narastającej oporności drobnoustrojów na antybiotyki oraz możliwych korzyści wynikających z zastosowania metod molekularnych w diagnostyce tych zakażeń. Dodatkowym przedmiotem przeprowadzonych badań była ocena skuteczności *in vitro* cefiderokolu, erawacykliny, tigecykliny, plazomycyny, fosfomycyny oraz skojarzenia ceftazydym/awibaktam z aztreonamem wobec izolatów klinicznych *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających karbapenemazę typu NDM.

Material i metody. W badaniach uwzględniono 4289 pacjentów hospitalizowanych w 4. Wojskowym Szpitalu Klinicznym we Wrocławiu w latach 2018-2022, analizując retrospektywnie ich dane demograficzne, wyniki badań mikrobiologicznych i biochemicznych. Badano także lekowrażliwość 60 izolatów *Klebsiella pneumoniae* NDM, stosując różne metody oceny wrażliwości, w tym paski z gradientem stężeń, mikrorozcieńczenia w agarze oraz metodę „strip-stacking” umożliwiającą ocenę skuteczności działania skojarzenia dwóch antybiotyków. W trzecim badaniu analizowano 118 pacjentów pod kątem diagnostyki zakażeń łożyska naczyniowego za pomocą hodowli krwi i testów molekularnych BIOFIRE BCID2, wykrywających 33 patogeny oraz geny oporności na antybiotyki. Przeprowadzono analizę wskaźników zapadalności na zakażenia, śmiertelności wśród pacjentów oraz

decyzji terapeutycznych podejmowanych przez lekarzy, zgodnie z rekomendacjami Szpitalnej Polityki Antybiotykowej. Wyniki trzech prac analizowano przy pomocy programu Statistica 13.3 i odpowiednich testów statystycznych.

Wyniki z przeprowadzonych badań wskazują na wzrost zapadalności na zakażenia łożyska naczyniowego w czasie pandemii COVID-19, zwłaszcza u pacjentów zarażonych wirusem SARS-CoV-2, oraz na częstsze występowanie drobnoustrojów opornych na antybiotyki w tej grupie chorych. Liczba przypadków wymagających diagnostyki zakażeń łożyska naczyniowego wzrosła o 34%, a dodatnią hodowlę krwi uzyskano u 20% pacjentów w porównaniu do 16% przed pandemią. Zapadalność na bakteryjne zakażenia łożyska naczyniowego wzrosła z 1,13 do 2,05 przypadków na 1000 osobodni, a śmiertelność w okresie pandemii była wyższa (47% vs. 42%), szczególnie u pacjentów z COVID-19 (59%). Analiza etiologii zakażeń wykazała częstsze występowanie gronkowców koagulazo-ujemnych, *Enterococcus* spp oraz wyższy odsetek MRSA u pacjentów z COVID-19 (49% vs. 26%). *Klebsiella pneumoniae* NDM stanowiły 16% izolowanych pałeczek Gram-ujemnych u pacjentów z COVID-19. Pacjenci z COVID-19 mieli niższe poziomy prokalcytoniny w porównaniu do pacjentów bez infekcji wirusowej. Badane izolaty kliniczne *Klebsiella pneumoniae* NDM wykazały 100% wrażliwość *in vitro* na cefiderokol, erawacyklinę oraz tygecyklinę, ale tylko 78% na plazomycynę. Porównanie wrażliwości na fosfomycynę oznaczonej metodą pasków z gradientem stężeń oraz komercyjnego testu AD Fosfomicin, wykazało rozbieżności w uzyskanych wynikach (68% vs 83% szczepów wrażliwych). Zastosowanie kombinacji ceftazydim/awibaktam i aztreonam, z wykorzystaniem metody „strip-stacking” wykazało 100% wrażliwość *in vitro* wśród testowanych szczepów. W badaniach molekularnych analizowano retrospektywnie wyniki pacjentów hospitalizowanych w latach 2021-2022. Najczęstszymi czynnikami etiologicznymi BSI były *Staphylococcus aureus* (37%) i *Escherichia coli* (21%). Wykryto, że 66% szczepów *S. aureus* było wrażliwych na metycylinę (MSSA), a 26% Gram-ujemnych pałeczek produkowało ESBL, z czego 4 miały geny odpowiedzialne za metalo- β -laktamazy. Wyniki badań molekularnych były w 100% zgodne z wynikiem hodowli oraz identyfikacji i antybiogramu wykonanego metodą fenotypową. Średni czas uzyskania wyniku badania molekularnego wynosił 10 godzin, w porównaniu do 52 godzin dla rutynowej hodowli krwi. Błędne decyzje terapeutyczne podejmowana najczęściej w przypadku wykrycia *S. aureus* MSSA (64,5%).

Podsumowanie. Przeprowadzona analiza wykazała wzrost zapadalności na zakażenia łożyska naczyniowego w okresie pandemii COVID-19, zwłaszcza wśród pacjentów zakażonych wirusem SARS-CoV-2. Zaobserwowano również znaczący wzrost występowania drobnoustrojów opornych na antybiotyki, w tym szczególnie *K. pneumoniae* NDM. Badania *in vitro* wykazały dobrą skuteczność cefiderokolu, erawacykliny, tygecykliny oraz skojarzenia ceftazydym/awibaktam z aztreonamem. Metody molekularne wykorzystywane w diagnostyce zakażeń łożyska naczyniowego umożliwiają szybsze podjęcie optymalnych decyzji terapeutycznych, co jest kluczowe dla skutecznej antybiotykoterapii. W praktyce jednak wyniki testów PCR często nie są poprawnie interpretowane, a optymalizacja antybiotykoterapii następuje dopiero po uzyskaniu klasycznego wyniku badania mikrobiologicznego.

ABSTRACT

Bloodstream infections (BSI) are a significant health concern, particularly for critically ill patients. Globally, it is estimated that there are approximately 30 million BSI cases annually, resulting in around 6 million deaths. These infections can stem from local infections or the presence of vascular catheters, and complications can lead to sepsis and septic shock, with a high mortality rate ranging from 25% to 80%. The COVID-19 pandemic has significantly impacted healthcare systems, increasing the incidence of hospital-acquired infections due to the high number of hospitalizations, misuse of antibiotics, and non-compliance with infection control procedures. Treating infections caused by multidrug-resistant microorganisms often requires the use of combination antibiotic therapies. The application of molecular biology methods in the diagnosis of BSI can expedite the implementation of appropriate therapy. The use of molecular tests is justified when the results are quickly implemented as part of an antibiotic stewardship program.

Objective: The aim of this study was to analyze changes in the epidemiology of bloodstream infections caused by the COVID-19 pandemic, considering the growing issue of antibiotic resistance, and the potential benefits of using molecular methods in diagnosing these infections. Additionally, the study assessed the *in vitro* efficacy of cefiderocol, eravacycline, tigecycline, plazomicin, fosfomicin, and the combination of ceftazidime/avibactam with aztreonam against clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-type carbapenemase.

Materials and Methods: The study included 4289 patients hospitalized at the 4th Military Clinical Hospital in Wrocław between 2018 and 2022. Demographic data, microbiological and biochemical test results were retrospectively analyzed. The susceptibility of 60 *K. pneumoniae* NDM isolates was tested using various methods, including gradient strip tests, agar microdilution, and the "strip-stacking" method to assess the efficacy of two antibiotic combinations. In a third study, 118 patients were analyzed for BSI diagnostics using blood cultures and BIOFIRE BCID2 molecular tests, which detect 33 pathogens and antibiotic resistance genes. Incidence rates of infections, patient mortality, and therapeutic decisions made by physicians, in accordance with the Hospital Antibiotic Policy recommendations, were analyzed. The results of the three studies were analyzed using Statistica 13.3 software and appropriate statistical tests.

Results: The studies indicated an increase in the incidence of bloodstream infections during the COVID-19 pandemic, particularly among SARS-CoV-2 infected

patients, and a higher occurrence of antibiotic-resistant microorganisms in this patient group. The number of cases requiring BSI diagnostics increased by 34%, and positive blood cultures were obtained in 20% of patients compared to 16% before the pandemic. The incidence of bacterial bloodstream infections rose from 1.13 to 2.05 cases per 1000 patient-days, and mortality during the pandemic was higher (47% vs. 42%), especially among COVID-19 patients (59%). The analysis of infection etiology showed a higher prevalence of coagulase-negative staphylococci, *Enterococcus* spp., and a higher percentage of MRSA among COVID-19 patients (49% vs. 26%). *K. pneumoniae* NDM constituted 16% of isolated Gram-negative rods in COVID-19 patients. COVID-19 patients had lower procalcitonin levels compared to patients without viral infection. The clinical isolates of *K. pneumoniae* NDM showed 100% *in vitro* susceptibility to cefiderocol, eravacycline, and tigecycline, but only 78% to plazomicin. Comparison of fosfomicin susceptibility using gradient strip tests and the commercial AD Fosfomicin test showed discrepancies (68% vs 83% susceptible strains). The combination of ceftazidime/avibactam and aztreonam using the "strip-stacking" method showed 100% *in vitro* susceptibility among tested strains. Molecular studies retrospectively analyzed the results of patients hospitalized between 2021 and 2022. The most common BSI pathogens were *Staphylococcus aureus* (37%) and *Escherichia coli* (21%). It was found that 66% of *S. aureus* strains were methicillin-susceptible (MSSA), and 26% of Gram-negative rods produced ESBL, with 4 carrying genes responsible for metallo- β -lactamases. The results of molecular tests were 100% consistent with blood culture, identification, and phenotypic antibiogram results. The average time to obtain molecular test results was 10 hours, compared to 52 hours for routine blood cultures. Incorrect therapeutic decisions were most often made in the case of MSSA *S. aureus* detection (64.5%).

Conclusion: The analysis showed an increased incidence of bloodstream infections during the COVID-19 pandemic, especially among SARS-CoV-2 infected patients. There was also a significant rise in the occurrence of antibiotic-resistant microorganisms, particularly *K. pneumoniae* NDM. *In vitro* studies demonstrated good efficacy of cefiderocol, eravacycline, tigecycline, and the combination of ceftazidime/avibactam with aztreonam. Molecular methods used in the diagnosis of bloodstream infections enable faster therapeutic decision-making, which is crucial for effective antibiotic therapy. However, in practice, PCR test results are often not correctly interpreted, and optimization of antibiotic therapy occurs only after obtaining classical microbiological test results.