Zakład Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku



Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Molekularne podstawy lekooporności szczepów klinicznych
*Proteus mirabilis* na antybiotyki beta-laktamowe, aminoglikozydy
oraz fluorochinolony

mgr farm. Anna Diana Michalska

Promotor: prof. dr hab. n. med. Elżbieta Anna Tryniszewska

# STRESZCZENIE

Rosnąca oporność Gram-ujemnych pałeczek na antybiotyki stosowane
w praktyce klinicznej stanowi istotne zagrożenie dla skuteczności terapii zakażeń bakteryjnych. Za najszerzej rozpowszechniony mechanizm oporności wśród szczepów *Proteus mirabilis* podaje się produkcję beta-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL). Istotnym klinicznie problemem staje się również
rosnące rozpowszechnienie plazmidowych cefalosporynaz AmpC, enzymów modyfikujących aminoglikozydy (AME), metylotransferaz 16S rRNA
i białek Qnr.

Celem niniejszej pracy była ocena częstości występowania genów kodujących beta-laktamazy ESBL, plazmidowe cefalosporynazy AmpC, AME, metylotransferazy 16S rRNA oraz białka Qnr wśród ESBL-dodatnich szczepów *Proteus mirabilis*.

W okresie od września 2012 roku do stycznia 2014 rokuuzyskano
498 szczepów *Proteus mirabilis* pobranych od pacjentów hospitalizowanych
w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym i Uniwersyteckim Dziecięcym Szpitalu Klinicznym w Białymstoku. Identyfikację i wstępne badanie lekowrażliwości wykonano z użyciem automatycznego systemu VITEK 2. Parametr minimalnego stężenia hamującego wybranych antybiotyków określono przy pomocy pasków Etest, a interpretację wyników badania lekowrażliwości przeprowadzono zgodnie z kryteriami EUCAST. W celu wykrycia produkcji enzymów ESBL przez szczepy bakteryjne zastosowano test synergizmu dwóch krążków. Z ESBL-dodatnich szczepów wyizolowano materiał plazmidowy. Następnie przeprowadzono szereg reakcji PCR z użyciem specyficznych starterów w kierunku genów kodujących enzymy ESBL, cefalosporynazy AmpC, AME, metylotransferazy 16S rRNA oraz białka Qnr. Po amplifikacji produkty PCR poddano rozdziałowi elektroforetycznemu i sekwencjonowaniu w celu określenia wariantów genów kodujących poszukiwane mechanizmy oporności.

Obecność mechanizmu oporności typu ESBL stwierdzono wśród siedemdziesięciu pięciu szczepów, co stanowiło 15,06% wszystkich szczepów *Proteus mirabilis* wyizolowanych w okresie objętym badaniem. Na podstawie badania lekowrażliwości stwierdzono oporność wszystkich ESBL-dodatnich szczepów na ampicylinę i ciprofloksacynę. Odsetek szczepów niewrażliwych na amoksycylinę z kwasem klawulanowym, piperacylinę z tazobaktamem, ceftazydym i cefepim wynosił odpowiednio 89,33%, 14,67%, 84,0% i 70,67%. Meropenem jako jedyny wykazał pełną aktywność wobec wszystkich ESBL-dodatnich szczepów. Znacznie mniej szczepów było opornych na amikacynę (10,67%), niż na gentamycynę (92,0%).

Najczęściej występującym genem kodującym beta-laktamazy ESBL był *bla*CTX-M-91 wykryty wśród 44,0% szczepów. Stwierdzono również obecność genów *bla*TEM-3 (40,0%), *bla*CTX-M-15 (30,67%), *bla*CTX-M-3 (5,33%), *bla*SHV-12 (2,67%) i *bla*CTX-M-136 (1,33%). Geny *bla*TEM-1 i *bla*SHV-11 kodujące klasyczne beta-laktamazy zostały wykryte odpowiednio wśród 44,0% i 2,67% szczepów. Obecność genów kodujących nabyte cefalosporynazy AmpC stwierdzono wśród 26,67% ESBL-dodatnich szczepów. Geny *bla*CMY-15, *bla*CMY-12, *bla*CMY-2, *bla*CMY-4 i *bla*DHA-1 wykryto odpowiednio wśród 50,0%, 35,0%, 5,0%, 5,0% i 5,0% ESBL i AmpC-dodatnich szczepów. Geny kodujące enzymy AME zidentyfikowano u 84,0% ESBL-dodatnich szczepów. Najczęściej występującym wariantem był *ant(2”)-Ia* (80,95% szczepów ESBL i AME-dodatnich). Wykryto również obecność genów *aph(3”)-Ib* (28,57%), *aac(6’)-Ib-cr* (12,69%), *aac(6’)-Ib* (3,17%) oraz *aac(3)-Ia* (1,59%). Wśród dwunastu (16,0%) ESBL-dodatnich szczepów stwierdzono występowanie genu *armA* kodującego metylotransferazę 16S rRNA. Obecność genów *qnrA1*, *qnrB42* i *qnrS1* kodujących białka Qnr wykryto u trzech (4,0%) szczepów.

Na podstawie niniejszej pracy zaobserwowano występowanie genów warunkujących oporność na beta-laktamy, aminoglikozydy i fluorochinolony wśród ESBL-dodatnich szczepów *Proteus mirabilis*. Współprodukcja kilku mechanizmów oporności przez szczepy bakteryjne znacznie ogranicza możliwości terapeutyczne, a prowadzenie optymalnej antybiotykoterapii jest konieczne
do ograniczenia dalszego rozwoju lekooporności.