MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2009, 61: 159 - 165

Ewa Tyczkowska-Sieroń[1], Anna Bartoszko-Tyczkowska[2], Wojciech Gaszyński[3]

WPŁYW TERAPII ANTYBIOTYKOWEJ NA SELEKCJĘ WIELOLEKOOPORNYCH SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH

[1] Zakład Biologii Środowiskowej, Katedra Nauk Podstawowych i Przedklinicznych, UM w Łodzi
Kierownik: dr hab. n. med. *A. Głowacka*
[2] Pracownia Mikrobiologii, USK nr 1 im. N. Barlickiego w Łodzi
Kierownik: dr n. med. *Anna Bartoszko-Tyczkowska*
[3] Katedra Anestezjologii i Intensywnej Terapii UM w Łodzi
Kierownik: prof dr hab. med. *W. Gaszyński*

Badania mikrobiologiczne dotyczyły pacjentów przebywających na Oddziale Intensywnej Terapii (OIT) USK nr 1 w Łodzi w latach 2002–2007. Celem pracy było zbadanie zależności między wystąpieniem mechanizmów oporności, takich jak: metycylinooporność *S. aureus*, synteza ESBL (extended spectrum β-lactamases), czy też synteza MBL (metalo-β-laktamazy), a terapią antybiotykami, które są induktorami tych mechanizmów.

Oporność drobnoustrojów na antybiotyki determinowana jest informacją genetyczną zakodowaną w chromosomie (powstaje ona w wyniku mutacji lub nabycia genu oporności), czy też w elementach ruchomych takich jak plazmidy, transpozomy lub integrony. Typowym przykładem bakteryjnych mutacji chromosomalnych prowadzących do nabycia oporności są mutacje w genie gyrazy i powstanie oporności na fluorochinolony. Częstość mutacji szacuje się jako jedno zdarzenie na $10^5 – 10^9$ komórek bakteryjnych. Plazmidy oporności mogą być przenoszone z komórki do komórki gatunków nawet odrębnych taksonomicznie w drodze bezpośredniego kontaktu. Informacja genetyczna zawarta w plazmidach najczęściej dotyczy cech nie mających bezpośredniego wpływu na procesy życiowe, tylko związana jest z syntezą np. czynników zjadliwości lub z opornością na antybiotyki. Transpozomy, integrony i kasety genowe są mniejszymi od plazmidów ruchomymi fragmentami DNA mogącymi być nośnikami genów oporności na antybiotyki. Ekspresja obecności genów lekooporności może objawiać się jako: 1) synteza enzymów modyfikujących lub inaktywujących antybiotyk, 2) ograniczenie przepuszczalności dla leku, 3) obecność nowego białka lub białka zmodyfikowanego, które zastępuje miejsce docelowego działania leku, 4) czynne usuwanie antybiotyku z komórki drobnoustroju przez białka tzw. transportery błonowe (3).

W szpitalach na całym świecie, a szczególnie na oddziałach intensywnej terapii, spośród wielu mechanizmów oporności bakterii najwięcej problemów sprawia obecność szczepów metycylinoopornych gronkowców (MRSA, MCNSA), pałeczek *Enterobacteriacae* produkujących ESBL, czy pałeczek niefermentujących, wytwarzających MBL (1,11).

Metycylinooporność wiąże się z obecnością genu mecA kodującego białka PBP_2 lub PBP_{2a} w ścianie komórkowej o niskim powinowactwie do antybiotyków β-laktamowych, co prowadzi do oporności na wszystkie antybiotyki posiadające pierścień β-laktamowy, czyli penicyliny, penicyliny z inhibitorami, cefalosporyny, karbapenemy (18).

ESBL to zmutowane enzymy klasyczne zdolne do rozkładu penicylin, cefalosporyn (z wyjątkiem cefamycyny) oraz monobaktamów (7,12). Mechanizm rozkładu polega na hydrolizie pierścienia β-laktamowego antybiotyku (4,6). Enzymy te nie hydrolizują jednak karbapenemów, co przyczynia się do nadmiernego zużycia tej grupy antybiotyków. Zdolność syntezy ESBL przekazywana jest między gatunkami za pomocą plazmidów (13,15). Aktywność ESBL hamowana jest *in vitro* przez inhibitory, które łączone z antybiotykiem dają aktywne terapeutycznie preparaty np. sulperazon – połączenie cefoperazonu z sulbaktamem (10).

MBL są to enzymy bakteryjne hydrolizujące penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy, nie hamowane przez inhibitory. Ich aktywność zależy od obecności kationów cynku lub kadmu (5,8). Geny kodujące nabyte MBL występują w obrębie tzw. „integronów" specjalizujących się w „wyłapywaniu" genów oporności na różne leki. Pojedynczy „integron" może zawierać zestaw genów nadających drobnoustrojowi niemal pełną wielolekooporność. Takie integrony są zlokalizowane wewnątrz transpozonów, mogą być przenoszone na plazmidy koniugacyjne, które rozprzestrzeniają się pomiędzy szczepami bakterii (17).

Wymienione tu mechanizmy oporności bakterii pojawiają się dzięki indukcji i selekcji wywołanej niewłaściwą i agresywną antybiotykoterapią w szpitalach.

MATERIAŁ I METODY

Do badań mikrobiologicznych pobierano następujące próbki materiału: bronchoaspiraty, krew, końcówki cewników centralnych, mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy, wymazy z ran. Wykonano 6467 posiewów od 1630 pacjentów hospitalizowanych na Oddziale Intensywnej Terapii (OIT) Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego nr 1 w Łodzi. Posiewy wykonywano zgodnie z wytycznymi Konsultanta Krajowego (14). Lekowrażliwość oznaczano metodą dyfuzyjno-krążkową, według wytycznych KORLD (Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów) (9), za pomocą E-testów, systemem półautomatycznym SCEPTOR HP, Vitek firmy Bio Merieux oraz Phenix firmy Becton Dickinson.

Stosowano następujące szczepy wzorcowe: *S. aureus* ATCC 25923, 43300, BAA-977; *E. faecalis* ATCC 29212; *E. coli* ATCC 25922, 35218; *K. pneumoniae* ATCC 700603; *P. aureginosa* ATCC 27853.

Zużycie antybiotyków na OIT określane było za pomocą zdefiniowanej dawki dobowej (DDD) (2).

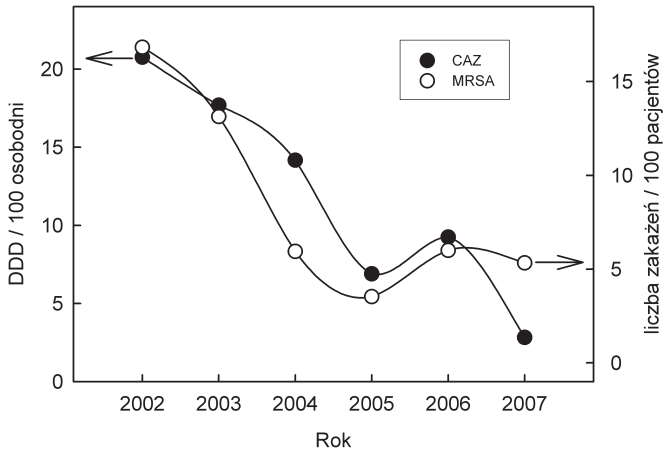
Badania korelacji pomiędzy zużyciem antybiotyków a wystąpieniem szczepów opornych wykonano stosując program *STATISTICA* 6.0 (16).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Analiza wpływu terapii antybiotykami będącymi induktorem MRSA

Na rycinie 1 przedstawiono liczbę zakażeń spowodowanych przez szczepy MRSA (w przeliczeniu na 100 pacjentów) w kolejnych latach 2002–2007. Pokazano tam również

zużycie ceftazydymu (CAZ), będącego silnym induktorem MRSA, w tym samym okresie. Jak widać, liczba zakażeń szczególnie istotnie zmniejsza się po 2003 roku, w którym zdecydowano o ograniczeniu terapii z zastosowaniem CAZ. Badanie zależności pomiędzy zużyciem tego antybiotyku oraz liczbą zakażeń z udziałem MRSA, dla całego analizowanego okresu, wykazało istotny związek o bardzo wysokiej, prostej korelacji ($p = 0{,}026$; $r = 0{,}87$). Jak z tego wynika, liczba zakażeń wywołanych szczepami MRSA jest wprost proporcjonalnie powiązana z ilością stosowanego w terapii ceftazydymu. Blokada zużycia CAZ powoduje wyraźny spadek liczby zakażeń MRSA.



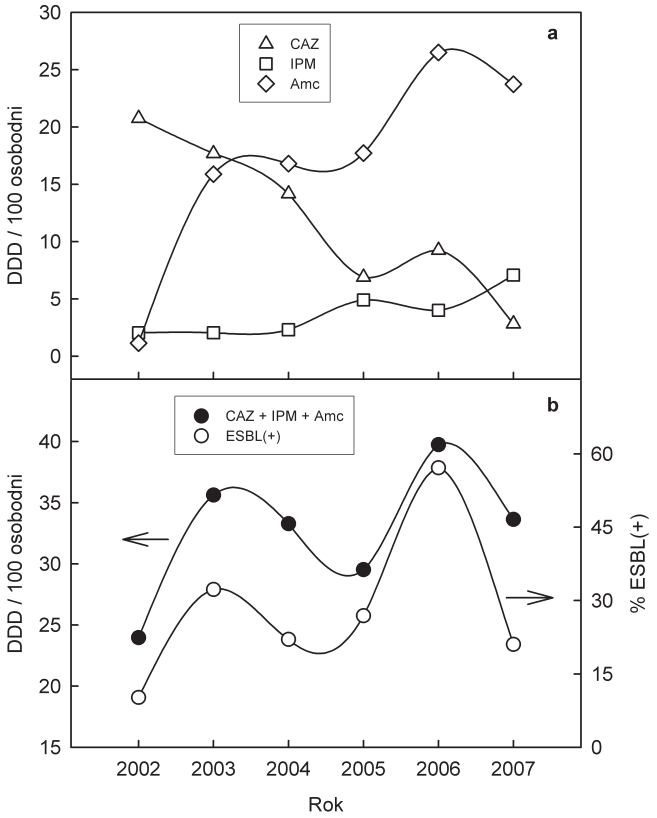
Ryc. 1. Liczba zakażeń spowodowanych przez MRSA oraz zużycie ceftazydymu (CAZ) na OIT w latach 2002–2007.

Analiza wpływu terapii antybiotykami będącymi induktorem ESBL

Głównymi induktorami syntezy ESBL wśród antybiotyków stosowanych do terapii na OIT są CAZ, imipenem (IPM) oraz amoksycylina z kwasem klawulanowym (Amc). Na rycinie 2a pokazano ich zużycie w latach 2002–2007 na tym oddziale. Z kolei na rycinie 2b przedstawiono w odsetkach zmianę udziału zakażeń spowodowanych w tym samym okresie przez szczepy wykazujące syntezę ESBL, głównie ESBL(+) szczepy pałeczek z rodziny *Enterobacteriacae*. Poszukując zależności pomiędzy zużyciem poszczególnych antybiotyków a pojawianiem się szczepów ESBL(+) zbadano korelacje między nimi. W żadnym z tych przypadków nie stwierdzono statystycznej istotności takich korelacji: dla CAZ ($p = 0{,}58$), IPM ($p = 0.86$) i Amc ($p = 0.10$). Analiza ta mogłaby świadczyć o braku istotnego powiązania pomiędzy zużyciem induktorów ESBL a występowaniem szczepów ESBL(+) na OIT.

Mając jednak na uwadze fakt, że każdy z wymienionych powyżej antybiotyków (CAZ, IPM i Amc) jest induktorem ESBL, sprawdzono ich sumaryczny wpływ na udział w zakażeniach spowodowanych przez ESBL(+) pałeczki *Enterobacteriacae*. Krzywą obrazującą zmianę sumy zużycia antybiotyków w okresie od 2002 do 2007 roku przedstawiono na rycinie 2b. Analiza korelacji pomiędzy tą krzywą a krzywą opisującą zmianę procentowego udziału zakażeń wywołanych przez ESBL(+) dostarczyła bardzo interesującego wyniku. Wskazała ona mianowicie na istotny i silny związek pomiędzy obydwiema krzywymi

(p = 0,03; r = 0,85). Należy jeszcze raz podkreślić, że oddzielne rozpatrywanie wpływu CAZ, IPM oraz Amc nie wykazuje korelacji z ESBL(+), natomiast po ich addytywnym dodaniu korelacja taka wyraźnie się pojawia. Uzyskany wynik wskazuje na konieczność rozpatrywania całokształtu polityki antybiotykowej, a nie tylko poddawania odrębnej analizie poszczególnych antybiotyków. Dotyczyć powinno to nie tylko oddziału, ale również całego szpitala.

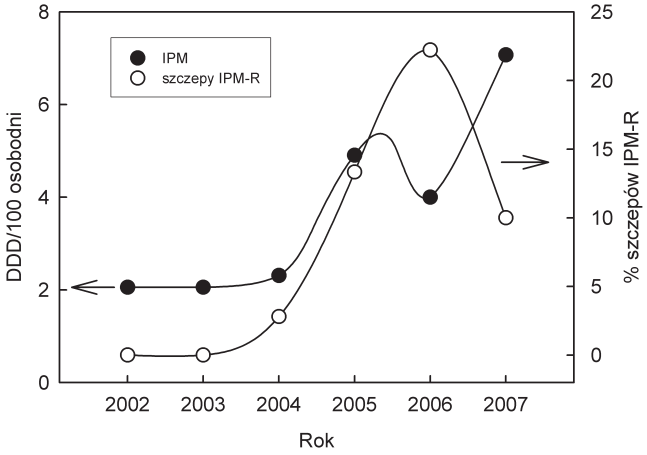


Ryc. 2. Zużycie ceftazydymu (CAZ), imipenemu (IPM) i amoksycyliny z kwasem klawulanowym (Amc) – **(a)**, oraz procentowy udział szczepów ESBL(+) we wszystkich zakażeniach spowodowanych przez ESBL+ pałeczki *Enterobacteriacae* wraz z sumarycznym zużyciem CAZ, IPM i Amc – **(b)**, na OIT w latach 2002–2007.

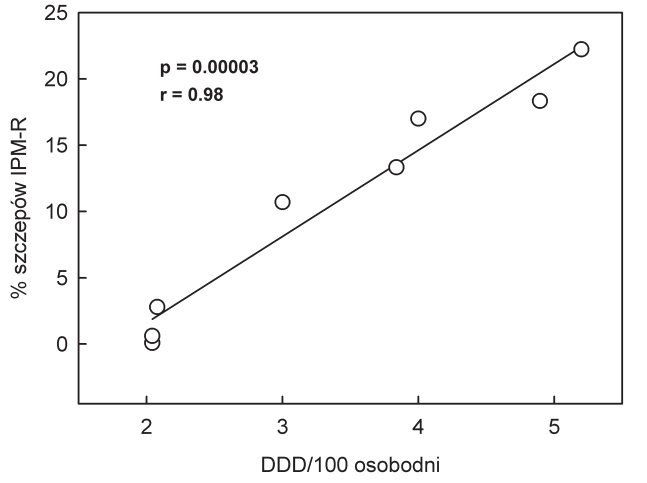
Analiza zużycia imipenemu w odniesieniu do indukcji szczepów karbapenemoopornych

Za czynniki ryzyka nabycia oporności na karbapenemy przez *P. aeruginosa* i *Acinetobacter sp.* należy uznać terapię imipenememem (IPM). W celu ustalenia jego wpływu na występowanie szczepów karbapenemoopornych syntezujących MBL (szczepy IPM-R) wykonano analizę korelacji pomiędzy ilością zużytego IPM a procentowym udziałem zakażeń wywołanych przez szczepy IPM-R w całkowitej liczbie zakażeń z udziałem *P. aeruginosa*

i *Acinetobacter sp.* Odpowiednie zależności w funkcji czasu (lata 2002-2007) przedstawiono na rycinie 3. Niestety, nie stwierdzono w tym przypadku żadnej korelacji (p = 0,23). Badając jednak powyższe zależności względem siebie, przy założeniu opóźnienia (równego 0,5 roku) w zmianach w występowaniu szczepów IPM-R w stosunku do zmian zużycia IPM, otrzymano bardzo dobrą korelację. Obrazuje ją rycina 4. Uzyskany wynik wskazuje na bardzo interesujący problem, a mianowicie wywoływanie zmiany w udziale opornych szczepów IPM-R wśród wszystkich szczepów *P. aeruginosa* i *Acinetobacter sp.* dopiero po pewnym czasie od zmiany ilości podawanego antybiotyku stanowiącego ich induktor. W badanym przypadku czas ten wynosi około 0,5 roku.



Ryc. 3. Procentowy udział szczepów IPM-R w zakażeniach spowodowanych przez *P. aeruginosa* i *Acinetobacter sp.* oraz zużycie imipenemu (IPM) na OIT w latach 2002–2007.



Ryc. 4. Korelacja pomiędzy zużyciem IPM a wyznaczonym po 0,5 roku procentowym udziale szczepów IPM-R w zakażeniach spowodowanych przez *P. aeruginosa* i *Acinetobacter sp.*

PODSUMOWANIE

Zakażenia wielolekoopornymi bakteriami, takimi jak MRSA, *Enterobacteriacae* ESBL(+) czy karbapenemoopornymi szczepami *Ps. aeruginosa* i *Acinetobacter sp.* (szczepy IPM-R) stanowi poważny problem terapeutyczny w szpitalach na całym świecie. Znacznie podwyższają koszty leczenia, przedłużają pobyt pacjenta w szpitalu, komplikując chorobę podstawową zagrażają życiu. Przeprowadzona w pracy analiza wyników świadczy o tym, że w doborze antybiotyku należy uwzględniać procedury terapeutyczne oraz bieżące dane epidemiologiczne z danego oddziału. Przy wyborze terapii empirycznej należy wnikliwie dokonać analizy ryzyka selekcji wieloopornych drobnoustrojów i dążyć do tego, aby w jak najkrótszym czasie terapię empiryczną zamienić na terapię celowaną. Zawsze należy poddać głębszej analizie skutki terapii wybranymi antybiotykami pamiętając o tym, że często ich wpływ na indukowanie szczepów opornych sumuje się. Należy również mieć na uwadze fakt, że efekt indukcji wielolekoopornych szczepów może ujawnić się dopiero po pewnym czasie (nawet półrocznym) od czasu rozpoczęcia terapii antybiotykiem mającym indukujące właściwości.

E. Tyczkowska-Sieroń, A. Bartoszko-Tyczkowska, W. Gaszyński

INFLUENCE OF ANTIBIOTIC-THERAPY ON THE SELECTION OF MULTI-DRUG RESISTANT PATHOGENS

SUMMARY

In this paper, relations between the number of nosocomial infections caused by multi-drug resistant pathogens and antibiotic-therapy were investigated. It was found that the number of MRSA infections is directly proportional to the amount of CAZ (ceftazidime) used in the therapy. It was also stated that CAZ, Amc (amoxicillin–clavulan acid) and IPM (imipenem) are strong inductors of ESBL. A good correlation between the number of infections caused by ESBL(+) strains and the total consumption of these antibiotics was found. A growing number of infections generated by *Ps. aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* strains resistant to carbapenems as a result of IPM therapy is also an anxiety-provoking fact. In this case, the changes in the number of isolated IPM-R streins occur only after approx. half an year from the changes in the IPM consumption.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bartoszko-Tyczkowska A*, *Gaszyński W*, *Tyczkowska-Sieroń E.* Analiza sytuacji epidemiologicznej oraz fenotypu oporności patogenów wyizolowanych od pacjentów oddziału intensywnej terapii USK nr 1 w Łodzi w latach 2002-2006. Med Dośw Mikrobiol 2008; 60: 223-30.
2. Baza danych. About the ATC/DDD system; The DDD – definition and principles. 2006; www.whocc.no/atcddd/indexdatabase.
3. *Borowiec D.* Mechanizmy bakteryjnej oporności na antybiotyki. W: Zakażenia szpitalne. Red. *D. Dzierżanowska*, α-medica press, Bielsko-Biała 2008, 475-96.

4. *Chapman TM*, *Perry CM*. Cefepime: A review of its use in the management of hospitalized patients with pneumonia. Am J Respir Med 2003; 2: 75-107.
5. *Deptuła A, Gospodarek E*. Oporność na karbapenemy wynikająca z syntezy metalo-β-laktamaz - metody wykrywania i analiza kosztów. Laboratorium 2005; (Wydanie specjalne - Mikrobiologia): 19-21.
6. *Dzierżanowska D*. Zapalenie płuc (w tym respiratorowe). Standardy Medyczne 2004; 6 (12): 142-5.
7. *Empel J*. ESBL – bieżąca sytuacja epidemiologiczna w kraju i na świecie. IX Sympozjum naukowe – Postępy w medycynie zakażeń, Warszawa 2005: 19.
8. *Gniadkowski M*. MBL - nowe wyzwanie dla medycyny. IX Sympozjum naukowe - Postępy w medycynie zakażeń, Warszawa 2005: 20-1.
9. *Hryniewicz W, Sulikowska A, Szczypa K* i inni. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. Postępy Mikrobiologii 2005; 44: 175-92.
10. *Kot K*, *Sawicka-Grzelak A*, *Rokosz A*, *Łuczak M*. Aktywność *in vitro* sulperazonu (cefoperazonu z sulbaktamem) wobec ESBL-dodatnich i ESBL-ujemnych pałeczek Gram-ujemnych izolowanych od pacjentów szpitalnych. IX Sympozjum naukowe – Postępy w medycynie zakażeń, Warszawa 2005: 52.
11. *Kozielski J*. Ciężkie zakażenia szpitalne wywołane bakteriami Gram-dodatnimi. Medipress Medical Update 2004; Supp. 2: 5-11.
12. *Literacka E*. Beta-laktamazy pałeczek *Proteus mirabilis*. Mikrobiol Med 2001; 28: 19-24.
13. *Masterton R*, *Drusano G*, *Peterson DL, Park G*. Appropriate antimicrobial treatment in nosocomial infections – the clinical challenges. J Hosp Infect 2003; 55: 1-12.
14. *Przondo-Mordarska A*. Procedury diagnostyki mikrobiologicznej w wybranych zakażeniach układowych. Continuo, Wrocław 2004.
15. *Silveira F*, *Fujitani S, Paterson DL*. Antibiotic-resistant infections in the critically ill adult. Clin Lab Med 2004; 24: 329-41.
16. *Stanisz A*. Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny. StatSoft, Kraków 2006.
17. *Walsh TR*, *Toleman MA*, *Poirel L*, *Nordmann P*. Metallo-β-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005; 18: 306-25.
18. *Wilk I, Ekiel A, Martirosian G*. Gronkowce – nowe właściwości starych patogenów. Nowa Klinika 2004; 11: 718-23.

Otrzymano: 6 V 2009 r.
Adres Autora: 90-153 Łódź, ul. Kopcińskiego 22, Pracownia Mikrobiologii USK nr1 im. N. Barlickiego w Łodzi