

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "VICTOR BABES"
TIMIȘOARA**

**FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ
DEPARTAMENTUL DE BOLI INFECȚIOASE**

IULIA-GEORGIANA BOGDAN



TEZĂ DE DOCTORAT

**The Impact of Multiplex PCR in Diagnosing and
Managing Bacterial and Fungal Infections in COVID-19
Patients**

Coordonator științific

PROF. UNIV. DR. HABIL. MARINCU IOSIF

**Timisoara
2024**

CUPRINS

CONTRIBUȚII PERSONALE

LISTA DE ABREVIERI

LISTA DE FIGURI

RECUNOAȘTERI

INTRODUCERE

PARTEA GENERALĂ

CAPITOLUL 1: PANDEMIA DE COVID-19

CAPITOLUL 3: DATE DE LABORATOR LA PACIENȚII CU COVID-19

CAPITOLUL 4: INFECȚII ASOCIATE CU SARS-COV-2

CAPITOLUL 5: PCR MULTIPLEX

PARTEA SPECIALĂ

I. STUDIUL 1: IMPACTUL PCR MULTIPLEX ÎN DIAGNOSTICAREA ȘI GESTIONAREA INFECȚIILOR BACTERIENE LA PACIENȚII CU COVID-19 CARE SE AUTOMEDICHEAZĂ CU ANTIBIOTICE

I.1 INTRODUCERE

I.1.1. CONTEXT

I.1.2. COPUL CERCETĂRII

I.2 MATERIALE ȘI METODE

I.2.1 PROIECTAREA STUDIULUI ȘI CONSIDERAȚII ETICE

I.2.2 CRITERII DE INCLUDERE ȘI VARIABILELE STUDIULUI

I.2.3 MATERIALE UTILIZATE

I.2.4 ANALIZA STATISTICĂ

I.3 REZULTATE

I.3.1 CARACTERISTICI GENERALE

I.3.2. REZULTATE

I.3.3. IDENTIFICAREA MICROBIANĂ

I.4 DISCUȚII

I.4.1 CONSTATĂRI DIN LITERATURA DE SPECIALITATE

I.4.2 LIMITĂRI ALE STUDIULUI

I.5 CONCLUZII

II. STUDIU 2: INFECȚII FUNGICE IDENTIFICATE CU PCR MULTIPLEX LA PACIENȚII CU COVID-19 SEVERI ÎN TIMPUL A ȘASE VALURI PANDEMICE

II.1 INTRODUCERE

II.1.1 CONTEXT

- II.1.2. SCOPUL CERCETĂRII
- II.2 MATERIALE ȘI METODE
- II.2.1 DESIGNUL ȘI ETICA STUDIULUI
- II.2.2. CRITERII DE INCLUDERE ȘI EXCLUDERE
- II.2.3 MATERIALE ȘI VARIABILE DE STUDIU
- II.2.4 ANALIZA STATISTICĂ
- II.3 REZULTATE
- II.3.1 DATE DEMOGRAFICE ALE PACIENȚILOR
- II.3.2 MANAGEMENTUL BOLII ȘI REZULTATELE
- II.3.3. IDENTIFICAREA SPECIILOR FUNGICE ȘI A REZISTENȚEI LA MEDICAMENTE
- II.3.4. LUAREA RISCULUI DE MORTALITATE
- II.4 DISCUȚII
- II.4.1 CONSTATĂRI DIN LITERATURA DE SPECIALITATE
- II.4.2 LIMITĂRI ALE STUDIULUI
- II.5 CONCLUZII
- III. STUDIUL 3: EVALUAREA PCR MULTIPLEX ÎN IDENTIFICAREA INFECȚIILOR BACTERIENE LA PACIENȚII SPITALIZAȚI CU INFECȚIE SARS-COV-2: O ANALIZĂ SISTEMATICĂ
- III.1 INTRODUCERE
- III.1.1 CONTEXT
- III.1.2. SCOPUL CERCETĂRII
- III.2 MATERIALE ȘI METODE
- III.3 REZULTATE
- III.3.1 CARACTERISTICI ALE STUDIULUI ȘI REZULTATE CLINICE
- III.3.2. DETECTAREA AGENȚILOR PATOGENI BACTERIENI
- III.4 DISCUȚII
- III.4.1 CONSTATĂRI DIN LITERATURA DE SPECIALITATE
- III.4.2 LIMITĂRI ALE STUDIULUI
- III.5 CONCLUZII
- IV. CONCLUZII FINALE ȘI PERSPECTIVE VIITOARE
- BIBLIOGRAFIE:
- ANEXA

STUDIUL 1: IMPACTUL PCR MULTIPLEX ÎN DIAGNOSTICAREA ȘI GESTIONAREA INFECȚIILOR BACTERIENE LA PACIENȚII COVID-19 CARE SE AUTOMEDICHEAZĂ CU ANTIBIOTICE.

CONTEXT

Coronavirusul 2019 (COVID-19), cauzat de coronavirusul 2 al sindromului respirator acut sever (SARS-CoV-2), a apărut la sfârșitul anului 2019 și a devenit rapid o pandemie globală. Majoritatea cazurilor de COVID-19 sunt boli respiratorii moderate, dar pot apărea complicații, inclusiv coinfecții, sindrom de detresă respiratorie acută și septicemie. Coinfecțiile cu alte boli respiratorii sunt frecvente, iar variațiile pot depinde de varianta SARS-CoV-2, prezentând provocări semnificative pentru diagnostic și tratament. Rapoartele arată o gamă variabilă de rate de coinfecție la pacienți, dar datele exacte privind coinfecțiile bacteriene dobândite în comunitate sunt limitate. Este crucială identificarea agenților patogeni la pacienții coinfectați cu COVID-19, datorită potențialului lor de a crește gravitatea bolii și mortalitatea.

Coinfecțiile cu SARS-CoV-2 apar de obicei simultan, în timp ce suprainfecțiile se dezvoltă pe măsură ce boala progresează. În ciuda acestei distincții, există o raportare inconsecventă în literatura de specialitate, ceea ce duce la date variate privind ratele de coinfecție și suprainfecție. Un studiu menționat a constatat că 3,5% dintre pacienții COVID-19 au avut o coinfecție bacteriană la internare, iar 14,3% au dezvoltat o suprainfecție în timpul spitalizării. Ratele pneumoniei asociate ventilatorului sunt considerabil mai mari la pacienții COVID-19 decât la pacienții non-COVID-19. Printre agenții patogeni coinfectanți comuni se numără *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* și diverse virusuri respiratorii. Coinfecțiile cu aceste virusuri pot înrăutăți evoluția clinică, ducând la o severitate sporită a bolii.

Utilizarea panelurilor multiplex de reacție în lanț a polimerazei (PCR) poate detecta rapid infecțiile respiratorii, ajutând la luarea deciziilor privind tratamentul. Prelevarea de probe din tractul respirator este vitală pentru detectarea organismelor la pacienții care dezvoltă complicații. Testele moderne bazate pe PCR ajută la diagnosticarea infecțiilor bacteriene concomitente sau ulterioare infecției cu SARS-CoV-2. Creșterea rezistenței la antibiotice, exacerbată de automedicație, prezintă riscuri pentru sănătate la nivel mondial. Studiul în curs de desfășurare are ca scop să evalueze dacă testele PCR multiplex de rutină pot ajuta medicii să identifice mai precis infecțiile bacteriene secundare la pacienții care se automedichează și să prezică traiectoria clinică a COVID-19.

REZUMAT AL CONSTATĂRILOR

Datele colectate de la 489 de pacienți spitalizați în cadrul COVID-19 care au suferit o infecție bacteriană secundară au arătat că 198 dintre ei s-au automedicați cu antibiotice înainte de spitalizare. În special, cei care au luat antibiotice aveau o prevalență mai mare a bolilor pulmonare precum bronșita cronică și BPOC. Cele mai frecvente antibiotice autoadministrate au fost cefalosporinele, macrolidele și penicilina, în principal procurate fără prescripție medicală. Pacienții care s-au automedecat s-au confruntat cu rezultate mai proaste, cu cazuri mai mari de pneumonie asociată ventilatorului, suprainfecții bacteriene mai grave, o severitate COVID-19 mai mare și șederi prelungite la terapie intensivă.

La compararea parametrilor biologici ai utilizatorilor și neutilizatorilor de antibiotice, primii au prezentat semne de disfuncție organică, cu valori mai mari la testele funcționale renale și hepatice. În ceea ce privește identificarea microbiană, RT-PCR multiplex a fost superioară tehnicilor convenționale de cultură, în special în detectarea infecțiilor bacteriene în rândul consumatorilor de antibiotice. De exemplu, PCR a fost semnificativ mai precisă în identificarea agenților patogeni precum *Klebsiella* spp. și *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa*.

Eficacitatea RT-PCR multiplex s-a extins și la identificarea rezistenței la antibiotice. În rândul consumatorilor de antibiotice, testul PCR a detectat rate mai mari de rezistență la

cefalosporine și macrolide în comparație cu metodele de cultură. În plus, PCR a evidențiat o prevalență mai mare a rezistenței la mai multe medicamente și a infecțiilor cu mai mulți agenți patogeni. În evaluarea rezultatelor pacienților în funcție de metoda de diagnosticare, cei evaluați inițial cu PCR au avut o identificare bacteriană și o inițiere a tratamentului mai rapidă, ceea ce a dus la șederi mai scurte în spital.

Analiza factorilor de risc a evidențiat pericolele legate de utilizarea antibioticelor fără prescripție medicală, deoarece a fost un factor de risc independent semnificativ pentru spitalizarea prelungită. Alți factori de risc au inclus statutul de fumător, suprainfecția bacteriană, recurgerea doar la culturi bacteriene convenționale și întârzieri în prelevarea de probe bacteriene la admiterea în spital.

Figura 1 - Frecvența antibioticelor automedicate în rândul pacienților cu COVID-19 și infecții bacteriene secundare.

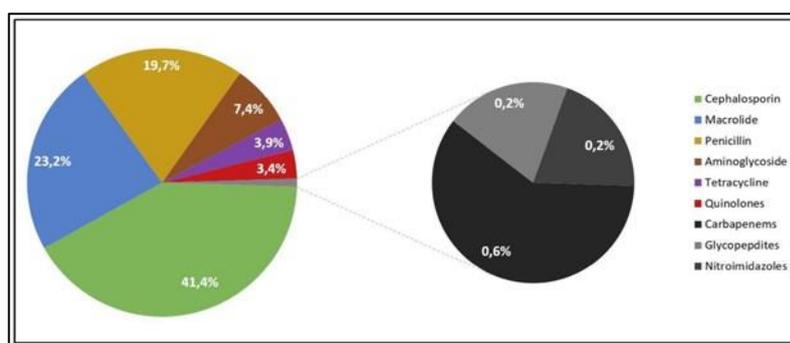
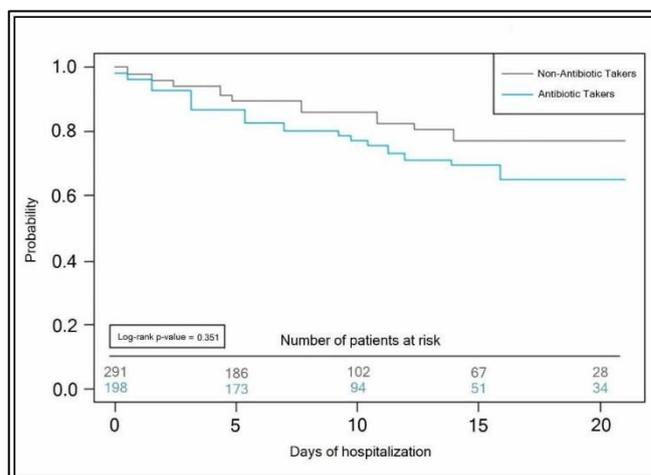


Figura 2 - Curba de probabilitate Kaplan-Meier a duratei de spitalizare în funcție de starea de utilizare a antibioticelor la pacienții COVID-19.



CONCLUZII

Tehnica PCR multiplex este foarte eficientă pentru detectarea infecțiilor bacteriene secundare la pacienții cu COVID-19 care au luat antibiotice pe cont propriu. Punerea în aplicare a acestei metode pentru evaluările inițiale la pacienții care prezintă simptome de sepsis sau declin clinic poate duce la reducerea șederii în spital și la o recuperare mai rapidă. Se subliniază importanța utilizării judicioase a antibioticelor, în special în era COVID, pentru a preveni consumul inutil de antibiotice și creșterea rezistenței antimicrobiene. În plus,

recomandăm proceduri de testare mai rapide pentru pacienții COVID-19 pentru a minimiza utilizarea de antibiotice autoadministrate și subliniem importanța integrării strategiilor de gestionare a antimicrobienelelor în planul de acțiune în caz de pandemie.

STUDIU 2: INFECȚII FUNGICE IDENTIFICATE CU PCR MULTIPLEX LA PACIENȚI CU COVID-19 GRAV ÎN TIMPUL A ȘASE VALURI PANDEMICE.

CONTEXT

Apariția pandemiei COVID-19, cauzată de SARS-CoV-2, a dus la o criză globală de sănătate. Dincolo de gestionarea virusului primar, complicațiile secundare, cum ar fi infecțiile fungice oportuniste, au afectat semnificativ morbiditatea și mortalitatea pacienților. Detectarea și înțelegerea acestor infecții rămân o provocare, metodele tradiționale, cum ar fi cultura și microscopia, producând adesea rezultate lente și imprecise.

Au apărut tehnologii avansate, cum ar fi secvențierea de generație următoare și MALDI-TOF MS, dar acestea necesită adesea mai multe resurse și expertiză decât cele disponibile. În schimb, PCR multiplex s-a dovedit a fi un instrument rapid, sensibil și eficient din punct de vedere al costurilor pentru detectarea agenților patogeni fungici, chiar dacă aplicarea sa pentru pacienții cu COVID-19 severă este încă insuficient explorată.

Acest studiu urmărește să acopere această lacună de cunoștințe prin analiza infecțiilor fungice la pacienții cu COVID-19 în stare severă în timpul primelor șase valuri pandemice. Scopul este de a determina prevalența și tipurile de infecții fungice și de a examina legăturile potențiale cu caracteristicile pacienților și strategiile terapeutice.

REZULTATE

Dintre pacienții studiați, 96 au fost diagnosticați cu infecții fungice, în timp ce 192 nu au fost diagnosticați. Cei infectați cu infecții fungice aveau o vârstă medie ușor mai mare, de 64,6 ani, comparativ cu 62,0 ani pentru cei neinfecțați, deși acest lucru nu a fost semnificativ din punct de vedere statistic. Bărbații au fost mai frecvent diagnosticați cu infecții fungice, în proporție de 63,5%. O constatare semnificativă a fost că 35,4% dintre cei cu infecții fungice erau obezi, spre deosebire de 21,4% dintre cei fără infecții. Nu au existat variații semnificative în ceea ce privește ratele de vaccinare COVID-19 și obiceiurile de fumat între cele două grupuri. În plus, în timp ce prezența bolilor pulmonare a fost mai mare în rândul celor cu infecții fungice, doar indicii de comorbiditate Charlson a prezentat o diferență semnificativă.

Testele de hemocultură au fost mai frecvente în grupul cu infecții fungice, deși fără o diferență semnificativă. Au fost observate diferențe în ceea ce privește metodele de suplimentare a oxigenului; în special, utilizarea ventilatorului a fost considerabil mai mare în grupul infecțiilor fungice (45,8% față de 18,8%). Din punct de vedere clinic, cei cu infecții fungice au avut o evoluție mai dificilă: au fost internați mai frecvent la terapie intensivă, au avut o ședere mai lungă la terapie intensivă, s-au confruntat cu un timp mai scurt de la debutul simptomelor până la deces și au avut o rată de mortalitate considerabil mai mare (32,3% față de 12,0%).

Cea mai frecventă infecție fungică identificată a fost *Candida* spp., cu o prevalență variabilă în funcție de valurile pandemice. *Aspergillus* spp. și *Mucor* spp. au avut, de asemenea, rate de detectare fluctuante în timpul valurilor. În ceea ce privește rezultatele clinice, internările la terapie intensivă și mortalitatea au fost semnificativ diferite de la un val la altul. În ceea ce privește rezistența la medicamente, infecțiile cu *Candida* spp. și *Aspergillus* spp. au prezentat o rezistență semnificativă la mai multe medicamente, în timp ce infecțiile cu *Mucor* spp. au prezentat rezistență în principal la unul sau două medicamente. În special, o mare parte din infecțiile cu *Rhizopus* spp. au demonstrat rezistență la trei sau mai multe medicamente. Riscul de deces a crescut substanțial odată cu gradul de rezistență la medicamente.

Riscul de mortalitate a variat în funcție de valurile pandemice, al doilea, al patrulea și al cincilea val prezentând riscuri semnificativ mai mari. Infecțiile cu *Aspergillus* spp. și *Mucor* spp. s-au corelat cu un risc mai mare de mortalitate, în timp ce infecțiile cu *Candida* spp. nu l-au influențat în mod semnificativ.

Figura 3 - Analiza Kaplan-Meier a supraviețuirii între pacienții cu COVID-19 sever cu și fără infecții fungice.

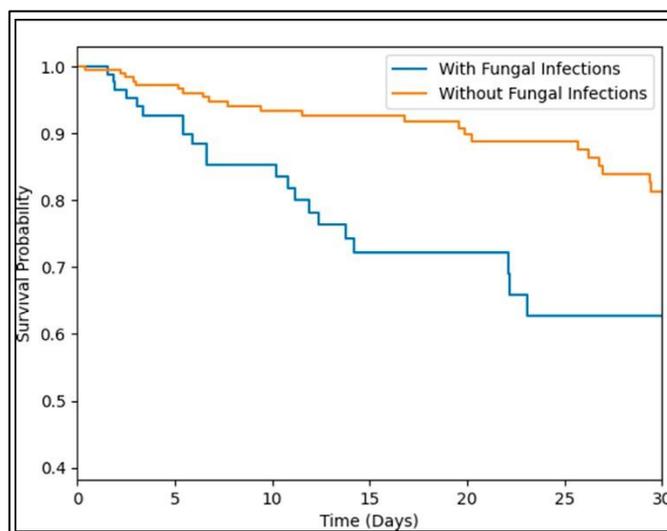
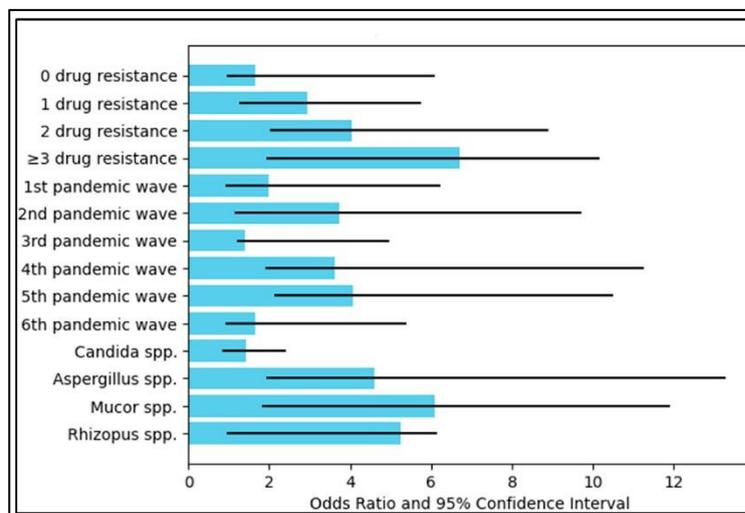


Figura 4 - Analiza factorilor de risc pentru mortalitate.



CONCLUZII

În concluzie, acest studiu retrospectiv relevă faptul că infecțiile fungice, identificate prin PCR multiplex, reprezintă un factor important la pacienții cu COVID-19 grav, având un impact atât asupra duratei de spitalizare, cât și asupra ratei mortalității. Prezența infecțiilor fungice a fost asociată cu o rată mai mare de internări la terapie intensivă, cu șederi mai lungi la terapie intensivă și cu rate ridicate de mortalitate. Dintre infecțiile fungice, *Candida* spp. a fost cea mai frecventă în toate valurile pandemice, dar infecțiile cu *Aspergillus* spp. și *Mucor* spp. au fost

asociate cu un risc de mortalitate semnificativ crescut. S-a observat, de asemenea, că rezistența la medicamente, în special rezistența la mai multe medicamente, a contribuit la o creștere semnificativă a riscului de mortalitate în rândul pacienților cu infecții fungice grave din COVID-19. Nu s-au constatat disparități semnificative în distribuția pacienților cu infecții fungice în diferitele valuri pandemice, ceea ce sugerează că varianta dominantă SARS-CoV-2 în circulație nu a influențat semnificativ apariția infecțiilor fungice. Aceste constatări subliniază importanța depistării și a gestionării precoce a infecțiilor fungice la pacienții cu COVID-19 grave pentru a îmbunătăți rezultatele clinice.

STUDIUL 3: EVALUAREA PCR MULTIPLEX ÎN IDENTIFICAREA INFECȚIILOR BACTERIENE LA PACIENȚII SPITALIZAȚI CU INFECȚIE SARS-COV-2: O ANALIZĂ SISTEMATICĂ.

CONTEXT

Coronavirusul 2 al sindromului respirator acut sever (SARS-CoV-2) este responsabil pentru boala coronavirus (COVID-19). În timp ce majoritatea persoanelor infectate prezintă simptome ușoare sau moderate, prezența coinfecțiilor poate duce la rezultate grave, multe dintre decese fiind legate de infecții multiple concomitente. Cele mai frecvente coinfecții bacteriene sunt cauzate de agenți patogeni precum *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* și *Staphylococcus aureus*, printre alții. Acestea pot fi dobândite în comunitate, semnalând o infecție înainte sau împreună cu SARS-CoV-2, sau nosocomiale, indicând o achiziție dintr-un spital după diagnosticul COVID-19.

Microbiologia clinică joacă un rol esențial în detectarea acestor agenți patogeni, în special în timpul epidemiei COVID-19, ceea ce necesită metode de testare precise și rapide. Reacția în lanț a polimerazei în lanț (PCR) multiplex a apărut ca o procedură de testare eficientă, oferind o alternativă mai rapidă la PCR tradițională prin amplificarea simultană a mai multor secvențe țintă. De asemenea, PCR în timp real accelerează procesul prin eliminarea etapelor de post-amplificare și prin detectarea materialului genetic bazat pe ARN. Deși antibioticele nu reprezintă un tratament primar pentru COVID-19, acestea sunt administrate pentru a contracara eventualele coinfecții bacteriene. Cu toate acestea, acest lucru a generat îngrijorări cu privire la creșterea rezistenței antimicrobiene, subliniind o abordare judicioasă a utilizării antibioticelor. Având în vedere implicațiile coprezenței bacteriene la pacienții cu COVID-19, această revizuire sistematică a fost realizată pentru a explora caracteristicile clinice și rezultatele acestor pacienți și pentru a evalua eficiența PCR multiplex în identificarea infecțiilor bacteriene....

REZULTATE

Au fost evaluate nouă studii, majoritatea fiind de natură retrospectivă și fiecare dintre ele fiind efectuate într-o țară diferită. Majoritatea participanților la aceste studii au fost pacienți de sex masculin în vârstă spitalizați din cauza COVID-19. Ratele de internare în terapie intensivă au variat între 6,7% și 34,3%, iar durata mediană a spitalizării a fost cuprinsă între 7 și 24 de zile. Ratele de mortalitate în rândul pacienților au variat de la 5,5% la 38,7%, unele studii remarcând necesitatea ventilației mecanice la o proporție semnificativă de pacienți. Mai multe studii au evidențiat, de asemenea, o varietate de simptome clinice la admitere, inclusiv febră și tuse, cu comorbidități prevalente, cum ar fi diabetul, bolile cardiovasculare și bolile renale cronice.

Toate studiile au identificat *Staphylococcus aureus* în eșantion, iar multe dintre ele au găsit *Klebsiella* spp. Diferențierea între infecțiile dobândite în comunitate și cele nosocomiale a evidențiat diferite prevalențe ale agenților patogeni bacterieni, cum ar fi *Chlamydomyces pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* și altele. S-au constatat rate ridicate de coinfecție bacteriană la pacienții în stare critică, implicând adesea agenți patogeni precum *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* și *Staphylococcus aureus*. Distincțiile între prevalența bacteriilor Gram-negative și Gram-pozitive au variat de la un studiu la altul.

Studiile au raportat rate substanțiale de utilizare a antibioticelor înainte de spitalizare, cu procente de până la 82%. Antibioticele utilizate frecvent au inclus cefalosporine, macrolide, ampicilină și

azitromicină. Genele de rezistență la antibiotice au fost găsite la un subset de pacienți, indicând provocarea infecțiilor bacteriene în unele cazuri.

PCR multiplex, în special BioFire® FilmArray® Pneumonia plus Panel, s-a dovedit a fi promițătoare în detectarea rapidă a diversilor agenți patogeni și a genelor de rezistență la antibiotice. Deși multe studii nu au raportat sensibilitatea și specificitatea PCR multiplex, celecare au făcut-o au constatat, în general, niveluri ridicate ale ambelor, sugerând că ar putea fi un instrument eficient în detectarea bacteriilor.

Tabelul. Date demografice și rezultate clinice

Studiu	Vârsta (mediană)	Sex (% femei - bărbați)	Internări la terapie intensivă (%)	Durata de spitalizare (mediană)	Rata de mortalitate (%)
Alosaimi [35]	52.0	33.0% - 77.0%	29.0	ND	19.0
Bogdan [36]	>18.0	49.0% - 51.0%	6.7	12.4	5.5
Cohen [37]	67.0	30.0% - 70.0%	ND	24.0	38.7
Foschi [38]	>18.0	ND	100	ND	ND
Huang [39]	72.0	31.8% - 68.2%	9.5	7.0	8.5
Karolyi [40]	62.5	20.0% - 80.0%	100	7.0	36.7
Maataoui [41]	57.0	18.0% - 82.0%	100	19.0	56.0
Rothe [42]	58.5	36.5% - 63.5%	23.4	9.0	4.5
Soto [43]	61.7	29.0% - 71.0%	ND	ND	31.0

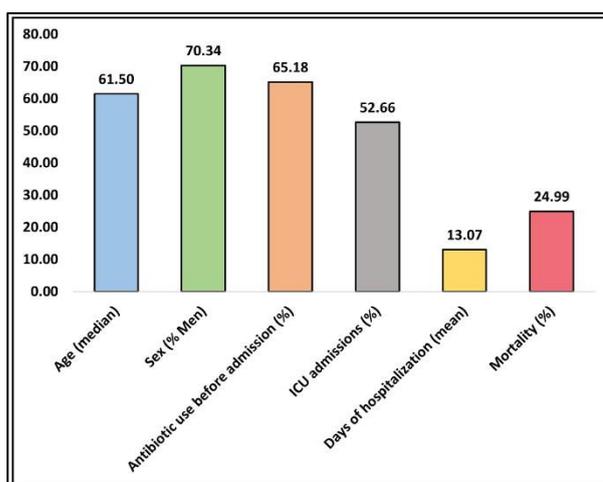


Figura 5 - Rezumatul constatărilor.

CONCLUZII

Infecțiile bacteriene care sunt identificate la pacienții cu COVID-19 pot duce la rezultate mai negative, în special atunci când este vorba de pacienții cu o infecție severă care sunt spitalizați cu COVID-19. Ținând cont de ratele ridicate de coinfectie și de procentul ridicat de antibiotice utilizate de către persoane înainte de spitalizare, trebuie implementate metode eficiente de diagnosticare și tratament în timp util pentru a reduce rata mortalității și pentru a preveni diagnosticarea eronată a infecțiilor. Acest lucru va permite reducerea numărului de infecții care sunt diagnosticate incorect. În ceea ce privește diferitele teste PCR, atât PCR multiplex, cât și RT-PCR au o sensibilitate și o specificitate ridicate, indiferent de panoul utilizat pentru detectarea bacteriilor, ceea ce le face să fie metode ideale de detectare a coinfecțiilor bacteriene la pacienții COVID-19.