

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Nauk o Zdrowiu

Marta Kłos

**Zakażenia krwi o etiologii *Enterobacteriaceae*  
u hospitalizowanych osób dorosłych w Polsce południowej  
– wybrane aspekty**

*Praca doktorska*

Promotor: prof. dr hab. Jadwiga Wójkowska-Mach

Pracę wykonano w Katedrze Mikrobiologii CM UJ

Kierownik jednostki: prof. dr hab. Małgorzata Bulanda

Kraków 2021

*Składam serdeczne podziękowania  
Pani Profesor Jadwidze Wójkowskiej-Mach,  
promotorce niniejszej pracy  
za opiekę naukową, pomoc merytoryczną i cierpliwość.  
Szczególne podziękowania składam także  
Pani dr hab. Agnieszce Chmielarczyk oraz Pani dr Dorocie Romaniszyn  
za cenne uwagi i wskazówki,  
a także mojej Rodzinie za wsparcie i motywację.*

## WYKAZ SKRÓTÓW

AmpC	ang. <i>class C <math>\beta</math>-lactamase</i> , $\beta$ -laktamaza klasy C
BJ	ang. <i>bone and joint infection</i> , zakażenie kości i stawów
bp	ang. <i>base pair</i> , para zasad
BSI	ang. <i>bloodstream infection</i> , zakażenie krwi
CAUTI	ang. <i>catheter-associated urinary tract infection</i> , zakażenie dróg moczowych związane z cewnikiem
CDC	ang. <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> , Centrum Kontroli Zakażeń i ich Zapobiegania
CFU	ang. <i>colony forming unit</i> , jednostka tworząca kolonię
CLABSI	ang. <i>central line-associated bloodstream infection</i> , zakażenie krwi związane z cewnikiem centralnym
CNS	ang. <i>coagulase-negative staphylococci</i> , gronkowce koagulazoujemne
CRBSI	ang. <i>catheter related bloodstream infection</i> , zakażenie krwi związane z cewnikiem
CPE	ang. <i>carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> , pałeczki <i>Enterobacteriaceae</i> produkujące karbapenemazy
CRE	ang. <i>carbapenem-resistant Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> odporne na karbapenemy
CTX-M	ang. <i>cefotaximase-Munich</i> , nazwa enzymu wskazuje na jego właściwości hydrolityczne wobec cefotaksymu oraz miasta, gdzie pierwszy raz go wyizolowano
CVC	ang. <i>central venous catheter</i> , centralny cewnik żylny
CVS-VASC	ang. <i>cardiovascular system infection-arterial or venous infection</i> , zakażenie układu sercowo-naczyniowego; zakażenie tętnic lub żył
DAEC	ang. <i>diffusely adhering E.coli</i> , szczepy <i>E.coli</i> dyfuzyjnie przylegające
EAEC	ang. <i>enteroaggregative E.coli</i> , enteroagregacyjne szczepy <i>E.coli</i>
ECDC	ang. <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> , Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób
EHEC	ang. <i>enterohemorrhagic E.coli</i> , enterokrwotoczne szczepy <i>E.coli</i>
EIEC	ang. <i>enteroinvasive E.coli</i> , enteroinwazyjne szczepy <i>E.coli</i>

EPEC	ang. <i>enteropathogenic E.coli</i> , enteropatogenne szczepy <i>E.coli</i>
ESBLs	ang. <i>extended spectrum <math>\beta</math>-lactamases</i> , $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania
ETEC	ang. <i>enterotoxinogenic E.coli</i> , enterotoksynogenne szczepy <i>E.coli</i>
EUCAST	ang. <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> , Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości
ExPEC	ang. <i>extraintestinal pathogenic E.coli</i> , <i>E.coli</i> wywołująca zakażenia pozajelitowe
GES	ang. <i>Guiana extended spectrum</i> , nazwa karbapenemazy pochodzi od miejsca, w którym została pierwszy raz wyizolowana
GIT	ang. <i>gastrointestinal tract infection</i> , zakażenie przewodu pokarmowego
HAI	ang. <i>hospital-acquired infection</i> , zakażenie nabyte w szpitalu
HCAI	ang. <i>healthcare associated infection</i> , zakażenie związane z opieką zdrowotną
HUS	ang. <i>haemolytic uremic syndrome</i> , hemolityczny zespół mocznicowy
IAB	ang. <i>intraabdominal infection</i> , zakażenie w obrębie jamy brzusznej
IMI	ang. <i>imipenem-hydrolyzing <math>\beta</math>-lactamase</i> , typ karbapenemazy wyizolowany z izolatów <i>E.cloacae</i>
IMP	ang. <i>imipenemase metallo-<math>\beta</math>-lactamase</i> , typ metalo- $\beta$ -laktamaz
KPC	ang. <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i> , karbapenemaza <i>Klebsiella pneumoniae</i>
LCBSI	ang. <i>laboratory confirmed bloodstream infection</i> , laboratoryjnie potwierdzone zakażenie krwioobiegu
LRI	ang. <i>lower respiratory tract infection</i> , zakażenie dolnych dróg oddechowych
<i>magA</i>	ang. <i>mucoviscosity-associated gene A</i>
MALDI-TOF MS	ang. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MBL	ang. <i>metallo-<math>\beta</math>-lactamases</i> , metalo- $\beta$ -laktamazy
MCSD	ang. <i>mechanical circulatory support device</i> , mechaniczne urządzenie wspomagające krążenie
MDR	ang. <i>multi-drug resistance</i> , wielolekooporność

MLSA	ang. <i>Multilocus Sequence Analysis</i>
MR/P fimbriae	ang. <i>mannose-resistant Proteus-like fimbriae</i>
NDM	ang. <i>New Delhi metallo-β-lactamase</i> , nazwa metalo-β-laktamazy pochodzi od miejsca, w którym została pierwszy raz wyizolowana
NHSN	ang. <i>National Healthcare Security Network</i>
NMC	ang. <i>not metalloenzyme carbapenemase</i> , typ karbapenemazy niezwiązanej z metalo-β-laktamazami, wyizolowany z izolatów <i>E.cloacae</i>
OXA	ang. <i>oxacillinase</i> , β-laktamaza klasy D hydrolizująca penicyliny i karbapenemy
PBP	ang. <i>penicillin-binding protein</i> , białko wiążące penicylinę
PCR	ang. <i>polymerase chain reaction</i> , reakcja łańcuchowa polimerazy
PFGE	ang. <i>pulsed-field gel electrophoresis</i> , elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym
REPR	ang. <i>reproductive tract infection</i> , zakażenie układu rozrodczego
RMP	ang. <i>revolutions per minute</i> , obroty na minutę
RND	ang. <i>resistance nodulation cell division</i> , rodzina transporterów typu efflux pumps
SHV	ang. <i>sulphydryl variable</i> , typ β-laktamazy, której skrót opisuje właściwości biochemiczne enzymu
SIRS	ang. <i>systemic inflammatory response syndrome</i> , zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej
SME	ang. <i>Serratia marcescens enzyme</i> , typ karbapenemazy pierwszy raz wyizolowany ze szczepów <i>S.marcescens</i>
SSI	ang. <i>surgical site infection</i> , zakażenie miejsca operowanego
SST	ang. <i>skin and soft tissue infection</i> , zakażenie skóry i tkanek miękkich
ST	ang. <i>sequence type</i> , typ sekwencyjny
STEC	ang. <i>Shiga toxin-producing E.coli</i> , szczepy <i>E.coli</i> wytwarzające toksynę Shiga
SUTI	ang. <i>symptomatic urinary tract infection</i> , objawowe zakażenie dróg moczowych
TEM	typ β-laktamazy, nazwa jest skrótem od nazwiska pacjenta Temoniera, od którego wyizolowano oporne bakterie

UTI	ang. <i>urinary tract infection</i> , zakażenie dróg moczowych
VAE	ang. <i>ventilator-associated event</i> , zdarzenie niepożądane związane z użyciem respiratora
VIM	ang. <i>Verona integron-encoded metallo-β-lactamase</i> , typ metalo-β-laktamazy, którego nazwa pochodzi od miejsca, gdzie została po raz pierwszy wyizolowana
WHO	ang. <i>World Health Organization</i> , Światowa Organizacja Zdrowia

## SPIS TREŚCI

1. WSTĘP.....	9
1.1. Charakterystyka bakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i> .....	9
1.1.1. Zmiany w nomenklaturze .....	10
1.1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	11
1.1.3. <i>Klebsiella</i> sp.....	14
1.1.4. <i>Enterobacter cloacae</i> .....	15
1.1.5. <i>Citrobacter</i> sp. ....	15
1.1.6. <i>Salmonella enteritidis</i> .....	16
1.2. Rodzina <i>Yersiniaceae</i> .....	17
1.2.1. <i>Serratia marcescens</i> .....	17
1.3. Rodzina <i>Morganellaceae</i> .....	17
1.3.1. <i>Morganella morganii</i> .....	17
1.3.2. <i>Proteus mirabilis</i> .....	17
2. ZAKAŻENIA KRWI U DOROSŁYCH .....	19
2.1. Pierwotne BSIs.....	20
2.1.1. Zakażenie krwi związane z cewnikiem (ang. <i>catheter related bloodstream infection</i> , CRBSI).....	21
Zakażenie krwi związane z cewnikiem centralnym (ang. <i>central line-associated bloodstream infection</i> , CLABSI).....	21
2.2. Wtórne BSIs.....	22
2.2.1. Zakażenia dróg moczowych (ang. <i>urinary tract infections</i> , UTIs) .....	23
Objawowe zakażenie dróg moczowych (ang. <i>symptomatic urinary tract infection</i> , SUTI) ..	23
Zakażenia dróg moczowych związane z cewnikiem (ang. <i>catheter-associated urinary tract infections</i> , CAUTIs).....	23
2.2.2. Zakażenia miejsca operowanego (ang. <i>surgical site infections</i> , SSIs).....	23
2.3. Wtórne BSI inne niż wymienione .....	23
2.3.1. Mechaniczne urządzenia wspomagające krążenie (ang. <i>mechanical circulatory support devices</i> , MCSDs).....	24
2.4. Profilaktyka zakażeń krwi.....	24
2.5. Sepsa kliniczna.....	24
3. LEKOOPORNOŚĆ DROBNOUSTROJÓW .....	26
3.1. Oporność naturalna .....	26
3.2. Oporność nabyta .....	27

3.2.1. $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ang. <i>extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamases</i> , ESBLs).....	28
4. IDENTYFIKACJA GATUNKOWA METODĄ MALDI-TOF MS.....	31
5. CEL PRACY .....	34
6. MATERIAŁY I METODY .....	35
6.1. Charakterystyka badanych szczepów.....	35
6.2. Analiza epidemiologiczna.....	36
6.3. Identyfikacja gatunkowa .....	36
6.4. Czynniki etiologiczne zakażeń krwi .....	37
6.5. Bankowanie szczepów .....	37
6.6. Fenotypowe oznaczenie lekooporności metodą BD Phoenix™ .....	38
6.7. Izolacja DNA genomowego.....	39
6.8. Reakcja PCR, multipleks PCR i elektroforeza.....	39
6.9. Oznaczenie wybranych genów wirulencji <i>Escherichia coli</i> ESBL+.....	41
6.10. Oznaczenie wybranych genów wirulencji <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL+.....	41
6.11. Oznaczanie wybranych genów oporności metodami molekularnymi.....	41
6.12. Analiza genetycznego podobieństwa między szczepami <i>Klebsiella pneumoniae</i> metodą PFGE (ang. <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> ) .....	41
7. WYNIKI.....	44
7.1. Etiologia drobnoustrojowa przypadków zakażeń krwi .....	44
7.2. Analiza epidemiologiczna zakażeń krwi o etiologii <i>Enterobacterales</i> .....	46
7.3. Wirulencja badanych szczepów <i>Enterobacterales</i> .....	47
7.3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	47
7.3.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	48
7.4. Lekooporność pałeczek <i>Enterobacterales</i> izolowanych z zakażeń krwi.....	50
7.4.1. Lekooporność pałeczek <i>Enterobacterales</i> izolowanych z zakażeń krwi na oddziałach internistycznych .....	50
7.4.2. Lekooporność pałeczek <i>Enterobacterales</i> izolowanych z zakażeń krwi na oddziałach zabiegowych .....	52
7.4.3. Lekooporność pałeczek <i>Enterobacterales</i> izolowanych z zakażeń krwi na oddziałach intensywnej terapii .....	54
7.5. Wrażliwość szczepów <i>Escherichia coli</i> oraz <i>Klebsiella pneumoniae</i> według grup antybiotyków.....	56
7.6. Mechanizmy oporności .....	59
7.7. Lekooporność pałeczek <i>Enterobacterales</i> ESBL+ .....	60



7.8. Genotypowanie szczepów ESBL+ .....	64
7.9. Typowanie metodą PFGE szczepów <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL+ z oddziałów zabiegowych celem wykrycia epidemii klonalnych.....	65
8. DYSKUSJA.....	67
8.1. Etiologia drobnoustrojowa przypadków zakażeń krwi .....	67
8.2. Czynniki zjadliwości szczepów <i>Enterobacterales</i> .....	69
8.3. Lekooporność szczepów <i>Enterobacterales</i> .....	71
8.4. Horyzontalne rozprzestrzenienie szczepów <i>K.pneumoniae</i> ESBL+ na oddziałach zabiegowych.....	74
9. WNIOSKI KOŃCOWE .....	76
10. STRESZCZENIE .....	78
11. SUMMARY .....	79
12. WYKAZ TABEL I RYCIN.....	80
12.1. Wykaz rycin .....	80
12.2. Wykaz tabel.....	80
13. LITERATURA .....	82

## 1. WSTĘP

Jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny są zakażenia związane z udzielaniem świadczeń zdrowotnych, tradycyjnie opisywanych w języku polskim jako szpitalne, w latach 90-tych XX wieku określano je również jako zakażenia zakładowe. Do najczęściej wymienianych zakażeń szpitalnych, poza zakażeniem krwi (ang. *bloodstream infection*, BSI), zalicza się zapalenie płuc, zakażenia dróg moczowych i zakażenia miejsca operowanego. Zmienia się udział, prevalencja różnych grup i gatunków drobnoustrojów w zakażeniach szpitalnych, w zależności od oddziału i rodzaju zakażenia. Największą sklasyfikowaną grupą drobnoustrojów, mających znaczenie w patogenezie zakażeń krwi, są pałeczki Gram-ujemne. W ostatnich latach wzrosła zachorowalność i śmiertelność związana z BSI, których drobnoustrojowym czynnikiem etiologicznym były właśnie drobnoustroje Gram-ujemne. Priorytetami współczesnej medycyny powinny być profilaktyka zakażeń związanych ze świadczeniem usług medycznych, skuteczna diagnostyka i antybiotykoterapia oraz wdrażanie efektywnych programów kontroli zakażeń.

### 1.1. Charakterystyka bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*

Rodzina *Enterobacteriaceae* to Gram-ujemne, względnie beztlenowe oraz nie tworzące spor pałeczki. Są one ruchliwe (poza *Klebsiella* sp. i *Shigella* sp.), katalazododatnie a podczas fermentacji glukozy głównym produktem są kwasy. Rodziną blisko spokrewnioną fenotypowo do *Enterobacteriaceae* jest *Vibrionaceae* – również fermentują glukozę, test oksydazowy ma wynik ujemny oraz zachodzi redukcja azotanów do azotynów [1].

Pałeczki *Enterobacteriaceae* są szeroko rozpowszechnione i można je znaleźć w glebie, wodzie, wśród roślinności, ale także w przewodach pokarmowych zwierząt i ludzi, gdzie stanowią składową ich mikrobioty [2]. Niektóre z pałeczek stanowią patogeny oportunistyczne i związane są z chorobami biegunkowymi oraz zakażeniami pozajelitowymi.

Zidentyfikowano wiele czynników zjadliwości u *Enterobacteriaceae* przenoszonych wewnątrzgatunkowo – obejmują one m.in. [1, 3, 4]:

- o Lipopolisacharyd, znajdujący się w zewnętrznej błonie, odgrywa rolę w ochronie bakterii przed detergentami, barwnikami i antybiotykami i składa się z: lipidu A, rdzenia oligosacharydowego oraz bocznych łańcuchów oligosacharydowych (antygen O); lipid A, inaczej zwany endotoksyną, jest aktywną biologicznie częścią

cząsteczki; klasyfikacja serologiczna pałeczek *Enterobacteriaceae* opiera się na antygenie O;

- Polisacharydy powierzchniowe, w tym wspólny antygen powierzchniowy (ang. *enterobacterial common antigen*) i otoczki. Otoczki nadają bakteriom zdolności antyfagocytarne, a w niektórych przypadkach pełnią rolę w patogenezie poszczególnych zakażeń;
- Rzęski złożone ze spiralnej matrycy, białka i flageliny nadają ruch bakteriom w środowisku płynnym oraz pomagają inicjować stan zapalny w organizmie gospodarza; poprzez zmienność flageliny, czyli antygeny H, możliwe jest typowanie gatunków;
- Fimbrie pełnią rolę w adhezji do komórek gospodarza, natomiast pilusy biorą udział w wymianie genów poprzez koniugację oraz w tworzeniu biofilmu poprzez autoagregację;
- Adhezyny są niezbędnym elementem w mechanizmie chorobotwórczości *Enterobacteriaceae* umożliwiającym przyleganie komórek bakteryjnych do komórek gospodarza. Do adhezyn można zaliczyć: fimbrie typu I (kluczowe w zakażeniach dróg moczowych), fimbrie typu IV czy intiminę;
- Toksyny zdolne do lizy komórek gospodarza, do których należą m.in. enterotoksyny *E.coli*, w tym hemolizyna. Ponadto stwierdzono działanie bakteryjnych systemów wydzielania ułatwiających transport toksyn przez błonę i do wnętrza komórki gospodarza.
- System pozyskiwania żelaza, który znacząco zwiększa zjadliwość bakterii, co udowodniono na przykładzie *Yersinia* sp. Pałeczki *Yersinia* sp. tworzą wysoko zjadliwe wyspy (ang. *high pathogenicity island*, HPI) zaangażowane, poprzez siderofory zwane yersiniabaktyną, w wychwytywanie żelaza [5]. U *Enterobacteriaceae* pozyskiwanie żelaza poprzez siderofory jest szeroko rozpowszechnione, a najczęściej wykorzystywanym sideroforem jest enterobaktyna.

#### **1.1.1. Zmiany w nomenklaturze**

W 2016 roku, na podstawie dokonanych przez Adeolu i wsp. badań genetycznych, zaproponowano zmiany filogenetyczne w rzędzie Enterobakterii, w tym zmianę

w nazwie *Enterobacteriales* na *Enterobacterales* [6]. Zmian filogenetycznych obejmujących przedstawicieli rzędu *Enterobacterales* dokonano opierając się na analizie białek rdzeniowych (ang. *core proteins*), białek rybosomalnych oraz analizie białek MLSA (ang. *Multilocus Sequence Analysis*) [6]. W przedstawionej pracy użyto najnowszej nomenklatury.

Rząd *Enterobacterales* tworzy siedem rodzin mikroorganizmów, w tym: *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae*, *Budviciaceae*. W niniejszej pracy istotną rolę pełnią trzy rodziny drobnoustrojów – *Enterobacteriaceae*, *Yersiniaceae* oraz *Morganellaceae*. Głównymi przedstawicielami pierwszej i największej grupy *Enterobacteriaceae* są: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* i *Shigella* [6, 7]. Wymienione patogeny są dobrze rozpoznawalne i w znacznym stopniu poznane. Do następnej grupy *Yersiniaceae* zalicza się m.in.: *Yersinia* i *Serratia*, natomiast do rodziny *Morganellaceae*: *Proteus* i *Morganella*. Patogeny z rodziny *Yersiniaceae* stanowią przedmiot zainteresowania naukowców ze względu na czynnik wywołujący epidemię [8, 9]. Udowodniono także, że członkowie rodziny *Yersiniaceae* mieli wspólnego unikalnego przodka [6].

Do najbardziej istotnych klinicznie w medycynie ludzkiej pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* zalicza się *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* i *Yersinia* [10]. Do izolacji *Enterobacteriaceae* z próbek klinicznych stosuje się: nieselektywne podłoża, takie jak agar z krwią; selektywne podłoża, takie jak agar McConkeya lub wzbogacone buliony do hodowli pałeczek Gram-ujemnych. Szczepy z tej rodziny dają się łatwo hodować w temperaturze 35-37<sup>0</sup>C, bez specjalnych wymagań atmosferycznych, na agarze z krwią lub agarze czekoladowym [1]. Buliony wzbogacone są wyjątkowo przydatne do uzyskiwania pałeczek *Salmonelli* z próbek kału [1].

Poniżej omówiono kluczowe dla tej rozprawy gatunki z rodziny *Enterobacteriaceae*: *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter* sp. oraz *Salmonella enteritidis*, a także scharakteryzowano gatunki w obrębie rzędu *Enterobacterales*: *Serratia marcescens*, *Morganella morganii* i *Proteus mirabilis*.

### **1.1.2. *Escherichia coli***

Nazwa rodzajowa tych pałeczek pochodzi od ich odkrywcy – Theodora Eschericha, austriackiego lekarza, który prowadził badania nad florą jelitową noworodków [1].

Pałeczki *Escherichia* fermentują laktozę oraz wytwarzają indol z tryptofanu w obecności tryptofanazy, czym odróżniają się od innych bakterii jelitowych [11].

Jak wcześniej wspomniano, *E.coli* zamieszkuje ludzki przewód pokarmowy jako część ludzkiej mikrobioty, gdzie stanowi najliczniejszą grupę pałeczek jelitowych, ale także powoduje zakażenia jelitowe i pozajelitowe (ang. *extraintestinal pathogenic E.coli*, ExPEC) u osób z obniżoną odpornością [10]. Często są to zakażenia dróg moczowych, zakażenia ran, zapalenie opon mózgowych u dzieci czy hemolityczny zespół mocznicowy (ang. *haemolytic uremic syndrome*, HUS) [11]. Szczepy *E.coli* wywołujące zakażenia pozajelitowe charakteryzują się występowaniem fimbrii, syntezą hemolizyny, obecnością wielu mechanizmów wychwytu żelaza oraz brakiem kapsułki polisacharydowej [4]. Ponadto stwierdzono występowanie toksyn i adhezyn mających znaczący wpływ na zakażenia dróg moczowych powiązanych z ExPEC [4]. Od 2000 roku najczęściej izolowanym szczepem z zakażeń pozajelitowych, niezależnie od regionu geograficznego, był szczep epidemiczny *E.coli* ST131 (ang. *sequence type*) [12]. Stwierdzono, że tak duże rozprzestrzenienie szczepu ST131 umożliwiły plazmidy przenoszące geny wirulencji oraz oporności wielolekowej [12].

Klasyfikacja filogenetyczna dzieli grupę pałeczek *E.coli* na siedem grup: A, B1, B2, C, D, E i F [13, 14]. Patogenne szczepy pozajelitowe należą do grupy B2 lub D natomiast niepatogenne do grupy A lub B1 [13]. Stwierdzono występowanie wielu czynników wirulencji wśród patogennych pozajelitowych szczepów *E.coli* [14]. W grupie filogenetycznej B2 zaobserwowano najwyższą częstość genów wirulencji, takich jak geny adhezji (*papC*), geny związane z transportem żelaza (*fyuA*) czy geny toksyn (*hlyA*) [14]. Hemolizyna *E.coli* (*hlyA*) jest egzotoksyną, która przyczynia się do szczególnej zjadliwości szczepów podczas bakteriemii i sepsy [15]. Gen adhezji *fimH* powiązany z patogenezą zakażeń dróg moczowych, gdyż pośredniczy w przyleganiu i inwazji komórek bakteryjnych do komórek nabłonka pęcherza [16]. Obecność genów wychwytu żelaza – *iutA*, *fyuA*, *iroN* powoduje zwiększoną śmiertelność pacjentów z bakteriamią [16, 17, 18]. Fimbrie typu P, kodowane przez geny *papC* i *papEF*, obserwowane w uropatogennych szczepach *E.coli* (ang. *uropathogenic E.coli*) zwiększają wirulencję szczepów oraz są odpowiedzialne za reakcje zapalne w drogach moczowych [19].

Klasyfikacja serologiczna pałeczek *E.coli* opiera się na antygenach powierzchniowych O, K i H [20]. Antygen O jest częścią lipopolisacharydu w błonie zewnętrznej, antygen K związany jest z otoczką polisacharydową *E.coli* – znanych jest ponad 80 różnych serotypów – natomiast antygen H to antygen rzęskowy bakterii [10,

20]. Antygeny O i K biorą udział w hamowaniu fagocytozy i przeżyciu bakterii w surowicy gospodarza [21]. Antygeny O, K i H, występując w dowolnej kombinacji, tworzą ogromną bazę szczepów bakteryjnych różniących się profilem immunologicznym [20].

W zależności od mechanizmu wywoływania zakażenia wyodrębniono sześć patotypów *E.coli* [11, 22]:

- EPEC – szczepy enteropatogenne – są przyczyną biegunek u niemowląt z wysokim wskaźnikiem śmiertelności (nawet powyżej 30%) oraz biegunek u podróżnych, wytwarzają adhezyny (m.in. intimina, Iha; pile), ale nie produkują enterotoksyn;
- EHEC – szczepy enterokrwotoczne – wytwarzają toksynę Shiga (ang. *Shiga toxin-producing E.coli*, STEC), syntezują wiele adhezyn (w tym: intimina, toksyna B, czynnik adhezji *Efa*, białko wiążące immunoglobulinę, adhezyna autoaglutynująca), związane są z zatruciami pokarmowymi, ale także z poważniejszymi chorobami takimi jak: krwotoczne zapalenie jelita grubego, HUS czy zakrzepowa płamica małopłytkowa, mogącymi zakończyć się zgonem; najlepiej poznanym szczepem tego gatunku jest enterokrwotoczny szczep *E.coli* O157:H7 [11];
- EIEC – szczepy enteroinwazyjne – są szczepami nieadherentnymi, nieruchliwymi i nie fermentującymi laktozy, powodują czerwonkę przy pomocy podobnego mechanizmu jak *Shigella* sp., również przebieg choroby przypomina czerwonkę wywołaną przez szczepy *Shigella* sp.;
- EAEC – szczepy enteroagregacyjne – syntezują adhezyny oraz toksyny (enterotoksynę termostabilną, enterotoksynę *Shigella*, hemolizynę) i są przyczyną przewlekłych biegunek niemowlęcych;
- ETEC – szczepy enterotoksynogenne – wywołują zapalenie żołądka i jelit z towarzyszącymi biegunkami i skurczami brzucha, szczególnie u dzieci oraz nawet u 60% podróżujących w strefy tropikalne, ponadto produkują czynniki kolonizacyjne a także enterotoksyny (termostabilna i termolabilna) mające wpływ na nadmierną utratę płynów;
- DAEC – szczepy dyfuzyjnie przylegające – syntezują adhezyny fimbrialne i niefimbrialne oraz są przyczyną biegunek u dzieci.

### 1.1.3. *Klebsiella* sp.

Pałeczki *Klebsiella* sp. fermentują laktozę, są nieruchliwe, występują powszechnie w przyrodzie – w glebie, wodzie oraz u zwierząt; powodują skażenie urządzeń medycznych, można je także izolować z ludzkiego przewodu pokarmowego oraz błon śluzowych nosa i gardła [1]. Większość szczepów rośnie na prostych podłożach, chociaż izolaty *K.pneumoniae* z moczu wymagają cysteiny do wzrostu [23]. *K.oxytoca* od *K.pneumoniae* odróżnia się na podstawie pozytywnego testu indolowego. Głównymi przedstawicielami rodzaju *Klebsiella* sp. są gatunki *K.pneumoniae* i *K.oxytoca*.

Rodzaj *Klebsiella* produkuje silnie śluzowate kolonie dzięki mocno rozbudowanej otoczce polisacharydowej. To właśnie otoczka polisacharydowa jest głównym czynnikiem zjadliwości u *Klebsiella pneumoniae* i odpowiada za tworzenie śluzu oraz hamowanie fagocytozy [4]. Dowiedziono, że szczepy syntezujące otoczki typu K1, K2, K4 i K5 wykazują szczególną zjadliwość poprzez wysoką odporność na fagocytozę neutrofilów, co wiąże się z zawartością mannozy w otoczce [23, 24]. Hiperwirulentne szczepy *K.pneumoniae*, zwłaszcza wytwarzające polisacharydowe otoczki K1 i K2, połączono z obecnością genów *rmpA* (regulator fenotypu śluzowego A) oraz *magA* (ang. *mucoviscosity-associated gene A*) [25]. Poza funkcją antyfagocytarną otoczki hamują różnicowanie i funkcjonowanie makrofagów, powodując paraliż immunologiczny [24]. Do innych genów związanych z syntezą otoczki polisacharydowej *K.pneumoniae* zalicza się *wabG*, odpowiedzialny za biosyntezę rdzenia lipopolisacharydowego, oraz *uge*, kodujący enzym biorący udział w syntezie otoczki [26]. Badania pokazały, że szczepy z otoczką typu K1 były często powiązane z występowaniem ropnia wątroby u pacjentów [23], natomiast serotyp K2 był najczęściej izolowany od pacjentów z zakażeniem dróg moczowych, zapaleniem płuc lub bakteriecią [24]. Zarówno typ K1 jak i K2 skorelowano z wysokimi wskaźnikami śmiertelności w Europie [26]. Ponadto, tak jak inne szczepy z rodziny *Enterobacteriaceae*, do czynników zjadliwości *Klebsiella* sp. zalicza się fimbrie (typu I odpowiadające za kolonizację dróg moczowo-płciowych i oddechowych, typu III aglutynujące tylko erytrocyty), lipopolisacharyd oraz siderofory (enterobaktyna i aerobaktyna) [1, 23, 24]. Szczepy wielolekooporne niosą geny oporności na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe i karbapenemy.

*Klebsiella* sp. jest przyczyną zarówno zakażeń szpitalnych jak i pozaszpitalnych [1], jednak większość zakażeń o tej etiologii to zakażenia oportunistyczne u pacjentów

hospitalizowanych czy operowanych [4]. Szczególnie ciężki przebieg opisuje się w przypadku pozaszpitalnego zapalenia płuc wywołanego pałeczkami *Klebsiella* sp., z wysoką gorączką, krwiopluciem (plwocina przypomina wyglądem galaretkę porzeczkową) oraz ropniami [23]. Jako patogen oportunistyczny *Klebsiella* sp. powoduje rozwój zakażeń głównie u osób z obniżoną odpornością, hospitalizowanych, cierpiących na choroby przewlekłe, np. u pacjentów z cukrzycą obserwuje się zmiany septyczne m.in. zapalenie wnętrza gałki ocznej, ropnie mózgu, ropne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie stawów [23, 24]. Najczęściej to gatunek *K.pneumoniae* wywołuje zapalenia płuc, zakażenia dróg moczowych, sepsę, zakażenia ran czy zapalenie otrzewnej [4]. *K.oxytoca*, podobnie jak *K.pneumoniae*, powoduje zakażenia pozaszpitalne, ale są one znacznie rzadsze [23].

#### **1.1.4. *Enterobacter cloacae***

Hodowlę pałeczek *Enterobacter cloacae* można prowadzić na każdym sztucznym podłożu. Fermentują glukozę oraz laktozę, produkując dwa razy więcej dwutlenku węgla niż wodoru [1]. Są ruchliwe oraz tworzą śluzowate kolonie. W teście czerwieni metylowej *E.cloacae* daje wynik ujemny, nie produkuje także siarkowodoru. Pałeczki należące do *E.cloacae* są szeroko rozpowszechnione w środowisku [27], stanowią też część mikrobioty przewodu pokarmowego i są zdolne do wywoływania zakażeń oportunistycznych u osób hospitalizowanych lub z chorobami przewlekłymi [1, 4, 27].

Szczepy *E.cloacae* często wytwarzają kapsułki polisacharydowe oraz aerobaktynę zwiększającą ich zjadliwość oraz wpływającą na wychwyty żelaza [4]. Wykazano, że *E.cloacae* posiada zdolności hemaglutynacyjne oraz syntezuje enterotoksyny [27]. Pałeczki *E.cloacae* są naturalnie odporne na ampicylinę, często przenoszą też geny oporności na wiele innych antybiotyków (cefalosporyny, karbapenemy,  $\beta$ -laktamy) [4]. Stanowią jedną z najczęstszych przyczyn szpitalnych zakażeń krwi pałeczkami Gram-ujemnymi, a także związany z tym wzrost oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe [28]. *E.cloacae* wywołuje zapalenie płuc, zakażenia dróg moczowych, zakażenia ran czy zapalenie opon mózgowych [4].

#### **1.1.5. *Citrobacter* sp.**

Pałeczki *Citrobacter* sp. są urzęsione perytrychalnie i mogą wykorzystywać cytrynian jako jedyne źródło węgla [1, 4]. Fermentują laktozę, zaś *C.freundii* wytwarza siarkowódór, podobnie jak pałeczki *Salmonelli* [4]. W celach diagnostycznych szczepy *Citrobacter* sp. dają pozytywny wynik w teście indolowym oraz teście czerwieni



metylowej [1]. Rodzaj *Citrobacter* obejmuje 11 gatunków [1], z których *C.freundii* oraz *C.koseri* są powiązane z zakażeniami u ludzi [4]. Szczepy *Citrobacter* sp. najczęściej izolowano z dróg moczowych (często u pacjentów z cewnikiem w pęcherzu moczowym) oraz z dróg oddechowych [4]. Są patogenami oportunistycznymi, szczególnie niebezpiecznymi dla pacjentów w neutropenii [29]. *C.koseri* wiązano z przypadkami noworodkowego zapalenia opon mózgowych i ropnia mózgu, natomiast *C.freundii* z zapaleniem żołądka i jelit oraz sepsą [29]. Jak wcześniej wspomniano, szczepy *Citrobacter* sp. są przyczyną zapalenia płuc, zapalenia wsierdza czy zakażenia tkanek miękkich [4, 30]. Zabiegi operacyjne przyczyniają się do wystąpienia bakteriemii spowodowanej *Citrobacter* sp. [31].

#### **1.1.6. *Salmonella enteritidis***

To oksydazo-ujemna, nie fermentująca laktozy, wytwarzająca siarkowodór pałeczka [10]. Jest ruchliwa, urzęsiona perytrychalnie [1]. Pałeczki *Salmonelli* zakażają tylko ludzi [2], a do zakażenia dochodzi poprzez spożycie skażonej żywności lub wody, kontakt z osobą zakażoną lub drogą fekalno-pokarmową [1, 2]. Pałeczki *Salmonelli* posiadają mechanizmy pozwalające im przetrwać w kwaśnym środowisku żołądka. Atakują komórki jelitowe poprzez endocytozę i namnażanie się w wyspecjalizowanych wakuolach.

Istnieją dwa kliniczne objawy salmonellozy: zapalenie żołądka i jelit oraz dur brzuszny [2]. Dur brzuszny to ogólnoustrojowe zakażenie charakteryzujące się skolonizowaniem przez bakterie wątroby, śledziony, szpiku kostnego z objawami obejmującymi m.in. gorączkę, bóle głowy, bóle mięśni, krótkie napady nudności czy biegunki [2]. W mechanizmie chorobotwórczości *S.enteritidis* biorą udział tzw. wyspy patogeniczności (ang. *pathogenicity islands*) [10]. System SP1 koduje mechanizm ułatwiający endocytozę białek bakteryjnych do komórek jelitowych, natomiast system SP2 reaguje na odpowiedź gospodarza. Ponadto *Salmonella* sp. syntezuje szereg różnych adhezyn (fimbrie typu I, fimbrie Std, fimbrie Pef) pomagających w przyleganiu do komórek jelitowych gospodarza [2]. Cały proces reakcji zapalnej organizmu polega na syntezie wielu czynników zapalnych, a tym samym zmian w sekrecji płynów i elektrolitów prowadzących do zapalenia żołądka, zapalenia okrężnicy i biegunki [10].

## **1.2. Rodzina *Yersiniaceae***

### **1.2.1. *Serratia marcescens***

Pałeczki *Serratia marcescens* rosną na podłożach bez dodatkowych czynników wzrostu [1]. Fermentują laktozę, rzadko są ruchliwe oraz wytwarzają zewnątrzkomórkową DNazę niszczącą materiał genetyczny komórek gospodarza [4]. *S.marcescens* występuje w środowisku nieożywionym, rzadko można ją wyizolować z ludzkiej flory [4]. Syntezuje czerwony pigment nazywany prodigiozyną [1].

Szczepy *S.marcescens* powodują wiele różnych zakażeń szpitalnych [4]. Ze względu na wysoką odporność bakterii na trudne warunki, komórki bakteryjne przeżywają w środkach dezynfekujących [4]. Stwierdzono, że zakażenia *S.marcescens* mają szczególnie związek z osobami dożylnie stosującymi narkotyki [4]. W USA *S.marcescens* powoduje około 10% wszystkich bakteriemii na oddziałach intensywnej terapii [10]. Ponadto najczęstszymi miejscami zakażenia są drogi oddechowe, drogi moczowe, rany a także zapalenia stawów, kości, opon mózgowych czy gałki ocznej [4]. Izolaty *S.marcescens* wykazują oporność na wiele środków drobnoustrojowych, w tym ampicylinę, cefalosporynę i karbapenemy [4].

## **1.3. Rodzina *Morganellaceae***

### **1.3.1. *Morganella morganii***

Pałeczki *Morganella morganii* nie fermentują laktozy, są ruchliwe [4]. Wytwarzają ureazę, hemolizynę, mają zdolności hemaglutynujące [32]. Tolerują 7,5% stężenie NaCl oraz pH w granicy 4,6-9,2 [1]. Szczepy *M.morganii* są rzadkim izolatem pacjentów hospitalizowanych, zwykle hodowanym z moczu lub ran [4, 33, 34]. Pałeczki *M.morganii* powodują szereg chorób, zarówno ludzkich (zakażenia wątroby, nerek, sepsę, zapalenie osierdzia, ropnie jajników), jak i zwierzęcych (zapalenie płuc u królików) [1]. Najczęstsze zakażenia kliniczne wywoływane przez *M.morganii* obejmują drogi moczowe, tkanki miękkie i drogi żółciowe [32].

### **1.3.2. *Proteus mirabilis***

Pałeczki *Proteus mirabilis* fermentują glukozę, produkują siarkowodór, rosną optymalnie w 37<sup>0</sup>C. Syntezują także ureazę, która ma kluczowy wpływ na rozwój zakażenia dróg moczowych poprzez alkalizację moczu [4, 35]. Charakteryzują się dużą ruchliwością [1]. *P.mirabilis* jest głównie komensalem przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt, ale znajduje się także w wodzie, ściekach i glebie [35].

Wśród czynników zjadliwości *P.mirabilis* należy wymienić fimbrie i rzęski biorące udział w patogenezie zakażeń układu dróg moczowych, z których najważniejsze są fimbrie MR/P (ang. *mannose-resistant Proteus-like fimbriae*) uczestniczące w adhezji do ścian pęcherza moczowego i nerek oraz inwazji do górnego odcinka układu moczowego [4, 36]. Ponadto systemy wychwytu metali niezbędnych dla wzrostu komórki czy białkowe toksyny zapewniające oporność, dostęp do składników odżywczych i ułatwiające kolonizację powierzchni [35].

*P.mirabilis* jest patogenem szczególnie znaczącym w epidemiologii zakażeń szpitalnych, zdolnym do wywoływania różnych zakażeń, jednak najczęstszym zakażeniem jest zakażenie dróg moczowych, zwłaszcza u pacjentów długotrwale cewnikowanych lub z nieprawidłowościami układu moczowego [4, 35]. Zakażenia dróg moczowych wywołane przez *P.mirabilis* są bardziej dotkliwe niż zakażenia spowodowane przez *E.coli* i często prowadzą do odmiedniczkowego zapalenia nerek, tworzenia się kamieni nerkowych czy trwałego uszkodzenia nerek, co prowadzi do sepsy [4, 35]. Często *P.mirabilis* powoduje również noworodkowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, ropniaki, zapalenie kości i szpiku czy zapalenie wsierdzia [34, 37]. Większość szczepów *P.mirabilis* jest wrażliwa na stosowane antybiotyki [34].

## 2. ZAKAŻENIA KRWI U DOROSŁYCH

Zakażenia związane z opieką zdrowotną (ang. *healthcare associated infections*, HAIs) to zakażenia związane z udzielaniem świadczeń medycznych, a więc diagnostyką, leczeniem czy rehabilitacją w szpitalu, innym zakładzie opieki zdrowotnej bądź w związku z leczeniem ambulatoryjnym – np. dializoterapia, które pojawiają się po 48 godzinach lub później po przyjęciu do szpitala lub w ciągu 30 dni po zakończeniu leczenia a nawet dłużej, gdyż po zabiegach operacyjnych z zastosowaniem implantów, zakażenia miejsca operowanego rozpoznaje się nawet do 90 dni [38]. CDC (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*) definiuje zakażenia nabyte w szpitalu (ang. *hospital-acquired infections*, HAIs) jako stan ogólnoustrojowy będący reakcją na czynnik zakaźny lub toksyny patogenu [39]. HAI jest spowodowane czynnikami zakaźnymi pochodzenia endogennego, tj. składnikami mikrobioty skóry, błon śluzowych, przewodu pokarmowego lub egzogennego [39]. Według ECDC (ang. *European Centre for Disease Prevention and Control*) każdego roku przybywa około 4 miliony chorych z HAI [40], natomiast zakażenia krwi stanowią około 11% wszystkich zakażeń szpitalnych [41]. W Polsce w badaniu punktowym PPS odsetek ten jest wyższy i wynosi 18% [42]. Inwazja patogenów do krwioobiegu, czyli zakażenie krwi (ang. *bloodstream infection*, BSI), charakteryzuje się wysoką zachorowalnością oraz śmiertelnością [43], a poza zapaleniem płuc zakażeniami miejsca chirurgicznego (ang. *surgical site infections*, SSIs) oraz zakażeniami dróg moczowych (ang. *urinary tract infections*, UTIs) i stanowi jedno z najczęściej występujących HAIs [38]. Zakażenie krwi określa się jako stan potencjalnie zagrażający życiu, ze śmiertelnością na poziomie 30-40% na oddziałach intensywnej terapii [43, 44]. Jak podaje INICC (ang. *International Nosocomial Infection Control Consortium*), śmiertelność pacjentów z HAIs na oddziałach intensywnej opieki medycznej wyniosła 38,1%, w porównaniu do 14,4% śmiertelności pacjentów z brakiem HAI na tych samych oddziałach [45]. Ponadto zakażenia krwi wydłużają czas hospitalizacji chorego oraz zwiększają koszty opieki zdrowotnej [45]; czas hospitalizacji pacjentów z BSI zwiększa się z 7 do 21 dni [46]. W Polsce średnia długość pobytu pacjentów na oddziałach intensywnej terapii wyniosła 29,6-33,7 dni [47].

Według Friedman i wsp. oraz Vallés i wsp. dla mikrobiologicznego potwierdzenia rozpoznania zakażenia krwi związanego z opieką zdrowotną (ang. *healthcare associated BSI*) należy uzyskać dodatni posiew krwi, a także należy spełnić jeden z następujących kryteriów:

- pacjent otrzymywał terapię dożylną w domu, podlegał terapii leczenia ran, otrzymał dożylną terapię medyczną lub żywienie dojelitowe na 30 dni przed zakażeniem;
- pacjent był poddawany hemodializie lub otrzymał dożylną chemoterapię na 30 dni przed zakażeniem;
- pacjent był hospitalizowany na oddziale intensywnej terapii przez 48 godzin lub więcej na 90 dni przed zakażeniem;
- pacjent mieszkał w domu opieki lub w ośrodku opieki długoterminowej na 30 dni przed zakażeniem [48, 49, 50].

Liczba próbek krwi pobranych od pacjenta dorosłego powinna wynosić od dwóch do czterech oraz być pobrana z osobnych nakłuć żylnych, unikając pobrania przez cewnik, w celu zmniejszenia ryzyka popełnienia błędu diagnostycznego [39].

Ze względów klinicznych oraz epidemiologicznych zakażenie krwi dzieli się na pierwotne (ang. *primary BSI*) i wtórne (ang. *secondary BSI*).

### **2.1. Pierwotne BSIs**

Pośród zakażeń krwi HAI dominuje zakażenie krwioobiegu związane z centralnym cewnikiem żylnym, które należy do pierwotnych zakażeń krwi [51]. Pierwotne zakażenie krwi to laboratoryjnie potwierdzona infekcja krwioobiegu (ang. *laboratory confirmed bloodstream infection, LCBSI*) niezwiązana z innym ogniskiem zapalnym [52]. Najczęściej jako źródło zakażenia identyfikuje się cewnik [52]. Zgodnie z definicją NHSN (ang. *National Healthcare Security Network*) dla rozpoznania CLABSI cewnik powinien być założony minimum 48 godzin przed obserwacją pierwszych objawów zakażenia [52]. Niezależnymi czynnikami ryzyka zakażenia krwi jest przedłużona hospitalizacja oraz neutropenia [41]. Do czynników zwiększających ryzyko kolonizacji a następnie ryzyko zakażenia Gram-ujemnymi lekoopornymi pałeczkami jest wcześniejsza antybiotykoterapia, cewnik udowy oraz stan krytyczny pacjenta [53].

Według CDC następujące kryteria muszą zostać spełnione aby laboratoryjnie potwierdzić pierwotne zakażenie krwi:

- identyfikacja patogenu z jednej lub więcej próbek krwi od pacjenta w posiewie krwi
- ALBO
- identyfikacja patogenu na poziomie gatunku lub rodzaju za pomocą testu mikrobiologicznego, nie opartego na hodowli mikroorganizmów

ORAZ

- zidentyfikowany patogen z krwi pacjenta nie może być związany z zakażeniem w innym miejscu;
- przy zakażeniu krwi pałeczkami *Enterobacterales* może wystąpić mniej typowy przebieg choroby z brakiem niektórych klinicznych objawów zakażenia, takich jak gorączka czy dreszcze [54].

### **2.1.1. Zakażenie krwi związane z cewnikiem (ang. *catheter related bloodstream infection*, CRBSI)**

#### **Zakażenie krwi związane z cewnikiem centralnym (ang. *central line-associated bloodstream infection*, CLABSI)**

Najczęstszym pierwotnym zakażeniem krwi jest CLABSI, dla którego punktem wyjścia jest założony centralny dostęp naczyniowy. Cewniki centralne są często stosowane u pacjentów w stanie krytycznym [55]. Centralny cewnik żylny (ang. *central venous catheter*, CVC) umieszcza się w głównym naczyniu celem infuzji, pobrania krwi lub monitorowania hemodynamicznego [52]. Miejscem wkłucia CVC są głównie: aorta, tętnica płucna, żyły główne dolne i górne, żyły ramiennie-głowowe, wewnętrzne żyły szyjne, żyły podobojczykowe, żyły biodrowe oraz żyły udowe [52].

W razie podejrzenia rozpoznania CRBSI podejmuje się następujące kroki:

- w razie możliwości usunięcie cewnika;
- wykonanie posiewu półilościowego/ilościowego z końcówki cewnika;
- użycie wybranych inhibitorów w hodowli, jeśli cewnik pokryty był materiałem antybakteryjnym;
- za wynik dodatni uważa się posiew półilościowy 5 cm końcówki cewnika >15 CFU (ang. *colony forming unit*, CFU) w posiewie na podłoże stałe lub posiew ilościowy >10<sup>2</sup> CFU/ml w posiewie w bulionie; dodatni wynik półilościowego posiewu z końcówki cewnika, przy braku wzrostu hodowli szczepów bakteryjnych, uważa się nie CLABSI, ale infekcję układu sercowo-naczyniowego (ang. *cardiovascular system infection-arterial or venous infection*, CVS-VASC) [39];
- w razie występowania objawów miejscowych w miejscu wkłucia (np. wysięk z miejsca wejścia cewnika) do badania mikrobiologicznego (metodą hodowli i/lub preparatu) należy pobrać materiał ze zmiany, głównie wymaz;
- przy użyciu cewników krótkoterminowych, np. tętnicznych, zalecaną metodą analizy mikrobiologicznej jest technika roll plate;

- przy użyciu cewników długoterminowych wykonuje się posiew półilościowy <15 CFU na podłoże stałe [51, 53, 56].

Jednymi z głównych drobnoustrojowych czynników etiologicznych CLABSI są gronkowce koagulazoujemne oraz pałeczki Gram-ujemne. Według Lin oraz Haque i wsp. pałeczki Gram-ujemne stanowią 39,2% wszystkich izolatów, według Atilla i wsp. 52% oraz według Bouza i wsp. 17% [38, 55, 57, 58]. Do praktyk prewencyjnych CLABSI, mających źródło zarówno endogenne jak i egzogenne, należy dezynfekcja rąk personelu i skóry pacjenta przed założeniem cewnika oraz dekontaminacja jamy ustnej [55, 60]. Według metaanalizy Lin istotnym elementem prewencyjnym może być dekontaminacja przewodu pokarmowego, chociaż ten aspekt jest uważany w literaturze przedmiotu za wymagający potwierdzenia w dużych badaniach randomizowanych [55, 59, 60]. Nadzór i właściwa kontrola oraz maksymalna staranność wpłyną na zmniejszenie liczby zakażeń [52].

## **2.2. Wtórne BSIs**

W przypadku wtórnego zakażenia krwi ognisko infekcji znajduje się w innej lokalizacji, tj. bakteremia współwystępuje z pierwotną infekcją w innej części ciała pacjenta [61, 62]. Przykładem wtórnego zakażenia krwi są wcześniej wymienione zakażenia dróg moczowych lub miejsca operowanego z następującą bakterią. Według NHSN wtórne zakażenie krwi musi spełnić jedno z dwóch następujących kryteriów, w innym wypadku nazywane jest pierwotnym BSI:

- patogen zidentyfikowany ze specyficznego miejsca zakażenia spełnia wymagane kryteria dla tego zakażenia, jak również pasuje do patogenu zidentyfikowanego z próbek krwi

ORAZ

- pobieranie próbek krwi powinno nastąpić w okresie przypisania wtórnego zakażenia krwi tzw. czasu inkubacji choroby (ang. *Infection Window Period*, IWP) czyli 7 dni, w trakcie których muszą zostać spełnione wszystkie kryteria zakażenia właściwe dla specyficznego miejsca, a także wykonanie pierwszego pozytywnego testu diagnostycznego właściwego dla danego zakażenia, 3 dni przed i 3 dni po. Poza IWP musi wystąpić 14-dniowy przedział czasowy (ang. *Repeat Infection Timeframe*, RIT), w trakcie którego nie są zgłaszane żadne nowe zakażenia tego typu

LUB

- o patogen zidentyfikowany z próbki krwi pasuje do patogenu zidentyfikowanego z miejsca zakażenia, a ponadto próbki krwi muszą zostać zebrane w ciągu czasu inkubacji choroby [61].

### **2.2.1. Zakażenia dróg moczowych (ang. *urinary tract infections*, UTIs)**

**Objawowe zakażenie dróg moczowych (ang. *symptomatic urinary tract infection*, SUTI)**

**Zakażenia dróg moczowych związane z cewnikiem (ang. *catheter-associated urinary tract infections*, CAUTIs)**

Szacuje się, że zakażenia dróg moczowych związane z cewnikiem stanowią 80% wszystkich zakażeń dróg moczowych nabytych w szpitalu [63], natomiast ponad 17% przypadków szpitalnych zakażeń krwi to zakażenia wtórne związane z drogami moczowymi [64]. CAUTI głównie powodowane są przez Gram-ujemne pałeczki, szczególnie uropatogenne szczepy *E.coli* [65, 66]. Do objawów klinicznych bakteriemii związanej z CAUTI, poza gorączką, dreszczami i niedociśnieniem zalicza się splątanie i leukocytozę [64]. Chociaż większość przypadków (ponad 90%) bakteriiurii przebiega bezobjawowo [65] to nieleczona bakteremia, która stanowi ciężkie następstwo objawowego zakażenia dróg moczowych, może prowadzić do śmierci [63].

### **2.2.2. Zakażenia miejsca operowanego (ang. *surgical site infections*, SSIs)**

Jedne z najczęstszych zdarzeń niepożądanych występujące u pacjentów hospitalizowanych poddanych zabiegom chirurgicznym to SSIs [45]. Największe ryzyko rozwoju SSIs niosą ze sobą operacje kardiochirurgiczne oraz jamy brzusznej [38]. U około 25%-27% pacjentów z SSIs rozwija się wtórne zakażenie krwi [57, 62]. Czynniki, które przyczyniają się do wystąpienia SSIs, są cukrzyca, palenie papierosów, brak profilaktyki antybiotykowej bądź niewłaściwie prowadzone działania okołoperacyjne, wcześniejsze operacje oraz długi czas operacji (>3 godzin) [67, 68].

## **2.3. Wtórne BSI inne iż wymienione**

- o Zakażenie dolnych dróg oddechowych (ang. *lower respiratory tract infection*, LRI), zdarzenie niepożądane związane z użyciem respiratora (ang. *ventilator-associated event*, VAE);
- o Zakażenie w obrębie jamy brzusznej (ang. *intraabdominal infection*, IAB), zakażenie przewodu pokarmowego (ang. *gastrointestinal tract infection*, GIT);
- o Zakażenie skóry i tkanek miękkich (ang. *skin and soft tissue infection*, SST);



- Inne m.in. zakażenie kości i stawów (ang. *bone and joint infection*, BJ), zakażenie układu rozrodczego (ang. *reproductive tract infection*, REPR).

### **2.3.1. Mechaniczne urządzenia wspomagające krążenie (ang. *mechanical circulatory support devices*, MCSDs)**

MCSDs to zwiększające ryzyko zakażenia krwioobiegu urządzenia umieszczone w żyłach lub tętnicach w celu utrzymania funkcji serca u pacjentów z ciężką niewydolnością [45]. Większość zakażeń spowodowana jest zakażeniem przezskórnym lub zlokalizowana jest na powierzchni zewnętrznej urządzenia tzw. pocket infections [69, 70] i ma związek z zakażeniem krwi [71]. Badania wykazały, że stan pacjenta, szczególnie przebieg choroby oraz choroby współistniejące w trakcie implantacji urządzenia, miały wpływ na ryzyko zakażeń [69, 71, 72] oraz śmiertelność [73]. Skutkiem zakażeń związanych z MCSDs jest wysoka śmiertelność oraz zwiększone ryzyko udaru mózgu [69]. Wszczepienie mniejszych pomp krwi zmniejsza powierzchnię kolonizacyjną dla bakterii, tym samym zmniejszając prawdopodobieństwo zakażenia [69]. Podobnie jak w przypadku zakażeń miejsca operowanego brak profilaktyki antybiotykowej zwiększa ryzyko zakażeń związanych z MCSDs [71, 72].

### **2.4. Profilaktyka zakażeń krwi**

Do strategii zapobiegania zakażeniom krwi oraz zmniejszenia narażenia na HAI należy właściwa higiena rąk, stosowanie środków antyseptycznych z chlorheksydyną oraz użycie cewników naczyniowych z powłoką antybakteryjną, np. chlorheksydynową lub sulfatiazolową [45, 52]. CDC zaleca także stosowanie cewników z politetrafluoroetylenem lub poliuretanu jako materiały bezpieczne [52]. Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) opracowała wytyczne dotyczące higieny rąk [74, 75], gdyż jak pokazują badania niewłaściwe stosowanie rękawiczek nie spełnia zasad higieny rąk [74, 76], a szczepy *Escherichia coli* oraz *Klebsiella* spp. wykazują 50% przeżycie odpowiednio po 6 minutach (epidemiczne) lub 2 minutach (nieepidemiczne) na powierzchni skóry [74].

### **2.5. Sepsa kliniczna**

W epidemiologii szpitalnej rozróżniono kliniczną sepsę i laboratoryjnie potwierdzone zakażenie krwi. Hugonnet i wsp. określają sepsę kliniczną jako jednostkę nieudokumentowaną mikrobiologicznie z określoną ilością informacji o znaczeniu klinicznym [77]. Klinicznie sepsa jest definiowana jako zagrażająca życiu dysfunkcja

organów powodowana przez rozregulowaną odpowiedź gospodarza na infekcję [78, 79]. W 1991 roku formalnie zdefiniowano sepsę i stwierdzono, że co najmniej dwa z czterech ogólnoustrojowych syndromów odpowiedzi zapalnej (ang. *systemic inflammatory response syndrome*, SIRS) muszą wystąpić równocześnie:

- temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$  lub  $<36^{\circ}\text{C}$ ;
- tętno  $>90$  uderzeń/minutę;
- częstość oddechu  $>20$  oddechów/minutę lub  $\text{PaCO}_2 <32$  mmHg;
- liczba białych krwinek  $<4000$  komórek/ $\text{mm}^3$  lub  $>12000$  komórek/ $\text{mm}^3$  [80, 81].

Do innych klinicznych objawów sepsy zalicza się dreszcze, trudności w oddychaniu, ból mięśni, sinicę skóry, skąpomocz oraz niedociśnienie [77, 79]. Poza wymienionymi objawami następujące warunki muszą zostać spełnione w diagnostyce klinicznej sepsy:

- z krwi nie wyizolowano żadnego mikroorganizmu, brak identyfikacji patogenu;
- brak widocznych objawów infekcji w innej lokalizacji;
- terapia antybiotykowa przy podejrzeniu sepsy [77].

### 3. LEKOOPORNOŚĆ DROBNOUSTROJÓW

Jednym z kluczowych problemów we współczesnej antybiotykoterapii jest oporność bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe. Istnieje różnica między trwałością (ang. *persistence*) a opornością (ang. *resistance*) komórek bakteryjnych. Komórki bakteryjne przetrwałe (ang. *persister cells*) mogą uniknąć działania antybiotyku będąc w uśpieniu czyli metabolicznej inaktywacji [82]. Jak pisze Wood i wsp., komórki przetrwałe są wysoko tolerancyjne na antybiotyki oraz są przyczyną ostrych i przewlekłych chorób zakaźnych [82, 83]. Główną przyczyną powstawania komórek przetrwałych jest prawdopodobnie powstawanie cząsteczek tetrafosforanu guanozyny (ppGpp), będących odpowiedzią komórek na stres i powodującą powstanie systemu toksyna-antytoksyna, odpowiedzialnego za ochronę komórki przed antybiotykiem [82, 84]. Badania Amato i wsp. wykazały, że przekształcenia źródła węgla oraz ilość ppGpp mają znaczenie w przypadku tworzenia się komórek przetrwałych u *E.coli* [84]. Wiadomo, że mutacje genu *hip* u szczepów *E.coli* zwiększają ilość komórek przetrwałych w danej populacji oraz powodują wzrost tolerancji na pewne antybiotyki [85].

Oporność wśród komórek bakteryjnych, będących w fazie wzrostu i w pełni metabolizujących, można podzielić na naturalną oraz nabytą.

Głównymi mechanizmami oporności drobnoustrojów są:

- zaburzenie przepuszczalności błony komórkowej (ograniczające pobieranie leku),
- modyfikacja miejsca docelowego leku,
- inaktywacja leku,
- aktywny wypływ leku (ang. *efflux pumps*) [86].

Bakterie Gram-ujemne wykorzystują wszystkie cztery mechanizmy oporności.

#### 3.1. Oporność naturalna

Oporność naturalna wewnętrzna dzieli się na konstytutywną i indukcyjną. Według badaczy oporność wewnętrzną posiadają wszystkie rodzaje bakterii, zaś jej mechanizmami są ograniczenie wychwytu, inaktywacja leku oraz aktywne usunięcie leku z komórki (ang. *efflux pumps*) [86, 87]. W mechanizmie zmienionej przepuszczalności błon biorą udział m.in. poryny – białka tworzące kanały dyfuzyjne, odpowiadające za transport składników odżywczych oraz antybiotyków do wnętrza komórki bakteryjnej [87]. Dyfuzja substancji odżywczej i antybiotyku zależy od budowy chemicznej danej

poryny [88, 89], z kolei mutacje, typu utrata lub zwężenie kanału porynowego, prowadzą do ograniczenia przyjmowania leku przez komórkę bakteryjną [88]. Mechanizm ten jest także obecny u *E.coli* jako fosfoporyna [87]. Poryny odpowiadają nie tylko za oporność bakterii, ale także przyczyniają się do jej zjadliwości [90].

*Efflux pumps* należą do chromosomalnie kodowanych mechanizmów oporności na antybiotyki. Za pracę pomp wypływowych odpowiedzialne są geny kodowane chromosomalnie, których ekspresja często jest warunkowana bodźcami środowiskowymi. Zapewniają bakteriom oporność na toksyny, w tym na wiele grup środków przeciwdrobnoustrojowych – u *E.coli* m.in. na fluorochinolony czy  $\beta$ -laktamy [91]. U bakterii Gram-ujemnych najczęściej spotykane są pompy wielolekowe typu RND (ang. *resistance nodulation cell division*) uczestniczące także w wypływie z komórki metali ciężkich czy detergentów [89]. Poryny oraz pompy wypływowe są wspomagane dodatkowymi elementami kodowanymi chromosomalnie [92, 93].

### 3.2. Oporność nabyta

Istnieją dwa źródła nabycia przez bakterie oporności na antybiotyki: mutacja albo horyzontalny transfer genów [94, 95]. Częstą przyczyną wewnętrznych chromosomalnych mutacji u bakterii są stresory, takie jak promieniowanie UV czy środki chemiczne [86]. Również same antybiotyki mają działanie mutagenne na bakterie – odnotowano odpowiedź szczepów *E.coli* na stres w wyniku traktowania fluorochinolami,  $\beta$ -laktamami oraz trimetoprimem [94, 96]. Jednak badanie Reygart wykazało, że wytworzenie oporności u bakterii odbywa się kosztem tempa podziału komórek bakteryjnych – nie są one w stanie dzielić się tak szybko jak przedtem [97].

Mutacje dotyczą różnych typów mechanizmów: genów kodujących miejsca docelowe antybiotyku, genów kodujących transportery antybiotyków oraz genów kodujących regulatory ekspresji transporterów – enzymy modyfikujące antybiotyk [95]. Wśród mechanizmów mutacji można wymienić:

- modyfikację celu: oporność na fluorochinolony poprzez mutację bakteryjnej topoiomerazy;
- enzymatyczną modyfikację celu: oporność na wankomycynę występuje w przypadku reorganizacji ściany komórkowej;
- tworzenie enzymów, które inaktywują antybiotyk [95].

Najczęstsza droga przekazywania genów oporności między bakteriami odbywa się za pośrednictwem plazmidu (poprzez poziomy transfer genów, rzadko przez bakteriofagi);

bakterie mogą także mutować własny chromosomalny DNA [86]. U *E.coli*, pod wpływem działania aminoglikozydów, odnotowano mutacje białek rybosomalnych lub RNA [86]. Podobny mechanizm jest także w momencie działania fluorochinolonów. Zachodzące mutacje w genach enzymów topoiizomerazy i gyrazy DNA, mutacje w białkach docelowych, zwiększona produkcja *efflux pumps* prowadzą do oporności bakterii na tę grupę antybiotyków [98]. W badaniach Vedantam i wsp. oraz Huovinen i wsp. scharakteryzowano szczepy *E.coli* z wieloma mutacjami plazmidowymi oraz chromosomalnymi prowadzące do zakłócenia szlaków metabolicznych i uniemożliwienia wiązania sulfonamidów i trimetoprimu [99, 100].

### **3.2.1. $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ang. *extended-spectrum $\beta$ -lactamases, ESBLs*)**

Tworzenie  $\beta$ -laktamaz jest mechanizmem oporności należącym zarówno do mechanizmu modyfikacji miejsca docelowego leku, jak i mechanizmu inaktywacji leku. Usuwanie antybiotyku  $\beta$ -laktamowego wśród komórek bakteryjnych odbywa się poprzez: obecność białek wiążących penicyliny (ang. *penicillin-binding proteins, PBPs*) w ścianach komórkowych, *efflux pumps* oraz tworzenie  $\beta$ -laktamaz. Zmiana struktury PBPs zmniejszy lub całkowicie uniemożliwi wiązanie leku [86]. Najczęściej obecnym mechanizmem oporności u bakterii Gram-ujemnych jest hydroliza antybiotyków  $\beta$ -laktamowych poprzez wytworzenie szerokiego spektrum  $\beta$ -laktamaz [101]. Hydroliza  $\beta$ -laktamów enzymami odbywa się poprzez rozpad pierścienia  $\beta$ -laktamowego obecnego w antybiotyku [86].

Według badaczy oporność na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe u *Enterobacteriaceae* obejmuje AmpC  $\beta$ -laktamazy,  $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum (ESBLs) oraz karbapenemazy (KPC czyli karbapenemazy *Klebsiella pneumoniae*, inne karbapenemazy produkowane przez pałeczki *Enterobacteriaceae* produkujące karbapenemazy CPE, metalo- $\beta$ -laktamazy MBLs oraz oksacylinazy typ OXA) [102, 103]:

- AmpC  $\beta$ -laktamazy nadają oporność na cefalosporyny i monobaktamy, kodowane chromosomalnie; u *E.coli* i *Klebsiella* również kodowane plazmidowo [104];
- ESBL nadają oporność na penicyliny, cefalosporyny oraz monobaktamy, najczęściej spotykane typy ESBL to TEM, SHV oraz CTX-M, najczęściej występują wśród szczepów *E.coli* oraz *K.pneumoniae*;
- KPC, czyli karbapenemazy produkowane przez *K.pneumoniae*, nadają oporność na penicyliny, karbapenemy, cefalosporyny oraz monobaktamy; hamowane są przez

inhibitory  $\beta$ -laktamaz, takie jak, kwas klawulanowy i tazobaktam; pałeczki produkujące karbapenemazy tego typu są szeroko rozpowszechnione wśród pałeczek *Enterobacteriaceae*. W takiej sytuacji stosuje się raczej określenie pałeczki *Enterobacteriaceae* produkujące karbapenemazy (ang. *carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*, CPE);

- Inne karbapenemazy serynowe klasy A, które obejmują, poza wyżej wymienioną grupą KPC, grupy enzymów: NMC/IMI (wykryte w izolatach *E.cloacae*), SME (wyizolowany ze szczepów *S.marcescens*) oraz GES; hydrolizują szerokie spektrum antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, w tym karbapenemy, cefalosporyny i penicyliny; ich aktywność jest hamowana przez kwas klawulanowy i tazobaktam [105].

Obecność genów plazmidowych, takich jak geny  $\beta$ -laktamazy, wskazuje, że szczep jest wielolekoopornym patogenem (ang. *multi-drug resistance*, MDR) [90]. Prawdopodobnie najbardziej znanym i najbardziej rozpowszechnionym szczepem ESBL jest patogen *E.coli* ST131 (O25:H4) [90]. *E.coli* typu ST131 jest ogólnoswiatowym, pandemicznym klonem zidentyfikowanym po raz pierwszy w 2008 roku [106]. Niesie wiele genów z rodziny  $\beta$ -laktamów, głównie CTX-M, rzadziej TEM i SHV oraz powoduje szeroki zakres infekcji [106].

Według Bush i Jacoby enzymy  $\beta$ -laktamowe o rozszerzonym spektrum substratowym klasyfikuje się na podstawie ich budowy molekularnej lub cech funkcjonalnych [101]. ESBL dzieli się na cztery klasy: A, B, C i D, z których klasy A, C i D wykorzystują serynę do hydrolizy substratu, natomiast klasa B to metaloenzymy, wykorzystujące do hydrolizy jony cynku [101]. Zaktualizowana klasyfikacja obejmuje następujące grupy [101]:

- cefalosporynazy – kodowane na wielu chromosomach bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, odpowiadające m.in. za oporność na cefalosporyny o szerokim spektrum działania [107]. Induktorami produkcji enzymu AmpC są głównie penicyliny i kwas klawulanowy [101, 107], należy do nich podgrupa  $\beta$ -laktamaz AmpC o rozszerzonym spektrum działania [108];
- $\beta$ -laktamazy serynowe – największa grupa enzymów obejmuje kilka podgrup, do których można zaliczyć podgrupy:
  - 2b – obejmują enzymy TEM i SHV, łatwo hydrolizują penicyliny, blokowane przez kwas klawulanowy i tazobaktam,
  - 2be – oprócz TEM i SHV obejmuje enzymy CTX-M, wrażliwe na kwas klawulanowy i tazobaktam, aktywne wobec penicylin i cefalosporyn,

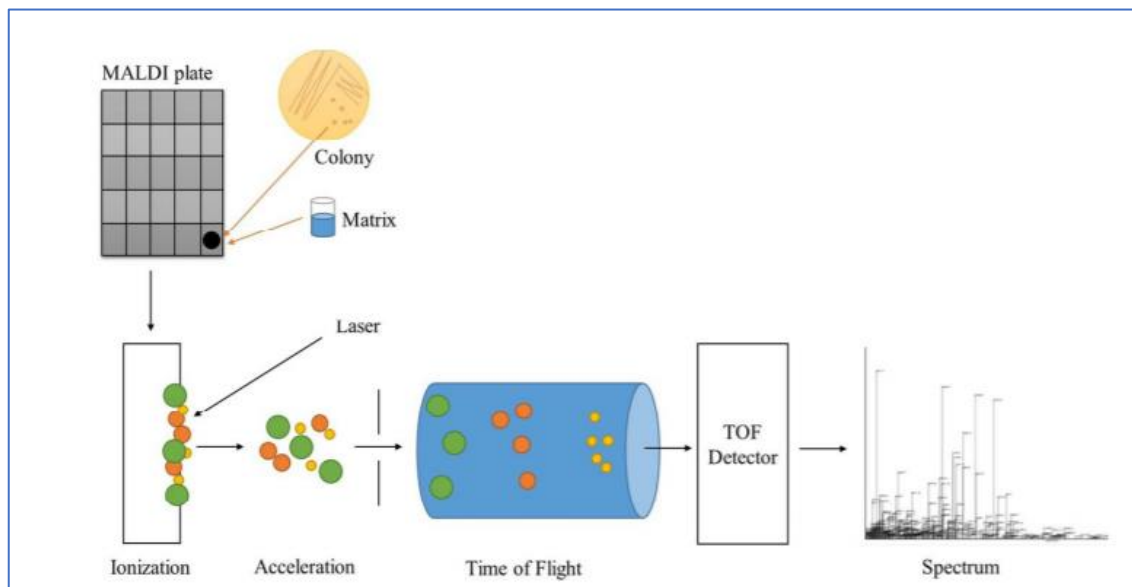
- 2d – druga co do wielkości rodzina  $\beta$ -laktamaz, obejmuje enzymy nazywane enzymami OXA z powodu zdolności do hydrolizowania oksacyliny; wiele enzymów tej podgrupy jest hamowanych przez chlorek sodu,
  - 2df – podgrupa hydrolizująca karbapenemy; nabytą oporność na  $\beta$ -laktamy stwierdzono u *Enterobacteriaceae*, odporne na kwas klawulanowy,
  - 2f – karbapenemazy serynowe, związane z wielolekoopornymi zakażeniami bakteriami Gram-ujemnymi [101, 109, 110]. Do tej podgrupy należą karbapenemazy *Klebsiella pneumoniae*, odporne na wszystkie  $\beta$ -laktamy, inaktywowane przez inhibitory  $\beta$ -laktamaz [86],
- o metalo- $\beta$ -laktamazy (ang. *metallo- $\beta$ -lactamases*, MBLs) – nie są blokowane przez kwas klawulanowy lub tazobaktam [101], ale przez związki chelatujące jony metali, takie jak EDTA [111], metaloenzymy sklasyfikowano na podstawie struktury albo funkcji [111, 112], ich aktywność obejmuje hydrolizę penicylin, cefalosporyn oraz karbapenemów [101]. Do metaloenzymów należy grupa szczepów *Enterobacteriaceae* hydrolizujących wszystkie  $\beta$ -laktamy, w tym karbapenemy (ang. *Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae*, CRE) określana jako CRE; wśród szczepów CRE najczęściej rozpowszechnionymi genami są IMP oraz VIM, przykładem jest typ NDM (ang. *New Delhi MBL*), identyfikowany głównie w szczepach *E.coli* [113].

#### 4. IDENTYFIKACJA GATUNKOWA METODĄ MALDI-TOF MS

Jedną z nowocześniejszych metod identyfikacji gatunkowej mikroorganizmów jest metoda MALDI-TOF MS (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*). Po raz pierwszy zastosowana w odniesieniu do komórek bakteryjnych w 1975 roku, przez lata udoskonalana, pozwala na charakterystykę rodzajów i gatunków bakterii dzięki specyficznym i powtarzalnym widmom [114]. Zasadę działania MALDI-TOF MS przedstawiono na Ryc. 1. Próbkę mikroorganizmów (analit) umieszczona jest na płytce i pokryta roztworem (matrix), który krystalizuje i powoduje ich rozpad [115]. Następnie próbka jest jonizowana krótkimi impulsami lasera azotowego, tworzącymi chmurę zjonizowanych cząsteczek [116]. Czas przelotu jonów w próżni przyspieszanych przez pole elektrostatyczne, czyli czas dotarcia do detektora, zależy od masy i ładunku i – co najważniejsze, jest unikalny dla każdego organizmu. Widma białek porównywane są ze stale aktualizowaną biblioteką widm i na tej podstawie drobnoustrój jest identyfikowany do poziomu gatunku. Identyfikacja badanych mikroorganizmów odbywa się automatycznie za pomocą porównania profilu widma z bazą danych i w zależności od stopnia podobieństwa widma uzyskanego i referencyjnego, drobnoustrój jest identyfikowany do poziomu rodzaju i gatunku, stopień podobieństwa opisuje się jako wskaźnik identyfikacji. Według Dingle i wsp. MALDI-TOF MS jest wysoce powtarzalna i dokładna w porównaniu z metodami konwencjonalnymi [114]. Istotne znaczenie ma też czas potrzebny do identyfikacji patogenu, który ogranicza stosowanie terapii empirycznej i pozwala szybciej wprowadzić u pacjenta terapię celowaną [115].



**Rycina 1.** Przebieg procedury identyfikacji drobnoustrojów metodą MALDI-TOF MS. Próbkę umieszcza się na metalowej płytce i pokrywa matrixem. Następnie próbka jonizuje dzięki działaniu lasera, a molekuly przyspieszają w polu elektrostatycznym. Jony są rozdzielane zgodnie z ich czasem przelotu, poddawane działaniu próżni, aż docierają do detektora, który rejestruje każdy sygnał [117].



Dużą zaletą opisywanej metody jest możliwość szybkiej analizy wybranych mechanizmów oporności patogenów, niestety tylko nielicznych. Ukierunkowanie leczenia minimalizuje działania niepożądane, poprawia skuteczność terapeutyczną oraz zmniejsza ryzyko rozwoju oporności [118]. W przypadku bakterii Gram-ujemnych wyniki testów na lekooporność metodą MALDI-TOF MS pokrywały się z wynikami metod konwencjonalnych [114].

Jedną z wad metody MALDI-TOF MS jest brak możliwości rozróżnienia niektórych blisko spokrewnionych organizmów, jak w przypadku bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* – *Shigella* sp. może być błędnie identyfikowana jako *E.coli*. Minusem jest także warunek czystej i dobrze wyizolowanej kultury bakterii, co sprawia, że czasami konieczne jest kilkukrotne przesianie uzyskanej hodowli aż do uzyskania pożądanej czystej, jednorodnej kolonii oraz braki w walidacji i nieskompletowane referencyjne bazy danych [114].

Niestety, mimo rozwoju medycyny, w dalszym ciągu wyzwaniem pozostaje identyfikacja patogenów z próbek krwi pacjentów z bakteriami. Metody molekularne oparte na technice PCR (ang. *polymerase chain reaction*) czy fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (ang. *Fluorescent In Situ Hybridization*, FISH) mogą pomóc przyspieszyć procedurę diagnostyczną oraz zwiększyć czułość wykrywania bakterii

we krwi, ale z jednej strony nie są szeroko rozpowszechnioną rutynową metodą diagnostyczną w polskich szpitalach, a z drugiej nie dają możliwości pełnej analizy lekowrażliwości [119]. W sytuacji realizacji diagnostyki w oparciu o metody hodowlane postępowanie diagnostyczne należy rozpocząć od:

1. przygotowania preparatu bezpośrednio z próby krwi, preparat oglądany pod mikroskopem daje możliwość uwidocznienia komórek bakterii i ich wyglądu, układu komórek względem siebie, a zabarwienie różnicujące dzieli na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne – przy masowej bakteriemii identyfikacja może dać wynik pozytywny już w kilka godzin po pobraniu krwi od pacjenta, co ułatwia szybkie wdrożenie terapii empirycznej;
2. hodowli drobnoustrojów na podłożu stałym.

Diagnostyka powinna objąć oba powyższe etapy. Tylko pozytywny wynik hodowli umożliwi identyfikację drobnoustroju do gatunku, z wykorzystaniem, np. opisanej techniki MALDI-TOF MS oraz ocenę jego lekowrażliwości. Uzyskanie hodowli drobnoustroju otwiera również drogę do pełnej, kompleksowej oceny jego wrażliwości na antybiotyki i chemioterapeutyki.

Z uwagi na duże znaczenie aktualnych lokalnych odniesień na temat lekowrażliwości drobnoustrojowej dla wdrażania racjonalnych lokalnych zaleceń dotyczących empirycznej terapii zakażeń i niewielkiej liczby tego typu publikacji dotyczących pacjentów szpitali Polski południowej, zdecydowano o opublikowaniu części wyników dotyczących tego elementu badań [120]. Dodatkowo wyniki częściowo były publikowane jako doniesienia na międzynarodowych konferencjach naukowych [121, 122].

## 5. CEL PRACY

Głównym celem pracy była analiza epidemiologiczna i mikrobiologiczna zakażeń krwi (BSI) wywołanych przez pałeczki rzędu *Enterobacterales* u hospitalizowanych osób dorosłych, w latach 2015-2018, na terenie Polski południowej (województwo śląskie oraz małopolskie). W analizie uwzględniono typ opieki nad pacjentem uzależniony od miejsca hospitalizacji i typu oddziału, wiek oraz płeć pacjentów. Celem przeprowadzonych analiz było określenie cech fenotypowych i molekularnych badanych izolatów, ze szczególnym uwzględnieniem czynników zjadliwości oraz oporności na wybrane antybiotyki.

Cele szczegółowe:

- Ocena prewalencji szczepów rzędu *Enterobacterales* powodujących szpitalne zakażenia krwi u hospitalizowanych osób dorosłych w zależności od typu populacji i sprawowanej opieki nad pacjentem: oddział intensywnej terapii, zabiegowy, internistyczny.
- Oznaczenie wybranych genów kodujących czynniki wirulencji wśród szczepów *E.coli* ESBL+ i *K.pneumoniae* ESBL+ w celu określenia, które z nich biorą udział w patogenezie zakażeń krwi.
- Ocena lekooporności szczepów przy zastosowaniu metod fenotypowych w celu określenia sytuacji epidemiologicznej w szpitalach południowej Polski.
- Oznaczenie genów kodujących oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe.
- Ocena podobieństwa genetycznego między szczepami *K.pneumoniae* ESBL+ przy pomocy metody PFGE w celu określenia horyzontalnego rozprzestrzenienia szczepów klonalnych.

## 6. MATERIAŁY I METODY

Przedstawiona praca powstała we współpracy z laboratorium analityczno-bakteriologicznym KORLAB-NZOZ w Rudzie Śląskiej. Analizie poddano 358 szczepów bakteryjnych pochodzących z przypadków zakażeń krwi o etiologii *Enterobacterales* pacjentów hospitalizowanych w 13 szpitalach województwa śląskiego i małopolskiego. Ocena stanu zdrowia pacjenta była dokonywana przez lekarza prowadzącego, na podstawie danych klinicznych bezpośrednio w szpitalu.

### 6.1. Charakterystyka badanych szczepów

Materiał do badań uzyskano od pacjentów na zlecenie lekarza. Krew pobierano w systemie zamkniętym, z wykorzystaniem podłoży transportowo-namnażających do krwi firmy BACTEC Plus Aerobic/F Culture Vials oraz BACTEC Plus Anaerobic/F Culture Vials (wymiennie z BACTEC Lytic/10 Anaerobic Culture Vials). Krew była pobierana przez przeszkolony personel bezpośrednio w miejscu hospitalizacji pacjenta.

Badanie objęło 356 pałeczek rzędu *Enterobacterales*, wyizolowanych od hospitalizowanych w latach 2015-2018 osób dorosłych ( $\geq 18$  lat). Szczepy izolowano od pacjentów 13 szpitali województw śląskiego i małopolskiego. W razie wielokrotnych posiewów do analizy włączono tylko pierwszy izolat pochodzący od jednego pacjenta z tego samego przypadku zakażenia.

Drobnoustroje pochodziły z przypadków zakażeń pacjentów z oddziałów:

- Internistycznych: chorób wewnętrznych, gastroenterologicznego, neurologicznego, kardiologicznego, geriatrii, reumatologicznego, diabetologicznego,
- Zabiegowych: chirurgii ogólnej, urologii, chirurgii naczyniowa, ginekologiczno-położniczego,
- Intensywnej terapii.

Kryteria włączenia patogenu do badania:

- izolacja od hospitalizowanego pacjenta dorosłego ( $\geq 18$  lat),
- przynależność do rzędu *Enterobacterales*,
- izolacja z wtórnego zakażenia krwi potwierdzonego laboratoryjnie.

Kryteria wykluczenia:

- wiek pacjenta  $\leq 18$  lat,
- pierwotne zakażenie krwi według kryteriów ECDC [54],

- zakażenie krwi nieznanego pochodzenia.

Izolaty przechowywano w Katedrze Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  w celu ich zabezpieczenia do dalszych analiz.

Badaniami objęto izolaty pochodzące z przypadków zakażeń:

- 195 kobiet w wieku 21-93 lata,
- 155 mężczyzn w wieku 39-96 lat.

## **6.2. Analiza epidemiologiczna**

Dla wszystkich laboratoryjnie potwierdzonych przypadków zakażeń krwi określono natężenie ich występowania z wykorzystaniem współczynnika prewalencji pałeczek rzędu *Enterobacterales*. Szczególnie:

- Prewalencja (ang. *prevalence*) to udział szczepów posiadających daną cechę w odniesieniu do liczebności całej próby izolatów:
  - badanymi cechami były:
    - obecność genów warunkujących wybrane cechy zjadliwości,
    - wrażliwość na leki przeciwdrobnoustrojowe,
    - wrażliwość na grupy antybiotyków,
    - występowanie mechanizmu ESBL.

Analizy obejmowały badanie zmiennych pod względem miejsca hospitalizacji, płci i wieku.

Dla zbadania związków pomiędzy badanymi grupami zastosowano test  $\chi^2$  Pearsona – jeśli spełniono warunek Cochran, natomiast gdy warunek nie był spełniony wykorzystano dokładny test Fishera. Gdy liczebności obserwowane były  $<10$  to stosowano poprawkę Yatesa. Za istotne przyjęto prawdopodobieństwo testowe na poziomie  $p < 0,05$ , a za wysoce istotne przyjęto prawdopodobieństwo testowe na poziomie  $p < 0,01$ . Analizy statystyczne opracowano za pomocą pakietu statystycznego PQStat wersja 1.8.0.444.

## **6.3. Identyfikacja gatunkowa**

Identyfikację 356 unikalnych szczepów przeprowadzono za pomocą metody spektroskopii masowej MALDI-TOF MS z użyciem desorpcji i jonizacji laserowej wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (Bruker Corporation, Holandia). Wszystkie odczyty dotyczące identyfikacji gatunkowej przeprowadzono w laboratorium KORLAB. Pod uwagę brano tylko interpretację na poziomie 2.00-2.29 wskaźnika

interpretacji, tj wiarygodną identyfikację drobnoustroju do poziomu rodzaju oraz prawdopodobny wynik identyfikacji do poziomu gatunku oraz na poziomie 2.30-3.00, wiarygodna identyfikacja do poziomu gatunku [123].

#### **6.4. Czynniki etiologiczne zakażeń krwi**

Łącznie, w latach 2015-2018, zebrano 332 izolaty z rodziny *Enterobacteriaceae*, 22 izolaty z rodziny *Morganellaceae* oraz 2 izolaty z rodziny *Yersiniaceae*. Wśród zakażeń krwi, zaklasyfikowanych do dalszych analiz, wyizolowano w zależności od oddziałów:

- Internistyczne: 140 szczepów *Escherichia coli*, 44 szczepy *Klebsiella pneumoniae*, 10 szczepów *Enterobacter cloacae*, 9 szczepów *Proteus mirabilis*, 6 szczepów *Klebsiella oxytoca* oraz po jednym szczepie *Klebsiella mobilis*, *Citrobacter braakii* i *Citrobacter koseri*;
- Zabiegowe: 74 szczepy *Escherichia coli*, 27 szczepów *Klebsiella pneumoniae*, 10 szczepów *Proteus mirabilis*, 5 szczepów *Klebsiella oxytoca*, 3 szczepy *Enterobacter cloacae* oraz po jednym szczepie *Klebsiella mobilis* i *Citrobacter freundii*;
- OIT: 8 szczepów *Escherichia coli* oraz 9 szczepów *Klebsiella pneumoniae*.

Wszystkie wyżej wymienione szczepy zostały zaklasyfikowane gatunkowo oraz określono ich lekooporność.

Wśród wyizolowanych szczepów 134 miały fenotyp ESBL. Na oddziałach internistycznych i zabiegowych fenotyp ESBL dominował wśród szczepów *Escherichia coli* (odpowiednio 54,5% oraz 41,3%), natomiast na oddziałach intensywnej terapii więcej szczepów ESBL wyizolowano wśród *Klebsiella pneumoniae* (63,6%). W tej grupie szczepów przeprowadzono procedury oznaczania obecności genów kodujących wybrane cechy wirulencji.

#### **6.5. Bankowanie szczepów**

Wszystkie badane szczepy były przechowywane w Katedrze Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w podłożach do przechowywania drobnoustrojów; kriobank Microorganism Preservation System TSC.

Badane szczepy zawieszano pod laminarem zapewniającym warunki jałowe w płynnym roztworze kriogenicznym zawierającym nośnik (kriokulki) i umieszczano w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Do testów mikrobiologicznych i genetycznych szczepy przesiewano na podłoże stałe TSA (ang. *Trypticase Soy Agar*) i inkubowano 24h w warunkach tlenowych, w temperaturze 37<sup>0</sup>C.

Dalsze etapy badania nie objęły 6 szczepów, w tym: 3 *Morganella morganii*, 2 *Serratia marcescens* oraz 1 *Salmonella enteritidis*. Powodem był brak wzrostu mikroorganizmów podczas procedury pasażowania.

#### **6.6. Fenotypowe oznaczenie lekooporności metodą BD Phoenix™**

Oporność szczepów na środki przeciwdrobnoustrojowe badano 3 metodami. Za pomocą automatycznego systemu BD Phoenix™ 100 oznaczono wrażliwość na: ampicylinę (AMP), ampicylinę z sulbaktamem (SAM), piperacylinę z tazobaktamem (TZP), cefuroksym (CXM), ceftazydym (CAZ), cefotaksym (CTX), meropenem (MEM), ciprofloksacynę (CIP), gentamycynę (CN), amikacynę (AK), tobramycynę (TOB) oraz trimetoprim z sulfametoksazolem (SXT). Do oznaczenia wrażliwości na antybiotyki wykorzystano panele NMIC/ID-204 [MIC (µg/mL: AMP 0,5-32; SAM 0,5/0,25-32/16; TZP 0,5/4-128/4; CXM 1-64; CAZ 0,5-64; CTX 0,5-64; MEM 0,25-16; CIP 0,25-4; CN 0,25-16; AK 0,5-64; TOB 0,12-16; SXT 0,5/9,5-16/304; Źródło: [https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsi-Phoenix\\_GramNegative\\_V5.15\\_V4.31.pdf](https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsi-Phoenix_GramNegative_V5.15_V4.31.pdf)], zgodnie z instrukcjami producenta. Wyniki badań lekooporności zostały zinterpretowane zgodnie z aktualizowanymi rokrocznie wytycznymi EUCAST 2017 rok, wersja 7.1 (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

Manualne badanie lekooporności przeprowadzono metodą dyfuzyjno-krażkową według Kirby-Bauera [124] przy pomocy krążków firmy Oxoid Thermo Scientific (Basingstoke, UK), zgodnie z zaleceniami EUCAST (2017 rok, wersja 7.1, jak wyżej).

Metodą dyfuzyjno-krażkową oznaczono oporność na: amoksycylinę z kwasem klawulanowym (AMC, 30µg), cefepim (FEP, 30µg), cefoperazon z sulbaktamem (SCF, 105µg), ertapenem (ETP, 10µg), imipenem (IPM, 10µg).

W celu wykrycia β-laktamaz przeprowadzono fenotypowe testy przesiewowe, metodą dyfuzyjno-krażkową. ESBL wykrywano za pomocą zmodyfikowanego testu dwóch krążków, według procedury Kaur i wsp., używając krążków z cefotaksymem (30µg), ceftazydymem (30µg), cefepimem (30µg) i aztreonamem (30µg) umieszczonych wokół dysku z amoksycyliną i kwasem klawulanowym (20µg i 10µg) [125].

Z badanych szczepów przygotowywano inokulum o gęstości 0,5 w skali McFarlanda zawieszając kolonie danego szczepu w jałowym, fizjologicznym 0,9% roztworze NaCl. Gęstość oznaczano przy użyciu densytometru (Biosan SIA., Łotwa). Następnie, jałowymi wymazówkami, wysiewano (murawowo) zawiesinę na powierzchnię całej płytki z podłożem agarowym Mueller-Hintona (BioCorp, Polska). Na tak posiane podłoże umieszczano krążki z antybiotykiem, delikatnie je dociskając co zapewniło równomierny kontakt z podłożem. Wynik oznaczenia odczytywano po 24-godzinnej inkubacji w 37<sup>0</sup>C.

### **6.7. Izolacja DNA genomowego**

Izolację bakteryjnego DNA przeprowadzono za pomocą gotowego zestawu (A&A Biotechnology, Gdynia) zgodnie z instrukcją producenta. Komórki do izolacji DNA hodowano w bulionie TSB (ang. *Tryptic Soy Broth*) 24h w temperaturze 37<sup>0</sup>C. Po wirowaniu przy obrotach 12 000 rpm (ang. *revolutions per minute*, obroty na minutę) przez 5 minut usunięto supernatant, a osad zawieszono w buforze lizującym z dodatkiem proteinazy K. Całość wymieszano i inkubowano w 37<sup>0</sup>C. Po inkubacji próbki wirowano przez 3 minuty przy obrotach 10 000 rpm, następnie supernatant naniesiono na minikolumny. Następnymi etapami było płukanie roztworem płuczającym oraz wirowanie celem związania DNA do złoża w minikolumnie i usunięcie zanieczyszczeń. Kolumnę umieszczono w probówce i dodano podgrzany do 75<sup>0</sup>C bufor Tris, probówkę zwirowano, a oczyszczone DNA przechowywano do dalszych analiz w temperaturze 4<sup>0</sup>C.

Wykorzystane odczynniki:

- Bulion hodowlany,
- Bufor Tris (10 mM, pH 8,5) (A&A Biotechnology, Gdynia),
- LT roztwór lizujący (A&A Biotechnology, Gdynia),
- A1 roztwór płuczający (A&A Biotechnology, Gdynia),
- Proteinaza K (A&A Biotechnology, Gdynia).

### **6.8. Reakcja PCR, multipleks PCR i elektroforeza**

W dalszej części badania wszystkie izolaty ESBL<sup>+</sup> badano pod kątem obecności genów *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>* oraz *bla<sub>CTX-M</sub>* metodą multipleks PCR (ang. *polymerase chain reaction*), używając wybranych primerów [126].

Wykrywanie genów oporności i wirulencji przeprowadzono stosując pojedyncze procedury PCR oraz multipleks PCR. Do przeprowadzenia łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) wykorzystano zestaw firmy A&A Biotechnology, Gdynia. Mieszanina reakcyjna zawierała:



- PCR Master Mix,
- Startery forward i reverse (przedni i wsteczny),
- DNA bakteryjne.

Objętość mieszaniny na jedną próbkę wynosiła 25µl. Gotowy roztwór umieszczano w termocyklerze (BioRad, California USA). W prowadzonych reakcjach stosowano różne temperatury przyłączania starterów oraz liczbę cykli (Tabela 1). Po reakcji PCR przeprowadzano elektroforezę w 1,5% żelu agarozowym. W celu rozdzielenia fragmentów DNA nakładano 10µl mieszaniny na żel z dodatkiem bromku etydyny (Sigma-Aldrich, St. Louis USA), zanurzony w buforze TBE (bufor Tris-boran-EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis USA). Do porównania wielkości produktu wykorzystywano marker DNA 100-1000 bp (ang. *base pair*) (A&A Biotechnology, Gdynia). Elektroforezę prowadzono pod napięciem 80V, przez 45-60 minut. Wyniki oglądano przy użyciu GelDocIt Imaging System (UVP, California USA) i programu komputerowego DOC-IT®LS.

Reakcja multiplex PCR umożliwia amplifikację wielu matryc podczas jednej reakcji PCR. Pozwala to na obniżenie kosztów i oszczędność czasu przy zachowaniu wysokiej jakości. Do przeprowadzenia multiplex PCR wykorzystano zestaw firmy A&A Biotechnology, Gdynia. Mieszanina reakcyjna zawierała, podobnie jak przy zwykłym PCR:

- PCR Master Mix,
- Startery forward i reverse (przedni i wsteczny),
- DNA bakteryjne.

Objętość mieszaniny na jedną próbkę wynosiła 50µl. Mieszaninę umieszczano w termocyklerze (BioRad, California USA). Programy reakcji różniły się temperaturą przyłączania i ilością cykli (Tab. 1). Po amplifikacji mieszaninę nakładano na 1,5% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny (Sigma-Aldrich, St. Louis USA). Żel umieszczono w buforze TBE (Sigma-Aldrich, St. Louis USA), reakcja trwała 45-60 minut pod napięciem 80V. Produkty porównywano z wykorzystaniem markera DNA 100-1000 bp (A&A Biotechnology, Gdynia). Wyniki oglądano za pomocą GelDocIt Imaging System (UVP, California USA) i programu komputerowego DOC-IT®LS.

Wykorzystane materiały:

- PCR Master Mix (A&A Biotechnology, Gdynia),
- Startery forward i reverse (przednie i wsteczne), (Genomed, Warszawa),
- Agaroz Plus (ABO, Gdańsk),
- Bufor TBE (Sigma-Aldrich, St. Louis USA),

- Bromek etydyny 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis USA),
- Marker DNA 100-1000 bp (A&A Biotechnology, Gdynia).

### **6.9. Oznaczenie wybranych genów wirulencji *Escherichia coli* ESBL+**

Do wykrycia wybranych genów wirulencji zastosowano metodę PCR ze specyficznymi starterami (Tab. 1). W przypadku *E.coli* wybrano następujące geny wirulencji do oznaczenia:

- Geny adhezji: *fimH* (fimbrie typu I), *papC*, *papEF* (fimbrie typu P), *sfa/foc* (fimbrie typu S), *iha*,
- Geny związane z transportem żelaza: *iucC* (aerobaktyna), *iroN* (receptor sideroforu katecholowego), *iutA* (receptor aerobaktyn), *fyuA* (receptor yersiniabaktyn), *ireA*, *fepA*, *fecA*, *fhuA*,
- Gen toksyny - hemolizyny: *hlyA*,
- Inne: *ibeA*, *neuC* (związane z zapaleniem opon mózgowych).

### **6.10. Oznaczenie wybranych genów wirulencji *Klebsiella pneumoniae* ESBL+**

W celu oznaczenia wybranych genów wirulencji zastosowano procedurę PCR ze specyficznymi starterami (Tab. 1). Dla izolatów *K.pneumoniae* zbadano:

- Geny związane z syntezą otoczki: *magA*, *rmpA*, *uge*, *wabG* (gen związany z syntezą rdzenia lipopolisacharydowego),
- Geny związane z transportem żelaza: *kfu*, *aerKP*,
- Inne: *allS* (powiązany z metabolizmem allantoiny).

### **6.11. Oznaczanie wybranych genów oporności metodami molekularnymi**

Oznaczanie genów oporności przeprowadzono wykorzystując metodę PCR z użyciem specyficznych starterów (Tab. 1). Analizowano następujące geny oporności:

- Geny kodujące  $\beta$ -laktamazy: *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*,
- Gen kodujący karbapenemazę: *bla<sub>OXA</sub>*.

### **6.12. Analiza genetycznego podobieństwa między szczepami *Klebsiella pneumoniae* metodą PFGE (ang. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*)**

Metodę elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE) zastosowano celem wykrycia możliwego horyzontalnego transfeceru genów między szczepami *K.pneumoniae* wyizolowanymi od pacjentów z tych samych oddziałów szpitalnych. Uzyskane genomowe DNA strawiono enzymem *XbaI* (10U) (EURx, Gdańsk, Polska).

Następnie, przy użyciu systemu CHEF III PFGE (BioRad, Warszawa, Polska), fragmenty DNA rozdzielano w 0,5xTBE (Sigma-Aldrich, St. Louis USA) w temperaturze 14°C przy 6V przez 22 godziny z czasem narastania impulsu 2-35s. Obraz zwizualizowano przy użyciu bromku etydyny przy zastosowaniu GelDocIt Imaging System (UVP, California USA) oraz programu komputerowego DOC-IT®LS. Analizę wyników przeprowadzono przy pomocy programu GelCompar (Applied Maths, Kortrijk, Belgia). Wyniki przedstawiono w formie dendrogramu, a do ich uzyskania zastosowano współczynnik Dice (ang. *Dice coefficient similarity*) oraz metodę najbliższego sąsiedztwa (ang. *Unweighted Pair Group Method Analysis*, UPGMA).

Wykorzystane materiały:

- Enzym *Xba*I (EURx, Gdańsk, Polska)
- Bufor TBE (Sigma-Aldrich, St. Louis USA),
- Bromek etydyny 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis USA).

### **Komisja Bioetyczna**

Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego, opinia nr 1072.6120.64.2019 z dnia 28.03.2019 (załącznik nr 1).

**Tabela 1. Wykaz genów, użytych starterów oraz warunków przeprowadzonych reakcji PCR.**

		Sekwencja startera przedniego For 5'-3'	Sekwencja startera wstecznego Rev 5'-3'	Wielkość produktu (bp)	Temp. przyłączenia starterów / liczba cykli	Literatura
Geny wirulencji <i>E.coli</i>	<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	63°C; 25 cykli	127
	<i>papC</i>	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	200	63°C; 25 cykli	127
	<i>papEF</i>	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336	63°C; 25 cykli	128
	<i>sfa/foc</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	63°C; 25 cykli	127
	<i>iha</i>	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	TCCTTAAGCTCCC GCGGCTGA	827	63°C; 25 cykli	129
	<i>iucC</i>	AAACCTGGCTTACGCAACTGT	ACCCGTCTGCAAATCATGGAT	269	55°C; 30 cykli	127
	<i>iroN</i>	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	GACGCCGACATTAAGACGCAG	665	63°C; 25 cykli	129
	<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	300	63°C; 25 cykli	127
	<i>fyuA</i>	TGATTAACCCCGCGACGGGAA	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	880	63°C; 25 cykli	127
	<i>ireA</i>	GATGACTCAGCCACGGGTAA	CCAGGACTCACCTCACGAAT	254	68°C; 35 cykli	130
	<i>fepA</i>	AGCTGACTGACAGCACCATCG	CGGGATGATCGACAAACGGTGC	554	56,5°C; 35 cykli	130
	<i>fecA</i>	AGGTTAATATCGCACCGGGATCG	ATGGCATCCATGTTGCCGAGC	565	68°C; 35 cykli	130
	<i>fhuA</i>	AGACACTATCACCGTTACCGCTG	GCCGCGAATGATCAGGTGGTC	265	64°C; 35 cykli	130
	<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA	1177	63°C; 25 cykli	128
	<i>ibeA</i>	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	170	63°C; 25 cykli	127
<i>neuC</i>	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	GGTGGTACATTCCGGGATGTC	675	61°C; 30 cykli	131	
Geny wirulencji <i>K.pneumoniae</i>	<i>magA</i>	GGTGCTCTTTACATCATTGC	GCAATGGCCATTTGCGTTAG	1280	50°C; 30 cykli	132
	<i>rmpA</i>	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	CTTGCATGAGCCATCTTTCA	535	46°C; 30 cykli	133
	<i>uge</i>	GATCATCCGGTCTCCCTGTA	TCTTCACGCCTTCCTTCACT	534	53°C; 30 cykli	134
	<i>wabG</i>	CGGACTGGCAGATCCATATC	ACCATCGGCCATTTGATAGA	683	53°C; 30 cykli	133
	<i>kfu</i>	GAAGTGACGCTGTTTCTGGC	TTTCGTGTGGCCAGTGACTC	797	55°C; 30 cykli	135
	<i>aerKP</i>	GCATAGGCGGATACGAACAT	CACAGGGCAATTGCTT	556	58°C; 35 cykli	136
	<i>allS</i>	CCGAAACATTACGCACCTTT	ATCACGAAGAGCCAGGTCAC	508	49°C; 35 cykli	136
	Geny β-laktamaz	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	713	60°C; 30 cykli
<i>bla<sub>TEM</sub></i>		CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	800	60°C; 30 cykli	126
<i>bla<sub>OXA</sub></i>		GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG	564	60°C; 30 cykli	126
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>		TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	688	60°C; 30 cykli	126

## 7. WYNIKI

### 7.1. Etiologia drobnoustrojowa przypadków zakażeń krwi

Z zakażeń krwi wśród dorosłych osób hospitalizowanych wyizolowano w sumie 557 szczepów bakteryjnych, w tym należących do rzędu *Enterobacterales* oraz innych gatunków nienależących do *Enterobacterales* (Tab. 2).

Ogółem wyizolowano 161 szczepów (29,0%) należących do ziarenkowców Gram-dodatnich, wśród których dominującym gatunkiem był *Staphylococcus aureus* niezależnie od oddziału. Na oddziałach internistycznych zaobserwowano 26,9% udział (100 szczepów) *S.aureus*, natomiast na OIT i zabiegowych odpowiednio 18,5% (5 szczepów) oraz 7,6% (12 szczepów). Najrzadziej izolowane były gatunki: *Streptococcus constellatus* (1 szczep na oddziale internistycznym; 0,3%), *Streptococcus pyogenes* (po jednym szczepie na oddziale internistycznym i zabiegowym, odpowiednio 0,3% i 3,7%) oraz *Streptococcus agalactiae* (2 szczepy na oddziale internistycznym; 0,5%). Gronkowce koagulazo-ujemne (ang. *coagulase-negative staphylococci*, CNS) stanowiły 2,1% udział na oddziałach internistycznych (8 szczepów) oraz 1,3% udział na oddziałach zabiegowych (2 szczepy) natomiast obecności CNS nie odnotowano na OIT (Tab. 2).

Łącznie wyizolowano 356 pałeczek rzędu *Enterobacterales* (63,8%). Najczęściej izolowanym gatunkiem była *Escherichia coli*, niezależnie od oddziału. Na oddziałach internistycznych zanotowano 37,6% udział szczepów *E.coli* (140 izolatów), zaś na oddziałach zabiegowych i OIT odpowiednio 46,8% (74 szczepy) i 29,6% (8 szczepów). Drugim, dominującym gatunkiem wśród wyizolowanych pałeczek *Enterobacterales*, była *Klebsiella pneumoniae*. Gatunek ten dominował szczególnie na OIT (9 szczepów; 33,3%) natomiast wśród izolatów na oddziałach internistycznych i zabiegowych stanowił odpowiednio 11,8% (44 szczepy) oraz 17,1% (27 szczepów). Zaobserwowano także pewien odsetek izolatów *Enterobacter cloacae* na oddziałach internistycznych (2,7%; 10 szczepów) oraz izolatów *Proteus mirabilis* na oddziałach zabiegowych (6,3%; 10 szczepów). Poza izolatami z gatunku *E.coli* oraz *K.pneumoniae* nie odnotowano obecności żadnych innych pałeczek z grupy *Enterobacterales* w OIT (Tab. 2).

Grupa szczepów, inna niż wyżej wymienione, obejmowała w sumie 40 izolatów (7,2%), gdzie gatunek *Pseudomonas aeruginosa* stanowił 10,1% przypadków na oddziałach zabiegowych (16 szczepów) oraz 2,7% przypadków na oddziałach

internistycznych (10 szczepów). Wykazano obecność także innych, rzadko izolowanych gatunków, które stanowiły 0,5% izolatów na oddziałach internistycznych (Tab. 2).

**Tabela 2. Szczepy wyizolowane z zakażeń krwi od osób dorosłych hospitalizowanych w zależności od oddziałów.**

	Gatunek	Oddziały internistyczne	Oddziały zabiegowe	OIT	RAZEM	p
<b>nie-Enterobacterales n=161</b>	Ziarenkowce Gram-dodatnie	<b>161 (29,0%)</b>				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	100 (26,9%)	12 (7,6%)	5 (18,5%)	117 (21,0%)	< <b>0,0001</b>
	<i>Enterococcus faecalis</i>	17 (4,6%)	3 (1,9%)	2 (7,4%)	22 (3,9%)	0,2254
	<i>Enterococcus faecium</i>	3 (0,8%)	1 (0,6%)	0	4 (0,7%)	1,0000
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2 (0,5%)	0	0	2 (0,3%)	1,0000
	<i>Streptococcus beta-hem. gr.G</i>	1 (0,3%)	2 (1,3%)	0	3 (0,5%)	0,3223
	<i>Streptococcus constellatus</i>	1 (0,3%)	0	0	1 (0,2%)	1,0000
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 (0,3%)	0	1 (3,7%)	2 (0,3%)	0,0947
Gronkowce koagulazoujemne	8 (2,1%)	2 (1,3%)	0	10 (1,8%)	0,8368	
<b>Enterobacterales n=356</b>	Pałeczki Gram-ujemne	<b>356 (63,8%)</b>				
	<i>Escherichia coli</i>	140 (37,6%)	74 (46,8%)	8 (29,6%)	222 (39,9%)	0,0760
	<i>Citrobacter koseri</i>	1 (0,3%)	0	0	1 (0,2%)	1,0000
	<i>Citrobacter freundii</i>	0	1 (0,6%)	0	1 (0,2%)	0,3321
	<i>Citrobacter braakii</i>	1 (0,3%)	0	0	1 (0,2%)	1,0000
	<i>Enterobacter cloacae</i>	10 (2,7%)	3 (1,9%)	0	13 (2,3%)	0,8770
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	44 (11,8%)	27 (17,1%)	9 (33,3%)	80 (14,4%)	<b>0,0045</b>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	6 (1,6%)	5 (3,2%)	0	11 (2,0%)	0,4402
	<i>Klebsiella mobilis</i>	1 (0,3%)	1 (0,6%)	0	2 (0,3%)	0,5544
	<i>Salmonella enteritidis</i>	1 (0,3%)	0	0	1 (0,2%)	1,0000
	<i>Serratia marcescens</i>	1 (0,3%)	1 (0,6%)	0	2 (0,3%)	0,5544
	<i>Morganella morganii</i>	3 (0,8%)	0	0	3 (0,5%)	0,6194
	<i>Proteus mirabilis</i>	9 (2,4%)	10 (6,3%)	0	19 (3,4%)	0,0669
<b>Inne n=40</b>	Pałeczki Gram-ujemne, inne	<b>40 (7,2%)</b>				
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	9 (2,4%)	0	1 (3,7%)	10 (1,8%)	0,0529
	<i>Acinetobacter Iwofii</i>	1 (0,3%)	0	0	1 (0,2%)	1,0000
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 (2,7%)	16 (10,1%)	1 (3,7%)	27 (4,8%)	<b>0,0012</b>
	Inne	2 (0,5%)	0	0	2 (0,3%)	1,0000
	<b>RAZEM</b>	372 (100%)	158 (100%)	27 (100%)	<b>557 (100%)</b>	

## 7.2. Analiza epidemiologiczna zakażeń krwi o etiologii *Enterobacterales*

Wśród zebranych w latach 2015-2018 szczepów *Enterobacterales* pochodzących z zakażeń krwi od osób dorosłych hospitalizowanych stwierdzono zakażenia w różnych grupach pacjentów.

Na oddziałach internistycznych średnia wieku wyniosła 71,5 lat (31, 96), większość stanowiły kobiety (124 osób; 58,5%). Pacjenci byli hospitalizowani przeważnie na oddziałach: gastroenterologicznych (32; 15,1%), reumatologicznych (17; 8,0%), kardiologicznych (16; 7,5%). W przypadku *Staphylococcus aureus* stwierdzono wysoce istotną ( $<0,0001$ ) zależność prewalencji od oddziałów. Najwyższy udział wyników dodatnich dotyczył oddziału internistycznego (27%) a kolejne to OIT (19%) i oddział zabiegowy (8%). Łącznie, na oddziałach internistycznych, wyizolowano 216 szczepów należących do *Enterobacterales*. Prewalencja *Enterobacterales* w przypadkach zakażeń krwi wyniosła 60,7%, najczęściej izolowanym szczepem była *Escherichia coli* (140; 64,8%), następnie *Klebsiella pneumoniae* (44; 20,4%). Poza *K.pneumoniae* wśród rodzaju *Klebsiella* zaobserwowano jeszcze 6 szczepów *Klebsiella oxytoca* (2,8%) oraz 1 szczep *Klebsiella mobilis* (0,5%). Zidentyfikowano także niski udział pałeczek *Enterobacterales* określony jako „Inne”, w tym: 10 *Enterobacter cloacae* (4,6%), 9 *Proteus mirabilis* (4,2%), 3 *Morganella morganii* (1,4%) oraz po jednym izolacie *Citrobacter koseri* (0,5%), *Citrobacter braakii* (0,5%), *Salmonella enteritidis* (0,5%) oraz *Serratia marcescens* (0,5%) (Tab. 2). Prewalencja szczepów ESBL+ wyniosła 36,3% (77 szczepów).

Na oddziałach zabiegowych średnia wieku wyniosła 64,3 lata (21, 96), większość stanowiły kobiety (63 osoby; 52,1%). Pacjenci byli hospitalizowani głównie na oddziałach urologicznych (109 osób; 90,1%). W przypadku *Pseudomonas aeruginosa* stwierdzono wysoce istotną (0,0012) zależność prewalencji od oddziałów. Najwyższy udział wyników dodatnich dotyczył oddziału zabiegowego (10%) a kolejne to OIT (4%) i oddział internistyczny (3%). W sumie wyizolowano 122 szczepy należące do *Enterobacterales*. Prewalencja *Enterobacterales* w przypadkach zakażeń krwi wyniosła 34,3%, najczęściej izolowanym szczepem była *Escherichia coli* (74; 60,6%) a następnie *Klebsiella pneumoniae* (27; 22,1%). Wśród rodzaju *Klebsiella* zidentyfikowano także gatunki *Klebsiella oxytoca* (5 szczepów; 4,1%) oraz *Klebsiella mobilis* (1 szczep; 0,8%). Do izolatów *Enterobacterales* oznaczonych jako „Inne” zaliczono: 10 *Proteus mirabilis* (8,2%), 3 *Enterobacter cloacae* (2,5%), 1 *Citrobacter freundii* (0,8%) i 1 *Serratia*

*marcescens* (0,8%) (Tab. 2). Prewalencja szczepów ESBL+ wyniosła 38,0% (46 szczepów).

Na oddziałach intensywnej terapii średnia wieku wyniosła 65,5 lat (43, 87), kobiety stanowiły mniejszą część pacjentów (8 osób; 47,1%), przeważali mężczyźni (9 osób; 52,9%). Na OIT wyizolowano ogółem 17 szczepów rzędu *Enterobacterales*. W przypadku *Klebsiella pneumoniae* stwierdzono wysoce istotną (0,0045) zależność prewalencji od oddziałów. Najwyższy udział wyników dodatnich dotyczył OIT (33%), a kolejne to oddział zabiegowy (17%) i oddział internistyczny (12%). Prewalencja *Enterobacterales* w przypadkach zakażeń krwi wyniosła 4,8%, najczęściej izolowanym szczepem była *Klebsiella pneumoniae* (9; 52,9%) a następnie *Escherichia coli* (8; 47,1%). Nie odnotowano obecności żadnych innych izolatów należących do *Enterobacterales* (Tab. 2). Prewalencja szczepów ESBL+ wyniosła 64,7% (11 szczepów). Załącznik nr 2 zawiera przykładowe zdjęcia hodowli szczepu *K.pneumoniae* ESBL+ oraz ESBL- na podłożu Mueller-Hintona (BioCorp, Polska).

### **7.3. Wirulencja badanych szczepów *Enterobacterales***

#### **7.3.1. *Escherichia coli***

Na oddziałach internistycznych (Tab. 3), wśród szczepów *E.coli* ESBL+, najczęściej wykrywano geny związane z transportem żelaza: *iucC* (95,2%), *iutA* (95,2%), *fepA* (97,6%) oraz geny adhezji: *iha* (88,1%), *fimH* (85,7%), *papC* (83,3%). W przypadku genów adhezji: *fimH* (0,0019), *papC* (0,0224) oraz *papEF* (0,0022) stwierdzono istotną zależność od oddziału. Nie stwierdzono obecności genów *sfa/foc* oraz genów związanych z patogenezą zapalenia opon mózgowych: *neuC* czy *ibeA* (Tab. 3). Załącznik nr 3 zawiera przykładowe zdjęcie przedstawiające rozdział elektroforetyczny produktów PCR genu adhezji *fimH* szczepów *E.coli* ESBL+ wyizolowanych z oddziałów internistycznych.

Na oddziałach zabiegowych także najczęściej wykrywanymi były geny związane z transportem żelaza: *fepA* (100%), *iucC* (89,5%), *fecA* (78,9%) oraz geny adhezji: *fimH* (100%), *iha* (84,2%), *papC* (52,6%). Istotnie częściej na oddziałach internistycznych i zabiegowych wykrywano gen związany z transportem żelaza *iutA* (0,0381). Nie stwierdzono obecności genów *sfa/foc* oraz *ibeA* (Tab. 3).

Na OIT, u wszystkich szczepów *E.coli* ESBL+ zaobserwowano obecność genu adhezji: *iha* (100%) oraz genów związanych z transportem żelaza: *iucC* (100%), *iutA* (100%), *fyuA* (100%), *fepA* (100%), *fecA* (100%). Nie stwierdzono obecności genów



związanych z patogenezą zapalenia mózgu (*ibeA*, *neuC*) oraz genu hemolizyny (*hlyA*) (Tab.3).

**Tabela 3. Prewalencja genów wirulencji wśród szczepów *E.coli* ESBL+ w zależności od oddziałów szpitalnych.**

		<i>E.coli</i> ESBL+ n=65				
		oddziały			Razem	P
		internistyczne n=42	zabiegowe n=19	OIT n=4		
<b>geny adhezji</b>	<i>fimH</i>	36 (85,7%)	19 (100%)	1 (25,0%)	56 (86,2%)	<b>0,0019</b>
	<i>papC</i>	35 (83,3%)	10 (52,6%)	2 (50,0%)	47 (72,3%)	<b>0,0224</b>
	<i>papEF</i>	31 (73,8%)	6 (31,6%)	1 (25,0%)	38 (58,5%)	<b>0,0022</b>
	<i>sfa/foc</i>	0	0	0	0	1,0000
	<i>iha</i>	37 (88,1%)	16 (84,2%)	4 (100%)	57 (87,7%)	0,8223
<b>geny związane z transportem żelaza</b>	<i>iucC</i>	40 (95,2%)	17 (89,5%)	4 (100%)	61 (93,8%)	0,6778
	<i>iroN</i>	3 (7,1%)	1 (5,2%)	0	4 (6,2%)	1,0000
	<i>iutA</i>	40 (95,2%)	14 (73,7%)	4 (100%)	58 (89,2%)	<b>0,0381</b>
	<i>fyuA</i>	30 (71,4%)	15 (78,9%)	4 (100%)	49 (75,4%)	0,6405
	<i>ireA</i>	2 (4,8%)	2 (10,5%)	1 (25,0%)	5 (7,7%)	0,1952
	<i>fepA</i>	41 (97,6%)	19 (100%)	4 (100%)	64 (98,5%)	1,0000
	<i>fecA</i>	25 (59,5%)	15 (78,9%)	4 (100%)	44 (67,7%)	0,1600
	<i>fhuA</i>	2 (4,8%)	3 (15,8%)	0	5 (7,7%)	0,2962
<b>gen toksyny</b>	<i>hlyA</i>	15 (35,7%)	2 (10,5%)	0	17 (26,2%)	0,0695
<b>Inne</b>	<i>ibeA</i>	0	0	0	0	1,0000
	<i>neuC</i>	0	1 (5,2%)	0	1 (1,5%)	0,3538

### 7.3.2. *Klebsiella pneumoniae*

Na oddziałach internistycznych, u szczepów *K.pneumoniae* ESBL+ pochodzących z zakażeń krwi (Tab. 4), odnotowano najwięcej genów związanych z syntezą otoczki: *wabG* (100%), *uge* (86,9%) oraz związanych z transportem żelaza – *aerKP* (52,2%). Geny związane z syntezą otoczki były wykrywane najczęściej, bez względu na oddział.

Na oddziałach zabiegowych i OIT gen *wabG* zaobserwowano w 100% badanych szczepów (odpowiednio 18 oraz 7 szczepów). Na oddziałach zabiegowych, oprócz genu *wabG*, zaobserwowano także obecność genów *uge* (83,3%) i *rmpA* (55,6%), związanych z syntezą otoczki, oraz *kfu* (50,0%) związanego z transportem żelaza. W przypadku genu *kfu* stwierdzono wysoce istotną (0,0081) zależność od oddziału, a najwyższą prewalencję stwierdzono w OIT (100%) (Tab. 4).

Na OIT gen *uge* był wykrywany wśród 100% izolatów (7 szczepów). Nie zanotowano obecności genu odpowiedzialnego za metabolizm allantoiny *allS* (Tab. 4).

**Tabela 4. Prewalencja genów wirulencji wśród szczepów *K.pneumoniae* ESBL+ w zależności od oddziałów.**

		<i>K.pneumoniae</i> ESBL+ n=48				
		oddziały			Razem	P
		internistyczne n=23	zabiegowe n=18	OIT n=7		
<b>geny związane z syntezą otoczki</b>	<i>magA</i>	2 (8,7%)	4 (22,2%)	1 (14,3%)	7 (14,6%)	0,5584
	<i>rmpA</i>	8 (34,8%)	10 (55,6%)	2 (28,6%)	20 (41,7%)	0,4049
	<i>uge</i>	20 (86,9%)	15 (83,3%)	7 (100%)	42 (87,5%)	0,8454
	<i>wabG</i>	23 (100%)	18 (100%)	7 (100%)	48 (100%)	1,0000
<b>geny związane z transportem żelaza</b>	<i>kfu</i>	8 (34,8%)	9 (50,0%)	7 (100%)	24 (50,0%)	<b>0,0081</b>
	<i>aerKP</i>	12 (52,2%)	5 (27,8%)	1 (14,3%)	18 (37,5%)	0,1281
<b>inne</b>	<i>allS</i>	0	0	0	0	1,0000

#### **7.4. Lekooporność pałeczek *Enterobacterales* izolowanych z zakażeń krwi**

W każdym z badanych oddziałów zanotowano wysoką oporność szczepów (w granicach 85,7-100%) na ampicylinę oraz ampicylinę z sulbaktamem, niezależnie od gatunku. Niższe oporności, w zakresie 12,5-71,4%, zaobserwowano w odniesieniu do inhibitorów  $\beta$ -laktamaz z antybiotykiem, zwłaszcza piperacyliny z tazobaktamem (12,5-55,6%). Wśród  $\beta$ -laktamów, *E.coli* wykazywała najniższą oporność na piperacylinę z tazobaktamem, niezależnie od oddziału. Cefalosporyny bez inhibitora wykazywały oporność w zakresie 28,6-66,7%, niezależnie od oddziału, zaś oporność na cefoperazon z sulbaktamem wahała się między 4,8% a 25,0%, niezależnie od oddziału. *K.pneumoniae* wykazywała wyższą oporność na cefalosporyny bez inhibitora, niezależnie od oddziału. Niezależnie od oddziału czy gatunku, wykazano wysoką wrażliwość szczepów na karbapenemy (do 100%). Wśród aminoglikozydów zanotowano najniższą oporność na amikacynę (11,1-40,7%), najwyższą zaś na tobramycynę (28,6-55,6%), niezależnie od oddziału. Wykazano, że niezależnie od oddziału, szczepy *Klebsiella* spp. są najbardziej odporne na trimetoprim z sulfametoksazolem (55,6-83,3%). Nie odnotowano istotnych statystycznie związków między lekoopornością a oddziałem szpitalnym.

##### **7.4.1. Lekooporność pałeczek *Enterobacterales* izolowanych z zakażeń krwi na oddziałach internistycznych**

Zanotowano wysoką oporność na penicyliny – do 100%, natomiast oporność na amoksycylinę z kwasem klawulanowym wahała się w granicach 14,3-71,4%. Na oddziałach internistycznych (Tab. 5) wykazano, że większość szczepów charakteryzowała się opornością na cefalosporyny bez inhibitora (14,3-61,9%), a *Klebsiella* spp. charakteryzowała się wyższą opornością na cefoperazon z sulbaktamem (13,6-14,3%) w porównaniu do innych szczepów izolowanych z tego samego oddziału lub OIT. Odnotowano trzy izolaty odporne na karbapenemy i była to najliczniejsza grupa spośród badanych populacji (2 szczepy *E.coli* oraz 1 szczep *K.pneumoniae*). Oporność na fluorochinolony była najniższa (28,6%) wśród izolatów *Klebsiella* spp., w zestawieniu z oddziałami zabiegowymi oraz OIT. Oporność na aminoglikozydy wahała się w granicach 13,6-45,4%, w zależności od gatunku drobnoustroju i antybiotyku (Tab. 5).

Tabela 5. Lekooporność szczepów *Enterobacterales* na oddziałach internistycznych.

Grupa leków przeciwdrobnoustrojowych	Antybiotyk	<i>Enterobacterales</i> BSI			
		Oddziały internistyczne n=212			
		<i>E.coli</i> n=140	<i>Klebsiella pneumoniae</i> n=44	<i>Klebsiella spp.</i> n=7	Inne n=21*
Penicyliny	Ampicylina	133 (95,0%)	43 (97,7%)	6 (85,7%)	20 (95,2%)
	Ampicylina-sulbaktam	132 (94,3%)	40 (90,9%)	7 (100%)	19 (90,5%)
	Amoksycylina-kwas klawulanowy	73 (52,1%)	24 (54,5%)	1 (14,3%)	15 (71,4%)
	Piperacylina-tazobaktam	24 (17,1%)	15 (34,1%)	2 (28,6%)	5 (23,8%)
Cefalosporyny	Cefuroksym	56 (40,0%)	20 (45,4%)	3 (42,8%)	10 (47,6%)
	Ceftazydym	52 (37,1%)	19 (43,2%)	2 (28,6%)	9 (42,8%)
	Cefotaksym	53 (37,8%)	19 (43,2%)	3 (42,8%)	9 (42,8%)
	Cefepim	58 (41,4%)	16 (36,4%)	1 (14,3%)	13 (61,9%)
	Cefoperazon-sulbaktam	9 (6,4%)	6 (13,6%)	1 (14,3%)	1 (4,8%)
Karbapenemy	Ertapenem	2 (1,4%)	1 (2,3%)	0	0
	Imipenem	0	0	0	0
	Meropenem	0	0	0	0
Fluorochinolony	Ciprofloksacyna	80 (57,1%)	25 (56,8%)	2 (28,6%)	14 (66,7%)
Aminoglikozydy	Gentamycyna	45 (32,1%)	15 (34,1%)	1 (14,3%)	5 (23,8%)
	Amikacyna	19 (13,6%)	11 (25,0%)	2 (28,6%)	4 (19,0%)
	Tobramycyna	56 (40,0%)	20 (45,4%)	2 (28,6%)	8 (38,1%)
Inne	Trimetoprim-sulfametoksazol	66 (47,1%)	22 (50,0%)	5 (71,4%)	10 (47,6%)

\*w analizie nie uwzględniono szczepów z rodzaju *Salmonella*, *Serratia* oraz *Morganella* z powodu braku wzrostu bakterii.

#### **7.4.2. Lekooporność pałeczek *Enterobacterales* izolowanych z zakażeń krwi na oddziałach zabiegowych**

U pacjentów oddziałów zabiegowych zaobserwowano 100% oporność szczepów *K.pneumoniae* na ampicylinę oraz ampicylinę z sulbaktamem, w porównaniu do oddziałów internistycznych (Tab. 6). Podobnie jak na oddziałach internistycznych, rodzaj *Klebsiella* charakteryzował się wyższą opornością na cefoperazon z sulbaktamem (16,7-18,5%) niż inne szczepy izolowane z tego oddziału bądź z OIT. Zanotowano najniższą oporność (48,6%) na fluorochinolony wśród izolatów *E.coli*, w zestawieniu z oddziałami internistycznymi oraz OIT. Oporność na aminoglikozydy wahała się w zakresie 14,2-55,5%, w zależności od gatunku drobnoustroju i antybiotyku. Na oddziałach zabiegowych wykazano najwyższą oporność szczepów na trimetoprim z sulfametoksazolem (50,0-83,3%), porównując do oddziałów internistycznych i OIT (Tab. 6).

Tabela 6. Lekooporność szczepów *Enterobacteriales* na oddziałach zabiegowych.

Grupa leków przeciwdrobnoustrojowych	Antybiotyk	<i>Enterobacteriales</i> BSI			
		Oddziały zabiegowe n=121			
		<i>E.coli</i> n=74	<i>Klebsiella pneumoniae</i> n=27	<i>Klebsiella</i> spp. n=6	Inne n=14*
Penicyliny	Ampicylina	73 (98.6%)	27 (100%)	6 (100%)	14 (100%)
	Ampicylina-sulbaktam	72 (97.2%)	27 (100%)	6 (100%)	13 (92.8%)
	Amoksycylina-kwas klawulanowy	34 (45.9%)	18 (66.7%)	2 (33.3%)	5 (35.7%)
	Piperacylina-tazobaktam	10 (13.5%)	9 (33.3%)	2 (33.3%)	3 (21.4%)
Cefalosporyny	Cefuroksym	29 (39.1%)	13 (48.1%)	2 (33.3%)	7 (50.0%)
	Ceftazydym	29 (39.1%)	12 (44.4%)	2 (33.3%)	5 (35.7%)
	Cefotaksym	28 (37.8%)	11 (40.7%)	2 (33.3%)	5 (35.7%)
	Cefepim	22 (29.7%)	14 (51.8%)	2 (33.3%)	5 (35.7%)
	Cefoperazon-sulbaktam	6 (8.1%)	5 (18.5%)	1 (16.7%)	0
Karbapenemy	Ertapenem	0	1 (3.7%)	0	0
	Imipenem	1 (1.3%)	0	0	0
	Meropenem	0	0	0	0
Fluorochinolony	Ciprofloksacyna	36 (48.6%)	20 (74.1%)	4 (66.7%)	8 (57.1%)
Aminoglikozydy	Gentamycyna	19 (25.6%)	6 (22.2%)	1 (16.7%)	5 (35.7%)
	Amikacyna	11 (14.8%)	11 (40.7%)	2 (33.3%)	2 (14.2%)
	Tobramycyna	24 (32.4%)	15 (55.5%)	2 (33.3%)	5 (35.7%)
Inne	Trimetoprim-sulfametoksazol	37 (50.0%)	16 (59.2%)	5 (83.3%)	9 (64.2%)

\*w analizie nie uwzględniono szczepów z rodzaju *Serratia* z powodu braku wzrostu bakterii.

### **7.4.3. Lekooporność pałeczek *Enterobacterales* izolowanych z zakażeń krwi na oddziałach intensywnej terapii**

Tabela 7 przedstawia oporności pałeczek *Enterobacterales* izolowanych na oddziałach intensywnej terapii (Tab. 7). W porównaniu do oddziałów internistycznych zanotowano wysoką, 100% oporność, na ampicylinę oraz ampicylinę z sulbaktamem wśród *K.pneumoniae*. W porównaniu do oddziałów internistycznych oraz zabiegowych, na OIT zaobserwowano wyższą oporność na cefoperazon z sulbaktamem wśród izolatów *E.coli* (25,0%). Szczepy izolowane na OIT charakteryzowały się najwyższą wrażliwością (100%) na karbapenemy, w porównaniu do pozostałych oddziałów. Na OIT zaobserwowano najwyższą oporność na fluorochinolony (66,7-75,0%), w zestawieniu z oddziałami internistycznymi oraz zabiegowymi. Oporność na aminoglikozydy wahała się w zakresie 11,1-55,6%, w zależności od gatunku drobnoustroju i antybiotyku. Zanotowano także najniższą oporność szczepów na trimetoprim z sulfametoksazolem (50,0-55,6%), w zestawieniu z oddziałami internistycznymi oraz zabiegowymi (Tab. 7).

Tabela 7. Lekooporność szczepów *Enterobacterales* na oddziałach intensywnej terapii.

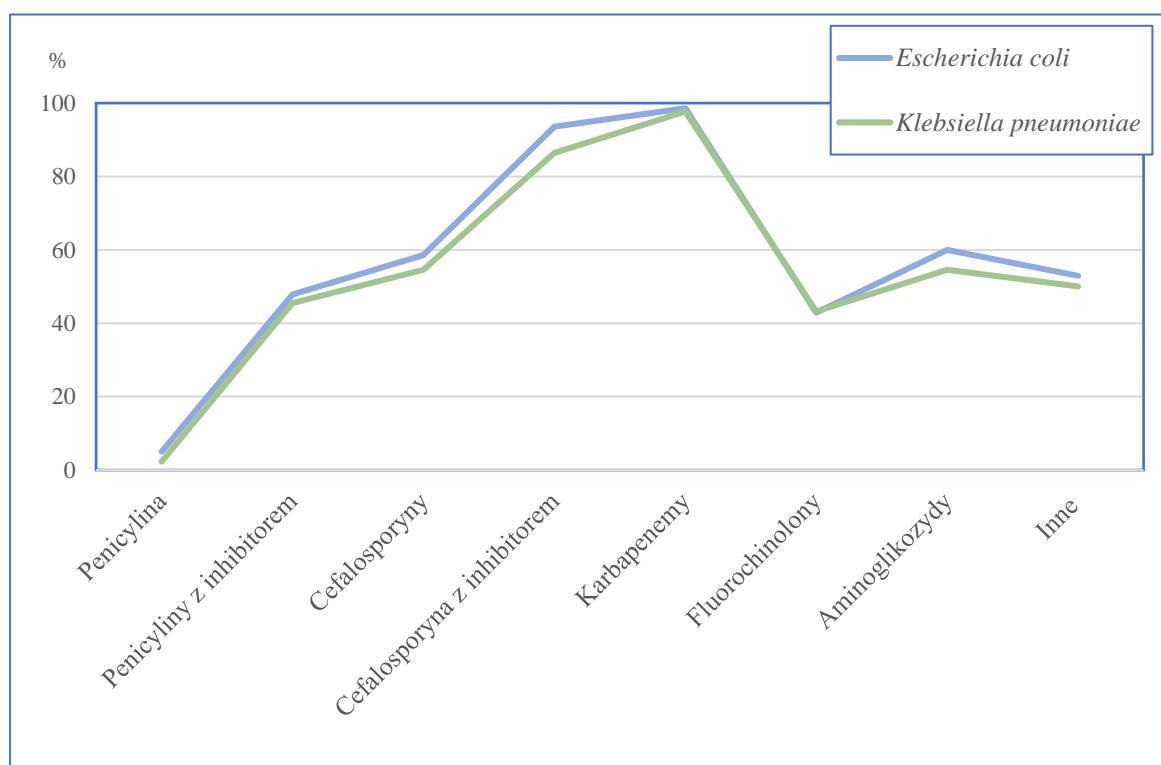
Grupa leków przeciwdrobnoustrojowych	Antybiotyki	<i>Enterobacterales</i> BSI		
		OIT n=17		
		<i>E.coli</i> n=8	<i>Klebsiella pneumoniae</i> n=9	Inne n=0
Penicyliny	Ampicylina	8 (100%)	9 (100%)	0
	Ampicylina-sulbaktam	8 (100%)	9 (100%)	0
	Amoksycylina-kwas klawulanowy	5 (62,5%)	6 (66,7%)	0
	Piperacylina-tazobaktam	1 (12,5%)	5 (55,6%)	0
Cefalosporyny	Cefuroksym	4 (50,0%)	6 (66,7%)	0
	Ceftazydym	4 (50,0%)	6 (66,7%)	0
	Cefotaksym	4 (50,0%)	6 (66,7%)	0
	Cefepim	3 (37,5%)	4 (44,4%)	0
	Cefoperazon-sulbaktam	2 (25,0%)	1 (11,1%)	0
Karbapenemy	Ertapenem	0	0	0
	Imipenem	0	0	0
	Meropenem	0	0	0
Fluorochinolony	Ciprofloksacyna	6 (75,0%)	6 (66,7%)	0
Aminoglikozydy	Gentamycyna	4 (50,0%)	4 (44,4%)	0
	Amikacyna	2 (25,0%)	1 (11,1%)	0
	Tobramycyna	4 (50,0%)	5 (55,6%)	0
Inne	Trimetoprim-sulfametoksazol	4 (50,0%)	4 (55,6%)	0



### 7.5. Wrażliwość szczepów *Escherichia coli* oraz *Klebsiella pneumoniae* według grup antybiotyków

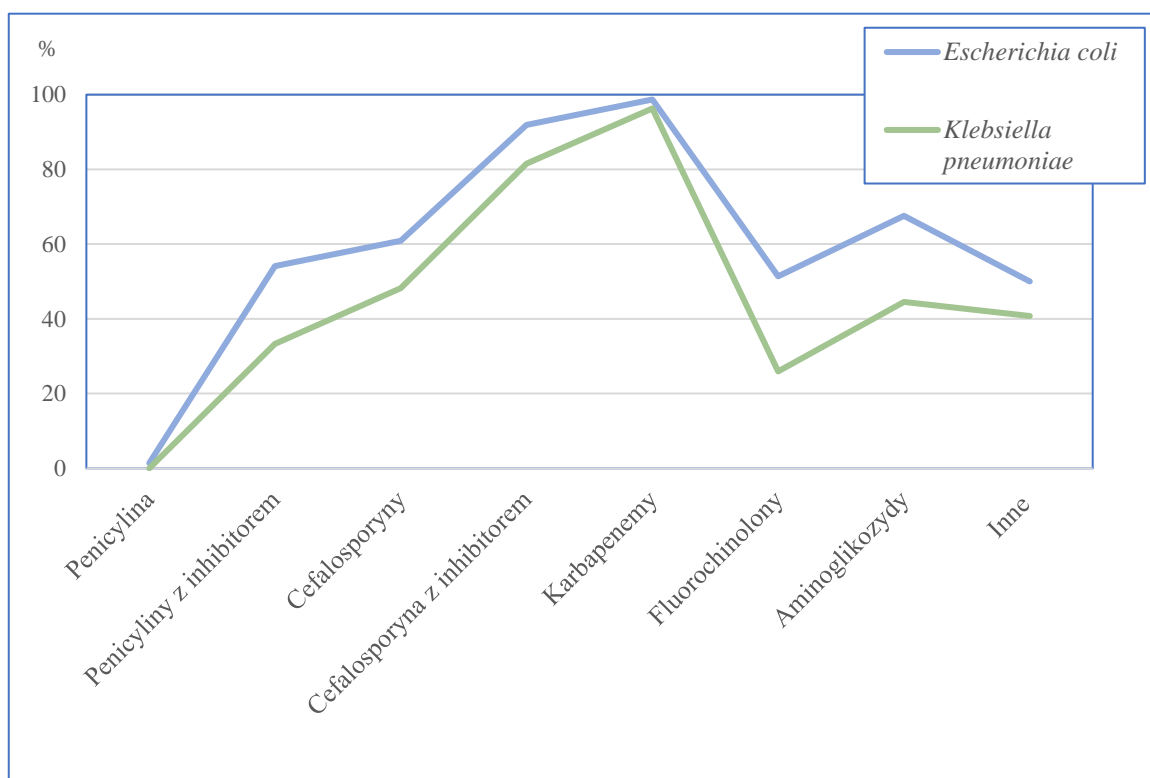
Na oddziałach internistycznych najwyższą wrażliwość zaobserwowano w stosunku do cefalosporyn z inhibitorem oraz karbapenemów – od 86% do prawie 100% (Ryc. 2), bez względu na gatunek. Niższą wrażliwość szczepów, w zakresie 50-60%, zanotowano w odniesieniu do cefalosporyn i aminoglikozydów, bez względu na gatunek. W przypadku penicyliny, penicylin z inhibitorem, cefalosporyn, fluorochinolonów, aminoglikozydów oraz innych antybiotyków stwierdzono wysoce istotną ( $p < 0,01$ ) zależność od gatunku bakterii i relacje są we wszystkich przypadkach takie same czyli niższe wrażliwości stwierdzono wśród *K. pneumoniae*. W przypadku fluorochinolonów wrażliwość izolatów *E.coli* oraz *K.pneumoniae* nieznacznie spadła (do około 40%). Zaobserwowano prawie zerową wrażliwość izolatów *E.coli* i *K.pneumoniae* na penicyliny oraz wrażliwość w granicach 45-50% na penicyliny z inhibitorem. Wrażliwość na inne antybiotyki osiągnęła poziom 50% bez względu na gatunek.

Rycina 2. Wrażliwość szczepów *E.coli* i *K.pneumoniae* według grup antybiotyków na oddziałach internistycznych.



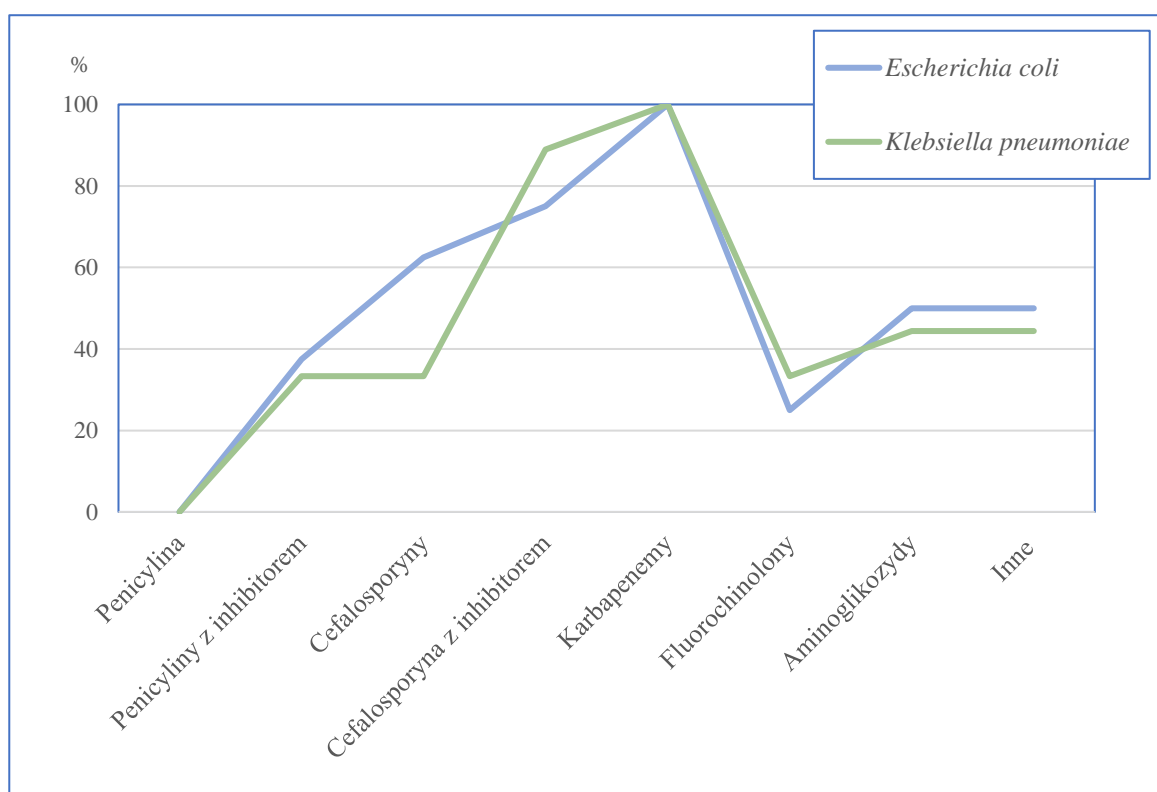
Na oddziałach zabiegowych, podobnie jak na oddziałach internistycznych, zaobserwowano najwyższą wrażliwość szczepów w stosunku do cefalosporyn z inhibitorem oraz karbapenemów (od 80% do prawie 100%), bez względu na gatunek (Ryc. 3). W przypadku penicyliny, penicylin z inhibitorem, cefalosporyn, fluorochinolonów oraz innych antybiotyków stwierdzono wysoce istotną ( $p < 0,01$ ) zależność od gatunku bakterii i relacje są we wszystkich przypadkach takie same czyli niższą wrażliwość stwierdzono wśród *K. pneumoniae*. Najniższą wrażliwość, bez względu na gatunek, zanotowano w stosunku do penicylin – prawie 0% wrażliwych izolatów *E.coli* i *K.pneumoniae*. Wrażliwość na cefalosporyny oraz aminoglikozydy wahała się w granicach 45-70%, bez względu na gatunek.

**Rycina 3. Wrażliwość szczepów *E.coli* i *K.pneumoniae* według grup antybiotyków na oddziałach zabiegowych.**



Podobnie jak na oddziałach internistycznych oraz zabiegowych, najwyższą wrażliwość zanotowano w stosunku do cefalosporyn z inhibitorem (prawie 90%) oraz karbapenemów (100%), bez względu na gatunek (Ryc. 4). Najniższą wrażliwość zaobserwowano w przypadku penicylin (0%) oraz fluorochinolonów – poniżej 35%, bez względu na gatunek.

**Rycina 4. Wrażliwość szczepów *E.coli* i *K.pneumoniae* według grup antybiotyków na oddziałach intensywnej terapii.**



## 7.6. Mechanizmy oporności

Ogółem wyizolowano 134 szczepy (38,3%) posiadające zdolność do syntezy ESBL (Tab. 8). Wśród izolatów ESBL+ dominował gatunek *E.coli* (65 szczepów; 29,3%). Poza *E.coli* fenotypem ESBL+ charakteryzowało się 48 szczepów *K.pneumoniae* (60,0%), 8 szczepów *Klebsiella spp.* (61,5%) oraz 13 szczepów (37,1%) nienależących do rodziny *Enterobacteriaceae*.

Izolaty zdolne do produkcji karbapenemaz łącznie stanowiły 1,4% (5 szczepów) wszystkich wyizolowanych szczepów. Najczęściej izolowanymi gatunkami karbapenemoopornymi były *E.coli* (3 szczepy; prewalencja 1,4%) oraz *K.pneumoniae* (2 szczepy; prewalencja 2,5%). Wśród innych pałeczek należących do *Enterobacteriales* nie wykryto obecności fenotypu CPE.

**Tabela 8. Prewalencja mechanizmów oporności wśród wyizolowanych szczepów *Enterobacteriales*.**

<i>Enterobacteriales</i>	mechanizmy oporności	
	ESBL	CPE
<i>E.coli</i> n=222	65 (29,3%)	3 (1,4%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> n=80	48 (60,0%)	2 (2,5%)
<i>Klebsiella spp.</i> n=13	8 (61,5%)	0
Inne n=35*	13 (37,1%)	0
<b>Razem</b>	134 (38,3%)	5 (1,4%)

ESBL (ang. *extended-spectrum  $\beta$ -lactamase*,  $\beta$ -laktamaza o rozszerzonym spektrum działania); CPE (ang. *carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*, pałeczki *Enterobacteriaceae* produkujące karbapenemazy)

\* grupa „Inne” obejmowała gatunki: *E.cloacae*, *P.mirabilis*, *C.braakii*, *C.koseri* oraz *C.freundii*

### 7.7. Lekooporność pałeczek *Enterobacterales* ESBL+

Stwierdzono, że spośród 356 wyizolowanych szczepów, 134 posiada fenotyp ESBL+ (Tab. 9).

Zaobserwowano, że połowa izolowanych szczepów *Klebsiella* spp. miała fenotyp ESBL+, zarówno na oddziałach internistycznych, jak i zabiegowych. U większości pałeczek *Enterobacterales* (61,5%) z grupy „Inne”, izolowanych na oddziałach internistycznych, wykryto fenotyp ESBL+.

**Tabela 9. Prewalencja szczepów *Enterobacterales* ESBL+ w przypadkach zakażeń krwi w zależności od oddziału.**

Enterobacterales ESBL+ n=134	Oddziały			Razem
	internistyczne	zabiegowe	OIT	
<i>E.coli</i> n=65	42 (64,6%)	19 (29,2%)	4 (6,2%)	65 (48,5%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> n=48	23 (47,9%)	18 (37,5%)	7 (14,6%)	48 (35,8%)
<i>Klebsiella</i> spp. n=8	4 (50,0%)	4 (50,0%)	0	8 (6,0%)
Inne* n=13	8 (61,5%)	5 (38,5%)	0	13 (9,7%)
<b>Razem</b>	<b>77 (57,5%)</b>	<b>46 (34,3%)</b>	<b>11 (8,2%)</b>	<b>134 (100%)</b>

\* grupa „Inne” obejmowała gatunki: *E.cloacae*, *P.mirabilis* oraz *C.freundii*

Na oddziałach internistycznych zdolność do syntezy ESBL najczęściej była wykrywana wśród szczepów *E.coli* (64,6%) oraz *K.pneumoniae* (47,9%) (Tab. 10). W stosunku do szczepów ESBL-, u szczepów ESBL+ wykryto oporność na: cefalosporyny (52,3-60,9%), fluorochinolony (60,9-71,4%) oraz trimetoprim-sulfametoksazol (64,3-65,2%) (Tab. 10). W przypadku szczepów ESBL+, na oddziałach zabiegowych, zanotowano wysoką lekooporność w stosunku do prawie wszystkich grup antybiotyków (Tab. 11). Wyjątkiem były inhibitory  $\beta$ -laktamaz oraz amikacyna.

Podobne wyniki zanotowano na oddziałach zabiegowych (Tab. 11) i OIT (Tab. 12). Nie stwierdzono istotnych statystycznie związków pomiędzy opornością szczepów ESBL+ na różne grupy antybiotyków na różnych oddziałach.

Tabela 10. Lekooporność szczepów ESBL+ i ESBL- na oddziałach internistycznych.

Grupa leków przeciwdrobnoustrojowych	Antybiotyk	ESBL+ n=121				ESBL- n=216			
		oddziały internistyczne							
		<i>E.coli</i> n=42 (34,7%)	<i>p</i>	<i>K. pneumoniae</i> n=23 (19,0%)	<i>p</i>	<i>E.coli</i> n=98 (45,4%)	<i>p</i>	<i>K. pneumoniae</i> n=21 (9,7%)	<i>p</i>
Penicyliny	Ampicylina	40 (95,2%)	1,0000	22 (95,6%)	1,0000	93 (94,9%)	0,5046	21 (100%)	1,0000
	Ampicylina-sulbaktam	40 (95,2%)	1,0000	22 (95,6%)	1,0000	92 (93,9%)	0,5198	18 (85,7%)	0,6190
	Amoksycylina-kwas klawulanowy	27 (64,3%)	1,0000	13 (56,5%)	0,7163	45 (45,9%)	0,9016	11 (52,4%)	0,8429
	Piperacylina-tazobaktam	10 (28,8%)	1,0000	10 (43,5%)	0,8533	14 (14,3%)	0,7838	5 (23,8%)	0,3599
Cefalosporyny	Cefuroksym	22 (52,4 %)	0,4890	14 (60,9%)	1,0000	34 (34,7%)	0,8346	6 (28,6%)	0,6882
	Ceftazydym	22 (52,5)	0,4890	13 (56,5%)	0,8491	30 (30,6%)	1,0000	6 (28,6%)	0,6882
	Cefotaksym	22 (52,4%)	0,4890	13 (56,5%)	0,8491	31 (31,6%)	0,8807	6 (28,6%)	0,3174
	Cefepim	22 (52,4%)	0,7752	12 (52,3%)	0,9215	30 (30,6%)	0,2676	4 (19,0%)	0,7824
	Cefoperazon-sulbaktam	3 (7,1%)	0,5049	5 (21,7%)	1,0000	6 (6,1%)	0,1735	1 (4,8%)	0,5766
Fluorochinolony	Ciprofloksacyna	30 (71,4%)	1,0000	14 (60,9%)	0,3425	50 (51,0%)	0,3249	11 (52,4%)	1,0000
Aminoglikozydy	Gentamycyna	22 (52,4%)	0,2896	10 (43,5%)	0,7248	23 (23,5%)	0,9337	5 (23,8%)	0,1524
	Amikacyna	5 (11,9%)	0,0796	8 (34,8%)	0,4322	14 (14,3%)	0,7838	3 (14,3%)	0,5601
	Tobramycyna	23 (54,8%)	0,7120	13 (56,5%)	0,7248	33 (33,7%)	0,7825	7 (33,3%)	1,0000
Inne	Trimetoprim-sulfametoksazol	27 (64,3%)	0,8208	15 (65,2%)	0,9228	39 (39,8%)	0,9052	7 (33,3%)	0,7161

Tabela 11. Lekooporność szczepów ESBL+ i ESBL- na oddziałach zabiegowych.

Grupa leków przeciwdrobnoustrojowych	Antybiotyk	ESBL+ n=121				ESBL- n=216			
		oddziały zabiegowe							
		<i>E.coli</i> n=19 (15,7%)	<i>p</i>	<i>K. pneumoniae</i> n=18 (14,9%)	<i>p</i>	<i>E.coli</i> n=55 (25,6%)	<i>p</i>	<i>K. pneumoniae</i> n=9 (4,2%)	<i>P</i>
Penicyliny	Ampicylina	19 (100%)	1,0000	18 (100%)	1,0000	54 (98,2%)	0,5046	9 (100%)	1,0000
	Ampicylina-sulbaktam	19 (100%)	1,0000	18 (100%)	1,0000	54 (98,2%)	0,5198	9 (100%)	0,6190
	Amoksycylina-kwas klawulanowy	12 (63,1%)	1,0000	12 (66,7%)	0,7163	23 (41,8%)	0,9016	6 (66,7%)	0,8429
	Piperacylina-tazobaktam	4 (21,0%)	1,0000	8 (44,4%)	0,8533	6 (10,9%)	0,7838	1 (11,1%)	0,3599
Cefalosporyny	Cefuroksym	13 (68,4%)	0,4890	11 (61,1%)	1,0000	16 (29,1%)	0,8346	2 (22,2%)	0,6882
	Ceftazydym	13 (68,4%)	0,4890	10 (55,5%)	0,8491	16 (29,1%)	1,0000	2 (22,2%)	0,6882
	Cefotaksym	13 (68,4%)	0,4890	10 (55,5%)	0,8491	15 (27,3%)	0,8807	1 (11,1%)	0,3174
	Cefepim	11 (57,9%)	0,7752	11 (61,1%)	0,9215	12 (21,8%)	0,2676	3 (33,3%)	0,7824
	Cefoperazon-sulbaktam	1 (5,3%)	0,5049	4 (22,2%)	1,0000	6 (10,9%)	0,1735	1 (11,1%)	0,5766
Fluorochinolony	Ciprofloksacyna	13 (68,4%)	1,0000	15 (83,3%)	0,3425	23 (41,8%)	0,3249	5 (55,6%)	1,0000
Aminoglikozydy	Gentamycyna	7 (36,8%)	0,2896	6 (33,3%)	0,7248	12 (21,8%)	0,9337	0	0,1524
	Amikacyna	5 (26,3%)	0,0796	8 (44,4%)	0,4322	6 (10,9%)	0,7838	3 (33,3%)	0,5601
	Tobramycyna	9 (47,4%)	0,7120	12 (66,7%)	0,7248	15 (27,3%)	0,7825	3 (33,3%)	1,0000
Inne	Trimetoprim-sulfametoksazol	14 (73,7%)	0,8208	12 (66,7%)	0,9228	23 (41,8%)	0,9052	4 (44,4%)	0,7161

Tabela 12. Lekooporność szczepów ESBL+ i ESBL- na oddziałach intensywnej terapii.

Grupa leków przeciwdrobnoustrojowych	Antybiotyk	ESBL+ n=121				ESBL- n=216			
		OIT							
		<i>E.coli</i> n=4 (3,3%)	<i>P</i>	<i>K. pneumoniae</i> n=7 (5,8%)	<i>P</i>	<i>E.coli</i> n=4 (1,9%)	<i>P</i>	<i>K. pneumoniae</i> n=2 (0,9%)	<i>P</i>
Penicyliny	Ampicylina	4 (100%)	1,0000	7 (100%)	1,0000	4 (100%)	0,5046	2 (100%)	1,0000
	Ampicylina-sulbaktam	4 (100%)	1,0000	7 (100%)	1,0000	4 (100%)	0,5198	2 (100%)	0,6190
	Amoksycylina-kwas klawulanowy	3 (75,0%)	1,0000	5 (71,4%)	0,7163	2 (50,0%)	0,9016	1 (50,0%)	0,8429
	Piperacylina-tazobaktam	1 (25,0%)	1,0000	4 (57,1%)	0,8533	0	0,7838	1 (50,0%)	0,3599
Cefalosporyny	Cefuroksym	3 (75,0%)	0,4890	5 (71,4%)	1,0000	1 (25,0%)	0,8346	1 (50,0%)	0,6882
	Ceftazydym	3 (75,0%)	0,4890	5 (71,4%)	0,8491	1 (25,0%)	1,0000	1 (50,0%)	0,6882
	Cefotaksym	3 (75,0%)	0,4890	5 (71,4%)	0,8491	1 (25,0%)	0,8807	1 (50,0%)	0,3174
	Cefepim	3 (75,0%)	0,7752	4 (57,1%)	0,9215	0	0,2676	0	0,7824
	Cefoperazon-sulbaktam	1 (25,0%)	0,5049	1 (14,3%)	1,0000	1 (25,0%)	0,1735	0	0,5766
Fluorochinolony	Ciprofloksacyna	3 (75,0%)	1,0000	5 (71,4%)	0,3425	3 (75,0%)	0,3249	1 (50,0%)	1,0000
Aminoglikozydy	Gentamycyna	3 (75,0%)	0,2896	3 (42,8%)	0,7248	1 (25,0%)	0,9337	1 (50,0%)	0,1524
	Amikacyna	2 (50,0%)	0,0796	1 (14,3%)	0,4322	0	0,7838	0	0,5601
	Tobramycyna	3 (75,0%)	0,7120	4 (57,1%)	0,7248	1 (25,0%)	0,7825	1 (50,0%)	1,0000
Inne	Trimetoprim-sulfametoksazol	3 (75,0%)	0,8208	4 (57,1%)	0,9228	1 (25,0%)	0,9052	0	0,7161



## 7.8. Genotypowanie szczepów ESBL+

W celu zbadania obecności genów odpowiedzialnych za mechanizm tworzenia ESBL, opisanych w literaturze jako enzymy typu SHV, TEM, CTX-M oraz OXA, analizie poddano tylko szczepy *E.coli* oraz *K.pneumoniae* ze względu na odpowiednią liczebność próby. Przeważała obecność genu *bla*<sub>CTX-M</sub> – w 61 (28,8%) badanych szczepach na oddziałach internistycznych stwierdzono jego występowanie (Tab. 13), natomiast na oddziałach zabiegowych obecność tego genu potwierdzono u 46 (38,0%) szczepów (Tab. 14). Poza *bla*<sub>CTX-M</sub>, wśród badanych szczepów z oddziałów internistycznych stwierdzono 13,2% (28 szczepów) udział genu *bla*<sub>OXA</sub> a także 8,0% (17 szczepów) udział genu *bla*<sub>SHV</sub> wśród badanych izolatów z oddziałów internistycznych. Na oddziałach zabiegowych odnotowano 14 (11,6%) szczepów z genem *bla*<sub>OXA</sub> oraz 12 (9,9%) szczepów z genem *bla*<sub>SHV</sub>. Dużo mniej genów odpowiedzialnych za mechanizm ESBL stwierdzono wśród izolatów z OIT – po 3 geny *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> oraz 7 *bla*<sub>CTX-M</sub> (Tab. 15).

**Tabela 13. Prewalencja genów odpowiedzialnych za wytwarzanie β-laktamaz o rozszerzonym spektrum działania wśród szczepów *Enterobacterales* na oddziałach internistycznych.**

<i>Enterobacterales</i> BSI					
Oddziały internistyczne n=212					
Geny kodujące ESBL	<i>E.coli</i> n=140	<i>Klebsiella pneumoniae</i> n=44	<i>Klebsiella spp.</i> n=7	Inne n=21*	Razem n=212
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	2 (1,4%)	12 (27,3%)	3 (42,8%)	0	17 (8,0%)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	4 (2,8%)	9 (20,4%)	2 (28,6%)	1 (4,8%)	16 (7,5%)
<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	15 (10,7%)	10 (22,7%)	2 (28,6%)	1 (4,8%)	28 (13,2%)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	35 (25,0%)	16 (36,4%)	2 (28,6%)	8 (38,1%)	<b>61 (28,8%)</b>

\*grupa „Inne” obejmowała gatunki: *E.cloacae*, *P.mirabilis*, *C.brakii* oraz *C.koseri*

Tabela 14. Prewalencja genów odpowiedzialnych za wytwarzanie  $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania wśród szczepów *Enterobacterales* na oddziałach zabiegowych.

<i>Enterobacterales</i> BSI					
Oddziały zabiegowe n=121					
Geny kodujące ESBL	<i>E.coli</i> n=74	<i>Klebsiella pneumoniae</i> n=27	<i>Klebsiella</i> spp. n=6	Inne n=14*	Razem n=121
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	0	8 (29,6%)	2 (33,3%)	2 (14,2%)	12 (9,9%)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	2 (2,7%)	3 (11,1%)	3 (50,0%)	3 (21,4%)	11 (9,1%)
<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	6 (8,1%)	3 (11,1%)	3 (50,0%)	2 (14,2%)	14 (11,6%)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	19 (25,7%)	18 (66,7%)	4 (66,7%)	5 (35,7%)	<b>46 (38,0%)</b>

\*grupa „Inne” obejmowała gatunki: *E.cloacae*, *P.mirabilis* oraz *C.freundii*

Tabela 15. Prewalencja genów odpowiedzialnych za wytwarzanie  $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania wśród szczepów *Enterobacterales* na oddziałach intensywnej terapii.

<i>Enterobacterales</i> BSI				
OIT n=17				
Geny kodujące ESBL	<i>E.coli</i> n=8	<i>Klebsiella pneumoniae</i> n=9	Inne n=0	Razem n=17
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	0	3 (33,3%)	0	3 (17,6%)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	0	3 (33,3%)	0	3 (17,6%)
<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	0	3 (33,3%)	0	3 (17,6%)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	2 (25,0%)	5 (55,5%)	0	<b>7 (41,2%)</b>

### 7.9. Typowanie metodą PFGE szczepów *Klebsiella pneumoniae* ESBL+ z oddziałów zabiegowych celem wykrycia epidemii klonalnych

Celem sprawdzenia podobieństwa genetycznego przeprowadzono typowanie molekularne metodą PFGE. Analizie poddano 27 szczepów *K.pneumoniae* ESBL+ izolowanych z zakażeń krwi z oddziałów zabiegowych (Ryc. 5). Szczepy te pochodziły z dwóch oddziałów zabiegowych o profilu urologicznym jednego szpitala.

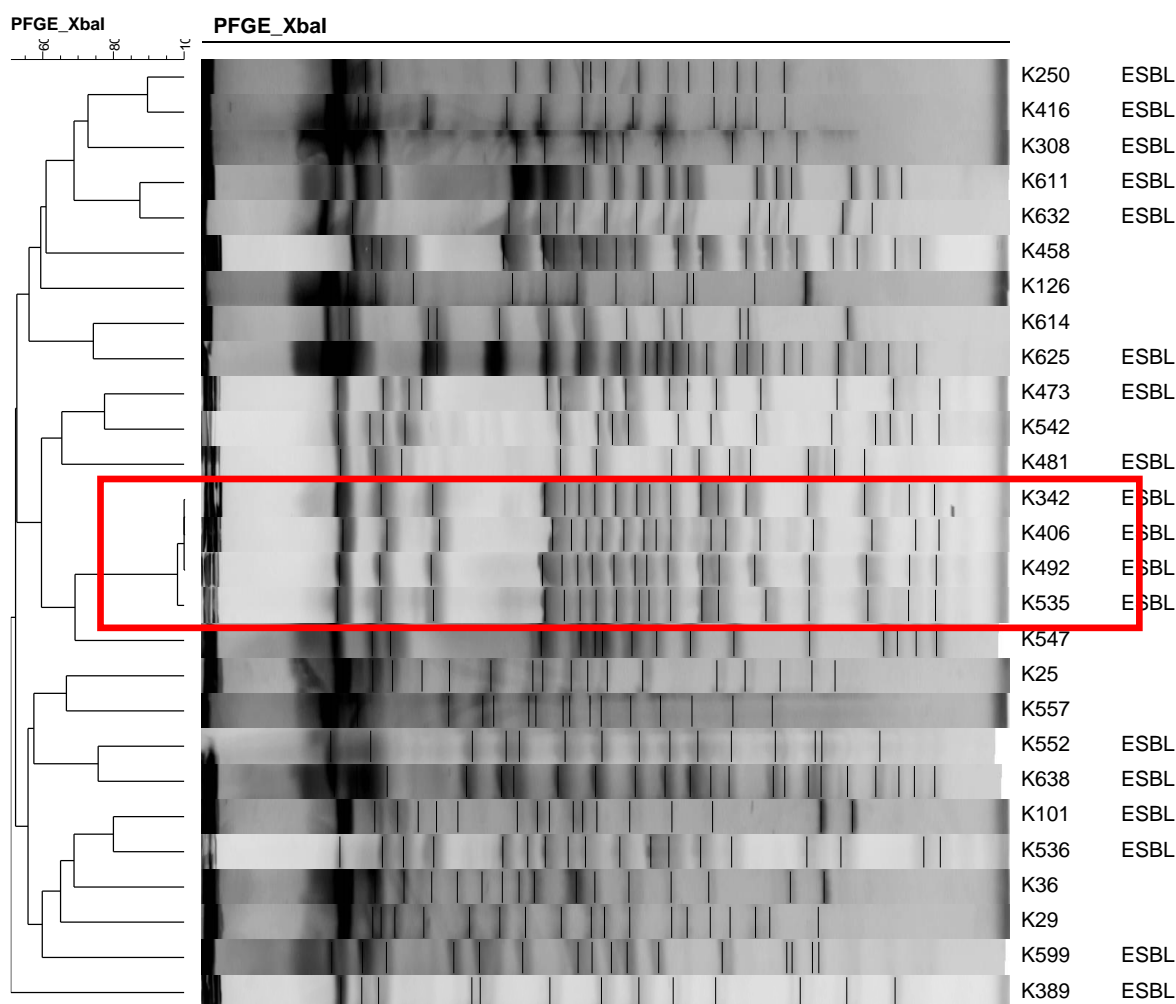
Spośród badanych szczepów wykazano, że cztery należały do tego samego klonu. Inne szczepy były bardzo zróżnicowane.

Szczepy klonalne zaznaczone na Ryc. 5 czerwoną ramką:

- K342: mężczyzna, wiek 49 lat, materiał pobrano w maju 2016, oddział II urologiczny;

- K406: mężczyzna, wiek 40 lat, materiał pobrano w sierpniu 2016, oddział I urologiczny;
- K492: kobieta, wiek 63 lata, materiał pobrano w styczniu 2017, oddział II urologiczny;
- K535: kobieta, wiek 54 lata, materiał pobrano w marcu 2017, oddział I urologiczny.

**Rycina 5. Dendrogram podobieństwa wybranych 27 szczepów *K.pneumoniae* z zakażeń krwi z oddziałów zabiegowych, ramką oznaczono szczepy należące do tego samego klonu.**



## 8. DYSKUSJA

### 8.1. Etiologia drobnoustrojowa przypadków zakażeń krwi

Ogółem, w trakcie trwania analiz w latach 2015-2018, analizowano epidemiologię 558 szczepów bakteryjnych pochodzących z wtórnych zakażeń krwi, w tym 161 (28,9%) należało do ziarenkowców Gram-dodatnich, 356 (63,9%) do rzędu *Enterobacterales* natomiast 40 (7,2%) pałeczek stanowiło Gram-ujemne szczepy, inne niż *Enterobacterales*. Zebrano łącznie 222 (39,8%) szczepy *E.coli*, co stanowiło największy odsetek wyizolowanych pałeczek Gram-ujemnych, bez względu na oddział. Pałeczki *K.pneumoniae* stanowiły 14,5% (80 szczepów) zebranych izolatów, zaś na trzecim miejscu znalazł się *Proteus mirabilis* z łącznym odsetkiem 3,4% (19 szczepów) wyizolowanych szczepów.

W 2019 roku opublikowano wyniki Programu Nadzoru Przeciwdrobnoustrojowego SENTRY (the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program) [137], które potwierdzają uzyskane wyniki. W trakcie trwającego 20 lat badania w 45 krajach zebrano szczepy z 264 901 przypadków zakażeń krwi. Stwierdzono, że dominującymi gatunkami były *Staphylococcus aureus* (20,7%) oraz *Escherichia coli* (20,5%) w zależności od regionu geograficznego, rodzaju zakażenia oraz wieku. Należy wspomnieć, że po 2005 roku, *E.coli* była gatunkiem dominującym izolowanym z zakażeń krwi. *S.aureus* dominował na obszarze obu Ameryk, natomiast *E.coli* na obszarze Europy oraz Azji [137].

W latach 2013-2016, szczególnie wzrost udziału szczepów *E.coli* i *K.pneumoniae* w zakażeniach krwi zaobserwowano w Europie i Azji. Wśród Gram-ujemnych drobnoustrojów, izolowanych z zakażeń krwi, najpowszechniejsze były szczepy *E.coli* i *K.pneumoniae* [138].

Według wielośrodkowego badania Wisplinghoff i wsp. 50,5% przypadków zakażeń krwi nabytych w szpitalu miało miejsce na oddziałach intensywnej terapii, natomiast oddziały najczęściej diagnozujące zakażenia krwi to oddziały internistyczne (38%) i zabiegowe (20%) [138]. Niezależne badania Renaud i Brun-Buisson oraz Kallel i wsp. pokazują, że na oddziałach intensywnej terapii jednymi z najczęściej izolowanych były pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* (odpowiednio 25,2% i 67,7%) [139, 140]. Wyniki najbardziej zbliżone do uzyskanych w przedstawionej rozprawie otrzymano w badaniu Kallel i wsp., jednakże badanie to było jednośrodkowe i obejmowało populację regionu Amazonii [140]. Także Al-Hazmi i wsp. wymieniają zakażenie krwi jako główną jednostkę chorobową wśród zakażeń nabytych w szpitalu, zwłaszcza u pacjentów

kardiologicznych, z cukrzycą, nadciśnieniem, gdzie pałeczki Gram-ujemne stanowiły 60% badanych izolatów [141]. Wielu badaczy wskazuje na większy udział szczepów *E.coli* na oddziałach intensywnej terapii w Europie, jednakże w niniejszej rozprawie to *K.pneumoniae* była najliczniejszą grupą izolatów [142, 143].

Szczególnie uzasadnione wydaje się porównanie otrzymanych wyników z danymi z raportów ECDC, gdyż dotyczą populacji bardzo zbliżonych, tj. pacjentów szpitali europejskich i polskich ze szczególnym uwzględnieniem pacjentów OIT. Według danych ECDC, z 2014 roku, na OITach w 15 krajach europejskich, najczęściej izolowanymi mikroorganizmami z zakażeń krwi były gronkowce koagulazo-ujemne, *Enterococcus* spp., *S.aureus* oraz pałeczki *Klebsiella* spp. [144]. W 2014 roku, pałeczki *Klebsiella* spp. dominowały w Portugalii (15%), na Słowacji (33,3%) i na Malcie (36,4%), natomiast odsetek wyizolowanych szczepów *E.coli* nie przekraczał 20% w żadnym z krajów [144]. Późniejsze dane z raportu ECDC z 2017 roku pokazują stały trend w przypadku najczęściej izolowanych patogenów z zakażeń krwi i były to gronkowce koagulazo-ujemne, a następnie *Enterococcus* spp., pałeczki *Klebsiella* spp. I *S.aureus* [145]. Pałeczki *Klebsiella* spp. przeważały nie tylko w Portugalii (21,1%), na Słowacji (23,8%) i na Malcie (43,8%), ale także we Włoszech (18%) i w Rumunii (34,8%) zaś odsetek wyizolowanych szczepów *E.coli* nie przekroczył 15% w żadnym z krajów [145]. Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie pokazują, że na OITach najczęściej izolowanym szczepem była *K.pneumoniae* (52,9%), a następnie *E.coli* (47,1%); nie odnotowano obecności innych szczepów *Enterobacterales*. Porównując dane z raportów ECDC oraz uzyskane wyniki należy stwierdzić, że wyniki badań epidemiologicznych badanej populacji znacznie odbiegają od danych epidemiologicznych populacji pacjentów szpitali europejskich przedstawionych w raportach ECDC. Mimo że pałeczki *Klebsiella* spp. stanowiły najczęściej izolowane mikroorganizmy według danych ECDC, zarówno z roku 2014, jak i 2017, to w żadnym z europejskich krajów nie osiągnęły tak alarmującego wysokiego poziomu, jak w Polsce. Na szczęście, pomimo wysokiej lekooporności szczepów *K.pneumoniae* udział fenotypu KPC wynosił tylko 2,5%. Podobnie było w przypadku izolatów *E.coli*.

W krajach europejskich sytuacja wygląda dużo lepiej niż w Polsce. W 2017 roku odsetek wyizolowanych szczepów *E.coli* był o 5 punktów procentowych niższy niż w 2014 roku, co pozwala sądzić, że jest to tendencja spadkowa. Niestety w Polsce *E.coli*, zaraz po *K.pneumoniae*, jest najczęściej izolowanym szczepem na OITach.

## 8.2. Czynniki zjadliwości szczepów *Enterobacterales*

Wyzolowane szczepy ESBL+ przebadano pod kątem występowania genów wirulencji. Mimo że wszystkie szczepy pochodziły z jednej formy zakażenia – zakażeń krwi – stwierdzono obecność różnych czynników zjadliwości. Na oddziałach internistycznych oraz zabiegowych odnotowano, że niewielka część pałeczek *E.coli* posiadała gen *hly* odpowiedzialny za lizę erytrocytów i patogenezę sepsy [146]. Hilali i wsp. wskazują na występowanie genów *pap* i *hly* jako czynników wywołujących zakażenia krwi u pacjentów z neutropenią [147]. Co ciekawe, chociaż wszystkie izolaty pochodziły z przypadków zakażeń krwi, nie zaobserwowano częstego występowania genu *hly*. Na żadnym z oddziałów nie stwierdzono obecności genu *sfa/foc*, kodującego fimbrie typu S, odpowiedzialnego za adhezję komórek bakteryjnych do komórek śródbłonna mikronaczyniowego mózgu, a tym samym do rozwoju bakteryjnego zapalenia opon mózgowych, szczególnie u noworodków [148]. Gen *sfa/foc*, razem z genem *hly*, jest często izolowany z zakażeń krwi [146]. Na żadnym z oddziałów nie odnotowano także występowania genu *ibeA*, gdyż – jak twierdzi Tao i wsp. – jest on głównie związany z patogenezą zakażeń centralnego układu nerwowego, szczególnie u noworodków [16] i według Watt i wsp. częściej izolowany był z płynu mózgowo-rdzeniowego [146]. Nie jest więc zaskakujący brak obecności tych genów, gdyż rozprawa obejmowała wyłącznie populację osób dorosłych.

Żelazo jest niezbędnym składnikiem metabolizmu bakteryjnego umożliwiającym przetrwanie i większą zjadliwość bakterii. Szczepy bakteryjne konkurują o żelazo z białkami gospodarza, wytwarzając związki niskocząsteczkowe wiążące żelazo – siderofory. Produkcja sideroforów wpływa na mikroflorę jelitową gospodarza oraz interakcje gospodarz-bakteria, co przyczynia się do wystąpienia zakażeń, chorób jelit czy nowotworów jelita grubego [149]. Do sideroforów zaliczamy aerobaktynę kodowaną przez geny *iucC* i *iutA* oraz yersiniabaktynę kodowaną przez gen *fyuA*. U większości izolatów *E.coli* stwierdzono obecność tych genów, bez względu na oddział, co potwierdza dużą zjadliwość wyizolowanych szczepów oraz potencjalne zdolności do przetrwania w organizmie gospodarza. Ponadto u części izolatów z oddziałów internistycznych i zabiegowych odnotowano obecność dodatkowego elementu kodującego receptor *iroN*, nadający enterobaktynie większe powinowactwo, a więc lepszą stabilnością w tkankach gospodarza [150]. Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie potwierdzają badania Tao i wsp. oraz Daga i wsp, w których badacze wskazują

na najczęściej występujące geny – *iutA*, *fyuA* (odpowiednio gen aerobaktyny i yersiniabaktyny) a także *fimH* (kodujący fimbrie typu 1), u pacjentów z zakażeniem krwi *E.coli* [14, 16]. Procesem zmniejszającym dostępność żelaza dla drobnoustrojów w błonach śluzowych gospodarza jest wydzielanie białek wiążących żelazo, takich jak lipokalina czy laktoferyna [149]. Również zwiększone natlenienie błony śluzowej utrudnia bakteriom pobieranie żelaza, gdyż sprzyja obecności nierozpuszczalnych form żelaza.

Na szczęście zaobserwowano obecność tylko jednego szczepu (5,2%) z genem *neuC* kodującym otoczkę polisacharydową i przyczyniającym się do powstania zakażeń dróg moczowych, zakażeń krwi i zapalenia opon mózgowych [151]. Produkcja otoczek polisacharydowych jest mocno związana ze szczepami uropatogennymi i pozwala uniknąć fagocytozy oraz ułatwia kolonizację dróg moczowych, przyczyniając się do tworzenia biofilmu na powierzchni nabłonka [151].

Otrzymane wyniki pokazują niepokojąco wysoki odsetek wyizolowanych szczepów *E.coli*, u których wykryto gen adhezji *pap*, kodujący fimbrie typu P (oddziały internistyczne) oraz gen adhezji *fimH*, kodujący fimbrie typu I (oddziały internistyczne i zabiegowe). Gen *pap*, odpowiedzialny za przyleganie komórek bakteryjnych do nabłonka dróg moczowych i rozwój stanów zapalnych dróg moczowych, obserwowany w uropatogennych szczepach *E.coli* przyczynia się do zwiększenia wirulencji szczepów i rozwoju ciężkich zakażeń [19]. Także gen *fimH* pośredniczy w patogenezie zakażeń dróg moczowych poprzez adhezję do komórek nabłonka pęcherza moczowego oraz sprzyja tworzeniu się biofilmu [16]. Niestety z większości szczepów izolowano również gen *iha*, będący adhezyną i receptorem dla katecholowych sideroforów. Jak pisze Johnson i wsp., *E.coli* swój potencjał patogenny zawdzięcza obecności właśnie tym genom wirulencji [129]. Obecność genu *iha*, w uropatogennych lub enterokrwotocznych szczepach *E.coli*, jest przyczyną urosepsy lub nawrotowych zakażeń dróg moczowych [152]. Najcięższą formą zakażenia dróg moczowych jest urosepsa. Do czynników prewencyjnych urosepsy należy korygowanie nieprawidłowości układu moczowo-płciowego oraz warunki aseptyczne przy wprowadzaniu cewnika, a także zapobieganie rozwojowi biofilmu na powierzchni cewnika poprzez pokrycie go biomateriałem [153].

Wśród szczepów *K.pneumoniae* najczęściej wykrywanymi genami, bez względu na oddziały, były geny związane z syntezą otoczki lipopolisacharydowej: *uge* – kodujący enzym biorący udział w syntezie otoczki (interna: 86,9%, zabiegowe; 83,3%, OIT: 100%)

oraz *wabG* – zaangażowany w syntezę rdzenia lipopolisacharydowego (100%, bez względu na oddział). Stwierdzono, że geny *uge* oraz *wabG* nadają oporność na fagocytozę szczepom *K.pneumoniae* oraz są związane z patomechanizmem zakażeń dróg moczowych i zapaleniem płuc [154]. Niestety część izolatów z każdego z oddziałów posiadała także gen *rmpA*, kodujący regulator fenotypu śluzowego A, biorący udział w syntezie śluzowatej otoczki polisacharydowej. Yu i wsp. wykazali, że obecność genu *rmpA* ma związek z wystąpieniem ropnych zakażeń tkanek [155].

Obecność genu *magA* (ang. *mucoviscosity-associated gene A*), specyficznego dla serotypu otoczki K1, zaobserwowano w niewielkiej części szczepów. Szczepy hiperwirulentne K1 zwykle posiadają grubą otoczkę i zawierają wiele genów wirulencji [156]. Wykazano, że szczepy z genami *magA* i *rmpA*, wysoce odporne na fagocytozę, powodują ropnie wątroby oraz powikłania septyczne z przerzutami [132, 156]. Na szczęście uzyskane wyniki potwierdziły stosunkowo nieduży odsetek szczepów z tymi genami, sięgający 55,6% na oddziale zabiegowym. Podobnie szczepy posiadające gen *allS*, związany z metabolizmem allantoiny, biorą udział w patogenezie ropni wątroby, jednakże w żadnym ze szczepów nie stwierdzono występowania genu metabolizmu allantoiny, co jest zgodne z danymi uzyskanymi w innych badaniach [136, 152].

Istotna jest także obecność genów *kfu* i *aerKP* związana z wykorzystaniem żelaza. Geny te odgrywają rolę w patogenności bakterii, umożliwiając wychwyt żelaza w organizmie gospodarza. Współistnienie genów *kfu* i *magA* zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia ropnia wątroby [155]. Udało się wykazać obecność tychże genów w niewielkim odsetku izolatów.

### **8.3. Lekooporność szczepów *Enterobacteriales***

Według raportu opublikowanego przez ECDC w 2019 roku, dotyczącego oporności mikroorganizmów w szpitalnych zakażeniach krwi, w Polsce odsetek izolatów *E.coli* opornych na aminopenicyliny jest jednym z najwyższych w Europie i wynosi 61,6%, podobnie jak w innych krajach Europy południowej czy Europy zachodniej i północnej [157]. Niestety wyniki uzyskane w danej rozprawie potwierdzają te dane. Bez względu na oddział zanotowano bardzo niską wrażliwość szczepów *E.coli* na penicyliny (nieprzekraczającą 5%). Także badania pozaeuropejskie pokazują wysoką oporność szczepów *E.coli* na ampicylinę (63,2%) oraz ciprofloksacynę (47,4%) [158]. Obiecująco wyglądały wyniki oporności na karbapenemy wśród *E.coli* w Polsce i innych krajach



europejskich, których oporność była znikoma i wahała się w granicach 0-1,6%, co potwierdzają dane uzyskane w niniejszym badaniu, niezależnie od oddziału [157].

Przeprowadzone w 2012 roku międzynarodowe badanie EUROBACT (*EUROBACT International Cohort Study*), obejmujące 162 oddziały intensywnej terapii w 24 krajach, pokazało wysoki odsetek (47,8%) drobnoustrojów wielolekoopornych, w tym 7,4% *E.coli* oraz 11,9% *K.pneumoniae* [159]. Badania Thom i wsp. obejmujące populację amerykańską, dotyczące skuteczności terapii empirycznej, wykazały wysoką wrażliwość szczepów *E.coli* oraz *K.pneumoniae* na  $\beta$ -laktamy (67-98%), cefalosporyny (76-93%), fluorochinolony (71-88%) oraz aminoglikozydy (83-92%) [160]. Większość tych danych, uzyskanych z analizy populacji amerykańskiej, nie znajduje odzwierciedlenia w uzyskanych wynikach m.in. wysokie oporności szczepów na  $\beta$ -laktamy (do 100%, niezależnie od oddziału), cefalosporyny (29-67%, zależnie od oddziału) oraz fluorochinolony (48-75%, zależnie od oddziału). Oporność na aminoglikozydy, zwłaszcza na amikacynę, pozostaje kwestią sporną, gdyż na oddziałach internistycznych i OIT nie przekracza 25%, natomiast na oddziałach zabiegowych sięga nawet 40,7% (w przypadku *K.pneumoniae*). Potwierdzenie wysokiej oporności szczepów *E.coli* i *Klebsiella* sp. na aminoglikozydy, izolowanych z oddziałów chirurgicznych, dostarcza badanie Baviskar i wsp. [161]. W przypadku większości grup antybiotyków, w odniesieniu do *E.coli*, stwierdzono wysoce istotną ( $p < 0,01$ ) zależność oporności od oddziału i relacje były we wszystkich przypadkach takie same, czyli najmniej przypadków lekooporności było na oddziałach internistycznych, więcej na zabiegowych, a najwyższy odsetek wyników pozytywnych dotyczył OIT. Wysoką oporność na cefalosporyny 3-generacji wskazują także dane ECDC, szczególnie wśród szczepów *Klebsiella* spp. (44%) oraz *E.coli* (17%), jednak są to oporności znacząco niższe od wyników uzyskanych w niniejszej rozprawie [144].

Rosnąca oporność na karbapenemy wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* staje się pilnym problemem w Sanach Zjednoczonych [162]. Według Souli i wsp. spośród gatunków z rodziny *Enterobacteriaceae*, *K.pneumoniae* została uznana za drobnoustrój o najwyższym wskaźniku oporności na karbapenemy [163], co potwierdzają także dane uzyskane przez Zilberberg i wsp. wskazujące na 37,4% udział *K.pneumoniae* oraz 15,2% *E.coli* opornych na karbapenemy [162]. Na szczęście otrzymane wyniki nie dają powodu do niepokoju dla pacjentów hospitalizowanych w Polsce południowej – spośród 350 przebadanych szczepów zaledwie 1,4% izolatów wykazywał zdolność do produkcji karbapenemaz. Dane ECDC wskazują znacząco wyższy odsetek szczepów

*K.pneumoniae* opornych na karbapenemy (7,7%), w porównaniu do szczepów *E.coli* (0,0%) w Polsce [157]. Jak pokazują badania Vatopoulos, szczególnie wysoki odsetek szczepów *K.pneumoniae* opornych na karbapenemy obserwuje się na oddziałach szpitalnych w Grecji (do 20%), zwłaszcza na OITach (do 50%) [164]. W raporcie ECDC Polska uzyskała jeden z najwyższych wyników, spośród danych z 33 badanych krajów europejskich, jeśli chodzi o oporność szczepów *K.pneumoniae* na fluorochinolony oraz aminoglikozydy (odpowiednio 61,3% i 47,5%) [157]. Także w przypadku oporności szczepów *K.pneumoniae* na cefalosporyny 3-generacji uzyskano wysokie wyniki (do 66,7% na OITach, w Polsce 58,3%) [157]. Niestety uzyskane wyniki potwierdzają te dane, gdzie niezależnie od oddziału otrzymano dosyć niskie wrażliwości szczepów *K.pneumoniae* na fluorochinolony (do 44%) i aminoglikozydy (do 55%). Interesujące wyniki otrzymano w badaniu wieloośrodkowym Wisplinghoff i wsp., obejmującym 49 szpitali amerykańskich, które dowodzi, że ponad 80% izolatów *K.pneumoniae* było wrażliwych na cefalosporyny 3-generacji, aminoglikozydy i fluorochinolony [138].

Uzyskano niepokojąco wysoki odsetek 38,3% (134 szczepy) pałeczek *Enterobacteriales*, które posiadały zdolność do syntezy ESBL, z czego izolaty *E.coli* stanowiły 29,3% zaś izolaty *K.pneumoniae* 60,0%. Także badania Kallel i wsp. wskazują na stosunkowo szerokie rozprzestrzenienie się fenotypu ESBL i dosyć wysoki odsetek szczepów *Enterobacteriaceae* ESBL+ (27,6%) [140]. W latach 2012-2014 przebadano 15 588 izolatów *Enterobacteriaceae* pochodzących z amerykańskich szpitali i tylko u 13,7% z nich stwierdzono obecność fenotypu ESBL [165]. Występowanie fenotypu ESBL zdeteminowanego przez produkcję enzymów TEM, SHV i CTX-M, związane było z występowaniem zakażeń szpitalnych [163, 166], ale także skojarzone z fenotypem wielolekooporności (MDR) u *Enterobacteriaceae* [163]. W 2007 roku Nicolas-Chanoine i wsp. opisują pojawienie się szeroko rozpowszechnionej globalnie grupy enzymów – CTX-M, występującej wśród zjadliwych szczepów *E.coli* [167]. Niestety także i w uzyskanych wynikach przeważał odsetek genu *bla*<sub>CTX-M</sub>, bez względu na oddział, jednak na każdym oddziale większy udział szczepów wykazujący obecność genu *bla*<sub>CTX-M</sub> stanowiły pałeczki *Klebsiella* spp. Wcześniejsze niezależne badania, przeprowadzone na oddziałach intensywnej opieki na grupach noworodków w Polsce, wykazały, że wszystkie izolaty ESBL+ niosły gen *bla*<sub>CTX-M</sub> [168, 169]. Także badania Castanheira i wsp. potwierdzają, że typ CTX-M był najbardziej rozpowszechniony [165]. Jak wcześniej wspomniano fenotyp ESBL często wiąże się ze złożonym fenotypem oporności wielolekowej danego mikroorganizmu, a co za tym idzie, zmniejsza liczbę środków

przeciwdrobnoustrojowych, na które podatny jest patogen [163, 170]. Widać to wyraźnie w wynikach przedstawionych w danej pracy, gdzie pałeczki *Enterobacteriaceae* ESBL+ są znacząco bardziej odporne na prawie wszystkie grupy antybiotyków, nie tylko  $\beta$ -laktamowych, niż pałeczki *Enterobacteriaceae* ESBL-, bez względu na oddział.

#### **8.4. Horyzontalne rozprzestrzenienie szczepów *K.pneumoniae* ESBL+ na oddziałach zabiegowych**

Jak wskazali badacze, PFGE jest świetną metodą typowania i porównywania klonów przy dużej liczbie izolatów  $\leq 30$  [171]. Analiza typowania PFGE objęła 27 szczepów *K.pneumoniae* ESBL+ z dwóch oddziałów zabiegowych jednego szpitala. Szczepy klonalne pochodziły od czterech różnych pacjentów, należały do tego samego klonu natomiast izolowane były na przestrzeni jedenastu miesięcy. Obecność czterech szczepów należących do tego samego klonu świadczy o wystąpieniu epidemii klonalnej w obrębie oddziałów zabiegowych tego szpitala. W dwóch szczepach zaobserwowano obecność genów związanych z syntezą otoczek lipopolisacharydowych – *uge* oraz *wabG*. Pozostałe szczepy, oprócz wymienionych genów, niosły regulator fenotypu śluzowego A (*rmpA*) oraz gen związany z transportem żelaza (*kfu*), co sugeruje potencjalną większą zjadliwość tych szczepów. Reszta badanych szczepów cechowała się bardzo zróżnicowanym wzorem prążkowym.

Przeprowadzone badania mają pewne ograniczenia. Ze względu na koszty, analizę PFGE przeprowadzono tylko dla wybranej, ograniczonej liczby szczepów szczepów.

Jako część programu kontroli zakażeń Wenzel i Edmond zalecają użycie cewników naczyniowych pokrytych antybiotykami oraz szerszy dostęp do środków higieny rąk zawierających alkohol [172]. W przeprowadzonym wielośrodkowym badaniu odsetek zakażeń krwi został znacznie zredukowany poprzez użycie cewników pokrytych ryfampicyną oraz minocykliną [173]. Także poprawa w zakresie stosowania higieny rąk, szczególnie zwiększenie częstości wykonywania tej procedury, ma wpływ na zredukowanie zakażeń krwi nabytych w szpitalu na oddziałach intensywnej terapii [174]. Jednocześnie należy zastanowić się nad skutecznością stosowania profilaktyki antybiotykowej. Chociaż wiadomo, że profilaktyka antybiotykowa jest niezbędna w przypadku zabiegów operacyjnych, to wciąż pewne mechanizmy oporności są niepoznane, a wzrost oporności u *Enterobacteriaceae* utrudnia leczenie [175]. Wielolekooporność szczepów, niewłaściwa profilaktyka, niedobra bądź opóźniona

terapia antybiotykowa skutkuje niepowodzeniem antybiotykoterapii empirycznej [162]. Łatwość rozprzestrzeniania genów ESBL i CRE oraz ich wysoki udział w izolowanych szczepach *Enterobacteriaceae* wymaga nowych antybiotyków, do których można zaliczyć tigecyklinę, avibaktam, erawacyklinę czy plazomycynę [176].

## 9. WNIOSKI KOŃCOWE

Prezentowane wyniki wskazują na duży udział drobnoustrojów Gram-ujemnych, w tym pałeczek rzędu *Enterobacterales*, które stanowiły ogółem prawie 2/3 etiologii drobnoustrojowej przypadków wtórnych zakażeń krwi, co jest wynikiem bardzo niepokojącym i wymagającym i powinno stać się podstawą szerokiej dyskusji nad stanem nadzoru nad zakażeniami w polskich szpitalach.

W kompleksowym badaniu wielu czynników zjadliwości pokazano te, które w sposób szczególny przyczyniają się do zakażeń inwazyjnych, takich jak zakażenia krwi. Zaskakujące jest to, że nie stwierdzono obecności genów biorących udział w patogenezie sepsy bądź odnotowano ich niewielki odsetek (*hlyA*, *sfa/foc*). Istotne jest, że znacząco duża część izolatów posiadała geny związane z transportem żelaza (m.in. *iucC*, *fepA*, *fyuA* czy *kfu*) zwiększające ich zjadliwość. Natomiast obecność genów adhezji (*fimH*, *iha*) u *E.coli* czy genów związanych z syntezą otoczek polisacharydowych (*uge*, *wabG*) u *K.pneumoniae* pozwala sądzić, że szczepy te biorąc udział w kolonizacji dróg moczowych, tworzeniu biofilmu i rozwoju stanów zapalnych dróg moczowych, mogą przyczynić się do rozwoju nadzwyczaj groźnych, obarczonych wysoką śmiertelnością przypadków tzw. urosepsy.

Kluczową kwestią badanego problemu jest stale rosnąca oporność na antybiotyki wśród pałeczek *Enterobacterales* wywołujących zakażenia krwi. Badanie lekooporności pozwoliło szczegółowo opisać aktualną złą sytuację epidemiologiczną w szpitalach południowej Polski, co powinno przyczynić się do opracowania lokalnych, racjonalnych zasad dotyczących antybiotykoterapii empirycznej. Racjonalna, zgodna – z tzw. *antibiotic stewardship* i lokalnymi antybiogramami skumulowanymi – terapia empiryczna pozwala m.in. zmniejszyć ryzyko powikłań w postaci zakażeń wtórnych czy zminimalizować ryzyko wystąpienia wielolekooporności drobnoustrojowej. W empirycznym leczeniu zakażeń należy preferować antybiotyki, w stosunku do których wrażliwości względem drobnoustrojów pozostaje na poziomie min. 70-80%. Stąd w badanej populacji, lekami do leczenia empirycznego wskazane są cefalosporyny, cefalosporyny z inhibitorem oraz karbapenemy.

Stwierdzona wysoka lekooporność jest zjawiskiem bardzo niepokojącym, na szczęście w badanej populacji nie stwierdzono szerzenia się szczepów pałeczek *Enterobacteraiceae* wykazujących oporność na karbapenemy, jedne z najważniejszych

grup leków nowoczesnej medycyny, co sprawia, że prezentowane wyniki mają duże znaczenie praktyczne przy konstrukcji lokalnych receptariuszy szpitalnych.

Łączenie szczegółowych analiz epidemiologicznych przypadków zakażeń krwi z wnikliwymi testami molekularnymi izolowanych szczepów bakteryjnych umożliwiło dwukierunkowe spojrzenie na problem zakażeń krwi: porównanie wykonywane pod kątem rozwoju, przebiegu i ciężkości zakażenia oraz cech – oporność, zjadliwość – danego szczepu. Wyniki uzyskane w tej pracy pozwalają w sposób całościowy opisać epidemiologię o zakażeniach krwi wywołanych przez pałeczki z rodziny *Enterobacterales*, a także mogą przyczynić się do ograniczenia tego typu zakażeń w przyszłości poprzez pokazanie wagi badanego problemu i wprowadzenie odpowiednich procedur, w tym stosowanie racjonalnej antybiotykoterapii opartej na leczeniu celowanym, informacji zwrotnej dla zespołów terapeutycznych oraz antybiogramach skumulowanych, a przede wszystkim realizowanie szkoleń dla personelu medycznego oddziałów szpitalnych.

## 10. STRESZCZENIE

Celem niniejszej rozprawy była analiza cech fenotypowo-molekularnych pałeczek *Enterobacterales* izolowanych z zakażeń krwi od hospitalizowanych osób dorosłych. Stosując różne metody oznaczania lekooporności (automatyczne, manualne, molekularne) udało się określić poziom oporności badanych izolatów w odniesieniu do wybranych grup antybiotyków. Ponadto, dzięki zastosowaniu procedury PCR, oznaczono wybrane geny wirulencji, co pozwoliło przeanalizować potencjał patogenny danych szczepów. Dodatkowo metoda PFGE umożliwiła wykrycie epidemii klonalnych na badanych oddziałach.

Uzyskane wyniki lekooporności pokazują, że pałeczki *Enterobacterales* cechowały się wysoką opornością wobec penicylin i fluorochinolonów, a także stosunkowo wysoką opornością wobec cefalosporyn. Należy jednak zaznaczyć, że oporność znacznie spadała w obecności inhibitorów  $\beta$ -laktamaz, takich jak kwas klawulanowy czy sulbaktam. Poza antybiotykami łączonymi z inhibitorami  $\beta$ -laktamaz świetne wyniki otrzymano stosując karbapenemy i niektóre aminoglikozydy. W przypadku terapii empirycznej należy więc rozważyć stosowanie karbapenemów, amikacyny oraz wybranych antybiotyków z inhibitorami  $\beta$ -laktamaz.

Badanie czynników zjadliwości wykazało, że tylko niewielka część izolatów *E.coli* niosła geny odpowiedzialne za patogenezę zakażeń krwi. Większość szczepów posiadała geny odpowiedzialne za adhezję i systemy pozyskiwania żelaza, które zwiększają zjadliwość mikroorganizmów poprzez adhezję, rozwój biofilmu i ciężkich stanów zapalnych. U części szczepów *K.pneumoniae* potwierdzono obecność genów odpowiedzialnych za rozwój otoczek polisacharydowych, a tym samym wysoką oporność na fagocytozę. Ponadto potwierdzono występowanie genów związanych z transportem żelaza zwiększających wirulencję *K.pneumoniae*.

W obrębie dwóch oddziałów zabiegowych, na przestrzeni prawie roku, zaobserwowano rozprzestrzenianie się szczepów *K.pneumoniae* należących do tego samego klonu. Świadczy to o wystąpieniu epidemii klonalnej i konieczności skuteczniejszego nadzoru nad zakażeniami *K.pneumoniae* na oddziałach zabiegowych.

Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę dalszych badań nad zakażeniami krwi o etiologii *Enterobacterales* u hospitalizowanych osób dorosłych, nie tylko z uwagi na rosnący udział pałeczek *Enterobacterales* wśród tego typu zakażeń, ale ze względu na wzrastającą oporność i zjadliwość tych pałeczek.

## 11. SUMMARY

The aim of this research was to analyze the phenotypic and molecular characteristics of *Enterobacteriales* isolated from bloodstream infections from hospitalized adults. Using various methods of determining drug resistance (automatic, manual, and molecular), it was possible to determine the resistance of the tested isolates in relation to selected groups of antibiotics. Moreover, through the PCR, selected virulence genes were determined, which made it possible to analyze the pathogenic potential of the given strains. Additionally, the PFGE method allowed to detect clonal diversity in the studied wards.

The findings with regard to drug resistance show that *Enterobacteriales* were characterized by high resistance to penicillins and fluoroquinolones as well as relatively high resistance to cephalosporins. It should be noted that resistance decreased significantly in the presence of  $\beta$ -lactamase inhibitors such as clavulanic acid or sulbactam. Apart from the antibiotics with  $\beta$ -lactamase inhibitors, good results have been obtained with carbapenems and some aminoglycosides. In the case of empiric therapy, the use of carbapenems, amikacin and selected antibiotics with  $\beta$ -lactamase inhibitors should be considered.

The study of virulence factors showed that only a small part of *E.coli* isolates carried genes responsible for the pathogenesis of bloodstream infections. Most strains had adhesion genes and iron transport system genes that increase the virulence of microorganisms through adhesion, biofilm development and severe infection. In some *K. pneumoniae* strains the presence of genes responsible for the development of polysaccharide envelopes and thus high resistance to phagocytosis was confirmed. In addition, the presence of iron transport system genes increasing the virulence of *K. pneumoniae* was confirmed.

Within two surgical wards, the spread of *K.pneumoniae* strains belonging to the same clone was observed over the course of almost a year. This proves the occurrence of a clonal outbreak and the need for more effective surveillance of *K.pneumoniae* infections in surgical wards.

The findings indicate that we need further research on bloodstream infections of *Enterobacteriales* etiology in hospitalized adults, not only due to the increasing contribution of *Enterobacteriales* in this type of infections, but also in view of the increasing resistance and virulence of these bacteria.



## 12. WYKAZ TABEL I RYCIN

### 12.1. Wykaz rycin

Rycina 1. Przebieg procedury identyfikacji drobnoustrojów w metodzie MALDI-TOF MS. Próbkę umieszcza się na metalowej płytce i pokrywa matrixem. Następnie próbka jonizuje dzięki działaniu lasera, a molekuly przyspieszają w polu elektrostatycznym. Jony są rozdzielane zgodnie z ich czasem przelotu, poddawane działaniu próżni, aż docierają do detektora, który rejestruje każdy sygnał [117].	32
Rycina 2. Wrażliwość szczepów <i>E.coli</i> i <i>K.pneumoniae</i> według grup antybiotyków na oddziałach internistycznych.	56
Rycina 3. Wrażliwość szczepów <i>E.coli</i> i <i>K.pneumoniae</i> według grup antybiotyków na oddziałach zabiegowych.	57
Rycina 4. Wrażliwość szczepów <i>E.coli</i> i <i>K.pneumoniae</i> według grup antybiotyków na oddziałach intensywnej terapii.	58
Rycina 5. Dendrogram podobieństwa wybranych 27 szczepów <i>K.pneumoniae</i> z zakażeń krwi z oddziałów zabiegowych, ramką oznaczono szczepy należące do tego samego klonu.	66

### 12.2. Wykaz tabel

Tabela 1. Wykaz genów, użytych starterów oraz warunków przeprowadzonych reakcji PCR.	43
Tabela 2. Szczepy wyizolowane z zakażeń krwi od osób dorosłych hospitalizowanych w zależności od oddziałów.	45
Tabela 3. Prewalencja genów wirulencji wśród szczepów <i>E.coli</i> ESBL+ w zależności od oddziałów szpitalnych.	48
Tabela 4. Prewalencja genów wirulencji wśród szczepów <i>K.pneumoniae</i> ESBL+ w zależności od oddziałów.	49
Tabela 5. Lekooporność szczepów <i>Enterobacterales</i> na oddziałach internistycznych.	51
Tabela 6. Lekooporność szczepów <i>Enterobacterales</i> na oddziałach zabiegowych.	53
Tabela 7. Lekooporność szczepów <i>Enterobacterales</i> na oddziałach intensywnej terapii.	55
Tabela 8. Prewalencja mechanizmów oporności wśród wyizolowanych szczepów <i>Enterobacterales</i> .	59
Tabela 9. Prewalencja szczepów <i>Enterobacterales</i> ESBL+ w przypadkach zakażeń krwi w zależności od oddziału.	60
Tabela 10. Lekooporność szczepów ESBL+ i ESBL- na oddziałach internistycznych.	61
Tabela 11. Lekooporność szczepów ESBL+ i ESBL- na oddziałach zabiegowych.	62
Tabela 12. Lekooporność szczepów ESBL+ i ESBL- na oddziałach intensywnej terapii.	63
Tabela 13. Prewalencja genów odpowiedzialnych za wytwarzanie $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania wśród szczepów <i>Enterobacterales</i> na oddziałach internistycznych.	64

Tabela 14. Prewalencja genów odpowiedzialnych za wytwarzanie $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania wśród szczepów <i>Enterobacterales</i> na oddziałach zabiegowych.....	65
Tabela 15. Prewalencja genów odpowiedzialnych za wytwarzanie $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania wśród szczepów <i>Enterobacterales</i> na oddziałach intensywnej terapii. ....	65

### 13. LITERATURA:

1. Octavia S, Lan R. The Family Enterobacteriaceae. W: E. Rosenberg et al. The Prokaryotes – Gammaproteobacteria. Springer. 2014, 13: 226-286.
2. Jenkins C, Rentenaar RJ, Landraud L, Brisse S. 180-Enterobacteriaceae. W: Cohen J, Powderly WG, Opal SM. Infectious Diseases. Fourth Edition. 2017, 4: 1565-1578.e2.
3. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol 2010, 8: 26–38.
4. Sonnenberg M. 220-Enterobacteriaceae. W: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Principles and Practice of Infectious Diseases. Eighth Edition. 2015, 2: 2503-2517.e5.
5. Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. Microbes Infect 2001, 3: 561–569.
6. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘*Enterobacteriales*’: proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2016, 66 (12): 5575–5599.
7. Nawrotek P, Grygorcewicz B, Augustyniak A. Zmiany w taksonomii  $\gamma$ -proteobacteria, modyfikacja nazwy rzędu Enterobacteriales i nowe rodziny w obrębie Enterobacterales ord. nov. Post Mikrobiol 2017, 56 (4): 465–469.
8. Eppinger M, Worsham PL, Nikolich MP, Riley DR, Sebastian Y, Mou S i wsp. Genome sequence of the deep-rooted *Yersinia pestis* strain Angola reveals new insights into the evolution and pangenome of the plague bacterium. J Bacteriol 2010, 192: 1685–1699.
9. Morelli G, Song Y, Mazzoni CJ, Eppinger M, Roumagnac P, Wagner DM i wsp. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. Nat Genet 2010, 42: 1140–1143.
10. Rock C, Sonnenberg MS. Human pathogenic Enterobacteriaceae. Reference Module in Biomedical Sciences 2014, 1-8.
11. Percival S, Williams DW. Chapter Six- *Escherichia coli*. W: Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition). Microbiological Aspects and Risks 2014, p. 89-117.
12. Manges AR, Geum HM, Guo A, Edens TJ. Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. Clin Microbiol Rev. 2019, 32 (3): e00135-18.

13. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 2013, 5: 58-65.
14. Daga AP, Koga VL, Soncini JGM, de Matos CM, Perugini MRE, Pelisson M i wsp. *Escherichia coli* bloodstream infections in patients at a University Hospital: Virulence Factors and Clinical Characteristics. *Front Cell Infect Microbiol* 2019, 9:191.
15. Koga VL, Tomazetto G, Cyويا PS, Neves MS, Vidotto MC, Nakazato G i wsp. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in brazil. *BioMed Res Int* 2014, 465054.
16. Tao X, Wang H, Min C, Yu T, Luo Y, Li J i wsp. A retrospective study on *Escherichia coli* bacteremia in immunocompromised patients: Microbiological features, clinical characteristics, and risk factors for shock and death. *J Clin Lab Anal* 2020, e23319.
17. Mora-Rillo M, Fernández-Romero N, Navarro-San Francisco C, Díez-Sebastián J, Romero-Gómez MP, Fernández FA i wsp. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. *Virulence* 2015, 6(1): 93–100.
18. Hung WT, Cheng MF, Tseng FC, Chen YS, Lee SSJ, Chang TH i wsp. Bloodstream infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: The role of virulence genes. *J Microbiol Immunol Infect* 2019, 52(6): 947-955.
19. Chmielewska SJ, Fiedoruk K, Daniluk T, Ściepuk M, Kaczmarzyk D, Leszczyńska K. Znaczenie uropatogennych szczepów *Escherichia coli* (UPEC) w etiopatogenezie zakażeń układu moczowego. *Post Mikrobiol* 2016, 55(1): 46-56.
20. Poolman JT, Wacker M. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. *J Infect Dis.* 2016, 213(1): 6–13.
21. Miajlovic H, Smith SG. Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiol Lett* 2014: 354: 1–9.
22. Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 2012, 3(2): 71–87.
23. Paterson DL, Siu KKL, Chang FY. *Klebsiella* species (*K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *K.ozzaenae* and *K. rhinoscleromatis*). *Infectious Disease & Antimicrobial Agents* 2010-2014, E-Sun Technologies. <http://www.antimicrobe.org/b107.asp>. Dostęp: 05.02.2021.

24. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998, 11(4): 589–603.
25. Xu M, Fu Y, Kong H, Chen X, Chen Y, Li L i wsp. Bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of *bla*<sub>KPC</sub>, virulence factors and their impacts on clinical outcome. *BMC Infect Dis* 2018, 18: 358.
26. Hasani A, Soltani E, Rezaee MA, Pirzadeh T, Oskouee MA, Hasani A i wsp. Serotyping of *Klebsiella pneumoniae* and Its Relation with Capsule-Associated Virulence Genes, Antimicrobial Resistance Pattern, and Clinical Infections: A Descriptive Study in Medical Practice. *Infect Drug Resist* 2020, 13: 1971–1980.
27. Keller R, Pedroso MZ, Ritchmann R, Silva RM. Occurrence of Virulence-Associated Properties in *Enterobacter cloacae*. *Infect Immun.* 1998, 66(2): 645–649.
28. Al-Hasan MN, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Baddour LM. Temporal trends in *Enterobacter* species bloodstream infection: a population-based study from 1998–2007. *Clin Microbiol Infect* 2011, 17: 539–545.
29. Ranjan KP, Ranjan N. Citrobacter: An emerging health care associated urinary pathogen. *Urol Ann* 2013, 5(4): 313–314.
30. Doran TI. The role of *Citrobacter* in clinical disease of children: review. *Clin Infect Dis* 1999, 28: 384–394.
31. Drelichman V, Band JD. Bacteremias due to *Citrobacter diversus* and *Citrobacter freundii*: incidence, risk factors, and clinical outcome. *Arch Intern Med* 1985, 145: 1808-1810.
32. Lin TY, Kak V, Chang FY. *Morganella* species. *Microbes 2010-2017*, E-Sun Technologies. <http://www.antimicrobe.org/b115.asp>. Dostęp: 05.02.2021.
33. Falagas ME, Kavadia PK, Mantadakis E, Kofteridis DP, Bliziotis IA, Saloustros E i wsp. *Morganella morganii* infections in a general tertiary hospital. *Infection* 2006, 34: 315-321.
34. O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin Microbiol Rev* 2000, 13: 534–546.
35. Armbruster CE, Mobley HLT, Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus* 2018, 8(1): 1-73.

36. Różalski A, Kwil I, Torzewska A, Baranowska M, Stączek P. Bakterie z rodzaju *Proteus* – cechy i czynniki chorobotwórczości. *Postepy Hig Med Dosw* 2007 (online), 61: 204-219.
37. Kalra A, Cooley C, Tsigrelis C. Treatment of endocarditis due to *Proteus* species: a literature review. *Int J Infect Dis* 2011, 15: e222–e225.
38. Haque M, Sartelli M, McKimm J, Bakar MA. Health care-associated infections – an overview. *Infect Drug Resist* 2018, 11: 2321–2333.
39. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008, 36(5): 309-332.
40. European Centre for Disease Prevention and Control: Surveillance of healthcare-associated infections in Europe 2007 [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/120215\\_SUR\\_HAI\\_2007.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/120215_SUR_HAI_2007.pdf) Dostęp: 05.02.2021
41. Lutwick L, Bearman G. Chapter Editor: Memish ZA. Bloodstream Infections. Guide to Infection Control in the Healthcare Setting. International Society for Infectious Diseases 2018. <https://isid.org/guide/hospital/bloodstreaminfections/>. Dostęp: 06.02.2021.
42. Deptuła A, Trejnowska E, Dubiel G, Żukowski M, Misiewska-Kaczur A, Ozorowski T, Hryniewicz W. Prevalence of healthcare-associated infections in Polish adult intensive care units: summary data from the ECDC European Point Prevalence Survey of Hospital-associated Infections and Antimicrobial Use in Poland 2012-2014. *J Hosp Infect* 2017, 96(2):145-150.
43. Laupland KB, Gregson DB, Zygun DA, Doig CJ, Mortis G, Church DL. Severe bloodstream infections: A population-based assessment. *Crit Care Med* 2004, 32 (4).
44. Son JS, Song JH, Soo Ko K, Yeom JS, Ki HK, Kim SW i wsp. Bloodstream Infections and Clinical Significance of Healthcare associated Bacteremia: A Multicenter Surveillance Study in Korean Hospitals. *J Korean Med Sci* 2010, 25: 992-998.
45. Bloodstream Infections. Hospital Infection Control. Infectious Disease Advisor 2017. 2013 Decision Support in Medicine. <https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/home/decision-support-in-medicine/hospital-infection-control/bloodstream-infections/>. Dostęp: 06.02.2021.

46. Jarvis WR. Selected aspects of the socioeconomic impact of nosocomial infections: morbidity, mortality, cost, and prevention. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996, 17(8): 552-7.
47. Wałaszek M, Różańska A, Wałaszek MZ, Wójkowska-Mach J oraz Zespół Polskiego Towarzystwa Zakażeń Szpitalnych. Epidemiology of Ventilator-Associated Pneumonia, microbiological diagnostics and the length of antimicrobial treatment in the Polish Intensive Care Units in the years 2013-2015. *BMC Infect Dis* 2018, 18: 308.
48. Friedman ND, Kaye KS, Stout JS, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP i wsp. Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* 2002, 137(10): 791-7.
49. Vallés J, Calbo E, Anoro E, Fontanals D, Xercavins M, Espejo E i wsp. Bloodstream infections in adults: Importance of healthcare-associated infections. *J Infect* 2008, 56: 27e34.
50. Cardoso T, Almeida M, Carratalà J, Aragão I, Costa-Pereira A, Sarmiento AE i wsp. Microbiology of healthcare-associated infections and the definition accuracy to predict infection by potentially drug resistant pathogens: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2015, 15: 565.
51. Slobbe L, El Barzouhi A, Boersma E, Rijnders BJA. Comparison of the Roll Plate Method to the Sonication Method To Diagnose Catheter Colonization and Bacteremia in Patients with Long-Term Tunnelled Catheters: a Randomized Prospective Study. *J Clin Microbiol* 2009, 47(4): 885-888.
52. Centers for Disease Control and Prevention: Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections, 2011: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/bsi-guidelines-H.pdf> Dostęp: 05.02.2021
53. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP i wsp. Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009, 49: 1-45.
54. National Healthcare Security Network: Bloodstream Infection Event (Central Line-Associated Bloodstream Infection and Non-central Line Associated Bloodstream Infection): [https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/4psc\\_clabscurrent.pdf](https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/4psc_clabscurrent.pdf) Dostęp: 05.02.2021

55. Lin KY, Cheng A, Chang, YC, Hung MC, Wang JT, Sheng WH i wsp. Central line-associated bloodstream infections among critically-ill patients in the era of bundle care. *J Microbiol Immunol Infect* 2017;50(3): 339–348.
56. Bulanda M, Wójkowska-Mach J. Zakażenia szpitalne w jednostkach opieki zdrowotnej. Wydawnictwo Lekarskie PZWL 2016, Wydanie I: 178-180.
57. Atilla A, Doğanay Z, Kefeli HC, Demirağ MD, Kiliç SS. Central line-associated blood stream infections: characteristics and risk factors for mortality over a 5.5-year period. *Turk J Med Sci* 2017;47(2): 646–652.
58. Bouza E, Eworo A, Cruz AF, Reigadas E, Rodriguez-Créixems M, Muñoz P. Catheter-related bloodstream infections caused by Gram-negative bacteria. *J Hosp Infect* 2013, 85(4): 316–320.
59. Silvestri L, van Saene HKF, Milanese M, Gregori D, Gullo A. Selective decontamination of the digestive tract reduces bacterial bloodstream infection and mortality in critically ill patients. Systematic review of randomized, controlled trials. *J Hosp Infect* 2007, 65: 187e203.
60. Oostdijk EAN, de Smet AMGA, Kesecioglu J, Bonten MJM. The role of intestinal colonization with Gram-negative bacteria as a source for intensive care unit-acquired bacteremia. *Crit Care Med* 2011, 39 (5).
61. Centers for Disease Control and Prevention: Secondary BSI Attribution: A Tale of Two Scenarios <https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/training/2019/secondary-bsi-508.pdf>  
Dostęp: 05.02.2021
62. Sante L, Aguirre-Jaime A, Miguel MA, Ramos MJ, Pedroso Y, Lecuona M. Epidemiological study of secondary bloodstream infections: The forgotten issue. *J Infect Public Health* 2019, 12: 37–42.
63. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HLT, Shirtliff ME. Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev* 2008, 21(1): 26–59.
64. Saint S. Clinical and economic consequences of nosocomial catheter-related bacteriuria. *Am J Infect Control* 2000, 28: 68-75.
65. Tambyah PA, Maki DG. Catheter-Associated Urinary Tract Infection Is Rarely Symptomatic. *Arch Intern Med* 2000, 160 (5).
66. Kucheria R, Dasgupta P, Sacks S, Khan M, Sheerin N. Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgrad Med J* 2005, 81: 83-86.



67. Martin ET, Kaye KS, Knott C, Nguyen H, Santarossa M, Evans R i wsp. Diabetes and Risk of Surgical Site Infection: A systematic review and meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016, 37(1): 88–99.
68. Li GQ, Guo FF, Ou Y, Dong GW, Zhou W. Epidemiology and outcomes of surgical site infections following orthopedic surgery. *Am J Infect Control* 2013, 41(12): 1268–1271.
69. Holman WL, Pamboukian SV, McGiffin DC, Tallaj JA, Cadeiras M, Kirklin JK. Device related infections: are we making progress? *J Card Surg* 2010, 25(4): 478-83.
70. McGarry TJ, Joshi R, Kawata H, Patel J, Feld G, Birgersdotter UM i wsp. Pocket infections of cardiac implantable electronic devices treated by negative pressure wound therapy. *EP Europace* 2014, 16 (3): 372–377.
71. Nagpal A, Baddour LM, Sohail MR. Microbiology and Pathogenesis of Cardiovascular Implantable Electronic Device Infections. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012, 5 (2): 433-441.
72. Baddour LM, Cha YM, Wilson WR. Infections of Cardiovascular Implantable Electronic Devices. *N Engl J Med* 2012, 367(9): 842–849.
73. Gordon SM, Schmitt SK, Jacobs M, Smedira NM, Goormastic M, Banbury MK i wsp. Nosocomial bloodstream infections in patients with implantable left ventricular assist devices. *Ann Thorac Surg* 2001, 72: 725- 730.
74. Pittet D, Allegranzi B, Sax H, Dharan S, Pessoa-Silva CL, Donaldson L i wsp. Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. *Lancet Infect Dis* 2006, 6: 641–52.
75. World Health Organization WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: a Summary:  
[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70126/WHO\\_IER\\_PSP\\_2009.07\\_eng.pdf;jsessionid=C2FD7EA80CF223AF5D137ACB2DE7DEC2?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70126/WHO_IER_PSP_2009.07_eng.pdf;jsessionid=C2FD7EA80CF223AF5D137ACB2DE7DEC2?sequence=1)  
Dostęp: 05.02.2021
76. Lucet JC, Rigaud MP, Mentre F, Kassis N, Deblangy C, Andremont A i wsp. Hand contamination before and after different hand hygiene techniques: a randomized clinical trial. *J Hosp Infect* 2002, 50: 276–80.
77. Hugonnet S, Sax H, Eggimann P, Chevrolet JC, Pittet D. Nosocomial Bloodstream Infection and Clinical Sepsis. *Emerg Infect Dis* 2004, 10(1): 76–81.
78. Huerta LE, Rice TW. 2019. Pathologic Difference between Sepsis and Bloodstream Infections. *J Applied Lab Med* 2019, 3(4): 654–663.

79. World Health Organization (26.08.2020): <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>. Dostęp: 06.02.2021.
80. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA i wsp. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* 1992, 101(6): 1644–1655.
81. Kaukonen KM, Bailey M, Bellomo R. Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis. *N Engl J Med* 2015, 372: 1629-1638.
82. Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial Persister Cell Formation and Dormancy. *Appl Environ Microbiol* 2013, 79(23): 7116–7121.
83. Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet* 1944, 244: 497–500.
84. Amato SM, Orman MA, Brynildsen MP. Metabolic Control of Persister Formation in *Escherichia coli*. *Mol Cell* 2013, 50(4): 475-487.
85. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. 2004. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett* 2004, 230: 13-18.
86. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* 2018, 4(3): 482–501.
87. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *J Med Microbiol* 2013, 303(6-7): 287–292.
88. Cao VTB, Arlet G, Ericsson BM, Tammelin A, Courvalin P, Lambert T. Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid mediated CMY-4 and permeability alteration. *J Antimicrob Chemother* 2000, 46(6): 895–900.
89. Kumar A, Schweizer H. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev* 2005, 57(10): 1486–1513.
90. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev* 2013, 26: 185–230.
91. Piddock LJV. Multidrug-resistance efflux pumps ? not just for resistance. *Nature Rev Microbiol* 2006, 4(8): 629–636.
92. Liu A, Tran L, Becket E, Lee K, Chinn L, Park E i wsp. Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54(4): 1393-403.
93. Girgis HS, Hottes AK, Tavazoie S. Genetic architecture of intrinsic antibiotic susceptibility. *PLoS One* 2009, 20: 4(5): e5629.

94. Blázquez J, Couce A, Rodríguez-Beltrán J, Rodríguez-Rojas A. Antimicrobials as promoters of genetic variation. *Curr Opin Microbiol* 2012, 15: 561–569.
95. Martínez JL. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol* 2014, 11: 33–39.
96. Lopez E, Elez M, Matic I, Blázquez J. 2007. Antibiotic-mediated recombination: ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2007, 64: 83-93.
97. Reygaert WC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): molecular aspects of antimicrobial resistance and virulence. *Clin Lab Sci* 2009, 22: 115–119.
98. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 2014, 22(8): 438–445.
99. Vedantam G, Guay GG, Austria NE, Doktor S Z, Nichols BP. Characterization of Mutations Contributing to Sulfathiazole Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998, 42(1): 88–93.
100. Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39: 279–289.
101. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54(3): 969–976.
102. Marsik FJ, Nambiar S. Review of carbapenemases and AmpC-beta lactamases. *Pediatr Infect Dis J* 2011, 30: 1094–1095.
103. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Infect Control* 2006, 34: S20–S28, S64–S73.
104. Denton M. *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents* 2007, 29(Suppl 3): S9–S22.
105. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007, 20(3): 440-458.
106. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia Coli* O25b-ST131: A Pandemic, Multiresistant, Community Associated Strain. *J Antimicrob Chemother* 2011, 66(1): 1-14.
107. Jacoby GA. AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009, 22(1): 161–182.
108. Nordmann P, Mammeri H. Extended-spectrum Cephalosporinases: Structure, Detection and Epidemiology. *Future Microbiol* 2007, 2(3): 297-307.

109. Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48(1): 1–14.
110. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48(1): 15–22.
111. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing Beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997, 41(2): 223-32.
112. Frère JM, Galleni M, Bush K, Dideberg O. Is It Necessary to Change the Classification of  $\beta$ -Lactamases? *J Antimicrob Chemother* 2005, 55(6): 1051-3.
113. Bajaj P, Singh NS, Viridi JS. Escherichia Coli  $\beta$ -Lactamases: What Really Matters. *Front Microbiol* 2016, 30:7:417.
114. Dingle TC, Butler-Wu SM. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. *Clin Lab Med* 2013, 33(3): 589–609.
115. Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2010, 16(11): 1604-13.
116. Viana RO, Magalhães-Guedes KT, Dias DR, Schwan RF. Use of Maldi-Tof MS biosensor in microbial assessment of Brazilian kefir grains. *Rev Ceres* 2019, 66(1).
117. Santos IC, Hildenbrand ZL, Schug KA. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *The Analyst* 2016, 141(10): 2827–2837.
118. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 2010, 48(5):1584-91.
119. Źródłowski T, Sobońska J, Salamon D, McFarlane IM, Ziętkiewicz M, Gosiewski T. Classical Microbiological Diagnostics of Bacteremia: Are the Negative Results Really Negative? What is the Laboratory Result Telling Us About the “Gold Standard”? *Microorganisms* 2020, 8(3):346.
120. Kłos M, Pomorska-Wesołowska M, Romaniszyn D, Wójkowska-Mach J, Chmielarczyk A. Antimicrobial Resistance in Enterobacterales Bacilli Isolated from Bloodstream Infection in Surgical Patients of Polish Hospitals. *Int J Microbiol* 2021, 2021:6687148.
121. Kłos M, Pomorska-Wesołowska M, Romaniszyn D, Chmielarczyk A, Wójkowska-Mach J. Healthcare-Associated Infections: Enterobacteriaceae

- Bloodstream Infections in the ICU Settings. Infection Control & Hospital Epidemiology 2020, 41(S1):S246-S247. SHEA 2020 Decennial
122. Kłos M, Pomorska-Wesołowska M, Chmielarczyk A, Romaniszyn D, Wójkowska-Mach J. High resistance of Enterobacteriales bacilli isolated from bloodstream infection secondary to surgical site infections from adult surgery patients of Southern Poland. 48th World Congress of Surgery (WCS) 2019, Krakow Conference: PE011.
  123. Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, Geider K. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. PLoS One 2008, 3(7): e2843.
  124. Kirby AW, Bauer WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. Am J Clin Pathol 1966, 45(4): 493-496.
  125. Kaur J, Mahajan G, Chand K, Sheevani, Chopra S. Enhancing Phenotypic Detection of ESBL in AmpC co-producers by using Cefepime and Tazobactam. J Clin Diagn Res 2016, 10(1): DC05–DC08.
  126. Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important b-lactamases in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother 2010, 65: 490–495.
  127. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis 2000, 181(1): 261-272.
  128. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Immunol Med Microbiol 1995, 12(2): 85-90.
  129. Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary JC i wsp. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN* (*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. Infect Immun 2000, 68(5): 3040-3047.
  130. Ons E, Bleyen N, Tuntufye HN, Vandemaele F, Goddeeris BM. High prevalence iron receptor genes of avian pathogenic *Escherichia coli*. Avian Pathol 2007, 36(5): 411-414.
  131. Zapata G, Crowley JM, Vann WF. Sequence and expression of the *Escherichia coli* K1 *neuC* gene product. J Bacteriol 1992, 174(1): 315-319.

132. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med* 2004, 199(5): 697-705.
133. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L i wsp. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One* 2009, 4(3): e4982.
134. Regué M, Climent N, Abitiu N, Coderch N, Merino S, Izquierdo L i wsp. Genetic characterization of the *Klebsiella pneumoniae waa* gene cluster, involved in core lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol* 2001, 183(12): 3564-3573.
135. Ma LC, Fang CT, Lee CZ, Shun CT, Wang JT. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. *J Infect Dis* 2005, 192(1): 117-128.
136. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn Micr Infec Dis* 2008, 62(2008): 1-6.
137. Diekema DJ, Hsueh PR, Mendes RE, Pfaller MA, Rolston KV, Sader HS i wsp. The Microbiology of Bloodstream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2019, 63(7): 1-10.
138. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004, 39 (3): 309-317.
139. Renaud B, Brun-Buisson C. Outcomes of primary and catheter-related bacteremia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163: 1584-90.
140. Kallel H, Houcke S, Resiere D, Roy M, Mayence C, Mathien C i wsp. Epidemiology and Prognosis of Intensive Care Unit-Acquired Bloodstream Infection. *Am J Trop Med Hyg* 2020, 103(1): 508-514.
141. Al-Hazmi HH, Al-Zahrani T, Elmalky AM. Hospital acquired blood stream infection as an adverse outcome for patients admitted to hospital with other principle diagnosis. *Saudi J Anaesth* 2014, 8(Suppl 1): S84–S88.
142. Rello J, Ricart M, Mirelis B, Quintana E, Gurgui M, Net A i wsp. Nosocomial bacteremia in a medical-surgical intensive care unit: epidemiologic characteristics

- and factors influencing mortality in 111 episodes. *Intensive Care Med* 1994, 20: 94-8.
143. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD i wsp. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009, 302: 2323.
  144. European Centre for Disease Prevention and Control: Annual Epidemiological Report 2016 – Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. Stockholm: ECDC; 2016  
[https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER-HCAI\\_ICU\\_3\\_0.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER-HCAI_ICU_3_0.pdf)  
Dostęp 27.02.2021
  145. European Centre for Disease Prevention and Control: Healthcare-associated infections acquired in intensive care units Annual Epidemiological Report for 2017  
[https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER\\_for\\_2017-HAI.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2017-HAI.pdf)  
Dostęp 27.02.2021
  146. Watt S, Lanotte P, Mereghetti L, Moulin-Schouleur M, Picard B, Quentin R. *Escherichia coli* strains from pregnant women and neonates: intraspecies genetic distribution and prevalence of virulence factors. *J Clin Microbiol* 2003, 41(5): 1929-1935.
  147. Hilali F, Ruimy R, Saulnier P, Barnabé C, Lebouguéne C, Tibayrenc M i wsp. Prevalence of Virulence Genes and Clonality in *Escherichia coli* Strains That Cause Bacteremia in Cancer Patients. *Infection and Immunity* 2000, 68(7): 3983-3989.
  148. Prasadarao NV, Wass CA, Kim KS. Identification and Characterization of S Fimbria-Binding Sialoglycoproteins on Brain Microvascular Endothelial Cells. *Infect Immun* 1997, 65(7): 2852-2860.
  149. Ellermann M, Arthur JC. Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions. *Free Radic Biol Med* 2017, 105: 68-78.
  150. Mokady D, Gophna U, Ron EZ. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Int J Med Microbiol* 2005, 295(6-7): 455-462.
  151. Goh KGK, Phan MD, Forde BM, Chong TM, Yin WF, Chan KG i in. Genome-Wide Discovery of Genes Required for Capsule Production by Uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio* 2017, 8(5): e01558-17.
  152. Rashid RA, Tarr PI, Moseley SL. Expression of the *Escherichia coli* IrgA homolog adhesin is regulated by the ferric uptake regulation protein. *Microb Pathog* 2006, 41(6): 207-217.

153. Kalra OP, Raizada A. Approach to a Patient with Urosepsis. *J Glob Infect Dis* 2009, 1(1): 57–63.
154. Candan ED, Aksöz N. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. *Acta Biochim Pol* 2015, 62(4): 867-74.
155. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee HC, Ke DS, Lee CC. Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis* 2006, 42(10): 1351-8.
156. Kim D, Park BY, Choi MH, Yoon EJ, Lee H, Lee KJ i wsp. Antimicrobial resistance and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* affecting 30 day mortality in patients with bloodstream infection. *J Antimicrob Chemother* 2019, 74(1): 190-199.
157. European Centre for Disease Prevention and Control: Surveillance Atlas of Infectious Diseases <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4> Dostęp 27.02.2021
158. Ghadiri H, Vaez H, Khosravi S, Soleymani E. The Antibiotic Resistance Profiles of Bacterial Strains Isolated from Patients with Hospital-Acquired Bloodstream and Urinary Tract Infections. *Crit Care Res Pract* 2012, (2): 890797.
159. Tabah A, Koulenti D, Laupland K, Misset B, Valles J, de Carvalho FB i wsp. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EUROBACT International Cohort Study. *Intensive Care Med* 2012, 38: 1930–1945.
160. Thom KA, Schweizer ML, Osih RB, McGregor JC, Furuno JP, Perencevich EN i wsp. Impact of empiric antimicrobial therapy on outcomes in patients with *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: a cohort study. *BMC Infect Dis* 2008, 8: 116.
161. Baviskar AS, Khatib KI, Rajpal D, Dongare HC. Nosocomial infections in surgical intensive care unit: A retrospective single-center study. *Int J Crit Illn Inj Sci* 2019, 9(1): 16–20.
162. Zilberberg MD, Nathanson BH, Sulham K, Fan W, Shorr AF. Carbapenem resistance, inappropriate empiric treatment and outcomes among patients hospitalized with Enterobacteriaceae urinary tract infection, pneumonia and sepsis. *BMC Infect Dis* 2017, 17: 279.



163. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drugresistant and pandrug-resistant Gramnegative bacilli in Europe. *EuroSurveill* 2008, 13(47): pii:19045.
164. Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece – a review of the current evidence. *EuroSurveill* 2008, 13(4).
165. Castanheira M, Mendes RE, Jones RN, Sader HS. Changes in the frequencies of beta-lactamase genes among *Enterobacteriaceae* isolates in U.S. hospitals, 2012 to 2014: activity of ceftazidime-avibactam tested against beta-lactamase-producing isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2016, 60: 4770–4777.
166. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev* 2005, 18(4): 657-686.
167. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM i wsp. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008, 61: 273–281.
168. Chmielarczyk A, Pobiega M, Wójkowska-Mach J, Romaniszyn D, Adamski P, Heczko PB, Bulanda M. Molecular epidemiology, plasmid analysis, virulence, and resistance of *Escherichia coli* isolated from neonatal intensive care units in Poland. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013, 76(4): 542-545.
169. Chmielarczyk A, Pobiega M, Wójkowska-Mach J, Romaniszyn D, Adamski P, Heczko PB, Bulanda M. Bloodstream Infections due to *Enterobacteriaceae* Among Neonates in Poland – Molecular Analysis of the Isolates. *Pol J Microbiol* 2015, 64(3): 217-225.
170. Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Trecarichi EM, Posteraro B, Fiori B i wsp. Predictors of Mortality in Patients with Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*: Importance of Inadequate Initial Antimicrobial Treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51(6): 1987–1994.
171. Hansen DS, Skov R, Benedi JV, Sperling V, Kolmos HJ. *Klebsiella* typing: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in comparison with O:K-serotyping. *Clin Microbiol Infect* 2002, 8(7): 397-404.
172. Wenzel RP, Edmond MB. The Impact of Hospital-Acquired Bloodstream Infections. 4th Decennial International Conference on Nosocomial and Healthcare-Associated Infections 2001, 7(2).

173. Darouiche RO, Raad II, Heard SO, Thornby JI, Wenker OC, Gabrielli A. A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters. *N Engl J Med* 1999, 340: 1–8.
174. Doebbeling BN, Stanley GL, Sheetz CT, Pfaller MA, Houston AK, Annis L. Comparative efficacy of alternative handwashing agents in reducing nosocomial infections in intensive care units. *N Engl J Med* 1992, 327: 88–93.
175. Kirby A, Santoni N. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: what impact on the efficacy of antibiotic prophylaxis in colorectal surgery? *J Hosp Infect* 2015, 89(4): 259-63.
176. Iredell J, Brown J, Tagg K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ* 2016, 352: 1-19.

**Załącznik nr 1** Opinia Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego  
nr 1072.6120.64.2019 z dnia 28.03.2019



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

## OPINIA

nr 1072.6120.64.2019 z dnia 28 marca 2019 roku

Na zebraniu w dniu 28 marca 2019 r. Komisja zapoznała się z wnioskiem z dnia 11 marca 2019 r.

złożonym:

przez kierownika tematu: **dr hab. Jadwiga Wójkowska - Mach**  
zatrudnionego **Katedra Mikrobiologii UJCM**  
**31 – 121 Kraków, ul. Czysta 18**

oraz jego merytorycznym uzasadnieniem dotyczącym przeprowadzenia eksperymentu medycznego pt. „Zakażenia krwi o etiologii *Enterobacteriaceae* u hospitalizowanych osób dorosłych w regionie Polski południowej – charakterystyka drobnoustrojów”.

Do wniosku dołączono:

1. Protokół badania, wersja 1.0 z dnia 07.03.2019 r.
2. Życiorys naukowy Wnioskodawcy.
3. Lista piśmiennictwa.
4. Oświadczenie o braku załączenia formularza informacji dla pacjenta, formularza zgody uczestnika badania, formularza o ochronie danych osobowych.
5. Oświadczenie o realizacji projektu w ramach prac badawczych UJ/UJCM.

Komisja wyraża pozytywną opinię w sprawie przeprowadzenia wnioskowanego badania - na warunkach określonych we wniosku oraz dodatkowo zastrzegając:

1/ obowiązek przedstawienia Komisji:

- wszystkich zmian w protokole mających wpływ na przebieg oraz ocenę badania,
- zawiadomienia o przyczynach przedwczesnego zakończenia badania,
- sprawozdania w toku przeprowadzanych badań - co sześć miesięcy,
- raportu końcowego.

**Badanie może być prowadzone do dnia 28 marca 2020 roku.**

**Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi. Lista członków Komisji biorących udział w podjęciu uchwały stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.**

Kraków, dnia 28 marca 2019 r.

Przewodniczący  
Komisji Bioetycznej UJ

prof. dr hab. n. med. Piotr Hior

ul. Grzegorzewska 20

PL 31-531 Kraków

tel. + 48 (12) 433 27 39

+ 48 (12) 433 27 43

kbet@cm-uj.krakow.pl

www.kbet.cm-uj.krakow.pl

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ UJ  
DO WYŁĄCZNEGO WYKORZYSTANIA  
DLA CELÓW STATUTOWYCH  
UNIwersytetu JAGIELLOŃSKIEGO

Lista członków KOMISJI BIOETYCZNEJ UJ biorących udział w podjęciu uchwały dotyczącej opinii nr 1072.6120.64.2019:

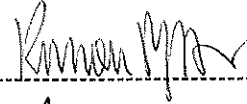
1. Przewodniczący: prof. dr hab. med. Piotr Thor – lekarz – chirurg ogólny/urolog



2. Z-ca Przewodniczącego: mgr Alicja Widera – psycholog kliniczny



3. prof. dr hab. med. Roman Pfitzner – lekarz – chirurg ogólny/kardiochirurg




4. dr hab. med. Ewa Konduracka, prof. UJ – lekarz – internista/kardiolog



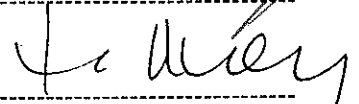
5. dr hab. med. Klaudia Stangel-Wójcikiewicz – lekarz – ginekolog-położnik



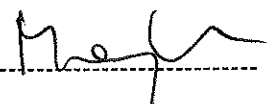
6. dr hab. med. Ewa Cichocka-Jarosz – lekarz – pediatra/alerlogolog



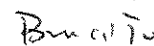
7. dr hab. n. med. Tomasz Kaczmarzyk, prof. UJ – lekarz stomatolog – chirurg stomatolog



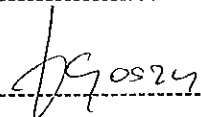
8. dr hab. med. Piotr Major – lekarz – chirurg ogólny



9. dr hab. Jerzy Brusilo OFMConv. – duchowny



10. dr med. Aleksandra Goszcz – lekarz – internista/farmakolog kliniczny



11. dr med. Stefan Bednarz – lekarz – internista



12. dr med. Bartosz Grabski – lekarz – psychiatra/seksuolog



13. mgr Leszek Kądziela – radca prawny



14. Jolanta Kopeć – położna

# AKCEPTACJA

dot. opinii nr: 1072.6120.64.2019 z dnia 28 marca 2019 roku

## TYTUŁ BADANIA:

„Zakażenie krwi o etiologii Enterobacteriaceae u hospitalizowanych osób dorosłych w regionie Polski południowej – charakterystyka drobnoustrojów”

## WNOSKODAWCA:

dr hab. med. Jadwiga Wójkowska-Mach  
Katedra Mikrobiologii UJ CM  
31-121 Kraków, ul. Czysła 18

## PRZEDSTAWIONE DOKUMENTY:

Zgłoszenie poprawki z dnia 31 marca 2020 r. dotyczącej wyrażenia zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego na wznowienie badania do 31 grudnia 2021 roku.

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Jagiellońskiego na posiedzeniu w dniu 23 kwietnia 2020 r., po zapoznaniu się z wyżej wymienionym dokumentem pozytywnie zaopiniowała zgłoszoną poprawkę.

## Lista członków Komisji Bioetycznej biorących udział w posiedzeniu:

Przewodniczący: prof. dr hab. med. Piotr Thor – lekarz – chirurg ogólny/urolog  
Zastępca przewodniczącego: mgr Alicja Widera – psycholog kliniczny

### Członkowie:

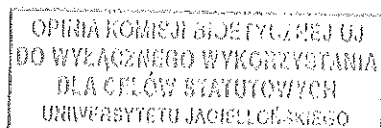
prof. dr hab. med. Roman Pfitzner – lekarz – chirurg ogólny/kardiolog  
dr hab. med. Ewa Konduracka, prof. UJ – lekarz – internista/kardiolog  
dr hab. med. Klaudia Stangel-Wójcikiewicz – lekarz – ginekolog-położnik  
dr hab. med. Ewa Cichocka-Jarosz, prof. UJ – lekarz – pediatra/alerгоlog  
dr hab. n. med. Tomasz Kaczmarzyk, prof. UJ – lekarz stomatolog – chirurg stomatolog  
dr hab. med. Piotr Major, prof. UJ – lekarz – chirurg ogólny  
dr med. Stefan Bednarz – lekarz – internista – przedstawiciel Okręgowej Rady Lekarskiej w Krakowie  
dr med. Bartosz Grabski – lekarz – psychiatra/seksuolog  
mgr Leszek Kądziela – radca prawny  
Jolanta Kopeć – położna

## Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi

Kraków, 23 kwietnia 2020 r.

Przewodniczący  
Komisji Bioetycznej UJ

prof. dr hab. n. med. Piotr Thor



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Komisja Bioetyczna  
Uniwersytetu  
Jagiellońskiego

ul. Grzegorzewska 20

PL 31-531 Kraków

tel. + 48 (12) 433 27 39

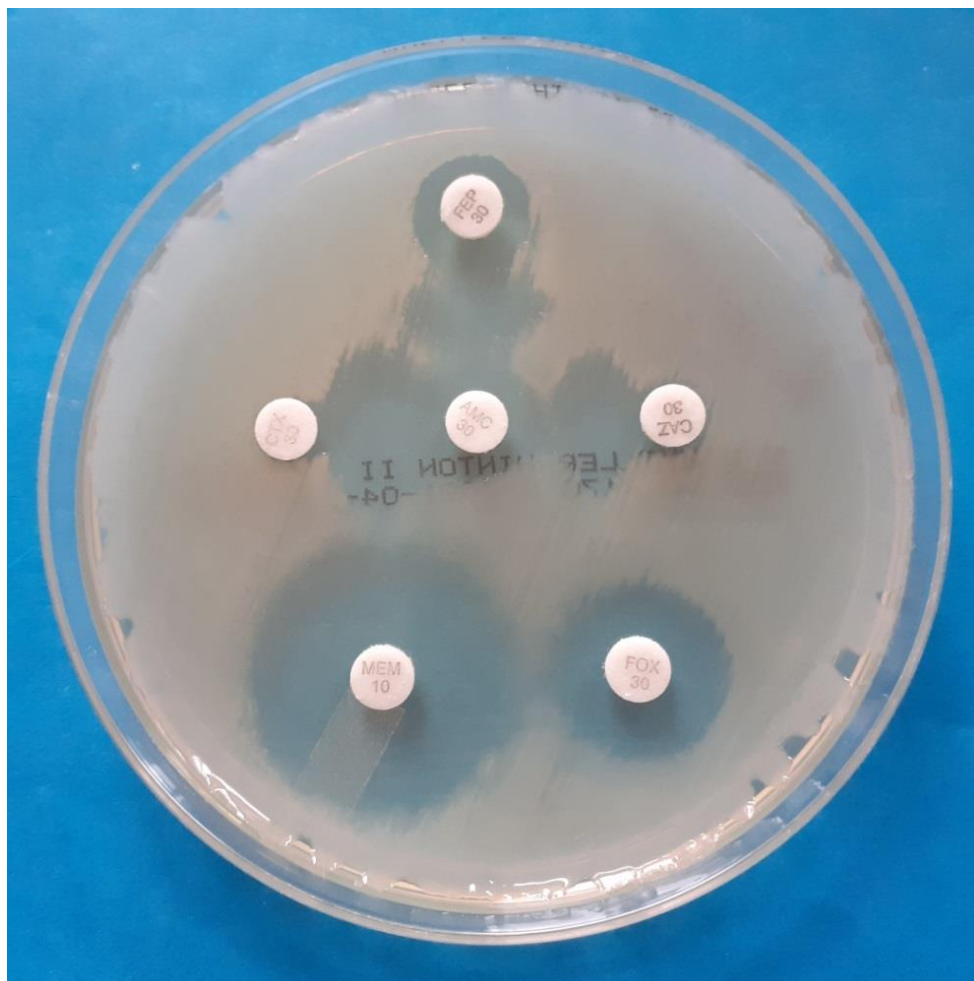
+ 48 (12) 433 27 43

kbet@cm-uj.krakow.pl

www.kbet.cm-uj.krakow.pl

**Załącznik nr 2** Przykładowe zdjęcie hodowli szczepu *Klebsiella pneumoniae* ESBL+ (A) oraz ESBL- (B) na podłożu Mueller-Hintona z nałożonymi krążkami nasączonymi antybiotykami: cefepim (FEP), amoksycylina z kwasem klawulanowym (AMC), cefotaksym (CTX), ceftazydym (CAZ), cefoksytyna (FOX, krążek wskaźnikowy dla identyfikacji oporności na cefalosporyny AmpC), meropenem (MEM, dla wstępnej identyfikacji oporności na karbapenemy).

A



B



**Załącznik nr 3** Przykładowe zdjęcie elektroforegramu produktów PCR genu adhezji *fimH* szczepów *Escherichia coli*, (82-518 – nieliniowe numery badanych próbek, K – kontrola pozytywna, M – marker masowy).

