

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Monika Pobiega

**Badania nad molekularną epidemiologią zakażeń
powodowanych przez oporne na antybiotyki pałeczki
z rodziny *Enterobacteriaceae* u noworodków z bardzo
małą masą urodzeniową.**

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Piotr B. Heczko

Pracę wykonano w Katedrze Mikrobiologii CM UJ
Kierownik jednostki: prof. dr hab. med. Małgorzata Bulanda

Kraków 2015

Składam serdeczne podziękowania:

*Panu prof. dr hab. med. Piotrowi Heczko
za opiekę naukową i gotowość do dzielenia się wiedzą,
Pani dr hab. Jadwidze Wójkowskiej-Mach,
dr Agnieszce Chmielarczyk oraz mgr Dorocie Romaniszyn
za pomoc i wsparcie,
mojej rodzinie
za siłę oraz motywację.*

**Badania finansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki
Nr 2011/01/D/NZ7/00104**

WYKAZ SKRÓTÓW

AAF	fimbrie agregacyjne, ang. <i>aggregative adherence fimbriae</i>
AHL	acetylowane pochodne laktonu homoseryny
APGAR	skala używana w medycynie do określenia stanu noworodka zaraz po porodzie
bp	para zasad, ang. <i>base pair</i>
BSI	zakażenie krwi, ang. <i>bloodstream infection</i>
CTX-M	pochodzenie skrótu od nazwy antybiotyku (cefotaksym) i miasta, w którym wyizolowano enzym pierwszy raz; ang. <i>Cefotaximase—Munich</i>
DDD	zdefiniowana dawka dzienna, ang. <i>defined daily dose</i>
DDST	test synergii dwóch krążków, ang. <i>double disc synergy test</i>
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
EAEC	enteroagregacyjne szczepy <i>E. coli</i> , ang. <i>enteroaggregative E. coli</i>
EDTA	kwasy (etylenodinitrylo)tetraoctowe, kwas etylenodiaminotetraoctowy
EHEC	enterokrwotoczne szczepy <i>E. coli</i> , ang. <i>enterohemorrhagic E. coli</i>
EIEC	enteroinwazyjne szczepy <i>E. coli</i> , ang. <i>enteroinvasive E. coli</i>
ELBW	ekstremalnie mała masa urodzeniowa (poniżej 1000 gramów) – ang. <i>extremely low birth weight</i>
EOI	zakażenia wczesne, ang. <i>early-onset infections</i>
EPEC	enteropatogenne szczepy <i>E. coli</i> , ang. <i>enteropathogenic E. coli</i>
ESBLs	β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania, ang. – <i>Extended-Spectrum B-Lactamases</i>
ETEC	enterotoksynogenne szczepy <i>E. coli</i> , ang. <i>enterotoxinogenic E. coli</i>
EUCAST	Europejski Komitet do spraw Lekowrażliwości i Chorób Zakaźnych, ang. <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility and Infectious Diseases</i>
ExPEC	<i>E. coli</i> wywołująca zakażenia pozajelitowe, ang. <i>extraintestinal pathogenic E. coli</i>
GES	nazwa enzymu pochodzi od nazwy państwa, w której został on opisany pierwszy raz, ang. <i>Guiana extended-spectrum β-lactamase</i>
GUS	Główny Urząd Statystyczny
KPC	karbapenemaza „ <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i> ”
LO-BSIs	późne zakażenie krwi, ang. <i>late-onset BSI</i>
LOI	zakażenie późne, ang. <i>late-onset infection</i>

LPS	lipopolisacharyd
MBL	metalo- β -laktamazy, ang. <i>metallo-β-lactamases</i>
MDR	wielolekooporność, ang. <i>multidrug resistance</i>
MIC	minimalne stężenie hamujące, ang. <i>minimal inhibitory concentration</i>
MLST	ang. <i>multilocus sequence typing</i>
NeoIT	Oddział Intensywnej Terapii Noworodkowej
OMPs	białka błony zewnętrznej, ang. <i>outer membrane proteins</i>
OR	iloraz szans, ang. <i>odds ratio</i>
OXA	pochodzenie skrótu od nazwy antybiotyku, który ten enzym hydrolizuje, ang. <i>hydrolysis of oxacillin</i>
PBP	białko wiążące penicylinę, ang. <i>penicillin binding protein</i>
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy, ang. <i>polymerase chain reaction</i>
PDR	całkowita oporność, ang. <i>pandrug resistance</i>
PER	nazwa enzymu pochodzi od gatunku bakterii, w którym został on opisany pierwszy raz, ang. <i>Pseudomonas extended resistance</i>
PFGE	elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym, ang. <i>pulsed-field gel electrophoresis</i>
PMQR	oporność na fluorochinolony kodowana plazmidowo, ang. <i>plasmid mediated quinolone resistance</i>
PRT	typowanie replikonów plazmidowych, ang. <i>plasmid replicon typing</i>
PSN	Polska Sieć Neonatologiczna
SHV	pochodzenie nazwy od właściwości biochemicznych, ang. <i>sulphhydryl variable</i>
ST	typ sekwencyjny, ang. <i>sequence type</i>
TEM	pochodzenie skrótu od nazwiska pacjenta (Temoniera)
UPEC	uropatogenne szczepy <i>Escherichia coli</i> , ang. <i>uropathogenic E. coli</i>
VEB	nazwa enzymu pochodzi od nazwy państwa, w której został on opisany pierwszy raz, ang. <i>Vietnam extended-spectrum β-lactamase (ESBLs)</i>
VLBW	bardzo mała masa urodzeniowa poniżej 1500 gramów – ang. <i>very-low birth weight</i>
VNTR	zmienna liczba tandemowych powtórzeń, ang. <i>variable number tandem repeat</i>
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia, ang. <i>Worlds Health Organization</i>
XDR	rozszerzona oporność, ang. <i>extensively drug resistance</i>

Spis treści

Wykaz skrótów

Spis treści	4
1 WPROWADZENIE	6
1.1 Charakterystyka bakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	6
1.1.1 <i>Escherichia coli</i>	8
1.1.2 Rodzaj <i>Klebsiella</i>	10
1.1.3 Rodzaj <i>Enterobacter</i>	11
1.1.4 <i>Morganella morganii</i>	12
1.1.5 Rodzaj <i>Serratia</i>	12
1.2 Charakterystyka zakażeń noworodków	13
1.3 Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki	18
1.4 Oporność na antybiotyki β -laktamowe	21
1.5 Oporność na fluorochinolony	24
1.6 Wybrane metody typowania bakterii	28
2 CEL PRACY	32
3 MATERIAŁ	34
3.1 Charakterystyka badanej populacji	34
3.2 Charakterystyka czynników etiologicznych zakażeń	36
4 METODY	39
4.1 Analiza epidemiologiczna	39
4.1.1 Określenie niezależnego wpływu poszczególnych czynników na zapadalność związaną z zakażeniami powodowanymi przez <i>Escherichia coli</i> w badanych grupach	40
4.2 Oznaczanie lekooporności metodami fenotypowymi	41
4.3 Izolacja DNA genomowego	42
4.4 Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) i elektroforeza	43
4.5 Reakcja Multiplex-PCR	44
4.6 Identyfikacja gatunkowa	45
4.7 Wykrywanie genów kodujących oporność na wybrane antybiotyki	46
4.8 Wykrywanie kodowanych plazmidowo genów oporności na fluorochinolony <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> , <i>qnrD</i> , <i>qnrC</i> , <i>qepA</i> i <i>aac-(6')-Ib-cr</i>	46
4.9 Procedura koniugacji	47
4.10 Określenie przynależności plazmidu wyizolowanego z danego szczepu bakteryjnego do grupy – typowanie replikonów plazmidowych	49
4.11 Analiza genetycznego podobieństwa pomiędzy szczepami	50
4.11.1 Typowanie badanych szczepów metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE)	50
4.11.2 Określenie podobieństwa genetycznego pomiędzy szczepami metodą Multilocus Sequence Typing (MLST)	52
4.12 Sekwencjonowanie	53
4.13 Charakterystyka szczepów <i>Escherichia coli</i>	54
4.13.1 Wykrywanie genów wirulencji <i>Escherichia coli</i>	54
4.13.2 Wykrywanie klonu epidemicznego <i>Escherichia coli</i> ST131	55
4.13.3 Klasyfikacja filogenetyczna szczepów <i>Escherichia coli</i>	55
4.13.4 Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym – PFGE	55
4.13.5 Multilocus Sequence Typing	56
4.14 Charakterystyka szczepów <i>Klebsiella pneumoniae</i>	57
4.14.1 Wykrywanie genów wirulencji <i>Klebsiella pneumoniae</i>	57

4.14.2	Określanie typu otoczki <i>Klebsiella pneumoniae</i>	57
4.14.3	Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym – PFGE.....	58
4.14.4	Multilocus Sequence Typing.....	58
4.14.5	Typowanie wybranych szczepów <i>Klebsiella pneumoniae</i> metodą zmiennej liczby tandemowych powtórzeń (VNTR)	59
4.15	Ocena udziału plazmidów niskocząsteczkowych w powstawaniu fenotypu ESBL-dodatniego	61
4.16	Charakterystyka szczepów <i>Klebsiella oxytoca</i>	64
4.16.1	<i>Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym – PFGE.</i>	64
4.17	Charakterystyka szczepów <i>Enterobacter</i> spp.	64
4.17.1	<i>Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym – PFGE.</i>	65
4.18	Charakterystyka szczepów <i>Serratia</i> spp.	65
4.18.1	<i>Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym – PFGE.</i>	65
4.19	Startery wykorzystane w badaniach.....	66
4.20	Wykorzystane oprogramowanie.....	71
5	Wyniki.....	72
5.1	Analiza epidemiologiczna.....	72
5.2	Zakażenia krwi.....	74
5.3	Charakterystyka szczepów <i>Escherichia coli</i>	80
5.3.1	Oporność badanych szczepów <i>Escherichia coli</i> na fluorochinolony.....	85
5.4	Charakterystyka szczepów <i>Klebsiella pneumoniae</i>	90
5.4.1	Oporność szczepów <i>Klebsiella pneumoniae</i> na fluorochinolony	94
5.4.2	Analiza epidemicznego klonu <i>Klebsiella pneumoniae</i>	95
5.4.3	Typowanie szczepów <i>Klebsiella pneumoniae</i> za pomocą metody zmiennej liczby tandemowych powtórzeń	97
5.5	Ocena udziału plazmidów niskocząsteczkowych w powstawaniu fenotypu ESBL-dodatniego pałeczek z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	98
5.6	Charakterystyka szczepów <i>Klebsiella oxytoca</i>	99
5.7	Charakterystyka szczepów <i>Enterobacter cloacae</i>	100
5.8	Charakterystyka szczepów <i>Serratia</i> spp.	103
6	Dyskusja.....	104
6.1	Analiza epidemiologiczna.....	104
6.2	Zakażenia krwi.....	106
6.3	Charakterystyka szczepów <i>Escherichia coli</i>	108
6.4	Charakterystyka szczepów <i>Klebsiella pneumoniae</i>	111
6.5	Charakterystyka pozostałych szczepów	114
7	Podsumowanie	116
8	Wnioski	117
9	Streszczenie.....	119
10	Summary	120
11	Wykaz tabel i rycin	121
11.1	Wykaz rycin	121
11.2	Wykaz tabel.....	121
12	Bibliografia	123

1 WPROWADZENIE

1.1 Charakterystyka bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*

Pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* należą do bakterii Gram-ujemnych, perytrychalnie urzęsionych (rodzaje *Klebsiella* i *Shigella* nie wytwarzają rzęsek). Dają się hodować na prostych podłożach sztucznych, rosnąc zarówno w warunkach beztlenowych, jak i tlenowych. Optymalny wzrost uzyskuje się po około 24 h inkubacji w temperaturze 20-30°C dla bakterii izolowanych ze środowiska nieożywionego i w 37°C dla tych, które pochodzą z organizmów żywych. Energię uzyskują w procesie oddychania tlenowego lub na drodze beztlenowej fermentacji, rozkładając cukry do alkoholi [1]. Procesy fermentacyjne prowadzone przez bakterie fakultatywnie tlenowe generują dużą liczbę związków, a wśród produktów przeważają kwasy organiczne. Większość z przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae* ma zdolność do tworzenia sideroforów, dzięki którym przechwytyują jony żelaza od transferryny gospodarza [1]. Zdecydowana większość bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae* jest składnikami naturalnej flory (mikrobiomu) człowieka, występując szczególnie licznie w obrębie jelita grubego. Spotkać je można także w środowisku nieożywionym, gdzie wybierają ciepłe i wilgotne miejsca. W niewielkich liczbach występują także na skórze i w nosogardzieli. Wszyscy przedstawiciele rodziny *Enterobacteriaceae* mają w ścianie komórkowej lipopolisacharyd (LPS), czyli endotoksynę [2]. Przy pomocy specyficznych przeciwciał można wykrywać antygeny znajdujące się na powierzchni komórki. Klasyfikacja serologiczna pałeczek *Enterobacteriaceae* oparta jest na antygenie somatycznym O, otoczkowym K oraz rzęskowym H [2].

Wyróżnia się kilkanaście rodzajów czynników determinujących chorobotwórczość bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*:

- LPS, czyli endotoksyna – zbudowana z immunogennej rdzenia cukrowego (specyficznego dla szczepu), antygeny O (również cukrowego) i lipidu A, który jest najbardziej konserwatywną częścią LPS [1, 3];

- egzotoksyny – pojedyncze białka lub kompleksy białek, które po związaniu się z receptorami komórek eukariotycznych prowadzą do ich uszkodzenia [1]. Należą do nich m. in. enterotoksyny, produkowane przez *Escherichia coli*, werotoksyny czy toksyny Shiga;
- czynniki adhezyjne, takie jak fimbrie (pilusy) adherencyjne i płciowe itp., które odgrywają dużą rolę w przyleganiu bakterii do komórek oraz w procesie koniugacji [1, 3];
- otoczki – to bakteryjne egzopolimery związane ze strukturami powierzchniowymi komórki bakteryjnej. U *Enterobacteriaceae* zbudowane są z polisacharydów. Indukują one odpowiedź humoralną w organizmie gospodarza. Ze względu na właściwości serologiczne noszą nazwę antygeny K. Chronią one komórki bakteryjne przed działaniem środowiska, utrudniają penetrację niektórych antybiotyków, a także mają udział w patogenezie (chronią przed fagocytozą, przyłączeniem przeciwciał, wspomagają adhezję do nabłonka i sztucznych powierzchni, takich jak protezy czy cewniki);
- rzęski – zbudowane z włókna, haczyka i ciała bazalnego. Włókno cechuje się immunogennością i jest nazywane antygenem H, haczyk łączy włókno z ciałkiem bazalnym, a ciało bazalne zakotwicza rzęskę w ścianie komórkowej i błonie cytoplazmatycznej. Rzęski są aparatem ruchu wielu bakterii [1, 3].

Tylko niektóre z pałeczek *Enterobacteriaceae* są pierwotnie patogenne oraz powodują zakażenia żołądkowo-jelitowe (np. rodzaje *Shigella* czy *Salmonella*). Zdecydowana większość z nich jest drobnoustrojami oportunistycznymi, należącymi do flory fizjologicznej (mikrobiomu) organizmu, ale powodującymi zakażenia u osób o osłabionej odporności (np. z naruszoną ciągłością skóry, błon śluzowych, czy też hospitalizowanych) [1, 4]. Do najważniejszych przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae* z punktu widzenia poniższej rozprawy należą gatunki *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* i bakterie z rodzaju *Klebsiella* oraz *Enterobacter*.

1.1.1 *Escherichia coli*

Pałeczki *Escherichia coli* stanowią fizjologiczną florę (składnik mikrobioty) jelita grubego. Powszechnie występują w środowisku. Bakterie tego gatunku są względnie beztlenowe, niesporujące i szybko rosnące. Cechują się dużą ruchliwością (posiadają rzęski). Fermentują laktozę, dobrze tolerują środowisko kwaśne [1].

W obrębie gatunku wyróżnić można kilka wiro(pato)typów:

- ETEC – szczepy enterotoksynogenne, wywołujące zakażenia przewodu pokarmowego, najczęściej u osób podróżujących. Wytwarzają enterotoksyny ciepłolabilne i ciepłostabilne, a także adhezyny (antygeny CFA).
- EHEC – szczepy enterokrwotoczne, adherujące do nabłonka jelita grubego, syntetyzują cytotoksyny (*Shiga-like toxins*, werotoksyny). Związane są z krwawymi biegunkami, które mogą być powikłane zespołem hemolityczno-mocznicowym, czy plamicą zakrzepową.
- EAEC – enteroagregacyjne szczepy *E. coli*, odpowiedzialne za przewlekłe biegunki (szczególnie u niemowląt i dzieci). Adherują do nabłonka za pomocą fimbrii agregacyjnych AAF (ang. *aggregative adherence fimbriae*). Mogą syntetyzować ciepłostalą enterotoksynę oraz hemolizynę.
- EPEC – szczepy enteropatogenne, odpowiedzialne za biegunki u niemowląt. Ich adhezja do nabłonka uwarunkowana jest produkcją fimbrii i intiminy. Nie produkują żadnych enterotoksyn.
- EIEC – szczepy enteroinwazyjne, wywołujące zakażenia przypominające czerwonkę. Nie fermentują laktozy i nie posiadają rzęsek.

Populacja *E. coli* została podzielona na cztery główne grupy filogenetyczne (A, B1, B2 i D) [5]. Szczepy *E. coli* wywołujące zakażenia pozajelitowe (ang. *extraintestinal E. coli*, ExPEC) należą najczęściej do grupy B2, rzadziej D, zaś komensalne jelitowe *E. coli* – do grup A i B1. Czynniki wirulencji u szczepów *E. coli* są badane i charakteryzowane od wielu lat. Należą do nich zarówno białka biorące udział w adhezji i inwazji szczepów bakteryjnych do komórek, białka biorące udział w transporcie żelaza, enzymy i toksyny. Wśród adhezyn wyróżnia się trzy główne grupy: fimbrie, rodzinę czynników nefimbriowych (Afa) i białka błony zewnętrznej (ang. *outer membrane proteins*, OMPs) [6]. Wśród białek fimbrialnych wyróżniamy

następujące typy: 1, P, S, oraz Dr [7, 8]. Poszczególne czynniki wirulencji mają związek z miejscem izolacji patogenu, a właściwie z formą zakażenia. Niektóre, takie jak *ibeA*, są typowe dla izolatów pochodzących z zakażeń krwi. Białko IbeA wchodzi w interakcję z białkiem na powierzchni komórek śródbłónka naczyń włosowatych mózgu i może sprzyjać inwazji patogenu do układu nerwowego [9]. Dwa inne geny, *hly* oraz *sfa*, także częściej występują u izolatów pochodzących z zakażeń krwi [10]. Do hemolizyn należy np. *hlyA*, odpowiedzialna za wiązanie i lizę erytrocytów. Uropatogenne szczepy *E. coli* (ang. *uropathogenic E. coli*, UPEC) cechuje często obecność fimbrii typu P, warunkujących powinowactwo tych pałeczek do białek występujących na powierzchni nabłonka wyściełającego drogi moczowe organizmu gospodarza [11]. Fimbrie S i F1C, kodowane przez geny *sfa/foc*, też częściej występują w izolatach wywołujących zakażenia dróg moczowych [11]. Gen *papC*, kodujący pilusy płciowe P, występuje częściej w izolatach pochodzących z zakażeń dróg moczowych, gdyż produkt tego genu jest użyteczny w przypadku adhezji do nabłonka dróg moczowych. Często wykrywaną adhezyną u szczepów UPEC jest Iha, pełniącą funkcję receptora dla katecholowych sideroforów. Stwierdzono, że obecność białka Iha w danym szczepie predysponuje do nawrotowych infekcji układu moczowego [12]. Geny związane z metabolizmem żelaza są obecne u *E. coli* izolowanych z różnych miejsc, gdyż sprzyjają one przeżywaniu bakterii zarówno we krwi, jak i drogach moczowych czy oddechowych [13, 14]. Należą do nich m. in. receptor yersiniobaktyny *fyuA* oraz receptory aerobaktyny *iucA* i *iucC*. Ponad połowa szczepów izolowanych z pochwy cechuje się ekspresją antygeny K1, którego obecność związana jest z sepsą u noworodków [15, 16]. Antygen otoczkowy K1 związany jest z obecnością genu *neuC*.

Bakterie *Escherichia coli*, szczególnie te wywołujące zakażenia pozajelitowe, rozwinęły mechanizmy oporności na każdy stosowany w lecznictwie antybiotyk. Światowe dane sugerują, że problem narastającej oporności *E. coli* związany jest z globalnym sukcesem klonu epidemicznego ST131. Bakterie reprezentujące ten klon należą do grupy filogenetycznej B2, do której zaliczamy zarówno szczepy odpowiedzialne za zakażenia pozajelitowe, jak i szczepy komensalne, izolowane z kału [17, 18]. Badania prowadzone w różnych ośrodkach na świecie wykazały także, że klon ST131 jest wysoce wiruletny [19-21], a także koduje liczne geny oporności na antybiotyki, m. in. fluorochinolony oraz leki z grupy β -laktamów [22]. Szczepy te charakteryzują się obecnością plazmidów, najczęściej należących do grupy niekompatybilności IncF [23]. Dodatkowo, badania wskazują na fakt wysokiej

zdolności przenoszenia klonu ST131 w obrębie gospodarstw domowych czy pomiędzy pacjentami tego samego szpitala, co ma wpływ na szybkie rozprzestrzenianie i globalny sukces klonu ST131 [24-26].

1.1.2 Rodzaj *Klebsiella*

Rodzaj *Klebsiella* reprezentowany jest przez bakterie nieruchliwe, z wydatną otoczką polisacharydową, zapewniającą ochronę przed mechanizmami obronnymi gospodarza. Potrafią one korzystać z wielu źródeł węgla, fermentują laktozę, glukozę, ale potrafią, wykorzystując także kwas malonowy i cytrynian sodu.

Klebsiella sp. występuje w środowisku nieożywionym; można spotkać ją w ściekach, glebie i wodzie, jak również jest obecna na powierzchniach błon śluzowych ssaków [27]. Najbardziej znanym przedstawicielem tego rodzaju jest gatunek *Klebsiella pneumoniae*, mogący wywołać m.in. zapalenie płuc. Czynniki determinującymi chorobotwórczość *K. pneumoniae* są otoczki, adhezyny fimbriowe oraz toksyny. Najważniejszym czynnikiem wirulencji *K. pneumoniae* jest otoczka. Stwierdzono, że szczepy posiadające otoczkę są dużo bardziej wirulentne od szczepów niewytwarzających otoczki [28, 29]. Otoczka bierze udział w adhezji *K. pneumoniae* do komórek gospodarza [28, 29]. Szczepy, w zależności od typu otoczki, różnią się między sobą zjadliwością: szczepy z antygenem K1, K2 lub K4 uważane są za dużo bardziej wirulentne od szczepów z antygenem K7 czy K21 [30]. Do czynników wirulencji możemy zaliczyć także produkt genu *rmpA* (regulator syntezy polisacharydów otoczkowych) oraz genu *uge* (kodującego enzym zaangażowany w syntezę otoczki), a także podobnie jak w przypadku *E. coli* – systemy transportu żelaza, np. obecność białka aerobaktyny lub enterocholiny [31, 32].

U *K. pneumoniae* opisano trzy rodzaje fimbrii i dwa rodzaje białek niefimbrialnych. Wśród fimbrii wyróżnia się: fimbrie typu 1, warunkujące adhezję do komórek nabłonka tchawicy, płuc czy dróg moczowych; fimbrie typu 3, warunkujące adhezję do komórek nabłonka dróg moczowych/uroepitelium, komórek nabłonkowych dróg oddechowych oraz komórek śródbłonkowych, oraz fimbrie typu KPF28, wiążące do nabłonka jelitowego [30, 33]. Niefimbrialne białko adhezyjne CF29K warunkuje przyleganie pałeczek *Klebsiella* sp. do nabłonka jelit, zaś adhezyny P-like, współwystępujące z fimbriami typu 1 i 3, posiadają właściwości

hemaglutynujące i warunkują adhezję do nabłonka dróg moczowych [33, 34]. Bakterie w obrębie rodzaju *Klebsiella* mogą być zdolne do produkcji enzymów pozakomórkowych, takich jak: ureaza, DNaza, lecytynazy, kwaśna fosfataza czy lipaza. Enzymy te warunkują degradację związków organicznych, budujących komórki gospodarza i są istotne w procesie zakażenia. Zdolność do produkcji ureazy pozwala na gromadzenie amoniaku i podwyższanie pH moczu w organizmie gospodarza [35]. Lipazy rozkładają lipidy w błonie komórkowej np. komórek naskórka, przyczyniając się do kolonizacji skóry przez *Klebsiella* sp. DNaza niszczy materiał genetyczny komórek gospodarza, co zaburza ich funkcjonowanie. Lecytynaza rozkłada fosfatydylocholinę i jest istotnym czynnikiem wirulencji w zapaleniach płuc [36]. Z adhezją komórek do podłoża związana jest także hydrofobowość powierzchni komórki. Szczepy hydrofobowe adherują lepiej niż szczepy hydrofilowe, ale właściwości te mogą zależeć od warunków panujących w otoczeniu (skład pożywki, temperatura, gęstość zawiesiny komórkowej) [37]. W przypadku *K. pneumoniae* ważną rolę odgrywają też czynniki zaangażowane w produkcję śluzowej otoczki, takie jak regulator syntezy polisacharydu otoczki zewnętrznej (gen *rmpA*).

1.1.3 Rodzaj *Enterobacter*

Bakterie należące do rodzaju *Enterobacter* zdolne są do fermentacji laktozy; są oksydazo-ujemne i ureazo-zmienne, zdolne do wzrostu w obecności soli żółci. Są względnie beztlenowcami. Najbardziej znanymi przedstawicielami tego rodzaju są *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* i *Enterobacter sakazakii*, należące do grupy patogenów oportunistycznych. Zakażenia przez nie wywołane mają często charakter endogenne i są efektem wcześniejszej kolonizacji tymi patogenami [38]. Pałeczki te występują powszechnie w środowisku, stanowią składnik mikrobiomu zdrowych ludzi [39, 40]. W środowisku szpitalnym kontaminują zlewy, nawilżacze powietrza oraz aparaturę podtrzymującą oddychanie [41]. W ich budowie antygenowej wyróżnia się antygen O-somatyczny i antygen H-rzęskowy. Niektóre szczepy mogą także posiadać antygen otoczkowy K [42]. Ważnymi czynnikami wirulencji są LPS oraz otoczka polisacharydowa. U większości pałeczek *Enterobacter* występują fimbrie typu I [39]. Niektóre szczepy mogą wytwarzać toksynę termolabilną, termostabilną

albo *Shiga-like* [39, 43]. Pałeczki *Enterobacter* zdolne są także do wytwarzania bakteriocyn i sideroforów [39, 44].

1.1.4 *Morganella morganii*

Pałeczki należące do gatunku *Morganella morganii* występują powszechnie w przyrodzie. Ich rezerwuarem jest woda i gleba [45, 46]. Zdarza się, że stanowią składnik mikrobioty przewodu pokarmowego ssaków [47]. Należą one do względnych beztlenowców, są niesporujące i nieotoczkujące. Mają zdolność syntezy katalazy i indolu. Cechują się metabolizmem fermentacyjnym, lecz nie fermentują laktozy. Mogą rosnąć w obecności cyjanku potasu, a także 8,5–9,0% chlorku sodu. Najważniejszym czynnikiem wirulencji *M. morganii* jest LPS. Kolejnym czynnikiem zjadliwości jest zdolność do wytwarzania ureazy [48], która alkalizując mocz ułatwia rozwój zakażenia dróg moczowych. Pałeczki te mają także zdolność syntezy hemolizyny, która lizuje błony komórkowe składników morfotycznych krwi [49] oraz zdolność produkcji licznych bakteriocyn [50]. Wytwarzają fimbrie typu 3, które umożliwiają im adhezję do różnych powierzchni. Jako drobnoustroje oportunistyczne rzadko wywołują zakażenia u zdrowych ludzi, jednak mogą być przyczyną śmiertelnych zakażeń szpitalnych u osób z obniżoną odpornością.

1.1.5 Rodzaj *Serratia*

Większość pałeczek z rodzaju *Serratia* ma podobne właściwości biochemiczne: są względnymi beztlenowcami, cechuje je zdolność ruchu przy pomocy wici, mają niewielkie wymagania pokarmowe, rosną w szerokim zakresie temperatur (10-37°C), fermentują glukozę i wytwarzają katalazę. Pałeczki *Serratia marcescens*, najbardziej znany przedstawiciel rodzaju, zdolne są do syntezy czerwonego pigmentu, prodigiozyny, która odgrywa rolę w procesie oddychania. Wśród czynników wirulencji wyróżnić można takie, które biorą udział w mechanizmie *quorum sensing*, czyli cząsteczki AHL (acetylowane pochodne laktonu homoseryny) [51]. Bakterie te adherują do powierzchni dzięki obecności fimbrii i białek zewnątrz błonowych [52]. Lipid A, będący elementem budującym LPS, bierze udział w inicjacji zapalenia płuc

[53]. Ponadto, szczepy *Serratia* sp. zdolne są do produkcji licznych enzymów zewnątrzkomórkowych, np. nukleaz, chitynaz, żelatynaz, proteinaz czy hemolizyn [52]. Pałeczki *Serratia*, jako patogeny oportunistyczne, zdolne są do wywoływania zakażeń u ludzi o obniżonej odporności. Światowe doniesienia koncentrują się głównie na przypadkach zakażeń, które są konsekwencją nieprzestrzegania zasad kontroli zakażeń [54].

1.2 Charakterystyka zakażeń noworodków

Zakażenia w okresie noworodkowym są, poza wadami wrodzonymi i stanami niedotlenienia okołoporodowego, najważniejszymi przyczynami zachorowalności i śmiertelności noworodków. Zdecydowana większość tych zakażeń jest klasyfikowana jako zakażenia szpitalne, zarówno przyjmując kryteria nowoczesnej epidemiologii szpitalnej, jak i stosując tradycyjny podział na zakażenia wczesne [ang. *early onset*] (w domyśle pozaszpitalne) i późne [ang. *late onset*] (w domyśle szpitalne). Dla potrzeb tej rozprawy przyjęto, że zakażenie szpitalne jest to rozpoznane klinicznie zakażenie, które powstaje podczas pobytu w szpitalu (lub w związku z nim) lub jest zakażeniem wynikającym z pasażu noworodka przez kanał porodowy [55-57].

Zakażenia noworodków, szczególnie tych o bardzo małej (poniżej 1500 g, ang. *very-low birth weight*, VLBW) i ekstremalnie małej (poniżej 1000 g, ang. *extremely low birth weight*, ELBW) masie urodzeniowej, pozostają jednym ze znaczących problemów współczesnej medycyny. Jednym z powodów jest wzrastająca liczba porodów przedwczesnych. Z danych Głównego Urzędu Statystycznego (GUS) wynika, że w Polsce w latach 2011 i 2012 liczba porodów przed planowanym terminem wynosiła odpowiednio 26 278 i 27 575, w tym przed 28 tygodniem ciąży – odpowiednio 1 748 i 1 731 [58, 59]. Choć z każdym rokiem rodzi się coraz mniej dzieci, to proporcja dzieci urodzonych przed czasem w Polsce utrzymuje się na stałym poziomie ok. 7% wszystkich urodzeń [58, 59]. Ogółem w Polsce co roku rodzi się co roku około 4 000 noworodków należących do grup VLBW i ELBW, co stanowi około 1% wszystkich żywych urodzeń. Dzieci najmniejsze z masą urodzeniową <600 g stanowią około 10%, kolejne 40% to noworodki z masą urodzeniową 600-999 g, pozostałe 50% zaś to dzieci z masą urodzeniową 1000-1499 g. Dzieci te pochodzą zarówno z ciąż pojedynczych, jak i mnogich [58, 59].

Przeżywalność noworodków o bardzo małej i ekstremalnie małej masie w nowoczesnych i dobrze przygotowanych do ratowania życia i leczenia oddziałach intensywnej terapii neonatologicznej, pośrednio wiąże się z ryzykiem wystąpienia zakażenia zarówno wczesnego (ang. *early-onset infections*, EOI), jak i późnego (ang. *late-onset infections*, LOI). W Polsce umieralność ogólna noworodków przed 28 dniem życia wynosi 3/1000 żywych urodzeń. A zatem, pomimo poprawy opieki medycznej, zarówno nad kobietą ciężarną, jak i noworodkiem, obserwuje się stały odsetek zgonów płodów i noworodków. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO), umieralność noworodków na świecie związana jest głównie z zakażeniami (36% wszystkich zgonów), takimi jak: zakażenie uogólnione – sepsa, zapalenie płuc, tęzec oraz biegunki, ale także z przedwczesnym urodzeniem (28%) i zamartwicą (23%). (http://www.who.int/gho/child_health/mortality/neonatal/en/ dostęp: 20.12.2014). Dane te różnią się pomiędzy krajami, a umieralność powiązana jest z jakością opieki sprawowanej nad kobietą ciężarną i noworodkami. Ryzyko śmierci noworodka z grupy VLBW jest wyższe niż noworodka urodzonego o czasie, o czym mówią dane literaturowe: ryzyko zgonu noworodków z grup VLBW i EBLW jest nawet do 200 razy większe [60]. W wieloośrodkowych badaniach Stoll *et al.* umieralność takich dzieci wyniosła 37% [61]. Ważnym czynnikiem ryzyka rozwoju zakażeń noworodków jest masa urodzeniowa – noworodki z ELBW charakteryzują się nawet 44 razy większym ryzykiem wystąpienia zakażenia [60]. Zwiększone ryzyko wystąpienia zakażeń związane jest także z obecnością szeregu czynników predysponujących. Jednym z nich jest niedojrzałość układu immunologicznego i mechanicznych barier ochronnych organizmu: skóry i błon śluzowych ciała oraz brak prawidłowej mikrobioty. Mikrobiota powierzchni ciała dorosłego człowieka stanowi pierwotną barierę ochronną, która ogranicza możliwość przeniknięcia do ustroju innych, potencjalnie patogennych drobnoustrojów. Nowonarodzone dzieci cechuje brak tej mikrobioty. Podczas porodu dochodzi do kolonizacji przebywającego dotychczas w sterylnym środowisku noworodka drobnoustrojami z pochwy, zaś w okresie poporodowym drobnoustrojami ze skóry matki oraz z otoczenia. Zdrowe noworodki ulegają kolonizacji pałeczkami kwasu mlekowego oraz innymi drobnoustrojami obecnymi na skórze i błonach śluzowych matki. Natomiast noworodki przebywające na NeoIT, urodzone najczęściej drogą cesarskiego cięcia, ulegają kolonizacji przez mikroorganizmy obecne w środowisku szpitalnym. W przypadku hospitalizacji noworodka w NeoIT, proces nabywania mikrobioty przewodu pokarmowego i skóry jest zatem zaburzony, gdyż

odbywa się z udziałem szczepów szpitalnych. Takie szczepy charakteryzuje nierzadko wysoka zjadliwość i oporność na liczne leki przeciwdrobnoustrojowe [62-64]. Co więcej, nie do końca wykształcony system immunologiczny nie zapewnia w pełni czynnej obrony przed patogenami [65], a odziedziczone od matki przeciwciała klasy IgG zanikają szybciej, niż u donoszonego noworodka [66]. U noworodków mniejsza jest także rezerwa szpikowa prekursorów granulocytów, obniżona jest aktywność poszczególnych składników dopełniacza, a zdolność do syntezy immunoglobulin jest niższa [67]. Podatność na zakażenia nasilają również niedobory odporności nieswoistej, takie jak np. zwiększona przepuszczalność bariery skórnej, która jest związana z jej niedojrzałością i brakiem mazi płodowej, słabo wykształconą warstwą rogową oraz brakiem warstwy lipidowej. Nieobniżone pH skóry także sprzyja nieprawidłowej kolonizacji skóry, a przede wszystkim wytworzeniu bariery z powodu niedoboru białek niezbędnych do wytworzenia połączeń ścisłych. Długa hospitalizacja oraz stosowanie wielu inwazyjnych zabiegów diagnostycznych czy leczniczych, takich jak cewnikowanie naczyń, mechaniczna wentylacja czy żywienie pozajelitowe, także mają związek ze zwiększonym ryzykiem zakażenia oraz śmierci [68].

Zakażenia krwi (ang. *bloodstream infections*, BSI) są najczęstszą postacią zakażeń u noworodków i wiążą się ze zwiększoną śmiertelnością [61, 69, 70]. Zachorowalność na zakażenia krwi waha się od 1 do 8 na 1000 żywych urodzeń, a wskaźnik ten jest wyższy w grupie noworodków o małej masie urodzeniowej [71]. Zakażenia wczesne, które pojawiają się do 72 h po urodzeniu, są zwykle związane z patogenami pochodzenia matczynego, wśród których dominują paciorkowce z grupy B [69, 72]. Zakażenia wczesne zdarzają się rzadziej niż zakażenia późne, a zapadalność w ciągu pierwszych trzech dni życia w grupie noworodków VLBW szacuje się na ok. 1,5-2,7%, jednak te zakażenia cechuje wysoka śmiertelność (26-36%) [61, 73]. W badaniach prowadzonych przez Sohna *et al.* stwierdzono, że u 11,4% noworodków hospitalizowanych na oddziale intensywnej terapii noworodka (NeoIT) wystąpiły objawy zakażeń, najczęściej zaś diagnozowano zakażenia krwi (53%) i zapalenia płuc (13%) [74]. W Polsce zakażenia krwi są przyczyną 3,6% wszystkich zgonów noworodków bez względu na masę urodzeniową [75, 76]. Czynniki ryzyka obejmują m.in. stan matki w trakcie lub przed porodem, niski wiek ciążowy, przedwczesne pęknięcie błon płodowych, brak odpowiedniej opieki przed porodem, stan przedrzucawkowy i zapalenie błon płodowych [61, 77]. Pomimo dominacji bakterii Gram-dodatnich w zakażeniach wczesnych, odnotowuje się coraz więcej przypadków

zakażeń wczesnych, których czynnikiem etiologicznym są Gram-ujemne pałeczki *Enterobacteriaceae* [61, 77-79]. W badaniach Ronnestada *et al.* *E. coli* stanowiła czynnik etiologiczny 9 na 14 zakażeń krwi, które zaczęły się w pierwszym dniu życia noworodka [77].

Noworodki, szczególnie z grup VLBW i ELBW, cechują się również zwiększonym ryzykiem późnych zakażeń krwi. Czynniki ryzyka LO-BSI obejmują niedojrzałość, przedłużony pobyt w szpitalu oraz stosowanie procedur inwazyjnych [80]. Wpływ na ryzyko rozwoju zakażenia ma także transmisja drobnoustrojów wewnątrz oddziału szpitalnego, która odbywa się najczęściej na rękach personelu medycznego. Wśród czynników etiologicznych LO-BSI dominują gronkowce koagulazo-ujemne, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Klebsiella* spp. i inne [69, 72]. W badaniach Grahama *et al.* na temat późnych przypadków zakażeń krwi zachorowalność związana z pałeczkami Gram-ujemnymi wyniosła 16,9% [81]. W przypadkach LO-BSI, *E. coli* może także pochodzić od matki lub ze środowiska albo dostać się do krwioobiegu poprzez układ moczowo-płciowy lub układ pokarmowy (translokacja bakterii z przewodu pokarmowego) [82, 83]. Różne badania pokazują wysoki odsetek transmisji *E. coli* pomiędzy matkami mającymi kontakt ze środowiskiem szpitalnym i z noworodkiem [84, 85]. Dane zebrane przez European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) wskazują, że w latach 2002-2009 zanotowano znaczny wzrost udziału pałeczek *E. coli* w zakażeniach krwi w stosunku do *S. aureus* [86]. Ryzyko śmierci noworodka z VLBW, u którego rozpoznano zakażenie związane z pałeczkami Gram-ujemnymi, jest znacznie wyższe niż w przypadku zakażeń związanych z innymi drobnoustrojami [69]. Bardzo późne zakażenia krwi (ang. *very late-onset sepsis*, VLOS) [71] diagnozowane są najczęściej u noworodków z grupy ELBW, hospitalizowanych wiele miesięcy po porodzie [80].

Pośród pałeczek *Enterobacteriaceae*, jedną z najczęstszych przyczyn zakażeń dróg moczowych, jest *E. coli*. Pałeczka ta jest także istotnym czynnikiem etiologicznym zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków. Nie tylko oporność na chemioterapeutyki, ale i wirulencja poszczególnych szczepów, może przyczynić się do niepowodzenia terapeutycznego zakażeń związanych z *E. coli*. Wśród czynników ryzyka zakażeń spowodowanych przez *E. coli* wskazuje się: długość hospitalizacji, wiek ciążowy, niską punktację w skali Apgar w 1 i 5 min., a także przedwczesne pęknięcie błon płodowych [87, 88]. Skala Apgar służy do oceny stanu noworodka w momencie urodzenia. Została wprowadzona do medycyny w 1953 roku przez

Virginię Apgar. Dziecko oceniane jest w pięciu kategoriach (kolor skóry, puls/minutę, reakcja na bodźce, napięcie mięśniowe, oddychanie), w każdej może dostać od 0 do 2 punktów. Dziecko minimalnie może dostać 0, a maksymalnie 10 punktów.

Wyniki badań wskazują także, że rezerwuarem *E. coli* może być też skolonizowana przez ten patogen matka, co przekłada się na wyższe ryzyko infekcji u noworodka, szczególnie urodzonego przedwcześnie [89]. Potwierdzeniem tych obserwacji są wyniki otrzymane m. in. w trakcie analiz prowadzonych w tym przewodzie doktorskim. Wyniki te, z uwagi na ich interesujący charakter, zostały opublikowane [90].

W ostatnich latach obserwuje się zwiększenie częstości występowania zakażeń wywołanych przez pałeczki *Serratia* sp. na oddziałach neonatologicznych i pediatrycznych. Dane światowe wskazują, że te bakterie są odpowiedzialne za 5-16% wszystkich zakażeń noworodków [91, 92]. W Polsce sytuacja wygląda odmiennie: według szacunkowych danych uzyskanych z warszawskich szpitali pediatrycznych, bakterie z rodzaju *Serratia* izolowane są stosunkowo rzadko, ale wysoka jest częstość izolacji szczepów zdolnych do produkcji β -laktamaz [52][93, 94]. Jednak wysoka śmiertelność związana z zakażeniami powodowanymi przez *Serratia* sp., sięgająca nawet 50%, wskazuje na potrzebę stałego monitorowania zakażeń o tej etiologii [95].

Zakażenia u noworodków związane z pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae* powodują nie tylko wzrost śmiertelności, lecz także zwiększone zużycie antybiotyków. Pociąga to za sobą wydłużenie czasu hospitalizacji i wzrost kosztów leczenia. Według Krawczyk-Wyrwickiej *et al.* koszt intensywnej opieki nad noworodkiem przedwcześnie urodzonym może wynieść nawet 91 000 zł (dane za lata 2004/2005), a średni koszt hospitalizacji noworodka urodzonego w 28 tygodniu ciąży to ok. 26 000 zł [96]. Według Payne'a *et al.*, każde zakażenie, któremu udało się zapobiec, pozwala na obniżenie kosztu hospitalizacji z około 13 000 do 5 000 dolarów [97].

Jednym z najważniejszych elementów pracy oddziału neonatologicznego jest kontrola zakażeń, w Polsce wymagana prawem [98]. Około 20% zakażeń późnych można zapobiec dzięki efektywnej kontroli zakażeń [99]. Żeby efektywnie prowadzić nadzór nad zakażeniami, należy szczegółowo znać czynniki ryzyka zakażeń. Dużo uwagi poświęca się ostatnio polityce antybiotykowej na oddziałach szpitalnych, w tym neonatologicznych. Zakażenia u noworodka rozwijają się szybko, stąd konieczność szybkiej reakcji i konieczność stosowania terapii empirycznej wobec braku czasu na pełną diagnostykę mikrobiologiczną. Z drugiej strony terapia empiryczna

i stosowanie leków o szerokim zakresie działania wiąże się z ryzykiem pojawienia się szczepów bakterii opornych na wiele antybiotyków. Niewłaściwe stosowanie antybiotyków jest głównym powodem narastającego w ostatnim czasie zjawiska lekooporności, co może prowadzić do niepowodzenia terapeutycznego i wzrostu śmiertelności [100, 101]. Analiza i interpretacja danych o czynnikach etiologicznych zakażeń szpitalnych, ustalenie oporności na antybiotyki i leki przeciwdrobnoustrojowe wraz z podaniem mechanizmu ją warunkującego, pozwala na prowadzenie w oddziale racjonalnej polityki antybiotykowej, co ułatwia skuteczną terapię – skraca ją i powoduje obniżenie kosztów farmakoterapii.

1.3 Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki

Jedną z przyczyn, z powodu których pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* są tak istotne w epidemiologii zakażeń, jest ich częsta oporność na liczne leki przeciwbakteryjne, która pozwala im przetrwać nawet intensywną antybiotykoterapię. Odkrycie i wprowadzenie do powszechnego użycia antybiotyków umożliwiło walkę z chorobami bakteryjnymi. Pierwsze antybiotyki, takie jak penicylina czy streptomycyna, wyizolowane zostały z żywych mikroorganizmów. Obecnie coraz częściej leki przeciwdrobnoustrojowe pozyskiwane są na drodze chemicznej syntezy i nazywane chemioterapeutykami przeciwdrobnoustrojowymi (np. nowe glikopeptydy i fluorochinolony). Podstawowa klasyfikacja leków przeciwdrobnoustrojowych dzieli je na leki bakteriostatyczne (hamujące podziały komórkowe) i bakteriobójcze (zabijające bakterie) [102]. Leki te można także klasyfikować opierając się na ich mechanizmie działania [103]. Istnieją leki, które hamują syntezę kwasów nukleinowych (np. chinolony) czy białek (np. makrolidy, aminoglikozydy) lub ściany komórkowej (np. β -laktamy, glikopeptydy). Inne zaś blokują ważne ścieżki metaboliczne w komórce (np. sulfonamidy) lub prowadzą do zniszczenia błony komórkowej (np. polimyksyny) [103]. Niestety, wraz z powszechnym stosowaniem antybiotyków, w komórkach bakteryjnych wykształciły się różne mechanizmy oporności na te substancje.

Oznaczanie lekowrażliwości jest najczęściej badane metodą jakościową przy pomocy nasączonych antybiotykiem w odpowiednim stężeniu bibułowych krążków [104]. Antybiotyk dyfunduje w podłożu promieniście, tworząc gradient stężeń.

Miarą wrażliwości danego szczepu jest średnica strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z antybiotykiem [104]. Wielkość strefy zahamowania jest proporcjonalna do stopnia wrażliwości bakterii na dany antybiotyk – w zależności od wielkości strefy, zmierzonej przy pomocy linijki, bakterie określa się jako wrażliwe, średniowrażliwe lub odporne. (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ Dostęp: 20.12.2014). W niektórych przypadkach wykonuje się badanie ilościowe, najczęściej z wykorzystaniem E-testu lub systemów automatycznych, takich jak VITEK. Metoda E-testu jest oparta na zasadzie gradientowo-dyfuzyjnej, która łączy dyfuzję antybiotyku i określanie minimalnego stężenia antybiotyku hamującego (ang. *minimal inhibitory concentration*, MIC) wzrost drobnoustroju. W tej metodzie wykorzystuje się paski nasyczone antybiotykiem w gradiencie stężeń.

Wykształcona przez bakterie oporność może być efektem zmian w przepuszczalności błony lub ściany komórkowej, co utrudnia penetrację antybiotyku do wnętrza komórki [1]. Inne mechanizmy opierają się na pompach wyrzutu (ang. *efflux pump*), aktywnie usuwających lek z komórki, bądź na mutacjach genów kodujących białka w obrębie miejsca wiązania antybiotyku. Część leków unieczynniana jest na skutek degradacji enzymami bakteryjnymi. Innym możliwym mechanizmem jest zmiana metabolizmu przez komórkę bakteryjną z pominięciem ścieżki hamowanej przez zastosowany lek [1]. Oporność bakterii może być efektem istnienia pierwotnej oporności (naturalnej) lub oporności nabytej [103]. Oporność naturalna jest cechą charakterystyczną gatunku i może się wiązać z brakiem receptora dla antybiotyku lub produkcją enzymów degradujących dany lek [105]. Oporność nabyta obecna jest wyłącznie u części populacji danego gatunku. Może się ona pojawiać na skutek spontanicznych lub indukowanych mutacji we własnym genomie lub pozyskania genów oporności od innych mikroorganizmów na drodze transferu horyzontalnego, w procesie koniugacji, transdukcji lub transformacji. Horyzontalny transfer genów to wymiana materiału genetycznego pomiędzy bakteriami tych samych bądź różnych gatunków, która pozwala na wydajniejszą ewolucję, ale także między innymi prowadzi do rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki [106]. Transformacja to pobranie bakteryjnego DNA ze środowiska, zaś w procesie transdukcji ważną rolę odgrywa bakteriofag, przenoszący materiał genetyczny między bakteriami. Koniugacja oznacza bezpośrednie przeniesienie materiału genetycznego z komórki do komórki. Podczas koniugacji dwie komórki bakteryjne znajdują się w ścisłym kontakcie ze sobą. Na tej drodze przenoszony jest zazwyczaj pozachromosomalny DNA w postaci plazmidów

i transpozonów koniugacyjnych. Plazmidy to kółeczko zamknięte, dwuniciowe molekuly DNA, zdolne do niezależnej replikacji [107]. Istnieją plazmidy o wielkości od 1000 par zasad (ang. *base pair*, bp) do 2 Mbp. Duże plazmidy występują zazwyczaj w jednej kopii, zaś mniejsze w wielu kopiach. Nie kodują one cech niezbędnych do przeżycia komórki, a jedynie dodatkowe, zwykle korzystne dla mikroorganizmu, cechy. Plazmidy koniugacyjne niosą geny kodujące białka umożliwiające tworzenie mostka koniugacyjnego [106]. Po fuzji błon enzymy dawcy przecinają jedną z nici plazmidowego DNA, jeden koniec tak przeciętej nici jest zaczepiany do białka w mostku koniugacyjnym i w ten sposób, przez mostek, nić przeciągana jest do komórki biorcy [106, 108]. Przekazywana jest tylko jedna nić, a druga jest odtwarzana w procesie replikacji z użyciem polimeraz. Druga grupa plazmidów to tzw. plazmidy mobilizowane, które samoistnie nie mogą się przenosić, ponieważ brakuje im genów kodujących białka do utworzenia mostka koniugacyjnego, ale które mogą skorzystać z mostka wytworzonego przez plazmid koniugacyjny [106, 108]. Innym typem elementów zdolnych do przeniesienia genów są transpozony koniugacyjne, które są zazwyczaj wbudowane w chromosom, a w odpowiedzi na sygnał ulegają wycięciu i zamknięciu w koło. Następnie, jedna z nici jest nacinana i ulega przekazaniu do biorcy, po czym odtwarzana jest druga nić i transpozon ponownie wbudowuje się do chromosomu [106].

Zgodnie z zaproponowaną przez Magiorakos *et al.* klasyfikacją, drobnoustroje dzielimy na wielolekooporne, drobnoustroje o rozszerzonej oporności oraz drobnoustroje całkowicie odporne. Wielolekooporność (ang. *multi-drug resistance*, MDR) oznacza niewrażliwość na co najmniej jeden antybiotyk z trzech lub więcej grup leków przeciwbakteryjnych, mających zastosowanie w leczeniu zakażeń wywołanych przez dany gatunek drobnoustroju. Rozszerzona oporność (ang. *extensively drug resistance*, XDR) oznacza niewrażliwość na co najmniej jeden antybiotyk ze wszystkich z wyjątkiem dwóch lub mniej grup antybiotyków. Całkowita oporność (ang. *pandrug resistance*, PDR) oznacza niewrażliwość na wszystkie zarejestrowane leki mające aktywność wobec badanego drobnoustroju [109].

Ponieważ do leczenia zakażeń wywoływanych przez pałeczki *Enterobacteriaceae* stosuje się przede wszystkim antybiotyki z grupy β -laktamów (cefalosporyny i karbapenemy) oraz – rzadko u dzieci – fluorochinolony, we wstępie do rozprawy omówiono poniżej bardziej szczegółowo mechanizmy oporności bakterii Gram-ujemnych na te dwie grupy leków.

1.4 Oporność na antybiotyki β -laktamowe

Antybiotyki β -laktamowe cechują się obecnością czterocząłowego, cyklicznego pierścienia aminowego, zwanego pierścieniem β -laktamowym. Taki pierścień obecny jest w strukturze prawie wszystkich penicylin, cefalosporyn, karbapenemów oraz monobaktamów, zaś jego nienaruszalność jest warunkiem skutecznego działania leków należących do tej grupy [3, 110-112]. Mechanizm działania antybiotyków β -laktamowych polega na hamowaniu enzymów zaangażowanych w syntezę ściany komórkowej. Ich celem są białka wiążące penicylinę (ang. *penicillin binding protein*, PBP), które zaangażowane są w polimeryzację podjednostek budujących peptydoglikan. Reakcja ta oparta jest na interakcji specyficznej reszty seryny (pochodzącej z PBP) z węglem karbonylowym pierścienia β -laktamowego [3, 110-112]. Po połączeniu antybiotyku z peptydazą w jej centrum aktywnym dochodzi do zablokowania aktywności i wytworzenia stabilnego produktu przejściowego – acylo-enzymu. Do zablokowania PBP dochodzi dzięki strukturalnemu podobieństwu antybiotyku do naturalnego substratu dla enzymu. W efekcie, komórka nie jest zdolna do syntetyzowania ściany komórkowej, co po pewnym czasie prowadzi do zwiększenia aktywności bakteryjnych enzymów autolitycznych, powodujących jej samozniszczenie [110-113]. Oporność na antybiotyki β -laktamowe może być uwarunkowana jednym z poniższych mechanizmów:

- mutacją PBP, która powoduje wybieranie innej cząsteczki docelowej – tak zwana oporność powodowana modyfikacją celu działania [110];
- zmniejszeniem przepuszczalności osłon komórkowych;
- obecnością enzymów β -laktamaz, które inaktywują pierścień β -laktamowy;
- aktywnym wypompowaniem leków z wnętrza komórki.

Częstość oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe wzrosła bardzo znacząco w Europie w ostatnich latach [22, 114]. Główne znaczenie dla oporności mają β -laktamazy produkowane przez pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*. Enzymy te zdolne są do hydrolizy penicylin, monobaktamów oraz większości cefalosporyn [111]. Funkcjonalny system klasyfikacji tych enzymów, zaproponowany przez Bush i Jacoby'ego, opiera się na porównaniu szybkości hydrolizy różnych β -laktamów i podatności na inhibicję [111, 115]:

- Grupa 1: β -laktamazy preferujące cefalosporyny, aktywne także względem penicylin i monobaktamów, słabo podatne na inhibitory – „cefalosporynazy AmpC”;
- Grupa 2: β -laktamazy podatne na działanie inhibitorów, ale o bardzo zróżnicowanym spektrum substratowym;
- Grupa 3: metalo- β -laktamazy (ang. *metallo- β -lactamases*, MBL), hydrolizujące penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy. Nie są one hamowane przez inhibitory, takie jak kwas klawulanowy, lecz ulegają hamowaniu przy pomocy EDTA;
- Grupa 4: grupa enzymów słabo zbadanych, niedawno poznanych, bez określonej nazwy [113].

Drugi system klasyfikacji (wg Amblera) jest oparty na pokrewieństwie ewolucyjnym β -laktamaz. Analiza sekwencji aminokwasowych pozwala na wyróżnienie czterech klas enzymów: klasy A, C i D to β -laktamazy serynowe, zaś klasa B obejmuje metalo- β -laktamazy. Geny dla β -laktamaz mogą być zlokalizowane zarówno na chromosomie bakteryjnym i są one wtedy gatunkowo-specyficzne, jak i na mobilnych elementach genetycznych. β -laktamazy trawią wiązanie amidowe w pierścieniu β -laktamu. Mechanizm działania β -laktamaz oparty jest na niekowalencyjnym oddziaływaniu enzymu z antybiotykiem, co skutkuje wytworzeniem specyficznego kompleksu. Kolejnym etapem jest atak wolnej grupy hydroksylowej reszty seryny i wytworzenie wiązania kowalencyjnego, efektem czego jest powstanie acylowanego estru serynowego. Hydroliza estru uwalnia enzym i zhydrolizowaną, nieaktywną (pozbawioną pierścienia) resztę antybiotykową [113]. Istnieją jednak inhibitory, które hamują β -laktamazy. Należą do nich kwas klawulanowy, sulbaktam oraz tazobaktam, jednak wiele szczepów oznaczanych jako zdolnych do produkcji β -laktamaz jest opornych także na skojarzenie antybiotyków β -laktamowych z inhibitorami [113]. W przypadku tych MBL, które w centrum aktywnym nie posiadają reszty seryny, otwieranie pierścienia β -laktamowego oparte jest na interakcji kationu cynku i antybiotyku.

β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ang. *extended spectrum β -lactamases*, ESBL) hydrolizują wszystkie cefalosporyny (oprócz cefamycyn), penicyliny i monobaktamy. Ich aktywność jest w większości wypadków hamowana

przez sulbaktam, tazobaktam, bądź kwas klawulanowy [111, 112, 115]. Klasyfikowane są do grupy 2 lub klas A i D. Kodowane są zwykle na plazmidach koniugacyjnych (np. IncFII, Inc L/M), przez co ulegają szybkiemu rozprzestrzenianiu [22, 116, 117]. Od 1983 roku opisano ponad 200 różnych naturalnych wariantów enzymów należących do ESBL, a obecnie w Europie obserwuje się zdecydowany wzrost dominacji β -laktamaz typu CTX-M w porównaniu z wariantami SHV i TEM [94]. Poważnym problemem w zwalczaniu szczepów o fenotypie ESBL jest fakt, że są one często odporne również na antybiotyki z innych grup (np. aminoglikozydy, fluorochinolony, kotrimoksazol).

Do głównych grup enzymów ESBL zaliczamy:

- a) pochodne TEM – mają różnoraką budowę molekularną i właściwości fizykochemiczne (np. punkt izoelektryczny). W obrębie tej grupy skład aminokwasowy enzymów jest podobny – występują najczęściej różnice punktowe, a więc najwyżej dwa aminokwasy w całym białku są inne. Często nie ma to wpływu na spektrum substratowe, wobec którego owe enzymy reagują [110, 112];
- b) pochodne SHV – ich budowa jest bardzo podobna do TEM. Spotyka się je najczęściej u *K. pneumoniae*, gdzie zlokalizowane są na chromosomie. U *E. coli* znajdują się na plazmidach [110, 112];
- c) CTX-M – wywodzą się od gatunkowo-specyficznych β -laktamaz niepatogennych bakterii z rodzaju *Kluyvera* (rodzina *Enterobacteriaceae*). ESBL należące do tej rodziny klasyfikuje się w obrębie pięciu podgrup [110, 112].

W ostatnim czasie obserwuje się ekspansję pałeczek Gram-ujemnych wytwarzających ESBL. Nie są one już tylko patogenami wywołującymi wyłącznie zakażenia szpitalne, lecz coraz częściej identyfikuje się je jako przyczynę zakażeń pozaszpitalnych, a także stwierdza się ich nosicielstwo u ludzi zdrowych [118].

Innym ważnym mechanizmem oporności na antybiotyki β -laktamowe jest zdolność do wytwarzania cefalosporynaz AmpC, rozkładających penicyliny, cefalosporyny (za wyjątkiem IV generacji) oraz aztreonam [112, 118]. Gen *AmpC* zlokalizowany jest najczęściej na chromosomie [113].

Coraz częściej obserwuje się także pojawianie się wśród *Enterobacteriaceae* β -laktamaz hydrolizujących karbapenemy [118, 119]. Należące do klasy B metalo- β -laktamazy to najbardziej aktywna klasa β -laktamaz, gdyż wszyscy jej przedstawiciele wykazują zdolność do hydrolizy karbapenemów, penicylin i cefalosporyn, ale nie monobaktamów [112, 119]. Należą one do dwóch grup: β -laktamaz klasy A (tak zwane KPC – ang. *Klebsiella pneumoniae carbapenemases*) oraz metalo- β -laktamaz klasy B (MBL) [112]. Głównym producentem KPC jest *K. pneumoniae*, lecz obecność tych enzymów stwierdza się także u innych gatunków *Enterobacteriaceae* [120]. Szczepy produkujące karbapenemazy są odporne na skojarzenia inhibitorów β -laktamaz z β -laktamami [120]. MBL wykorzystują jony cynku jako kofakory w reakcji hydrolizy β -laktamów [112, 120]. Testy fenotypowe na obecność MBL oparte są na wykorzystywaniu inhibitorów tych β -laktamaz (głównie EDTA) oraz karbapenemów i ceftazydymu jako antybiotyków wskaźnikowych [112, 121, 122].

Zakażenia i kolonizacja noworodków szczepami bakterii zdolnymi do produkcji ESBL to duży problem na oddziałach neonatologicznych i wyzwanie dla kontroli zakażeń. Głównym zadaniem nadzoru nad zakażeniami jest wykrycie źródła zakażenia, dróg przenoszenia oraz ogniska epidemicznego, a także likwidacja epidemii, zastosowanie odpowiednich procedur celem zapobiegania takim sytuacjom w przyszłości oraz edukacja personelu. Nadzór nad takim zakażeniami powinien obejmować przestrzeganie reżimu sanitarnego oraz racjonalną politykę antybiotykową w profilaktyce i terapii zakażeń.

1.5 Oporność na fluorochinolony

Duże znaczenie przy coraz częstszych niepowodzeniach leczniczych, powstających w trakcie leczenia zakażeń powodowanych przez pałeczki Gram-ujemne, ma związek pomiędzy zdolnością do produkcji ESBL i opornością na aminoglikozydy i/lub fluorochinolony u tych bakterii. Zjawisko to prowadzi do ko-selekcji szczepów opornych na fluorochinolony w wyniku stosowania β -laktamów lub aminoglikozydów, i *vice-versa*, ko-selekcji szczepów ESBL-dodatnich w wyniku stosowania fluorochinolonów. Spora część ze znanych genów oporności (w tym także kodujących enzymy ESBL), zlokalizowana jest bowiem na mobilnych elementach genetycznych,

takich jak plazmidy, które mogą być w łatwy sposób przekazywane pomiędzy szczepami nie tylko w obrębie jednego gatunku, ale także pomiędzy gatunkami [123, 124].

Chinolony zostały wprowadzone do leczenia w 1962 roku. Pierwszym lekiem z tej grupy był kwas nalidyksowy [125]. Zostały odkryte przypadkowo, jako uboczny produkt syntezy chininy [126]. Chinolony są pochodnymi kwasu chinolinokarboksylowego, zawierają w pozycji 4 dwucyklicznego heteroaromatycznego pierścienia grupę karbonylową, a w pozycji 3 – grupę karboksylową, które to grupy są niezbędne do transportu cząsteczki do wnętrza komórki bakteryjnej i do przyłączenia jej do kompleksu enzym-DNA [124, 127]. Mechanizm ich działania oparty jest na oddziaływaniu z dwoma typami topoizomeraz bakteryjnych typu 2 – gyrazą DNA i topoizomerazą IV, które są niezbędne w procesie replikacji DNA. Topoizomerazy te działają poprzez rozplatanie dwuniciowej struktury DNA [128]. Podstawową funkcją topoizomerazy IV jest rozdzielanie potomnych chromosomów po procesie replikacji (tzw. dekatencja) i ich segregacja do komórek potomnych [129]. Gyraza DNA jest jedynym znanym enzymem, zdolnym do wprowadzania negatywnych superhelikalnych skrętów do nici bakteryjnego DNA, które to są niezbędne do inicjacji procesu replikacji DNA i ułatwiają wiązanie białek zaangażowanych w start procesu replikacji [124, 129]. Interakcja chinolonów z gyrazą lub topoizomerazą IV powoduje zmiany konformacyjne w strukturze enzymu i w obrębie DNA związanego z enzymem [130]. Stosowanie chinolonów powoduje hamowanie replikacji bakteryjnego DNA, gdyż kompleks chinolon-enzym-DNA blokuje postęp widełek replikacyjnych, co sprawia, że leki te mają w pierwszej kolejności działanie bakteriostatyczne [131, 132].

Modyfikacja rdzenia chinolonów, poprzez podstawienie różnych reszt w miejsca N-1, C-6, C-7 i C-8, zmieniły właściwości przeciwbakteryjne, farmakokinetykę i właściwości metaboliczne tych leków. Jedną z ważniejszych zmian było podstawienie reszty fluoru w pozycję C-6, co spowodowało wzrost aktywności hamującej względem gyrazy DNA, ułatwiło penetrację do wnętrza komórki bakteryjnej i dodało aktywność przeciwko bakteriom z rodzaju *Staphylococcus* [133]. Fluorochinolony, bo tak nazwano fluorowane pochodne, szybko stały się popularnymi lekami na całym świecie, chętnie stosowanymi przez lekarzy. Do tej grupy leków należą m. in. ciprofloksacyna, ofloksacyna, norfloksacyna, lewofloksacyna oraz moksifloksacyna. Jednak już w ciągu 20 lat, które minęły od wprowadzenia fluorochinolonów do leczenia, oporność bakterii na chinolony stała się zjawiskiem powszechnym [134]. Doniesienia z Chin

wskazywały, że ponad połowa klinicznych szczepów bakterii z gatunku *E. coli* izolowanych pod koniec lat 90-tych XX wieku była oporna na ciprofloksacyny [135]. W krajach europejskich odsetek opornych szczepów był niższy (np. 13,1% klinicznych szczepów *Klebsiella* sp. w Norwegii) [136]. Uważa się, że oporność ta nie powstała wskutek rozpowszechnienia jednego opornego bakteryjnego klonu na całym świecie, lecz pojawiała się równolegle u wielu organizmów w różnych miejscach globu [137].

Dotychczas opisano kilka mechanizmów oporności na fluorochinolony. Najważniejszy z nich opiera się na akumulacji mutacji w genach bakteryjnej topoizomerazy IV i gyrazy [134]. Drugi mechanizm oparty jest na obniżeniu wewnątrzkomórkowej akumulacji leku przez nadprodukcję pomp aktywnie usuwających lek z komórki albo samodzielnie, albo włącznie z nadprodukcją poryn błony zewnętrznej [138]. Mechanizmy te przekazywane są do komórek potomnych w trakcie podziału komórkowego [139]. Ostatni z mechanizmów oparty jest na plazmidach (ang. *plasmid mediated quinolone resistance*, PMQR), a został odkryty i opisany pod koniec lat 90-tych XX wieku. Plazmidowo kodowane białko odpowiedzialne za obniżoną wrażliwość na chinolony, nazwane QnrA, należy do grupy białek wyposażonych w tandemowo powtarzające się, pięcioaminokwasowe motywy, które poprzez wiązanie się do gyrazy lub topoizomerazy IV chroni te enzymy przed hamowaniem ich aktywności przez chinolony [139]. Ten mechanizm nie powoduje nabywania przez bakterie całkowitej oporności na dany lek z grupy chinolonów, tylko podnosi MIC leku. Zauważono 2-12-krotny wzrost MIC w przypadku kwasu nalidyksowego oraz 12-250-krotny wzrost MIC w przypadku ciprofloksacyny dla bakterii niosących gen *qnrA* [132, 139]. Kolejno odkryte geny oporności to *qnrS1* (znaleziony w klinicznym izolacie *Shigella flexneri* w Japonii) oraz *qnrB1* (wyzisolowany w Indiach ze szczepu *K. pneumoniae*) [140, 141].

Innym białkiem, warunkującym obniżoną wrażliwość na ciprofloksacynę i norfloksacynę, jest białko AAC(6')-Ib-cr, będące wariantem acetylotransferazy aminoglikozydowej, warunkującej oporność na tobramycynę, amikacynę i kanamycynę [139]. Wydaje się ono występować częściej, niż białka Qnr i odgrywa dużą rolę w wyznaczaniu oporności na fluorochinolony, szczególnie, jeśli współwystępuje w komórce wraz z którymś z białek Qnr. Wówczas poziom wrażliwości na lek zbliża się do wartości granicznych MIC [139].

W 2002 roku w Japonii, w klinicznym izolacie *E. coli*, zidentyfikowana została kodowana plazmidowo pompa wyrzutu, QepA [142]. Plazmid, na którym się znajdowała, wykazywał także obecność wielu genów oporności na aminoglikozydy, fluorochinolony i β -laktamy. Obecność i ekspresja genu *qepA* wpływa na znaczny wzrost MIC dla wielu antybiotyków, w tym dla ciprofloksacyny, norfloksacyny oraz erytromycyny [142].

Oporność na fluorochinolony kodowana plazmidowo, odpowiada za obniżoną wrażliwość na fluorochinolony, a geny odpowiedzialne za ten mechanizm rozprzestrzeniają się bardzo szybko. Większość badań nad PMQR obejmuje izolaty pochodzące od pacjentów dorosłych. Jest to spowodowane faktem, że fluorochinolony nie są lekami rekomendowanymi do stosowania u pacjentów pediatrycznych ze względu na możliwe wystąpienie skutków ubocznych w postaci m. in. zahamowania wzrostu dziecka. Jednak przeprowadzone badania kliniczne dotyczące użycia ciprofloksacyny w leczeniu sepsy u noworodków nie wykazały żadnego szkodliwego efektu [143]. Według wyników badania ankietowego (na podstawie obiektywnych danych z aptek szpitalnych), przeprowadzonego w 2007 roku na polskich oddziałach neonatologicznych, najczęściej stosowane w lecznictwie były antybiotyki β -laktamowe, ale w 2% przypadków zastosowane zostały również fluorochinolony [144]. W badanych ośrodkach już w roku 2007 zdefiniowana dawka dzienna (ang. *defined daily dose*, DDD) dla fluorochinolonów wynosiła 2.8 [144]. Niewiele jest danych dotyczących występowania mechanizmu PMQR w szczepach pochodzących od pacjentów pediatrycznych. Badania przeprowadzone w latach 2005-2006 w Chinach na 292 szczepach *E. coli* pochodzących z pięciu szpitali dziecięcych pokazały, że około 7% szczepów posiadała przynajmniej jedną determinantę PMQR [145]. W przeprowadzonych w Peru i Boliwii badaniach na środowiskowych szczepach *Enterobacteriaceae* pochodzących od 310 zdrowych dzieci (wiek: 6-72 miesiące) wykazano, że częstość występowania genów *qnrB* i *qnrS* była zaskakująco wysoka (odpowiednio, 54% i 14%) [146]. Aktualnie krajem o wysokiej częstości występowania szczepów z genami *qnr* są Chiny (ok. 8%) i Stany Zjednoczone [139, 147]. We Francji, Danii i w Kanadzie tylko około 1-1,6% szczepów jest zdolnych do produkcji białek Qnr [148-150]. Co ciekawe, geny *qnr* występują częściej u gatunku *K. pneumoniae*, niż u *E. coli* [139, 148, 151]. Najpopularniejszą determinantą *qnr* w Chinach i Tunezji jest *qnrB*, zaś w Hiszpanii – *qnrA* [151-153].

Z uwagi na fakt, iż badań dotyczących częstości występowania plazmidowo kodowanych genów oporności na fluorochinolony u pacjentów pediatrycznych jest niewiele, zdecydowano o publikacji wyników części poniższej pracy doktorskiej, dotyczących tego zagadnienia [154].

1.6 Wybrane metody typowania bakterii

Szczepy bakterii powodujące zakażenia szpitalne, charakteryzujące się wielolekoopornością, a także wysoką zjadliwością, mogą klonalnie rozprzestrzeniać się zarówno wewnątrz, jak i pomiędzy szpitalami. Liczne badania wykazują często dominację konkretnego klonu na terenie jednego państwa, a z czasem jego rozprzestrzenienie się na tereny sąsiednich państw i całego kontynentu [155-157]. Metody typowania molekularnego stosowane są w epidemiologii w celu uzyskania odpowiedzi na dwa pytania: czy izolaty pochodzące z danej epidemii są ze sobą genetycznie powiązane (epidemiologia lokalna), oraz, czy i jak izolaty wywołujące zakażenia w jednym ognisku epidemicznym na świecie są związane z izolatami wywołującymi zakażenia w innych rejonach (epidemiologia globalna) [158]. Do takich celów porównawczych można stosować różnorakie metody, które powinny się cechować powtarzalnością i wysokim potencjałem dyskryminacyjnym.

Dzięki metodzie MLST istnieje możliwość wykazania występowania tych samych, konkretnych szczepów w różnych miejscach geograficznych. Metoda MLST opiera się na porównaniu konserwatywnych sekwencji genów metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*), które kontrolują podstawowe funkcje życiowe w każdej żywej komórce. Sekwencje tych genów są tak stabilne genetycznie, że zmiany w nich mogą służyć do określania pokrewieństwa genetycznego pomiędzy szczepami bakterii z jednego gatunku. Metoda MLST oparta jest na sekwencjonowaniu, dzięki czemu jest jednoznaczna, a jej wyniki możliwe do porównania pomiędzy laboratoriami. Pierwszym etapem jest amplifikacja wybranych genów metabolizmu podstawowego bakterii przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy, (ang. *polimerase chain reaction*, PCR), w której otrzymuje się fragmenty o długości ok. 500 bp, a następnym – sekwencjonowaniu tych fragmentów. Pokrewieństwo badanych szczepów określone jest przez porównanie otrzymanych sekwencji z już istniejącymi, zapisanymi w ogólnodostępnej bazie MLST. Unikatowym allelom przypisywany jest

numer. Każdy szczep jest zatem scharakteryzowany przez allele ze wszystkich badanych *loci*, co składa się na tzw. profil alleliczny, czyli typ klonalny ST (ang. *sequence type*). Ponieważ w każdym z badanych *loci* znajduje się wiele alleli, nie jest możliwe, by dwa szczepy posiadały ten sam profil przypadkowo. Szczepy o tym samym profilu mogą zatem zostać sklasyfikowane do tego samego typu klonalnego, a zatem można określić pokrewieństwo genetyczne badanych szczepów [158]. Końcowe wyniki MLST przedstawiane są w formacie cyfrowym, przechowywane w ogólnodostępnych bazach internetowych, dzięki czemu mogą być wykorzystane do porównań pomiędzy laboratoriami. Stosowanie metody MLST może być czasochłonne i wymaga sekwencjonowania dużej liczby nukleotydów. Co za tym idzie, dla celów dochodzeń epidemiologicznych, MLST wydaje się zbyt pracochłonne i kosztowne do zastosowania jako podstawowe narzędzie do typowania.

Analizę genetycznego podobieństwa pałeczek Gram-ujemnych można również przeprowadzić metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (ang. *pulsed field gel electrophoresis*, PFGE). Polega ona na rozdziale elektroforetycznym w zmiennym polu elektrycznym fragmentów DNA uzyskanych wskutek cięcia genomu bakteryjnego za pomocą wybranego enzymu restrykcyjnego. Metoda ta jest wykorzystywana do analizy podobieństwa głównie w dochodzeniach epidemiologicznych lokalnych. W początkowym etapie procedury PFGE istotne jest otrzymanie nienaruszonego genomowego DNA badanego szczepu. Izolacja DNA odbywa się z zastosowaniem agarozowych blochków, w których zatapiane są całe komórki bakterii. Zatopione komórki poddawane są procesowi lizy z wykorzystaniem odpowiedniego enzymu (np. proteinazy K w przypadku większości pałeczek Gram-ujemnych), fragmenty zlizowanych komórek są odpłukiwane, a genomowe DNA zostaje poddane trawieniu enzymem restrykcyjnym tak dobranym, aby uzyskać optymalną liczbę fragmentów. W czasie rozdziału elektroforetycznego uzyskane fragmenty DNA tworzą charakterystyczny wzór prążkowy, typowy dla określonego szczepu w obrębie badanego gatunku bakterii. Uzyskane w ten sposób wzory prążkowe można następnie porównywać przy pomocy odpowiedniego oprogramowania z wykorzystaniem kryteriów zaproponowanych przez Tenovera *et al.* [159]. Metoda PFGE jest wysoce dyskryminacyjna, ale wymaga dużej ilości czasu, odpowiedniego sprzętu, zaś dodatkowym problemem może być brak miejsc cięć restrykcyjnych u niektórych szczepów, co czyni je niemożliwymi do typowania tą metodą [160, 161].

W genomie bakterii istnieją miejsca zawierające powtarzający się motyw nukleotydowy. Takie *loci* cechuje wysoka zmienność w populacji – u różnych bakterii powtarzające się motywy (zwane tandemowymi powtórzeniami) mogą mieć różną długość i dlatego nazywa się je VNTR – zmienną liczbą tandemowych powtórzeń (ang. *variable number tandem repeats*). Metoda typowania VNTR polega na określeniu liczby tandemowych powtórzeń w poszczególnych, wybranych *loci* genomu bakteryjnego. Bazuje ona na reakcji PCR, zaś analiza wielkości ampikonów prowadzona jest przy pomocy standardowego rozdziału elektroforetycznego na żelu agarozowym [161]. Metoda ta jest znacznie szybsza i tańsza od PFGE i może być jej alternatywą wtedy, kiedy niezbędne jest uzyskanie wyników w krótkim czasie. Wadą tej metody jest fakt, że nie jest ona uniwersalna, zaś startery muszą być dopasowane indywidualnie dla każdego gatunku. Dodatkowo, nie jest ona w 100% powtarzalna, dopóki produkty amplifikacji nie zostaną zsekwencjonowane. Wymaga także arbitralnej decyzji badacza, od którego miejsca zaczyna się i gdzie kończy się tandemowe powtórzenie. Nierzadko zdarza się też, że wielkość tandemowego powtórzenia jest powiększana przez sekwencje insercyjne [161].

Oprócz typowania w obrębie genomu możliwe i użyteczne jest także typowanie replikonów plazmidowych [23, 162]. Geny oporności często są zlokalizowane w pobliżu ruchomych elementów genetycznych (sekwencji insercyjnych, transpozonów), co umożliwia łatwe ich przenoszenie pomiędzy różnymi replikonami DNA. Uważa się, że *E. coli* zdolna jest także do naturalnej transformacji DNA w określonych warunkach, które mogą zaistnieć w środowisku. Takim środowiskiem może być m.in. biofilm, który umożliwia transformację, choćby z uwagi na fakt, że żywe komórki współistnieją z martwymi, a DNA uwalniane przez martwe komórki akumuluje się wokół żywych. Jeżeli proces nabywania kompetencji przez komórki bakteryjne do pobierania wolnego DNA może zachodzić spontanicznie w warunkach *in vivo*, taki mechanizm może stanowić poważne zagrożenie dla rozprzestrzeniania się wielolekooporności [163, 164].

Do zwiększenia genetycznej różnorodności wśród bakterii danej populacji przyczyniają się plazmidy bakteryjne. Datta i Hedges zaproponowali schemat klasyfikacji plazmidów oparty na ich stabilności i kompatybilności podczas koniugacji [165]. Zjawisko określane mianem kompatybilności plazmidów manifestuje zdolność danego plazmidu do współistnienia w tej samej komórce z innym typem plazmidu, który posiada podobny schemat replikacji. Niekompatybilność oznacza, że dwa plazmidy używające podobnej maszynerii replikacyjnej nie mogą jednocześnie

namnażać się w danej komórce, a zatem tylko plazmidy kompatybilne będą znajdować się w komórkach transkoniugatów. Znanych jest wiele różnych rodzin plazmidów występujących w obrębie rodziny *Enterobacteriaceae* (HI2, HI1, X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A/C, T, K, B/O) [162, 166]. Do dnia dzisiejszego opisano 27 różnych typów replikonów plazmidowych [167]. Plazmidy kodujące oporność na antybiotyki odgrywają bardzo dużą rolę w zrozumieniu dróg szerzenia patogenów wielolekoopornych. *Plasmid Replicon Typing* (PRT) jest metodą opartą na reakcji PCR, i pozwala zbadać filogenetyczne pokrewieństwo pomiędzy plazmidami. Protokół opracowany przez Carattoli *et al.* pozwala zaklasyfikować plazmidy do najczęściej występujących grup w rodzinie *Enterobacteriaceae* [162]. Z uwagi na innowacyjność metody i fakt, że niewiele jest doniesień dotyczących typowania replikonów plazmidowych w Polsce, zdecydowano o opublikowaniu wyników dotyczących tej części badań [168].

2 CEL PRACY

Celem głównym pracy było przeprowadzenie epidemiologicznej i mikrobiologicznej analizy zakażeń związanych z pałeczkami Gram-ujemnymi z rodziny *Enterobacteriaceae*, które wystąpiły w latach 2009-2011 i były przedmiotem nadzoru nad zakażeniami u noworodków z masą urodzeniową poniżej 1500 g, prowadzonego przez Polską Sieć Neonatologiczną. Celem opisowej analizy epidemiologicznej było wyliczenie podstawowych współczynników określających badane zakażenia i określenie wpływu na nie wybranych czynników ryzyka. Natomiast celem molekularnej analizy epidemiologicznej było zbadanie podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi szczepami pałeczek przy zastosowaniu kilku metod. Ponadto przeprowadzona została analiza mikrobiologiczna, której celem była szczegółowa fenotypowa i genotypowa charakterystyka oporności zebranych szczepów pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae* na wybrane leki przeciwdrobnoustrojowe.

Cele szczegółowe:

- a) Określenie współczynnika zachorowalności na poszczególne rodzaje zakażeń o etiologii związanej z pałeczkami *Enterobacteriaceae*, analiza śmiertelności związanej z zakażeniami o badanej etiologii wśród noworodków o różnej masie urodzeniowej obarczonych różnym ryzykiem zachorowania w związku ze stanem matki w czasie ciąży i przebiegiem porodu. Określenie niezależnego wpływu poszczególnych czynników na zapadalność związaną z zakażeniami powodowanymi przez *Enterobacteriaceae* w badanych grupach.
- b) Określenie udziału szczepów lekoopornych i wielolekoopornych w etiologii zakażeń (zastosowanie metody dyfuzyjno-krażkowej oraz oznaczenie wartości MIC (mg/l) dla wybranych antybiotyków przy użyciu metody E-testu).
- c) Wykrywanie genów oporności na wybrane antybiotyki przy pomocy reakcji PCR oraz multipleks PCR – w celu wykrycia genów kodujących β -laktamazy TEM, SHV, CTX-M, genów kodujących β -laktamazy rzadziej spotykanych typów, takich jak PER, GES, VEB, genów kodujących karbapenemazy KPC i oksacylinazy OXA.

- d) Wykrywanie kodowanych plazmidowo genów oporności na fluorochinolony *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrD*, *qnrC*, *qepA* i *aac-(6')-Ib-cr* z wykorzystaniem real-time PCR dla szczepów *E. coli* i *K. pneumoniae*. Określenie, czy geny oporności na β -laktamy i geny PMQR znajdują się na tym samym plazmidzie.
- e) Oznaczenie genów kodujących wybrane czynniki wirulencji badanych szczepów *E. coli* i *K. pneumoniae* zaangażowanych w patomechanizm zakażeń.
- f) Ocena udziału plazmidów niskocząsteczkowych w powstawaniu fenotypu ESBL-dodatniego wśród pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*.
- g) Typowanie replikonów plazmidowych – określenie przynależności plazmidów z danego szczepu bakteryjnego do grupy według schematu klasyfikacji plazmidów zaproponowanego przez Hedges i Datta, opartego na stabilności i kompatybilności plazmidów podczas koniugacji.
- h) Przeprowadzenie analizy genotypowego podobieństwa pomiędzy szczepami *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* metodą PFGE w celu wykrycia możliwych epidemii klonalnych.
- i) Określenie podobieństwa genetycznego pomiędzy szczepami pałeczek Gram-ujemnych z gatunku *E. coli* i *K. pneumoniae* pochodzących z przypadków zakażeń krwi w odniesieniu do typów ST uzyskanych dzięki metodzie MLST.
- j) Porównanie dwóch metody typowania *K. pneumoniae*: tańszej i szybszej, jaką jest typowanie VNTR (zmiennej liczby tandemowych powtórzeń) z rutynowo stosowaną, czasochłonną i stosunkowo drogą metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym.

3 MATERIAŁ

3.1 Charakterystyka badanej populacji

Materiał będący przedmiotem badań objętych niniejszą rozprawą został uzyskany w trakcie programu poświęconego epidemiologii zakażeń noworodków z bardzo małą masą urodzeniową w Polsce. Ciągły, prospektywny nadzór nad zakażeniami prowadzono w okresie pomiędzy 1 stycznia 2009 a 31 grudnia 2011. Objął on 6 oddziałów intensywnej opieki neonatologicznej, które uczestniczyły w działaniach Polskiej Sieci Neonatologicznej (PSN). Nadzór realizowany był w ramach badań wspólnych sieci naukowej „Polska Sieć Neonatologiczna” – utworzonej decyzją Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr 669/E-215/BWSN-0180/2008 z dnia 20 maja 2008 roku. Kierownikiem Sieci była Pani prof. dr hab. Ewa Helwich, a realizatorami – oddziały neonatologiczne:

1. Klinika Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie;
2. Klinika Neonatologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie;
3. Klinika Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka Akademii Medycznej w Warszawie;
4. Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie;
5. Katedra i Klinika Neonatologii wraz z Kliniką Zakażeń Noworodka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego SPZOZ Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu;
6. Klinika Neonatologii Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi;

oraz:

7. Instytut Informatyki PAN w Gliwicach;
8. Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Zaangażowane oddziały neonatologiczne zapewniają opiekę medyczną dla około 20% wszystkich przedwcześnie urodzonych noworodków w Polsce. Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego – opinia nr KBET/221/B/2011.

Badaniami objęto noworodki o masie urodzeniowej poniżej 1500 gramów urodzone po 22 tygodniu ciąży. Nadzór był prowadzony do momentu osiągnięcia przez nie masy 1800 gramów albo zgonu albo transferu do innej jednostki. Zakażenia u noworodków rozpoznawano i kwalifikowano na podstawie definicji zakażeń, które zostały przygotowane i zaakceptowane przez Radę Sieci w oparciu o doświadczenia i dane systemu National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) opracowanego przez Centers for Disease and Prevention (CDC) w USA [169], z uwzględnieniem modyfikacji zgodnych z niemieckim programem Neo-KISS [56] oraz modyfikacji własnych PSN. Zakażenia późne definiowano jako zakażenia rozpoznane co najmniej po 72 h od urodzenia. W grupie dzieci z zakażeniem krwi wydzielono także grupę przypadków zakażeń wczesnych (ang. *early-onset* BSI). Nowy przypadek zakażenia u tego samego pacjenta rozpoznawano wtedy, gdy po pierwszym zakażeniu był okres wolny od objawów klinicznych, a noworodek nie był leczony przeciwdrobnoustrojowo. Zmiana czynnika patogennego lub pojawienie się dodatkowego patogenu nie stanowiło podstawy do rozpoznania nowego zakażenia o tej samej postaci. Zakażenia wertykalne (przezłożyskowe), takie jak różyczka, zakażenia wirusami cytomegalii, herpes simplex, toksoplazmoza i inne nie były zaliczane do zakażeń szpitalnych.

Kryteria włączenia noworodka do badania:

- Masa urodzeniowa <1500 g;
- Jeżeli poród odbywał się poza jednostką, masa noworodka w momencie rozpoczęcia hospitalizacji i nadzoru nie powinna była przekraczać 1800 g;
- Poród po 22 tygodniu ciąży.

Kryteria wykluczenia przed rozpoczęciem badania:

- Masa urodzeniowa >1500 g;
- Poród przed 22 tygodniem ciąży.

Badaniem została objęta grupa 1695 noworodków, spośród których 1243 przeżyło dłużej niż 72h. W badanej grupie znalazło się:

- 97 noworodków o masie <600g;
- 671 noworodków o masie 600-999g;
- 927 noworodków o masie >1000 g.

3.2 Charakterystyka czynników etiologicznych zakażeń

Po rozpoznaniu zakażenia, w celu ustalenia czynnika etiologicznego pobierano (w zależności od lokalizacji zakażenia):

- krew z wykorzystaniem standardowych podłoży transportowo-namnażających;
- wydzielinę z dróg oddechowych;
- mocz;
- płyn owodniowy, (pobierany okołoporodowo w przypadku obecności markerów stanu zapalnego obserwowanych w płynie owodniowym i dużym ryzyku zakażenia wczesnego);
- inny materiał (np. wymaz).

Z uwagi na fakt, iż pobranie materiału z dolnych dróg oddechowych jest u noworodków z VLBW i ELBW trudne, w niektórych wypadkach zakażenie rozpoznawano jako zapalenie płuc, pomimo że pobrany materiał nie odpowiadał klinicznie tej lokalizacji. W takich wypadkach posługiwano się informacją uzyskaną od lekarza prowadzącego, który na podstawie objawów klinicznych i ustalonych kryteriów rozpoznawał zapalenie płuc i stosował odpowiednie leczenie przeciwdrobnoustrojowe.

W wyniku przeprowadzonych badań rozpoznano – pośród innych – 241 zakażeń o etiologii związanej z pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae*. Wśród zakażeń rozpoznano:

- 70 przypadków zakażeń krwi: 65 późnych zakażeń krwi i 5 wczesnych zakażeń krwi;
- 138 przypadków zapaleń płuc: 115 późnych zapaleń płuc i 23 wczesnych zapaleń płuc;
- 10 zakażeń dróg moczowych;
- 23 inne zakażenia.

Oznaczenie gatunku drobnoustroju wykonywane było w szpitalnym laboratorium w każdym ośrodku uczestniczącym w badaniu z wykorzystaniem systemów VITEK (BioMerieux, Francja). Drobnoustroje były następnie przesiewane na agar odżywczy w miniprobówkach o objętości 1 ml (Nutrient S LAB-AGAR™, BioCORP, Polska) i przesyłane do Katedry Mikrobiologii UJ CM, gdzie po wysianiu na podłoża stałe (agar MacConkeya, BioCORP, Polska) przystępowano do procedury izolacji DNA (opisanej w podrozdziale 4.3) i potwierdzania przynależności gatunkowej otrzymanych szczepów przy pomocy reakcji PCR (opisanej w podrozdziale 4.6) .

W trakcie trwania badania rozpoznano:

- 96 zakażeń, w których w pobranych materiałach wykazano obecność *Escherichia coli*. Do badań objętych tą rozprawą otrzymano 90 szczepów, pochodzących ze wszystkich form klinicznych zakażeń.
- 86 zakażeń, w których w pobranych materiałach wykazano obecność *Klebsiella* sp. Do badań objętych tą rozprawą otrzymano 60 szczepów *Klebsiella pneumoniae* oraz 18 szczepów *Klebsiella oxytoca* pochodzących ze wszystkich form klinicznych zakażeń.
- 40 zakażeń, w których w pobranych materiałach wykazano obecność *Enterobacter* sp. Do badań objętych tą rozprawą otrzymano 36 szczepów, pochodzących ze wszystkich form klinicznych zakażeń.
- 19 zakażeń, w których w pobranych materiałach wykazano obecność innych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*. Do badań objętych tą rozprawą otrzymano 11 szczepów *Serratia* sp. oraz 1 szczep *Morganella morganii*.

Ogółem w trakcie trwania badań w latach 2009-2011 zebrano 216 szczepów pałeczek *Enterobacteriaceae*. Częstość występowania poszczególnych gatunków bakterii w materiałach pobranych w kolejnych ośrodkach, z wyszczególnieniem szczepów zdolnych do produkcji ESBL, uwidoczniono w Tabeli 1. Najwięcej, bo 147 szczepów otrzymano z ośrodka VI (co stanowiło 68% wszystkich otrzymanych szczepów), zaś najmniej, bo tylko 2, z ośrodka IV.

Tabela 1. Gatunki bakterii obecne w materiałach pobranych z przypadków zakażeń w ośrodkach uczestniczących w badaniach, z wyszczególnieniem szczepów zdolnych do produkcji β -laktamaz o rozszerzonym spektrum (ESBL).

<i>Gatunek/Ośrodek</i>	<i>I</i>		<i>II</i>		<i>III</i>		<i>IV</i>		<i>V</i>		<i>VI</i>		<i>Razem</i>
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
<i>Escherichia coli</i>	1	12,5	30	36,6	8	44,4	0	0,0	13	33,3	38	25,9	90
w tym ESBL	0	0,0	8	9,8	3	16,7	0	0,0	1	2,6	13	8,8	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	50,0	9	11,0	3	16,7	0	0,0	3	7,7	41	27,9	60
w tym ESBL	0	0,0	4	4,9	2	11,1	0	0,0	0	0,0	32	21,8	38
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0,0	11	13,4	0	0,0	0	0,0	3	7,7	4	2,7	18
w tym ESBL	0	0,0	2	2,4	0	0,0	0	0,0	1	2,6	0	0,0	3
<i>Enterobacter sp.</i>	3	37,5	14	17,1	0	0,0	0	0,0	9	23,1	10	6,8	36
w tym ESBL	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	9	23,1	4	2,7	13
<i>Serratia sp.</i>	0	0,0	4	4,9	1	5,6	2	100	0	0,0	4	2,7	11
w tym ESBL	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,7	1
<i>Morganella morganii</i>	0	0,0	0	0,0	1	5,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1
w tym ESBL	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0
Razem	8	100	82	100	18	100	2	100	39	100	147	100	

4 METODY

4.1 Analiza epidemiologiczna

Na potrzeby działalności Polskiej Sieci Neonatologicznej, zespół pracujący w Instytucie Informatyki PAN w Gliwicach pod kierownictwem Pana prof. Jerzego Klamki opracował aplikację internetową oraz bazę danych gromadzącą informację o pacjentach. Działanie aplikacji, opracowanej w języku PHP, przetestowano we wszystkich popularnych przeglądarkach internetowych. Do korzystania z programu uczestnicy Sieci potrzebowali komputera z dostępem do Internetu. Jako środowisko uruchomieniowe dla skryptów wykorzystano serwer Apache. Do rejestracji i przetwarzania gromadzonych informacji wykorzystano system relacyjnych baz danych MySQL. Instytut współuczestniczył również przy opracowaniu ostatecznym bazy danych wraz z jej analizą. Dane były zbierane bezpośrednio w ośrodkach z zachowaniem zasad bezpieczeństwa, tj. dostęp do bazy danych był chroniony unikatowym hasłem i był realizowany przez osoby wskazane przez kierownika jednostki. Przed scaleniem bazy i wykonaniem analiz dokonano przeglądu kompletności danych: procedura została zakończona 31 marca 2012 roku.

Analizy epidemiologiczne przeprowadzono z zastosowaniem następujących definicji (zgodnie ze „Słowniczkiem terminów epidemiologicznych” Państwowego Zakładu Higieny (dostęp *on-line*)):

- Współczynnik zapadalności (ang. *incidence rate*) jest miarą częstości pojawiania się nowych przypadków choroby lub innego zdarzenia związanego ze zdrowiem odniesiona do ram czasowych. Jest wyliczany jako liczba nowych przypadków w określonym czasie podzielony przez średnią liczebność populacji, zwykle w środku okresu obserwacji lub do sumy osobo-czasu obserwacji populacji pozostającej w ryzyku.
- Zapadalność (ang. *incidence*) jest to miara częstości występowania chorób, stanowiąca iloraz nowych zachorowań, które pojawiły się w określonym

przedziale czasowym w określonej populacji w stosunku do liczebności tej populacji.

- Współczynnik śmiertelności (ang. *case-fatality ratio*) opisuje ryzyko zgonu osoby chorej na daną chorobę. Jest to proporcja osób w określonym stanie zdrowia lub ekspozowanych na określony czynnik lub zdarzenie, która umiera z powodu tego stanu. W mianowniku występuje liczba osób chorych lub narażonych, a w liczniku liczba zgonów, jaka wśród nich wystąpiła.
- Współczynnik umieralności opisuje ryzyko zgonu danego pacjenta. Jest to stosunek liczby wszystkich zgonów w badanej populacji w określonym przedziale czasowym do liczebności tej populacji w połowie przedziału czasowego; zwykle przeliczany na 100 000 ludności na rok.
- Prewalencja (ang. *prevalence*) to liczba osób posiadająca daną cechę podzielona przez liczebność całej próby lub populacji, do której osoby te należą. Prewalencja choroby nosi nazwę chorobowości.

Do zbadania istotności różnic dla analiz epidemiologicznych posłużono się testem χ^2 , za pomocą którego przedstawiono związki pomiędzy poszczególnymi badanymi grupami oraz testem G^2 (G-likelihood ratio), jeśli liczba rekordów wynosiła 0. Ponadto wykorzystano także testy t-Studenta i Manna-Whitneya. W analizach porównawczych wykorzystano test post-hoc Kramera-Tuckeya. Relacje pomiędzy poszczególnymi parametrami (zmienne ciągłe) były badane przy pomocy testu ANOVA. Jeśli rozkład zmiennych ciągłych był niezgodny z rozkładem normalnym, przeprowadzono test nieparametryczny Kruskala-Wallisa. Za próg istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$.

4.1.1 Określenie niezależnego wpływu poszczególnych czynników na zapadalność związaną z zakażeniami powodowanymi przez *Escherichia coli* w badanych grupach

Zakażenia, w których z pobranych materiałów wyizolowano *E. coli*, porównano do zakażeń, w których z pobranych materiałów nie wyizolowano *E. coli* w odniesieniu do: masy urodzeniowej, wieku ciążowego, skali APGAR, płci, rodzaju porodu (poród

siłami natury, poród przez cięcie cesarskie) oraz zastosowanej okołoporodowej profilaktyki antybiotykowej. Związek między prawdopodobieństwem wystąpienia zakażenia, w którym jako czynnik etiologiczny wyizolowano *E. coli*, a zmiennymi ciągłymi (np. wiek ciążowy) zbadano przy pomocy testu ANOVA. Jeśli rozkłady badanych zmiennych nie były zgodne z rozkładem normalnym, zastosowano test nieparametryczny Kruskala-Wallisa.

4.2 Oznaczanie lekooporności metodami fenotypowymi

Do określenia lekowrażliwości wykorzystano metodę Kirby-Bauera. Sporządzano zawiesiny w 0,9% soli fizjologicznej o gęstości 0,5 w skali MacFarlanda (wartość zmierzono z wykorzystaniem densytometru MacFarlanda (Biosan SIA., Łotwa)), które przy pomocy jałowego wacika (Equimed, Polska) wysiewano na płytki Petriego zawierające podłoże agarowe Mueller-Hintona (BioCorp, Polska). Na tak przygotowane podłoże nakładano krążki nasączone antybiotykami, po czym wynik odczytywano po 18 h inkubacji w 37°C. W badaniu wykorzystano następujące krążki z antybiotykiem lub chemioterapeutykiem: ampicylina (AMP; 10 µg), amoksycylina z kwasem klawulanowym (AMC; 20 µg i 10 µg), piperacylina z tazobaktamem (TZP, 30 µg i 6 µg), cefepim (FEP; 30 µg), cefotaksym (CTX; 5 µg), ceftazydym (CAZ; 10 µg), cefuroksym (CXM, 30 µg), doripenem (DOR, 10 µg), ertapenem (ETP, 10 µg), imipenem (IMP, 10 µg), meropenem (MEM, 10 µg), aztreonam (ATM; 30 µg), ciprofloksacyna (CIP; 5 µg), amikacyna (AK, 30 µg), gentamycyna (GN, 10 µg), tobramycyna (TOB, 10 µg), tygecyklina (TGC, 15 µg), chloramfenikol (C, 30 µg), trimetoprim-sulfametoksazol (SXT; 25 µg). Wszystkie krążki pochodziły z firmy Oxoid (Basingstoke, Wielka Brytania).

Wartości MIC na wybrane leki z grupy chinolonów i fluorochinolonów (kwas nalidyksowy, lewofloksacyna, ofloksacyna, ciprofloksacyna) określano z zastosowaniem metody E-testu (bioMerieux, Francja). Na wysiane na agarze Mueller-Hintona (BioCorp, Polska) zawiesiny bakteryjne nakładano jałową pęsetą E-test. Wynik odczytywano po 18 h inkubacji w 37°C.

Zdolność do syntezy ESBL wykrywano przy pomocy rozszerzonego testu dwóch krążków (ang. *double disk synergy test*, DDST) według metody Drieux *et al.*

[121]. Stosowano krążki z ceftazydymem 10 µg, cefotaksymem 5 µg, cefepimem 30 µg oraz aztreonamem 30 µg, które układano w odległości 2 cm od centralnie ułożonego krążka z amoksycyliną z kwasem klawulanowym 20/10 µg na wysiane zawiesiny bakteryjne na agarze Mueller-Hintona. Wynik testu uznawano za pozytywny, jeśli strefa zahamowania wzrostu wokół krążka ze skrajnie położonym antybiotykiem ulegała powiększeniu od strony centralnie umieszczonego krążka z kwasem klawulanowym.

Wykorzystane odczynniki

- Sól fizjologiczna 0,9% NaCl
- Podłoże Mueller-Hintona LAB-AGAR™ (BioCORP Polska) (Ekstrakt wołowy 2 g/l, kwaśny pepton kazeinowy 17,5 g/l, skrobia 1,5 g/l, agar 17 g/l; końcowe pH w 25°C: $7,4 \pm 0,2$).

4.3 Izolacja DNA genomowego

Izolację genomowego DNA prowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu kolumnkowego (A&A Biotechnology, Gdynia), zgodnie z wytycznymi producenta. Do izolacji DNA wykorzystano odwirowaną (12 000 rpm, 5 min.) 18 h hodowlę (37°C) komórek bakteryjnych, prowadzoną w podłożu Tryptic Soy Broth (TSB). Po usunięciu supernatantu pozostały osad zawieszano w buforze Tris-EDTA (TE). Następnie komórki poddano lizie z wykorzystaniem roztworu lizującego LT w obecności proteiny K. Mieszaninę po energicznym zmieszaniu i odwirowaniu (3 min., 10 000 rpm) наносzono na minikolumnę ze złożem krzemionkowym do oczyszczania genomowego DNA. W kolejnym etapie przeprowadzano dwukrotne płukanie przy pomocy roztworu płuczającego A1, zawierającego alkohol. W efekcie DNA wiązało się do złoża minikolumny, a dwukrotne przemywanie roztworem A1 miało na celu usunięcie zanieczyszczeń i/lub inhibitorów reakcji. Elucję DNA prowadzono przy pomocy niskojonowego buforu Tris ogrzanego do temperatury 75°C. Wyizolowane DNA przechowywano w probówkach w temperaturze 4°C do dalszych analiz. Po izolacji DNA przeprowadzano pomiar spektrofotometryczny z wykorzystaniem urządzenia NanoDrop (ThermoScientific, USA) w celu określenia stężenia DNA w próbce (ng/µl).

Wykorzystane odczynniki:

- Podłoże TSB (BioCORP Polska) o następującym składzie: trzustkowy hydrolizat kazeiny 17 g/l, hydrolizat papainowy mączki sojowej 3,0 g/l, chlorek sodu 5g/l, wodorofosforan potasu 2,5g/l, dekstroza 2,5g/l, pH 7,3
- Bufor TE (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH=8,0) (Serva, Niemcy)
- Bufor Tris (10 mM TrisHCl, pH=8,0) (Serva, Niemcy)
- Bufor lizujący LT (A&A Biotechnology, Gdynia)
- Roztwór płuczający A1 (A&A Biotechnology, Gdynia)
- Proteinaza K 20 mg/ml (A&A Biotechnology, Gdynia)

4.4 Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) i elektroforeza

Wszystkie mieszaniny do reakcji PCR przygotowywano na lodzie. Objętość mieszaniny przewidziana na 1 próbkę wynosiła 25 μ l.

Mieszanina do reakcji PCR zawierała:

1. 2xPCR Master Mix (A&A Biotechnology, Gdynia) o następującym składzie:
 - polimeraza DNA *Taq* 0,1 U/ μ l;
 - chlorek magnezu o stężeniu 4 mM;
 - każdy z czterech trifosforanodeoksynukleotydów dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) o stężeniu 0,5 mM każdego z dNTP;
 - czerwony barwnik i bufor obciążający;
2. Specyficzne startery (przedni i wsteczny) w stężeniu 1 μ M każdy (Genomed, Warszawa);
3. Matrycę genomowego DNA bakteryjnego w stężeniu 50 ng, która w kontroli negatywnej zastępowana była wodą destylowaną.

Przygotowaną mieszaninę reakcyjną umieszczano w termocyklerze PTC-200 (BioRad, California, USA). Amplifikacje prowadzono zgodnie z odpowiednimi programami – temperatura przyłączania starterów oraz liczba cykli podane są w Tabeli 2 (zależnie od wykorzystanych starterów).

Elektroforezę prowadzono w żelu agarozowym, służącym do rozdzielania łańcuchów DNA o różnej długości po reakcji PCR. Po amplifikacji, 10 µl mieszaniny reakcyjnej nakładano na 1,5% żel agarozowy w buforze Tris-boran-EDTA (TBE) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), z dodatkiem bromku etydy (BioRad, California, USA). W celu porównania wielkości produktu wykorzystano Marker DNA 100-1000 bp (A&A Biotechnology, Gdynia). Elektroforezę prowadzono przez około 60 min., pod napięciem 80 V z użyciem aparatu do elektroforezy poziomej SubCell GT (BioRad, California, USA). Wynik elektroforezy oglądano przy użyciu systemu GelDocIt Imaging System (UVP, Kalifornia, USA) kontrolowanego przez program komputerowy do dokumentacji i analizy obrazu DOC-IT ®LS.

Wykorzystane odczynniki

- 2xPCR Master Mix (A&A Biotechnology, Gdynia)
- Startery: przedni i wsteczny (Genomed, Warszawa), wymienione w Tabeli 2
- Agaroz Plus (Prona Marine Research Institute, Hiszpania)
- Bufor TBE (45 mM Tris buforowany kwasem borowym do pH=8,0, 1 mM EDTA) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Bromek etydy (10 mg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Marker DNA 100-1000bp (A&A Biotechnology, Gdynia)

4.5 Reakcja Multiplex-PCR

Reakcja ta służy do amplifikowania wielu matryc podczas jednej reakcji PCR. Dzięki jednoczesnemu wykorzystaniu różnych zestawów starterów, metoda ta zapewnia oszczędność czasu oraz pozwala obniżyć koszty przeprowadzanych badań przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej jakości uzyskiwanych wyników.

Mieszaniny do reakcji multiplex-PCR przygotowywano na lodzie. Objętość mieszaniny przewidziana na 1 próbkę wynosiła 50 µl.

Mieszanina do reakcji PCR zawierała:

1. 2x PCR MasterMix (A&A Biotechnology, Gdynia) o następującym składzie:
 - a. polimeraza DNA *Taq* w stężeniu 0,1 U/µl;
 - b. chlorek magnezu w stężeniu 4 mM;

- c. każdy z czterech trifosforanodeoksynukleotydów dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 0,5 mM każdego z dNTP;
 - d. czerwony barwnik i bufor obciążający;
2. Specyficzne pary starterów przednich i wstecznych w stężeniu 1 μ M każdy (Genomed, Warszawa);
 3. Matrycę genomowego DNA bakteryjnego w stężeniu 50 ng, która w kontroli negatywnej zastępowana była wodą destylowaną.

Przygotowaną mieszaninę reakcyjną umieszczano w termocyklerze PTC-200 (BioRad, California, USA). Amplifikacje prowadzono zgodnie z odpowiednimi programami (Tabela 2).

Po amplifikacji 10 μ l mieszaniny reakcyjnej nakładano na 1,5% żel agarozowy w buforze TBE, z dodatkiem bromku etydy (BioRad, California, USA). W celu porównania wielkości produktu wykorzystano Marker DNA 100-1000bp (A&A Biotechnology, Gdynia). Elektroforezę prowadzono przez około 60 min., pod napięciem 80 V z użyciem aparatu do elektroforezy poziomej SubCell GT (BioRad, California, USA). Wynik elektroforezy oglądano przy użyciu systemu GelDocIt Imaging System (UVP, Kalifornia, USA) kontrolowanego przez program komputerowy do dokumentacji i analizy obrazu DOC-IT [®]LS.

Wykorzystane odczynniki

- 2xPCR Master Mix (A&A Biotechnology, Gdynia)
- Startery przedni i wsteczny (Genomed, Warszawa), wymienione w Tabeli 2
- Agaroz Plus (Prona Marine Research Institute, Hiszpania)
- Bufor TBE (45 mM Tris buforowany kwasem borowym do pH=8,0, 1 mM EDTA) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Bromek etydy (10 mg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Marker DNA 100-1000 bp (A&A Biotechnology, Gdynia)

4.6 Identyfikacja gatunkowa

Potwierdzenie identyfikacji gatunkowej wszystkich szczepów prowadzono z wykorzystaniem reakcji PCR i gatunkowo specyficznych starterów,

komplementarnych do regionu 16S-23S rRNA, silnie konserwatywnego w obrębie gatunku [170, 171]. Startery wymieniono w Tabeli 2.

4.7 Wykrywanie genów kodujących oporność na wybrane antybiotyki

Przeprowadzano wykrywanie genów kodujących oporność na wybrane antybiotyki z wykorzystaniem reakcji PCR i specyficznych starterów, wymienionych w Tabeli 2:

- Geny kodujące β -laktamazy: *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} [172]. Reakcje prowadzono zgodnie ze zmodyfikowanym protokołem, oddzielnie z każdą parą starterów, z uwagi na konieczność wysyłania produktów reakcji do sekwencjonowania;
- Geny kodujące β -laktamazy PER, GES i VEB [173-175];
- Gen kodujący karbapenemazę KPC [176];
- Geny kodujące oksacylinyazy OXA-1 [177].

4.8 Wykrywanie kodowanych plazmidowo genów oporności na fluorochinolony *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrD*, *qnrC*, *qepA* i *aac*-(6')-Ib-cr

Do wykrywania kodowanych plazmidowo genów oporności na fluorochinolony *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrD*, *qnrC* i *qepA* wykorzystano real-time PCR, czyli łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym [178]. Technika ta charakteryzuje się zwiększoną czułością w stosunku do klasycznego PCR a także daje możliwość analizy i wizualizacji produktów jeszcze w czasie trwania reakcji. Wykorzystano wyizolowane uprzednio DNA. Reakcję real-time PCR przeprowadzono z wykorzystaniem urządzenia CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, California, USA). Allele genu *qnr* wykrywano z wykorzystaniem analizy high-resolution melting analysis (HRMA). Wykrywanie genu

qepA odbywała się z wykorzystaniem zestawu SYBR Green I Master (Roche Molecular Diagnostics, Germany).

Wykrywanie wariantu *-cr* genu *aac(6')-Ib*, który koduje acetylotransferazę aminoglikozydową i powoduje obniżoną wrażliwość na ciprofloksacynę przeprowadzano według metody opisanej przez Park *et al.* [179]. W pierwszym etapie przeprowadzano reakcję PCR z pierwszą parą starterów. Następnie, w przypadku otrzymania pozytywnego wyniku reakcji PCR, produkty wysyłano do sekwencjonowania z tym samym starterem przednim i innym starterem wstecznym (Tabela 2) w celu wykrycia także wariantu genu *aac(6')-Ib-cr*, który nie posiada miejsca restrykcyjnego *BstF5I*, obecnego w genie *aac(6')-I* [179].

Wykorzystane odczynniki

- SYBR Green I Master (Roche Molecular Diagnostics, Niemcy)
- Startery przedni i wsteczny (Genomed, Warszawa, Polska), wymienione w Tabeli 2
- Woda DEPC (wolna od RNAz woda z dodatkiem dietylopirowęgłanu) (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska)

4.9 Procedura koniugacji

Dla wybranych szczepów, posiadających geny plazmidowo determinowanej oporności na fluorochinolony, przeprowadzano proces koniugacji do szczepu bakterii biorcy (*Escherichia coli* J53, z genomowo kodowaną opornością na azydek sodu i rifampicynę, otrzymany dzięki uprzejmości Pana dr Thomasa Guillarda, Hôpital Robert Debré - CHU de Reims, Francja). Szczep *Escherichia coli* J53 (F(-) met pro Azi(r)) jest auksotroficznym pochodnym szczepem *E. coli* K-12, który jest oporny na azydek sodu. Ten szczep wykorzystywany jest w eksperymentach nad koniugacją jako szczep biorca. Jego genom jest zsekwencjonowany.

Do 20 ml płynnego podłoża TSB zawierającego cefotaksym w stężeniu 1 mg/ml dodawano 1 kolonię szczepu bakterii, uprzednio wyhodowanych na podłożu TSA i hodowano w temperaturze 37°C aż do momentu osiągnięcia logarytmicznej fazy wzrostu (określanej przy pomocy pomiaru spektrofotometrycznego, OD_{600nm} = 0,4-0,6). Następnie, 200 µl komórek dawcy mieszano z 800 µl komórek biorcy (I tura), zaś 800 µl komórek dawcy z 200 µl komórek biorcy (II tura) i tak uzyskane mieszaniny bakterii

hodowano przez 3 h w 37°C w cieplarni z wytrząsaniem (60rpm/min). Następnie po 100 µl z każdej mieszaniny (Tura I, Tura II) wysiano na następujące podłoża:

- podłoże TSB z cefotaksymem (1 mg/l) – podłoże kontrolne dla hodowli szczepów dawców,
- podłoże TSB z rifampicyną (250 mg/l) i azydkiem sodu (100 mg/l) – podłoże kontrolne dla hodowli szczepów biorców,
- podłoże TSB z cefotaksymem (1 mg/l), rifampicyną (250 mg/l) i azydkiem sodu (100 mg/l) – podłoże selekcyjne dla hodowli transkonjugantów,

i hodowano przez 18 h w 37°C.

Następnego dnia analizowano uzyskane wyniki:

- brak wzrostu bakterii na płytkach z podłożami kontrolnymi i/lub podłożu selekcyjnym oznaczał niepowodzenie prowadzonego eksperymentu i konieczność jego powtórzenia;
- brak wzrostu bakterii na płytce z podłożem selekcyjnym przy jednoczesnym wzroście kolonii na płytkach z podłożem kontrolnym oznaczał niepowodzenie prowadzonego eksperymentu i konieczność jego powtórzenia;
- wzrost bakterii na płytce z podłożem selekcyjnym przy jednoczesnym wzroście kolonii na płytkach z podłożem kontrolnym oznaczał pozytywny wynik eksperymentu i możliwość prowadzenia dalszych analiz.

W przypadku uzyskania wzrostu kolonii na płytce z podłożem selekcyjnym, jedną kolonię przesiewano ponownie na podłoże selekcyjne i hodowano w 37°C przez 18 h. Kolejnym etapem było przeprowadzenie testu DDST (zgodnie z opisem w podrozdziale 4.2) na podłożu Mueller-Hintona z rifampicyną (250 mg/ml) oraz izolacja DNA wg metody opisanej w podrozdziale 4.3 i przeprowadzenie reakcji real-time PCR wykrywającej geny z rodziny *qnr*, opisanej w podrozdziale 4.8. Jeśli zarówno test DDST, jak i reakcja real-time PCR dały wynik pozytywny, kwalifikowano szczep jako niosący geny ESBL i *qnr* na tym samym plazmidzie. Jeśli test DDST dał wynik pozytywny, zaś reakcja real-time PCR negatywny, kwalifikowano szczep jako niosący geny ESBL i *qnr* na różnych plazmidach.

Dla transkonjugatów określano także przynależność plazmidu do grupy według schematu klasyfikacji plazmidów podanej przez Hedges i Datta, szczegółowo opisanego w podrozdziale 4.10.

Wykorzystane odczynniki

- pożywka płynna TSB (BioCORP Polska)
- podłoże TSA (BioCORP Polska) (trypton 15 g/l, soytone 5 g/l, NaCl 5 g/l, agar 15 g/l)
- cefotaksym (Cefotaxime sodium, A&A Biotechnology, Gdynia)
- rifampicyna (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- azydek sodu (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- podłoże wg Mueller-Hintona (BioCORP Polska)

4.10 Określenie przynależności plazmidu wyizolowanego z danego szczepu bakteryjnego do grupy – typowanie replikonów plazmidowych

Typowanie replikonów plazmidowych jest metodą opartą na reakcji PCR, i pozwala zbadać filogenetyczne pokrewieństwo pomiędzy plazmidami. Protokół opracowany przez Carattoli *et al.* pozwala zaklasyfikować plazmidy do najczęściej występujących grup w rodzinie *Enterobacteriaceae* [162]. Wybrane szczepy przebadano pod kątem obecności 18 replikonów plazmidowych z wykorzystaniem pięciu paneli reakcyjnych Multiplex-PCR oraz trzech reakcji Sigleplex-PCR:

- Multiplex 1: HI1, HI2, I1;
- Multiplex 2: L/M, N, X;
- Multiplex 3: FIA, FIB, W;
- Multiplex 4: Y, P, FIC;
- Multiplex 5: T, A/C, FIIS;
- Reakcje singleplex dla: F, K, B/O.

Wszystkie mieszaniny do PCR przygotowano na lodzie z wykorzystaniem starterów wymienionych w Tabeli 2. Amplifikacje prowadzono zgodnie z odpowiednimi programami (Tabela 2). Reakcje przygotowano zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 4.5. Reakcje Singleplex-PCR przygotowano w sposób opisany w podrozdziale 4.4. Wszystkie kontrole pozytywne otrzymano dzięki uprzejmości Pani prof. Alessandry Carattoli (Istituto Superiore di Sanita, Rome, Italy).

Po zakończonej reakcji amplifikacji próbki w objętości 10 µl nakładano na 1,5% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydy (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), w celu stwierdzenia obecności produktu reakcji PCR. W celu porównania wielkości produktu wykorzystano Marker DNA 100-1000b p (A&A Biotechnology, Gdynia). Elektroforezę prowadzono w buforze TBE (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), przez około 60 min., pod napięciem 80 V. Wynik elektroforezy oglądano przy użyciu systemu GelDocIt Imaging System (UVP, Kalifornia, USA) kontrolowanego przez program komputerowy do dokumentacji i analizy obrazu DOC-IT ®LS.

Wykorzystane odczynniki

- Startery przedni i wsteczny (Genomed, Warszawa), wymienione w Tabeli 2
- Agaroz Plus (Prona Marine Research Institute, Hiszpania)
- Bufor TBE (45 mM Tris buforowany kwasem borowym do pH=8,0, 1 mM EDTA) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Bromek etydy (10 mg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Marker DNA 100-1000 bp (A&A Biotechnology, Gdynia)

4.11 Analiza genetycznego podobieństwa pomiędzy szczepami

4.11.1 Typowanie badanych szczepów metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE)

Analizę genotypowego podobieństwa pomiędzy szczepami przeprowadzono zgodnie z protokołem *Centers for Disease Control and Prevention* [180].

Izolację DNA prowadzono z wykorzystaniem 18 h hodowli bakteryjnej w podłożu TSB. Po odwirowaniu (10000 rpm, 5 min.) 1,5 ml hodowli, nadsącz wylewano, zaś osad płukano buforem SE i ponownie odwirowywano (10000 rpm, 5 min.). Następnie osad zawieszano w 150 µl buforu płuczącego Wash Buffer I i dodawano agarozę Clean Cut (2%, podgrzana do 50°C). Po sporządzeniu bloczków (z wykorzystaniem plastikowych foremek *plug molds*) inkubowano je w buforze lizującym Lysis Buffer z dodatkiem enzymu Proteinazy K (AppliChem, Niemcy) przez 18 h w 54°C. Następnie bloczki płukano czterokrotnie po 30 min.

z wykorzystaniem buforu TE i równoważono przez 30 min. w buforze Tango (ThermoScientific). Przeprowadzono cięcie restrykcyjne enzymem *XbaI* (25U) w temperaturze 37°C przez 18 h. Fragmenty chromosomalnego DNA z 1/3 objętości błočka rozdzielano w 1% agarozie do PFGE w 0,5xTBE w aparacie CHEF DR II (BioRad, Polska) w warunkach charakterystycznych dla poszczególnych gatunków. Warunki te opisano w podrozdziałach dotyczących charakterystyki poszczególnych gatunków (podrozdział 4.13.4 dla *E. coli*, podrozdział 4.14.3 dla *K. pneumoniae*, podrozdział 4.16.1 dla *K. oxytoca*, podrozdział 4.17.1 dla *Enterobacter* sp., podrozdział 4.18.1 dla *Serratia* sp.).

Wizualizację żelu prowadzono po barwieniu z użyciem bromku etydy (stężenie 0,5 µg/ml, 30 min.) z wykorzystaniem aparatu GelDocIt Imaging System (UVP, Kalifornia, USA) kontrolowanego przez program komputerowy do dokumentacji i analizy obrazu DOC-IT ®LS. Do analizy wyników wykorzystano komputerowy program GelCompar (Applied Maths, Kortrijk, Belgia). Wyniki przedstawiono w postaci dendrogramu podobieństw. W jego konstruowaniu zastosowano metodę najbliższego sąsiedztwa (ang. *Unweighted Pair Group Method Analysis*, UPGMA), polegającą na łączeniu wzorów restrykcyjnych dwóch najbardziej do siebie podobnych szczepów, następnie dołączaniu kolejnego najbardziej podobnego i tworzeniu w ten sposób drzewa podobieństw. Do porównania profili DNA zastosowano współczynnik Dice (ang. *Dice coefficient similarity*). Dendrogram generowano przy 1,0% optymalizacji i 1,0% tolerancji położenia prążka.

Wykorzystane odczynniki:

- Podłoże TSB (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Bufor SE (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH=8,0)
- Wash Buffer I (10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH=7,2)
- Bufor TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=8,0)
- Lysis Buffer (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% SDS, pH=8,0)
- Agaroz Clean Cut (2%) (BioRad, California, USA)
- Bufor do enzymu restrykcyjnego Tango (Fermentas/ThermoScientific)
- Enzym restrykcyjny *XbaI* (Fermentas/ThermoScientific)
- Bufor TBE (45 mM Tris buforowany kwasem borowym do pH=8,0, 1 mM EDTA) (BioRad, California, USA)
- Bromek etydy (10 mg/ml) (BioRad, California, USA)

- Proteinaza K (20 mg/ml) (AppliChem, Niemcy)
- Agaroza do PFGE (BioRad, California, USA)

4.11.2 Określenie podobieństwa genetycznego pomiędzy szczepami metodą Multilocus Sequence Typing (MLST)

W pierwszym etapie analizy przeprowadzano amplifikację siedmiu genów metabolizmu podstawowego bakterii z siedmioma parami starterów z wykorzystaniem reakcji PCR (Tabela 2). Reakcje PCR składano na lodzie w sposób charakterystyczny dla poszczególnych gatunków. Procedura składania reakcji PCR jak i amplifikacji poszczególnych produktów jest szczegółowo opisana w podrozdziałach dotyczących charakterystyki poszczególnych gatunków (podrozdział 4.13.5 dla *E. coli* oraz 4.14.4 dla *K. pneumoniae*). Następnie prowadzono elektroforezę produktów na żelu agarozowym (1,5%) i sekwencjonowanie produktów PCR (przeprowadzano w firmie Genomed, Warszawa). Opis sekwencjonowania przedstawiono w podrozdziale 4.12.

Uzyskane sekwencje nukleotydowe porównano do znanych alleli dla każdego *locus* genu przy użyciu oprogramowania dostępnego na stronach internetowych (<http://mlst.ucc.ie/> oraz <http://pubmlst.org/data/>). Dla każdego szczepu wygenerowano siedem cyfrowych profili, które definiują dany typ ST. Ponieważ w każdym z siedmiu badanych *loci* znajduje się wiele alleli, nie jest możliwe, by dwa szczepy posiadały przypadkowo ten sam profil. Szczepy o tym samym profilu były zatem klasyfikowane do tego samego typu klonalnego [158].

Wykorzystane odczynniki:

- Termostabilna polimeraza DreamTaq w stężeniu 5 U/μl (Thermo Scientific)
- Bufor reakcyjny do polimerazy zawierający 20 mM MgCl₂ (Thermo Scientific).
- Trifosforanodeoksynukleotydy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) w stężeniu 200 μM każdy (Thermo Scientific)
- Bufor reakcyjny do polimerazy zawierający: 10mM Tris-HCl pH=8,0, 50mM KCl, 0,1% Triton X-100 (Thermo Scientific)
- Startery przedni i wsteczny (Genomed, Warszawa), wymienione w Tabeli 2
- Agaroza Plus (Prona Marine Research Institute, Hiszpania)

- Bufor TBE (45 mM Tris buforowany kwasem borowym do pH=8,0, 1 mM EDTA) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Bromek etydyny (10 mg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Marker DNA 100-1000bp (A&A Biotechnology, Gdynia)

4.12 Sekwencjonowanie

Produkt amplifikacji reakcji PCR z użyciem specyficznych starterów poddano reakcji sekwencjonowania w komercyjnym laboratorium (Genomed, Warszawa). Matryce przygotowano zgodnie z zaleceniami laboratorium:

- Przygotowano startery przedni i wsteczny, odpowiednie dla każdego sekwencjonowania: w stężeniu 5 pmol/μl (5 μM), w objętości 10 μl.
- DNA: zawieszony w wodzie, w objętości nie mniejszej niż 12 μl, w ilości (minimum):
 - produkt PCR < 500 pz 50 ng
 - produkt PCR 500-1000 pz 100 ng
 - produkt PCR > 1000 pz 200 ng
- Produkty PCR były oczyszczone ze starterów, dNTP-ów i zawieszone w wodzie.

Każdorazowo załączano także zdjęcie żelu matrycowego DNA.

Do sekwencjonowania wykorzystano startery użyte w reakcji PCR (Tabela 2). Po zsekwencjonowaniu, w programie ChromasPro® przeprowadzono analizę otrzymanych fluorogramów:

- Z początku i końca zsekwencjonowanych nici usunięto nukleotydy o niepewnej identyfikacji.
- Nici porównano ze sobą i sklejono w jeden kontig.
- Tak utworzony kontig przeanalizowano przy pomocy algorytmu *blastn* (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) – sekwencje nukleotydowe porównano do znanych sekwencji genów dostępnych w banku genów (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Za identyczne uznano sekwencje, których współczynnik podobieństwa wynosił przynajmniej 99%.

4.13 Charakterystyka szczepów *Escherichia coli*

Oznaczenie lekooporności przeprowadzano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.2. Oznaczono wartość MIC dla leków z grupy chinolonów i fluorochinolonów zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.2. Izolację genomowego DNA przeprowadzano tak, jak opisano w podrozdziale 4.3. Identyfikację gatunkową przeprowadzano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.6. Wykrywano geny oporności na antybiotyki β -laktamowe zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.7. Wykrywano kodowane plazmidowo geny oporności na fluorochinolony zgodnie z procedurą z podrozdziału 4.8. Określano, czy geny oporności na antybiotyki β -laktamowe i fluorochinolony znajdują się na tym samym plazmidzie, wykorzystując procedurę opisaną w podrozdziale 4.9. Przeprowadzono typowanie replikonów plazmidowych zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.10.

4.13.1 Wykrywanie genów wirulencji *Escherichia coli*

Do wykrywania wybranych genów kodujących czynniki wirulencji *E. coli* zastosowano reakcję PCR ze specyficznymi starterami (Tabela 2). Mieszaniny do PCR przygotowywano zgodnie z opisem umieszczonym w podrozdziale 4.4. W ten sposób prowadzono wykrywanie następujących genów kodujących czynniki wirulencji:

- gen *hlyA* – określenie zdolności hemolitycznej szczepów *E. coli*;
- geny niezbędne w procesie adhezji i inwazji szczepów *E. coli*, geny kodujące białka fimbrialne oraz białka receptorowe i transportowe:
 - adhezyny: *papC* and *papEF* (fimbrie P), *sfa/foc* (fimbrie S lub F1C), *fimH* (pilusy typu 1), *iha*;
 - siderofory: *iucC* (aerobaktyna), *iroN* (receptor salmochelinowy), *iutA* (receptor aerobaktyn), *fyuA* (receptor yersiniabaktyn), *ireA*, *fepA*, *fhuA*, *fecA* (receptory sideroforów);
 - *ibeA* (związany z zapaleniem opon mózgowych u noworodków);
 - *neuC* (antygen otoczki K1).

4.13.2 Wykrywanie klonu epidemicznego *Escherichia coli* ST131

Do amplifikacji fragmentu genu *pabB*, specyficznego dla szczepów należących do klonu O25b-ST131, wykorzystano procedurę wg Clermonta *et al.*[181]. Mieszaniny do PCR przygotowywano zgodnie z opisem umieszczonym w podrozdziale 4.4.

4.13.3 Klasyfikacja filogenetyczna szczepów *Escherichia coli*

Klasyfikację szczepów *E. coli* do jednej z czterech głównych grup filogenetycznych (A, B1, B2, D) przeprowadzano zgodnie z procedurą opisaną przez Clermonta *et al.* [182] z wykorzystaniem reakcji multiplex PCR, opisanej w podrozdziale 4.5. Wykorzystano startery komplementarne do następujących genów i fragmentów DNA:

- *chuA* – gen niezbędny do transportu hemu w enterokrwotocznych szczepach *E. coli* O157:H7;
- *yjaA* – gen o nieustalonej funkcji, obecny u *E. coli* K-12;
- TSPE4.C2 – anonimowy fragment DNA.

Przypisywanie do poszczególnych grup filogenetycznych odbywało się zgodnie z następującym algorytmem:

- Obecny gen *chuA*, obecny gen *yjaA* – grupa B2;
- Obecny gen *chuA*, brak genu *yjaA* – grupa D;
- Brak genu *chuA*, obecny fragment TSPE4.C2 – grupa B1;
- Brak genu *chuA*, brak fragmentu TSPE4.C2 – grupa A.

4.13.4 Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym – PFGE

Wszystkie szczepy *Escherichia coli* zostały poddane typowaniu molekularnemu z wykorzystaniem elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym, według procedury opisanej w podrozdziale 4.11.1 w następujących warunkach rozdziału:

- napięcie 6V/cm,
- temperatura 14°C,
- impuls początkowy 2,2s,
- impuls końcowy 54,2s,
- czas rozdziału 20h.

4.13.5 Multilocus Sequence Typing

Określano podobieństwo genetyczne pomiędzy szczepami *Escherichia coli* pochodzącymi z przypadków zakażeń krwi w odniesieniu do typów ST. W tym celu wykorzystano metodę MLST, opisaną w podrozdziale 4.11.2. Reakcje PCR składano na lodzie tak, że typowa mieszanina reakcyjna zawierała:

1. Bufor reakcyjny do polimerazy zawierający 20 mM MgCl₂ (Thermo Scientific).
2. Każdy z czterech trifosforanodeoksynukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) w stężeniu 200 μM każdy (Thermo Scientific)
3. Specyficzne startery w stężeniu 1 μM każdy (Genomed, Warszawa)
4. Termostabilną polimerazę DreamTaq w stężeniu 5 U/μl (Thermo Scientific)
5. Matrycę genomowego DNA bakteryjnego w ilości 50 ng na próbkę, która w kontroli negatywnej zastępowana była wodą destylowaną.

Warunki amplifikacji dla *E. coli* były następujące:

- denaturacja wstępna: 95°C – 2 min.;
- 30 cykli:
 - denaturacja 95°C – 1 min.;
 - przyłączanie starterów (w zależności od startera: 54°C lub 60°C lub 58°C) – 1 min.;
 - wydłużanie 72°C – 2 min.;
- końcowe wydłużanie: 72°C – 5 min.

Następnie prowadzono elektroforezę produktów na żelu agarozowym (1,5%) i sekwencjonowanie produktów PCR (przeprowadzano w firmie Genomed, Warszawa). Opis sekwencjonowania przedstawiono w podrozdziale 4.12.

4.14 Charakterystyka szczepów *Klebsiella pneumoniae*

Oznaczanie lekooporności metodami fenotypowymi przeprowadzano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.2. Zdolność do produkcji ESBL oznaczano zgodnie z metodyką opisaną powyżej w podrozdziale 4.2. Oznaczono MIC dla leków z grupy chinolonów i fluorochinolonów zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.2. Izolację genomowego DNA przeprowadzano tak, jak opisano w podrozdziale 4.3. Identyfikację gatunkową przeprowadzano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.6. Wykrywano geny oporności na antybiotyki β -laktamowe zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.7. Wykrywano kodowane plazmidowo geny oporności na fluorochinolony zgodnie z procedurą z podrozdziału 4.8.

4.14.1 Wykrywanie genów wirulencji *Klebsiella pneumoniae*

Dla *K. pneumoniae* pochodzących z zakażeń krwi określono częstość występowania następujących genów oporności z wykorzystaniem reakcji PCR, zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.4:

- *rmpA* (ang. *regulator of the mucoid phenotype A*);
- *magA* (ang. *mucoviscosity-associated gene A*);
- *wabG* (gen zaangażowany w syntezę zewnętrznego rdzenia lipopolisacharodywego – ang. *the outer core lipopolysaccharide*);
- *uge* (gen kodujący enzym zaangażowany w syntezę otoczki);
- *kfu* (gen związany z systemem pobierania żelaza).

Wykorzystano startery wymienione w Tabeli 2.

4.14.2 Określanie typu otoczki *Klebsiella pneumoniae*

Do określania typu otoczki (K1, K2, K5, K20, K54, K57) szczepów pochodzących z przypadków zakażeń krwi zastosowano reakcję multiplex PCR, opisaną w podrozdziale 4.5 z wykorzystaniem wcześniej publikowanych sekwencji starterów (Tabela 2) [183].

4.14.3 Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym – PFGE

Wszystkie szczepy *K. pneumoniae* zostały poddane typowaniu molekularnemu z wykorzystaniem elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym, według procedury opisanej w podrozdziale 4.11.1 w następujących warunkach rozdziału:

- napięcie 6V/cm,
- temperatura 14°C,
- impuls początkowy 2s,
- impuls końcowy 35s,
- czas rozdziału 22h.

4.14.4 Multilocus Sequence Typing

Określano podobieństwo genetyczne pomiędzy szczepami *K. pneumoniae* pochodzącymi z przypadków zakażeń krwi w odniesieniu do typów ST. W tym celu wykorzystano metodę MLST, opisaną w podrozdziale 4.11.2. Reakcje PCR składano na lodzie tak, że typowa mieszanina reakcyjna zawierała (próbka o objętości 50 µl):

1. Bufor reakcyjny do polimerazy zawierający: 10 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100 (Thermo Scientific);
2. Każdy z czterech trifosforanodeoksynukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) w stężeniu 200 µM każdy (Thermo Scientific);
3. Specyficzne startery w stężeniu 1 µM każdy (Genomed Warszawa);
4. Termostabilną polimerazę *DreamTaq* w stężeniu 1U/µl (Thermo Scientific);
5. MgCl₂ w stężeniu 25 mM, z wyjątkiem reakcji ze starterami do genu *tonB*: 50 mM;
6. Matrycę genomowego DNA bakteryjnego w ilości 50 ng na próbkę, która w kontroli negatywnej zastępowana była wodą destylowaną.

Warunki amplifikacji dla *K. pneumoniae* były następujące:

- denaturacja wstępna: 94°C – 2 min.;
- 35 cykli:
 - denaturacja 94°C – 20 s;

- przyłączanie starterów (w zależności od startera: 50°C lub 45°C lub 60°C) – 30 s;
- wydłużanie 72°C – 30 s;
- końcowe wydłużanie: 72°C – 10 min.

Amplifikację prowadzono z wykorzystaniem termocyklera PTC-200 (BioRad, California, USA). Następnie prowadzono elektroforezę produktów na żelu agarozowym (1,5%), które następnie zsekwencjonowano w firmie Genomed, Warszawa. Opis sekwencjonowania przedstawiono w podrozdziale 4.12. Do sekwencjonowania użyto tych samych starterów, co do amplifikacji we wszystkich przypadkach, z wyjątkiem starterów do genów *infB* i *pgi* (Tabela 2).

4.14.5 Typowanie wybranych szczepów *Klebsiella pneumoniae* metodą zmiennej liczby tandemowych powtórzeń (VNTR)

Do analizy VNTR wybrano pulę 15 szczepów, reprezentujących różne genotypy (wg PFGE) oraz 15 szczepów reprezentujących trzy różne klony (wg MLST i PFGE). Przeprowadzono reakcje PCR w objętości 25 µl ze znanymi sekwencjami starterów (Tabela 2), reprezentujących 8 różnych *loci* [184]. Reakcje PCR składano na lodzie tak, że typowa mieszanina reakcyjna zawierała:

1. Bufor reakcyjny do polimerazy zawierający 20 mM MgCl₂ (Thermo Scientific);
2. Każdy z czterech trifosforanodeoksynukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) w stężeniu 200 µM każdy (Thermo Scientific);
3. Specyficzne startery w stężeniu 1 µM każdy (Genomed, Warszawa);
4. Termostabilną polimerazę *DreamTaq* w stężeniu 5 U/µl (Thermo Scientific)
5. Matrycę genomowego DNA bakteryjnego w ilości 50 ng na próbkę, która w kontroli negatywnej zastępowana była wodą destylowaną.

Przygotowaną mieszaninę reakcyjną umieszczano w termocyklerze PTC-200 (BioRad, California, USA). Amplifikacje prowadzono zgodnie z odpowiednimi programami – temperatura przyłączania starterów oraz liczba cykli podane są w Tabeli 2 (zależnie od wykorzystanych starterów). Po amplifikacji, 10 µl mieszaniny reakcyjnej nakładano na 1,5% żel agarozowy w buforze Tris-boran-EDTA (TBE) (Sigma Aldrich,

St. Louis, USA), z dodatkiem bromku etydyny (BioRad, California, USA). W celu porównania wielkości produktów wykorzystano Marker DNA 100-1000 bp (A&A Biotechnology, Gdynia) oraz Marker Dramix (A&A Biotechnology, Gdynia). Elektroforezę prowadzono przez około 60 min., pod napięciem 80 V z użyciem aparatu do elektroforezy poziomej SubCell GT (BioRad, California, USA). Wynik elektroforezy oglądano przy użyciu systemu GelDocIt Imaging System (UVP, Kalifornia, USA) kontrolowanego przez program komputerowy do dokumentacji i analizy obrazu DOC-IT ®LS.

Następnie określano wielkość prążków w porównaniu do markera wielkości. W ten sposób określano wielkość tandemowych powtórzeń i determinowano liczbę powtórzeń w danym *loci* dla każdego szczepu, znając wielkość danego tandemowego powtórzenia (Tabela 2). Uzyskane liczby powtórzeń porządkowano według *loci*: A, E, H, J, K, D, I, L, uzyskując w ten sposób numeryczny profil VNTR, który można było porównywać między szczepami. Część z produktów reakcji PCR poddano sekwencjonowaniu (korzystając z usług zewnętrznej firmy Genomed z siedzibą w Warszawie, zgodnie z opisem metody przedstawionym w podrozdziale 4.12) celem potwierdzenia prawidłowej interpretacji wyników. Wyniki sekwencjonowania analizowano z wykorzystaniem bezpłatnego oprogramowania dostępnego on-line (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>)

Wykorzystane odczynniki:

- Termostabilna polimeraza DreamTaq w stężeniu 5 U/μl (Thermo Scientific)
- Bufor reakcyjny do polimerazy zawierający 20 mM MgCl₂ (Thermo Scientific)
- Trifosforanodeoksynukleotydy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) w stężeniu 200 μM każdy (Thermo Scientific)
- Startery przedni i wsteczny (Genomed, Warszawa), wymienione w Tabeli 2
- Agaroza Plus (Prona Marine Research Institute, Hiszpania)
- Bufor TBE (45 mM Tris buforowany kwasem borowym do pH=8,0, 1 mM EDTA) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Bromek etydyny (10 mg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Marker DNA 100-1000 bp (A&A Biotechnology, Gdynia)
- Marker Dramix (A&A Biotechnology, Gdynia) o wielkości prążków w zakresie 142-3 794 bp

4.15 Ocena udziału plazmidów niskocząsteczkowych w powstawaniu fenotypu ESBL-dodatniego

Do izolacji plazmidów z wybranych losowo 10 szczepów *K. pneumoniae* i 10 szczepów *E. coli* wytwarzających ESBL zastosowano dostępne na rynku zestawy do preparacji DNA plazmidowego (Plasmid Mini Kit, Qiagen, Holandia). Objętość 5 ml płynnego bulionu lizogennego (LB) z dodatkiem ampicyliny (100 mg/l) posiano jedną kolonią i inkubowano przez 18 h w temperaturze 37°C. Tak uzyskaną zawiesinę rozcieńczano 500x do objętości 3 ml w płynnym LB i hodowano przez 16 h w temperaturze 37°C. Następnie zawiesinę wirowano (6000 g, 15 min, 4°C), zlano nadsącz, zaś komórki bakteryjne zawieszano w 300 µl buforu P1 i energicznie mieszano. Po dodaniu 300 µl buforu P2 i wymieszaniu próbki przez odwracanie (4-6 razy) inkubowano próbkę przez 5 min. w temperaturze pokojowej. Po dodaniu 300 µl buforu P3 i wymieszaniu próbki przez odwracanie (4-6 razy) inkubowano próbkę przez 5 min. na lodzie w celu precypitacji genomowego DNA, białek i resztek komórek bakteryjnych. Następnie próbkę wirowano (12000g, 10 min). Nadsącz komórkowy nakładano na kolumnkę i pozostawiano w celu przejścia lizatu przez kolumnkę pod wpływem siły grawitacji. Kolumnkę przemywano dwukrotnie 2 ml buforu QC. Następnie do kolumnki przyłączano nową próbkę typu Eppendorf i przeprowadzano elucję DNA z wykorzystaniem 0,8 ml buforu QF, a następnie doprowadzano do precypitacji DNA z użyciem 0,56 ml izopropanolu i wirowano (15000 g, 30 min.). Usunięto nadsącz, zaś osad przepłukano 1 ml 70% etanolu i wirowano (15000 g, 10 min.). Ponownie usunięto nadsącz bez naruszania osadu. Osad suszono przez 10 min. w temperaturze pokojowej i zawieszano w 100 µl buforu TE (pH 8,0). Stężenie plazmidowego DNA mierzono przy pomocy urządzenia NanoDrop (ThermoScientific, USA). Stężenie DNA w próbce można określić spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm, dla której przypada maksimum absorpcji kwasów nukleinowych. Wpływ na otrzymaną wartość mają inne związki, które zanieczyszczają próbkę, a pochłaniają światło w podobnym zakresie (np. białka), dlatego należy zmierzyć absorbancję próbki dodatkowo przy 280 nm. Stosunek zmierzonej absorbancji przy długości fali 260 nm do zmierzonej absorbancji przy długości fali 280 nm (A_{260}/A_{280}) dla czystego preparatu DNA wynosi 1,8-2,0. Niższe wartości świadczą o zanieczyszczeniu białkiem. Urządzenie NanoDrop

(ThermoScientific, USA) określa stężenie DNA w ng/μl, przy prawidłowo przeprowadzonej izolacji wartość stężenia mieści się w zakresie 20-60 ng/μl.

Po izolacji nakładano próbki w objętości 10 μl z dodatkiem 2 μl buforu obciążającego na 1% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), w celu stwierdzenia obecności plazmidu. W celu porównania wielkości produktu wykorzystano Marker DNA Lambda-*Hind*III (A&A Biotechnology, Gdynia). Elektroforezę prowadzono w buforze TBE (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), przez około 60 min., pod napięciem 80 V w aparacie SubCell GT (BioRad, California, USA). Wynik elektroforezy oglądano przy użyciu systemu GelDocIt Imaging System (UVP, Kalifornia, USA) kontrolowanego przez program komputerowy do dokumentacji i analizy obrazu DOC-IT ®LS.

W celu wykazania, że wyizolowane plazmidy są odpowiedzialne za fenotyp ESBL-dodatni przeprowadzano transformację laboratoryjnego szczepu *Escherichia coli* DH5α (szczep otrzymano dzięki uprzejmości Pana mgr Marcina Krzykawskiego, Zakład Immunologii UJ CM, Kraków) przy pomocy wyizolowanego, plazmidowego DNA. Przygotowano komórki kompetentne z wykorzystaniem komercyjnego zestawu *E. coli* Transformer (A&A Biotechnology, Gdynia). Procedurę przeprowadzano na lodzie, gdyż wzrost temperatury powoduje spadek kompetencyjności komórek bakteryjnych.

Do transformacji wykorzystano szczep *E. coli* DH5α, używany do rekombinacji. Bakterie *E. coli* DH5α przesiano za pomocą posiewu redukcyjnego na płytkę z podłożem LA. Płytkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 18 h. Następnie, 10 ml pożywki płynnej LB posiano jedną kolonią *E. coli* DH5α uzyskaną z posiewu redukcyjnego i inkubowano przez 18 h w temperaturze 37°C. Do 100 ml świeżej pożywki płynnej LB z dodatkiem ampicyliny (100 μg/l) dodawano 1 ml nocnej hodowli *E. coli* DH5α i inkubowano w wyrząsarce w temperaturze 37°C przez 2-3h, 220-250 rpm, do uzyskania gęstości optycznej OD₆₀₀=0,3-0,5 (aż bakterie osiągną fazę logarytmicznego wzrostu). OD zmierzono przy pomocy spektrofotometru (Jasco V-550 UV-VIX Spectrophotometer) przy długości fali 600 nm (OD₆₀₀). Hodowlę schłodzono w lodzie i odwirowano (5 min., 3500 rpm, 4°C). Osad bakterii zawieszano w 2 ml roztworu S1, schłodzonego do 4°C. Następnie dodano 2 ml roztworu S2 i inkubowano w lodzie przez 15 min. Zawiesinę rozporcjowano po 100 μl do probówek typu Eppendorf. Tak otrzymane komórki kompetentne *E. coli* DH5α użyto do transformacji. Do komórek kompetentnych w lodzie dodano obliczoną ze stężenia uprzednio wyizolowanego plazmidowego DNA objętość odpowiadającą 50 ng plazmidowego

DNA. Mieszaninę inkubowano na lodzie przez 30 min., uważając, by nie wstrząsać probówką. Po inkubacji probówki delikatnie umieszczano w termobloku (10 min., 37°C). Następnie probówki schładzano na lodzie przez 2 min. Do mieszaniny dodano 1 ml podgrzanej do 37°C pożywki LB bez antybiotyku. Inkubowano hodowlę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem przy 200 rpm przez 45 min. w celu uzyskania ekspresji genów odpowiedzialnych za oporność stransformowanych komórek na antybiotyki. Na płytce z podłożem selekcyjnym wysiewano po 20 μ l i 200 μ l mieszaniny transformacyjnej i rozprowadzano równomiernie jałową bagietką szklaną po całej powierzchni agaru. Selekcję transformatów przeprowadzano na podłożu LA z ampicyliną w stężeniu 100 μ g/ml. Uzyskane w ten sposób transformaty poddano badaniu na obecność ESBL metodą dyfuzyjno-krażkową (Test DDST, opisany w podrozdziale 4.2).

Wykorzystane odczynniki

- Pożywka płynna – bulion lizogenny Luria Broth (LB) (1% trypton, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 1% NaCl, pH 7,0) (BioCORP Polska)
- Podłoże stałe Luria Agar (LA) (1% trypton, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 1% NaCl, 1,5% agar, pH 7,0) (BioCORP Polska)
- Ampicylina (A&A Biotechnology, Gdynia)
- Zestaw Plasmid Mini Kit (Qiagen, Holandia)
 - Bufor P1 (Qiagen, Holandia)
 - Bufor P2 (Qiagen, Holandia)
 - Bufor P3 (Qiagen, Holandia)
 - Bufor QC (Qiagen, Holandia)
 - Bufor QF (Qiagen, Holandia)
- Zestaw *E. coli* Transformer (A&A Biotechnology, Gdynia) w skład którego wchodzi:
 - Bufor S1
 - Bufor S2
- Bufor TE (pH 8,0)
- Bufor obciążający (błękit bromofenolowy 0,25g/ml, glicerol 20%) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

4.16 Charakterystyka szczepów *Klebsiella oxytoca*

Oznaczanie lekooporności metodami fenotypowymi przeprowadzano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.2. Obecność ESBL oznaczano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.2. Identyfikację gatunkową przeprowadzano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.6.

4.16.1 Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym – PFGE

Wszystkie szczepy *K. oxytoca* zostały poddane typowaniu molekularnemu z wykorzystaniem elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym, według procedury opisanej w podrozdziale 4.11.1 w następujących warunkach rozdziału:

- napięcie 6V/cm,
- temperatura 14°C,
- impuls początkowy 2s,
- impuls końcowy 35s,
- czas rozdziału 22h.

4.17 Charakterystyka szczepów *Enterobacter* spp.

Oznaczanie lekooporności metodami fenotypowymi przeprowadzano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.2, z tym, że nie oznaczano wrażliwości *Enterobacter* sp. na ampicylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym oraz cefuroksym z uwagi na występowanie naturalnej oporności tych szczepów na te leki przeciwdrobnoustrojowe. Obecność ESBL oznaczano zgodnie z metodyką opisaną powyżej w podrozdziale 4.2. Identyfikację gatunkową przeprowadzano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.6. Wykrywano geny oporności na antybiotyki β -laktamowe zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.7.

4.17.1 Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym – PFGE

Wszystkie szczepy *Enterobacter cloacae* zostały poddane typowaniu molekularnemu z wykorzystaniem elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym, według procedury opisanej w podrozdziale 4.11.1 w następujących warunkach:

- napięcie 6V/cm,
- temperatura 14°C,
- impuls początkowy 2s,
- impuls końcowy 35s,
- czas rozdziału 22h.

4.18 Charakterystyka szczepów *Serratia spp.*

Oznaczanie lekooporności metodami fenotypowymi przeprowadzano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.2, z tym, że nie oznaczano wrażliwości na ampicylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym oraz cefuroksym z uwagi na występowanie naturalnej oporności tych szczepów na te leki przeciwdrobnoustrojowe. Obecność ESBL oznaczano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.2. Identyfikację gatunkową przeprowadzano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 4.6.

4.18.1 Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym – PFGE

Wszystkie otrzymane szczepy *Serratia marcescens* zostały poddane typowaniu molekularnemu z wykorzystaniem elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym, według procedury opisanej w podrozdziale 4.11.1 w następujących warunkach rozdziału:

- napięcie 6V/cm,
- temperatura 14°C,
- impuls początkowy 2s,
- impuls końcowy 35s,
- czas rozdziału 22h.

4.19 Startery wykorzystane w badaniach

Tabela 2. Wykaz starterów wykorzystanych w badaniach, ze wskazaniem wielkości produktu i warunkami reakcji PCR.

Gen	Sekwencja startera przedniego For 5'-3'	Sekwencja startera wstecznego Rev 5'-3'	Wielkość produktu	Temp.przyt ażania starterów / liczba cykli	Cytowanie
Startery gatunkowospecyficzne					
Gatunek <i>E. coli</i> gen <i>tuf</i>	TGGGAAGCGAAATCCTG	CAGTACAGGTAGACTTCTG	258	58°C/30x	[170]
Gatunek <i>K. pneumoniae</i> , ITS-region	ATTGGAAGAGGTTGCCAAACGAT	CCGAAGATGTTTCACCTTCTGATT	260	57°C/35x	[171]
Geny β-laktamaz i geny oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki					
<i>bla</i> _{SHV-1}	ATGCGTTATATTCGCCTGTG	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA	747	60°C/30x	[172]
<i>bla</i> _{TEM-1}	TCGCCGATACACTATTCTCAGAAATGA	ACGCTCACCGGCTCCAGATTAT	445	60°C/30x	[172]
<i>bla</i> _{CTX-M}	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	TGGGTRAARTARGTSCCAGAAAYCAGCG G	593	60°C/30x	[172]
<i>bla</i> _{PER}	AATTGGGCTTAGGGCAGAA	ATGAATGTCATTATAAAAAGC	920	50°C/30x	[175]
<i>bla</i> _{VEB}	CGACTTCCATTTCGCCGATGC	GGACTCTGCAACAAATACGC	650	58°C/30x	[173, 174]
<i>bla</i> _{GES}	ATGCGCTTCATTACAGCAC	CTATTTGTCCGTGCTCAGG	863	55°C/30x	[174]
<i>bla</i> _{KPC}	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	TTTTCAGAGCCTTACTGCC	882	62°C/38x	[185]
<i>bla</i> _{OXA-1}	ACACAATACATATCAACTTCGC	AGTGTGTGTTAGAAATGGTGATC	814	60°C/35x	[177]
AAC-6'-Ib	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	CTCGAATGCCCTGGCGTGT	482	55°C/34x	[179]
Do sekwencjonowania: CGTCACTCCATACATTGCAA					
Geny wirulencji <i>Escherichia coli</i>					
<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	ACCATATAAGCGGTTCATTCGCCGTCA	1177	63°C/25x	[186]

<i>papC</i>	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	200	63°C/25x	[187]
<i>papEF</i>	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336	63°C/25x	[186]
<i>sfa/foc</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	CGGAGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	63°C/25x	[187]
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	63°C/25x	[187]
<i>tha</i>	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	TCCTTAAGCTCCCGGGCTGA	827	63°C/25x	[188]
<i>iucC</i>	AAACCTGGCTTACGCAACTGT	ACCCGTCTGCAAAATCATGGAT	269	55°C/30x	[187]
<i>iroN</i>	AAGTCAAAGCAGGGTTGCCCG	GACGCCGACATTAAGACGCAG	665	63°C/25x	[188]
<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	300	63°C/25x	[187]
<i>fyuA</i>	TGATTAAACCCCGCACGGGAA	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	880	63°C/25x	[187]
<i>ireA</i>	GATGACTCAGCCACGGGTAA	CCAGGACTCACCTCACGAAT	254	68°C/35x	[189]
<i>fepA</i>	AGCTGACTGACAGCACCATCG	CGGGATGATCGACAAAACGGTCG	554	56,5°C/35x	[189]
<i>fhuA</i>	AGACACTATCACCGTTACCGCTG	GCCGGAATGATCAGGTGGTC	265	64°C/35x	[189]
<i>fecA</i>	AGGTTAATATCGCACCGGGATCG	ATGGCATCCATGTTGCCGAGC	565	68°C/35x	[189]
<i>ibeA</i>	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	TGGTGCTCCGGCAAAACCATGC	170	63°C/25x	[187]
<i>neuC</i>	AGGTGAAAAGCCTGTGATGTG	GGTGTACATTCGCGGATGTC	675	61°C/30x	[190]
Typowanie filogenetyczne					
<i>chuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	271	55°C/30x	[182]
<i>yjaA</i>	TGAAGTGTACAGGAGACGCTG	ATGGAGAAATGCGTTCCTCAAC	211	55°C/30x	[182]
TspE4C2	GAGTAATGTGCGGGGCATTCA	CGCGCCAACAAGTATTACG	159	55°C/30x	[182]
Wykrywanie ST131					
O25pabBspe	TCCAGCAGGTGCTGGATCGT	GCGAAAATTTTCGCCCGTACTGT	347	65°C/30x	[181]
Geny wirulencji <i>Klebsiella pneumoniae</i>					
<i>rmpA</i>	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	CTTGCAATGAGCCCATCTTTCA	535	46°C/30x	[31]
<i>magA</i>	GGTGCTCTTTACATCATTGC	GCAATGGCCATTGTCGTTAG	1280	50°C/30x	[191]
<i>wabG</i>	CGGACTGGCAGATCCATATC	ACCATCGGCCCATTTGATAGA	683	53°C/30x	[31]
<i>uge</i>	GATCATCCGGTCTCCCTGTA	TCTTCACGCCCTTCCTTCACT	534	53°C/30x	[192]
<i>kfu</i>	GAAGTGACGCTGTTTCTGGC	TTTCGTGTGGCCAGTGACTC	797	55°C/30x	[193]

Typowanie otoczki <i>Klebsiella pneumoniae</i>					
K1	GGTGCTCTTTACATCATTCG	GCAATGGCCATTTCGCTTAG	1283	58°C/35x	[191]
K2	GACCCGATATTCATACACTTGACACAGAG	CCTGAAGTAAATTCGTAAATAGATGGC	641	58°C/35x	[183]
K5	TGGTAGTGATGCTCGCGA	CCTGAACCCACCCCAATC	280	58°C/35x	[183]
K20	CGGTGCTACAGTGCATCAT	GTTATACGATGCTCAGTCGC	881	58°C/35x	[191]
K54	CATTAGCTCAGTGGTTGGCT	GCTTGACAAACACCATAGCAG	1037	58°C/35x	[191]
K57	CTCAGGGCTAGAAGTGTCA	CACTAACCCAGAAAGTCGAG	741	58°C/35x	[191]
Geny plazmidowej oporności na fluorochinolony					
<i>qnrA</i>	TTCTCACGCCAGGATTG	CCATCCAGATCGGCAAA	521	60°C/40x	[178]
<i>qnrB</i>	GGMATHGAAATTCGCCACTG	TTYGCBGYCYCGCCAGTCG	261	60°C/40x	[178]
<i>qnrS</i>	GTGAGTAATCGTATGTACTTTTGC	AAACACCTCGACTTAAGTCT	169	60°C/40x	[178]
<i>qnrD</i>	GGAGCTGATTTTCGAGGG	AGAAAAATTAGCGTAACTAAGATTGTC	105	60°C/40x	[178]
<i>qnrC</i>	ATTACGGGTTGTAATTGTCTTATG	ATCAGAAAAATGATCCCCTACT	144	60°C/40x	[178]
<i>qepA</i>	GCCGGTGATGCTGCTGA	CAGRAACAGCGCSCCSA	214	60°C/40x	[178]
Typowanie metodą Multilocus Sequence Typing - <i>Escherichia coli</i>					
<i>adkF</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	CCGTCAACTTTCGCGTATTT	536	56°C/35x	[194]
<i>fumC</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	GTACGCAGCGGAAAAAGATTTC	469	56°C/35x	[194]
<i>icdF</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCAC A	GGACGCAGCAGGATCTGT	518	56°C/35x	[194]
<i>gyrB</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC	ATCAGGCCTTCACGCGCATC	460	56°C/35x	[194]
<i>mdh</i>	AGCGCGTTCTGTTCAAATGC	CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT	452	56°C/35x	[194]
<i>purA</i>	CGCGCTGATGAAGAGATGA	CATACGGTAAGCCACGCAGA	478	56°C/35x	[194]

<i>recA</i>	CGCATTCGCTTTACCCCTGACC	TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	510	56°C/35x	[194]
Typowanie metodą Multilocus Sequence Typing - <i>Klebsiella pneumoniae</i>					
<i>rpoB</i>	GGCGAAAATGGCWGAGAACCA	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	501	50°C/35x	[195]
<i>gapA</i>	TGAAATATGACTCCACTCACGG	CTTCAGAAAGCGGCTTTTGATGGCTT	450	60°C/35x	[195]
<i>Mdh</i>	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	CCGTTTTTCCCCCAGCAGCAG	477	50°C/35x	[195]
<i>Pgi</i>	GAGAAAAAACCTGCCCTGTACTGCTGGC Do sekwencjonowania: CTGCTGGCGCTGATCGGCAT	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT Do sekwencjonowania: TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT	432	50°C/35x	[195]
<i>phoE</i>	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	420	50°C/35x	[195]
<i>infB</i>	CTCGCTGCTGGACTATATTCC Do sekwencjonowania: ACTAAGGTTGCCCTCCGGCGAAGC	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	318	50°C/35x	[195]
<i>tonB</i>	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	414	45°C/35x	[195]
Typowanie metodą Variable Number Tandem Repeat					
locus L	GGTGGCTCATTTTTTTGGC	GATAAACACGCGGCTAATGACC	Wielkość powtórzeń 168	58°C/30x	[184]
locus D	GCAGGTCTCGTCTTCATTCC	TGACCATCGAAGAGGGG	14	58°C/30x	[184]
locus K	GAGCTGGCGGCTGGAATA	GCAATCTGCCCGGAATA	118	58°C/30x	[184]
locus A	AGCGTATCTGCCATTGCC	CAGCATGGCCAGTTTGTCT	140	58°C/30x	[184]
locus E	CCAAATCCGGGTATTTATCG	TTTGATAACCCATCCGGAAG	118	58°C/30x	[184]
locus H	ATGACCAAGGAAGAACCCG	CTTTACCTGGCATGCGAACG	124	58°C/30x	[184]
locus I	CAGGATCACCGATATTTTGGG	GATCGCGGCAGGTTGAG	14	58°C/30x	[184]
locus J	ACCGGATTAAGCGCTATTCC	TTCTCTGCCCCACGGATAG	124	58°C/30x	[184]
Typowanie replikonów plazmidowych					
HI1	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	471	60°C/30x	[162]

HI2	TTTCTCTGAGTCACCTGTTAACAC	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	644	60°C/30x	[162]
I1	CGAAGCCGACGGCAGAA	TCGTGTTCCGCCAAGTTCGT	139	60°C/30x	[162]
X	AACCTTAGAGGCTATTAAAGTTGCTGAT	TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTTAG C	376	60°C/30x	[162]
L/M	GGATGAAAACTATCAGCATCTGAAG	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785	60°C/30x	[162]
N	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	559	60°C/30x	[162]
FIA	CCATGCTGTTCTAGAGAAAGGTG	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462	60°C/30x	[162]
FIB	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	702	60°C/30x	[162]
W	CCTAAGAACAAACAAAGCCCCCG	GGTGCGCGGCATAGAACCGT	242	60°C/30x	[162]
Y	AATTCAAAACAACACTGTGCAGCCTG	GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT	765	60°C/30x	[162]
P	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	TCACGCGCCAGGGCGCGAGCC	534	60°C/30x	[162]
FIC	GTGAACCTGGCAGATGAGGAAGG	TTCTCCTCGTCGCCCAAAC TAGAT	262	60°C/30x	[162]
A/C	GAGAACCAAAGACAAAAGACCTGGA	ACGACAAAACCTGAATTGCCCTCCTT	465	60°C/30x	[162]
T	TTGGCCTGTTTGTGCTAAACCAT	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	750	60°C/30x	[162]
FIIS	CTGTCTGTAAGCTGATGGC	CTCTGCCACAAACTTCAGC	270	60°C/30x	[162]
FrepB	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	GAAGATCAGTCACACCATCC	270	52°C/30x	[162]
K/B	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	160	60°C/30x	[162]
B/O	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC	TCTGCGTTCCGCCCAAAGTTCGA	159	60°C/30x	[162]

4.20 Wykorzystane oprogramowanie

Uzyskanie wyników wielu badań było możliwe przy zastosowaniu odpowiedniego oprogramowania komputerowego. Listę wykorzystanego oprogramowania zamieszczono poniżej.

- **GelCompar III (Applied Maths)**
program umożliwił porównanie profili restrykcyjnych szczepów bakteryjnych otrzymanych w wyniku PFGE
- **GelDocIt Imaging System**
program komputerowy do dokumentacji i analizy obrazu DOC-IT ®LS. (UVP, Kalifornia, USA)
- **Adobe®Photoshop® v. 7.0 (Adobe Systems Incorporated)**
program umożliwił obróbkę graficzną fotografii stanowiących dokumentację badawczą
- **Microsoft® Excel 2003 v. 11.8404.8405 (Microsoft Corporation)**
program umożliwił wstępną obróbkę uzyskanych danych liczbowych oraz tworzenie wykresów
- **Microsoft® Word 2003 v. 11.8411.8405 SP3 (Microsoft Corporation)**
program umożliwił napisanie tekstu niniejszej pracy doktorskiej
- **Statistica Pl v.6.0 (StatSoft)**
program umożliwił statystyczne opracowanie wyników przeprowadzonych badań.

5 Wyniki

Z uwagi na charakter pracy, wyniki przedstawione będą dwójako: najpierw zostaną przedstawione te dotyczące najważniejszych z punktu widzenia epidemiologicznego zakażeń krwi. W stosunku do szczepów pochodzących z przypadków zakażeń krwi posłużono się metodą typowania molekularnego Multilocus Sequence Typing. Następnie omówiona zostanie charakterystyka poszczególnych gatunków bakterii pochodzących z przypadków różnych zakażeń. Z uwagi na fakt, że część gatunków (np. *Morganella morganii*) reprezentowana była przez pojedyncze szczepy, nie zostanie przedstawiona ich szczegółowa analiza w części dotyczącej gatunków, lecz jedynie w części dotyczącej zakażeń krwi.

5.1 Analiza epidemiologiczna

W trakcie badań prowadzonych w latach 2009-2011 nad zakażeniami wywołanymi przez pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* w grupie noworodków hospitalizowanych w oddziałach neonatologicznych rozpoznano 241 zakażeń na podstawie wykrycia pałeczek *Enterobacteriaceae* w materiałach pobranych od tych przypadków. Współczynnik zapadalności na zakażenia związane z pałeczkami *Enterobacteriaceae* wyniósł 14,2%. Wśród zakażeń rozpoznano:

1. 100 przypadków zakażeń krwi; zapadalność skumulowana wyniosła 5,9%.
Wśród zakażeń krwi rozpoznano 65 zakażeń późnych i 35 zakażeń wczesnych.
Z powodu zakażenia krwi zmarło 15 noworodków, śmiertelność wyniosła 15%.
Do badań objętych tą rozprawą otrzymano 55 szczepów pochodzących zarówno z przypadków zakażeń późnych (n=51), jak i wczesnych (n=4).
Śmiertelność noworodków w grupie późnych zakażeń krwi związanymi z *E. coli* wyniosła 15,4%, zaś związanymi z *K. pneumoniae* – 11,1%.
2. 138 przypadków zapaleń płuc. Zapadalność wyniosła 8,14%. Rozpoznano 115 zakażeń późnych i 23 zakażenia wczesne.

Do badań objętych tą rozprawą otrzymano 133 szczepy, pochodzące z przypadków zakażeń późnych i wczesnych. Z powodu późnych zapaleń płuc zmarło 5 noworodków, śmiertelność wyniosła 3,6%.

3. 10 zakażeń dróg moczowych. Zapadalność wynosiła 0,59%. Do badań objętych rozprawą otrzymano 10 szczepów.
4. 23 innych zakażeń. Do badań objętych rozprawą otrzymano 16 szczepów.

Ogółem w trakcie trwania badań zmarły (z różnych przyczyn) 233 noworodki. Umieralność ogólna w grupie noworodków o masie urodzeniowej poniżej 600 g (n=52) wyniosła 53,6%, o masie 600-999 g (n=128) – 19,1%, zaś o masie powyżej 1000 g (n=53) – 5,7%.

W celu określenia wpływu wybranych czynników ryzyka na zapadalność związaną z zakażeniami związanymi z *Escherichia coli* przeprowadzono analizy statystyczne wyników uzyskanych na podstawie bazy danych. Wykazano, że noworodki z zakażeniami, w których w pobranych materiałach nie wykazano obecności *E. coli* charakteryzowały się lepszym stanem w momencie urodzenia, niż noworodki z zakażeniem związanym z *E. coli*, co wyrażało się większą masą urodzeniową, wiekiem ciążowym, punktacją w skali Apgar (Tabela 3). Stwierdzono także, że znamienne wyższa liczba noworodków z zakażeniem związanym z *E. coli* urodziła się drogą naturalną; natomiast dzieci z zakażeniami związanymi z innymi patogenami przychodziły na świat częściej drogą cięcia cesarskiego ($p<0,0001$). Dodatkowo wykazano, że śmiertelność noworodków z zakażeniami niezwiązanymi z *E. coli* była dwukrotnie mniejsza, niż w przypadku noworodków z zakażeniem związanym z *E. coli* ($p<0,0001$). Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że niższy wiek ciążowy, niższa masa urodzeniowa noworodka, niska punktacja w skali Apgar oraz przedwczesne pęknięcie błon płodowych były czynnikami ryzyka zakażenia związanego z *E. coli*. Cięcie cesarskie obniżało ryzyko zakażenia związanego z *E. coli*, w odróżnieniu od zastosowanej okołoporodowej profilaktyki antybiotykowej – w grupie, w której taką profilaktykę zastosowano, zakażenia związane z *E. coli* pojawiały się istotnie statystycznie częściej (Tabela 3).

Tabela 3. Wpływ wybranych czynników ryzyka na zakażenie związane z *E. coli* w porównaniu z zakażeniem niezwiązanym z *E. coli*.

Czynnik ryzyka	Noworodki z zakażeniami niezwiązanymi z <i>E. coli</i> [N=782]		Noworodki z zakażeniami związanymi z <i>E. coli</i> [N=96]		OR	95%CI	P-value
	Średnia	95%CI	Średnia	95%CI			
Masa urodzeniowa (g)	991	[972;1010]	909	[858; 959]	NA		<0.0001
Wiek ciążowy (tyg)	28,0	[27,8; 28,2]	27,0	[26,5; 27,6]	NA		<0.0001
Apgar (1 min.)	5,3	[5,2; 5,4]	4,8	[4,4; 5,2]	NA		<0.0001
Apgar (5 min.)	6,0	[5,9; 6,2]	5,7	[5,3; 6,1]	NA		<0.0001
Liczba i procent populacji							
Płeć żeńska	350	44,8	44	45,8	0,96	0,63-1,46	-
Cięcie cesarskie	624	79,8	62	64,6	2,17	1,38-3,41	<0.0001
Okoloporodowa profilaktyka antybiotykowa	344	44,0	46	47,9	0,85	0,56-1,31	<0.0001
Śmierć pacjenta	64	8,2	14	14,6	0,56	0,28-0,97	<0.0001

Legenda: OR – iloraz szans (ang. *odds ratio*); CI – przedział ufności (ang. *confidence interval*), NA – nie wyznaczano (not applicable)

5.2 Zakażenia krwi

W trakcie badań zarejestrowano 395 przypadków późnych zakażeń krwi, w tym 65 związanych z pałeczkami *Enterobacteriaceae* (16,5%). Rozpoznano także 118 wczesnych zakażeń krwi, w tym 35 związanych z pałeczkami *Enterobacteriaceae* (29,7%) (Tabela 4).

Tabela 4. Udział poszczególnych gatunków w etiologii wczesnych i późnych zakażeń krwi.

	Wczesne zakażenia krwi (n=118) (n, %)	Późne zakażenia krwi (n=395) (n, %)	Suma
<i>Escherichia coli</i>	28 (23,7%)	26 (6,6%)	54
<i>Klebsiella</i> spp.	3 (2,5%)	27 (6,8%)	30
<i>Enterobacter</i> spp.	2 (1,7%)	8 (2,0%)	10
Inne pałeczki	2 (1,7%)	4 (1,0%)	6
Suma	35 (29,7%)	65 (16,5%)	100

Z uwagi na specyfikę wczesnych zakażeń krwi oraz ich wysoką śmiertelność, większość wyizolowanych z nich szczepów nie została zachowana do dalszych badań.

Spośród 55 szczepów bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, które zostały otrzymane do poniższego badania, 24 zostały zidentyfikowane w laboratoriach współpracujących ośrodków jako *E. coli*, 16 – jako *K. pneumoniae*, 4 – *K. oxytoca*, 5 – *Enterobacter cloacae*, 1 – *Enterobacter sakazakii*, 4 – *Serratia marcescens* i 1 – *Morganella morganii*.

W fenotypowym badaniu lekooporności wykazano, że wśród badanych szczepów *E. coli* najwięcej było niewrażliwych na ampicylinę (91,7%), amoksycylinę z kwasem klawulanowym (54,2%), trimetoprim/sulfametoksazol (41,7%) i aztreonam (33,3%). Zgodnie z przyjętą definicją, pięć szczepów sklasyfikowano jako wielolekooporne (MDR). W fenotypowym badaniu lekooporności szczepów *K. pneumoniae* wykazano, że zdecydowana większość szczepów cechowała się opornością na aztreonam (81,3%), amoksycylinę z kwasem klawulanowym (56,3%), badane cefalosporyny (56,3%) oraz ciprofloksacynę (43,8%). Pięć szczepów sklasyfikowano jako MDR. Dwa badane szczepy *Klebsiella oxytoca* były odporne na amoksycylinę z kwasem klawulanowym, jeden – na aztreonam. Nie wykryto szczepów opornych na pozostałe badane antybiotyki. Jeden ze szczepów *Serratia marcescens* był niewrażliwy na cefotaksym, ceftazydym i aztreonam, pozostałe zaś cechowały się wrażliwością na wszystkie antybiotyki. Szczep *Morganella morganii* był odporny na cefotaksym, ertapenem, aztreonam i tobramycynę. Należy nadmienić, że nie oznaczano wrażliwości *Enterobacter* sp., *Serratia* sp. oraz *Morganella morganii* na ampicylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym oraz cefuroksym z uwagi na występowanie naturalnej oporności tych szczepów na te leki przeciwdrobnoustrojowe. Wyniki badania lekooporności zostały przedstawione w Tabeli 5.

Tabela 5. Wyniki badania lekowrażliwości bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* pochodzących z zakażeń krwi – liczba szczepów opornych na wymienione leki.

	<i>Escherichia coli</i> n=24(%)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> n=16 (%)	<i>Enterobacter sp.</i> n=6 (%)	<i>Klebsiella oxytoca</i> n=4 (%)	<i>Serratia marcescens</i> n=4 (%)	<i>Morganella morganii</i> n=1 (%)
<i>Penicyliny</i>						
Ampicylina	22 (91,7)	16 (100)	nd	nd	nd	nd
Amoksyacylina/kwas klawulanowy	13 (54,2)	9 (56,3)	nd	2 (50)	nd	nd
Piperacylina/tazobaktam	0 (0)	2 (12,5)	1 (16,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Cefalosporyny</i>						
Cefepim	6 (25)	9 (56,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Cefotaksym	5 (20,8)	9 (56,3)	2 (33,3)	0 (0)	1 (25)	1 (100)
Ceftazydym	6 (25)	9 (56,3)	1 (16,7)	0 (0)	1 (25)	0 (0)
Cefuroksym	6 (25)	9 (56,3)	nd	0 (0)	nd	nd
<i>Karbapenemy</i>						
Doripenem	1 (4,2)	3 (18,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ertapenem	2 (8,3)	3 (18,8)	2 (33,3)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Imipenem	1 (4,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Meropenem	1 (4,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Monobaktamy</i>						
Aztreonam	8 (33,3)	13 (81,3)	2 (33,3)	1 (25)	1 (25)	1 (100)
<i>Fluorochinolony</i>						
Ciprofloksacyna	5 (20,8)	7 (43,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Aminoglikozydy</i>						
Amikacyna	2 (8,3)	2 (12,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Gentamycyna	3 (12,5)	3 (18,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Tobramycyna	6 (25)	8 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>Tetracykliny</i>						
Tygecyklina	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Różne</i>						
Chloramfenikol	1 (4,2)	3 (18,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Trimetoprim/sulfametoksazol	10 (41,7)	6 (37,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

LEGENDA: nd – nie badano.

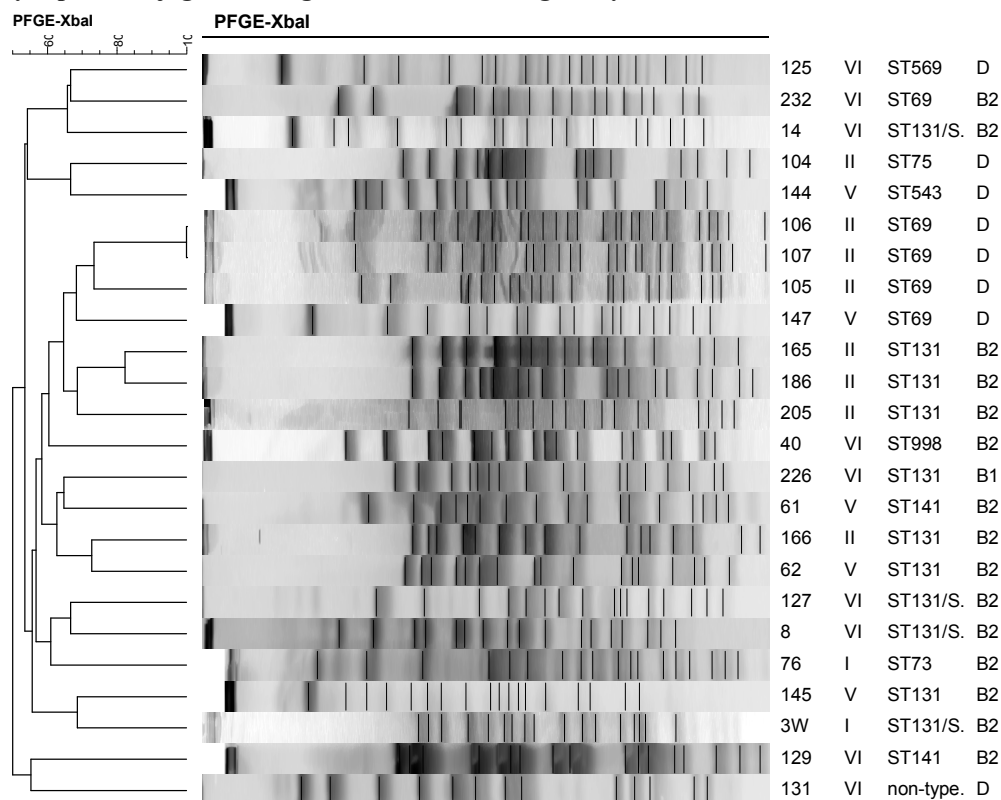
Zdolność do syntezy ESBL wykrywano przy pomocy rozszerzonego testu dwóch krążków. Na podstawie tego testu określono, że fenotypem ESBL-dodatnim cechowało się 16 szczepów (29,0%): 9 *K. pneumoniae*, 6 *E. coli* i 1 *Enterobacter*

cloacae. Przy pomocy reakcji PCR i sekwencjonowania produktu tej reakcji wykazano, że wszystkie szczepy ESBL-dodatnie cechowała obecność genu *bla*_{CTX-M}: 15 z nich posiadało wariant CTX-M-15, jeden zaś – CTX-M-3. Dodatkowo stwierdzono, że jedenaście szczepów niosło dodatkowo gen *bla*_{TEM-1} wraz z genem *bla*_{CTX-M}. Pięć szczepów cechowała obecność genu *bla*_{SHV-11}, jeden zaś posiadał gen *bla*_{SHV-1}.

W celu określenia częstości występowania poszczególnych genów kodujących czynniki wirulencji posłużono się reakcją PCR i stwierdzono, że najczęściej wykrywanymi genami wirulencji wśród szczepów *E. coli* były geny związane z wychwytywaniem żelaza: *fhuA* (91,7%), *fecA* (75,0%), *iutA* (58,3%), *fyuA* (54,2%), *iroN* (50,0%) oraz *iucC* (50,0%). Wykazano także, że 83,3% wszystkich szczepów *E. coli* posiadało gen *fimH* (83,3%). Zdecydowanie rzadziej wykrywano inne geny, takie jak *ibeA*, który znaleziono u 37,5% szczepów, oraz *neuC* obecny w 20,8% szczepów.

Scharakteryzowane szczepy z gatunku *Escherichia coli* poddano analizie porównawczej metodą PFGE w celu wykazania, bądź wykluczenia ich podobieństwa. Analiza uzyskanych wzorów restrykcyjnych z użyciem enzymu *XbaI* wykazała, że 22 szczepy *E. coli* posiadały unikatowy pulsotyp, zaś dwa cechowały się identycznym wzorem prążkowym na żelu agarozowym (szczepy 106, 107). Te dwa szczepy o identycznym wzorze prążkowym pochodziły od tego samego pacjenta, od którego materiał do badania (krew) został pobrany dwukrotnie w odstępie 3 dni. Do typowania szczepów *E. coli* pochodzących z przypadków zakażeń krwi zastosowano także metodę MLST. Analizie poddano 24 szczepy, z których jeden okazał się być niemożliwy do typowania tą metodą. Typowanie MLST wykazało, że w badanej populacji szczepów występowało 10 różnych typów ST: najwięcej, bo 7 szczepów należało do typu klonalnego ST131, zaś inne typy klonalne były mniej liczne: ST69 (n=5), ST141 (n=3), ST998 (n=3), ST73 (n=1), ST75 (n=1), ST95 (n=1), ST543 (n=1) i ST569 (n=1). Wzory szczepów *Escherichia coli* uzyskane podczas elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym przedstawiono w postaci dendrogramów z odniesieniem do typu ST oraz obecności wybranych genów wirulencji (Rysunek 1).

Rysunek 1. Dendrogram podobieństwa szczepów *Escherichia coli* pochodzących z przypadków zakażeń krwi, będący wynikiem typowania molekularnego metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym po izolacji genomowego DNA i strawieniu go enzymem *XbaI*.



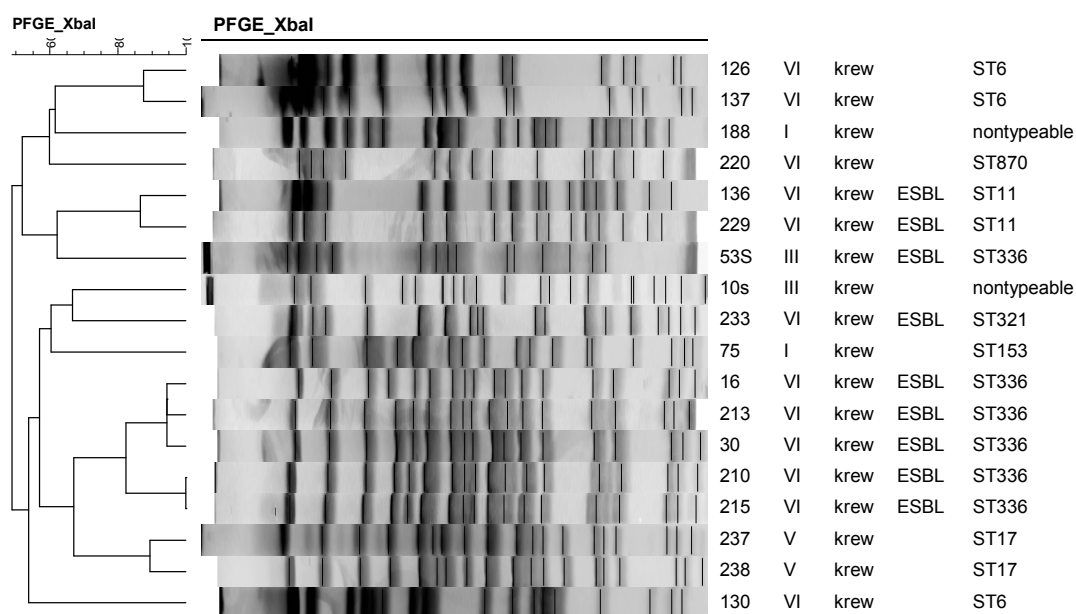
Legenda: Kolejność opisów: Numer szczepu; Ośrodek; Typ ST (non-type: nietypowy); Grupa filogenetyczna. Dendrogram uzyskano z wykorzystaniem oprogramowania GelCompar (Applied Maths).

Dla szczepów *K. pneumoniae* określono typ otoczki z wykorzystaniem reakcji PCR. Wykazano, że żaden z badanych szczepów *K. pneumoniae* nie należał do typu otoczkowego K1, K2, K5, K20, K54, bądź K57. Do określania częstości występowania genów wirulencji posłużono się reakcją PCR. Nie zidentyfikowano żadnego szczepu z genem *mag*, zaś wszystkie posiadały gen *uge*. Gen *wabG* obecny był u 11 szczepów (68,8%), jeden szczep posiadał gen *allS*, inny zaś – geny *kfu* i *rpmA*.

Scharakteryzowane szczepy z gatunku *K. pneumoniae* poddano następnie analizie porównawczej metodą PFGE w celu wykazania, bądź wykluczenia podobieństwa szczepów. Analiza uzyskanych wzorów restrykcyjnych z użyciem enzymu *XbaI* wykazała obecność 8 pulsotypów. Pięć szczepów z ośrodka VI należało do tego samego klonu (szczepy o numerach: 16, 213, 215, 210, 30), chociaż pochodziły one z lat 2009, 2010 i 2011. Każda z pozostałych trzech grup klonalnych składała się z dwóch szczepów o nierozróżnialnym wzorze prążkowym (pary: 126 i 137; 136 i 229; 237 i 238). Pięć pozostałych szczepów posiadało unikatowe wzory prążkowe.

Do typowania szczepów *K. pneumoniae* pochodzących z przypadków zakażeń krwi zastosowano także metodę MLST. Typowanie to wykazało obecność 7 różnych typów sekwencyjnych: ST336 (n=6), ST6 (n=3), ST11 (n=2) ST17 (n=2), ST153 (n=1), ST321 (n=1) i ST 870 (n=1). Dwa szczepy okazały się niemożliwe do typowania tą metodą. Wzory szczepów *Klebsiella pneumoniae* uzyskane podczas elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym przedstawiono w postaci dendrogramów z odniesieniem do typu ST oraz obecności wybranych genów wirulencji (Rysunek 2).

Rysunek 2. Dendrogram podobieństwa szczepów *Klebsiella pneumoniae* pochodzących z przypadków zakażeń krwi, będący wynikiem typowania molekularnego metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym po izolacji genomowego DNA i strawieniu go enzymem *Xba*I.



Legenda: Kolejność opisów: Numer szczepu; Ośrodek; Materiał; Obecność ESBL; Typ ST (nontypeable – nietypowalny). Dendrogram uzyskano z wykorzystaniem oprogramowania GelCompar (Applied Maths).

Przeprowadzone typowanie molekularne szczepów *Enterobacter cloacae* pochodzących z przypadków zakażeń krwi metodą PFGE wykazało obecność unikatowych pulsotypów. Nie znaleziono szczepów o nierozróżnialnych wzorach prążkowych.

Dwa szczepy *K. oxytoca* pochodzące od tego samego pacjenta cechowały się nierozróżnialnymi wzorami genomowego DNA uzyskanymi metodą PFGE. Materiał do badania (krw) został pobrany dwukrotnie w odstępie 3 dni. W przypadku *Serratia marcescens*, dwa szczepy pochodzące od różnych pacjentów cechowały się nierozróżnialnym wzorem genomowego DNA uzyskanym metodą PFGE.

5.3 Charakterystyka szczepów *Escherichia coli*

W efekcie badań epidemiologicznych prowadzonych w ramach Polskiej Sieci Neonatologicznej uzyskano na potrzeby tej rozprawy 90 szczepów *Escherichia coli* pochodzących z następujących form zakażeń: zapalenia płuc (n=50), zakażenia krwi (n=24), zakażenia dróg moczowych (n=8), inne formy zakażenia (n=8). W fenotypowym badaniu ich lekooporności wykazano, że 88,8% szczepów było opornych na ampicylinę, 62,2% na amoksycylinę z kwasem klawulanowym, 34,4% na trimetoprim z sulfametoksazolem, oraz 33,3% na aztreonam.

Zdolność do syntezy ESBL przez badane szczepy wykrywano przy pomocy rozszerzonego testu dwóch krążków. Na podstawie tego testu określono, że fenotypem ESBL-dodatnim cechowało się 25 szczepów (27,7%), z czego 16 zgodnie z przyjętą definicją sklasyfikowano jako MDR (17,7%). Wszystkie szczepy ESBL-dodatnie cechowały się obecnością genu *bla*_{CTX-M}: 60% z nich posiadało wariant CTX-M-15, zaś 40% wariant CTX-M-3. Wykazano, iż u 12 szczepów wraz z genem *bla*_{CTX-M} współwystępował gen *bla*_{TEM-1}, zaś 15 szczepów cechowała dodatkowo obecność genu *bla*_{OXA}. U badanych szczepów nie wykryto genów *bla*_{PER}, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB} ani *bla*_{KPC}. W wyniku porównania szczepów ESBL-dodatnich w stosunku do szczepów ESBL-ujemnych zaobserwowano, że szczepy ESBL-dodatnie były znamienne częściej odporne na antybiotyki, niż szczepy ESBL-ujemne. Zależność ta dotyczyła wybranych penicylin, oraz wszystkich badanych cefalosporyn, monobaktamu, fluorochinolonów i aminoglikozydów (Tabela 6).

Wykrywanie szczepów należących do typu ST131 prowadzono z wykorzystaniem reakcji PCR i w ten sposób zidentyfikowano 33 szczepy ST131. Porównując częstość oporności na poszczególne antybiotyki w grupie szczepów należących do typu ST131 w stosunku do szczepów nie należących do tego typu zaobserwowano, że szczepy ST131 były istotnie statystycznie częściej odporne na antybiotyki z grupy β -laktamów (ampicylina, ceftazydym, cefotaksym, cefuroksym, cefepim, aztreonam) oraz tobramycynę i ciprofloksacynę, niż szczepy spoza typu ST131. Wyniki reakcji PCR, pozwalającej szybko określić przynależność do typu ST131, były w kilku przypadkach rozbieżne z wynikami typowania MLST. Wyniki typowania MLST, którą zastosowano dla 24 szczepów pochodzących z przypadków zakażeń krwi, zmieniła przynależność do typu ST dla 5 szczepów:

- szczepy 8, 14 i 40 – z ST131 na ST998

- szczep 127 – z ST131 na ST95
- szczep 3W – z ST131 na ST141.

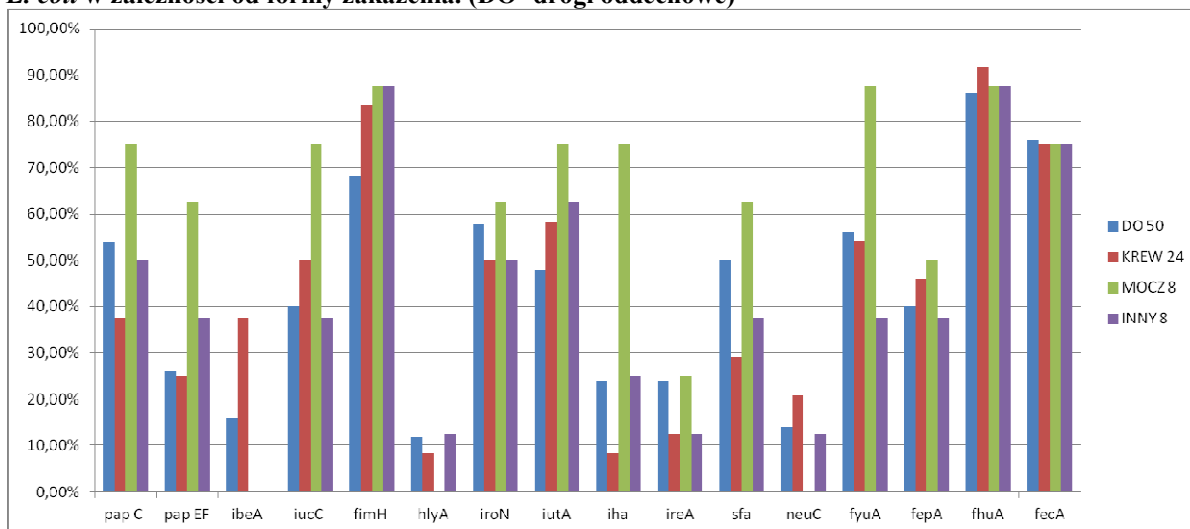
Tabela 6. Różnice w oporności na antybiotyki pomiędzy szczepami *E. coli* ESBL-dodatnimi i ESBL-ujemnymi, a także pomiędzy szczepami *E. coli* należącymi i nienależącymi do klonu ST131.

	<i>ESBL</i> (<i>n</i> =25) [%]	<i>nie-ESBL</i> (<i>n</i> =65) [%]	<i>Wartość</i> <i>p</i>	<i>ST131</i> (<i>n</i> =33) [%]	<i>Nie-ST131</i> (<i>n</i> =57) [%]	<i>Wartość</i> <i>p</i>
<i>Penicyliny</i>						
Ampicylina	100	84,6	0,0375	100	82,5	0,0107
Amoksycylina/kwas klawulanowy	96	49,2	<0,0001	72,7	56,1	NS
Piperacylina/tazobaktam	8,0	1,5	NS	6,0	1,7	NS
<i>Cefalosporyny</i>						
Cefepim	76,0	3,0	<0,0001	39,4	14,0	0,0061
Cefotaksym	96,0	1,5	<0,0001	48,5	17,5	0,0008
Ceftazydym	60,0	3,0	<0,0001	33,3	10,5	0,0077
Cefuroksym	100,0	1,5	<0,0001	43,8	20,7	0,0018
<i>Karbapenemy</i>						
Doripenem	8,0	3,0	NS	0	7,0	NS
Ertapenem	0	4,6	NS	0	5,3	NS
Imipenem	0	1,5	NS	0	1,7	NS
Meropenem	0	3,0	NS	0	3,5	NS
<i>Monobaktamy</i>						
Aztreonam	100,0	7,7	<0,0001	48,5	24,6	0,0203
<i>Fluorochinolony</i>						
Ciprofloksacyna	48,0	3,0	<0,0001	30,3	7,0	0,0033
<i>Aminoglikozydy</i>						
Amikacyna	32,0	6,2	0,0012	18,1	10,5	NS
Gentamycyna	28,0	4,6	0,0016	9,0	12,2	NS
Tobramycyna	64,0	6,1	<0,0001	36,4	14,0	0,0141
<i>Tetracykliny</i>						
Tygecyklina	4,0	1,5	NS	3,0	1,7	NS
<i>Różne</i>						
Chloramfenikol	20,0	10,7	NS	12,1	14,0	NS

Legenda: ESBL – β -laktamazy o rozszerzonym spektrum; NS – nie znamienne, $p > 0,05$

W wyniku przeprowadzonego typowania filogenetycznego, opartego na reakcji PCR, wykazano, że 62 szczepy należały do grupy B2, 16 do grupy D, 7 do grupy A, zaś 5 do grupy B1. Dokonano także analizy częstości występowania poszczególnych genów wirulencji. Najczęściej wykrywanymi genami z grupy adhezyn były geny *fimH* (75,0%), *papC* (51,0%) i *sfa* (44,4%). Badając obecność genów, uczestniczących w biosyntezie białek warunkujących pozyskiwanie jonów żelaza wśród szczepów *E. coli*, wykazano że najczęściej były obecne: *fhuA* (87,7%), *fecA* (75,5%), *fyuA* (56,6%), *iroN* (55,5%) i *iutA* (54,0%). Gen *hlyA* wykryto u 9 szczepów (10,0%). Wykazano, że szczepy pochodzące z przypadków zakażeń krwi istotnie statystycznie częściej cechowały się obecnością genu *ibeA*, niż szczepy pochodzące z zakażeń płuc czy dróg moczowych ($p=0,0109$). Natomiast szczepy pochodzące z przypadków zakażeń dróg moczowych istotnie statystycznie częściej posiadały gen *iha* ($p=0,0023$), niż szczepy pochodzące z zakażeń krwi i płuc. Procentowe występowanie genów kodujących czynniki wirulencji w zależności od formy zakażenia pokazano na Rysunek 3.

Rysunek 3. Częstość występowania genów kodujących czynniki wirulencji w badanych szczepach *E. coli* w zależności od formy zakażenia. (DO- drogi oddechowe)



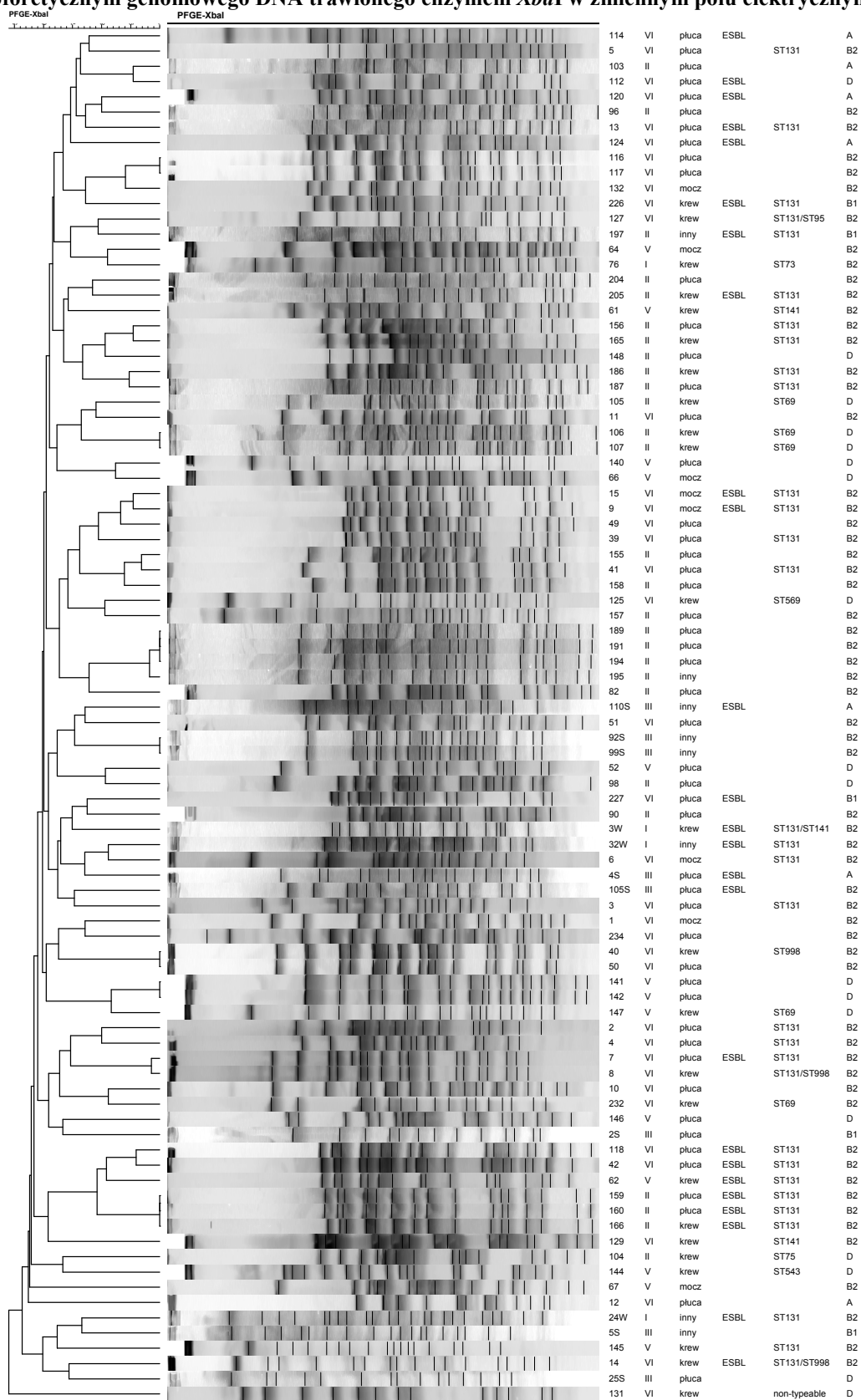
Dokonano również porównania liczby genów kodujących czynniki wirulencji w szczepach należących do poszczególnych grup filogenetycznych: wśród szczepów należących do grupy filogenetycznej A liczba genów wyniosła średnio 3,7 (odchylenie standardowe, SD=1,6), w grupie B1 – 6,4 (SD=3), w grupie B2 – 8,2 (SD=3,2) i w grupie D – 4,5 (SD=2,9). Wykazano znamienne różnice statystyczne pomiędzy średnią liczbą genów kodujących czynniki wirulencji u szczepów należących do grupy B2 w stosunku do szczepów należących do grup A lub D ($p<0,001$). Podobnie,

porównując średnią liczbę genów kodujących czynniki wirulencji szczepów należących do klonu ST131 i szczepów spoza tego klonu wykazano, że różnica ta jest znamienna statystycznie (8,45 wobec 6,1; $p=0,0022$).

Typowanie replikonów plazmidowych wykazało obecność 12 różnych typów Inc w badanej grupie szczepów *Escherichia coli*. Więcej niż jeden replikon wykryto w 62 szczepach (68,8%). Wykazano, że najczęściej wykrywanymi typami replikonów były IncFIB (n=60; 66,6%), IncF (n=55; 61,1%) i IncFIA (n=28; 31,1%). Pozostałe typy replikonów wykrywane były znacznie rzadziej, z następującą częstością: IncB/O (n=8), IncI1 (n=5), IncHI2 (n=4), IncHI1 (n=3), IncL/M (n=3), IncY (n=3), IncFIC (n=2), IncFIIS (n=2), IncP (n=1). W żadnym ze szczepów nie wykazano obecności któregośkolwiek z następujących typów Inc: IncX, N, W, A/C, T, K/B. U pięciu szczepów nie wykazano obecności żadnego z badanych replikonów.

Scharakteryzowane szczepy z gatunku *Escherichia coli* (n=90) poddano analizie porównawczej metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE) w celu wykazania, bądź wykluczenia podobieństwa pomiędzy nimi (Rysunek 4). Podczas trawienia restrykcyjnego genomowego DNA enzymem *Xba*I wykazano obecność 71 unikatowych pulsotypów, w większości o podobieństwie mniejszym niż 70%, co wskazuje na populację genetycznie zróżnicowaną. Szczepy o nierozróżnialnym wzorze prążkowym pochodziły albo od tego samego pacjenta (11 przypadków par lub trójek szczepów), albo od różnych pacjentów, lecz tego samego szpitala i były izolowane w tym samym okresie czasu (7 szczepów) (Rysunek 4).

Rysunek 4. Dendrogram podobieństwa szczepów *Escherichia coli* otrzymany po rozdziale elektroforetycznym genomowego DNA trawionego enzymem *Xba*I w zmiennym polu elektrycznym.



Legenda: Kolejność opisów: Numer szczepu; ośrodek; materiał; zdolność do produkcji ESBL; Typ ST; Grupa filogenetyczna. Dendrogram uzyskano z wykorzystaniem oprogramowania GelCompar (Applied Maths).

5.2.1 Oporność badanych szczepów *Escherichia coli* na fluorochinolony

Do określenia oporności na wybrane leki z grupy fluorochinolonów oraz kwas nalidyksowy wybrano 80 niepowtarzalnych szczepów (zgodnie z wynikami typowania metodą PFGE, Rysunek 4), izolowanych z przypadków zakażeń różnych pacjentów. Na podstawie testu synergii dwóch krążków wykazano, że w badanej grupie 20 (25%) szczepów cechowało się fenotypem ESBL-dodatnim. Zgodnie z wynikiem reakcji PCR, 11 szczepów niosło gen *bla*_{CTX-M-15}, 8 szczepów gen *bla*_{CTX-M-3}, zaś 1 – *bla*_{SHV-5}. W badanych szczepach zidentyfikowano 12 różnych typów plazmidów. Najczęściej występowały typy IncFIB (n=57; 71,3%), IncF (n=47; 58,8%) i IncFIA (n=23; 28,8%). Spośród wszystkich wybranych szczepów, 52 należało do grupy filogenetycznej B2 (65%), zaś 27 z nich reprezentowało klon ST131 (27/52, 52%).

Zbadano wartości MIC wybranych szczepów na wybrane leki z grupy chinolonów i fluorochinolonów (kwas nalidyksowy, lewofloksacyna, ofloksacyna, ciprofloksacyna) z zastosowaniem E-testu. Wykazano, że 6 (7,5%) szczepów było niewrażliwych na ciprofloksacyne, 13 (16,0%) na ofloksacyne, 5 (6,2%) na lewofloksacyne. Określono wartość MIC₅₀ dla badanych chemioterapeutyków: dla kwasu nalidyksowego wyniosła ona 4,0 mg/l, dla ofloksacyny – 0,094 mg/l, dla ciprofloksacyny – 0,008 mg/l, zaś dla lewofloksacyny – 0,032 mg/l. Dodatkowo wykazano, że cztery szczepy (5%) były oporne na wszystkie trzy badane fluorochinolony.

Dokonano analizy częstości występowania poszczególnych genów plazmidowej oporności na fluorochinolony (PMQR). Na podstawie wyników reakcji PCR i real-time PCR wykazano, że 22 (27,5%) szczepy cechowały się obecnością przynajmniej jednej determinanty PMQR (Tabela 7). Częstość występowania genów *qnr*, określona dzięki reakcji real-time PCR, wynosiła 11,3% (9/80 szczepów), gen *qnrB* został zidentyfikowany u 7 szczepów (8,8%), zaś *qnrS* u 2 (2,5%). W badanych szczepach nie występował żaden spośród genów *qnrA*, *qnrD*, *qnrC* czy *qepA*. Częstość izolacji genów *aac(6')-Ib-cr*, określona z pomocą reakcji PCR, wynosiła 27,5% (22/80 szczepów).

Spośród szczepów należących do grupy B2, 11 cechowało się fenotypem ESBL-dodatnim (21,1%), zaś 13 posiadało determinantę PMQR (25%): dwa szczepy posiadały geny *qnrS* i *aac(6')-Ib-cr*, 3 – geny *qnrB* i *aac(6')-Ib-cr*, zaś 8 – gen *aac(6')-Ib-cr*.

Pośród szczepów ESBL-dodatnich, 4 (20%) posiadało gen *aac(6')-Ib-cr*, 6 (30%) niosło gen *aac(6')-Ib-cr* wraz z genem *qnrB*, zaś 2 (10%) *aac(6')-Ib-cr* wraz z genem *qnrS*. Pośród szczepów ESBL-ujemnych, gen *aac(6')-Ib-cr* wystąpił u 9 szczepów (15%); zaś gen *aac(6')-Ib-cr* wraz z genem *qnrB* wystąpił u 1 szczepu (Tabela 7).

Wyniki porównania częstości występowania genów *qnr* u szczepów o fenotypie ESBL-dodatnim pokazały, że 8 (88,9%) spośród szczepów z genami *qnr* produkowało ESBL, zaś pośród 71 szczepów *qnr*-ujemnych, 12 (17%) produkowało ESBL. Wykazano, że u szczepów niosących gen *qnr* istotnie statystycznie częściej ($p=0,0003$) występował fenotyp ESBL-dodatni, co może sugerować istnienie związku pomiędzy genami *qnr* i ESBL.

Tabela 7. Częstość występowania determinant plazmidowo kodowanej oporności na fluorochinolony (PMQR) u badanych szczepów *Escherichia coli*.

Szczepy/Geny	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr + qnrB</i>	<i>aac(6')-Ib-cr + qnrS</i>	Suma
<i>E. coli</i> ESBL-dodatnie	0	0	4	6	2	12 (54,5%)
<i>E. coli</i> ESBL-ujemne	0	0	9	1	0	10 (44,5%)
Suma	0	0	13	7	2	22 (100%)

Porównując średnie wartości MIC₅₀, określone dla szczepów niosących geny plazmidowej oporności na chinolony (PMQR-dodatnie) i PMQR-ujemnych wykazano, że szczepy PMQR-dodatnie cechowały się wyższą wartością MIC₅₀ dla ciprofloksacyny, niż szczepy PMQR-ujemne (0,23 mg/l wobec 0,008 mg/l). Podobne wyniki zaobserwowano dla pozostałych fluorochinolonów: MIC₅₀ dla ofloksacyny i lewofloksacyny dla szczepów PMQR-dodatnich wynosiło odpowiednio 0,75 mg/l i 0,38 mg/l, zaś dla PMQR-ujemnych – 0,094 mg/l i 0,032 mg/l. Liczba szczepów opornych na ciprofloksacynę i ofloksacynę była istotnie statystycznie wyższa ($p<0,001$) pośród szczepów PMQR-dodatnich, niż ujemnych.

W celu wykazania, że geny PMQR zlokalizowane są na tym samym plazmidzie, co geny odpowiadające za fenotyp ESBL-dodatni, dla wszystkich szczepów PMQR-dodatnich (także dla tych o fenotypie ESBL-ujemnym, które potraktowano jako kontrole procesu koniugacji) przeprowadzono procedurę koniugacji. Pomimo trzykrotnego powtórzenia całej procedury, pozytywny wynik otrzymano dla 9 szczepów (w tym trzech o fenotypie ESBL-ujemnym), uzyskując wzrost bakterii na płycie z podłożem selekcyjnym przy jednoczesnym wzroście kolonii na płytkach z podłożem

kontrolnym. W przypadku szczepu oznaczonego numerem 7, w dwóch powtórzeniach procedury koniugacji otrzymano dwa różne transkoniuganty. W każdym przypadku, gdy wynik koniugacji był pozytywny, jedną kolonię przesiano na podłoże selekcyjne i hodowano w 37°C przez 18 h. Następnie przeprowadzony test DDST na podłożu Mueller-Hintona z rifampicyną (250 mg/ml) wykazał, że:

- Z wyjściowej puli 6 szczepów ESBL-dodatnich (oznaczonych numerami: 7, 14, 114, 160, 166, 205), uzyskano 4 transkoniuganty, które cechowały się fenotypem ESBL-dodatnim (szczepy oznaczone numerami: Tc7(2), Tc114, Tc160, Tc205). Transkoniuganty szczepów 14 i 166 cechowały się fenotypem ESBL-ujemnym. W przypadku szczepu nr 7, otrzymano także transkoniugant Tc7(1) cechujący się fenotypem ESBL-ujemnym.
- Z wyjściowej puli 3 szczepów ESBL-ujemnych (oznaczonych numerami 1, 189, 204) uzyskano 3 transkoniuganty, także ESBL-ujemne, co było oczekiwanym rezultatem.

Po wyizolowaniu DNA i przeprowadzeniu reakcji real-time PCR (wykrywanie genów *qnr*) oraz PCR (wykrywanie genu *aac(6')-Ib-cr*) otrzymano następujące wyniki dla poszczególnych transkoniugantów:

- U ESBL-dodatniego transkoniugantu Tc114 wykazano obecność genów *qnrB* i *aac(6')-Ib-cr*, identycznie, jak u szczepu dawcy. Typowanie replikonów plazmidowych wykazało obecność plazmidu HI2. Świadczy to o tym, że wszystkie te geny zlokalizowane są na jednym plazmidzie, należącym do grupy niekompatybilności IncHI2.
- U ESBL-dodatniego transkoniugantu Tc160 wykazano obecność genu *qnrS* w transkoniugancie oraz brak genu *aac(6')-Ib-cr*. Typowanie replikonów plazmidowych wykazało obecność plazmidu FIA. Dowodzi to, że geny ESBL (w tym wypadku konkretnie gen *bla_{CTX-M-15}*) oraz *qnrS* występują na tym samym plazmidzie, należącym do grupy IncFIA, zaś gen *aac(6')-Ib-cr* zlokalizowany jest na plazmidzie IncF.
- U ESBL-ujemnego transkoniugantu Tc166 wykazano obecność genów *qnrS* i *aac(6')-Ib-cr*. Typowanie replikonów plazmidowych wykazało obecność plazmidu IncF. Świadczy to o tym, że geny ESBL (w tym wypadku konkretnie gen *bla_{CTX-M-15}*) zlokalizowany jest na plazmidzie należącym do grupy IncFIA, zaś gen *aac(6')-Ib-cr* wraz z genem *qnrS* zlokalizowane są na plazmidzie IncF.

- UESBL-ujemnego transkoniugantu Tc7(1) wykazano brak genów PMQR. Świadczy to o tym, że geny te mogły być zlokalizowane na tym samym plazmidzie, który nie został przekazany do szczepu biorcy. W szczepie dawcy występuje natomiast drugi plazmid, należący do grupy niekompatybilności IncFIB, zawierający niezależnie gen OXA-1-like.
- W przypadku ESBL-ujemnego szczepu Tc14 wykazano obecność genów *qnrB* i *aac(6')Ib-cr* w transkoniugancie. Typowanie replikonów plazmidowych wykazało obecność plazmidu FIB u transkoniugantu, w odróżnieniu od szczepu-dawcy, u którego obecne były dwa typy replikonów: FIB i FIIS. Świadczy to o tym, że geny ESBL oraz *qnrB* i *aac(6')-Ib-cr* zlokalizowane są na różnych plazmidach. Gen ESBL (w tym wypadku konkretnie gen *bla_{CTX-M-15}*) zlokalizowany jest na plazmidzie należącym do grupy niekompatybilności IncFIIS, zaś *qnrB* i *aac(6')-Ib-cr* mogą być zlokalizowane na plazmidzie należącym do grupy IncFIB.
- W przypadku ESBL-ujemnego szczepu Tc189, którego dawca także był ESBL-ujemny, wykazano obecność genu *aac(6')-Ib-cr* w transkoniugancie. Nie wykazano przeniesienia genu *bla_{TEM-1}* ze szczepu dawcy do transkoniugantu. Jednocześnie transkoniugant cechował się obecnością plazmidu z grupy FIA. Dowodzi to, że gen *bla_{TEM-1}* zlokalizowany jest na plazmidzie IncF (nieobecnego u transkoniugantu), zaś gen *aac(6')-Ib-cr* zlokalizowany jest na plazmidzie IncFIA.
- W przypadku ESBL-ujemnego transkoniugantu Tc204, którego dawca także był ESBL-ujemny, wykazano obecność genu *aac(6')Ib-cr* w transkoniugancie. Nie wykazano przeniesienia genu *bla_{TEM-1}* ze szczepu dawcy do transkoniugantu. Dowodzi to, że gen *bla_{TEM-1}* zlokalizowany jest na plazmidzie IncB/O (którego brak u transkoniugantu), zaś gen *aac(6')-Ib-cr* zlokalizowany jest na plazmidzie IncF (wykrytego u transkoniugantu).
- U ESBL-dodatniego Tc205 wykazano obecność genów *qnrB* i *aac(6')-Ib-cr*, identycznie, jak u szczepu dawcy. Świadczy to o tym, że wszystkie te geny zlokalizowane są na jednym plazmidzie, należącym do grupy niekompatybilności IncFIB lub IncF.

Wyniki charakterystyki szczepów wyjściowych oraz ich transkoniugantów przedstawione są w Tabeli 8.

Tabela 8. Charakterystyka szczepów *Escherichia coli* posiadających gen *qnr* i/lub *aac(6')-Ib-cr* i ich transkoniugantów (oznaczonych symbolem Tc).

Numer szczepu	Obecność genu <i>qnr</i>	Obecność genu <i>aac(6')-Ib-cr</i>	MIC kwas nalidyksowy [mg/L]	MIC ofloksacyna [mg/L]	MIC lewofloksacyna [mg/L]	MIC ciprofloksacyna [mg/L]	Geny β -laktamaz	Gen OXA-1-like	Typ replikonu plazmidowego
1	-	+	3	0,064	0,032	0,004	TEM-1	-	-
Tc1	-	-	2	0,032	0,032	0,004	-	-	-
7	<i>qnrB</i>	+	2	0,064	0,032	0,38	CTX-M-15, TEM-1	OXA-1-like	FIB
Tc 7 (1)	-	-	2	0,016	0,023	0,006	-	OXA-1-like	FIB
Tc 7 (2)	<i>qnrB</i>	+	2	0,023	0,008	0,016	CTX-M-15, TEM-1	-	-
14	<i>qnrB</i>	+	4	0,75	0,25	0,5	CTX-M-15, TEM-1	OXA-1-like	FIB, FIIS
Tc 14	<i>qnrB</i>	+	4	0,75	0,25	0,25	TEM-1	OXA-1-like	FIB
114	<i>qnrB</i>	+	8	1	0,38	0,75	CTX-M-3, TEM-1	OXA-1-like	HI2
Tc114	<i>qnrB</i>	+	4	0,19	0,19	0,25	CTX-M-3, TEM-1	OXA-1-like	HI2
160	<i>qnrS</i>	+	256	32	12	>32	CTX-M-15	OXA-1-like	FIA, F
Tc160	<i>qnrS</i>	-	6	0,38	0,25	0,38	CTX-M-15	OXA-1-like	FIA
166	<i>qnrS</i>	+	8	0,75	0,38	0,25	CTX-M-15, TEM-1	OXA-1-like	FIA, F
Tc166	<i>qnrS</i>	+	6	0,023	0,047	0,047	-	OXA-1-like	F
189	-	+	12	1	0,38	0,38	TEM-1	-	FIA, F
Tc189	-	+	12	0,5	0,38	0,19	-	-	FIA
204	-	+	3	0,094	0,016	0,064	TEM-1	-	F, B/O
Tc204	-	+	3	0,094	0,016	0,064	-	-	F
205	<i>qnrB</i>	+	24	0,5	0,75	0,38	CTX-M-15, TEM-1	OXA-1-like	FIB, F
Tc 205	<i>qnrB</i>	+	24	0,19	0,75	0,38	CTX-M-15, TEM-1	OXA-1-like	FIB, F

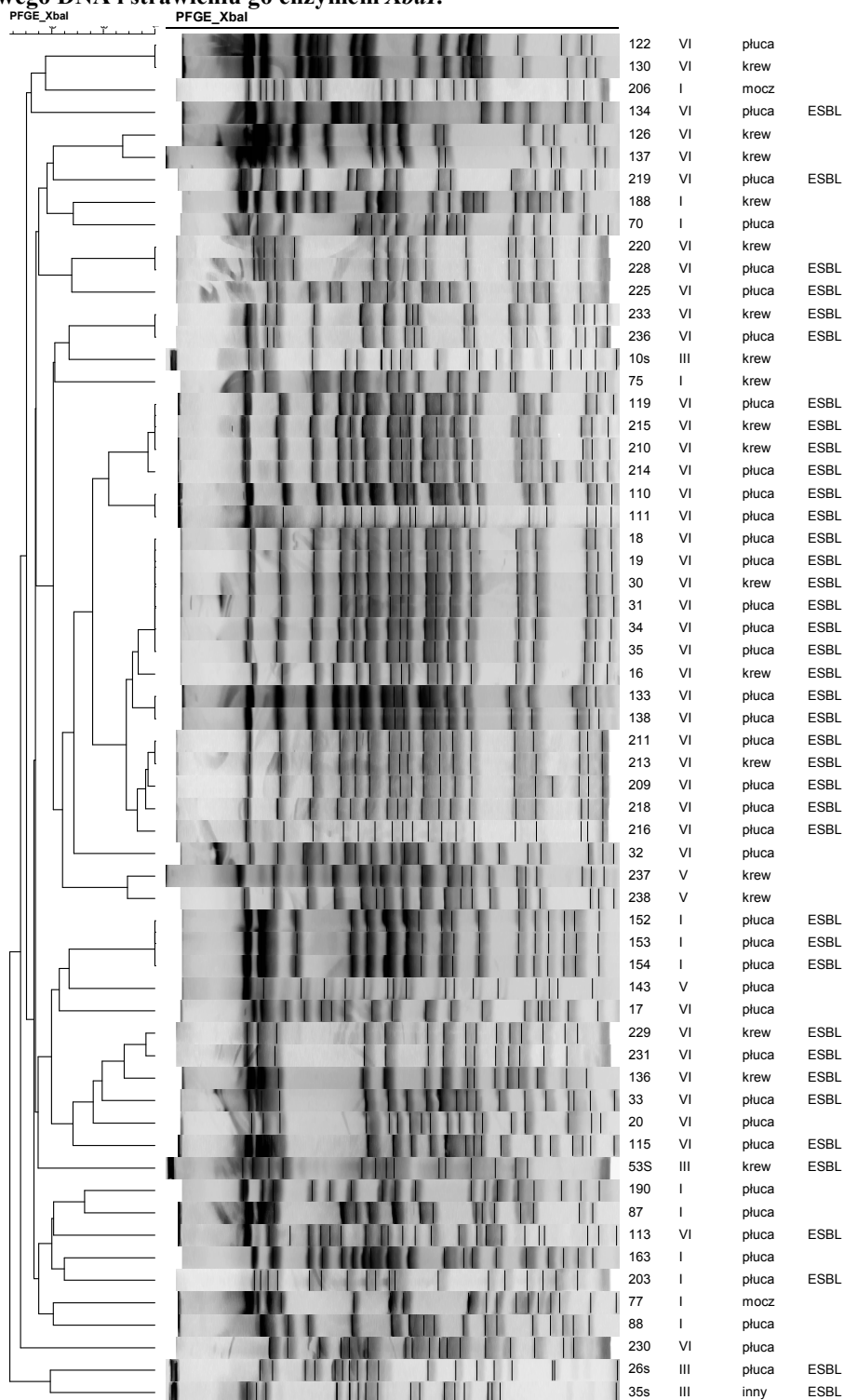
5.4 Charakterystyka szczepów *Klebsiella pneumoniae*

Z badań programu PSN uzyskano 60 szczepów *Klebsiella pneumoniae*, pochodzących z pięciu współpracujących szpitali. Z materiałów pochodzących z przypadków zapaleń płuc wyizolowano 40 szczepów, z zakażeń krwi – 18, z zakażeń dróg moczowych – 2 szczepy. Wszystkie szczepy z gatunku *K. pneumoniae* poddano analizie porównawczej metodą PFGE w celu wykazania, bądź wykluczenia podobieństwa szczepów. Analiza uzyskanych wzorów restrykcyjnych z użyciem enzymu *XbaI* wykazała obecność szczepów o nierozróżnialnych wzorach prążkowych, czyli tak zwanych klonów epidemicznych (Rysunek 5):

- Klon A reprezentowany był przez 18 szczepów, wyizolowanych ze szpitala VI. Klon ten został scharakteryzowany szczegółowo w podrozdziale 5.4.2.
- Klon B, do którego zaliczono 3 szczepy (o nr 152, 153, 154), pochodzące od tego samego pacjenta, został wykryty w szpitalu I. Materiał z dróg oddechowych został pobrany trzykrotnie, w odstępie 23 dni oraz po kolejnych 15 dniach.
- Klon C reprezentowany był przez 3 szczepy (o nr 231, 136, 33), pochodzące od trzech różnych pacjentów ze szpitala VI.
- Klony D, E, F, H były reprezentowane przez 2 szczepy i wszystkie zostały wyizolowane od pacjentów hospitalizowanych w ośrodku VI. Szczep należący do klonu D wyizolowany został od dwóch różnych pacjentów (nr 122 i 130), raz z przypadku zakażenia krwi, raz z przypadku zapalenia płuc. Szczep należący do klonu E wyizolowany został od dwóch różnych pacjentów (nr 220, 228), raz z przypadku zakażenia krwi, raz z przypadku zapalenia płuc. Szczep należący do klonu F wyizolowany został od dwóch różnych pacjentów (nr 233, 236), raz z przypadku zakażenia krwi, raz z przypadku zapalenia płuc. Szczep należący do klonu H wyizolowany został od dwóch różnych pacjentów (nr 126, 137), z przypadków zakażenia krwi.
- Klon G, do którego zaliczono 2 szczepy pochodzące od tego samego pacjenta (nr 237, 238), został wykryty w szpitalu V. Szczepy te pochodziły z przypadku zakażenia krwi. Krew pobrana była dwukrotnie w odstępie 4 dni.

Do dalszej analizy włączono ogółem 55 szczepów, po wyeliminowaniu wszystkich przypadków identycznych szczepów należących do tego samego klonu, a pochodzących od tego samego pacjenta.

Rysunek 5. Dendrogram podobieństwa szczepów *Klebsiella pneumoniae*, będący wynikiem typowania molekularnego metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym po izolacji genomowego DNA i strawieniu go enzymem *XbaI*.



Legenda: Kolejność opisów: Numer szczepu; Ośrodek; Materiał; Obecność ESBL. Dendrogram uzyskano z wykorzystaniem oprogramowania GelCompar (Applied Maths).

Zdolność do syntezy ESBL przez badane szczepy wykrywano przy pomocy rozszerzonego testu synergii dwóch krążków. Na podstawie tego testu określono, że fenotypem ESBL-dodatnim cechowały się 34 szczepy (61,8%). Przy pomocy reakcji PCR i sekwencjonowania, u 31 szczepów zidentyfikowano gen *bla*_{CTX-M-15}, u 1 – *bla*_{CTX-M-14}, zaś u innego *bla*_{CTX-M-3}. Co ciekawe, w przypadku jednego szczepu za fenotyp ESBL-dodatni odpowiadał gen *bla*_{SHV-5}. Korzystając z reakcji PCR i sekwencjonowania, u 48 (87,3%) szczepów zidentyfikowano geny z rodziny *bla*_{SHV}. W przypadku 23 szczepów wykryto wariant SHV-11, u 14 – SHV-1, u 1 SHV-5 lub SHV-12, zaś u 9 nie udało się określić wariantu SHV. U 30 szczepów (54,5%) wykryto gen *bla*_{TEM-1}, zaś u 23 (41,8%) – *bla*_{OXA-1-like}. U badanych szczepów nie wykryto genów *bla*_{PER}, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB} ani *bla*_{KPC}.

Porównując oporność wszystkich szczepów (bez względu na wykryty mechanizm oporności ESBL) na antybiotyki wykazano, że spośród antybiotyków β -laktamowych najwięcej szczepów cechowała oporność na aztreonam (33/55, 60%), spośród aminoglikozydów – na tobramycynę (29/55, 52,7%). Na ciprofloksacynę opornych było 29 szczepów (52,7%), na ofloksacynę – 30 (54,5%). Wykazano również, że szczepy ESBL-dodatnie były częściej odporne na antybiotyki należące do wszystkich badanych grup (Tabela 9).

Żaden z badanych szczepów *K. pneumoniae* nie należał do typu otoczkowego K1, K2, K5, K20, K54, K57. Nie zidentyfikowano także żadnego szczepu z genem *mag*, zaś wszystkie przebadane szczepy cechowały się obecnością genu *uge*.

Tabela 9. Liczba opornych szczepów *Klebsiella pneumoniae* z podziałem na szczepy ESBL-dodatnie i ESBL-ujemne.

	ESBL-dodatnie (n=34) (n, %)	ESBL-ujemne (n=21) (n, %)
Penicyliny		
Piperacylina/tazobaktam	6 (17,6)	2 (9,5)
Cefalosporyny		
Cefepim	31 (91,2)	0 (0)
Cefotaksym	31 (91,2)	0 (0)
Ceftazydym	31 (91,2)	0 (0)
Cefuroksym	32 (94,1)	0 (0)
Karbapenemy		
Doripenem	8 (23,5)	2 (9,5)
Ertapenem	9 (26,5)	0 (0)
Imipenem	0 (0)	0 (0)
Meropenem	1 (2,9)	0 (0)
Monobaktamy		
Aztreonam	32 (94,1)	1 (4,8)
Fluorochinolony^a		
Ciprofloksacyna	29 (85,3)	0 (0)
Lewofloksacyna	10 (29,4)	0 (0)
Ofloksacyna	17 (50,0)	3 (14,3)
Kwas nalidyksowy	15 (44,1)	3 (14,3)
Aminoglikozydy		
Amikacyna	3 (8,8)	0 (0)
Gentamycyna	8 (23,5)	0 (0)
Tobramycyna	28 (82,4)	1 (4,8)
Tetracykliny		
Tygecyklina	1 (2,9)	0 (0)
Różne		
Chloramfenikol	6 (17,6)	0 (0)
Trimetoprim/sulfametoksazol	16 (47,1)	1 (4,8)

^a oznaczone przy pomocy E-testu (bioMerieux, Francja); Dla kwasu nalidyksowego przyjęto, że szczepy oporne to szczepy o MIC>16µg/ml.

5.4.1 Oporność szczepów *Klebsiella pneumoniae* na fluorochinolony

Korzystając z metody oznaczania lekooporności przy pomocy E-testu wykazano, że 29 spośród 55 szczepów (52,7%) było niewrażliwych na ciprofloksacynę, 30 (54,5%) na ofloksacynę, 10 (18,2%) na lewofloksacynę. Określono wartość MIC₅₀ dla poszczególnych antybiotyków: dla kwasu nalidyksowego MIC₅₀ wyniosła ona 3,0 mg/l, dla ofloksacyny – 0,75 mg/l, dla ciprofloksacyny – 0,75 mg/l, zaś dla lewofloksacyny – 0,25 mg/l. Wykazano, że 9 szczepów (16,4%) było jednocześnie opornych na wszystkie trzy badane fluorochinolony.

Zgodnie z wynikami real-time PCR wykazano, że 33 (61,1%) badane szczepy cechowały się obecnością przynajmniej jednej determinanty PMQR (Tabela 10). Częstość występowania genów *qnr* została określona na 49,1% (27/55 szczepów); gen *qnrB* zidentyfikowano u 25 szczepów (45,5%), zaś *qnrS* u 2 (3,6%). U żadnego z badanych szczepów nie wykryto genów *qnrA*, *qnrD*, *qnrC* czy *qepA*. Zgodnie z wynikiem reakcji PCR, częstość występowania genów *aac(6')-Ib-cr* wynosiła 52,7% (29/55). Wysoka częstość występowania genów PMQR może być efektem włączenia do badania 18 reprezentantów tego samego klonu epidemicznego, pochodzących od różnych pacjentów. Włączono te szczepy do badanej grupy, ponieważ cechowały się obecnością zróżnicowanych genów oporności, zlokalizowanych na plazmidach (w tym genów PMQR, czy genów β -laktamaz).

Spośród 34 szczepów ESBL-dodatnich 4 (11,8%) posiadało gen *aac(6')-Ib-cr*, 22 (64,7%) niosło gen *aac(6')-Ib-cr* wraz z genem *qnrB*, 1 (2,9%) *aac(6')-Ib-cr* wraz z genem *qnrS*, a 1 – sam gen *qnrB* (2,9%). Pośród 21 szczepów ESBL-ujemnych, gen *aac(6')-Ib-cr* wystąpił u 2 szczepów (9,5%), zaś gen *qnrB* wystąpił u 1 szczepu (4,8%), podobnie jak gen *qnrS*. Porównano częstości występowania genów PMQR u szczepów ESBL-dodatnich i ESBL-ujemnych. Stwierdzono, że determinanty PMQR występują istotnie statystycznie częściej u szczepów ESBL-dodatnich, niż ESBL-ujemnych ($p < 0,05$).

Tabela 10. Częstość występowania determinant plazmidowo kodowanej oporności na fluorochinolony (PMQR) u badanych szczepów *Klebsiella pneumoniae*.

Szczep	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr + qnrB</i>	<i>aac(6')-Ib-cr + qnrS</i>	Suma
<i>K.pneumoniae</i> ESBL+	2	0	4	22	1	29(87,9%)
<i>K.pneumoniae</i> ESBL-	1	1	2	0	0	4 (12,1%)
Suma	3	1	6	22	1	33 (100%)

Porównano wartości MIC₅₀ dla poszczególnych fluorochinolonów wobec szczepów podzielonych na grupy szczepów PMQR-dodatnich i PMQR-ujemnych. Wykazano, że szczepy niosące geny plazmidowej oporności na chinolony (PMQR-dodatnie) cechowały się wyższą wartością MIC₅₀ dla ciprofloksacyny, niż szczepy PMQR-ujemne (1,5 mg/l wobec 0,023 mg/l). Podobne wyniki zaobserwowano dla pozostałych fluorochinolonów: MIC₅₀ dla ofloksacyny i lewofloksacyny dla szczepów PMQR-dodatnich wynosiło odpowiednio 1,0 mg/l i 0,5 mg/l, zaś dla PMQR-ujemnych – 0,125 mg/l i 0,064 mg/l. Wykazano także, że szczepy PMQR-dodatnie były istotnie statystycznie częściej odporne na przynajmniej jeden spośród badanych fluorochinolonów niż szczepy PMQR-ujemne (p<0,001).

5.4.2 Analiza epidemicznego klonu *Klebsiella pneumoniae*

W trakcie trwania nadzoru otrzymano ogółem z ośrodka VI 42 szczepy *K. pneumoniae*. Po wykonaniu analizy podobieństwa genetycznego metodą PFGE wykazano, że 20 szczepów cechuje się nierozróżnialnym wzorem prążkowym i należy do jednego klonu epidemicznego (Rysunek 5). Spośród identycznych szczepów, 2 pary szczepów pochodziły z przypadków zapaleń płuc u dwóch pacjentów. Materiał pochodzący od tych pacjentów został pobrany dwukrotnie w ciągu 21 lub odpowiednio w drugim przypadku – 31 dni. Pięć szczepów pochodziło z zakażeń krwi, 15 było związanych z zapaleniami płuc. Pierwszy szczep należący do tego klonu został wyizolowany z przypadku zakażenia krwi w grudniu 2009 roku, ostatni zaś – z przypadku zapalenia płuc w lipcu 2011. Zgodnie z wynikami badania fenotypowego, przeprowadzonego przy pomocy testu synergii dwóch krążków oraz reakcji PCR zakończonej sekwencjonowaniem, wszystkie szczepy cechowały się fenotypem ESBL-dodatnim i zawierały gen *bla*_{CTX-M-15}. Gen *bla*_{SHV-11} wykryto u 19 szczepów, zaś *bla*_{SHV-12} u jednego. U 18 szczepów wykryto gen *bla*_{TEM-1}.

Szczepy nieznacznie różniły się lekoopornością i obecnością genów oporności. Różnice te zestawiono w Tabeli 11 i oznaczono kolorem czerwonym. Geny oporności, często obecne na plazmidach, mogły zostać „zgubione” w trakcie podziałów komórek bakteryjnych.

Tabela 11. Porównanie epidemicznych szczepów *Klebsiella pneumoniae* ze szpitala VI. Kolorem zaznaczono różnice pomiędzy klonami.

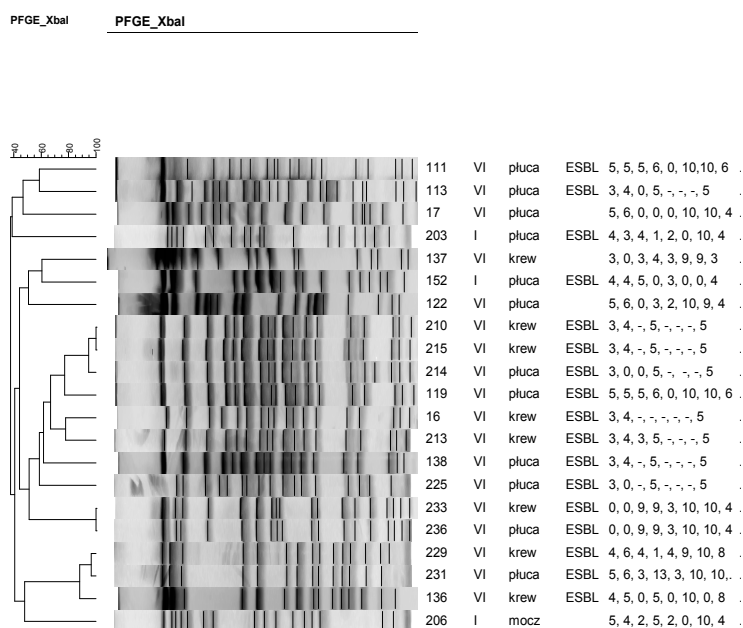
<i>Nr szczepu</i>	<i>Data izolacji</i>	<i>Material</i>	<i>Ciprofloksacybna</i>	<i>Trimetoprim/sulfametoksazol</i>	<i>Ertapenem</i>	<i>Doripenem</i>	<i>Meropenem</i>	<i>Chloramfenikol</i>	<i>Tobramycyna</i>	<i>Piperacylina/tazobaktam</i>	<i>Obecność OXA-1-like</i>	<i>Typ β-laktamazy SHV</i>	<i>Obecność β-laktamazy TEM-1</i>
30	17.12.2009	KR	R	S	S	S	S	S	R	S	+	11	+
35	23.12.2009	DO	R	S	S	S	S	S	R	S	+	11	+
209	6.01.2010	DO	R	R	R	R	R	S	R	S	+	12	+
31	13.01.2010	DO	R	S	R	S	S	S	R	S	+	11	-
34	25.01.2010	DO	R	S	S	S	S	S	R	S	+	11	+
18	12.02.2010	DO	R	S	S	S	S	S	R	S	+	11	+
16	15.02.2010	KR	R	S	S	S	S	R	R	S	+	11	+
19	16.02.2010	DO	R	S	R	S	S	S	R	S	+	11	+
119	1.03.2010	DO	R	S	S	S	S	S	S	S	+	11	+
133	23.03.2010	DO	R	S	S	S	S	S	R	S	+	11	+
138	30.06.2010	DO	R	S	S	S	S	S	R	R	-	11	+
111	26.07.2010	DO	R	S	S	S	S	S	R	R	+	11	+
210	23.01.2011	KR	R	R	S	S	S	S	R	S	-	11	+
211	31.01.2011	DO	R	R	S	S	S	S	R	S	+	11	+
213	1.02.2011	KR	R	R	R	S	S	S	R	S	+	11	+
214	7.02.2011	DO	R	R	R	R	R	S	R	S	+	11	+
215	8.02.2011	KR	S	S	S	S	S	S	S	S	+	11	+
216	10.02.2011	DO	R	R	R	R	S	S	R	S	-	11	-
218	3.03.2011	DO	R	R	S	S	S	S	R	S	+	11	+
110	26.07.2011	DO	R	S	R	R	S	S	R	R	-	11	+

Legenda: DO – drogi oddechowe, KR – krew, R – oporny, S – wrażliwy.

5.4.3 Typowanie szczepów *Klebsiella pneumoniae* za pomocą metody zmiennej liczby tandemowych powtórzeń

Do analizy VNTR wybrano grupę 15 szczepów, reprezentujących różne genotypy we wcześniejszym badaniu PFGE oraz 15 szczepów reprezentujących trzy różne klonu w PFGE. Wyniki typowania metodą VNTR uzyskano dla 21 szczepów. Wyniki uzyskane przy pomocy typowania metodą VNTR w postaci cyfrowych profili były w części przypadków zgodne z wynikami uzyskanymi metodą PFGE (Rysunek 6). Uzyskane profile cyfrowe były identyczne lub nieznacznie się różniły dla szczepów należących do tego samego klonu (nr 210, 215, 16, 213 i 138), ale były zupełnie odmienne dla szczepów 119 i 214, mimo ich podobieństwa w PFGE. Identyczne profile VNTR otrzymano w przypadku szczepów 233 i 236, które cechowały się nierozróżnialnym wzorem prążkowym w PFGE. Profile VNTR znacząco różniły się w przypadku szczepów 229, 231 i 136, które cechowały się dużym podobieństwem w PFGE. Zaobserwowano także, że w przypadkach szczepów znacząco różnych (wg PFGE) profile cyfrowe wygenerowane metodą VNTR różniły się od siebie.

Rysunek 6. Porównanie dwóch metod typowania *Klebsiella pneumoniae*: PFGE i VNTR. Cyfry oznaczają profil wygenerowany metodą VNTR. ESBL oznacza zdolność do produkcji β-laktamaz o rozszerzonym spektrum. „-”, oznacza brak produktu reakcji PCR, „0” oznacza obecność produktu po reakcji PCR, jednak po sekwencjonowaniu i analizie komputerowej – brak tandemowych powtórzeń.



Legenda: Kolejność opisu: Nr szczepu, ośrodek, typ zakażenia, ESBL, cyfrowy profil.

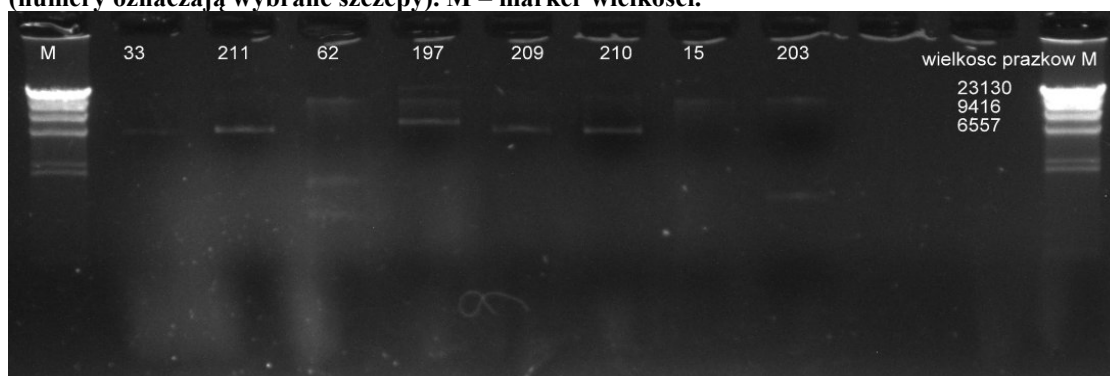
5.5 Ocena udziału plazmidów niskocząsteczkowych w powstawaniu fenotypu ESBL-dodatniego pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*

Do oceny udziału plazmidów niskocząsteczkowych w powstawaniu fenotypu ESBL-dodatniego wyizolowano plazmidy od 16 szczepów, reprezentujących gatunki *Escherichia coli* (n=6) oraz *Klebsiella pneumoniae* (n=10). Stężenie wyizolowanego plazmidowego DNA z poszczególnych szczepów oraz zdjęcie będące wynikiem rozdziału elektroforetycznego plazmidowego DNA (wybrane szczepy) zostały przedstawione poniżej (Tabela 12, Rysunek 7). Stosunek absorbancji A260/280 oznacza stopień zanieczyszczenia DNA białkami.

Tabela 12. Stężenie plazmidowego DNA, wyizolowanego z wybranych szczepów ESBL-dodatnich. W tabeli podano wartość absorbancji przy długości fali 260nm (A260) i stosunek absorbancji przy długości fal 260 do 280 nm (A260/280) jako wskaźnik zanieczyszczenia białkami.

<i>Nr szczepu</i>	<i>Gatunek</i>	<i>Stężenie plazmidu [ng/ul]</i>	<i>Wartość absorbancji A260</i>	<i>Stosunek absorbancji A260/280</i>
9	<i>E. coli</i>	63,9	1,28	1,6
15	<i>E. coli</i>	44,7	0,9	1,7
19	<i>K. pneumoniae</i>	33,6	0,67	1,7
30	<i>K. pneumoniae</i>	23,2	0,46	1,76
16	<i>K. pneumoniae</i>	32,6	0,65	1,6
18	<i>K. pneumoniae</i>	35,5	0,71	1,6
33	<i>K. pneumoniae</i>	39,5	0,79	1,8
62	<i>E. coli</i>	41,3	0,82	1,8
211	<i>K. pneumoniae</i>	48,7	0,97	1,8
215	<i>K. pneumoniae</i>	58,1	1,16	1,75
209	<i>K. pneumoniae</i>	50,3	1,01	1,8
203	<i>K. pneumoniae</i>	40,9	0,82	1,8
210	<i>K. pneumoniae</i>	56,9	1,14	1,45
114	<i>E. coli</i>	54,9	1,1	1,73
197	<i>E. coli</i>	46,9	0,94	1,71
14	<i>E. coli</i>	41,6	0,83	1,85

Rysunek 7. Przykładowe zdjęcie przedstawiające rozdziel elektroforetyczny plazmidowego DNA (numery oznaczają wybrane szczepy). M – marker wielkości.



Przeprowadzone badania wykazały, że znaczna liczba przebadanych szczepów zawierała plazmidy niskocząsteczkowe o wielkości poniżej 20 kbp. Uzyskane wzory prążkowe dla niektórych szczepów (np. 209, 210, 211) były bardzo podobne, co może wskazywać na obecność tego samego plazmidu we wszystkich trzech szczepach, pochodzących z tego samego oddziału szpitalnego.

Przeprowadzono transformację komórek *E. coli* DH5alfa przy pomocy wyizolowanych plazmidów. Po hodowli zliczano kolonie wyrosłe na płytkach. Wyizolowany DNA plazmidowy nadawał szczepom laboratoryjnym DH5alfa oporność na ampicylinę. Metodą dyfuzyjno-krażkową wykazano, że szczep laboratoryjny odtwarzał fenotyp ESBL po transformacji plazmidowym DNA. Uzyskany wynik wskazuje, że plazmidy niskocząsteczkowe zawierają geny *bla*, których produktami są β -laktamazy o rozszerzonym spektrum.

5.6 Charakterystyka szczepów *Klebsiella oxytoca*

W efekcie badań PSN otrzymano 18 szczepów *K. oxytoca* z trzech różnych szpitali: II – 11 szczepów, V – 3 szczepy, VI – 4 szczepy. Cztery szczepy pochodziły z przypadków zakażeń krwi, pozostałe 14 – z przypadków zapaleń płuc. Po wykonaniu analizy podobieństwa genetycznego szczepów metodą PFGE, z dalszej analizy wykluczono 4 szczepy (identyczne szczepy z różnych form zakażenia pochodzące od tych samych pacjentów). Przeprowadzono ocenę zdolności do produkcji ESBL z wykorzystaniem testu synergii dwóch krążków i wykazano, że 2 szczepy cechowały się fenotypem ESBL-dodatnim. Nie zidentyfikowano szczepów opornych na którykolwiek z karbapenemów, ciprofloksacynę, trimetoprim/sulfametoksazol,

tygocyklinę, amikacynę, tobramycynę czy chloramfenikol. Dla trzech szczepów wykazano oporność na pojedyncze antybiotyki: gentamycynę (n=1), piperacylinę/tazobaktam (n=1) czy cefuroksym (n=1).

5.7 Charakterystyka szczepów *Enterobacter cloacae*

W wyniku badań PSN otrzymano 36 szczepów *Enterobacter* spp. (34 *Enterobacter cloacae* i 2 *Enterobacter sakazakii*), pochodzących z 4 współpracujących szpitali: 3 z ośrodka Nr I, 14 z II, 9 z V i 10 z VI. Z przypadków zapaleń płuc wyizolowano 23 szczepy (w tym 22 z przypadków późnych zapaleń płuc), z zakażeń krwi – 6, z innych zakażeń – 7 szczepów. Ponieważ w trakcie trwania badań rozpoznano łącznie 282 przypadki późnych zapaleń płuc, częstość izolacji *Enterobacter* spp. wyniosła 7,8%.

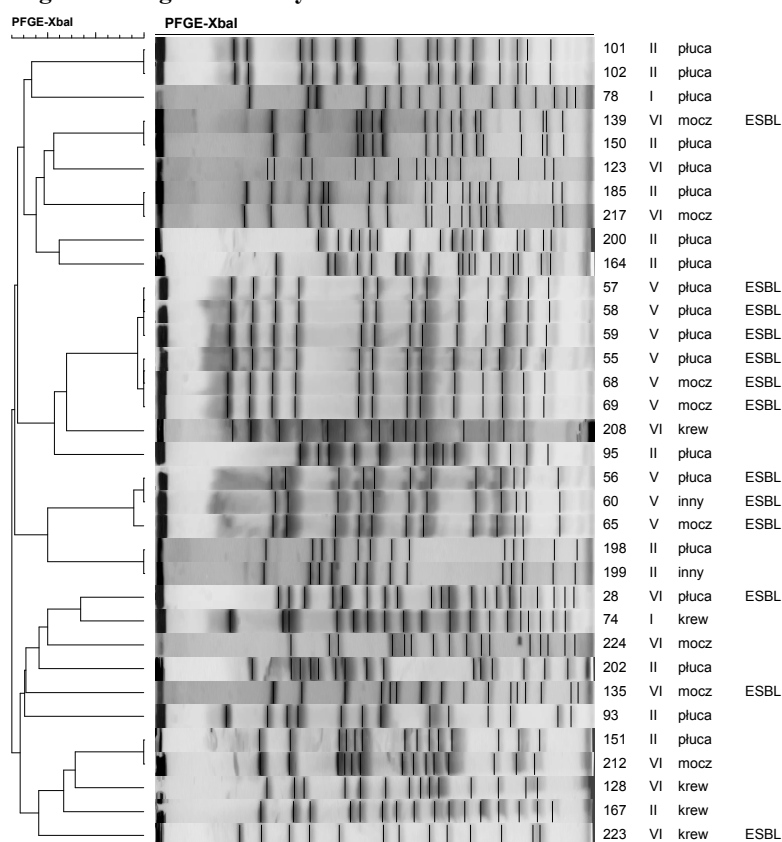
Analiza podobieństwa genetycznego metodą PFGE wszystkich otrzymanych szczepów ujawniła obecność szczepów o nierozróżnialnym wzorze prążkowym, które zidentyfikowano jako mało liczne klony epidemiczne. Wyniki przedstawiono w postaci dendrogramu podobieństw (Rysunek 8). Analiza dendrogramu wykazała, że najbardziej liczny klon A reprezentowany był przez 6 szczepów (o numerach: 57, 58, 59, 55, 68, 69), wyizolowanych od pacjentów hospitalizowanych w szpitalu V. Trzy spośród tych szczepów (oznaczone numerami 57, 58, 59) zostały wyizolowane od tego samego pacjenta, zaś materiał do badania został pobrany trzykrotnie, w odstępie 5 i 15 dni. Do dalszej analizy został włączony szczep pochodzący z pierwszego przypadku zakażenia (numer 57). Pozostałe trzy szczepy pochodziły od trzech różnych pacjentów. Pozostałe klony reprezentowane były przez:

- Klon B – 3 szczepy (o numerach 56, 60, 65), pochodzące od tego samego pacjenta z ośrodka V, do dalszej analizy włączono pierwszy z nich (nr 56);
- Klon C – 2 szczepy (o numerach 101 i 102), od tego samego pacjenta, z ośrodka V. Materiał pochodzący z dróg oddechowych został pobrany dwukrotnie w ciągu 7 dni. Do dalszej analizy włączono pierwszy ze szczepów (nr 101);
- Klon D – 2 szczepy (o numerach 139 i 150), od różnych pacjentów, z dwóch różnych ośrodków (VI, II);
- Klon E – 2 szczepy (o numerach 185 i 217), od różnych pacjentów, z dwóch różnych ośrodków (VI, II);

- Klon F – 2 szczepy (o numerach 198 i 199), pochodzące od tego samego pacjenta, z ośrodka II. Materiał do badania został pobrany dwa razy w odstępie 1 dnia. Do dalszej analizy włączono pierwszy ze szczepów (nr 198);
- Klon G – 2 szczepy (o numerach 151 i 212), od różnych pacjentów, z dwóch różnych ośrodków (VI, II);

Do dalszej analizy włączono ogółem 30 szczepów należących do rodzaju *Enterobacter* spp., po wyeliminowaniu wszystkich szczepów identycznych pochodzących od tego samego pacjenta.

Rysunek 8. Dendrogram podobieństwa szczepów *Enterobacter cloacae* otrzymany w wyniku trawienia genomowego DNA enzymem *Xba*I.



Legenda: Kolejność opisów: Numer szczepu; Ośrodek; Materiał; Obecność ESBL. Opracowane przy pomocy oprogramowania GelCompar (Applied Maths).

Korzystając z testu synergii dwóch krążków wykazano, że fenotypem ESBL-dodatnim cechowało się łącznie 9 szczepów (30,0%). W 4 z nich przy pomocy reakcji PCR i późniejszego sekwencjonowaniu produktu tej reakcji zidentyfikowano gen *bla*_{CTX-M-15}, u 4 – *bla*_{CTX-M-9}. W przypadku jednego szczepu nie udało się określić, jaki gen odpowiada za fenotyp ESBL-dodatni. W trzech szczepach (10,0%) wykryto mechanizm oporności typu AmpC, w jednym przypadku współwystępował on

z mechanizmem ESBL. W wyniku sekwencjowania produktu reakcji PCR zidentyfikowano gen *bla*_{SHV-11} u 2 szczepów (6,7%), zaś u 6 szczepów (20,0%) wykryto gen *bla*_{TEM-1}. W fenotypowym badaniu oporności wykazano, że spośród antybiotyków β -laktamowych najwięcej szczepów cechowała oporność na aztreonam (12/30, 40%), spośród aminoglikozydów – na tobramycynę (8/30, 26,7%). Na ciprofloksacynę odporne były 3 szczepy (10,0%) (Tabela 13). Pięć szczepów (16,7%) cechowała oporność na ertapenem, 1 szczep był oporny na trzy z badanych karbapenemów (ertapenem, imipenem i doripenem). Nie zidentyfikowano szczepów opornych na amikacynę, tygecyklinę lub meropenem.

Tabela 13. Liczba opornych szczepów *Enterobacter* sp. z podziałem na szczepy ESBL-dodatnie i ESBL-ujemne.

	<i>ESBL-dodatnie (n=11) (n, %)</i>	<i>ESBL-ujemne (n=19) (n, %)</i>
<i>Penicyliny</i>		
Piperacylina/tazobaktam	4 (36,4)	0
<i>Cefalosporyny</i>		
Cefepim	8 (72,7)	0
Cefotaksym	9 (81,8)	1 (5,3)
Ceftazydym	10 (90,9)	0
<i>Karbapenemy</i>		
Doripenem	1 (9,1)	0
Ertapenem	3 (27,3)	2 (10,5)
Imipenem	1 (9,1)	0
Meropenem	0	0
<i>Monobaktamy</i>		
Aztreonam	10 (90,9)	2 (10,5)
<i>Fluorochinolony</i>		
Ciprofloksacyna	3 (27,3)	0
<i>Aminoglikozydy</i>		
Amikacyna	0	0
Gentamycyna	7 (63,6)	0
Tobramycyna	7 (63,6)	1 (5,3)
<i>Tetracykliny</i>		
Tygecyklina	0	0
<i>Różne</i>		
Chloramfenikol	4 (36,4)	0
Trimetoprim/sulfametoksazol	5 (45,5)	0

5.8 Charakterystyka szczepów *Serratia* spp.

W trakcie trwania nadzoru zgromadzono 11 szczepów należących do rodzaju *Serratia* spp.:

- Trzy szczepy *Serratia liquefaciens*, pochodzące od pacjentów hospitalizowanych w ośrodku II, z przypadków zapaleń płuc (n=2) i z innych zakażeń (n=1). Dwa szczepy pochodziły od tego samego pacjenta. Materiał do badania od tego pacjenta został pobrany dwa razy w odstępie 22 dni. Do dalszej analizy został włączony tylko pierwszy ze szczepów.
- Osiem szczepów *Serratia marcescens*, pochodzących od pacjentów hospitalizowanych w ośrodkach II (n=1), III (n=1), IV (n=2), VI (n=4). Cztery szczepy pochodziły z przypadków zakażeń krwi, pozostałe 4 – z przypadków zapaleń płuc. Dwa szczepy z zakażeń krwi zostały wyizolowane od różnych pacjentów i zgodnie z wynikiem typowania metodą PFGE reprezentowały ten sam klon, cechując się nierozróżnialnym wzorem prążkowym. Dwa szczepy pochodzące z przypadku zapalenia płuc, które zostały wyizolowane od tego samego pacjenta w odstępie czasu równym 40 dni, zostały włączone do analizy.

Łącznie, do dalszej analizy zakwalifikowano 10 szczepów należących do rodzaju *Serratia*.

Wszystkie szczepy, za wyjątkiem jednego, były wrażliwe na wszystkie badane antybiotyki i chemioterapeutyki. Jeden szczep, cechujący się zdolnością do produkcji ESBL, został wyizolowany z przypadku zapalenia płuc u pacjenta ośrodka VI, u którego 40 dni wcześniej także zdiagnozowano zapalenie płuc związane z *Serratia marcescens*.

6 Dyskusja

6.1 Analiza epidemiologiczna

Zaprezentowane analizy pochodzą z pierwszego polskiego programu kontroli zakażeń w oddziałach neonatologicznych i zostały przeprowadzone na podstawie skompletowanej na potrzeby tej rozprawy bazy danych w celu znalezienia czynników wpływających na zakażenia noworodków z bardzo niską masą urodzeniową, spowodowane przez bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*. Projektem objęta została grupa około 20% noworodków o małej i bardzo małej masie urodzeniowej, urodzonych w Polsce w latach 2009-2011. Ogółem, w trakcie trwania nadzoru w latach 2009-2011, zebrano 216 szczepów pałeczek *Enterobacteriaceae*. Rozpoznano 125 przypadków zakażeń wczesnych i 287 zakażeń późnych o etiologii związanej z pałeczkami należącymi do rodziny *Enterobacteriaceae*. Większość badanych szczepów pochodziła z ośrodka VI (około 68%), natomiast ośrodek II przekazał jedynie dwa szczepy, co może mieć wpływ na interpretację otrzymanych wyników. Badanie objęło jednak wystarczająco dużą grupę noworodków o małej masie urodzeniowej, urodzonych w Polsce, aby można było przeprowadzić wiarygodne analizy.

Jednym z celów tej rozprawy było określenie w badanych grupach niezależnego wpływu poszczególnych czynników na zapadalność związaną z zakażeniami związanymi z *E. coli*. W przeprowadzonym badaniu wykazano, że czynnikiem ryzyka zakażeń o etiologii *E. coli*, w stosunku do zakażeń o innej etiologii, był niski wiek ciążowy, mała masa urodzeniowa oraz niska punktacja w skali Apgar w 1 i 5 minucie życia. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi z literatury medycznej. Inni autorzy także wskazują, że czynniki te związane są z podwyższonym ryzykiem kolonizacji lub zakażenia, szczególnie ESBL-dodatnimi pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae* [88, 196, 197]. Dodatkowo, uzyskane wyniki wskazują, że innym ważnym czynnikiem ryzyka zakażeń o etiologii *E. coli* może być kolonizacja tymi bakteriami dróg rodnych matki w trakcie ciąży. Potwierdza to wcześniejsze spostrzeżenia uzyskane w macierzystym ośrodku, że dzieci urodzone drogą cięcia cesarskiego, które nie przechodziły przez kanał rodny, istotnie statystycznie rzadziej zapadały na zakażenia

związane z *E. coli* [90]. Hipotezę tę wzmacniają wyniki uzyskane przez Denkel *et al.*, a także fakt, że rezultaty typowania epidemiologicznego za pomocą metody PFGE nie wskazują na klonalne przeniesienie szczepów *Escherichia coli* pomiędzy pacjentami, tak jak to często obserwowano w przypadku *Klebsiella pneumoniae* czy *Staphylococcus aureus* [89, 198]. Niestety, na badanych oddziałach nie były prowadzone badania przesiewowe matek pod kątem kolonizacji pochwy przez *E. coli*. Badania takie mogłyby być przeprowadzone, jednak ich interpretacja byłaby trudna, zaś zastosowanie ewentualnej profilaktyki wymagałoby dowodów z badań wielośrodkowych. Prawdopodobne badania przesiewowe powinny być ukierunkowane na poszukiwanie kolonizacji wywołanej przez szczepy *E. coli* konkretnego typu ST, np. ST131, który jest wysoce wirulentny i wielolekooporny, ale tego typu badania nie są na razie możliwe ze względu na trudności zastosowania metody MLST w badaniach rutynowych. Niepokój budzi fakt wynikający z analizy, że zakażenia związane z *E. coli* na oddziałach biorących udział w badaniach, cechowała ponad dwukrotnie wyższa śmiertelność, niż zakażenia związane z innymi patogenami. Przyczyną tego może być fakt, że badane szczepy należały najczęściej do grupy filogenetycznej B2 i cechowały się dużą liczbą czynników wirulencji, a więc wysoką patogennością. Podobnie duża część szczepów należała do wysoce wirulentnego i wielolekoopornego klonu ST131, co również mogło mieć wpływ na uzyskane wyniki. Inne doniesienia wskazują, że stosowanie w leczeniu antybiotyków jest niezależnym czynnikiem ryzyka kolonizacji lub zakażenia ESBL-dodatnimi pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae* [88, 199]. Rozważając zatem ewentualne badania nad wprowadzeniem rekomendacji dotyczących badań przesiewowych matek pod kątem obecności *E. coli* w pochwie, pojawia się pytanie dotyczące możliwości i skuteczności zastosowania profilaktyki antybiotykowej. Jednocześnie należy zwrócić uwagę, że w przeprowadzonym badaniu wykazano, iż zastosowanie okołoporodowej profilaktyki antybiotykowej nie obniżało ryzyka wystąpienia zakażenia związanego z *E. coli*. W ostatnich latach obserwowany jest wzrost częstości zakażeń noworodków o etiologii *E. coli*, co prawdopodobnie jest związane ze stosowaniem procedur związanych z wykrywaniem kolonizacji *Streptococcus agalactiae* i wdrożeniem antybiotykowej profilaktyki okołoporodowej [200, 201].

Rozważania nad możliwymi sposobami zapobiegania zakażeniom noworodków związanym z *E. coli* wynikają też z ogólnych danych epidemiologicznych. Niepokój

budzą światowe dane dotyczące umieralności dzieci z małą i bardzo małą urodzeniową masą ciała. Według European Perinatal Health Report, umieralność noworodków z masą urodzeniową poniżej 1500 g wynosiła 12,2%. W 2009 roku w Polsce współczynnik umieralności noworodków z urodzeniową masą ciała <1500 g wynosił 27%, a więc znacznie więcej niż dla krajów rozwiniętych [58, 59]. W grupie noworodków objętych poniższym badaniem umieralność ogólna w latach 2009-2011 wynosiła 13,74%, a więc dwukrotnie mniej niż wskazują na to dane GUS. Należy jednak pamiętać, że badania PSN były prowadzone w najlepszych ośrodkach w Polsce. W niniejszej pracy udowodniono zatem, że noworodki z zakażeniami związanymi z *E. coli* narażone są na wyższe ryzyko śmierci (OR=1,8; 95% CI 1,03-3,01, p=0,0396) niż noworodki z zakażeniami związanymi z innymi patogenami. Wyniki te są zgodne z danymi innych autorów, którzy także wskazywali, że noworodki z zakażeniami związanymi z *E. coli* cechuje wyższa śmiertelność [202-204]. Uważa się, że zakażenia związane z *E. coli* pojawiają się rzadziej niż zakażenia wywołane przez inne patogeny, ale związane są z wyższą śmiertelnością [61, 69, 200].

6.2 Zakażenia krwi

Jednym z celów poniższej rozprawy była analiza zakażeń krwi u noworodków o bardzo małej masie urodzeniowej. Jak podano powyżej, pałeczki należące do rodziny *Enterobacteriaceae* są bardzo ważną, choć nie najczęstszą przyczyną zakażeń krwi u noworodków. W badaniach przeprowadzonych przez National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) w ramach Neonatal Research Network (NRN) ponad 70% późnych zakażeń krwi było związanych z bakteriami Gram-dodatnimi, ale wyższa śmiertelność notowana była dla zakażeń związanych z *E. coli* [202]. Podobną zależność wykazano też w innych badaniach, np. prowadzonych przez Makhoul *et al.* w Izraelu – śmiertelność noworodków była czterokrotnie wyższa w przypadku zakażeń wywołanych przez *E. coli* i sześciokrotnie wyższa w przypadku zakażeń wywołanych przez *K. pneumoniae*, w stosunku do zakażeń wywołanych przez koagualazo-ujemne gronkowce [204].

Wyniki uzyskane w tej rozprawie wskazują że, pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* odpowiedzialne były za 15,2% wszystkich zakażeń krwi, zaś śmiertelność noworodków z zakażeniem związanym z *Enterobacteriaceae* wynosiła

14,5%, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów, np. Cordero *et al.* [78].

Bardzo ciekawa okazała się analiza wyników typowania metodą PFGE przeprowadzonego dla szczepów *E. coli* pochodzących z przypadków zakażeń krwi. Wykazano, że bakterie *E. coli* cechowały się znacznym zróżnicowaniem, nie wykazano klonalnego rozprzestrzeniania się szczepów w obrębie oddziałów, zaś wykryte klony izolowane były zwykle od tego samego pacjenta na przestrzeni czasu. Inaczej było w przypadku szczepów *K. pneumoniae*, które wykazywała znaczne podobieństwo genetyczne. Wykryto horyzontalne przeniesienie szczepu *K. pneumoniae* na jednym z oddziałów szpitalnych. Podobne wyniki wskazujące na dużą różnorodność szczepów *E. coli*, zaś duże podobieństwo szczepów *K. pneumoniae*, wywołujących zakażenia, były opublikowane także przez innych autorów [205, 206]. Dodatkowo, wyniki otrzymane dzięki typowaniu metodą MLST wykazały, że szczepy *K. pneumoniae* należały do typów sekwencyjnych ST: ST6, ST11, ST17 i ST336, z których ST11 i ST17 są szeroko rozpowszechnione w Europie [207, 208]. W przypadku 7 szczepów *E. coli*, które należały do typu sekwencyjnego ST131, zaś nie wykazywały podobieństwa w badaniu PFGE i pochodziły z trzech różnych szpitali, nie można natomiast mówić o horyzontalnym przeniesieniu w obrębie oddziału, a jedynie o przypadkowej identyczności w typowaniu MLST. Jest to zgodne z wynikami innego badania, które wyraźnie wskazują, że szczepy należące do tych samych typów ST, nie zawsze cechują się nierozróżnialnym wzorem prążkowym podczas typowania metodą PFGE [209].

Należy dodać, że znaczna większość badanych szczepów *Enterobacteriaceae* izolowanych z przypadków zakażeń krwi, cechowała się opornością na ampicylinę, amoksycylinę i aztreonam, które, zgodnie z wynikami wcześniej przeprowadzonych badań, należą do najczęściej stosowanych leków na oddziałach neonatologicznych [144]. Ten fakt może wpłynąć na trudności terapeutyczne podczas stosowania antybiotykoterapii empirycznej i powinien być brany pod uwagę przy konstruowaniu odpowiednich zaleceń.

6.3 Charakterystyka szczepów *Escherichia coli*

Ponieważ *E. coli* odpowiedzialna jest za około 5-13% zakażeń w grupie noworodków z małą i bardzo małą masą urodzeniową, rośnie zainteresowanie tym patogenem wśród badaczy na całym świecie [210-212]. Niezbędne stają się zatem szczegółowe badania molekularne, dotyczące genów oporności i wirulencji szczepów znajdujących na oddziałach noworodkowych.

W przeprowadzonym badaniu wykryto 27,7% szczepów *E. coli* produkujących ESBL. Odsetek ten jest znaczący, zaś obecność tego mechanizmu może przekładać się na trudności terapeutyczne w momencie ujawnienia zakażenia u noworodka. Najczęściej występującym genem, odpowiedzialnym za fenotyp ESBL-dodatni, był gen *bla*_{CTX-M-15}, co jest zgodne z wynikami uzyskiwanymi dotychczas w Europie [22, 114, 213]. Za rozprzestrzenienie się genu *bla*_{CTX-M-15} na świecie odpowiedzialny jest szczep *E. coli* ST131, należący do grupy filogenetycznej B2 [157]. Rozpowszechnienie klonu ST131 jest prawdopodobnie efektem tego, że ma on zdolność łatwej adaptacji do organizmu gospodarza [214]. Cechuje się on ponadto opornością na liczne leki przeciwdrobnoustrojowe [25, 156, 181, 215]. W przeprowadzonym badaniu do grupy klonalnej ST131 zaliczono około 1/3 wszystkich szczepów. Przebadane szczepy należące do klonu ST131 cechowały się wyższą zjadliwością, wyrażoną jako średnia liczba genów kodujących czynniki wirulencji, częściej także produkowały ESBL. Podobne wyniki uzyskane zostały przez van der Bij *et al.* [216]. W przeprowadzonym badaniu wykazano także, że szczepy ESBL-dodatnie były znacznie częściej odporne na aminoglikozydy, ciprofloksacynę oraz trimetoprim/sulfametaksazol, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów [22, 114].

Według opinii wielu badaczy wyższa wirulencja danego szczepu *E. coli* koreluje z opornością na mniejszą liczbę antybiotyków [14, 217]. Szczepy wielolekooporne cechują się zdolnością do przetrwania w sprzyjającym środowisku szpitalnym, gdzie stosowane są liczne leki przeciwdrobnoustrojowe, podczas gdy szczepy wysoce wirulentne powodują szybki i gwałtowny przebieg choroby i związane są często z wysoką śmiertelnością. W pracy eksperymentalnej przeprowadzonej na modelu mysim wykazano, że klon ST131 nie jest wysoce wirulentny, zaś szczepy przynależące do tego klonu cechują się brakiem genów wirulencji *hly* oraz *cnf1*, obecnych u pozostałych przedstawicieli grupy filogenetycznej B2 [19].

W wyniku porównania częstości występowania genów kodujących poszczególne czynniki wirulencji w zależności od formy zakażenia, z którego izolowano dany szczep, wykryto, że szczepy pochodzące z przypadków zakażeń krwi istotnie statystycznie częściej niż szczepy pochodzące z zakażeń dróg moczowych lub zapaleń płuc, posiadały gen *ibeA* ($p=0,0109$). Produkt tego genu, białko IbeA, wchodzi w interakcję z białkiem na powierzchni komórek endotelium w mózgu i może sprzyjać inwazji tego patogenu do układu nerwowego [9]. Soto *et al.* łączy wyższą częstość wykrywania genu *ibeA* ze szczepami powodującymi zakażenia wczesne [83]. Niestety, zbyt mała liczba szczepów pochodzących z zakażeń wczesnych nie pozwoliła na zbadanie tego związku w otrzymanej grupie szczepów. Co ciekawe, nie zaobserwowano częstszego występowania genów *hly* i *sfa* wśród szczepów pochodzących z przypadków zakażeń krwi, choć postuluje się, że biorą one udział w powstaniu sepsy [10]. Udało się jednak wykazać, że w grupie szczepów pochodzących z przypadków zakażeń dróg moczowych częściej występowały geny *iha* oraz *papC*, kodujące odpowiednio siderofory i pilusy typu P, które wspomagają adhezję do nabłonka dróg moczowych.

Istotnym zagadnieniem w zakresie leczenia zakażeń powodowanych przez pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* jest problem kodowanej plazmidowo oporności na antybiotyki. Według wcześniej opublikowanych wyników badań, znaczącą rolę w rozprzestrzenianiu oporności na antybiotyki u bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae* odgrywa rodzina plazmidów typu IncF, gdyż to na nich ulokowany jest (między innymi) gen *bla_{CTX-M-15}* [117]. Są one jednocześnie najczęstszym typem plazmidów występującym w obrębie tej rodziny [153]. W przeprowadzonym badaniu najczęściej wykrywane były plazmidy należące właśnie do tej rodziny IncFIB oraz także IncF. Wykazano, że plazmid IncFIA częściej występował wśród szczepów należących do klonu ST131; postuluje się, że na tym plazmidzie kodowane są także liczne czynniki wirulencji [23]. Nie wykazano korelacji pomiędzy typem replikonu plazmidowego, a opornością na różne grupy antybiotyków, choć wyniki innych autorów sugerują, że plazmidy IncFIA częściej występują u szczepów opornych na β -laktamy [117, 218], zaś plazmidy IncP, IncW, IncY, IncA/C związane są z szczepami wielolekoopornymi MDR [167], jednak tych typów replikonów w powyższym badaniu wykrywano zbyt mało.

Plazmidowe geny oporności na fluorochinolony odpowiadają za obniżoną wrażliwość na chemioterapeutyki należące do tej grupy leków [219]. Z powodu rosnącej częstości występowania determinant PMQR i, co za tym idzie, rosnącej

częstości oporności *E. coli* na fluorochinolony, wykrywanie genów PMQR w klinicznych szczepach tego gatunku wydaje się mieć duże znaczenie [220, 221]. Doniesienia z ostatnich lat wskazują na globalne rozprzestrzenienie wysoce wirulentnego klonu *E. coli* ST131, wykazującego oporność na fluorochinolony oraz niosącego dodatkowo gen *bla*_{CTX-M-15} [25]. Opublikowane wcześniej wyniki badań innych autorów wskazują na niższą częstość występowania genów PMQR wśród szczepów *E. coli* (14,0% w Kanadzie, 12,7% w Hiszpanii) w porównaniu do częstości wynoszącej 27,5% w tym badaniu – jednak były to badania przeprowadzone z wykorzystaniem szczepów pochodzących od osób dorosłych [14, 150, 221]. Podobnie, częstość wykrywania genów *qnr* w tym badaniu była znacznie wyższa (11,3%), niż w badaniach prowadzonych we Francji, Norwegii, Szwecji oraz Kanadzie, w których częstość ta wahała się od 1 do 1,6% [136, 148, 150]. Nieco częściej (5%) geny *qnr* wykrywano w szczepach *E. coli* w Stanach Zjednoczonych i Chinach [139, 147]. Podobnie jak w badaniach przeprowadzonych we Francji i Chinach, także i w przypadku szczepów *E. coli* przebadanych w tej rozprawie, najczęściej wykrywanym wariantem genu *qnr* był *qnrB* [147, 148]. Jednak wszystkie opisane powyżej wyniki pochodzą z badań nad szczepami pochodzącymi od osób dorosłych, zatem porównań należy dokonywać ostrożnie. Jak dotychczas, jedynie nieliczne badania szczepów *E. coli* dotyczące PMQR zostały przeprowadzone z wykorzystaniem materiałów pochodzących z przypadków zakażeń u dzieci i noworodków. Jednym z takich badań jest analiza 292 klinicznych szczepów *E. coli*, pochodzących z pięciu szpitali w Chinach, w których PMQR wyodrębniono tylko w 20 przypadkach (6,8%) [145]. Drugie badanie dotyczy analizy komensalnych jelitowych szczepów *E. coli* pochodzących od 310 zdrowych dzieci mieszkających w Ameryce Południowej, która wskazała, że około 54% tych szczepów posiadało gen *qnrB* [146]. Wyniki dotyczące częstości występowania plazmidowo kodowanych genów oporności na fluorochinolony w populacji szczepów pochodzących z przypadków zakażeń noworodków, uzyskane w trakcie badań objętych tą rozprawą, już opublikowano [154].

Spośród 22 badanych w niniejszej pracy szczepów, u których wykryto gen *aac*(6')-Ib-cr, 12 (54,5%) posiadało także gen *bla*_{CTX-M}. Należy podkreślić, że wyniki badań innych autorów wskazują na związek pomiędzy tymi genami [222, 223]. Także w tych badaniach większość szczepów posiadających determinantę PMQR była zdolna do produkcji ESBL [151, 152]. Takie współwystępowanie obu genów w znacznej części badanych szczepów *E. coli* sprawia, że leczenie zakażeń powodowanych przez takie

szczepu staje się znacznie trudniejsze, gdyż lista skutecznych leków do zastosowania w zakażeniach spowodowanych przez szczep *E. coli*, opornych jednocześnie na większą liczbę leków przeciwdrobnoustrojowych, jest bardzo ograniczona. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość selekcji szczepów *E. coli* zawierających geny *qnr* podczas stosowania niewłaściwej antybiotykoterapii. Współwystępowanie genu *qnrB* wraz z genami *bla*_{CTX-M} na tym samym plazmidzie jest znanym zjawiskiem – plazmidy zawierające determinanty PMQR często zawierają także inne geny oporności, głównie na antybiotyki z grupy β -laktamów [137, 223, 224]. Wiele spośród noworodków z badanej grupy w trakcie pobytu na oddziale była leczona antybiotykami z grupy β -laktamów [144], co wzmacnia hipotezę dotyczącą ko-selekcji szczepów PMQR-dodatnich poprzez stosowanie leków należących do grupy β -laktamów. Wyniki badań innych autorów wskazują, że obecność PMQR może prowadzić do wystąpienia mutacji w genach odpowiedzialnych za powstanie oporności na fluorochinolony w momencie ekspozycji szczepu na terapeutyczne dawki fluorochinolony [225]. W tym badaniu wykazano, że szczep *E. coli* niosące geny *qnr* cechowały się znacznie wyższą wartością MIC dla ciprofloksacyny, niż szczep *qnr*-ujemne.

Należy nadmienić, że w przypadku jednego szczepu *E. coli* nie wykryto jednoczesnego transferu genu *bla*_{CTX-M-15} wraz z genem *qnrB* ze szczepu-dawcy do szczepu-biorcy w procesie koniugacji. Należy podkreślić, że jest to sytuacja zaskakująca, gdyż geny *qnrB* i *bla*_{CTX-M-15} zwykle zlokalizowane są na tym samym plazmidzie i podlegają jednoczesnemu transferowi do szczepu-biorcy [139, 149]. Trzeba dodać, że w pozostałych przypadkach udanego transferu genów wykazano, że PMQR znajduje się na tym samym plazmidzie, co *bla*_{CTX-M}. Niestety, w kilku przypadkach procedura koniugacji nie powiodła się, co może sugerować, że geny PMQR znajdowały się na plazmidach niekoniugacyjnych.

6.4 Charakterystyka szczepów *Klebsiella pneumoniae*

W przypadku badanych szczepów *K. pneumoniae*, ciekawą obserwacją, zgodną z danymi literaturowymi, był fakt, że większość badanych szczepów miała organizację klonalną. W przypadku ośrodka VI doszło do horyzontalnego przenoszenia szczepu, który obecny był na oddziale przez cały okres prowadzenia badania (trzy lata). Szczep ten, cechujący się zdolnością do produkcji β -laktamaz o rozszerzonym spektrum,

należał do typu klonalnego ST336. Był to szczep wielolekooporny, a wraz z wykryciem takiego szczepu na oddziale szpitalnym powinny zostać zastosowane procedury izolacyjne i wzmożona higiena rąk personelu [226]. Badania przeprowadzone przez Bloom *et al.* wskazują, że sprawnie wdrożone i przeprowadzone procedury izolacyjne obniżają ryzyko transmisji drobnoustrojów wewnątrz oddziału [227]. Zastosowanie molekularnych technik identyfikacji drobnoustrojów wielolekoopornych może przyczynić się do szybkiego wykrywania klonów epidemicznych, a w konsekwencji do ograniczenia ich szerzenia się. W przypadku analizowanego oddziału VI takie badanie nie zostało przeprowadzone. Wynikało to prawdopodobnie z niewiedzy o zachodzącej horyzontalnej transmisji patogenu w obrębie oddziału albo z wysokich kosztów przeprowadzenia takiego badania.

Bardzo duża liczba badanych szczepów *K. pneumoniae* (61,8%) cechowała się obecnością mechanizmu oporności ESBL. Podobne wyniki uzyskali inni badacze, np. w Egipcie ESBL-dodatnie szczepy *Klebsiella pneumoniae* wykryte zostały w 66,7% zakażeń [228]. Mechanizm ESBL w badanych szczepach związany był w większości wypadków z obecnością genu *bla_{CTX-M}*, który to gen jest najbardziej rozpowszechniony w Europie [22, 208]. Co więcej, duża grupa badanych szczepów oporna była na liczne antybiotyki, należące do różnych grup (w tym β -laktamy, aminoglikozydy i fluorochinolony). Podobne wyniki, wskazujące na oporność na liczne leki przeciwdrobnoustrojowe klinicznych szczepów *K. pneumoniae*, prezentowane były także przez innych autorów. W badaniach hiszpańskich, u wszystkich szczepów ESBL-dodatnich mechanizm ten związany był z obecnością genu *bla_{CTX-M-15}* [208]. Dodatkowo, stwierdzono współwystępowanie genów OXA-1-like oraz *bla_{CTX-Mu}* 21 spośród 34 ESBL dodatnich szczepów, co wyjaśnia fenomen oporności wszystkich 21 szczepów na amoksycylinę z kwasem klawulanowym i ma wpływ na zmniejszenie liczby dostępnych antybiotyków umożliwiających skuteczne leczenie. Co ciekawe, odmiennie, niż w badaniach przeprowadzonych w Hiszpanii, w których wszystkie szczepy ESBL-dodatnie były wrażliwe na ciprofloksacyny [208], w przeprowadzonym badaniu wykazano, że 79,4% szczepów ESBL-dodatnich cechowała się opornością na ten antybiotyk.

Niestety, nie udało się ustalić typu otoczkowego badanych szczepów *K. pneumoniae* – negatywne wyniki reakcji PCR wykazały, że żaden z badanych szczepów nie należał do najczęstszych typów otoczkowych K1, K2, K5, K20, K54,

K57. Uważa się, że najbardziej rozpowszechnione są szczepy należące do typu otoczkowego K1 lub K2, jednocześnie te dwa typy otoczkowe cechują się wysoką zjadliwością [32]. Być może szczepy *K. pneumoniae* pochodzące z zakażeń noworodków są w tym zakresie odmienne od innych.

Jednym z celów poniższej rozprawy było określenie częstości występowania kodowanych plazmidowo genów oporności na fluorochinolony w badanych szczepach *K. pneumoniae*. Wykazano, że cechowały się one wysoką częstością występowania genów PMQR (61,1%), znacznie wyższą, niż wskazują dane uzyskane przez innych autorów (ok. 13,9% w Korei, 8,3% w Szwecji i Norwegii) [136, 224]. Geny *qnr* wykryto u 49,1% szczepów. W pracach opisujących częstość wykrywania determinant PMQR u różnych gatunków bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae* pojawiają się doniesienia mówiące o istotnie większej częstości PMQR u *K. pneumoniae* w stosunku do innych gatunków, a szczególnie *E. coli* [139, 148, 151]. W przedstawionej rozprawie również zaobserwowano taką zależność. A zatem, uzyskane wyniki wskazują, że głównym rezerwuarem genów PMQR u noworodków o bardzo małej masie urodzeniowej może być *Klebsiella pneumoniae*. Wysoka częstość występowania tych genów może być także efektem włączenia do badania 18 reprezentantów tego samego klonu epidemicznego, pochodzących od różnych pacjentów. Za włączeniem tych szczepów do puli przemawiał jednak fakt, iż cechowały się one obecnością zróżnicowanych genów oporności, zlokalizowanych na plazmidach (w tym genów PMQR, czy ESBL). Wyniki tych badań pokazały, że zdecydowana większość szczepów PMQR-dodatnich była także zdolna do produkcji ESBL (74,1% ESBL-dodatnich szczepów niosło determinantę PMQR), co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów [151, 152]. W pracach dotyczących badań nad współwystępowaniem genów *qnr* wraz z genami *bla_{CTX-M}* wykazano, że geny te często występują razem [139, 229]. Podobne wyniki uzyskano w przeprowadzonym badaniu. Wykazano także, że szczepy *K. pneumoniae* niosące geny PMQR cechowały się znacznie wyższą wartością MIC₅₀ dla badanych fluorochinolonów, niż szczepy PMQR-ujemne, co może powodować konieczność modyfikacji dawek terapeutycznych tych leków, co skądinąd byłoby sprawą bardzo kontrowersyjną w przypadkach ich stosowania u noworodków.

Kolejnym z celów niniejszej rozprawy było porównanie dwóch metody typowania *K. pneumoniae*: tańszej i szybszej, jaką jest typowanie VNTR (zmiennej liczby tandemowych powtórzeń) z rutynowo stosowaną, czasochłonną i stosunkowo drogą metodą PFGE. W badaniach próbowano określić, czy typowanie VNTR ma porównywalny potencjał rozdzielczy, jak PFGE i czy może być jej alternatywą. Nowe, szybsze i tańsze, metody typowania mogłyby być przydatne w dochodzeniach epidemiologicznych. Wyniki uzyskane przy pomocy typowania metodą VNTR w postaci cyfrowych profili były w części przypadków zgodne z wynikami uzyskanymi metodą PFGE, jednak w przypadku znacznej liczby szczepów należących do tego samego klonu (wg PFGE) były rozbieżne. Zaobserwowano, że w przypadku szczepów o zróżnicowanych wzorach prążkowych w PFGE, profile cyfrowe wygenerowane metodą VNTR także znacząco się od siebie różniły. Choć metoda typowania zmiennej liczby tandemowych powtórzeń wydaje się być szybką i taną alternatywą, nie może jednak w pełni zastąpić złotego standardu, jakim jest elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym. Jednakże może być stosowana jako metoda poprzedzająca wykonanie typowania metodą PFGE, gdyż można w praktyce wykorzystać istotną cechę VNTR, jaką jest jej szybkość uzyskania informacji o epidemii w obrębie oddziału powodowanej przez ten sam klon *Klebsiella pneumoniae*.

6.5 Charakterystyka pozostałych szczepów

Szczepy *Klebsiella oxytoca* izolowane były z zakażeń noworodków w trzech współpracujących szpitalach, zarówno z zakażeń krwi, jak i zapaleń płuc. Dwa szczepy cechowały się zdolnością do produkcji ESBL. Co ciekawe, wszystkie badane szczepy cechowała wysoka wrażliwość na wiele badanych antybiotyków. Jednak dobrą informacją jest fakt, że nie znaleziono szczepów tego gatunku opornych na którykolwiek z karbapenemów, ciprofloksacynę, trimetoprim/sulfametoksazol, tygocyklinę, amikacynę, tobramycynę czy chloramfenikol, zaś tylko pojedyncze szczepy były oporne na pozostałe antybiotyki.

Szczepy *Enterobacter* spp. izolowane były w czterech współpracujących szpitalach, zarówno z przypadków zakażeń krwi, jak i zapaleń płuc, a także innych form zakażeń. Szczepy tego rodzaju były związane z zakażeniem krwi, jednakże z częstotnością

dużo mniejszą (1,9%), niż wykazywaną przez innych autorów [57, 211, 212]. W badaniach przeprowadzonych w Wielkiej Brytanii, szczepy *Enterobacter* spp. były izolowane z 8,7% przypadków późnych zakażeń krwi, jednak nie z przypadków zakażeń wczesnych [211]. W badaniach niemieckich, czynnik ten był związany z 6,4% zakażeń krwi [57, 212]. Częstość izolacji *Enterobacter* spp. z przypadków późnych zapaleń płuc (7,8%) była porównywalna z częstością uzyskaną w badaniach niemieckich (8,8%) [212]. W trakcie typowania metodą PFGE wykazano obecność szczepów o nierozróżnialnym wzorze prążkowym, które zidentyfikowano jako klony epidemiczne występujące na oddziale. Zdolnością do produkcji ESBL cechowało się 30,0% badanych szczepów, mechanizm ten był związany głównie z obecnością genów *bla*_{CTX-M-15} i *bla*_{CTX-M-9}, co jest zgodne z danymi literaturowymi [114, 208]. Zaobserwowano, że szczepy *Enterobacter* spp. cechowały się wrażliwością na badane leki przeciwdrobnoustrojowe, nieliczne szczepy były oporne na ciprofloksacynę lub tobramycynę.

Częstość izolacji *Serratia marcescens* z zakażeń na badanych oddziałach wyniosła około 5% (11/216), włączając w to szczepy pochodzące od tych samych pacjentów. Liczne doniesienia wskazują, że częstość izolacji pałeczek *Serratia* sp. na oddziałach szpitalnych wynosi około 5-16%, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w tej rozprawie [91, 92]. Wykazano, że badane szczepy *Serratia marcescens* cechowała często wrażliwość na badane leki przeciwdrobnoustrojowe. Znaleziono tylko jeden szczep zdolny do produkcji ESBL, to znaczy znacznie mniej, niż wskazują dane literaturowe (20-70%) [93, 94]. Szczep ten pochodził z przypadku zapalenia płuc u pacjenta z ośrodka VI, u którego 40 dni wcześniej także zdiagnozowano zapalenie płuc o etiologii *Serratia marcescens*, ale spowodowane przez szczep ESBL-ujemny, co sugeruje możliwość rozwoju mechanizmu oporności w wyniku zastosowanego leczenia przeciwdrobnoustrojowego.

7 Podsumowanie

Uzyskane wyniki wskazują na konieczność dalszych badań nad epidemiologią zakażeń o etiologii *Enterobacteriaceae* w grupie noworodków o małej masie urodzeniowej. Szczególnie istotne wydają się badania molekularne nad transmisją patogenów w obrębie oddziałów noworodkowych, co może przyczynić się do ograniczenia liczby zakażeń przenoszonych horyzontalnie. Ponadto, badania nad opornością i mechanizmami oporności mogą stać się przyczynkiem do opracowania nowych wytycznych dotyczących terapii empirycznej zakażeń u noworodków o małej masie urodzeniowej. Terapia empiryczna rozpoczyna się bowiem często zanim uzyskane zostaną wyniki z laboratorium mikrobiologicznego. Ma to związek z długim czasem oczekiwania na wyniki. Badania populacyjne, prowadzone na podobnej grupie pacjentów, mogą przyczynić się do opracowania nowych wytycznych dotyczących antybiotykoterapii, mając na uwadze częstość izolacji szczepów opornych, występujących na terenie danego kraju. Konstrukcja receptariusza szpitalnego powinna być oparta o wyniki z laboratorium mikrobiologicznego i uwzględniać wyłącznie przypadki zakażeń z danego terenu, gdyż uwzględnienie przypadków kolonizacji może zaburzyć obraz epidemiologiczny oddziału. Wskazane jest, aby w oddziałach neonatologicznych wprowadzona została zasada codziennego przeglądu sytuacji leczonych noworodków, aby skrócić podaż antybiotyków, gdy wyniki badań mikrobiologicznych na to wskazują lub gdy wykluczono zakażenie [68].

Należy jednak zauważyć, że przeprowadzone badanie ma pewne ograniczenia. Badana liczba szczepów była relatywnie mała, jednak są to pierwsze w Polsce badania nad epidemiologią zakażeń o etiologii *Enterobacteriaceae* przeprowadzone na grupie noworodków o małej i bardzo małej masie urodzeniowej. Z uwagi na wysokie koszty, niektórych analiz (np. MLST) nie przeprowadzono dla wszystkich, a jedynie dla wybranej grupy szczepów. Dodatkowo, z uwagi na szybki rozwój badań dotyczących tematyki wirulencji *E. coli*, nie przebadano wielu czynników wirulencji, które mogą wydawać się istotne.

Przeprowadzone badania poszerzają aktualny stan wiedzy, dotyczący zakażeń u noworodków o małej masie urodzeniowej. Ich efektem jest wniosek, że epidemiologia zakażeń o etiologii *K. pneumoniae* i *E. coli* jest różna. W związku z tym, każdy z tych patogenów wymaga innego typu nadzoru i innego typu kontroli zakażeń.

8 Wnioski

1. Czynnikiem ryzyka zakażeń spowodowanych przez *E. coli* u noworodków z bardzo małą masą urodzeniową w stosunku do zakażeń o innej etiologii jest niski wiek ciążowy, mała masa urodzeniowa oraz niska punktacja APGAR w 1 i 5 minucie życia. Innym ważnym czynnikiem ryzyka zakażeń o etiologii *E. coli* jest kolonizacja dróg rodnych matki w trakcie ciąży tym patogenem.
2. Zakażenia spowodowane przez *E. coli* u noworodków z bardzo małą masą urodzeniową cechuje ponad dwukrotnie wyższa śmiertelność niż zakażeń o innej etiologii. Badane szczepy *E. coli* należą najczęściej do grupy filogenetycznej B2 i cechują się dużą liczbą czynników wirulencji, a więc wysoką patogennością. Duża część szczepów należy do wysoce wirulentnego i wielolekoopornego klonu ST131.
3. Bakterie należące do gatunku *E. coli* wyizolowane z przypadków zakażeń u noworodków z bardzo małą masą urodzeniową cechowały się znacznym zróżnicowaniem, nie wykazano klonalnego rozprzestrzeniania się szczepów w obrębie oddziałów, zaś wykryte klony izolowane były zwykle od tego samego pacjenta na przestrzeni czasu.
4. Szczepy *K. pneumoniae*, wyizolowane z przypadków zakażeń noworodków z bardzo małą masą urodzeniową wykazywały znaczne podobieństwo genetyczne. Wykryto horyzontalne przeniesienie szczepu *K. pneumoniae* na jednym z oddziałów szpitalnych.
5. Pomimo, że fluorochinolony nie są lekami zalecanymi i często stosowanymi do leczenia zakażeń na oddziałach noworodkowych, to jednak szczepy bakterii Gram-ujemnych pochodzące od noworodków cechują się obniżoną wrażliwością na te chemioterapeutyki, niosąc geny kodowane plazmidowo. Co za tym idzie, mogą przyczyniać się do rozprzestrzeniania genów oporności i niepowodzeń terapeutycznych.

6. Ponieważ szczepy bakterii Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae* niosące geny *qnr* nie mają jednakowego fenotypu oporności na fluorochinolony, częstość ich występowania jest znacznie wyższa niż dotychczas sądzono na podstawie wyznaczonych wartości minimalnego stężenia hamującego MIC. Wartości MIC nie dają bowiem wystarczającej informacji dotyczącej mechanizmu oporności.
7. Na podstawie uzyskanych wyników badań mikrobiologicznych należy rozważyć zaproponowanie ginekologom wprowadzenia zaleceń dotyczących przeprowadzania badań przesiewowych kobiet w trzecim trymestrze ciąży pod kątem kolonizacji pochwy przez *E. coli* w celu eliminacji nosicielstwa przed porodem za pomocą antybiotyku w sposób podobny do postępowania w przypadku stwierdzenia nosicielstwa *Streptococcus agalactiae*.
8. Ze względu na zagrożenie noworodków z bardzo niską masą urodzeniową zakażeniami powodowanymi przez zjadliwe szczepy *E. coli* należy rozważyć zalecanie neonatologom przeprowadzanie badań przesiewowych noworodków należących do tej grupy pod kątem kolonizacji jamy ustnej przez *E. coli* zaraz po przyjęciu na oddział intensywnej opieki noworodkowej.
9. Stwierdzenie występowania zakażeń powodowanych przez *K. pneumoniae* na oddziałach intensywnej opieki noworodkowej wskazuje na możliwość przeniesienia tych bakterii w obrębie oddziału. Zatem należy rozważyć w takich przypadkach konieczność wprowadzenia bardziej skutecznego systemu kontroli zakażeń (np. przez wprowadzenie lepszych i ściśle przestrzeganych procedur dezynfekcji rąk).
10. Ze względu na różnorodność fenotypów oporności pałeczek Gram-ujemnych należących do rodziny *Enterobacteriaceae* postuluje się prowadzenie badań molekularnych genów determinujących oporność w przypadkach izolacji tych bakterii, opornych fenotypowo na wiele antybiotyków.

9 Streszczenie

Celem poniższej pracy była analiza molekularnej epidemiologii zakażeń powodowanych przez oporne na antybiotyki pałeczki należące do rodziny *Enterobacteriaceae* w grupie noworodków z bardzo małą masą urodzeniową.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że czynnikami ryzyka zakażeń spowodowanych przez *E. coli* w stosunku do zakażeń o innej etiologii jest niski wiek ciążowy, mała masa urodzeniowa, niska punktacja APGAR w 1 i 5 minucie życia, a także kolonizacja dróg rodnych matki w trakcie ciąży tym patogenem.

Dodatkowo, wskazano na problem wysokiej śmiertelności w grupie noworodków z zakażeniami związanymi z *E. coli* w stosunku do grupy noworodków z zakażeniami o innej etiologii, co mogło mieć związek z wysoką opornością i zjadliwością tego patogenu.

Ponadto, wykazano, że bakterie należące do gatunku *E. coli* cechowały się znacznym zróżnicowaniem, nie wykazano klonalnego rozprzestrzeniania się szczepów w obrębie oddziałów. Inaczej było w przypadku *K. pneumoniae*, która wykazywała znaczne podobieństwo genetyczne – wykryto horyzontalne przeniesienie szczepu *K. pneumoniae* na jednym z oddziałów szpitalnych. Zatem należy rozważyć konieczność monitorowania zakażeń powodowanych przez *K. pneumoniae* w nadzorze nad zakażeniami na oddziałach intensywnej opieki noworodkowej i postulować wprowadzenie bardziej skutecznego systemu kontroli zakażeń. Wskazano również na problem związany z plazmidowo kodowaną opornością na fluorochinolony, która może być w łatwy sposób przenoszona na inne szczepy.

Uzyskane wyniki wskazują na konieczność dalszych badań nad epidemiologią zakażeń o etiologii *Enterobacteriaceae* w grupie noworodków o małej masie urodzeniowej, ze względu na fakt ich rosnącego udziału w patogeniezie tych zakażeń. Szczególnie istotne wydają się badania molekularne nad transmisją patogenów w obrębie oddziałów noworodkowych, co może przyczynić się do ograniczenia liczby zakażeń przenoszonych horyzontalnie. Ponadto, badania nad opornością i mechanizmami oporności mogą stać się przyczynkiem do opracowania nowych wytycznych dotyczących terapii empirycznej zakażeń u noworodków o małej masie urodzeniowej.

10 Summary

The aim of this study was to investigate the molecular epidemiology of infections caused by antibiotic resistant *Enterobacteriaceae* in very low birth weight neonates.

The results have shown that the risk factors for infections caused by *E. coli* (in relation to infections caused by other pathogens) are low gestational age, low birth weight, low Apgar score, as well as maternal genital tract colonization during pregnancy with *E. coli*.

Additionally, the problem of high mortality in *E. coli* associated infections (comparing to infections of different etiology) was highlighted and connected with the high resistance and virulence of the pathogen.

Furthermore, it has been shown that *E. coli* did not show clonality. It was different in case of *K. pneumoniae*, which showed genetic similarity – horizontal transfer of *K. pneumoniae* strain on one of the wards was detected. Therefore, detailed monitoring of infections caused by *K. pneumoniae* should be implemented and more effective system of infection control should be introduced. The results indicated also a problem with plasmid-mediated fluoroquinolone resistance, which can be easily transferred to other strains.

The results indicate the need for further study of the epidemiology of the infections caused by *Enterobacteriaceae* in newborns with low birth weight, due to the fact of their increasing participation in the pathogenesis of such infections. Molecular studies are of particular interest, transmission patterns should be studied, as it may help to reduce the number of infections transmitted horizontally. In addition, research on resistance and resistance mechanisms may contribute to the development of new guidelines for empiric therapy of infections in low birth weight infants.

11 Wykaz tabel i rycin

11.1 Wykaz rycin

Rysunek 1. Dendrogram podobieństwa szczepów <i>Escherichia coli</i> pochodzących z przypadków zakażeń krwi, będący wynikiem typowania molekularnego metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym po izolacji genomowego DNA i strawieniu go enzymem <i>XbaI</i> .	78
Rysunek 2. Dendrogram podobieństwa szczepów <i>Klebsiella pneumoniae</i> pochodzących z przypadków zakażeń krwi, będący wynikiem typowania molekularnego metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym po izolacji genomowego DNA i strawieniu go enzymem <i>XbaI</i> .	79
Rysunek 3. Częstość występowania genów kodujących czynniki wirulencji w badanych szczepach <i>E. coli</i> w zależności od formy zakażenia. (DO- drogi oddechowe).	82
Rysunek 4. Dendrogram podobieństwa szczepów <i>Escherichia coli</i> otrzymany po rozdziale elektroforetycznym genomowego DNA trawionego enzymem <i>XbaI</i> w zmiennym polu elektrycznym.	84
Rysunek 5. Dendrogram podobieństwa szczepów <i>Klebsiella pneumoniae</i> , będący wynikiem typowania molekularnego metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym po izolacji genomowego DNA i strawieniu go enzymem <i>XbaI</i> .	91
Rysunek 6. Porównanie dwóch metod typowania <i>Klebsiella pneumoniae</i> : PFGE i VNTR. Cyfry oznaczają profil wygenerowany metodą VNTR. ESBL oznacza zdolność do produkcji β -laktamaz o rozszerzonym spektrum. „-” oznacza brak produktu reakcji PCR, „0” oznacza obecność produktu po reakcji PCR, jednak po sekwencjonowaniu i analizie komputerowej – brak tandemowych powtórzeń.	97
Rysunek 7. Przykładowe zdjęcie przedstawiające rozdział elektroforetyczny plazmidowego DNA (numery oznaczają wybrane szczepy). M – marker wielkości.	99
Rysunek 8. Dendrogram podobieństwa szczepów <i>Enterobacter cloacae</i> otrzymany w wyniku trawienia genomowego DNA enzymem <i>XbaI</i> .	101

11.2 Wykaz tabel

Tabela 1. Gatunki bakterii obecne w materiałach pobranych z przypadków zakażeń w ośrodkach uczestniczących w badaniach, z wyszczególnieniem szczepów zdolnych do produkcji β -laktamaz o rozszerzonym spektrum (ESBL).	38
Tabela 2. Wykaz starterów wykorzystanych w badaniach, ze wskazaniem wielkości produktu i warunkami reakcji PCR.	66
Tabela 3. Wpływ wybranych czynników ryzyka na zakażenie związane z <i>E. coli</i> w porównaniu z zakażeniem niezwiązanym z <i>E. coli</i> .	74
Tabela 4. Udział poszczególnych gatunków w etiologii wczesnych i późnych zakażeń krwi.	74
Tabela 5. Wyniki badania lekowrażliwości bakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i> pochodzących z zakażeń krwi – liczba szczepów opornych na wymienione leki.	76
Tabela 6. Różnice w oporności na antybiotyki pomiędzy szczepami <i>E. coli</i> ESBL-dodatnimi i ESBL-ujemnymi, a także pomiędzy szczepami <i>E. coli</i> należącymi i nienależącymi do klonu ST131.	81
Tabela 7. Częstość występowania determinant plazmidowo kodowanej oporności na fluorochinolony (PMQR) u badanych szczepów <i>Escherichia coli</i> .	86

Tabela 8. Charakterystyka szczepów <i>Escherichia coli</i> posiadających gen <i>qnr</i> i/lub <i>aac(6')-Ib-cr</i> i ich transkoniugantów (oznaczonych symbolem Tc).....	89
Tabela 9. Liczba opornych szczepów <i>Klebsiella pneumoniae</i> z podziałem na szczepy ESBL-dodatnie i ESBL-ujemne.....	93
Tabela 10. Częstość występowania determinant plazmidowo kodowanej oporności na fluorochinolony (PMQR) u badanych szczepów <i>Klebsiella pneumoniae</i>	95
Tabela 11. Porównanie epidemicznych szczepów <i>Klebsiella pneumoniae</i> ze szpitala VI. Kolorem zaznaczono różnice pomiędzy klonami.	96
Tabela 12. Stężenie plazmidowego DNA, wyizolowanego z wybranych szczepów ESBL-dodatnich. W tabeli podano wartość absorbancji przy długości fali 260nm (A260) i stosunek absorbancji przy długości fal 260 do 280 nm (A260/280) jako wskaźnik zanieczyszczenia białkami.	98
Tabela 13. Liczba opornych szczepów <i>Enterobacter</i> sp. z podziałem na szczepy ESBL-dodatnie i ESBL-ujemne.	102

12 Bibliografia

1. Virella G: **Oporność bakterii na antybiotyki.** W: *Mikrobiologia i choroby zakaźne*. Wydawnictwo Medyczne Urban i Partner. 2000:59-62.
2. Schelegel HG: **Komórka i jej budowa.** W: *Mikrobiologia ogólna*. PWN. 2003:36-112.
3. Pobiega M: **Występowanie genów kodujących oporność typu ESBL wśród pałeczek Gram-ujemnych z rodziny Enterobacteriaceae w przypadkach zakażeń i kolonizacji u rezydentów jednostek opieki długoterminowej w Krakowie.** Kraków 2011.
4. Salyers A, Whitt D: **Populacje drobnoustrojów w organizmie człowieka.** W: *Mikrobiologia - Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko*. PWN; 2005:225-238.
5. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS: **Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1990, **172**(11):6175-6181.
6. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL: **Pathogenic *Escherichia coli*.** *Nat Rev Microbiol* 2004, **2**(2):123-140.
7. Muhldorfer I, Hacker J: **Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence.** *Microb Pathog* 1994, **16**(3):171-181.
8. Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A: **Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction.** *J Clin Microbiol* 1992, **30**(5):1189-1193.
9. Bingen E, Bonacorsi S, Brahimi N, Denamur E, Elion J: **Virulence patterns of *Escherichia coli* K1 strains associated with neonatal meningitis.** *J Clin Microbiol* 1997, **35**(11):2981-2982.
10. 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.
11. Strus M, Brzywczy-Włoch M, Chmielarczyk A, Gosiewski T, Kukla G, Rurańska-Smutnicka D, Przondo-Mordarska A, Heczko PB: **Właściwości powierzchniowe szczepów *Escherichia coli* wyizolowanych z moczu kobiet z objawami zakażenia dróg moczowo-płciowych oraz ich wrażliwość na antagonistyczne działanie różnych gatunków *Lactobacillus*.** *Urologia Polska* 2005, **58**.
12. 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.

13. Mokady D, Gophna U, Ron EZ: **Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains.** *Int J Med Microbiol* 2005, **295**(6-7):455-462.
14. Pitout JD: **Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance.** *Front Microbiol* 2012, **3**:9.
15. Amstey MS, Lewin E, Colaice J: **Vaginal colonization with invasive *Escherichia coli* during pregnancy.** *Am J Obstet Gynecol* 1980, **137**(5):534-535.
16. Krohn MA, Thwin SS, Rabe LK, Brown Z, Hillier SL: **Vaginal colonization by *Escherichia coli* as a risk factor for very low birth weight delivery and other perinatal complications.** *J Infect Dis* 1997, **175**(3):606-610.
17. Donnenberg M: *Escherichia coli: virulence mechanism of a versatile pathogen.* Academic Press, 2002:3-53;55-77.
18. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY: ***Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group.** *Clin Microbiol Rev* 2014, **27**(3):543-574.
19. Lavigne JP, Vergunst AC, Goret L, Sotto A, Combescure C, Blanco J, O'Callaghan D, Nicolas-Chanoine MH: **Virulence potential and genomic mapping of the worldwide clone *Escherichia coli* ST131.** *PLoS One* 2012, **7**(3):e34294.
20. Blanco J, Mora A, Mamani R, Lopez C, Blanco M, Dahbi G, Herrera A, Marzoa J, Fernandez V, de la Cruz F, Martinez-Martinez L, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Johnson JR, Johnston B, Lopez-Cerero L, Pascual A, Rodriguez-Bano J, Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH): **Four main virotypes among extended-spectrum-beta-lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: bacterial, epidemiological, and clinical characteristics.** *J Clin Microbiol* 2013, **51**(10):3358-3367.
21. Johnson JR, Urban C, Weissman SJ, Jorgensen JH, Lewis JS, 2nd, Hansen G, Edelstein PH, Robicsek A, Cleary T, Adachi J, Paterson D, Quinn J, Hanson ND, Johnston BD, Clabots C, Kuskowski MA, AMERECUS Investigators: **Molecular epidemiological analysis of *Escherichia coli* sequence type ST131 (O25:H4) and blaCTX-M-15 among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *E. coli* from the United States, 2000 to 2009.** *Antimicrob Agents Chemother* 2012, **56**(5):2364-2370.
22. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, Baquero F, Canton R, Nordmann P: **Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**(2):195-200.
23. Johnson TJ, Nolan LK: **Plasmid replicon typing.** *Methods Mol Biol* 2009, **551**:27-35.
24. Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M: ***Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States.** *Clin Infect Dis* 2010, **51**(3):286-294.

25. Peirano G, Bradford PA, Kazmierczak KM, Badal RE, Hackel M, Hoban DJ, Pitout JD: **Global incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* ST131.** *Emerg Infect Dis* 2014, **20**(11):1928-1931.
26. Peirano G, Pitout JD: **Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* sequence type 131 isolates causing bloodstream infections in a canadian region with a centralized laboratory system: rapid emergence of the H30-Rx sublineage.** *Antimicrob Agents Chemother* 2014, **58**(5):2699-2703.
27. Bagley ST, Seidler RJ, Talbot HW, Jr, Morrow JE: **Isolation of Klebsiellae from within living wood.** *Appl Environ Microbiol* 1978, **36**(1):178-185.
28. Cryz SJ, Jr, Furer F, Germanier R: **Experimental Klebsiella pneumoniae burn wound sepsis: role of capsular polysaccharide.** *Infect Immun* 1984, **43**(1):440-441.
29. Tomas JM, Benedi VJ, Ciurana B, Jofre J: **Role of capsule and O antigen in resistance of Klebsiella pneumoniae to serum bactericidal activity.** *Infect Immun* 1986, **54**(1):85-89.
30. Podschun R, Ullmann U: **Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors.** *Clin Microbiol Rev* 1998, **11**(4):589-603.
31. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, Grimont P: **Virulent clones of Klebsiella pneumoniae: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization.** *PLoS One* 2009, **4**(3):e4982.
32. Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, Liu KL, Chang SC: **Klebsiella pneumoniae genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess.** *Clin Infect Dis* 2007, **45**(3):284-293.
33. Tarkkanen AM, Virkola R, Clegg S, Korhonen TK: **Binding of the type 3 fimbriae of Klebsiella pneumoniae to human endothelial and urinary bladder cells.** *Infect Immun* 1997, **65**(4):1546-1549.
34. Przondo-Mordarska A, Smutnicka D, Matusiewicz K: **Occurrence and characteristic of P-like adhesin among Klebsiella strains.** *Med Dosw Mikrobiol* 2003, **55**(2):135-146.
35. Kleiner D: **Ammonium (methylammonium) transport by Klebsiella pneumoniae.** *Biochim Biophys Acta* 1982, **688**(3):702-708.
36. Esselmann MT, Liu PV: **Lecithinase production by gramnegative bacteria.** *J Bacteriol* 1961, **81**:939-945.
37. Sekowska A, Gospodarek E, Kaminska D: **Antimicrobial susceptibility and genetic similarity of ESBL-positive Klebsiella pneumoniae strains.** *Arch Med Sci* 2012, **8**(6):993-997.

38. Kaminska W, Patzer J, Dzierzanowska D: **Urinary tract infections caused by endemic multi-resistant *Enterobacter cloacae* in a dialysis and transplantation unit.** *J Hosp Infect* 2002, **51**(3):215-220.
39. Keller R, Pedroso MZ, Ritchmann R, Silva RM: **Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*.** *Infect Immun* 1998, **66**(2):645-649.
40. Michalska A, Gospodarek E: **Paleczki *Enterobacter* spp. – taksonomia, charakterystyka, czynniki wirulencji i metody identyfikacji.** *Post Mikrob* 2007, **46**:39-47.
41. Sanders WE, Jr, Sanders CC: ***Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century.** *Clin Microbiol Rev* 1997, **10**(2):220-241.
42. Gaston MA, Strickland MA, Ayling-Smith BA, Pitt TL: **Epidemiological typing of *Enterobacter aerogenes*.** *J Clin Microbiol* 1989, **27**(3):564-565.
43. Klipstein FA, Lee CS, Engert RF: **Assay of *Escherichia coli* enterotoxins by in vivo perfusion in the rat jejunum.** *Infect Immun* 1976, **14**(4):1004-1010.
44. Gaston MA: ***Enterobacter*: an emerging nosocomial pathogen.** *J Hosp Infect* 1988, **11**(3):197-208.
45. Samonis G, Anadoliotaki M, Apostolakou H, Souglakos J, Georgoulas V: **Fatal septicemia and meningitis due to *Morganella morganii* in a patient with Hodgkin's disease.** *Scand J Infect Dis* 2001, **33**(7):553-555.
46. Osanai S, Nakata H, Ishida K, Hiramatsu M, Toyoshima E, Ogasa T, Ohsaki Y, Kikuchi K: **Renal abscess with *Morganella morganii* complicating leukemoid reaction.** *Intern Med* 2008, **47**(1):51-55.
47. Cetin M, Ocak S, Kuvandik G, Aslan B, Temiz M, Aslan A: ***Morganella morganii*-associated arthritis in a diabetic patient.** *Adv Ther* 2008, **25**(3):240-244.
48. Janda JM, Abbott SL, Khashe S, Robin T: **Biochemical investigations of biogroups and subspecies of *Morganella morganii*.** *J Clin Microbiol* 1996, **34**(1):108-113.
49. Kim JH, Cho CR, Um TH, Rhu JY, Kim ES, Jeong JW, Lee HR: ***Morganella morganii* sepsis with massive hemolysis.** *J Korean Med Sci* 2007, **22**(6):1082-1084.
50. Senior BW, Voros S: **Discovery of new morganocin types of *Morganella morganii* in strains of diverse serotype and the apparent independence of bacteriocin type from serotype of strains.** *J Med Microbiol* 1989, **29**(2):89-93.
51. Gospodarek E, Bogiel T, Zalas-Wiecek P: **Communication between microorganisms as a basis for production of virulence factors.** *Pol J Microbiol* 2009, **58**(3):191-198.

52. Celejewski-Marciniak P, Tyski S: **Palczki z rodzaju *Serratia*: charakterystyka gatunków, chorobotwórczość oraz oporność na antybiotyki *Serratia marcescens*.** *Post Mikrobiol* 2011, **50**:291-302.
53. Makimura Y, Asai Y, Sugiyama A, Ogawa T: **Chemical structure and immunobiological activity of lipid A from *Serratia marcescens* LPS.** *J Med Microbiol* 2007, **56**(Pt 11):1440-1446.
54. Manning ML, Archibald LK, Bell LM, Banerjee SN, Jarvis WR: ***Serratia marcescens* transmission in a pediatric intensive care unit: a multifactorial occurrence.** *Am J Infect Control* 2001, **29**(2):115-119.
55. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP: **Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System.** *Crit Care Med* 1999, **27**(5):887-892.
56. Gastmeier P, Geffers C, Schwab F, Fitzner J, Obladen M, Ruden H: **Development of a surveillance system for nosocomial infections: the component for neonatal intensive care units in Germany.** *J Hosp Infect* 2004, **57**(2):126-131.
57. Geffers C, Piening B, Schwab F, Gastmeier P: **Surveillance of nosocomial infections among very low birth weight infants in NEO-KISS: from a voluntary system to a mandatory regulation.** *Z Geburtshilfe Neonatol* 2008, **212**(5):170-175.
58. Główny Urząd Statystyczny: Rocznik statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej. 2011.
59. Główny Urząd Statystyczny: Rocznik statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej. 2012.
60. Behrman RE SP: **Neonatal risk factors.** W: *Neonatal-Perinatal Medicine. Diseases of the fetus and infant.* 7th Edition. Fanaroff AA MR. 2002.
61. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK: **Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network.** *Pediatrics* 2002, **110**(2 Pt 1):285-291.
62. Goldmann DA, Leclair J, Macone A: **Bacterial colonization of neonates admitted to an intensive care environment.** *J Pediatr* 1978, **93**(2):288-293.
63. Goldmann DA: **The bacterial flora of neonates in intensive care-monitoring and manipulation.** *J Hosp Infect* 1988, **11 Suppl A**:340-351.
64. Savey A, Fleurette J, Salle BL: **An analysis of the microbial flora of premature neonates.** *J Hosp Infect* 1992, **21**(4):275-289.
65. Wynn JL, Neu J, Moldawer LL, Levy O: **Potential of immunomodulatory agents for prevention and treatment of neonatal sepsis.** *J Perinatol* 2009, **29**(2):79-88.

66. van Der Zwet WC, Vandenbroucke-Grauls CM, van Elburg RM, Cranendonk A, Zaaijer HL: **Neonatal antibody titers against varicella-zoster virus in relation to gestational age, birth weight, and maternal titer.** *Pediatrics* 2002, **109**(1):79-85.
67. Jurczak A, Kordek A, Grochans E, Giedrys-Kalembe S: **Clinical and microbiological characteristics of hospital infections in the neonatal intensive care unit.** *Adv Med Sci* 2007, **52** Suppl 1:30-33.
68. Wójkowska-Mach J.: **Epidemiologia zakażeń noworodków z bardzo małą masą urodzeniową w oddziałach Polskiej Sieci Neonatologicznej w 2009 roku: rozprawa habilitacyjna.** UJ CM, Kraków 2012.
69. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK: **Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants.** *N Engl J Med* 2002, **347**:240-247.
70. Doit C, Mariani-Kurkdjian P, Mahjoub-Messai F, Bidet P, Bonacorsi S, Carol A, Varon E, Bingen E: **Epidemiology of pediatric community-acquired bloodstream infections in a children hospital in Paris, France, 2001 to 2008.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010, **66**(3):332-335.
71. Lawn JE, Cousens S, Zupan J, Lancet Neonatal Survival Steering Team: **4 million neonatal deaths: when? Where? Why?** *Lancet* 2005, **365**(9462):891-900.
72. Kaftan H, Kinney JS: **Early onset neonatal bacterial infections.** *Semin Perinatol* 1998, **22**(1):15-24.
73. Lopez Sastre JB, Coto Cotallo D, Fernandez Colomer B, Grupo de Hospitales Castrillo: **Neonatal sepsis of nosocomial origin: an epidemiological study from the "Grupo de Hospitales Castrillo".** *J Perinat Med* 2002, **30**(2):149-157.
74. Sohn AH, Garrett DO, Sinkowitz-Cochran RL, Grohskopf LA, Levine GL, Stover BH, Siegel JD, Jarvis WR, Pediatric Prevention Network: **Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: Results from the first national point-prevalence survey.** *J Pediatr* 2001, **139**(6):821-827.
75. Wojkowska-Mach J, Gulczynska E, Nowiczewski M, Borszewska-Kornacka M, Domanska J, Merritt TA, Helwich E, Kordek A, Pawlik D, Gadzinowski J, Szczapa J, Adamski P, Sulik M, Klamka J, Brzychczy-Wloch M, Heczko PB: **Late-onset bloodstream infections of Very-Low-Birth-Weight infants: data from the Polish Neonatology Surveillance Network in 2009-2011.** *BMC Infect Dis* 2014, **14**:339-2334-14-339.
76. Denys A.: *Zakażenia szpitalne w wybranych oddziałach. Tom I i II.* 2013.
77. Ronnestad A, Abrahamsen TG, Medbo S, Reigstad H, Lossius K, Kaaresen PI, Engelund IE, Irgens LM, Markestad T: **Septicemia in the first week of life in a Norwegian national cohort of extremely premature infants.** *Pediatrics* 2005, **115**(3):e262-8.

78. Cordero L, Rau R, Taylor D, Ayers LW: **Enteric gram-negative bacilli bloodstream infections: 17 years' experience in a neonatal intensive care unit.** *Am J Infect Control* 2004, **32**(4):189-195.
79. Lutsar I, Chazallon C, Carducci FI, Trafojer U, Abdelkader B, de Cabre VM, Esposito S, Giaquinto C, Heath PT, Ilmoja ML, Katragkou A, Lascoux C, Metsvaht T, Mitsiakos G, Netzer E, Pugni L, Roilides E, Saidi Y, Sarafidis K, Sharland M, Usonis V, Aboulker JP, NeoMero Consortium: **Current management of late onset neonatal bacterial sepsis in five European countries.** *Eur J Pediatr* 2014, **173**(8):997-1004.
80. Ozkan H, Cetinkaya M, Koksall N, Celebi S, Hacimustafaoglu M: **Culture-proven neonatal sepsis in preterm infants in a neonatal intensive care unit over a 7 year period: coagulase-negative Staphylococcus as the predominant pathogen.** *Pediatr Int* 2014, **56**(1):60-66.
81. Graham PL, 3rd, Begg MD, Larson E, Della-Latta P, Allen A, Saiman L: **Risk factors for late onset gram-negative sepsis in low birth weight infants hospitalized in the neonatal intensive care unit.** *Pediatr Infect Dis J* 2006, **25**(2):113-117.
82. Benjamin DK, Jr, Stoll BJ: **Infection in late preterm infants.** *Clin Perinatol* 2006, **33**(4):871-82.
83. Soto SM, Bosch J, Jimenez de Anta MT, Vila J: **Comparative study of virulence traits of *Escherichia coli* clinical isolates causing early and late neonatal sepsis.** *J Clin Microbiol* 2008, **46**(3):1123-1125.
84. Birgy A, Mariani-Kurkdjian P, Bidet P, Doit C, Genel N, Courroux C, Arlet G, Bingen E: **Characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains involved in maternal-fetal colonization: prevalence of *E. coli* ST131.** *J Clin Microbiol* 2013, **51**(6):1727-1732.
85. Rodriguez-Bano J, Lopez-Cerero L, Navarro MD, Diaz de Alba P, Pascual A: **Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology.** *J Antimicrob Chemother* 2008, **62**(5):1142-1149.
86. Gagliotti C, Balode A, Baquero F, Degener J, Grundmann H, Gur D, Jarlier V, Kahlmeter G, Monen J, Monnet DL, Rossolini GM, Suetens C, Weist K, Heuer O, EARS-Net Participants (Disease Specific Contact Points for AMR): ***Escherichia coli* and Staphylococcus aureus: bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS), 2002 to 2009.** *Euro Surveill* 2011, **16**(11):19819.
87. Shakil S, Akram M, Ali SM, Khan AU: **Acquisition of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* strains in male and female infants admitted to a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and analysis of risk factors.** *J Med Microbiol* 2010, **59**(Pt 8):948-954.

88. Huang Y, Zhuang S, Du M: **Risk factors of nosocomial infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in a neonatal intensive care unit in China.** *Infection* 2007, **35**(5):339-345.
89. Denkel LA, Schwab F, Kola A, Leistner R, Garten L, von Weizsacker K, Geffers C, Gastmeier P, Piening B: **The mother as most important risk factor for colonization of very low birth weight (VLBW) infants with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E).** *J Antimicrob Chemother* 2014, **69**(8):2230-2237.
90. Chmielarczyk A, Wojkowska-Mach J, Romaniszyn D, Adamski P, Helwich E, Lauterbach R, Pobiega M, Borszewska-Kornacka M, Gulczy Ska E, Kordek A, Heczko PB: **Mode of delivery and other risk factors for *Escherichia coli* infections in very low birth weight infants.** *BMC Pediatr* 2014, **14**(1):274.
91. Foglia EE, Fraser VJ, Elward AM: **Effect of nosocomial infections due to antibiotic-resistant organisms on length of stay and mortality in the pediatric intensive care unit.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007, **28**(3):299-306.
92. Givskov M, Olsen L, Molin S: **Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for extracellular phospholipase A1 from *Serratia liquefaciens*.** *J Bacteriol* 1988, **170**(12):5855-5862.
93. Naumiuk L, Baraniak A, Gniadkowski M, Krawczyk B, Rybak B, Sadowy E, Samet A, Kur J: **Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* in two hospitals in Gdansk, Poland, over a 5-year period.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(7):3108-3116.
94. Empel J, Baraniak A, Literacka E, Mrowka A, Fiett J, Sadowy E, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Beta-PL Study Group: **Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in Enterobacteriaceae isolates from Polish hospitals.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**(7):2449-2454.
95. Vogel L, Jones G, Triep S, Koek A, Dijkshoorn L: **RAPD typing of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates using standardized reagents.** *Clin Microbiol Infect* 1999, **5**(5):270-276.
96. Krawczyk-Wyrwicka I, Piotrowski A, Rydlewska-Liszkowska I, Hanke W: **Costs of intensive care of premature infants.** *Przegl Epidemiol* 2006, **60**(1):155-162.
97. Payne NR, Carpenter JH, Badger GJ, Horbar JD, Rogowski J: **Marginal increase in cost and excess length of stay associated with nosocomial bloodstream infections in surviving very low birth weight infants.** *Pediatrics* 2004, **114**(2):348-355.
98. Ustawa o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi. . Dz. U. 2008, **234**(poz. 1570).
99. Harbarth S, Sax H, Gastmeier P: **The preventable proportion of nosocomial infections: an overview of published reports.** *J Hosp Infect* 2003, **54**(4):258-66; 321.

100. Fonseca SN, Ehrenkranz RA, Baltimore RS: **Epidemiology of antibiotic use in a neonatal intensive care unit.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994, **15**(3):156-162.
101. Cohen FL, Tartasky D: **Microbial resistance to drug therapy: a review.** *Am J Infect Control* 1997, **25**(1):51-64.
102. Hancock RE: **Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens.** *Lancet Infect Dis* 2005, **5**(4):209-218.
103. Tenover FC: **Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria.** *Am J Med* 2006, **119**(6 Suppl 1):S3-10; S62-70.
104. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M: **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.** *Am J Clin Pathol* 1966, **45**(4):493-496.
105. Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG: **Genetics of antimicrobial resistance.** *Anim Biotechnol* 2006, **17**(2):111-124.
106. Salyers A, Whitt D: **Genetyka bakterii III – horyzontalne przekazywanie genów; Populacje drobnoustrojów w organizmie człowieka.** W: *Mikrobiologia*. PWN; 2005:139-161, 220-238.
107. Baron EJ: **Classification.** W: *Medical Microbiology*. 4th edition. Edited by Baron S. Galveston (TX): The University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
108. Pobiega M, Chmielarczyk A, Wójkowska-Mach J, Heczko P: **Molekularna charakterystyka pałeczek Gram-ujemnych izolowanych z przypadków zakażeń od noworodków z małą i bardzo małą masą urodzeniową.** W: *Młodzi naukowcy dla polskiej nauki, część VIII. Nauki przyrodnicze. Tom III*. Creative Time. 2012:167-174.
109. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL: **Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance.** *Clin Microbiol Infect* 2012, **18**(3):268-281.
110. Karlovsky P: **Mutual competitive inhibition between target sites during the restriction endonuclease digestion of DNA.** *J Theor Biol* 1988, **132**(1):1-6.
111. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA: **A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure.** *Antimicrob Agents Chemother* 1995, **39**(6):1211-1233.
112. Bush K, Jacoby GA: **Updated functional classification of beta-lactamases.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**(3):969-976.
113. Livermore DM: **beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance.** *Clin Microbiol Rev* 1995, **8**(4):557-584.

114. Coque TM, Baquero F, Canton R: **Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe.** *Euro Surveill* 2008, **13**(47):19044.
115. Nikonorow E, Baraniak A, Gniadkowski M: **Oporność bakterii z rodziny Enterobacteriaceae na antybiotyki beta-laktamowe wynikająca z wytwarzania beta-laktamaz.** *Post Mikrobiol* 2013, **52**:261-271.
116. Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A: **Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among Salmonella and Escherichia coli isolates.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**(9):3203-3206.
117. Marcade G, Deschamps C, Boyd A, Gautier V, Picard B, Branger C, Denamur E, Arlet G: **Replicon typing of plasmids in Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamases.** *J Antimicrob Chemother* 2009, **63**(1):67-71.
118. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM: **Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe.** *Clin Microbiol Infect* 2008, **14 Suppl 1**:144-153.
119. Livermore DM: **The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy.** *Curr Opin Investig Drugs* 2002, **3**(2):218-224.
120. Queenan AM, Bush K: **Carbapenemases: the versatile beta-lactamases.** *Clin Microbiol Rev* 2007, **20**(3):440-58.
121. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V: **Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide.** *Clin Microbiol Infect* 2008, **14 Suppl 1**:90-103.
122. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y: **Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**(10):4623-4629.
123. Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, Hall RM: **Commensal Escherichia coli of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants.** *J Med Microbiol* 2010, **59**(Pt 11):1331-1339.
124. Pobiega M, Heczko P: **Mechanizmy oporności na fluorochinolony.** W *Nowe trendy w naukach przyrodniczych 3. Tom IV*. Creative Time. 2012:157-163.
125. Ball P: **Safety of the new fluoroquinolones compared with ciprofloxacin.** *J Chemother* 2000, **12 Suppl 1**:8-11.
126. Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP: **1,8-Naphthyridine Derivatives. a New Class of Chemotherapeutic Agents.** *J Med Pharm Chem* 1962, **91**:1063-1065.

127. Karpiuk I, Tyski S: **Looking for the new preparations for antibacterial therapy III. New antimicrobial agents from the quinolones group in clinical trials.** *Przegl Epidemiol* 2013, **67**(3):455-60, 557-61.
128. Andriole VT: **The quinolones: past, present, and future.** *Clin Infect Dis* 2005, **41** Suppl 2:S113-9.
129. Zechiedrich EL, Cozzarelli NR: **Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*.** *Genes Dev* 1995, **9**:2859-2869.
130. Kampranis SC, Maxwell A: **The DNA gyrase-quinolone complex. ATP hydrolysis and the mechanism of DNA cleavage.** *J Biol Chem* 1998, **273**(35):22615-22626.
131. Hiasa H, Yousef DO, Mariani KJ: **DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone-DNA ternary complex.** *J Biol Chem* 1996, **271**(42):26424-26429.
132. Nordmann P, Poirel L: **Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae.** *J Antimicrob Chemother* 2005, **56**(3):463-469.
133. Gootz TD, Brighty KE: **Fluoroquinolone antibacterials: SAR mechanism of action, resistance, and clinical aspects.** *Med Res Rev* 1996, **16**(5):433-486.
134. Hooper DC: **Mechanisms of fluoroquinolone resistance.** *Drug Resist Updat* 1999, **2**(1):38-55.
135. Wang M, Sahm DF, Jacoby GA, Zhang Y, Hooper DC: **Activities of newer quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**(4):1400-1401.
136. Karah N, Poirel L, Bengtsson S, Sundqvist M, Kahlmeter G, Nordmann P, Sundsfjord A, Samuelsen O, Norwegian Study Group on PMQR: **Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from Norway and Sweden.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010, **66**(4):425-431.
137. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A: **Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat.** *Clin Microbiol Rev* 2009, **22**(4):664-689.
138. Ruiz J: **Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection.** *J Antimicrob Chemother* 2003, **51**(5):1109-1117.
139. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC: **The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance.** *Lancet Infect Dis* 2006, **6**(10):629-640.

140. Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Ibe S, Sakae K: **Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(2):801-803.
141. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC: **qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**(4):1178-1182.
142. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y: **New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(9):3354-3360.
143. Kaguelidou F, Turner MA, Choonara I, Jacqz-Aigrain E: **Ciprofloxacin use in neonates: a systematic review of the literature.** *Pediatr Infect Dis J* 2011, **30**:29-37.
144. Rozanska A, Wojkowska-Mach J, Borszewska-Kornacka M, Cmiel A, Gadzinowski J, Gulczynska E, Helwich E, Kordek A, Pawlik D, Szczapa J, Heczko PB: **Antibiotic consumption and its costs of purchase in Polish neonatology networks units.** *Przegl Epidemiol* 2012, **66**(3):513-519.
145. Han C, Yang Y, Wang M, Wang A, Lu Q, Xu X, Wang C, Liu L, Deng Q, Shen X: **The prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among clinical isolates of ESBL or AmpC-producing *Escherichia coli* from Chinese pediatric patients.** *Microbiol Immunol* 2010, **54**(3):123-128.
146. Pallecchi L, Riccobono E, Mantella A, Bartalesi F, Sennati S, Gamboa H, Gotuzzo E, Bartoloni A, Rossolini GM: **High prevalence of qnr genes in commensal enterobacteria from healthy children in Peru and Bolivia.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**(6):2632-2635.
147. Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, Li L: **Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China.** *J Antimicrob Chemother* 2008, **61**(5):1003-1006.
148. Poirel L, Leviandier C, Nordmann P: **Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae isolates from a French university hospital.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**(12):3992-3997.
149. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P: **Plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrB4 identified in France in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate coexpressing a QnrS1 determinant.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(7):2652-2653.
150. Pitout JD, Wei Y, Church DL, Gregson DB: **Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of aac(6')-Ib-cr.** *J Antimicrob Chemother* 2008, **61**(5):999-1002.

151. Fang H, Huang H, Shi Y, Hedin G, Nord CE, Ullberg M: **Prevalence of qnr determinants among extended-spectrum beta-lactamase-positive Enterobacteriaceae clinical isolates in southern Stockholm, Sweden.** *Int J Antimicrob Agents* 2009, **34**(3):268-270.
152. Dahmen S, Poirel L, Mansour W, Bouallegue O, Nordmann P: **Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae from Tunisia.** *Clin Microbiol Infect* 2010, **16**(7):1019-1023.
153. Lavilla S, Gonzalez-Lopez JJ, Sabate M, Garcia-Fernandez A, Larrosa MN, Bartolome RM, Carattoli A, Prats G: **Prevalence of qnr genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain.** *J Antimicrob Chemother* 2008, **61**(2):291-295.
154. Chmielarczyk A, Pobiega M, de Champs C, Wojkowska-Mach J, Rozanska A, Heczko PB, Guillard T, Bulanda M: **The High Prevalence of Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance Among Very Low Birth-Weight Infants in Poland.** *Microb Drug Resist* 2015, .
155. Petty NK, Ben Zakour NL, Stanton-Cook M, Skippington E, Totsika M, Forde BM, Phan MD, Gomes Moriel D, Peters KM, Davies M, Rogers BA, Dougan G, Rodriguez-Bano J, Pascual A, Pitout JD, Upton M, Paterson DL, Walsh TR, Schembri MA, Beatson SA: **Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**(15):5694-5699.
156. Papagiannitsis CC, Studentova V, Jakubu V, Spanelova P, Urbaskova P, Zemlickova H, Hrabak J: **High Prevalence of ST131 Among CTX-M-Producing *Escherichia coli* from Community-Acquired Infections, in the Czech Republic.** *Microb Drug Resist* 2015, **21**(1):74-84.
157. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Canica MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR: **Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15.** *J Antimicrob Chemother* 2008, **61**(2):273-281.
158. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG: **Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(6):3140-3145.
159. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B: **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.** *J Clin Microbiol* 1995, **33**(9):2233-2239.
160. Struelens MJ, Hawkey PM, French GL, Witte W, Tacconelli E: **Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs.** *Clin Microbiol Infect* 2009, **15**(2):112-119.

161. Sabat A, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijl R, Laurent F, Grundmann H, Friedrich A: **Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance.** *Eurosurveillance* 2013, **18**.
162. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ: **Identification of plasmids by PCR-based replicon typing.** *J Microbiol Methods* 2005, **63**:219-228.
163. Lorenz MG, Wackernagel W: **Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment.** *Microbiol Rev* 1994, **58**(3):563-602.
164. Baur B, Hanselmann K, Schlimme W, Jenni B: **Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence.** *Appl Environ Microbiol* 1996, **62**(10):3673-3678.
165. Datta N, Hedges RW: **Compatibility groups among fi - R factors.** *Nature* 1971, **234**(5326):222-223.
166. Carattoli A: **Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**(6):2227-2238.
167. Lindsey RL, Frye JG, Thitaram SN, Meinersmann RJ, Fedorka-Cray PJ, Englen MD: **Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* by antimicrobial resistance profiles, plasmid replicon typing, and pulsed-field gel electrophoresis.** *Microb Drug Resist* 2011, **17**(2):157-163.
168. Chmielarczyk A, Pobiega M, Wojkowska-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. 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.
170. Maheux AF, Picard FJ, Boissinot M, Bissonnette L, Paradis S, Bergeron MG: **Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of *Escherichia coli*/Shigella in water samples.** *Water Res* 2009, **43**(12):3019-3028.
171. Liu Y, Liu C, Zheng W, Zhang X, Yu J, Gao Q, Hou Y, Huang X: **PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S-23S internal transcribed spacer.** *Int J Food Microbiol* 2008, **125**(3):230-235.
172. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE: **Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae.** *APMIS* 2007, **115**(12):1400-1408.
173. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P: **Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene.** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**(3):573-581.

174. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P: **Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**(3):622-632.
175. Nordmann P, Naas T: **Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases.** *Antimicrob Agents Chemother* 1994, **38**(1):104-114.
176. Kitchel B, Rasheed J, Endimiani A, Hujer A, Anderson KF, Bonomo RA, Patel JB: **Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**:4201-4207.
177. Oliver A, Weigel LM, Rasheed JK, McGowan Jr JE, Jr, Raney P, Tenover FC: **Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**(12):3829-3836.
178. Guillard T, Moret H, Brasme L, Carlier A, Vernet-Garnier V, Cambau E, de Champs C: **Rapid detection of qnr and qepA plasmid-mediated quinolone resistance genes using real-time PCR.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011, **70**(2):253-259.
179. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC: **Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**(11):3953-3955.
180. Centers for Disease Control and Prevention:
<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>
181. Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, Mulvey MR, Nordmann P, Ruppe E, Sarthou JL, Frank T, Vimont S, Arlet G, Branger C, Woodford N, Denamur E: **Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains.** *J Antimicrob Chemother* 2009, **64**(2):274-277.
182. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E: **Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:4555-4558.
183. Turton JF, Baklan H, Siu LK, Kaufmann ME, Pitt TL: **Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp. and comparison of isolates within these serotypes.** *FEMS Microbiol Lett* 2008, **284**(2):247-252.
184. Turton JF, Perry C, Elgohari S, Hampton CV: **PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets.** *J Med Microbiol* 2010, **59**(Pt 5):541-547.
185. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y: **Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**(4):1413-1418.

186. 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.
187. 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.
188. Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary JC,Jr, Stell AL: **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.
189. 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.
190. Zapata G, Crowley JM, Vann WF: **Sequence and expression of the *Escherichia coli* K1 *neuC* gene product.** *J Bacteriol* 1992, **174**(1):315-319.
191. 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.
192. Regue M, Climent N, Abitiu N, Coderch N, Merino S, Izquierdo L, Altarriba M, Tomas JM: **Genetic characterization of the *Klebsiella pneumoniae* *waa* gene cluster, involved in core lipopolysaccharide biosynthesis.** *J Bacteriol* 2001, **183**(12):3564-3573.
193. 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.
194. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M: **Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective.** *Mol Microbiol* 2006, **60**(5):1136-1151.
195. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S: **Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(8):4178-4182.
196. Millar M, Philpott A, Wilks M, Whiley A, Warwick S, Hennessy E, Coen P, Kempley S, Stacey F, Costeloe K: **Colonization and persistence of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae strains in infants nursed in two neonatal intensive care units in East London, United Kingdom.** *J Clin Microbiol* 2008, **46**(2):560-567.
197. Giuffre M, Cipolla D, Bonura C, Geraci DM, Aleo A, Di Noto S, Nociforo F, Corsello G, Mammina C: **Outbreak of colonizations by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 in a neonatal intensive care unit, Italy.** *Antimicrob Resist Infect Control* 2013, **2**(1):8-2994-2-8.

198. Gastmeier P, Loui A, Stamm-Balderjahn S, Hansen S, Zuschneid I, Sohr D, Behnke M, Obladen M, Vonberg RP, Ruden H: **Outbreaks in neonatal intensive care units - they are not like others.** *Am J Infect Control* 2007, **35**(3):172-176.
199. Bromiker R, Ernest N, Meir MB, Kaplan M, Hammerman C, Schimmel MS, Schlesinger Y: **Correlation of bacterial type and antibiotic sensitivity with maternal antibiotic exposure in early-onset neonatal sepsis.** *Neonatology* 2013, **103**(1):48-53.
200. Gaynes R, Edwards JR, National Nosocomial Infections Surveillance System: **Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli.** *Clin Infect Dis* 2005, **41**(6):848-854.
201. Shane AL, Stoll BJ: **Recent developments and current issues in the epidemiology, diagnosis, and management of bacterial and fungal neonatal sepsis.** *Am J Perinatol* 2013, **30**(2):131-141.
202. Karlowicz MG, Buescher ES, Surka AE: **Fulminant late-onset sepsis in a neonatal intensive care unit, 1988-1997, and the impact of avoiding empiric vancomycin therapy.** *Pediatrics* 2000, **106**(6):1387-1390.
203. Karlowicz MG, McMurray JL: **Comparison of neonatal nurse practitioners' and pediatric residents' care of extremely low-birth-weight infants.** *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000, **154**(11):1123-1126.
204. Makhoul IR, Sujov P, Smolkin T, Lusky A, Reichman B, Israel Neonatal Network: **Pathogen-specific early mortality in very low birth weight infants with late-onset sepsis: a national survey.** *Clin Infect Dis* 2005, **40**(2):218-224.
205. Wojkowska-Mach J, Chmielarczyk A, Borszewska-Kornacka M, Domanska J, Gadzinowski J, Gulczynska E, Nowiczewski M, Helwich E, Kordek A, Pawlik D, Jursa-Kulesza J, Giedrys-Kalembe S, Szczapa J, Heczko PB: **Enterobacteriaceae infections of very low birth weight infants in Polish neonatal intensive care units: resistance and cross-transmission.** *Pediatr Infect Dis J* 2013, **32**(6):594-598.
206. Castro B, Montesinos I, Fuster-Jorge P, Delgado T, Miguel-Gomez MA, Sierra A: **Epidemiology of enterobacteriaceae causing bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients.** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010, **28**(4):227-232.
207. Damjanova I, Toth A, Paszti J, Hajbel-Vekony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Fuzi M: **Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'?** *J Antimicrob Chemother* 2008, **62**(5):978-985.
208. Oteo J, Cuevas O, Lopez-Rodriguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Perez-Vazquez M, Bautista V, Arroyo M, Garcia-Caballero J, Marin-Casanova P, Gonzalez-Sanz R, Fuentes-Gomez V, Ona-Compan S, Garcia-Cobos S, Campos J: **Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults.** *J Antimicrob Chemother* 2009, **64**(3):524-528.

209. Vimont S, Mnif B, Fevre C, Brisse S: **Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates.** *J Med Microbiol* 2008, **57**(Pt 10):1308-1310.
210. Babazono A, Kitajima H, Nishimaki S, Nakamura T, Shiga S, Hayakawa M, Tanaka T, Sato K, Nakayama H, Ibara S, Une H, Doi H: **Risk factors for nosocomial infection in the neonatal intensive care unit by the Japanese Nosocomial Infection Surveillance (JANIS).** *Acta Med Okayama* 2008, **62**(4):261-268.
211. Vergnano S, Menson E, Kennea N, Embleton N, Russell AB, Watts T, Robinson MJ, Collinson A, Heath PT: **Neonatal infections in England: the NeonIN surveillance network.** *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2011, **96**(1):F9-F14.
212. Geffers C, Baerwolff S, Schwab F, Gastmeier P: **Incidence of healthcare-associated infections in high-risk neonates: results from the German surveillance system for very-low-birthweight infants.** *J Hosp Infect* 2008, **68**(3):214-221.
213. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N: **CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**(2):165-174.
214. Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon JM, Garry L, Clermont O, Denamur E, Arlet G, Vandewalle A: **The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities.** *PLoS One* 2012, **7**(9):e46547.
215. Brisse S, Diancourt L, Laouenan C, Vigan M, Caro V, Arlet G, Drieux L, Leflon-Guibout V, Mentre F, Jarlier V, Nicolas-Chanoine MH, Coli beta Study Group: **Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes.** *J Clin Microbiol* 2012, **50**(9):2974-2981.
216. Van der Bij AK, Peirano G, Pitondo-Silva A, Pitout JD: **The presence of genes encoding for different virulence factors in clonally related *Escherichia coli* that produce CTX-Ms.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012, **72**(4):297-302.
217. Bou G: **Relationship between resistance and virulence in bacteria of clinical interest.** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014, **32**(1):1-3.
218. Mshana SE: **State of the globe: evaluating the existence of extended spectrum Beta lactamases.** *J Glob Infect Dis* 2009, **1**(2):85-86.
219. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA: **Quinolone resistance from a transferable plasmid.** *Lancet* 1998, **351**(9105):797-799.
220. Allou N, Cambau E, Massias L, Chau F, Fantin B: **Impact of low-level resistance to fluoroquinolones due to *qnrA1* and *qnrS1* genes or a *gyrA* mutation on ciprofloxacin bactericidal activity in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**(10):4292-4297.

221. Briales A, Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, de Alba PD, Rodriguez-Bano J, Martinez-Martinez L, Pascual A: **Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain.** *Int J Antimicrob Agents* 2012, **39**(5):431-434.
222. Fihman V, Lartigue MF, Jacquier H, Meunier F, Schnepf N, Raskine L, Riahi J, Sanson-le Pors MJ, Bercot B: **Appearance of aac(6')-Ib-cr gene among extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a French hospital.** *J Infect* 2008, **56**(6):454-459.
223. Kim ES, Jeong JY, Jun JB, Choi SH, Lee SO, Kim MN, Woo JH, Kim YS: **Prevalence of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme among Enterobacteriaceae blood isolates in Korea.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**(6):2643-2645.
224. Kim NH, Choi EH, Sung JY, Oh CE, Kim HB, Kim EC, Lee HJ: **Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes and ciprofloxacin resistance in pediatric bloodstream isolates of Enterobacteriaceae over a 9-year period.** *Jpn J Infect Dis* 2013, **66**(2):151-154.
225. Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, Garcia I, Cano ME, Martinez-Martinez L, Pascual A: **Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for Enterobacteriaceae expressing the plasmid-carried quinolone resistance determinant qnrA1.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(6):2236-2239.
226. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, Health Care Infection Control Practices Advisory Committee: **2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings.** *Am J Infect Control* 2007, **35**(10 Suppl 2):S65-164.
227. Bloom BT, Craddock A, Delmore PM, Kurlinski JP, Voelker M, Landfish N, Rodriguez-Pierce M, Swanton D, Rossi J, Ehlen J, Harmon C, Deterding J, Houser F: **Reducing acquired infections in the NICU: observing and implementing meaningful differences in process between high and low acquired infection rate centers.** *J Perinatol* 2003, **23**(6):489-492.
228. Abdel-Hady H, Hawas S, El-Daker M, El-Kady R: **Extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in neonatal intensive care unit.** *J Perinatol* 2008, **28**(10):685-690.
229. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P: **Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem?** *Clin Microbiol Infect* 2008, **14**(4):295-297.