

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum

Dorota Ochońska

Epidemiologia molekularna szczepów klinicznych  
*Klebsiella pneumoniae*, struktura klonalna populacji,  
wirulencja i antybiotykooporność

Molecular epidemiology of clinical strains  
*Klebsiella pneumoniae*, population clonal structure,  
virulence and antibiotic resistance

*Praca doktorska*

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Monika Brzychczy-Włoch

Pracę wykonano w Katedrze Mikrobiologii UJ CM

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. Magdalena Strus

Kraków, 2023

***Składam serdeczne podziękowania:***

***Pani Profesor dr hab. n. med. Monice Brzychczy-Włoch***

*za pomoc w ukierunkowaniu tematyki pracy doktorskiej, nieustającą opiekę naukową,  
cenne wskazówki udzielone podczas przygotowania rozprawy doktorskiej,  
poświęcony czas, przychylność, zaufanie, wsparcie oraz za cierpliwość.*

***Całemu Zespołowi Współpracowników***

*Zakładu Molekularnej Mikrobiologii Medycznej Katedry Mikrobiologii UJ CM*

*za okazaną pomoc, życzliwość, niezwykle przyjazną atmosferę,  
sympatię, wzajemne zrozumienie, serdeczność i uśmiech.*

## Spis Treści

|                                                                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>WYKAZ SKRÓTÓW</b>                                                                                                     | <b>1</b>  |
| <b>STRESZCZENIE ROZPRAWY W JĘZYKU POLSKIM</b>                                                                            | <b>3</b>  |
| <b>SUMMARY</b>                                                                                                           | <b>8</b>  |
| <b>CYKL PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ</b>                                                          | <b>12</b> |
| <b>1. WSTĘP</b>                                                                                                          | <b>14</b> |
| <b>1.1 Ogólna charakterystyka pałeczek z rodzaju <i>Klebsiella</i></b>                                                   | <b>14</b> |
| 1.1.1 Systematyka, nazewnictwo                                                                                           | 14        |
| 1.1.2 Występowanie                                                                                                       | 16        |
| 1.1.3 Znaczenie kliniczne                                                                                                | 17        |
| <b>1.2 Charakterystyka gatunku <i>Klebsiella pneumoniae</i></b>                                                          | <b>18</b> |
| 1.2.1 Morfologia                                                                                                         | 18        |
| 1.2.2. Wymagania wzrostowe, metody hodowlane i profil biochemiczny                                                       | 18        |
| 1.2.3 Identyfikacja gatunkowa                                                                                            | 19        |
| 1.2.4 Postacie kliniczne zakażeń szpitalnych                                                                             | 21        |
| 1.2.5 Leczenie zakażeń                                                                                                   | 22        |
| 1.2.6 Antybiotykooporność                                                                                                | 22        |
| 1.2.7 Epidemiologia zakażeń szpitalnych                                                                                  | 27        |
| 1.2.8 Wybrane metody typowania molekularnego stosowane w epidemiologii szpitalnej                                        | 29        |
| 1.2.9 Czynniki chorobotwórczości                                                                                         | 31        |
| <b>1.3 Biofilm bakteryjny <i>K. pneumoniae</i> i jego znaczenie w medycynie</b>                                          | <b>35</b> |
| <b>2. CELE PRACY</b>                                                                                                     | <b>38</b> |
| <b>3. MATERIAŁY I METODY</b>                                                                                             | <b>40</b> |
| <b>3.1 Materiał badawczy</b>                                                                                             | <b>40</b> |
| 3.1.1 Bioetyka                                                                                                           | 40        |
| 3.1.2 Szczepy bakterii                                                                                                   | 40        |
| <b>3.2 Metody</b>                                                                                                        | <b>40</b> |
| 3.2.1 Identyfikacja gatunkowa                                                                                            | 40        |
| 3.2.2 Oznaczenie profili lekooporności                                                                                   | 41        |
| 3.2.3 Oznaczenie fenotypów oporności                                                                                     | 41        |
| 3.2.4 Detekcja genów oporności na wybrane środki przeciwdrobnoustrojowe przy zastosowaniu metody PCR oraz multipleks PCR | 42        |
| 3.2.5 Typowanie molekularne                                                                                              | 42        |

|                                                                                                                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.5.1 Typowanie molekularne przy zastosowaniu metody REA-PFGE                                                                                                                            | 41        |
| 3.2.5.2 Typowanie molekularne przy zastosowaniu metody MLST                                                                                                                                | 42        |
| 3.2.6 Detekcja genów kodujących wybrane czynniki wirulencji                                                                                                                                | 43        |
| 3.2.7 Ocena zdolności do tworzenia biofilmu                                                                                                                                                | 43        |
| 3.2.7.1 Ocena tworzenia biofilmu przy zastosowaniu metody kolorymetrycznej z fioletem krystalicznym                                                                                        | 43        |
| 3.2.7.2 Obrazowanie biofilmu na powierzchni biomateriałów, na przykładzie polietylenowych i wykonanych z polichlorku winylu rurek tracheostomijnych w skaningowym mikroskopie elektronowym | 44        |
| <b>3.3 Analiza statystyczna</b>                                                                                                                                                            | <b>45</b> |
| <b>4. WYNIKI</b>                                                                                                                                                                           | <b>46</b> |
| <b>4.1 Publikacja nr 1</b>                                                                                                                                                                 | <b>46</b> |
| 4.1.1 Charakterystyka kliniczna pacjentów                                                                                                                                                  | 47        |
| 4.1.2 Dochodzenie epidemiologiczne                                                                                                                                                         | 47        |
| 4.1.3 Profil lekooporności                                                                                                                                                                 | 49        |
| 4.1.4 Fenotypowe testy przesiewowe w kierunku wykrywania karbapenemaz oraz powiązanych $\beta$ -laktamaz                                                                                   | 49        |
| 4.1.5 Detekcja genów kodujących karbapenemazy oraz powiązane $\beta$ -laktamazy                                                                                                            | 50        |
| 4.1.6 Typowanie molekularne izolatów <i>K. pneumoniae</i> opornych na karbapenemy                                                                                                          | 50        |
| <b>4.2 Publikacja nr 2</b>                                                                                                                                                                 | <b>51</b> |
| 4.2.1 Charakterystyka kliniczna pacjentów                                                                                                                                                  | 51        |
| 4.2.2 Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe                                                                                                                                            | 52        |
| 4.2.3 Oznaczenie fenotypu oporności ES $\beta$ L                                                                                                                                           | 54        |
| 4.2.4 Detekcja genów kodujących $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L                                                                                                                       | 54        |
| 4.2.5 Typowanie molekularne izolatów <i>K. pneumoniae</i> pochodzących od pacjentów po przebytych zabiegu tracheotomii                                                                     | 54        |
| 4.2.6 Detekcja genów kodujących struktury białkowe fimbrii typu 1, 3 i ECP przy zastosowaniu reakcji PCR                                                                                   | 55        |
| 4.2.7 Ocena biofilmu bakteryjnego                                                                                                                                                          | 55        |
| 4.2.8 Obrazowanie biofilmu <i>K. pneumoniae</i> w skaningowym mikroskopie elektronowym                                                                                                     | 56        |
| <b>4.3 Publikacja nr 3</b>                                                                                                                                                                 | <b>57</b> |
| 4.3.1 Charakterystyka kliniczna pacjentów                                                                                                                                                  | 57        |
| 4.3.2 Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe                                                                                                                                            | 58        |
| 4.3.3 Wykrywanie genów kodujących $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L                                                                                                                     | 60        |
| 4.3.4 Typowanie molekularne izolatów <i>K. pneumoniae</i> wytwarzających                                                                                                                   |           |



|                                                                           |            |
|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| β-laktamazy typu ESβL                                                     | 60         |
| 4.3.5 Detekcja genów kodujących wybrane czynniki wirulencji               | 63         |
| 4.3.6 Korelacja pomiędzy występowaniem genów oporności i genów wirulencji | 63         |
| <b>5. DYSKUSJA</b>                                                        | <b>65</b>  |
| <b>6. WNIOSKI</b>                                                         | <b>82</b>  |
| <b>7. PIŚMIENNICTWO</b>                                                   | <b>84</b>  |
| <b>8. ZAŁĄCZNIKI: PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD PRACY DOKTORSKIEJ</b>      | <b>96</b>  |
| 8.1 Publikacja nr 1                                                       | 97         |
| 8.2 Publikacja nr 2                                                       | 108        |
| 8.3 Publikacja nr 3                                                       | 124        |
| <b>9. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW</b>                                       | <b>135</b> |
| <b>10. OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ</b>                                     | <b>148</b> |

## WYKAZ SKRÓTÓW

**AAC** (ang. *aminoglycoside N-acetyltransferases*) - N-acetylotransferazy aminoglikozydowe

**AmpC  $\beta$ -lactamase** (ang. *ampicillin class C  $\beta$ -lactamase*) -  $\beta$ -laktamaza klasy C

**ANT** (ang. *aminoglycoside O-nucleotydylotransferases*) - O-nukleotydylotransferazy aminoglikozydowe

**APH** (ang. *aminoglycoside O-phosphotransferases*) - O-fosfotransferazy aminoglikozydowe

**ARGs** (ang. *antibiotic resistant genes*) - geny oporności na antybiotyki

**ATCC** (ang. *American Type Culture Collection*) - Amerykańska Kolekcja Szczepów Wzorcowych

**BA** (ang. *blood agar base*) - podłoże krwawe

**BAIs** (ang. *biomaterial associated infections*) - zakażenia związane z biomateriałem

**BS $\beta$ L** (ang. *broad-spectrum  $\beta$ -lactamases*) -  $\beta$ -laktamazy o szerokim spektrum substratowym

**CC** (ang. *clonal complex*) - kompleks klonalny

**CFU** (ang. *colony forming units*) - jednostki tworzące kolonie

**CG** (ang. *clonal group*) - grupa klonalna

**CHDL** (ang. *carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -Lactamases*) - karbapenemazy klasy D

**cKP** (ang. *classical Klebsiella pneumoniae*) - klasyczny szczep *Klebsiella pneumoniae*

**CRKP** (ang. *carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae*) - *Klebsiella pneumoniae* oporna na karbapenemy

**CPE** (ang. *carbapenemase producing Enterobacteriaceae*) - pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacteriaceae* wytwarzające karbapenemazy

**CPS** (ang. *capsular polysaccharide*) - otoczka wielocukrowa

**CTX-M** (ang. *cefotaxime hydrolyzing capabilities*) - rodzina  $\beta$ -laktamaz typu ES $\beta$ L o aktywności cefotaksymaz

**ECP** (ang. *Escherichia coli common pilus*) - fimbrie powszechne *Escherichia coli*

**EDTA** (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*) - kwas etylenodiaminotetraoctowy

**EPS** (ang. *extracellular polymeric substance*) - pozakomórkowa substancja polisacharydowa

**ES $\beta$ L** (ang. *extended spectrum  $\beta$ -lactamases*) -  $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym

**HGT** (ang. *horizontal gene transfer*) - horyzontalny transfer genów

**hvKP** (ang. *hypervirulent Klebsiella pneumoniae*) - hiperwirulentny szczep *Klebsiella pneumoniae*

**IMP** (ang. *imipenemase*) - imipenemaza

**KPC** (ang. *Klebsiella pneumoniae karbapenemase*) - karbapenemaza *Klebsiella pneumoniae*

**MBL** (ang. *metallo- $\beta$ -lactamase*) - metalo- $\beta$ -laktamaza

**MDR** (ang. *multidrug resistant*) - wielolekooporność

**MGE** (ang. *mobile genetic elements*) - ruchome elementy genetyczne

**MIC** (ang. *minimal inhibitory concentration*) - minimalne stężenie hamujące

**MLST** (ang. *multi locus sequence typing*) - sekwencjonowanie genów metabolizmu podstawowego

**mPCR** (ang. *multiplex polymerase chain reaction*) - multipleksowa reakcja łańcuchowa polimerazy

**NDM** (ang. *New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase*) - metalo- $\beta$ -laktamaza typu New Delhi

**OXA-48** (ang. *oxacilinase-48*) - oksacylinaza-48

**PBP** (ang. *penicillin binding protein*) - białka wiążące penicylinę

**PCR** (ang. *polymerase chain reaction*) - reakcja łańcuchowa polimerazy

**PDR** (ang. *pandrug resistant*) - całkowita oporność na antybiotyki

**PLA** (ang. *primary liver abscess*) - pierwotny ropień wątroby

**pLVKP** (ang. *large virulence plasmid of Klebsiella pneumoniae*) - wielki plazmid *Klebsiella pneumoniae*

**REA-PFGE** (ang. *restriction enzyme analysis with pulsed field gel electrophoresis*) - analiza restrykcyjna genomowego DNA w połączeniu z elektroforezą w zmiennym polu elektrycznym

**SEM** (ang. *scanning electron microscopy*) - skaningowa mikroskopia elektronowa

**SHV** (ang. *sulphydryl variable*) -  $\beta$ -laktamaza typu SHV

**ST** (ang. *sequence type*) - typ sekwencyjny

**TEM** (ang. *Temoneira  $\beta$ -lactamase*) -  $\beta$ -laktamaza typu TEM nazwana od imienia Temoneira

**TSA** (ang. *tryptic soy agar*) - agar tryptozowo-sojowy

**TT** (ang. *tracheostomy tube*) - rurka tracheostomijna

**UPGMA** (ang. *unweighted pair group method with arithmetic mean*) - metoda średnich połączeń ze średnią arytmetyczną

**UTIs** (ang. *urinary tract infections*) - infekcje dróg moczowych

**VAP** (ang. *ventilator associated pneumonia*) - zapalenie płuc związane z wentylacją mechaniczną

**VIM** (ang. *Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase*) - metalo- $\beta$ -laktamaza typu VIM

**XDR** (ang. *extremely drug resistant*) - rozszerzona oporność na antybiotyki

## STRESZCZENIE ROZPRAWY W JĘZYKU POLSKIM

**WSTĘP.** *Klebsiella pneumoniae* jest powszechnie występującym mikroorganizmem. Miejscami jej naturalnego bytowania są wody powierzchniowe, gleba, rośliny oraz ścieki. Pałeczki te wchodzą w skład mikrobiomu człowieka oraz zwierząt. W środowisku szpitalnym *K. pneumoniae* pozostaje wciąż jednym z najważniejszych patogenów alarmowych. Wielolekooporne oraz hiperwirulentne szczepy *K. pneumoniae* (hvKP) są przyczyną zakażeń szpitalnych. Drobnoustrój ten powoduje głównie zapalenia płuc, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zakażenia septyczne oraz zakażenia dróg moczowych. powodujących zagrażające życiu zakażenia. Poza szpitalem na zakażenia najbardziej narażone są wcześniaki, noworodki, osoby w podeszłym wieku, chorzy z obniżoną odpornością i alkoholicy. Aktualnie jednym z najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia publicznego jest dynamiczne, globalne rozprzestrzenianie się *K. pneumoniae* wytwarzających karbapenemazy (CPE). Bezobjawowa kolonizacja szczepem CPE jest źródłem rozprzestrzeniania się pałeczek w populacjach pacjentów hospitalizowanych i poddawanych długotrwałej antybiotykoterapii, ponadto, wiąże się z wysokim ryzykiem (70%) rozwoju zakażenia o etiologii *K. pneumoniae* u tych chorych. Na oddziałach szpitalnych poza szczepami *K. pneumoniae* opornymi na karbapenemy (CRKP) ciągle zagrożenie powodują szczepy wytwarzające  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L. Konsekwencje kliniczne i epidemiologiczne zakażeń szczepami *K. pneumoniae* (CPE) oraz o fenotypie ES $\beta$ L sprawiają, że istnieje potrzeba stałego nadzoru i monitorowania obserwowanego zjawiska narastającej lekooporności oraz szybkiego rozprzestrzeniania się tych szczepów.

**CEL.** Głównym celem pracy było przeprowadzenie szczegółowej charakterystyki szpitalnych szczepów *K. pneumoniae* izolowanych z przypadków nosicielstwa/kolonizacji i/lub zakażeń objawowych wykrytych u chorych hospitalizowanych na wybranych oddziałach trzech szpitali specjalistycznych w Polsce. Cele szczegółowe pracy obejmowały: 1) fenotypową charakterystykę szczepów *K. pneumoniae* pod względem profili lekooporności z określeniem fenotypów oporności typu AmpC, ES $\beta$ L, KPC i OXA-48, 2) detekcję genów oporności w badanych szczepach klinicznych *K. pneumoniae*, 3) analizę epidemiologiczną i określenie struktury klonalnej badanej populacji szczepów klinicznych *K. pneumoniae* z zastosowaniem analizy makrorestrykcyjnej chromosomalnego DNA połączonej z elektroforezą w zmiennym polu elektrycznym (REA-PFGE), a także określenie typów sekwencyjnych (STs) oraz kompleksów klonalnych (CCs) izolatów przy zastosowaniu metody MLST, 4) wykrywanie genów

kodujących wybrane czynniki wirulencji, w tym bakteryjne systemy pobierania żelaza (siderofory) takie jak: aerobaktyna (gen *iutA*), enterobaktyna (gen *entB*) oraz jersiniabaktyna (gen *ybtS*), ponadto, regulator syntezy polisacharydów otoczkowych (gen *rmpA*), białka adhezyjne fimbrii typu 1 (geny: *fimA*, *fimH*), białka adhezyjne fimbrii typu 3 (geny: *mrkA*, *mrkD*), białka adhezyjne fimbrii ECP (gen *ecpA*), serotyp otoczkowy K1 i fenotyp mukoidalny (gen *magA*), serotyp otoczkowy K2 (gen *K2*), system transportu żelaza i funkcje fosfotransferazy (gen *kfu*), a także metabolizm alantoiny (gen *allS*), 5) ocenę stopnia tworzenia biofilmu przez *K. pneumoniae* przy zastosowaniu metody kolorymetrycznej z fioletem krystalicznym (CV) oraz obrazowanie biofilmu bakteryjnego utworzonego na powierzchni różnych biomateriałów na przykładzie polietylenu i polichlorku winylu wykorzystywanych do produkcji rurek tracheostomijnych za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM).

**MATERIAŁ I METODY.** Badaniem objęto 172 szczepy *K. pneumoniae* zebrane w latach 2016-2019 od pacjentów hospitalizowanych w trzech szpitalach zlokalizowanych na terenie Polski Południowej to jest: Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym imienia Jana Pawła II (n=139 pacjentów), 5 Wojskowym Szpitalu Klinicznym z Polikliniką Samodzielnego Publicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej (SPZOZ) w Krakowie (n=18 pacjentów) oraz Górnośląskim Centrum Medycznym imienia profesora Leszka Gieca Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (n=15 pacjentów). Badane izolaty pochodziły z różnych materiałów klinicznych, w tym zarówno z przypadków nosicielstwa/kolonizacji (wymazy z odbytu), jak i zakażeń objawowych. Materiał diagnostyczny stanowiły: krew, płwocina, aspirat tchawiczy, popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL), płyn opłucnowy, wymaz z rurki tracheostomijnej, wymaz z rany oraz mocz. Identyfikacja gatunkowa izolatów *K. pneumoniae* przeprowadzona została za pomocą automatycznych systemów do identyfikacji bakterii, w tym między innymi VITEK<sup>®</sup> 2 Compact. Oznaczenia profili lekooporności badanych izolatów *K. pneumoniae* dla następujących grup antybiotyków: penicylin, cefalosporyn, karbapenemów, fluorochinolonów, aminoglikozydów oraz antybiotyków z innych grup, w tym: aztreonamu, fosfomicyny, kolistyny, nitrofurantoiny, tetracykliny, trimetoprimu z sulfametoksazolem (kotrimoksazolu) i tygecykliny dokonano zgodnie z rekomendacjami Europejskiego Komitetu do spraw Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST) wersja 9.0, 2019-01-01 przy zastosowaniu metod gradientowo-dyfuzyjnych z użyciem E-testów. Oznaczenia fenotypów oporności zrealizowano za pomocą testów przesiewowych w kierunku wykrywania:  $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym i/lub

warunkujących oporność na karbapenemy takich jak:  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L w teście dwóch krążków DDST,  $\beta$ -laktamazy typu AmpC w zmodyfikowanym teście dwóch krążków z cefepimem,  $\beta$ -laktamazy typu MBL w teście z 0,5M EDTA,  $\beta$ -laktamazy typu KPC w teście z kwasem boronowym (PBA) oraz  $\beta$ -laktamazy typu OXA-48 w teście z krążkiem z temocyliną. Wykrywanie genów oporności takich jak: *bla*<sub>CTX-M-type</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> i *bla*<sub>OXA-48</sub> dokonano przy zastosowaniu metody PCR oraz multipleks PCR (mPCR). Typowanie molekularne badanych izolatów *K. pneumoniae* przeprowadzono przy zastosowaniu metody REA-PFGE opartej na analizie makrorestrykcyjnej chromosomalnego DNA połączonej z elektroforezą w zmiennym polu elektrycznym oraz metody analizy wielu *loci* - MLST opartej na sekwencjonowaniu genów metabolizmu podstawowego w tym *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* oraz *tonB*. Detekcji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji (*iutA*, *entB*, *ybtS*, *rmpA*, *magA*, *K2*, *kfu*, *allS*) dokonano za pomocą reakcji mPCR. Występowanie genów kodujących adhezyny fimbrialne (*fimA*, *fimH*, *mrkA*, *mrkD*, *ecpA*) potwierdzono za pomocą reakcji PCR. Ocenę tworzenia biofilmu przez badane *K. pneumoniae* dokonano z użyciem metody kolorymetrycznej z fioletem krystalicznym (CV). Obserwacje biofilmu *K. pneumoniae* na powierzchni rurek tracheostomijnych polietylenowych (PE) oraz wykonanych z polichlorku winylu (PVC) zrealizowano na podstawie obrazowania w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM).

**WYNIKI.** W utworzonej kolekcji 172 szczepów klinicznych *K. pneumoniae* zidentyfikowano 142 izolaty (82,6%) wytwarzające  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L oraz 15 (8,7%) izolatów CRKP wytwarzających karbapenemazy typu KPC-2, VIM-1 i OXA-48. Wszystkie izolaty o fenotypie oporności typu ES $\beta$ L zostały sklasyfikowane jako wielolekooporne i reprezentowały fenotyp MDR, 6 izolatów CRKP (3,5%) charakteryzował fenotyp XDR. Wśród szczepów prezentujących fenotyp ES $\beta$ L dominującym był gen *bla*<sub>SHV</sub> wykryty w 117 izolatach (82,4%), w dalszej kolejności gen *bla*<sub>CTX-M-type</sub> wykryty w 115 izolatach (81%), gen *bla*<sub>TEM</sub> w 111 izolatach (78,2%), *bla*<sub>CTX-M-9</sub> w 109 izolatach (76,8%) oraz gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> w 5 izolatach (3,5%). Dla wszystkich badanych izolatów CRKP potwierdzono obecność genów: *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> i *bla*<sub>OXA-48</sub>. Na podstawie uzyskanych wyników typowania molekularnego w badanej populacji szczepów o fenotypie oporności typu ES $\beta$ L zidentyfikowano 4 główne klony (A-D), wskaźnik zróżnicowania klonalnego badanych izolatów *K. pneumoniae* został określony na poziomie  $\geq 98\%$ . Ponadto, w toku przeprowadzonego genotypowania wykazano, że wszystkie badane izolaty CRKP prezentowały jeden typ REA-PFGE

oznaczony jako klon A, dodatkowo za pomocą metody MLST przyporządkowano je do typu sekwencyjnego ST147 i kompleksu klonalnego CC147. Z kolei analiza REA-PFGE, przeprowadzona wśród izolatów *K. pneumoniae* pochodzących z wydzielin tchawiczych z rurek tracheostomijnych użytkowanych przez pacjentów po przebytym zabiegu tracheotomii wykazała większe zróżnicowanie genetyczne i przynależność szczepów do szesnastu unikatowych profili restrykcyjnych (A-P). W badanej puli szczepów *K. pneumoniae* o fenotypie oporności ES $\beta$ L najczęstszymi genami kodującymi wybrane czynniki wirulencji były: *entB* (91,4%), *ybtS* (55,4%), *iutA* (55,4%), *magA* (53,2%), *kfu* (14,4%), *K2* (11,5%), *mrkD* (10,1%), *rmpA* (7,9%) i *allS* (5%). Wykryto 39 kombinacji genów kodujących badane czynniki wirulencji z wyraźną dominacją zestawienia genów *ybtS+entB+iutA* zidentyfikowana w 23 (16,5%) izolatach. Zaobserwowano duży zakres zmienności udziału genów kodujących struktury białkowe fimbrii typu 1, fimbrii typu 3 oraz fimbrii ECP. Blisko połowa (44,4%) izolatów *K. pneumoniae* pochodzących z rurek tracheostomijnych pozyskanych od pacjentów poddanych zabiegowi tracheotomii tworzyło biofilm w badaniach *in vitro*. Zdolność do tworzenia biofilmu potwierdzono w obrazowaniu SEM.

**WNIOSKI.** Wśród przebadanych szczepów klinicznych *K. pneumoniae* wykryto izolaty wytwarzające  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L w tym CTX-M-type, CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-15, SHV i TEM oraz karbapenemazy typu KPC-2, VIM-1 i OXA-48 co wskazuje, że identyfikacja fenotypów oporności na antybiotyki ma kluczowe znaczenie dla monitorowania ich w populacjach pacjentów hospitalizowanych oraz stanowi istotny element kontroli i profilaktyki zakażeń patogenami alarmowymi. Określenie częstości występowania w badanych izolatach *K. pneumoniae* genów oporności, w tym genów kodujących  $\beta$ -laktamazy typu: ES $\beta$ L (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>), CTX-M (*bla*<sub>CTX-M-type</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1 group</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9 group</sub>) oraz genów kodujących karbapenemazy typu: MBL (*bla*<sub>VIM-1</sub>), KPC (*bla*<sub>KPC-2</sub>) i OXA-48 (*bla*<sub>OXA-48</sub>), dostarcza istotnych informacji o molekularnych uwarunkowaniach tych mechanizmów oraz przyczynia się do nadzoru i monitorowania obserwowanego zjawiska narastającej lekooporności. Oznaczenie w badanej populacji izolatów *K. pneumoniae* typu sekwencyjnego ST147, charakteryzującego się wielolekoopornością i wysoką wirulencją potwierdza jego występowanie w Polsce oraz globalny zasięg. Ocena pokrewieństwa badanych szczepów *K. pneumoniae*, przeprowadzona techniką analizy restrykcyjnej chromosomalnego DNA połączoną z elektroforezą pulsową (REA-PFGE), wykazała występowanie lokalnych klonów, które utrzymywały się w populacji pacjentów oraz w środowisku szpitalnym w badanym

okresie. Wykazano duże zróżnicowanie genów kodujących wybrane czynniki wirulencji, wśród izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L, przy czym w najwyższym odsetku szczepów wykryto geny kodujące siderofory, w tym enterobaktynę (*entB*) - 91,4%, jersiniabaktynę (*ybtS*) - 55,4%, aerobaktynę (*iutA*) - 55,4% oraz otoczkowy serotyp K1 (*magA*) - 53,2%. Analiza współwystępowania genów oporności oraz genów kodujących czynniki wirulencji wykazała słabą korelację pomiędzy współwystępowaniem badanych czynników, co wskazuje na odmienny mechanizm rozprzestrzeniania się tych genów w populacji *K. pneumoniae*. W badaniach *in vitro* potwierdzono zdolność szczepów klinicznych *K. pneumoniae* izolowanych od pacjentów po przebytym zabiegu tracheotomii do tworzenia struktur biofilmu na rurkach tracheotomijnych użytkowanych przez tych pacjentów, co wskazuje na fakt, iż szczepy te mogą nieść ryzyko zakażeń związanych z jego wytworzeniem.



## SUMMARY

**INTRODUCTION:** *Klebsiella pneumoniae* is a common microorganism. This bacterium is found in the hospital and community environment. The places of its natural existence are surface waters, sewage, soil and plants. These rods are part of the microbiome of humans and animals. *K. pneumoniae* remains one of the most important alarm pathogens causing life-threatening infections, especially in young children, the elderly and immunocompromised patients. Multidrug-resistant and hypervirulent strains of *K. pneumoniae* (hvKP) are the cause of nosocomial infections developing in hospitalized patients. This pathogen mainly causes pneumonia, meningitis, septic infections and urinary tract infections. Currently, one of the most serious threats to public health is the dynamic, global spread of this species of intestinal bacteria that produce carbapenemases (so-called CPE strains). Carriage/colonization of these microorganisms in the gastrointestinal tract is the source of the spread of CPE strains in the populations of hospitalized patients. In hospital wards, in addition to carbapenem-resistant strains of *K. pneumoniae* (CRKP) strains producing ES $\beta$ L  $\beta$ -lactamases are a constant threat. The clinical and epidemiological consequences of infections with strains with the ES $\beta$ L phenotype and CPE strains, including *K. pneumoniae* isolates, make it necessary to constantly monitor and supervise this phenomenon.

**AIM:** The main objective of the study was to perform a detailed characterization of hospital *K. pneumoniae* strains isolated from cases of carrier/colonization and/or symptomatic infections detected in patients hospitalized in selected wards of three specialist hospitals in Poland. The specific objectives of the study included: 1) phenotypic characterization of *K. pneumoniae* strains in terms of drug resistance profiles, including determination of resistance phenotypes such as AmpC, ES $\beta$ L, KPC, OXA-48; 2) detection of resistance genes in the tested clinical strains of *K. pneumoniae*; 3) epidemiological analysis and determination of the clonal structure of the studied population of clinical strains of *K. pneumoniae* using macrorestriction analysis of chromosomal DNA combined with alternating electric field electrophoresis (REA-PFGE), as well as determination of sequence types (STs) and clonal complexes (CCs) of isolates at using the MLST method; 4) detection of genes encoding selected virulence factors, including bacterial iron uptake systems (siderophores) such as aerobactin (gene *iutA*), enterobactin (gene *entB*) and yersinobactin (gene *ybtS*), also a regulator of capsular polysaccharide synthesis (gene *rmpA*), fimbrial adhesion proteins type 1 (genes: *fimA*, *fimH*), fimbrial adhesion proteins type 3 (genes: *mrkA*, *mrkD*), fimbrial adhesion proteins ECP (gene *ecpA*), envelope

serotype K1 and mucoid phenotype (gene *magA*), envelope serotype K2 (gene: *K2*), iron transport system and phosphotransferase functions (gene *kfu*) and allantoin metabolism (gene *allS*); 5) assessment of the degree of biofilm formation by *K. pneumoniae* using the crystal violet (CV) colorimetric method and imaging of the bacterial biofilm formed on the surface of various biomaterials used for the production of tracheostomy tubes using scanning electron microscopy (SEM).

**MATERIALS AND METHODS:** The study covered 172 strains of *K. pneumoniae* collected in 2016-2019 from patients hospitalized in three hospitals located in Southern Poland, i.e.: John Paul II Specialist Hospital in Krakow (n=139 patients), 5th Military Clinical Hospital with a Polyclinic of the Independent Public (SPZOZ) in Krakow (n=18 patients) and the Upper Silesian Medical Center named after Professor Leszek Giec of the Medical University of Silesia in Katowice (n=15 patients). The tested isolates came from a variety of clinical materials, including both cases of carrier/colonization (rectal swabs) and symptomatic infections. The diagnostic material consisted of blood, sputum, tracheal aspirate, bronchoalveolar lavage (BAL), pleural fluid, tracheostomy tube swab, wound swab and urine. Species identification of *K. pneumoniae* isolates was carried out using automatic bacterial identification systems, including VITEK<sup>®</sup>2 Compact. The drug resistance profiles of the tested *K. pneumoniae* isolates for the following groups of antibiotics: penicillins, cephalosporins, carbapenems, fluoroquinolones, aminoglycosides and antibiotics from other groups, including aztreonam, fosfomycin, colistin, nitrofurantoin, tetracycline, trimethoprim with sulfamethoxazole and tigecycline, were performed in accordance with the recommendations of the European for Drug Susceptibility Testing (EUCAST) version 9.0, 2019-01-01 using gradient-diffusion methods using E-tests. Resistance phenotypes were determined by screening for: extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or carbapenem resistance, i.e. ES $\beta$ L-type  $\beta$ -lactamases in the DDST two-disc assay, AmpC-type  $\beta$ -lactamases in a modified cefepime two-disk test, MBL-type  $\beta$ -lactamases in the z-test 0.5M EDTA, KPC type  $\beta$ -lactamases in the boronic acid (PBA) test and OXA-48 type  $\beta$ -lactamases in the temocillin disc test. Detection of resistance genes including *bla*<sub>CTX-M-type</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> i *bla*<sub>OXA-48</sub> was performed by PCR and multiplex PCR (mPCR). Molecular typing of the tested *K. pneumoniae* isolates was carried out using the REA-PFGE method based on macro-restriction analysis of chromosomal DNA combined with electrophoresis in an alternating electric field and the MLST method based on the sequencing of housekeeping genes including *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* and *tonB*. Detection of genes encoding selected virulence factors in siderophores: aeroactin (gene:

*iutA*), enterobactin (gene: *entB*), yersinobactin (gene: *ybtS*); regulator of capsular polysaccharide synthesis (gene *rmpA*); K1 capsular serotype and mucoid phenotype (gene *magA*); capsular serotype K2 (gene *K2*); iron transport system 6 and phosphotransferase functions (gene *kfu*) and allantoin metabolism (gene *allS*) were performed by mPCR. The detection of genes encoding fimbrial adhesins type 1 (genes: *fimA*, *fimH*), fimbrial adhesins type 3 (genes: *mrkA*, *mrkD*) and ECP fimbriae (gene *ecpA*) was performed by PCR. The assessment of biofilm formation by the tested *K. pneumoniae* was performed using the crystal violet (CV) colorimetric method. Observations of *K. pneumoniae* biofilm on the surface of polyethylene (PE) and polyvinyl chloride (PVC) tracheostomy tubes from patients were made on the basis of scanning electron microscopy (SEM) imaging.

**RESULTS:** In the created collection of 172 clinical strains of *K. pneumoniae*, 142 isolates (82.6%) producing  $\beta$ -lactamases of the type (ES $\beta$ L) and 15 (8.7%) isolates resistant to carbapenems (CRKP) producing carbapenemases of the type KPC-2, VIM- 1 and OXA-48. All 142 isolates (82.6%) with the ES $\beta$ L resistance phenotype were classified as multidrug resistant and represented the MDR phenotype, six CRKP isolates (3.5%) were characterized by the XDR phenotype. Among the strains presenting the ES $\beta$ L phenotype, the *bla*<sub>SHV</sub> gene was dominant in 117 isolates (82.4%); followed by the *bla*<sub>CTX-M-type</sub> gene detected in 115 isolates (81%); *bla*<sub>TEM</sub> gene in 111 isolates (78.2%); *bla*<sub>CTX-M-9</sub> in 109 isolates (76.8%) and the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene in 5 isolates (3.5%). The presence of *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> and *bla*<sub>VIM-1</sub> genes was confirmed in all tested CRKP strains. Based on the results of molecular typing, 4 main clones (A-D) were identified in the studied population of strains with the ES $\beta$ L phenotype, and the clonal diversity index of the tested *K. pneumoniae* isolates was determined at the level of  $\geq 98\%$ . Moreover, in the course of genotyping, it was shown that all tested CRKP isolates presented one type of REA-PFGE marked as clone (A), additionally, using the MLST method, they were assigned to the ST147 sequence type and the CC147 clonal complex. On the other hand, the REA-PFGE analysis conducted among *K. pneumoniae* isolates obtained from tracheal secretions from tracheostomy tubes from patients with tracheostomy showed greater genetic diversity and strains belonging to sixteen unique restriction profiles (A-P). In the studied pool of *K. pneumoniae* strains with the ES $\beta$ L resistance phenotype, the most common genes encoding selected virulence factors were *entB* (91.4%); *ybtS* (55.4%); *iutA* (55.4%); *magA* (53.2%); *kfu* (14.4%); *K2* (11.5%); *mrkD* (10.1%); *rmpA* (7.9%) and *allS* (5%). Thirty-nine combinations of genes encoding the studied virulence factors were detected with a clear dominance of the *ybtS+entB+iutA* gene combination identified in 23 (16.5%) isolates. A large range of variability in the share of genes encoding protein structures of fimbriae type

1, fimbriae type 3 and ECP fimbriae was observed. Nearly half (44.4%) of *K. pneumoniae* isolates from tracheal secretions from tracheostomy tubes from patients undergoing tracheostomy formed a biofilm in *in vitro* studies.

**CONCLUSIONS:** Among the tested clinical strains of *K. pneumoniae*, isolates producing ES $\beta$ L  $\beta$ -lactamases of types CTX-M-type, CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-15, SHV and TEM (82.5% ) and KPC-2, VIM-1 and OXA-48 type carbapenemases (8.7%), which indicates that the identification of antibiotic resistance phenotypes is of key importance for monitoring them in hospitalized patient populations and is an important element in the control and prevention of infections with alert pathogens. Determination of the frequency of resistance genes, including genes encoding ES $\beta$ L-type  $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>), genes coding CTX-M-type  $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>CTX-M-type</sub>; *bla*<sub>CTX-M-1 group</sub>; *bla*<sub>CTX-M-9 group</sub>), genes encoding KPC-type carbapenemases (*bla*<sub>KPC-2</sub>), MBL-type carbapenemases (*bla*<sub>VIM-1</sub>) and OXA-48 type carbapenemases (*bla*<sub>OXA-48</sub>) provide important information about the molecular determinants of these mechanisms and contributes to the supervision and monitoring of the observed phenomenon of increasing drug resistance. The determination of *K. pneumoniae* isolates of the sequential type ST147 in the studied population, characterized by multidrug resistance and high virulence, confirms its presence in Poland and its global range. The relationship assessment of the tested strains of *K. pneumoniae*, performed using the technique of chromosomal DNA restriction analysis combined with pulsed electrophoresis (REA-PFGE), showed the presence of local clones that persisted in the patient population and in the hospital environment during the study period. A great diversity of genes encoding selected virulence factors was found among *K. pneumoniae* isolates producing ES $\beta$ L-type  $\beta$ -lactamases, with the highest percentage of strains showing genes encoding siderophores, including enterobactin (*entB*) - 91.4%, yersinobactin (*ybtS*) - 55.4%, aerobactin (*iutA*) - 55.4% and capsular serotype K1 (*magA*) - 53.2%. The analysis of the co-occurrence of resistance genes and genes encoding virulence factors showed a weak correlation between the co-occurrence of the studied factors, which indicates a different mechanism of the spread of these genes in the *K. pneumoniae* population. *In vitro* studies have confirmed the ability of clinical strains of *K. pneumoniae* isolated from patients with a tracheostomy to form biofilm structures, which indicates that these strains may carry the risk of infection in this group of patients associated with the formation of biofilm on the tracheostomy tubes in use.

## CYKL PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

### **Publikacja nr 1:**

**Dorota Ochońska, Hanna Klamińska-Cebula, Anna Dobrut, Małgorzata Bulanda, Monika Brzychczy-Włoch. Clonal Dissemination of KPC-2, VIM-1, OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Katowice, Poland. Polish Journal of Microbiology 2021,70(1):107-116. PMID: 33815532. DOI:10.33073/pjm-2021-010. Punktacja MNiSW:40, IF:1,280**

Mój udział szacuję na **70%** i polegał on na zaplanowaniu pracy i doborze metod badawczych, sporządzeniu kolekcji szczepów klinicznych *K. pneumoniae*, przeprowadzeniu badań laboratoryjnych w tym, identyfikacji gatunkowej badanych izolatów metodami fenotypowymi, oznaczeniu profili lekooporności na wybrane środki przeciwdrobnoustrojowe metodą gradientowo-dyfuzyjną z zastosowaniem E-testów, analizie fenotypów oporności wraz z charakterystyką  $\beta$ -laktamaz typu AmpC, ES $\beta$ L, KPC, MBL i OXA-48 za pomocą reakcji PCR i sekwencjonowania, typowaniu molekularnemu metodą REA-PFGE oraz metodą MLST, a także podsumowaniu i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

### **Publikacja nr 2:**

**Dorota Ochońska, Łukasz Ścibik, Monika Brzychczy-Włoch. Biofilm Formation of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity. Pathogens 2021,10:1345:1-15. PMID: 34684294. DOI:10.3390/pathogens10101345. Punktacja MNiSW:100, IF:3,492**

Mój udział szacuję na **70%** i polegał on na zaplanowaniu pracy i doborze metod badawczych, sporządzeniu kolekcji szczepów klinicznych *K. pneumoniae*, przeprowadzeniu badań laboratoryjnych, w tym identyfikacji gatunkowej badanych izolatów metodami fenotypowymi, oznaczeniu profili lekooporności na wybrane środki przeciwdrobnoustrojowe metodą gradientowo-dyfuzyjną z zastosowaniem E-testów, ocenie zdolności do tworzenia biofilmu na biomateriałach rurek tracheostomijnych metodą kolorymetryczną z użyciem fioleto krystalicznego (CV), wykrywaniu genów kodujących  $\beta$ -laktamazy z rodzin: SHV (gen *bla*<sub>SHV</sub>) i TEM (gen *bla*<sub>TEM</sub>) za pomocą reakcji PCR oraz

genów kodujących  $\beta$ -laktamazy z rodzin: CTX-M-type (gen *bla*<sub>CTX-M-type</sub>), CTX-M-1 (gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub>) i CTX-M-9 (gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub>) z zastosowaniem reakcji multipleks PCR (CTX-Mplex PCR), detekcji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji z wykorzystaniem metody PCR w tym, wykrywanie obecności genów kodujących białka adhezyjne fimbrii typu 1 (geny: *fimA*, *fimH*), białka adhezyjne fimbrii typu 3 (geny: *mrkA*, *mrkD*) oraz białka adhezyjne fimbrii ECP (gen *ecpA*), typowaniu molekularnemu metodą REA-PFGE, przygotowaniu i obserwacji próbek biomateriałów (polietylenu i polichlorku winylu) wykorzystywanych do produkcji rurek tracheostomijnych w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM), a także podsumowaniu i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

### **Publikacja nr 3:**

**Dorota Ochońska**, Aldona Olechowska-Jarżab, Anna Dobrut, Małgorzata Bulanda, Monika Brzychczy-Włoch. **Studies on molecular epidemiology of ES $\beta$ L-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients hospitalized in a specialist hospital in southern Poland.** *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* 2021,75:970-979. DOI:10.2478/ahem-2021-0039. **Punktacja MNiSW:40, IF:0,270**

Mój udział szacuję na **70%** i polegał on na zaplanowaniu pracy i doborze metod badawczych, sporządzeniu kolekcji szczepów klinicznych *K. pneumoniae*, przeprowadzeniu badań laboratoryjnych, w tym identyfikacji gatunkowej badanych izolatów metodami fenotypowymi, wykrywaniu genów kodujących  $\beta$ -laktamazy z rodzin SHV (gen *bla*<sub>SHV</sub>) i TEM (gen *bla*<sub>TEM</sub>) za pomocą reakcji PCR oraz genów kodujących  $\beta$ -laktamazy z rodzin: CTX-M-type (gen *bla*<sub>CTX-M-type</sub>), CTX-M-1 (gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub>) i CTX-M-9 (gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub>) z zastosowaniem reakcji multipleks PCR (CTX-Mplex PCR), detekcji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji, w tym bakteryjne systemy pobierania żelaza - siderofory takie jak aerobaktyna (gen *iutA*), enterobaktyna (gen *entB*), jersiniabaktyna (gen *ybtS*), ponadto, regulator syntezy polisacharydów otoczkowych (gen *rmpA*), białka adhezyjne fimbrii typu 3 (gen *mrkD*), serotyp otoczkowy K1 i fenotyp mukoidalny (gen *magA*), serotyp otoczkowy K2 (gen *K2*), system transportu żelaza i funkcje fosfotransferazy (gen *kfu*) oraz metabolizm alantoiny (gen *allS*) dokonano za pomocą reakcji mPCR, typowaniu molekularnemu metodą REA-PFGE, a także podsumowaniu i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

## 1. WSTĘP

### 1.1 Ogólna charakterystyka pałeczek z rodzaju *Klebsiella*

#### 1.1.1 Systematyka, nazewnictwo

Postęp w dziedzinie mikrobiologii spowodował, że klasyfikacja taksonomiczna i utworzony system nazewnictwa pałeczek zaliczanych do rodzaju *Klebsiella*, podobnie jak innych mikroorganizmów na przestrzeni lat, uległ znaczącym zmianom i podlega ciągłym modyfikacjom. Pierwszym krokiem w identyfikacji i różnicowaniu bakterii było wprowadzenie w 1884 roku przez Hansa Grama metody barwienia umożliwiającej podział bakterii na Gram-dodatnie i Gram-ujemne [1]. Od końca XIX wieku odkrycia i próby klasyfikacji kolejnych grup mikroorganizmów były dokonywane w oparciu o analizę cech fenotypowych: morfologicznych, biochemicznych, enzymatycznych i serologicznych [2]. W dalszej kolejności w określaniu przynależności taksonomicznej bakterii przydatne okazało się poznanie budowy i funkcjonowania komórek na poziomie molekularnym [3]. Przełomem w nauce był zaproponowany w latach dziewięćdziesiątych XX wieku przez Carla Richarda Woese'a model klasyfikacji organizmów oparty na analizie molekularnej sekwencji genu kodującego kwas rybonukleinowy wchodzący w skład małej podjednostki rybosomu 16S rRNA (ang. *16S ribosomal RNA*, *rrs*) [4]. Udowodniono, że analiza sekwencyjna genu *rrs* stanowi fundamentalną metodę wyznaczania zależności ewolucyjnych bakterii, także tych zaliczanych do rodzaju *Klebsiella*, w postaci tak zwanych drzew filogenetycznych [5]. Wykorzystywanie w rutynowej praktyce mikrobiologicznej genu kodującego 16S rRNA jako molekularnego markera doprowadziło do skorygowania wcześniejszych ustaleń dotyczących systematyki pałeczek z rodzaju *Klebsiella* [3]. Gen 16S rRNA zawiera zarówno regiony konserwatywne, czyli regiony wspólne dla wielu bakterii, jak i regiony swoiste gatunkowo, co pozwala na precyzyjną identyfikację rodzaju lub gatunku izolowanego szczepu bakteryjnego poprzez porównanie określanych sekwencji z sekwencjami dostępnymi w publicznych bazach danych [5]. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy naukowej opartej na wynikach wielu przeprowadzonych badań molekularnych wykazano, że inne geny o konserwatywnej ewolucyjnie sekwencji, na przykład wybrane geny metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*), w tym gen *rpoB* kodujący podjednostkę  $\beta$  polimerazy RNA charakteryzują się także wysokim potencjałem różnicującym [6]. Obecnie, identyfikację różnych grup bakterii przeprowadza się na podstawie cech fenotypowych i genotypowych opartych o sekwencje kodujące rRNA lub zsekwencjonowane genomy, dodatkowo

uzupełniane o informacje pozyskiwane ze struktury aminokwasowej białek pełniących kluczowe funkcje w komórkach [7]. Na tej podstawie w 2016 roku zaproponowano zmiany w taksonomii *γ-Proteobacteria*, zmodyfikowano nazwę rzędu *Enterobacteriales* oraz wprowadzono nowy podział rodzin wydzielonych z rodziny *Enterobacteriaceae* w obrębie rzędu *Enterobacterales* order novum [8]. Zgodnie z ustaleniami nastąpiło przekształcenie monotypowego rzędu *Enterobacteriales* zawierającego jedną rodzinę *Enterobacteriaceae* w politypowy rząd *Enterobacterales* order novum składający się z siedmiu nowych rodzin takich jak: *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* i *Budviciaceae* [8]. Uzgodniono również, że bakterie wcześniej zaliczane do rodziny *Enterobacteriaceae* w tym, przedstawiciele rodzaju *Klebsiella*, aktualnie będą klasyfikowani do taksonu w randze rzędu *Enterobacterales* [8].

**Tabela 1.** Przynależność taksonomiczna pałeczek z rodzaju *Klebsiella*. Opracowanie własne na podstawie [8-9].

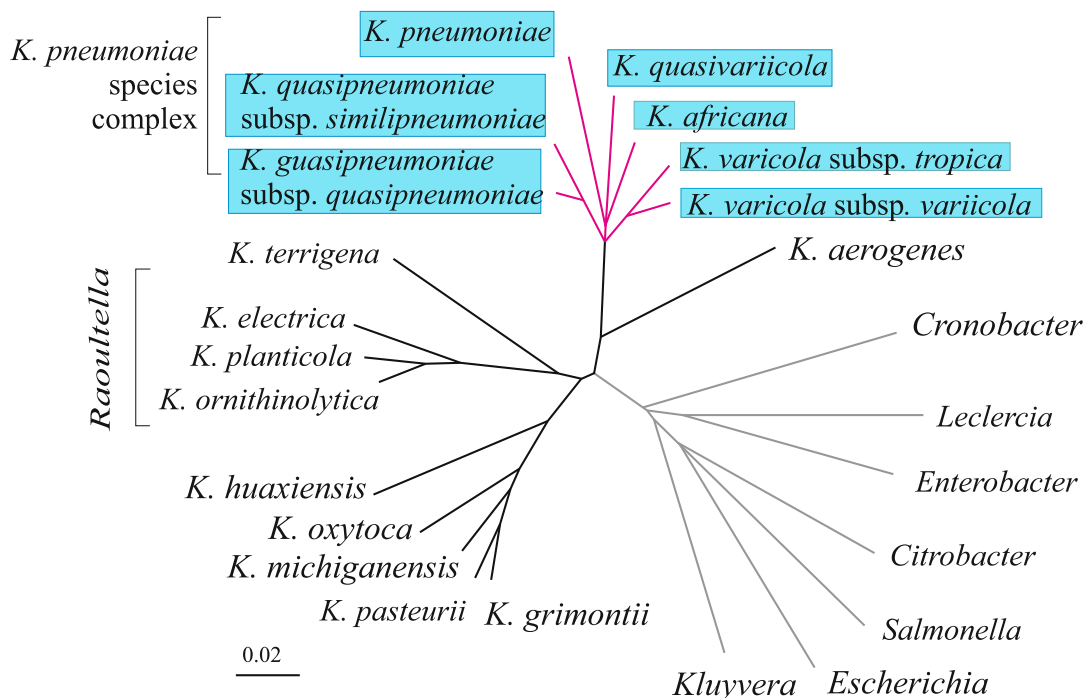
| Jednostka taksonomiczna | Nazwa                     |
|-------------------------|---------------------------|
| Domena                  | <i>Procaryota</i>         |
| Typ                     | <i>Proteobacteria</i>     |
| Klasa                   | <i>γ-proteobacteria</i>   |
| Rząd                    | <i>Enterobacterales</i>   |
| Rodzina                 | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| Rodzaj                  | <i>Klebsiella</i>         |

Obecnie w Polsce i na świecie obowiązuje kilka systemów taksonomicznych klasyfikacji pałeczek z rodzaju *Klebsiella*. Wyróżnia się między innymi system klasyfikacji według Cowan wprowadzony w 1960 roku, system klasyfikacji według Bascomb wprowadzony w 1971 roku oraz system klasyfikacji według Ørskov wprowadzony w 1984 roku [2]. Większość amerykańskich i europejskich zespołów naukowych bazuje głównie na klasyfikacji opracowanej przez Ørskov [2].

W świetle przedstawionych zmian uwzględniających nowoczesną taksonomię filogenetyczną aktualnie rodzaj *Klebsiella* obejmuje 17 gatunków, w tym 3 gatunki wchodzące w skład kompleksu *K. pneumoniae* (ang. *K. pneumoniae species complex*, KpSC) takie jak: *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* i *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*; następnie 5 kolejnych gatunków wchodzących w skład kompleksu *K. oxytoca* (ang. *Klebsiella oxytoca species complex*, KoSC) takich



jak: *K. huaxensis*, *K. oxytoca*, *K. michiganensis*, *K. pasteurii* i *K. grimontii* [10]. Ponadto, wśród kolejnych 6 gatunków wyróżnia się: *K. quasivariicola*, *K. africana*, *K. varicola* subsp. *tropica*, *K. varicola* subsp. *varicola*, *K. aerogenes* i *K. terrigena* [3]. Pozostałe 3 ostatnie gatunki: *K. electrica*, *K. planticola* oraz *K. ornithinolytica* zostały włączone do nowo utworzonego w 2001 roku rodzaju *Raoultella* (Ryc. 1) [10].



**Ryc. 1** Podział systematyczny pałeczek z rodzaju *Klebsiella*. Opracowanie własne na podstawie [10].

Nazwa rodzajowa *Klebsiella* wywodzi się od nazwiska niemieckiego mikrobiologa Edwina Klebsa (1834-1913) i została ona nadana w 1885 roku przez Vittore Trevisana dla upamiętnienia nazwiska odkrywcy [2]. Po raz pierwszy bakterie z rodzaju *Klebsiella* zostały wyizolowane w 1882 roku przez Carla Friedländer'a od pacjenta zmarłego na zapalenie płuc [11]. Jednocześnie w tym samym roku pierwszym opisanym przez Karla von Frischa gatunkiem *Klebsiella* była pałeczka *Klebsiella rhinoscleromatis* wyizolowana od pacjenta z twardzielą (łac. *scleroma*) [12].

### 1.1.2 Występowanie

Pałeczki z rodzaju *Klebsiella* są mikroorganizmami szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie. Bakterie te wchodzi w skład mikrobiomu człowieka oraz różnorodnych zwierząt (koni, kotów, psów oraz świń) [13]. U ssaków bakterie te są składnikami

mikrobioty jamy ustnej i układu oddechowego, przewodu pokarmowego oraz skóry [13]. W środowisku naturalnym pałeczki *Klebsiella* dominują jako bakterie komensalne, przy czym zjawisko komensalizmu odnosi się tylko do ekosystemu przewodu pokarmowego. Przeniknięcie komensali do narządów, tkanek oraz układu moczowego stwarza korzystne warunki do rozwoju zakażenia i choroby [14-16]. Pałeczki *Klebsiella*, wydalone z kałem człowieka i zwierząt, pospolicie występują w glebie, wodach gruntowych, powierzchniowych i morskich, a także na różnorodnych roślinach takich jak: bananowiec, kukurydza, ryż czy sorgo [14-16]. Bakterie te stanowią też składnik ścieków przemysłowych [13].

Pałeczki z rodzaju *Klebsiella* występują zarówno w środowisku szpitalnym jak i pozaszpitalnym. Środowisko szpitalne jest ważnym siedliskiem wielu gatunków pałeczek *Klebsiella*, w którym selekcionują się wielolekooporne szczepy szpitalne [17]. Badania ostatnich lat wykazują, że szczepy te są dominującymi składnikami mikroflory licznych oddziałów szpitalnych, w tym przede wszystkim oddziałów noworodkowych, anestezjologii intensywnej terapii, neurochirurgii i kardiologii [17]. Poza szpitalem na zakażenia *K. pneumoniae* najbardziej narażone są wcześniaki, noworodki, osoby w podeszłym wieku, chorzy z obniżoną odpornością oraz alkoholicy [18].

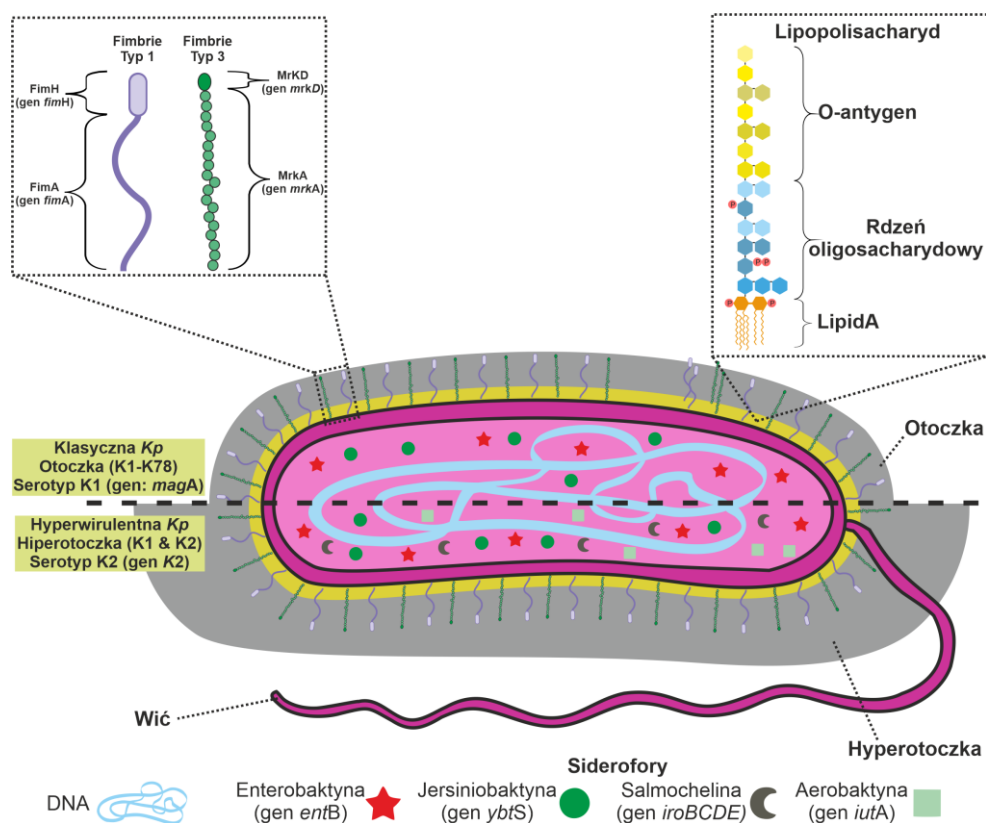
### 1.1.3 Znaczenie kliniczne

Gatunki bakterii zaliczane do rodzaju *Klebsiella* należą do największej i najbardziej heterogennej grupy blisko spokrewnionych ze sobą Gram-ujemnych pałeczek jelitowych. Pałeczki te wraz z przedstawicielami enterobakterii z rodzajów *Enterobacter*, *Serratia* i *Citrobacter* wchodzi w skład mniejszej podgrupy KESC (ang. *Klebsiella, Enterobacter, Serratia and Citrobacter subgroup*), reprezentowanej przez gatunki bakterii zaliczonych do rodzajów o najbliższym pokrewieństwie i podobnym profilu biochemicznym [4]. Drobnoustroje zaszeregowane do KESC charakteryzują się wielolekoopornością. Obecność czynników umożliwiających im swobodne przeżywanie w środowisku szpitalnym sprawia, iż są częstą przyczyną zakażeń szpitalnych (ang. *nosocomial infections*) [4]. Pałeczki *Klebsiella* jako patogeny oportunistyczne są przyczyną groźnych zakażeń dróg oddechowych głównie zapaleń płuc, uporczywych, zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych, zakażeń septycznych (posocznicy) oraz trudnych do wyleczenia zakażeń układu moczowego [18]. Bakterie te mogą być także czynnikiem etiologicznym epidemicznych biegunek występujących u noworodków [18].

## 1.2 Charakterystyka gatunku *Klebsiella pneumoniae*

### 1.2.1 Morfologia

*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*, pałeczka zapalenia płuc nazywana dawniej pałeczką Friedländera) to Gram-ujemna pałeczka, cylindryczna, otoczkowa, bezrzęskowa, nie wytwarzająca przetrwalników [17]. Wielkość pałeczek jest zróżnicowana i wynosi 0,3-1 µm szerokości oraz 0,6-6 µm długości [17]. Niektóre szczepy kliniczne *K. pneumoniae* mogą być wyposażone w pojedynczą wić (ang. *flagellum*), której włókno zbudowane jest z polimeru flagelliny. Włókno wici poruszane jest poprzez struktury zlokalizowane w błonie komórkowej drobnoustroju zwiększając tym samym jego ruchliwość [19]. Obecność wici może być traktowana jako istotny czynnik zjadliwości u tego gatunku bakterii (Ryc. 2) [19].

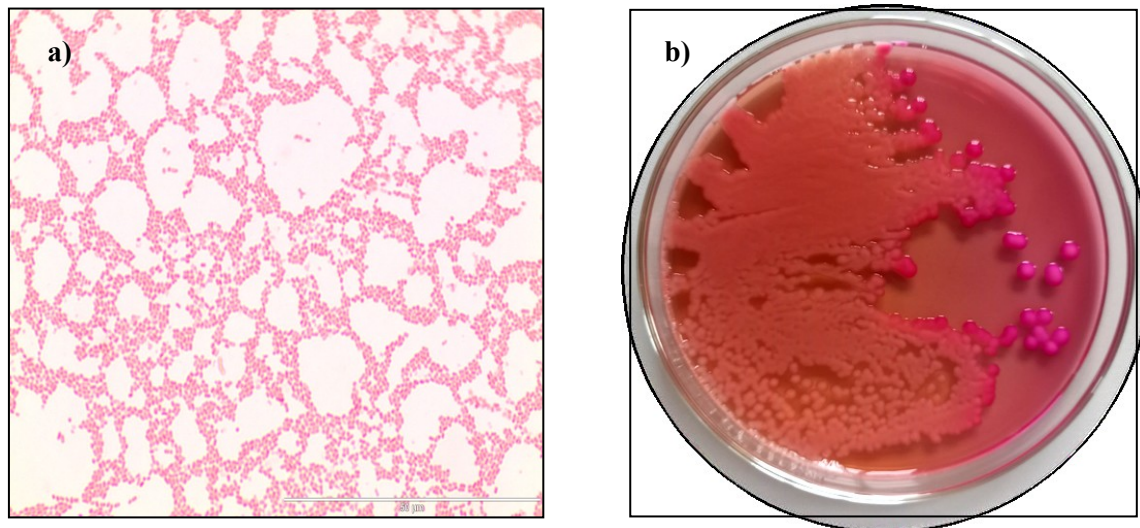


**Ryc. 2** Schematyczne przedstawienie morfologii komórki bakterii z gatunku *K. pneumoniae*. Opracowanie własne na podstawie [17].

### 1.2.2 Mikroskopia, wymagania wzrostowe, metody hodowlane i profil biochemiczny

Pałeczki *K. pneumoniae* w preparatach mikroskopowych z hodowli układają się w pary lub krótkie łańcuszki, komórki z reguły łączą się biegunami (Ryc. 3a). W preparatach bezpośrednich bakterie te układają się parami przypominając dwoinki zapalenia płuc potocznie nazywane również pneumokokami [4].

*K. pneumoniae* to fakultatywne (względne) beztlenowce rosnące zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych, w optymalnej temperaturze 37°C. Pałeczki swobodnie przeżywają w środowisku nieożywionym w bardzo szerokim zakresie temperatur, sięgającym od 12°C do 42°C. Bakterie te są katalazo-dodatnie i oksydazo-ujemne, redukują azotany do azotynów, nie wytwarzają deoksyrybonukleazy (DNaz-y), nie powodują dezaminacji fenyloalaniny [4]. Ponadto, są indolo-ujemne, wytwarzają ureazę, fermentują laktozę, jako źródło węgla wykorzystują kwas malonowy oraz cytrynian sodu, produkują dekarboksylazę lizyny, nie wytwarzają dekarboksylazy ornityny [4]. Hodowle bulionowe pałeczek *K. pneumoniae* są jednolicie mętne z utworzonym pierścieniem lub błonką zlokalizowaną na powierzchni hodowli [20]. Podobnie jak inne gatunki pałeczek *Enterobacterales* *K. pneumoniae* rosną dobrze i obficie na zwykłych podłożach tworząc charakterystyczne śluzowe, błyszczące, wypukłe, gładkie, szarobiałe kolonie [20]. Hodowle pałeczek *K. pneumoniae* mogą być prowadzone na podłożach nieselektywnych takich jak: agar zwykły (ang. *tryptic soy agar*, TSA) lub agar z krwią (ang. *blood agar*, BA) oraz na podłożach selektywnych (wybiórczo-różnicujących) w tym między innymi na agarze MacConkey'a (Ryc. 3b), podłożu Drigalskiego, podłożu EMB (ang. *eosin-methylene blue agar*) oraz podłożu BTB (ang. *bromo-tymol blue agar*) [2, 4].



**Ryc. 3 (a);** Przykładowe zdjęcie obrazu preparatu z hodowli bakteryjnej pałeczek *K. pneumoniae* barwionych według metody Grama. **(b)** Przykładowy wzrost bakterii *K. pneumoniae* na podłożu MacConkey'a, widoczny typowy różowy kolor kolonii fermentujących laktozę. Opracowanie własne na podstawie [4].

### 1.2.3 Identyfikacja gatunkowa

Do identyfikacji gatunkowej *K. pneumoniae* wykorzystywane są różne metody mikrobiologiczne, od technik mikroskopowych poprzez tradycyjne metody fenotypowe aż do zaawansowanych analiz molekularnych [1-2, 4, 21]. W trakcie hodowli pałeczek jelitowych *Enterobacterales* izolację i wstępną kwalifikację bakterii do gatunku *K. pneumoniae* ułatwia widoczny na podłożach stałych śluzowy wygląd kolonii bakteryjnych. Zjawisko to jest wynikiem wytwarzania przez szczepy *K. pneumoniae* wielocukrowej otoczki bakteryjnej (ang. *capsular polysaccharide*, CPS) i jest cechą charakterystyczną szczególnie dobrze obserwowaną na podłożach wybiórczo-różnicujących zawierających węglowodany [4, 20]. Otoczkę bakteryjną dodatkowo można uwidocznąć poprzez zastosowanie specjalnych technik barwienia, na przykład metody negatywno-pozytywnej według Burriego-Ginsa wykorzystującej tusz chiński i fuksynę zasadową mającej na celu uwidocznienie bezbarwnej otoczki pokrywającej zabarwione komórki bakteryjne *K. pneumoniae* na ciemnym tle preparatu [20]. Na poziomie molekularnym opisane właściwości są zależne od występującego w komórkach *K. pneumoniae* wielkiego plazmidu (ang. *large mosaic virulence plasmid*, pLVKP) kodującego cechy fenotypu charakteryzującego się śluzowym wyglądem kolonii bakteryjnych oraz zdolnością wytwarzania sideroforów [22-24]. Badania w kierunku identyfikacji szczepów *K. pneumoniae* wykazujących zdolność do tworzenia fenotypu hipermukoidalnego (ang. *hypermucoviscosity*, HM) charakterystycznego dla izolatów wysoce zjadliwych przeprowadzane są za pomocą „testu ciągliwości” (ang. *string test*) (Ryc. 4) [25].



**Ryc. 4** Przykładowy dodatni wynik „testu ciągliwości” dla izolatów *K. pneumoniae* charakteryzujących się fenotypem hipermukoidalnym. Opracowanie własne na podstawie [25].

Dalsza identyfikacja gatunkowa *K. pneumoniae* prowadzona jest w oparciu o metody bakteriologiczne polegające na analizach cech biochemicznych za pomocą metod manualnych przy użyciu wystandaryzowanych zestawów, na przykład pasków typu API<sup>®</sup> 20E lub metod automatycznych z wykorzystaniem kompaktowych systemów do identyfikacji bakterii wraz z jednoczesnym określeniem lekowrażliwości drobnoustrojów, na przykład przy użyciu systemu VITEK<sup>®</sup> 2 Compact [26-27]. Precyzyjna identyfikacja pałeczek do poziomu gatunku może być przeprowadzona za pomocą dodatkowych wysokospecjalistycznych technik wykorzystujących spektrometrię masową MALDI-TOF-MS (ang. *matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*), identyfikujących mikroorganizmy na podstawie analizy ich profilu białkowego (ang. *molecular surface interaction fingerprinting*) w zestawieniu ze wzorcami referencyjnymi [28].

W diagnostyce mikrobiologicznej wśród badań molekularnych podstawową metodą badawczą i diagnostyczną jest łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) [29]. Metoda ta polega na powieleniu (amplifikowaniu) materiału genetycznego oraz wykrywaniu czynników chorobotwórczych na poziomie molekularnym. Proces ten zachodzi w wyniku wielokrotnego podgrzewania i oziębiania próbki i jest prowadzony w warunkach laboratoryjnych. Technika PCR jest czuła, specyficzna i stosunkowo szybka. Metoda ta jest wykorzystywana między innymi w badaniach dotyczących wykrywania drobnoustrojów, ich identyfikacji na poziomie gatunku i szczepu, a także określenia ich powiązań filogenetycznych. Jako technika umożliwiająca wykrywanie konserwatywnego genu prokariontów 16S RNA, PCR znalazła szczególne zastosowanie w szybkiej identyfikacji drobnoustrojów [29].

#### 1.2.4 Postacie kliniczne zakażeń szpitalnych

Pałeczka *K. pneumoniae* jest identyfikowana w około 95% przypadków wśród wszystkich drobnoustrojów chorobotwórczych z rodzaju *Klebsiella* wywołujących większość groźnych infekcji u ludzi [20]. Bakteria ta może być czynnikiem etiologicznym zakażeń przebiegających pod wieloma postaciami klinicznymi i występującymi z różną częstotliwością. Pałeczki te odgrywają kluczową rolę w pierwotnym, szpitalnym i pozaszpitalnym płatowym zapaleniu płuc. Ponadto, wywołują infekcje dróg moczowych (ang. *urinary tract infections*, UTIs), bakterie, zapalenie opon mózgowych, zapalenie wnętrza gałki ocznej (łac. *endophthalmitis*), pierwotny ropień wątroby (ang. *primary liver abscess*, PLA), zakażenia ran, zakażenia septyczne, zakażenia dróg żółciowych, zapalenia

opon mózgowo-rdzeniowych (głównie u noworodków), biegunki, zapalenia otrzewnej oraz infekcje tkanek miękkich w szczególności u chorych po urazach [13, 30-31].

Zgodnie z najnowszymi doniesieniami literaturowymi wśród izolatów *K. pneumoniae* wyróżnia się szczepy klasyczne (ang. *classical Klebsiella pneumoniae*, cKP) oraz szczepy hiperwirulentne (ang. *hypervirulent Klebsiella pneumoniae*, hvKP). Szczepy cKP wywołują najczęściej pozaszpitalne zapalenie płuc, są przede wszystkim izolowane od pacjentów w podeszłym wieku obciążonych czynnikami ryzyka takimi jak: nadużywanie alkoholu czy palenie papierosów [32]. Z kolei szczepy hvKP to szczepy wysoce zjadliwe, odpowiadające za pozaszpitalne zapalenia płuc charakteryzujące się ciężkim przebiegiem oraz wysokim odsetkiem śmiertelności sięgającym w niektórych regionach świata nawet do 40% [32]. W wyniku procesu translokacji z jelita, szczepy hvKP mogą rozsiewać się do innych narządów i tkanek (centralnego układu nerwowego, płuc, kości, prostaty, skóry i tkanki podskórnej), a także przyczyniać się do powstawania pierwotnych ropni wątroby (ang. *primary liver abscess*, PLA) [33].

### 1.2.5 Leczenie zakażeń

Do środków przeciwdrobnoustrojowych, w tym antybiotyków i chemioterapeutyków aktywnych wobec szczepów *K. pneumoniae* należą: aminoglikozydy (amikacyna, gentamycyna, netylmycyna, tobramycyna), cefalosporyny II (cefuroksym), III (ceftazydym, cefotaksym) i IV generacji (cefepim), a także fluorochinolony (ciprofloksacyna, lewofloksacyna, moksifloksacyna, ofloksacyna), karbapenemy (doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem), trimetoprim z sulfametoksazolem (kotrimoksazol), monobaktamy (aztreonam), piperacylina z tazobaktamem, tikarcylina z klawulanianem oraz ureidopenicyliny (azlocylina, mezlocylina) [34]. W terapii empirycznej najczęściej stosowanymi grupami antybiotyków są aminoglikozydy i cefalosporyny. Należy pamiętać, że w przypadku izolacji pałeczek *K. pneumoniae* konieczne jest określenie wrażliwości na antybiotyki w celu doboru najskuteczniejszej opcji terapeutycznej, z uwagi na wysoki odsetek szczepów opornych na większość leków przeciwbakteryjnych [35-37].

### 1.2.6 Antybiotykooporność

Dla pałeczek *K. pneumoniae* charakterystyczne jest zjawisko oporności naturalnej oraz duże zdolności nabywania oporności na drodze różnorodnych procesów genetycznych, przykładowo mutacji lub przekazania informacji genetycznej wskutek



bezpośredniego kontaktu komórek [13, 38]. Pojawianie się genów oporności na antybiotyki (ang. *antibiotic resistant genes*, ARGs) jest konsekwencją powszechnego, niejednokrotnie nieprawidłowego stosowania antybiotyków nie tylko w medycynie, ale także innych dziedzinach życia takich jak: weterynaria, rolnictwo, rybołówstwo czy ogrodnictwo [39].

Oporność *K. pneumoniae* na antybiotyki i/lub chemioterapeutyki może być determinowana informacją genetyczną zakodowaną w chromosomie lub ruchomych elementach genetycznych (ang. *mobile genetic elements*, MGE) [40]. Oporność chromosomalna generuje się w wyniku mutacji, czyli spontanicznej zmiany fragmentu sekwencji DNA genomu (chromosomu) lub nabycia genu oporności, na przykład w przebiegu procesu transformacji obcogatunkowego DNA. Geny oporności zlokalizowane w chromosomalnym DNA rozprzestrzeniają się klonalnie znacznie wolniej niż geny oporności zlokalizowane na MGE, które mogą stanowić nawet do 40% całkowitej puli informacji genetycznej zawartej w danym szczepie. Do MGE oprócz plazmidów i genomów bakteriofagów należą elementy transpozycyjne (sekwencje insercyjne i ranspozony), elementy integrujące z DNA w tym elementy koniugacyjne (ang. *integrative and conjugative elements*, ICE) oraz elementy mobilizowalne (ang. *integrative and mobilizable elements*, IME), a także introny oraz inteiny [40]. Ruchome elementy genetyczne (MGE) odgrywają istotną rolę w generowaniu zmienności organizmów gdyż są zdolne do przenoszenia informacji genetycznej w procesie horyzontalnego transferu genów (ang. *horizontal gene transfer*, HGT). Ponadto, MGE są uznawane za jeden z najbardziej rekombinogennych czynników, gdyż kodują różne rekombinazy, których aktywność może doprowadzić do zmian struktury materiału genetycznego mikroorganizmu [40].

Pałeczki *K. pneumoniae* wykształciły trzy zasadnicze mechanizmy oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki: enzymatyczną, receptorową i transportową [41]. Najlepiej rozwiniętym mechanizmem u tych szczepów jest oporność enzymatyczna. Ten najważniejszy i najczęstszy typ oporności na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe związany jest z produkcją wydzielanych pozakomórkowo enzymów:  $\beta$ -laktamaz, rozkładających antybiotyki z tej grupy. Proces wytwarzania  $\beta$ -laktamaz przez *K. pneumoniae* pozostaje jednym z najszerzej badanych mechanizmów oporności bakterii na leki [42-45]. Fundamentalny zarys podziałów  $\beta$ -laktamaz obejmujący wszystkie znane klasy, grupy i podgrupy powstał dawno przed wprowadzeniem antybiotyków  $\beta$ -laktamowych do leczenia [41, 45-46]. W chwili obecnej ogromna różnorodność  $\beta$ -laktamaz jest wynikiem rozprzestrzeniania się genów oporności na drodze procesów koniugacji,



transdukcji i transformacji wśród szczepów bakteryjnych [41]. Dodatkowo, w toku ewolucji powstają kolejne mutacje powodujące różnicowanie się tych enzymów, przyczyną których jest stosowanie na masową skalę antybiotyków, zarówno w terapii jak i w innych dziedzinach działalności człowieka, w tym w hodowli zwierząt czy rolnictwie [39]. Aktualnie obowiązują dwa główne systemy klasyfikacji  $\beta$ -laktamaz, strukturalny i funkcjonalny [41]. System strukturalny zaproponowany przez Ambler'a jest oparty na analizie sekwencji aminokwasowych  $\beta$ -laktamaz i klasyfikuje enzymy pod względem pokrewieństwa ewolucyjnego na cztery klasy oznaczone literami od A do D, przy czym do klas A, C i D zaliczane są  $\beta$ -laktamazy serynowe, natomiast enzymy z klasy B to metalo- $\beta$ -laktamazy [41]. Drugi system funkcjonalny autorstwa Bush'a i Jacoby'ego grupuje  $\beta$ -laktamazy na podstawie porównania szybkości reakcji hydrolizy antybiotyków  $\beta$ -laktamowych oraz na podstawie oceny podatności tych enzymów na działanie typowych inhibitorów  $\beta$ -laktamaz, takich jak: kwas klawulanowy, sulbaktam i tazobaktam, a także aztreonam, kloksacylina, kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. *ethylenediamine-tetraacetic acid*, EDTA) i chlorek sodu (ang. *sodium chloride*, NaCl) [41]. System ten klasyfikuje  $\beta$ -laktamazy na cztery główne grupy funkcjonalne ponumerowane odpowiednio od 1 do 4 [46]. Grupa 1 obejmuje chromosomalne cefalosporynazy AmpC (ang. *ampicillin class C  $\beta$ -lactamase*), całkowicie hamowane przez kloksacylinę, ale słabo reagujące na inhibicyjne działanie kwasu klawulanowego. Enzymy te jako preferowane substraty obejmują cefalosporyny, penicyliny i monobaktamy (aztreonam). Do bardziej zróżnicowanej strukturalnie i funkcjonalnie grupy 2 podzielonej na 12 podgrup (2a-2f) zalicza się zarówno penicylinazy, jak i cefalosporynazy, o wąskim spektrum substratowym takie jak: LEN (ang. *from K. pneumoniae strain LEN-1*), OKP (ang. *Other K. pneumoniae  $\beta$ -lactamases*) i SHV (ang. *sulfhydryl variable*). Ponadto, do grupy 2 zaliczane są  $\beta$ -laktamazy o szerokim spektrum substratowym nazywane wtórnymi  $\beta$ -laktamazami (ang. *broad-spectrum  $\beta$ -lactamases*, BS $\beta$ L),  $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ang. *extended spectrum  $\beta$ -lactamases*, ES $\beta$ L) oraz  $\beta$ -laktamazy o ekstremalnie szerokim spektrum substratowym obejmującym praktycznie wszystkie antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. Do tych ostatnich zaliczane są karbapenemazy typu KPC (ang. *Klebsiella pneumoniae carbapenemases*), nabyte  $\beta$ -laktamazy hydrolizujące karbapenemy klasy D (podgrupa 2df), czyli enzymy CHDL (ang. *carbapenem-hydrolysing class D  $\beta$ -lactamases*) włączając typ OXA-48 (ang. *oxacilinase-48*) [44]. Aktywność enzymów grupy OXA jest hamowana przez kwas klawulanowy, sulbaktam oraz tazobaktam [47]. Grupa 3 to metalo- $\beta$ -laktamazy (ang. *metallo- $\beta$ -lactamases*, MBL) reprezentowane przez

$\beta$ -laktamazy typu IMP (ang. *imipenemase*),  $\beta$ -laktamazy typu VIM (ang. *Verona-integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase*) oraz  $\beta$ -laktamazy typu NDM-1 (ang. *New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase*) hydrolizujące penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy. Metallo- $\beta$ -laktamazy (MBL) są kodowane na integronach klasy 1 i 3. Enzymy te są hamowane przez EDTA natomiast, w odróżnieniu od aktywności enzymów z grupy 2 nie są hamowane przez inhibitory  $\beta$ -laktamaz. W skład grupy 4 wchodzi kilka dawno zidentyfikowanych i słabo poznanych penicylinaz. Grupa ta została pominięta w najnowszej wersji systemu klasyfikacji funkcjonalnej [48].

U szczepów *K. pneumoniae* równolegle z ewolucją enzymatycznej oporności na  $\beta$ -laktamy, zachodziło nabywanie enzymatycznej oporności na antybiotyki aminoglikozydowe [49]. Aminoglikozydy w porównaniu z antybiotykami  $\beta$ -laktamowymi charakteryzują się znacznie węższym zakresem działania i rzadziej indukują oporność wśród bakterii. Najważniejszym mechanizmem oporności bakterii na tę grupę antybiotyków jest wytwarzanie enzymów kodowanych plazmidowo. Enzymy te modyfikują antybiotyk aminoglikozydowy poprzez blokowanie aktywnych funkcjonalnie aminowych i hydroksylowych grup chemicznych. Wśród najpowszechniejszych enzymów wyróżnia się: N-acetylotransferazy (ang. *aminoglycoside N-acetyltransferases*, AAC) modyfikujące grupy aminowe z wykorzystaniem jako donora grupy acetylowej - acetylokoenzymu A, następnie O-fosfotransferazy (ang. *aminoglycoside phosphotransferases*, APH) modyfikujące grupy hydroksylowe wykorzystujące adenozyno-5'-trifosforanu (ang. *adenozyno-5'-trifosforan*, ATP) oraz O-nukleotydylotransferazy (ang. *aminoglycoside nucleotydylotransferases*, ANT), modyfikujące także grupy hydroksylowe wykorzystujące ATP [49]. Modyfikacjom łatwo poddają się naturalne aminoglikozydy, takie jak: gentamycyna, streptomycyna, kanamycyna i tobramycyna [49]. Oporność na aminoglikozydy może być wynikiem zmniejszonego powinowactwa podjednostki 30S rybosomu do antybiotyku wytworzonego na skutek mutacji bakteryjnego DNA, 16S rRNA oraz białek rybosomalnych, a także zmniejszonego transportu antybiotyku do wnętrza komórki bakteryjnej na skutek uruchomienia pompy usuwającej lek z komórki [49].

Oporność receptorowa u *K. pneumoniae* dotyczy antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, aminoglikozydów oraz fluorochinolonów. Ten typ oporności polega na modyfikacji docelowego miejsca wiązania antybiotyku - receptora, w którym wiąże się on z komórką bakteryjną. Efektem tego procesu są różnorodne zmiany konformacyjne w zależności od rodzaju antybiotyku. W przypadku antybiotyków  $\beta$ -laktamowych mechanizm oporności

receptorowej związany jest z barierami przepuszczalności lub ze spadkiem powinowactwa do białek wiążących penicylinę (ang. *penicillin binding proteins*, PBP) zaliczanych do rodzaju PBP-3, -4 i -5. Mechanizm ten odnotowywany jest u 60% pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* [34]. Receptorowe mechanizmy oporności na aminoglikozydy u *K. pneumoniae* mogą być wynikiem zmiany rybosomalnych białek w szczególności w przypadku streptomycyny lub rzadziej mutacji występujących w rybosomalnym RNA (rRNA). W aspekcie epidemiologicznym najważniejszym mechanizmem warunkującym oporność *K. pneumoniae* na większość stosowanych w terapii aminoglikozydów takich jak: amikacyna, gentamycyna, kanamycyna, netilmycyna i tobramycyna jest produkcja i ekspresja kodowanych plazmidowo różnych typów enzymów metylujących podjednostkę 16S rRNA (metylotransferaz) w tym: ArmA (ang. *Aminoglycosyde resistance mtase*), RmtA (ang. *Resistance-associated methyltransferase A*), RmtB (ang. *Resistance-associated methyltransferase B*), RmtC (ang. *Resistance-associated methyltransferase C*), RmtD (ang. *Resistance-associated methyltransferase D*), RmtG (ang. *Resistance-associated methyltransferase G*) [50-51].

W przypadku antybiotyków fluorochinolowych podstawowym mechanizmem oporności receptorowej u *K. pneumoniae* na tę grupę leków są mutacje w regionie determinującym oporność na fluorochinolony (ang. *quinolone resistance-determining region*, QRDR). Najczęstsze mutacje zachodzą w genie odpowiedzialnym za syntezę gyrazy (*gyrA*) lub topoizomerazy IV (*parC*). Pierwszy enzym jest odpowiedzialny za ujemny skręt helisy DNA, drugi enzym odpowiada za rozdzielanie nici DNA niezbędne do procesu replikacji [34]. Mutacje odpowiedzialne za oporność w genie *gyr* prowadzą do zmiany jednego aminokwasu w enzymie. Oporność związana ze zmianą topoizomerazy IV jest wynikiem wielostopniowych mutacji, w efekcie których szczepy bakteryjne nabywają oporność w coraz większym stopniu [34].

Oporność transportowa u *K. pneumoniae* może być wynikiem mutacji w genach kodujących białka porynowe (ang. *outer membrane proteins*, OMPs) zakotwiczone w błonie komórkowej niezbędne elementy oporności drobnoustrojów na substancje chemiczne. Białka OMPs są pierwszą barierą, jaką napotykać czynniki antybakteryjne. Zdolność do penetracji błony komórkowej jest warunkiem niezbędnym do zahamowania podziału lub zabicia bakterii [52]. U *K. pneumoniae* w transporcie antybiotyków do wnętrza komórki bakteryjnej kluczową rolę odgrywają dwa główne białka porynowe (ang. *major proteins*) - OmpK35 i OmpK36 występujące w błonie w dużej liczbie kopii. Poza tym, szczepy odporne mogą charakteryzować się deficytem poryn w błonie komórkowej,

wówczas ich funkcje przejmują białka drugorzędne (ang. *minor proteins*) - LamB, OmpK37/26 i PhoE, których ekspresja w błonie jest zależna od potrzeb komórki. Białka te kompensują komórce niedobory niespecyficznych poryn poprzez swobodny przepływ składników odżywczych równocześnie blokując przepływ antybiotyków. Dodatkowo błony komórkowe pałeczek *K. pneumoniae* są wyposażone w małe białko OmpK37 homologiczne z białkiem OmpN u *E. coli*. Białko to nie jest produkowane w naturalnych warunkach [52].

Drugim możliwym wariantem oporności transportowej wykorzystywanym przez pałeczki *K. pneumoniae* jest wypompowywanie antybiotyku poza komórkę w przebiegu mechanizmu typu *efflux*. Transport antybiotyków uwarunkowany jest obecnością białek transportowych w błonie komórkowej. W zależności od budowy, liczby sekwencji transbłonowych, swoistości substratowej oraz mechanizmu działania wyróżnia się pięć rodzin pomp: MFS (ang. *major facilitator superfamily*), SMR (ang. *small multidrug resistance family*), MATE (ang. *multidrug and toxic compound extrusion family*), ABC (ang. *ATP binding cassette superfamily*) i RND (ang. *resistance nodulation cell division family*) [15]. Z uwagi na złożoną strukturę osłon komórkowych u bakterii Gram-ujemnych białka transportowe tworzą potrójną strukturę, złożoną z białka wewnętrznej błony cytoplazmatycznej, białka błony zewnętrznej, tworzące kanał transportowy oraz łączącego oba wymienione białka, białka przestrzeni periplazmatycznej. U *K. pneumoniae* występuje pompa AcrAB-TolC wcześniej opisana u *E. coli*. Pompa ta należy do rodziny pomp RND wykorzystujących gradient protonów w poprzek błony komórkowej w celu wyzwolenia ruchu cząstek substratu [15]. Pompa ta odpowiedzialna jest nie tylko za usuwanie z komórki bakteryjnej soli kwasów tłuszczowych, ale także za wyrzut antybiotyków, między innymi aminoglikozydów,  $\beta$ -laktamów, fluorochinolonów, tetracyklin i glikocyklin. Wskutek derepresji genu *acrAB*, błony komórkowe szczepów opornych *K. pneumoniae* charakteryzują się zwiększoną liczbą pomp, a co za tym idzie, zwiększonym aktywnym usuwaniem antybiotyku z komórki bakteryjnej [15].

### 1.2.7 Epidemiologia zakażeń szpitalnych

Oporność na antybiotyki w szczególności na karbapenemy u *K. pneumoniae* jest jednym z głównych wyzwań dla instytucji opieki zdrowotnej na całym świecie w okresie ostatnich dwóch dekad [17]. Od pierwszego opisu w 1996 roku w Północnej Karolinie *K. pneumoniae* wytwarzającej karbapenemazę szczepy CPE gwałtownie rozprzestrzeniły się na całym świecie [13].

Według szacunkowych danych Europejskiego Centrum do spraw Zapobiegania i Kontroli Chorób (ang. *European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) odnotowano wzrost częstości zakażeń wywoływanych przez szczepy *K. pneumoniae* odporne na karbapenemy o 46% w Europie z 26 399 w 2016 roku do 38 668 w 2020 roku [53].

Zdolność pałeczek *K. pneumoniae* do rozprzestrzeniania się w środowisku szpitalnym powoduje, że jako drobnoustroje oportunistyczne odgrywają one niekorzystną rolę jako czynnik etiologiczny poważnych zakażeń szpitalnych stanowiących od 3-8% wszystkich raportowanych przypadków szpitalnych zakażeń bakteryjnych u pacjentów hospitalizowanych [54]. Pałeczki te między innymi odpowiadają za 83% szpitalnych zapaleń płuc [17]. Zasadniczym powodem ułatwiającym rozwój zakażeń szpitalnych powodowanych przez te patogeny jest wysoki odsetek kolonizacji pacjentów głównie w górnych drogach oddechowych, przewodzie pokarmowym i drogach moczowych przez wyselekcjonowane, wielolekooporne szczepy pałeczek [55-56]. Zgodnie z najnowszymi danymi, kolonizacja nosogardzieli u ludzi zdrowych przez *K. pneumoniae* wynosi od 1% do 5% w krajach zachodnich oraz od 1,4% do powyżej 20% w krajach azjatyckich, Brazylii oraz w krajach afrykańskich [55-56]. Z kolei kolonizacja przewodu pokarmowego zdrowych osób przez *K. pneumoniae* sięga od 5% do 35% w krajach zachodnich oraz od 19% do 88% w krajach azjatyckich [56]. Do rozwoju zakażeń szpitalnych wywoływanych przez szczepy *K. pneumoniae* powodujące ciężkie zakażenia układowe z wysokim odsetkiem śmiertelności, mogą przyczyniać się zarówno pałeczki wchodzące w skład naturalnej mikrobioty pacjenta, wywołując zakażenia endogenne, ale także jako patogeny oportunistyczne pochodzące ze środowiska szpitalnego, wywołując zakażenia egzogenne. Naukowo udowodniono, że ryzyko zakażenia u osób skolonizowanych szczepami *K. pneumoniae* jest czterokrotnie wyższe niż u osób niebędących nosicielami bakterii tego gatunku [56]. Znaczna część infekcji endogennych powodowanych przez *K. pneumoniae* rozwija się u osób często lub długotrwale hospitalizowanych obciążonych poważnymi chorobami podstawowymi upośledzającymi odporność takimi jak: choroby serca, cukrzyca, miażdżyca, niewydolność nerek, nowotwory, ponadto, nagłymi stanami zagrażającymi życiu, takimi jak: udary i zawały, a także długotrwałym przyjmowaniem antybiotyków, leków immunosupresyjnych czy steroidów [57]. Do rozwoju zakażeń endogennych może dochodzić także w wyniku interwencji chirurgicznych przeprowadzanych w obrębie dróg oddechowych, jamy brzusznej lub układu moczowego [57]. Czynniki predysponującymi do zakażeń wywoływanych przez *K. pneumoniae*

należą również wiek między innymi wcześniaki, noworodki, osoby w podeszłym wieku oraz różnego rodzaju uzależnienia (alkoholizm czy palenie tytoniu) [57]. W placówkach medycznych istotnym wektorem przenoszenia chorób bakteryjnych wywoływanych przez *K. pneumoniae* są ręce personelu medycznego sprawującego opiekę nad pacjentem. Źródłem zakażeń egzogennych może być także zanieczyszczony sprzęt medyczny (cewniki, defibrylatory, dreny, endoskopy, katetery i rurki tracheostomijne (ang. *tracheostomy tubes*, TTs), materiały opatrunkowe, nieprawidłowo przechowywane leki, systemy wentylacyjne, kanalizacyjne lub klimatyzacyjne. Ważnym rezerwuarem tych drobnoustrojów są toalety i umywalki [44].

### **1.2.8 Wybrane metody typowania molekularnego stosowane w epidemiologii szpitalnej**

Jednym z głównych narzędzi stosowanych w epidemiologii szpitalnej jest typowanie epidemiologiczne nazywane genotypowaniem, którego głównym celem jest różnicowanie wewnątrzgatunkowe izolatów bakteryjnych. Celem typowania epidemiologicznego jest ustalenie genetycznego podobieństwa drobnoustrojów pochodzących z różnych źródeł, w szczególności od hospitalizowanych pacjentów oraz ze środowiska nieożywionego [18, 58].

W aspekcie epidemiologicznym pałeczki *K. pneumoniae* wytwarzające  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L oraz różne karbapenemazy zaliczane są do ważniejszych drobnoustrojów alarmowych, które w warunkach danego oddziału czy szpitala mogą wywołać zakażenie o charakterze epidemii lub występują endemicznie [18, 59]. Ciągłe narastanie oporności pałeczek *K. pneumoniae* na antybiotyki, a także wzrost liczby zakażeń oportunistycznych wywoływanych przez ten drobnoustrój oraz dodatkowych czynników ryzyka zakażenia związanych z inwazyjną diagnostyką i leczeniem wymagają aktualnie prowadzenia systematycznej, rzetelnej i specjalistycznej kontroli ekosystemu szpitala oraz rejestracji zakażeń, szczególnie wywołanych przez ten patogen alarmowy [18, 59]. Badania epidemiologiczne szczepów *K. pneumoniae* stanowią podstawę tworzenia racjonalnej polityki antybiotykowej oraz zwalczania zakażeń i chorób zakaźnych począwszy od lokalnego poziomu oddziału szpitala, następnie całej jednostki, poprzez regiony, kraje i kontynenty, kończąc na całym świecie [60-62]. Znalezienie klonalnie spokrewnionych izolatów w badanych próbkach dowodzi, że szczepy te uczestniczą w transmisji zakażenia. Szczepy bakterii powodujące zakażenia szpitalne mogą klonalnie rozprzestrzeniać się zarówno wewnątrz jak i pomiędzy szpitalami. Liczne badania naukowe wykazują często

dominację jednego klonu na terenie jednego państwa z czasem niejednokrotnie rozprzestrzeniającego się na tereny sąsiednich państw, całych kontynentów a nawet całego globu [60-62].

Metody typowania molekularnego stosowane w epidemiologii szpitalnej służą do typowania szczepów w obrębie gatunku celem ustalenia źródła zakażenia oraz transmisji szczepów epidemicznych i/lub endemicznych na oddziale szpitala, jak również do porównywania izolatów pochodzących od tego samego chorego z różnych materiałów lub w różnym czasie. Metody te powinny odpowiedzieć na pytanie czy mamy do czynienia z epidemią lokalną obejmującą izolaty genetycznie ze sobą powiązane lub epidemią globalną obejmującą izolaty szeroko rozpowszechnione na świecie [63].

W badaniach epidemiologicznych wykorzystuje się tradycyjne metody diagnostyczne oparte na analizie cech fenotypowych drobnoustrojów oraz metody biologii molekularnej oparte na analizie całego materiału genetycznego drobnoustroju [38]. W badaniach tych najważniejszym elementem jest dobór właściwych metod diagnostycznych spełniających odpowiednie kryteria gwarantujące jej pełną wiarygodność. O wiarygodności zastosowanej metody świadczą istotne cechy takie jak: typowalność rozumiana jako uzyskanie wyniku dla każdego izolatu danego gatunku, powtarzalność oznaczająca kilkakrotne otrzymanie identycznych wyników z tej samej próbki, wysoki potencjał dyskryminacyjny (siła dyskryminacyjna) pozwalająca na rozróżnianie szczepów epidemiologicznie niespokrewnionych określanych mianem szczepów unikatowych [63]. Wykonanie analizy spełniającej powyższe kryteria wymaga przeprowadzenia optymalizacji zastosowanej metody. Brak standaryzacji badań jest najczęstszą przyczyną uniemożliwiającą uzyskanie powtarzalności wyników, powoduje ich błędną interpretację i ogranicza szersze zastosowanie metod genetycznych w epidemiologii szpitalnej [63].

Obecnie wciąż za tak zwany „złoty standard” w typowaniu molekularnym drobnoustrojów uznaje się metodę REA-PFGE (ang. *restriction enzyme analysis pulsed field gel electrophoresis*) opartą na analizie restrykcyjnej chromosomowego DNA połączonej z elektroforezą pulsową. Elektroforeza pulsowa polega na wymuszonej zmianie kierunku migracji cząstek DNA pod wpływem zmieniającego się w czasie kierunku działania pola elektrycznego. W wyniku trawienia genomowego DNA rzadko tnącym enzymem restrykcyjnym otrzymuje się od 10 do 30 fragmentów DNA o wielkości od 0,5 kbp do 1000 kbp. Następnie fragmenty DNA rozdziela się w zmiennym polu elektrycznym generując profil prążków charakterystyczny dla badanego drobnoustroju. Polimorfizm fragmentów restrykcyjnych oddaje polimorfizm sekwencji genomowego

DNA. Technika REA-PFGE jest uniwersalna i charakteryzuje się wysokim potencjałem różnicującym. Metoda ta jest szczególnie przydatna do analizy izolatów pochodzących z danego oddziału lub szpitala [63].

Kolejną metodą stosowaną w epidemiologii szpitalnej jest metoda analizy wielu *loci* (ang. *multi locus sequence typing*, MLST). Technika ta polega na sekwencjonowaniu fragmentów siedmiu genów podstawowego metabolizmu komórkowego (ang. *housekeeping genes*) i ustaleniu typu sekwencyjnego (ang. *sequence type*, STs) identyfikowanego izolatu z wykorzystaniem internetowej bazy danych, na przykład BLAST [62]. Technika MLST wykrywa zmiany wolno gromadzące się w genomie bakterii. Profile MLST określają przynależność badanych szczepów do międzynarodowych klonów epidemicznych (ang. *clonal complex*, CCs) natomiast słabiej różnicują izolaty w lokalnych badaniach epidemiologicznych [62].

### 1.2.9 Czynniki chorobotwórczości

Chorobotwórczość pałeczek *K. pneumoniae* jest uwarunkowana obecnością wielu czynników chorobotwórczości nazywanych również determinantami wirulencji lub czynnikami zjadliwości [64]. Do najważniejszych czynników chorobotwórczości odgrywających istotną rolę w patogenezie zakażeń wywoływanych przez ten gatunek bakterii zalicza się: otoczki (antygen K), lipopolisacharydy (ang. *lipopolisaccharides*, LPS, antygen O), fimbrialne i niefimbrialne adhezyny, siderofory (aerobaktyna, enterobaktyna i jersiniabaktyna), ciepłastale i ciepłochwiejne enterotoksyny, hemolizyny (klebolizyna) oraz zdolność tworzenia biofilmu [17].

Polisacharydowe otoczki i lipopolisacharydy ściany komórkowej to strukturalne antygeny komórkowe stanowiące elementy powierzchni komórek *K. pneumoniae* odpowiedzialne za adhezję bakterii do komórek gospodarza [65]. Podstawową rolą tych struktur jest udział w kolonizacji błon śluzowych człowieka i jednocześnie stanowią one ochronę bakterii przed fagocytozą przez makrofagi bądź odpowiedzią immunologiczną [65].

Wielocukrowa otoczka bakteryjna (CPS) jest podstawowym, dobrze poznanym czynnikiem zjadliwości pałeczek *K. pneumoniae* tworząc warstwę hermetycznie otaczającą od zewnątrz ścianę komórkową bakterii [17]. Strukturalnie otoczka jest heteropolimerem zbudowanym z heksoz (D-glukozy, D-galaktozy i D-mannozy), deoksyheksoz (D-fukozy i D-ramnozy) oraz kwasów glukuronowego i galakturonowego. W skład otoczki mogą wchodzić również komponenty niecukrowe takie jak reszty O-acylowe, bursztynianowe,



mrówczanowe i pirogronianowe [17]. Podjednostki otoczki są głównie zbudowane z 4-6 cukrów oraz kwasów uronowych. Otoczki pałeczek *K. pneumoniae* charakteryzują się różnorodnością struktury polisacharydów je budujących oraz dużą zmiennością serologiczną. Poznanie częstości występowania określonych serotypów dla wybranych populacji *K. pneumoniae* ma duże znaczenie w badaniach epidemiologicznych. Określenie serotypu to ważny element charakterystyki izolatów pałeczek *K. pneumoniae*, jednakże ze względu na zbyt małą rozdzielczość, nie jest to metoda wystarczająca do celów epidemiologicznych. Serotypowanie określające immunologiczny typ otoczki polisacharydowej jest najczęściej przeprowadzane przy użyciu testów serologicznych. Antygeny otoczkowe K są ważnymi antygenami wykorzystywanymi w serotypowaniu szczepów omawianego gatunku bakterii. Dotychczas u szczepów *K. pneumoniae* wykazano występowanie 78 serotypów otoczkowych przy czym nowe serotypy otoczkowe są systematycznie wykrywane [17]. Badania wskazują, że częstość występowania poszczególnych serotypów otoczkowych wśród *K. pneumoniae* jest różna, a co za tym idzie różna jest chorobotwórczość tych serotypów. Hiperwirulentne szczepy *K. pneumoniae* (ang. *hypervirulent Klebsiella pneumoniae*, hvKP) o dużej zjadliwości z reguły posiadają antygen otoczkowy K1 lub K2 [17]. Obserwacje klonów epidemicznych *K. pneumoniae* na świecie dowodzą, że drobnoustroje reprezentujące ten sam klon epidemiczny posiadają ten sam typ otoczki [66]. Właściwość ta wykorzystywana jest w typowaniu szczepów *K. pneumoniae* pochodzących z ogniska epidemicznego [66].

Za syntezę otoczki bakteryjnej odpowiada zespół genów *cps* zlokalizowanych na chromosomie oraz na plazmidzie [17]. Dzięki poznaniu sekwencji alleli w locus *cps*, odpowiadającym za biosyntezę otoczki, obecnie coraz powszechniej do ich wykrywania stosowana jest metoda PCR [17].

Lipopolisacharyd (ang. *lipopolysaccharid*, LPS) nazywany również endotoksyną, jest integralnym składnikiem błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych niezbędnym do ich funkcjonowania [17]. Lipopolisacharyd (LPS) wykazuje silne właściwości cytotoksyczne, immunogenne, immunomodulujące i prozapalne. Ponadto, LPS pozostaje jednym z ważniejszych czynników chorobotwórczości oraz głównym antygenem ściany komórkowej *K. pneumoniae* pełniącym istotną rolę w patomechanizmie zakażenia wywołanego przez te patogeny zwłaszcza we wstrząsie endotoksycznym towarzyszącym zakażeniom ośrodkowego układu nerwowego, zakażeniom krwi oraz zapaleniom płuc [66]. Lipopolisacharyd (LPS) jest substancją o konserwatywnej budowie składającej się z trzech fundamentalnych składników, to jest zlokalizowanego najbardziej

zewnątrznie somatycznego polisacharydu O (łańcucha O, O-antygeny), oligosacharydu (oligocukru) rdzeniowego stanowiącego antygen wspólny dla wszystkich pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz lipidu A (Ryc. 2). W epidemiologicznej klasyfikacji szczepów, w obrębie gatunku, decydującym antygenem jest polisacharyd O. Aktualnie u pałeczek *K. pneumoniae* wyróżnia się 8 serotypów antygenów somatycznych O [66]. Typowanie serologiczne pałeczek *K. pneumoniae* opiera się na dwóch głównych grupach antygenów, to jest somatycznym polisacharydzie O oraz typowo-swoistym antygenie otoczkowym K [66]. Kluczowym czynnikiem wirulencji odpowiedzialnym za aktywność endotoksyczną LPS jest lipid A [20]. Lipid A stanowi hydrofobową część endotoksyny, odpowiadającą za zakotwiczenie heteropolimeru w błonie zewnętrznej gospodarza, dzięki czemu tworzy on swoistą barierę hamującą przenikanie substancji w tym antybiotyków i detergentów, w głąb drobnoustroju jednocześnie generując odporność na te związki. Lipid A jest częścią endotoksyny uznaną za region najbardziej konserwatywny strukturalnie [17].

Właściwości adhezyjne pałeczek *K. pneumoniae* wynikają również z posiadania fimbrialnych i niefimbrialnych adhezyn [67]. Do fimbrialnych adhezyn zalicza się fimbrie typu 1 (ang. *mannose-sensitive*, MS), fimbrie typu 3 (ang. *mannose-resistant*, MR), fimbrie powszechne *E. coli* (ang. *Escherichia coli common pilus*, ECP), fimbrie typu 6, fimbrie typu KPF-28 (ang. *Klebsiella pneumoniae fimbriae with a fimbrin molecular mass of 28 kDa*) oraz fimbrie Kp (a-g) [67]. Wśród wymienionych fimbrialnych adhezyn do najlepiej poznanych i najczęściej ekspresjonowanych na powierzchni *K. pneumoniae* są fimbrie typu 1 oraz fimbrie typu 3. Fimbrie typu 1 to białkowe heterokompleksy składające się z głównej podjednostki fimbryliny (FimA) tworzącej strukturę wypustki i jedenastu mniejszych podjednostek od FimB do FimX odpowiedzialnych za jej wydłużanie [67]. Fimbrie typu 3 to białkowe heterokompleksy do ekspresji których wymaganych jest co najmniej dziewięć genów z klastra *mrk*. Geny te mogą być usytuowane zarówno na chromosomalnym, jak i na plazmidowym DNA. Fimbrylinę (FimA) koduje gen *mrkA*, z kolei gen *mrkD* koduje właściwą adhezynę, warunkującą specyficzne oddziaływanie wypustki z receptorem. Geny *mrkB*, *mrkC* i *mrkD*, kodujące odpowiednio mniejsze podjednostki fimbrii MrkB, MrkC i MrkD są odpowiedzialne za regulację ekspresji wypustek i tworzenie charakterystycznej struktury. Gen *mrkF* stabilizuje strukturę fimbrii na powierzchni komórki bakteryjnej [67]. Jak udokumentowano, zarówno u komensalnych jak i patogennych szczepów *K. pneumoniae* mogą występować homolgi wysoce konserwatywnego genu *ecpA* kodującego główną podjednostkę strukturalną fimbrii

powszechnych *E. coli* (ang. *Escherichia coli common pilus*, ECP) [67]. Fimbrie te są cienkie, osiągając do 3 nm średnicy, półgietkie i równomiernie rozmieszczone na powierzchni komórki bakteryjnej. Struktury te są konieczne do stabilizacji adherujących bakterii i sprzyjają ich kolonizacji [67].

Do niefimbrialnych adhezyn należy białko adhezyjne CF29K oraz białko adhezyjne typu P [68-69]. Białko adhezyjne CF29K (ang. *nonfimbrial protein of 29 kDa*) pośredniczy w adhezji szczepów *K. pneumoniae* wytwarzających  $\beta$ -laktamazę CAZ-1 o szerokim spektrum działania [68]. Białko to, nazywane u pałeczek *Klebsiella* czynnikiem CF29K, uznano za identyczne z białkiem CS31A-L kodowanym przez gen *clpG*, występującym u enterotoksycznych szczepów *E. coli* (ang. *enterotoxigenic E. coli*, ETEC) [68]. Z kolei białko P wykazuje szczególne powinowactwo do nabłonka dróg moczowych i występuje u uropatogennych szczepów *E. coli* (ang. *uropathogenic E. coli*, UPEC) [69].

Kolejnymi istotnymi czynnikami wirulencji syntetyzowanymi przez *K. pneumoniae* są siderofory a wśród nich aerobaktyna, enterobaktyna oraz jersiniabaktyna [70]. Siderofory bakteryjne nazywane nośnikami żelaza (ang. *iron carriers*) są to niskocząsteczkowe, organiczne związki chemiczne o charakterze niebiałkowym i nieporfirynowym chelatujące jony żelaza i wydzielane zewnątrzkomórkowo przez niektóre mikroorganizmy w celu wychwycenia tego pierwiastka [70]. W komórkach bakteryjnych żelazo jest pierwiastkiem niezbędnym do syntezy cytochromów, reduktazy rybonukleotydów uczestniczącej w procesie syntezy DNA, ale także innych enzymów. Poza tym, jon żelazowy często jest końcowym akceptorem elektronów w łańcuchu oddechowym bakterii beztlenowych. Bakterie wykształciły różne systemy asymilacji żelaza, które są aktywowane w zależności od warunków środowiska. Pierwszy system niskiego powinowactwa uruchamiany jest przez mikroorganizmy podczas względnej obfitości żelaza w otoczeniu i oparty jest na swobodnej dyfuzji jonów żelaza przez błony komórkowe. Drugi system wysokiego powinowactwa bakterie uruchamiają w warunkach niedoboru żelaza. System ten oparty jest na transporcie jonów żelaza do komórki, z wykorzystaniem sideroforów [71]. Przeżycie *K. pneumoniae* w środowisku zależy od sideroforów ze względu na minimalną ilość wolnego lub niezwiązanego żelaza. Podobnie jest w organizmie gospodarza, gdzie bakteria ma ograniczony dostęp do tego mikroelementu, ponieważ większość komórkowego żelaza jest związana z jego białkami, a stężenie wolnych jonów żelaza we krwi jest za niskie do swobodnej dyfuzji. W celu zaspokojenia zapotrzebowania na ten pierwiastek, mikroorganizmy produkują siderofory i konkurują z żywicielem o dostępną pulę żelaza [71]. Enterobaktyna, należąca do

katecholanów, jest najczęściej syntetyzowanym sideroforem u tego gatunku bakterii ponieważ gen syntezy enterobaktyny (*entB*) jest składnikiem jej genomu podstawowego. Ponadto, pałeczki te syntetyzują także siderofory „typu mieszanego” posiadające elementy wspólne dla dwóch lub trzech głównych rodzin sideroforów i są zaliczane do nabytych sideroforów, które bakteria może nabyć w drodze horyzontalnego transferu genów (HGT). Wśród nabytych sideroforów w większości przypadków syntetyzowana jest jersiniabaktyna kodowana przez locus *ybtS* znajdujący się na integracyjnym elemencie koniugacyjnym. Warto podkreślić, że wszystkie nabyte siderofory związane są z wirulencją drobnoustroju wywołującego choroby inwazyjne, niejednokrotnie o śmiertelnym przebiegu [72].

Do wydzielanych pozakomórkowo ważnych czynników chorobotwórczości *K. pneumoniae* należą również enterotoksyny - toksyny białkowe podobne do ciepłostałych (ang. *enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1*, EAST 1) oraz ciepłochwielnych (ang. *heat-labile*, LT) enterotoksyn występujących u gatunku *E. coli* [73]. Plazmidy kodujące enterotoksyny nabyte przez szczepy wielolekooporne mogą być sprzyjającym czynnikiem do powstania epidemii. Poza tym, biegunki bakteryjne występujące u dzieci na oddziałach szpitalnych mogą wywoływać ogniska epidemiczne, gdyż są czynnikami sprzyjającymi rozprzestrzenianiu się drobnoustrojów w środowisku szpitala [73].

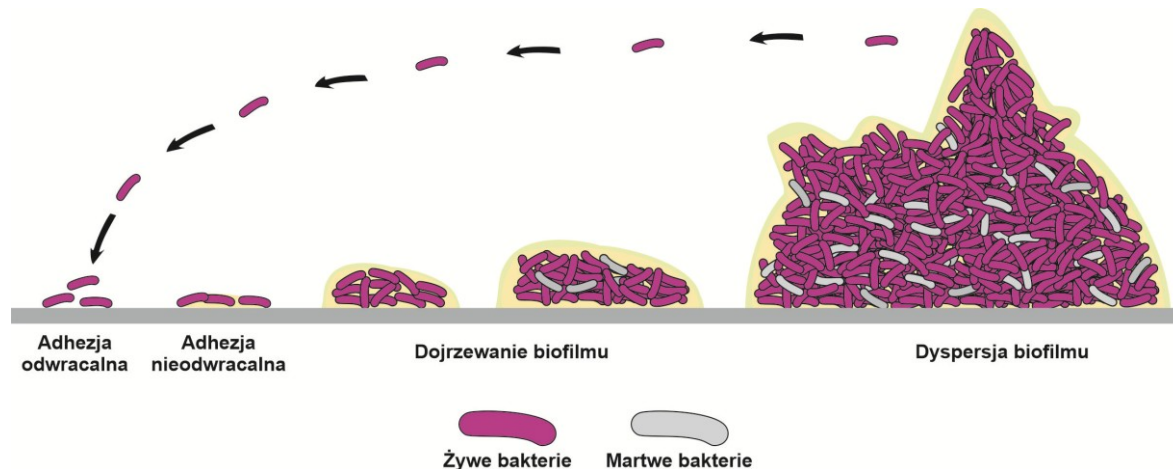
Oprócz enterotoksyn, do wydzielanych pozakomórkowo czynników chorobotwórczości *K. pneumoniae* należą także hemolizyny, nazywane klebolizynami [74]. Hemolizyny te ulegają inaktywacji w obecności cholesterolu oraz reagują krzyżowo z przeciwciałami skierowanymi przeciwko streptolizynie O [74].

### **1.3 Biofilm bakteryjny *K. pneumoniae* i jego znaczenie w medycynie**

Problem zakażeń, będących konsekwencją zdolności pałeczek *K. pneumoniae* do tworzenia biofilmu bakteryjnego narasta na przestrzeni ostatnich kilku lat w związku z dynamicznym rozwojem inżynierii biomateriałów (materiałów biomedycznych) oraz ich szerokim stosowaniem w różnych dziedzinach współczesnej medycyny. Biomateriały mogą służyć do pokrywania powierzchni urządzeń wszczepianych do wnętrza organizmu ludzkiego lub mogą być także projektowane i adresowane do wyrobów medycznych przeznaczonych do długotrwałego, bezpośredniego kontaktu z tkankami organizmu ludzkiego [75]. Biomateriały stosowane są powszechnie między innymi w kardiologii (zastawki serca, stenty i przeszczepy), laryngologii (implanty ślimakowe, rurki intubacyjne, rurki tracheostomijne), neurologii (urządzenia stymulujące nerwy), okulistyce

(soczewki kontaktowe), ortopedii (endoprotezy, protezy, sztuczne stawy, więzadła i ścięgna) oraz stomatologii (implanty dentystyczne) [75-76]. Powierzchnie biomateriałów są idealnymi miejscami do formowania struktur biofilmu w związku z czym stanowią istotny rezerwuár czynników etiologicznych zakażeń związanych z biomateriałami (ang. *biomaterials associated infections*, BAIs) [35, 77-78]. Ukierunkowane na poprawę komfortu życia i funkcjonowania pacjentów wszechstronne zastosowanie biomateriałów przyczynia się do wzrostu częstotliwości ryzyka rozwoju BAIs. Aktualnie szacuje się, że zakażenia z udziałem biofilmu odpowiadają za około 65-80% wszystkich zakażeń występujących u ludzi i zwierząt [79-80].

W środowisku naturalnym 99% bakterii występuje w formie biofilmu. Biofilm to złożona zorganizowana wielokomórkowa, jedno- lub wielogatunkowa struktura, w której komórki bakteryjne osadzone w samodzielnie wytworzonej z zewnątrzkomórkowej substancji polimerowej (ang. *extracellular polymeric substance*, EPS) macierzy, przylegają do siebie i/lub wykazują adhezję do powierzchni biotycznych lub powierzchni abiotycznych [78]. Zjawisko tworzenia biofilmu jest procesem zachodzącym w kilku etapach: adhezji odwracalnej, adhezji nieodwracalnej, dojrzewania i dyspersji (Ryc. 5) [81].



**Ryc. 5** Schematyczne przedstawienie tworzenia biofilmu przez pałeczki *K. pneumoniae*. Opracowanie własne na podstawie [81].

Proces formowania biofilmu jest kontrolowany poprzez zjawisko „*quorum sensing*”, unikalny system komunikacji międzykomórkowej, regulowany za pomocą związków chemicznych nazywanych molekułami sygnalizacyjnymi i zwiększający zdolności adaptacyjne biofilmu. Na końcowym etapie dojrzewania biofilmu dochodzi do dyspersji, czyli odrywania się komórek bakteryjnych od powierzchni biofilmu. W wyniku

przemieszczania się komórek bakteryjnych wraz z krwią oraz innymi płynami ustrojowymi, komórki bakteryjne rozpoczyna się proces zasiedlania nowych nisz, dając początek nowemu biofilmowi. Dojrzałe struktury biofilmu charakteryzują się zmniejszoną wrażliwością na stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe oraz obecnością bakteryjnych komórek przetrwałych (ang. *persister cells*, PCs), które umożliwiają odnowienie populacji biofilmu [82].

Tworzenie biofilmu bakteryjnego na biomateriałach jest uważane za ważny czynnik podnoszący wirulencję [83]. W porównaniu do komórek wolnopływających, mikroorganizmy rosnące w populacji biofilmu są znacznie mniej wrażliwe na działanie antybiotyków, antyseptyków oraz mechanizmów obronnych organizmu ludzkiego [84].

## 2. CELE PRACY

Celem głównym pracy było przeprowadzenie szczegółowej charakterystyki szczepów klinicznych *K. pneumoniae* izolowanych z przypadków nosicielstwa/kolonizacji i/lub zakażeń objawowych wykrytych w latach 2016 - 2019 u pacjentów hospitalizowanych na wybranych oddziałach trzech szpitali specjalistycznych w południowej Polsce, polegające na badaniu antybiotykooporności, analizie struktury klonalnej populacji, wykrywaniu wybranych determinant wirulencji oraz ocenie zdolności do tworzenia biofilmu.

Cele szczegółowe badań zakładały:

- a) Fenotypową charakterystykę profili lekooporności wraz z określeniem fenotypów oporności typu AmpC, ES $\beta$ L, VIM-1, IMP, KPC, NDM-1 i OXA-48 wśród zebranych izolatów *K. pneumoniae*,
- b) Detekcję genów kodujących oporność na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe w tym:
  - genów kodujących  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>),
  - genów kodujących cefotaksymazy (*bla*<sub>CTX-M-type</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub> i *bla*<sub>CTX-M-15</sub>),
  - genów kodujących karbapenemazy (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> i *bla*<sub>OXA-48</sub>),
- c) Określenie struktury klonalnej badanej populacji szczepów *K. pneumoniae* z zastosowaniem analizy makrorestrykcyjnej chromosomalnego DNA połączonej z elektroforezą w zmiennym polu elektrycznym (REA-PFGE),
- d) Określenie typów sekwencyjnych (STs) oraz kompleksów klonalnych (CCs) przy zastosowaniu metody MLST.
- e) Badanie profilu wirulencji poprzez detekcję genów kodujących wybrane czynniki wirulencji, w tym:
  - siderofory takie jak: aerobaktyna (gen *iutA*); enterobaktyna (gen *entB*), jersiniabaktyna (gen *ybtS*).
  - serotyp otoczkowy K1 i fenotyp mukoidalny (gen *magA*), serotyp otoczkowy K2 (gen *K2*),
  - system transportu żelaza oraz funkcje fosfotransferazy (gen *kfu*),
  - adhezyny fimbrialne: fimbrie typu 1 (geny: *fimA*, *fimH*), fimbrie typu 3 (geny: *mrkA*, *mrkD*), fimbrie ECP (gen *ecpA*),
  - regulator syntezy polisacharydów otoczkowych (gen *rmpA*) oraz metabolizm allantoiny (gen *allS*),

- f) Ocenę stopnia tworzenia biofilmu przez *K. pneumoniae* przy zastosowaniu metody kolorymetrycznej (CV) oraz obrazowanie za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM).



### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1 MATERIAŁ BADAWCZY

##### 3.1.1 Bioetyka

Na przeprowadzenie badań uzyskano akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum o numerach: KBET/1072.6120.153.2019 oraz KBET/1072.6120.264.2019.

##### 3.1.2 Szczepy bakterii

Materiał badawczy stanowiły szczepy szpitalne z gatunku *K. pneumoniae* wyizolowane z przypadków nosicielstwa/kolonizacji i/lub zakażeń objawowych od pacjentów hospitalizowanych w trzech szpitalach specjalistycznych w południowej Polsce to jest:

- a) Górnośląskim Centrum Medycznym imienia profesora Leszka Gieca Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Liczba izolatów *K. pneumoniae* wynosiła 15 (n=15), w tym 14 izolatów pochodzących z wymazów z odbytu oraz 1 izolat pochodzący z krwi. Materiał diagnostyczny stanowiły wymazy z odbytu oraz krew.
- b) 5 Wojskowym Szpitalu Klinicznym z Polikliniką Samodzielnego Publicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej w Krakowie. Liczba izolatów *K. pneumoniae* wynosiła 18 (n=18), w tym wszystkie izolaty pochodzące z rurek tracheostomijnych użytkowanych przez pacjentów poddanych zabiegowi tracheotomii, hospitalizowanych na dwóch oddziałach szpitalnych to jest: oddziale anestezjologii i intensywnej terapii (OAIT) oraz klinicznym oddziale otolaryngologicznym (ORL). Materiał diagnostyczny stanowiły wydzieliny tchawicze z rurek tracheostomijnych.
- c) Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym imienia Jana Pawła II. Liczba izolatów *K. pneumoniae* wynosiła 139 (n=139). Materiał diagnostyczny stanowiły: krew, popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (ang. *bronchoalveolar lavage*, BAL), wymazy z ran, mocz, plwocina, aspirat tchawiczy, płyn opłucnowy, cewnik typu JJ (ang. *double J*, DJ).

#### 3.2 METODY

##### 3.2.1 Identyfikacja gatunkowa

Identyfikacja gatunkowa badanych izolatów *K. pneumoniae* przeprowadzona została za pomocą systemów do identyfikacji bakterii, którymi dysponują Pracownie i Zakłady Mikrobiologii wyżej wymienionych szpitali wysokospecjalistycznych w tym między innymi automatycznego systemu do identyfikacji bakterii VITEK<sup>®</sup> 2 Compact (bioMérieux, Francja).

Określenia fenotypu mukoidalnego wybranych izolatów z kolekcji dokonano za pomocą tak zwanego „testu ciągłości”, przeprowadzonego zgodnie z metodyką zaproponowaną przez Eisenmenger i inni [25]. Kryterium doboru szczepów było potwierdzenie obecności genu *magA*. Pozytywny wynik testu ciągłości polegającego na rozciągnięciu kolonii bakteryjnej na płytce agarowej, obserwowano zgodnie z definicją, jako tworzenie lepkich łańcuchów o długości równej lub powyżej 5 mm [25].

### **3.2.2 Oznaczenie profili lekooporności**

Oznaczenie profili lekooporności badanych izolatów *K. pneumoniae* oraz interpretację uzyskanych wyników przeprowadzono zgodnie z rekomendacjami Europejskiego Komitetu do spraw Oznaczania Lekowrażliwości (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) wersja 9.0, 2019-01-01 [85]. Oznaczenia wartości minimalnego stężenia hamującego (ang. *minimum inhibitory concentration*, MIC) (mg/L) dla następujących grup antybiotyków: penicyliny (ampicylina, amoksycylina z kwasem klawulanowym, piperacylina, piperacylina z tazobaktamem), cefalosporyny (cefaklor, cefuroksym, cefotaksym, ceftazydym, cefepim), karbapenemy (doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem), monobaktamy (aztreonam), fluorochinolony (ciprofloksacyna, lewofloksacyna, moksifloksacyna, norfloksacyna, ofloksacyna), aminoglikozydy (amikacyna, gentamycyna, netylmycyna, tobramycyna) oraz inne leki (fosfomycyna, kolistyna, nitrofurantoina, tetracyklina, trimetoprim z sulfametoksazolem, tygecyklina) dokonano za pomocą metody gradientowo-dyfuzyjnej z użyciem paska nasączonego gradientem stężeń antybiotyku (E-testu) oraz w systemie automatycznym VITEK<sup>®</sup> 2 Compact (bioMérieux, Francja).

### **3.2.3 Oznaczenie fenotypów oporności**

Oznaczenie fenotypów oporności u badanych pałeczek *K. pneumoniae* dokonano w oparciu o zalecenia EUCAST dotyczące wykrywania mechanizmów oporności metodą dyfuzyjno-krażkową, wersja 2.0, 2017 [86].

Badania przeprowadzono za pomocą następujących testów przesiewowych w kierunku wykrywania  $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym i/lub warunkujących oporność na karbapenemy w tym:

- a)  $\beta$ -laktamazy typu **ES $\beta$ L** wykrywano w teście dwóch krążków (ang. *double disk synergy test*, DDST),
- b)  $\beta$ -laktamazy typu **AmpC** wykrywano z użyciem modyfikacji testu DDST z krążkiem z cefepimem (30  $\mu$ g),
- c) karbapenemazy typu **MBL** (ang. *metallo- $\beta$ -lactamases*) wykrywano testem z wykorzystaniem zestawu zawierającego krążek z 10 $\mu$ l 0,5M EDTA (pH 7,3-7,5) a po jego obu stronach krążki z ceftazydymem (30  $\mu$ g) i imipenemem (10  $\mu$ g),
- d) karbapenemazy typu **KPC** wykrywano testem z kwasem fenyloboronowym (ang. *phenylboronic acid*, PBA),
- e) karbapenemazy typu **OXA-48** wykrywano testem z krążkiem z temocyliną (30  $\mu$ g).

### 3.2.4 Detekcja genów oporności na wybrane środki przeciwdrobnoustrojowe przy zastosowaniu metody PCR oraz multipleks PCR

Izolację bakteryjnego DNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EUR<sub>X</sub>) zgodnie z instrukcją producenta.

Detekcji genów oporności na wybrane na wybrane antybiotyki dokonano przy zastosowaniu metody PCR oraz multipleks PCR (ang. *multiplex polymerase chain reaction*, mPCR) w tym:

- a) *bla*<sub>SHV-type</sub> i *bla*<sub>TEM-type</sub> kodujących  $\beta$ -laktamazy **ES $\beta$ L** [87],
- b) *bla*<sub>CTX-M-type</sub>; *bla*<sub>CTX-M-1 group</sub>; *bla*<sub>CTX-M-9 group</sub> kodujących  $\beta$ -laktamazy ES $\beta$ L o aktywności cefotaksymaz (ang. *cefotaxime hydrolyzing capabilities*, **CTX-M**) [88],
- c) *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM-type</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> kodujących karbapenemazy typu **KPC**, **MBL** i **OXA-48** [88].

### 3.2.5 Typowanie molekularne

#### 3.2.5.1 Typowanie molekularne przy zastosowaniu metody REA-PFGE

Typowanie molekularne badanych izolatów *K. pneumoniae* przeprowadzono z zastosowaniem metody REA-PFGE opartej na analizie makrorestrykcyjnej chromosomalnego DNA połączonej z elektroforezą w zmiennym polu elektrycznym po

wcześniej trawieniu enzymem restrykcyjnym *Xba*I i przeprowadzonej zgodnie z protokołem opracowanym przez Han i inni [63]. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy użyciu systemu CHEF-DR<sup>®</sup> II (BioRad). Oceny pokrewieństwa badanych szczepów *K. pneumoniae* dokonano na podstawie dendrogramu wykreślonego z użyciem programu bioinformatycznego Gel Compar<sup>®</sup> II, wersja 6,5 (Applied MATHS) z użyciem metody UPGMA (ang. *unweighted pair group method with arithmetic mean*) [63].

### 3.2.5.2 Typowanie molekularne przy zastosowaniu metody MLST

Typowanie molekularne badanych izolatów *K. pneumoniae* przeprowadzono z użyciem metody analizy wielu *loci* (MLST) polegającej na analizie porównawczej sekwencji siedmiu genów metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping*) [62]. Określenie typu sekwencyjnego (STs) oraz kompleksu klonalnego (CCs) badanych izolatów *K. pneumoniae* przeprowadzono poprzez amplifikację fragmentów następujących genów: *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*, a następnie sekwencjonowanie oraz analizę w międzynarodowej bazie INSTITUT PASTEUR MLST and Whole Genome MLST Databases (<http://bigsd.dbweb.pasteur.fr/klebsiella/>).

### 3.2.6 Detekcja genów kodujących wybrane czynniki wirulencji

Detekcji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji, w tym siderofory (geny: *ybtS*, *entB*, *iutA*), regulator syntezy polisacharydów otoczkowych (gen *rmpA*), adhezyny fimbrialne typu 3 (gen *mrkD*), serotyp otoczkowy K1 i fenotyp hipermukoidalny (gen *magA*), serotyp otoczkowy K2 (gen: K2), system transportu żelaza oraz funkcje fosfotransferazy (gen *kfu*) oraz metabolizm alantoiny (gen *allS*) przeprowadzono z zastosowaniem metody multipleks PCR (mPCR) zgodnie z protokołem Compain i inni [64].

Detekcji genów kodujących struktury białkowe fimbrii typu 1, 3 i ECP dokonano przy zastosowaniu reakcji PCR [89]. Jako kontroli pozytywnej użyto szczepu *K. pneumoniae* ATCC<sup>®</sup>700603<sup>™</sup> posiadającego fimbrie typu 1 oraz fimbrie typu 3.

### 3.2.7 Ocena biofilmu bakteryjnego

#### 3.2.7.1 Ocena tworzenia biofilmu *K. pneumoniae* przy zastosowaniu metody kolorymetrycznej z fioletem krystalicznym

Oceny tworzenia biofilmu przez badane szczepy *K. pneumoniae* dokonano w oparciu o metodykę Christensen i inni [90] z własnymi modyfikacjami. Hodowle zawiesin

bakteryjnych badanych szczepów *K. pneumoniae* prowadzono w 3 ml podłoża płynnego TSB. Kultury bakteryjne inkubowano w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po zakończonej inkubacji ustalano gęstość zawiesin bakteryjnych doprowadzając do 0,5 w skali McFarlanda a następnie rozcieńczano 100-krotnie w świeżym medium TSB. W dalszej kolejności наносzono po 3 ml zawiesin bakteryjnych do 12-dółkowych płytek polistyrenowych z płaskim dnem (Costar® Corning®) i inkubowano w temperaturze 37°C, w warunkach tlenowych przez 48 godzin. Jako kontroli pozytywnej użyto szczepu wzorcowego *K. pneumoniae* ATCC®700603™, kontrolę negatywną stanowiło jałowe podłoże TSB. Zarówno dla kontroli pozytywnej, kontroli negatywnej jak i dla każdego szczepu badanego hodowle biofilmu prowadzono w trzech powtórzeniach. Po zakończonej inkubacji usuwano podłoże wraz z bakteriami w formie planktonowej. Biofilm powstały na dnie dołków płukano trzykrotnie buforem PBS (Lonza, Belgia) w celu precyzyjnego usunięcia niezwiązanych komórek bakteryjnych. Powstały na dnie dołka biofilm utrwalano metanolem (Chempur, Polska), następnie metanol usuwano, a płytki pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po tym czasie biofilm poddawano barwieniu przez 20 minut wykorzystując roztwór fioletu krystalicznego (Stamar, Polska). Niezwiązany barwnik intensywnie odpłukiwano jałową wodą destylowaną, a płytki pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej na 18-20 godzin. Równolegle z próbkami badanymi barwieniu poddawano szczepy wzorcowe stanowiące kontrolę pozytywną oraz kontrolę negatywną. Na dalszym etapie badań biofilmu dokonano pomiarów absorbancji natężenia barwy roztworów (ang. *optical density*, OD) przy długości fali  $\lambda=595$  nm za pomocą czytnika Infinite M200 PRO (Tecan, Szwajcaria). Uzyskane uśrednione wyniki wraz z odchyleniem standardowym analizowano na podstawie kategoryzacji umożliwiającej podział szczepów bakteryjnych zgodnie z ich zdolnością do tworzenia biofilmu. Wartość punktu odcięcia (ang. *optical density cut-off value*, OD<sub>C</sub>) obliczano zgodnie z równaniem:

$$OD_C = OD_{NG} + 3 \times SD_{NG},$$

oraz określeniu przedziałów OD dla otrzymanych wyników według poniższych kryteriów zaproponowanych przez Stepanović i inni [91]:

- a)  $OD \leq OD_C$  - brak produkcji biofilmu,
- b)  $OD_C < OD \leq 2 \times OD_C$  - słaba produkcja biofilmu,
- c)  $2 \times OD_C < OD \leq 4 \times OD_C$  - umiarkowana produkcja biofilmu,
- d)  $4 \times OD_C < OD$  - silna produkcja biofilmu,

gdzie: OD<sub>C</sub> - punkt odcięcia (ang. *optical density cut-off value*); OD<sub>NG</sub> - średnia wartość absorbancji kontroli negatywnej (ang. *average value of the measured optical density of negative control*); SD<sub>NG</sub> - odchylenie standardowe absorbancji kontroli negatywnej (ang. *standard deviation of measured optical density of negative control*) [91]:

Zgodnie z powyższym, klasyfikacja szczepów wytwarzających biofilm została ustalona na podstawie odczytów absorbancji uzyskanych ze stosunku próby ślepej (0,069) i kontroli dodatniej (1,74). Na tej podstawie wyszczególniono następujące grupy izolatów:

- a) izolaty z OD < 0,127, niewykazujące zdolności do tworzenia biofilmu,
- b) izolaty, których OD mieściło się w przedziale wartości 0,127 - 0,254, wykazujące słabą zdolność do tworzenia biofilmu,
- c) izolaty z OD mieszczącym się w zakresie 0,254 - 0,509, charakteryzujące się średnią zdolnością do tworzenia biofilmu,
- d) izolaty z OD > 0,509, charakteryzujące się dużą zdolnością do tworzenia biofilmu.

### **3.2.7.2 Obrazowanie biofilmu *K. pneumoniae* na powierzchni biomateriałów, na przykładzie polietylenowych i wykonanych z polichlorku winylu rurek tracheostomijnych w skaningowym mikroskopie elektronowym**

Obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym (ang. *scanning electron microscopy*, SEM) poddano próbki biologiczne, które stanowiły fragmenty polietylenowej (ang. *polyethylene*, PE, Demed) oraz poliwinylowej (ang. *polyvinyl chloride*, PVC, SUMI) rurki tracheostomijnej z mankietem o rozmiarze 9,5 mm. Preparatykę badanych elementów biomateriałów do analizy za pomocą SEM wykonano zgodnie z metodyką opisaną przez Jarrett i inni [92]. Bazując na skali McFarlanda sporządzono zawiesinę bakteryjną *K. pneumoniae* o gęstości 10<sup>6</sup> CFU/ml (ang. *colony forming units*) na mililitr. Fragmenty rurek tracheostomijnych inkubowano w warunkach laboratoryjnych z hodowlą bakteryjną szczepu wzorcowego *K. pneumoniae* ATCC®700603™ w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Kontrolę negatywną stanowiły fragmenty rurek tracheostomijnych inkubowane w jałowym podłożu TSB. Po upływie czasu inkubacji badane fragmenty biomateriałów poddano utrwalaniu w 2,5% aldehydzie glutarowym (Sigma-Aldrich, USA) w 0,1 molowym (M) buforze fosforanowym przez 24 godziny. Następnie próbki badane płukano dwukrotnie w buforze PBS przez 10 minut w temperaturze pokojowej. W dalszej kolejności przeprowadzono odwadnianie próbek poprzez dokonanie seryjnej ekspozycji w wodnym szeregu alkoholu etylowego (Chempur, Polska) 50%, 75%, 80%, 96% przez 10 minut w każdym stężeniu, a następnie dwukrotnie

w alkoholu etylowym 99,8% (Chempur, Polska) przez 30 minut. W ostatnim etapie próbki badane umieszczono w 100% acetonie (Sigma-Aldrich, Niemcy). Do dalszej preparatyki próbek badanych zastosowano metodę suszenia w punkcie krytycznym (ang. *critical point dryer*, CPD E 3000/E3100). Metoda CPD wykorzystuje zjawisko współistnienia fazy gazowej oraz fazy ciekłej dwutlenku węgla w określonych warunkach temperatury i ciśnienia, to znaczy w tak zwanym punkcie krytycznym. W punkcie krytycznym zachodzi proces zmiany fazy skupienia z ciekłej w gazową. Zastosowanie metody CPD pozwala na uniknięcie artefaktów powstających w związku z deformacją próbki w próżni mikroskopowej. Gotowe preparaty zostały zamontowane na stoliku aluminiowym do SEM. Przewodzącą warstwę metalu (złota) na analizowanych próbkach celem jej zobrazowania uzyskano dzięki zastosowaniu automatycznej napylarki węglowej JEOL JEC-530. Obserwacje próbek badanych prowadzono za pomocą mikroskopu HITACHI S-4700 z systemem mikroanalizy NORAN Vantage (Tokio, Japonia) będącym na wyposażeniu Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Skaningowej i Mikroanalizy Zakładu Mineralogii i Petrografii w Instytucie Nauk Geologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego.

### 3.3 Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu programu komputerowego STATISTICA™ 13.3 oraz programu R 3.5.3. Istotność statystyczną oszacowano za pomocą dokładnej skali Fishera z użyciem testu dla zmiennych kategorycznych w celu porównania oporności na wybrane antybiotyki i obecności czynników wirulencji wśród czterech głównych zidentyfikowanych klonów PFGE (A-D) w badanych izolatach *K. pneumoniae* wytwarzających  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L. Analizę korelacji między genami oporności a genami wirulencji badanych izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L przeprowadzono obliczając współczynnik korelacji liniowej Pearsona ( $r_{xy}$ ). Za statystycznie istotne uznano wyniki dla których poziom istotności „p” był mniejszy od wartości 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 4. WYNIKI

### 4.1 Publikacja nr 1:

**Dorota Ochońska, Hanna Klamińska-Cebula, Anna Dobrut, Małgorzata Bulanda, Monika Brzychczy-Włoch. Clonal Dissemination of KPC-2, VIM-1, OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Katowice, Poland. Polish Journal of Microbiology**

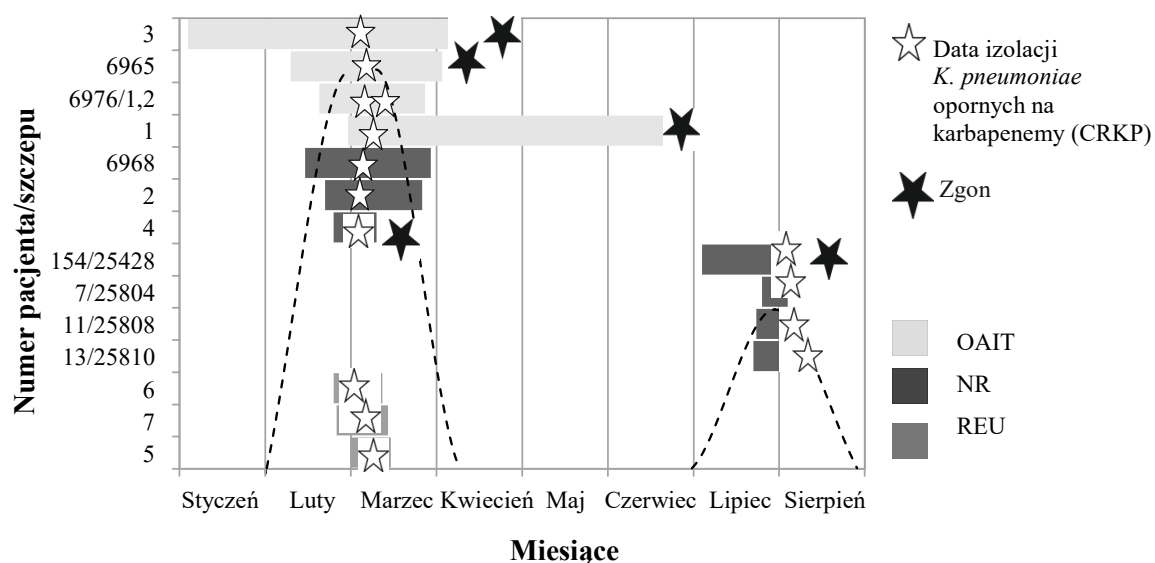
#### **4.1.1 Charakterystyka kliniczna pacjentów**

W okresie od 3 stycznia 2018 roku do 9 sierpnia 2018 roku badaniem objęto czternastu pacjentów hospitalizowanych w Górnośląskim Centrum Medycznym (GCM) na trzech oddziałach mieszczących się w różnej lokalizacji w budynku Specjalistycznego Szpitala Wieloprofilowego (SSW) w tym: a) Oddziale Anestezjologii i Intensywnej Terapii (OAiT, parter); b) Oddziale Neurologii z Pododdziałem Udarowym (NR, VII piętro); c) Oddziale Chorób Wewnętrznych i Reumatologii (REU, IX piętro). Średni wiek pacjentów wynosił 65,5 lat (przedział wiekowy 43-90 lat). Średni czas hospitalizacji pacjentów wynosił 37 dni. Łącznie przebadano 15e szczepów klinicznych *K. pneumoniae*, 14 izolatów pozyskano z wymazów z odbytu. Dodatkowo, jeden szczep pochodził z krwi od pacjenta z zespołem Guillain-Barré (ang. *Guillain-Barré syndrome*, GBS), u którego rozwinęły się objawy sepsy, pacjent ten był z sukcesem leczony linezolidem i kolistyną. Zgodnie z zebraniem wywiadem odnotowano, że u dwóch pacjentów z REU zastosowano leki przeciwbakteryjne z grupy karbapenemów, natomiast powód zastosowania takiego leczenia nie został podany. Pierwszy pacjent był leczony z powodu reumatoidalnego zapalenia stawów, skazy krwotocznej, choroby wieńcowej, choroby wrzodowej, nadciśnienia, miażdżycy i dny moczanowej. Drugi pacjent był leczony z powodu miażdżycy oraz ostrej zakrzepicy tętniczej kończyny dolnej. W konsekwencji skutecznej terapii u tych chorych nastąpiła znaczna poprawa stanu zdrowia. Pięciu pacjentów zmarło, natomiast zgony te nie były powiązane z zakażeniami o etiologii *K. pneumoniae*. Głównymi przyczynami wtórnymi śmierci były powikłania w przebiegu towarzyszących tym pacjentom poważnym chorobom podstawowym, takim jak: cukrzyca, gruźlica, nadciśnienie, miażdżycy i przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP). Przyczynami bezpośrednimi były obejmujące zagrażające życiu stany chorobowe, w tym tętniak aorty brzusznej oraz udary mózgu. U wszystkich chorych potwierdzono kolonizację odbytu szczepami *K. pneumoniae* opornymi na karbapenemy (ang. *carbapenem resistant K. pneumoniae*, CRKP). Szczepy te izolowano na różnych etapach pobytu pacjentów w szpitalu, bowiem okresy hospitalizacji wynosiły od 5 do 64 dni. Średni czas hospitalizacji pacjenta od momentu przyjęcia do izolacji szczepu wynosił 16 dni.

#### **4.1.2 Dochodzenie epidemiologiczne**



Pierwszy szczep CRKP o numerze 6968 wyizolowano w lutym 2018 roku z wymazu z odbytu od 63-letniego mężczyzny, określonego jako pacjent zero (ang. *index case*), hospitalizowanego na NR. Pacjent ten z nadciśnieniem tętniczym był leczony z powodu miażdżycy. Kolejny szczep CRKP o numerze 6965 wyizolowano od 60-letniej pacjentki w 20-tym dniu jej pobytu w szpitalu na OAIT z powodu powikłań w przebiegu gruźlicy oraz POChP. Ponowne epizody izolacji kolejnych szczepów CRKP zarejestrowano w marcu 2018 roku u trzech nowych pacjentów przebywających na OAIT, u sześciu kolejnych na NR i u trzech pacjentów leczonych na REU. Po 5-6 miesiącach, w lipcu i sierpniu, wykryto kolejne szczepy CRKP u czterech pacjentów hospitalizowanych na NR, spośród których u trzech stwierdzono udar mózgu, zaś czwarty pacjent był leczony z powodu nadciśnienia tętniczego oraz choroby niedokrwiennej serca. Sporządzona krzywa epidemii szczepów CRKP wykazała bimodalny rozkład przypadków z dwoma wyraźnymi pikami oddzielonymi 148 dniami, co mogłoby wskazywać na dwa okresy, luty-marzec 2018 roku oraz lipiec-sierpień 2018 roku, kiedy wykryto szczepy CRKP. Warto podkreślić, że w obu tych okresach kolonizację badanymi szczepami CRKP wykryto u pacjentów hospitalizowanych na NR (Ryc. 6).



**Ryc. 6** Wykres Gantta przedstawiający krzywą epidemii wywołanej przez szczepy CRKP odnotowanej na trzech oddziałach Specjalistycznego Szpitala Wieloprofilowego (SSW) Górnośląskiego Centrum Medycznego imienia Leszka Gieca w Katowicach w 2018 roku.

Legenda: OAIT - Oddział Anestezjologii i Intensywnej Terapii, NR - Oddział Neurologii z Pododdziałem Udarowym, REU - Oddział Chorób Wewnętrznych i Reumatologii. Opracowanie własne na podstawie [88].

#### 4.1.3 Profil lekooporności

Analiza wyników oznaczenia lekooporności badanych izolatów CRKP wykazała całkowitą oporność izolatów (n=15, 100%) na penicyliny (ampicylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym), cefalosporyny (cefaklor, cefuroksym, cefotaksym, cefotaksym z kwasem klawulanowym, ceftazydym, ceftazydym z kwasem klawulanowym, cefepim), karbapenemy (doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem), chinolony (ciprofloksacynę), aminoglikozydy (amikacynę, gentamycynę, netilmycynę, tobramycynę) oraz inne antybiotyki i leki przeciwdrobnoustrojowe (aztreonam, kolistynę, tetracyklinę, tygecyklinę, trimetoprim z sulfametoksazolem (kotrimoksazol) i fosfomycynę). Dwanaście izolatów (80%) było opornych na imipenem. Równocześnie u dwóch izolatów (13,3%) były odporne na amikacynę równocześnie u dwóch izolatów (13,3%) odnotowano średnią wrażliwość na amikacynę z wartościami MIC równymi lub powyżej 12 µg/ml. Ponadto, siedem izolatów (42,8%) było opornych na tygecyklinę.

Zgodnie z kryteriami zdefiniowanymi w międzynarodowym dokumencie opublikowanym w 2012 roku, dziewięć izolatów CRKP (60%) sklasyfikowano jako izolaty MDR (ang. *multidrug resistant*) a sześć izolatów (40%) cechowała oporność typu XDR (ang. *extremely drug resistant*) [93]. Nie wykryto szczepów zaliczanych do kategorii PDR (ang. *pandrug resistant*) charakteryzujących się całkowitą opornością drobnoustroju na wszystkie antybiotyki, we wszystkich grupach stosowanych wobec danego gatunku [93].

#### 4.1.4 Fenotypowe testy przesiewowe w kierunku wykrywania karbapenemaz oraz powiązanych β-laktamaz

We wszystkich badanych izolatach CRKP (n=15, 100%) produkcja karbapenemaz typu KPC-2 oraz OXA-48 została potwierdzona pozytywnymi wynikami fenotypowych testów przesiewowych, odpowiednio z kwasem fenylboronowym (PBA) oraz z krążkiem z temocyliną (30 µg). Dla wszystkich badanych izolatów CRKP (n=15, 100%) uzyskano ujemne wyniki w fenotypowym teście dwóch krążków (DDST) przeprowadzonym w kierunku wykrywania mechanizmu ESβL oraz w teście dyfuzyjno-krążkowym w kierunku wykrywania mechanizmu MBL. Uzyskanie fałszywie ujemnych wyników w fenotypowych testach potwierdzających mogło być konsekwencją równoczesnej obecności i ekspresji innych mechanizmów oporności lub ograniczenia przepuszczalności przez zmiany poryn, co zamaskowało działanie inhibicyjne kwasu klawulanowego w przypadku

mechanizmu ES $\beta$ L oraz działanie inhibicyjne EDTA w przypadku mechanizmu MBL i mogło zakłócić wynik testów synergizmu.

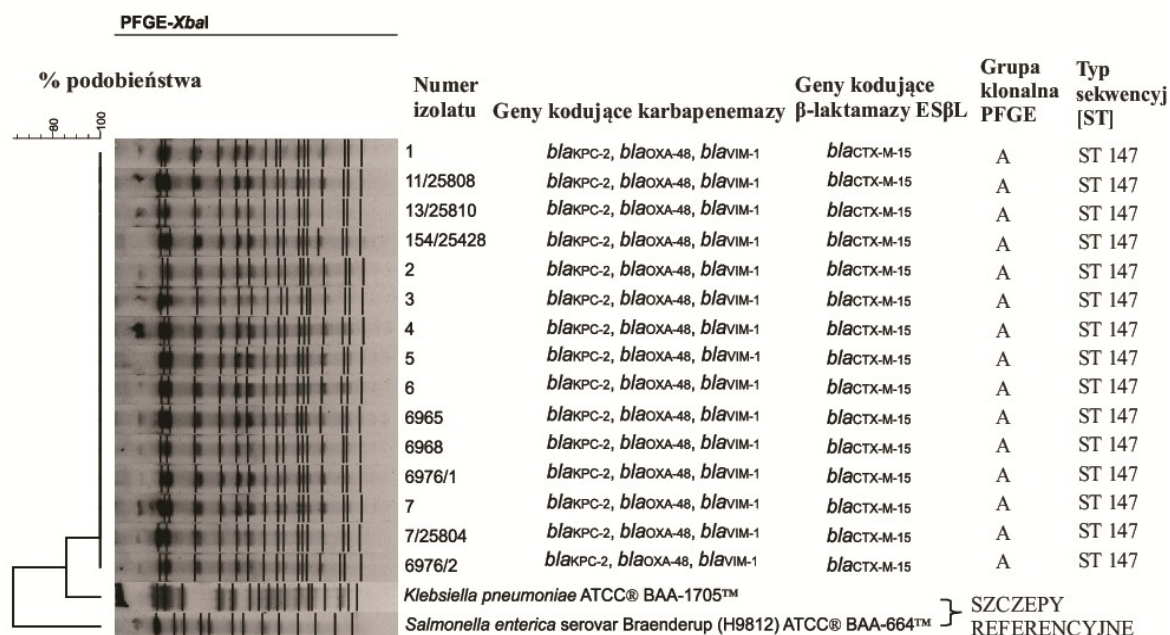
#### 4.1.5 Detekcja genów kodujących karbapenemazy oraz powiązane $\beta$ -laktamazy

Amplifikacja zdefiniowanych odcinków DNA przeprowadzona metodą PCR i sekwencjonowania potwierdziła występowanie we wszystkich badanych izolatach CRKP (n=15, 100%) genów kodujących karbapenemazy następujących klas: A (gen *bla*<sub>KPC-2</sub>), B (gen *bla*<sub>VIM-1</sub>) i D (gen *bla*<sub>OXA-48</sub>). Dodatkowo, we wszystkich izolatach (n=15, 100%) wykryto geny typu *bla*<sub>CTX-M</sub>, przy czym jedynym zidentyfikowanym wariantem był *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Nie wykryto genów *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> i *bla*<sub>NDM-1</sub>.

#### 4.1.6 Typowanie molekularne izolatów *K. pneumoniae* opornych na karbapenemy

Efektem typowania metodą *Xba*I-REA-PFGE było wykrycie jednego klonu A obejmującego wszystkie badane izolaty CRKP (n=15, 100%). Grupę klonalną (ang. *clonal group*, CG) A zdefiniowano jako wzorce DNA wykazujące 100% podobieństwa. Analiza sekwencji wielu *loci* (MLST) pozwoliła zaklasyfikować wszystkie izolaty do typu sekwencyjnego ST147 o profilu allelicznym 3-4-6-1-7-4-38 należące do kompleksu klonalnego CC147 i potwierdziła związek klonalny pomiędzy badanymi izolatami CRKP. Uzyskane wyniki genotypowania potwierdziły, że wszystkie badane izolaty CRKP posiadały identyczny wzór profilu genetycznego i reprezentowały pojedynczy szczep drobnoustroju należący do hiperepidemicznego klonu *K. pneumoniae* ST147, który rozprzestrzenił się wśród pacjentów szpitala w badanym okresie czasu (Ryc. 7).

Na podstawie przeprowadzonej analizy epidemiologicznej wykazano, że najbardziej prawdopodobną drogą szerzenia się było wewnątrzzpitalne klonalne rozprzestrzenianie się szczepu epidemicznego *K. pneumoniae* ST147. Klon ten wykazywał wrażliwość na antybiotyki (amikacyna, kolistyna) z innych grup terapeutycznych niż antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. Ponadto, klon ten wykrywany był jako kolonizacja szczepami CRKP pacjentów przebywających na trzech oddziałach znajdujących się w różnych lokalizacjach na terenie jednego szpitala, z nakładającymi się okresami ich hospitalizacji i utrzymywał się w środowisku szpitala przez okres co najmniej ośmiu miesięcy.



**Ryc. 7** Dendrogram podobieństwa genetycznego 15 izolatów CRKP wykreślony w oparciu o analizę chromosomalnego DNA badanych izolatów po trawieniu enzymem restrykcyjnym *XbaI* rozdzielonego za pomocą metody REA-PFGE przy użyciu systemu CHEF DR® II oraz poddany analizie przy zastosowaniu oprogramowania Gel Compar® II wersja 6.5 (współczynnik podobieństwa - Dice; optymalizacja - 1%; tolerancja - 1%; metoda grupowania - UPGMA) i uzupełniony o geny kodujące karbapenemazy i β-laktamazy typu CTX-M-15. Opracowanie własne na podstawie [88].

## 4.2 Publikacja nr 2:

**Dorota Ochońska, Łukasz Ścibik, Monika Brzychczy-Włoch. Biofilm Formation of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity. *Pathogens* 2021,10:1345. PMID: 34684294. DOI:10.3390/pathogens10101345. Punktacja MNiSW:100, IF:3,492**

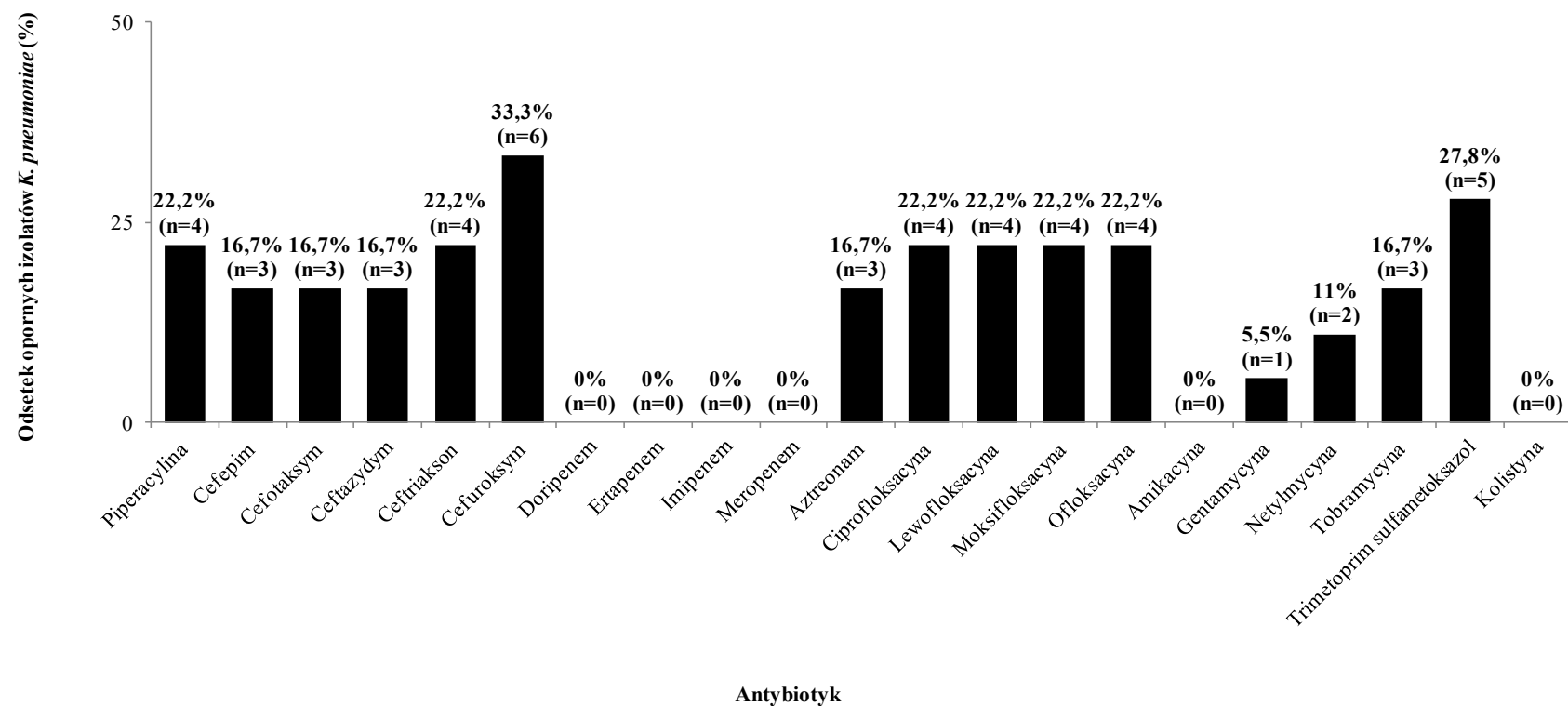
### 4.2.1 Charakterystyka kliniczna pacjentów

W okresie dwóch lat, od 31 lipca 2017 roku do 20 listopada 2019 roku, zebrano osiemnaście izolatów *K. pneumoniae* od osiemnastu pacjentów po przebytym zabiegu tracheotomii hospitalizowanych w 5 Wojskowym Szpitalu Klinicznym (5WSzK) z Polikliniką SPZOZ w Krakowie na dwóch oddziałach mieszczących się w różnej lokalizacji szpitala to jest: a) Klinice Otolaryngologii i Chirurgii Onkologicznej Głowy i Szyi (ORL) oraz b) Klinice Anestezjologii i Intensywnej Terapii (OAiT). Średni wiek

pacjentów wynosił 77 lat (przedział wiekowy 61-98 lat). Średni czas hospitalizacji wynosił 22,4 dni. Łącznie przebadano osiemnaście szczepów klinicznych *K. pneumoniae* pochodzących z rurek tracheostomijnych, w tym 12 (66,7%) próbek pozyskanych od pacjentów oddziału ORL poddanych zabiegowi tracheotomii z powodu raka krtani oraz 6 (33,3%) od chorych leczonych w OAIT, u których konieczność wykonania tracheotomii wynikała z przedłużonej wentylacji mechanicznej płuc. Dwie pacjentki hospitalizowane w OAIT zmarły. Pierwsza z nich, 93-letnia kobieta leczona była z powodu niedrożności przewodu pokarmowego, po zabiegu wycięcia guza esicy z powodu raka gruczołowego jelita grubego. U pacjentki doszło do perforacji wstępnicy w przebiegu pooperacyjnym, a także do martwicy kątnicy spowodowanej niedokrwieniem, czego efektem było rozlane zapalenie otrzewnej, ostra niewydolność krążeniowo-oddechowa oraz niewydolność wielonarządowa i w konsekwencji zgon. U drugiej, 90-letniej pacjentki, doszło do wystąpienia wstrząsu septycznego i ostrej niewydolności oddechowej. Ponadto, u tej chorej stwierdzono zakażenie odcewnikowe o etiologii *Staphylococcus epidermidis*, była ona także nosicielem szczepu wieloopornego *Enterococcus faecium* z wykształconym mechanizmem oporności na glikopeptydy (ang. *vancomycin resistant Enterococcus*, VRE).

#### **4.2.2 Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe**

Wśród wszystkich badanych szczepów *K. pneumoniae* 33,3% (n=6) izolatów było opornych na cefuroksym, 27,8% (n=5) na trimetoprim z sulfametoksazolem (kotrimoksazol), 22,2% (n=4) wykazywało oporność na ceftriakson, ciprofloksacynę, lewofloksacynę, moksifloksacynę, ofloksacynę i piperacylinę, 16,7% (n=3) było opornych na aztreonam ceftazydym, cefepim, cefotaksym i tobramycynę, 11% (n=2) na netylmycynę, ponadto, jeden izolat (5,5%) był oporny na gentamycynę. Nie wykryto izolatów opornych na amikacynę, doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem i kolistynę (Ryc. 8).



**Ryc. 8** Profil lekooporności szczepów klinicznych *K. pneumoniae* izolowanych z rurek tracheostomijnych pochodzących od pacjentów po przebytych zabiegu tracheotomii. Opracowanie własne na podstawie [89].

### 4.2.3 Oznaczenie fenotypu oporności typu ESβL

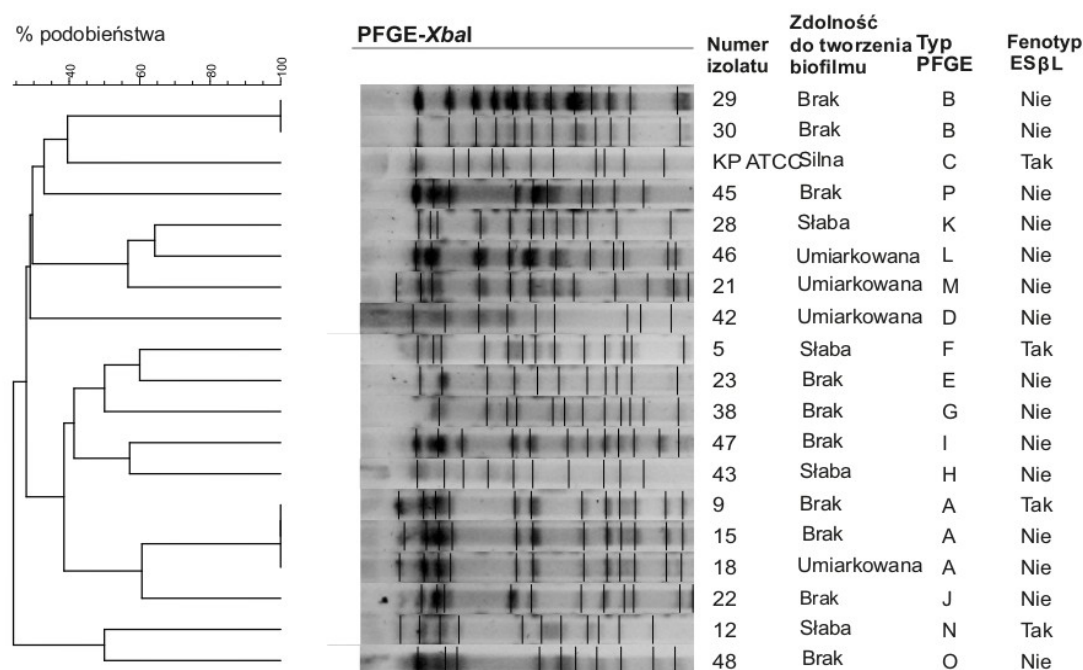
Trzy (16,7%) izolaty *K. pneumoniae* odporne na ceftazydym i cefotaksym równocześnie wykazały pozytywny wynik testu w kierunku wykrywania fenotypu oporności typu ESβL przeprowadzonego za pomocą testu dwóch krążków (DDST).

### 4.2.4 Detekcja genów kodujących β-laktamazy typu ESβL

Amplifikacja przeprowadzona za pomocą reakcji PCR w trzech izolatach o fenotypie oporności typu ESβL potwierdziła obecność genów *bla<sub>SHV</sub>* i *bla<sub>TEM</sub>*. Dodatkowo, w tych izolatach wykryto wariant genu *bla<sub>CTX-M group 1</sub>*. Ponadto, w kolejnym z izolatów oprócz wariantu genu *bla<sub>CTX-M group 1</sub>* wykryto także wariant genu *bla<sub>CTX-M group 9</sub>*.

### 4.2.5 Typowanie molekularne *K. pneumoniae* izolowanych od pacjentów po przebytym zabiegu tracheotomii

Na podstawie otrzymanych wzorów DNA chromosomalnego, wśród 18 izolatów *K. pneumoniae* zidentyfikowano 16 profili *Xba*I-REA-PFGE. Na podstawie różnic w układzie prążków oznaczono typy PFGE i oznaczono je literami (A-P). Wykryto dwie małe grupy klonalne: klon A (16,7%, n=3) oraz klon B (11%, n=2). Trzynastcie (72,2%) pozostałych izolatów prezentowało unikatowe wzory restrykcyjne (C-P). Izolaty o fenotypie oporności typu ESβL zaliczono do 3 różnych profili PFGE (A, F oraz N) (Ryc. 9).



**Ryc. 9** Dendrogram podobieństwa genetycznego 18 izolatów *K. pneumoniae* pochodzących od pacjentów po przebytym zabiegu tracheotomii wykreślony w oparciu o analizę chromosomalnego

DNA badanych izolatów po trawieniu enzymem restrykcyjnym *Xba*I i rozdzielonego za pomocą metody REA-PFGE przy użyciu systemu CHEF DR<sup>®</sup>II oraz poddanego analizie przy zastosowaniu oprogramowania Gel Compar<sup>®</sup>II wersja 6.5 (współczynnik podobieństwa, Dice; optymalizacja, 1%; tolerancja, 1%; metoda grupowania, UPGMA). Opracowanie własne na podstawie [89].

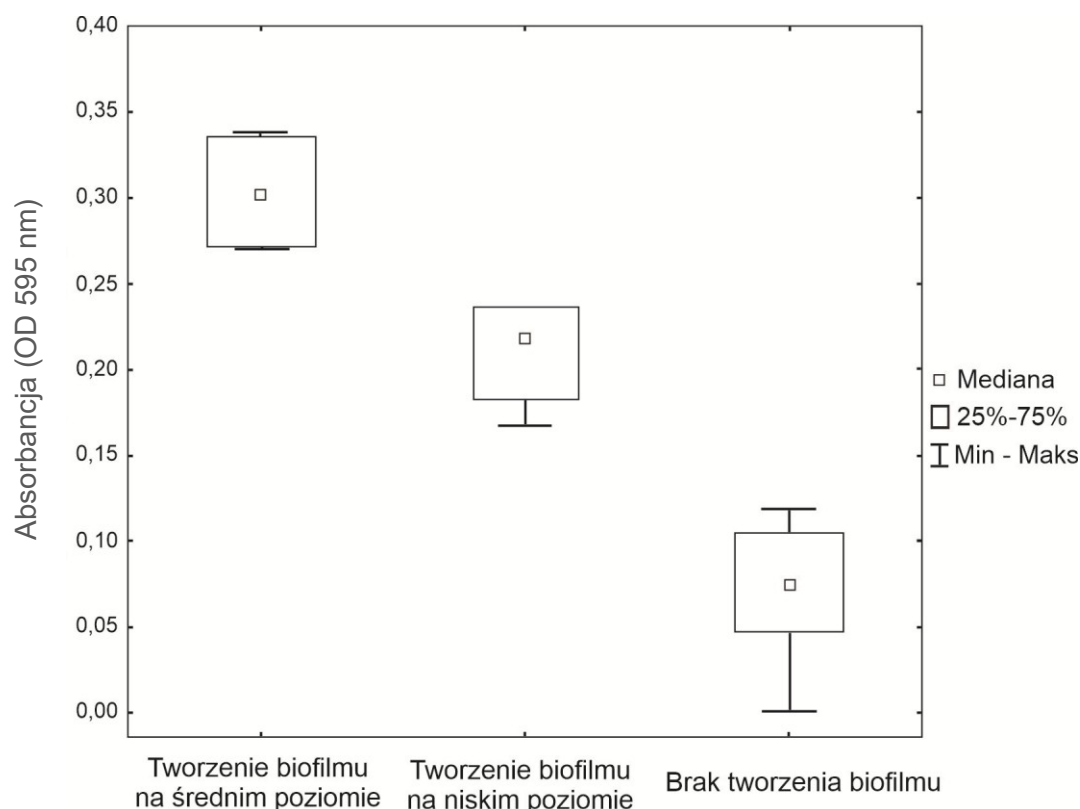
#### **4.2.6 Detekcja genów kodujących fimbrie metodą PCR**

Badanie metodą PCR wykazało, że 100% (n=18) izolatów pochodzących z rurek tracheostomijnych posiadało gen adhezyny *mrkA*, podczas gdy u 27,8% (n=5) izolatów wykryto gen *fimA*. Obecność genu adhezyny *mrkD* potwierdzono u 38,9% (n=7) izolatów. Ponadto, geny *ecpA* i *fimH* wykryto odpowiednio w 50% (n=9) i 27,8% (n=5) izolatach.

#### **4.2.7 Ocena biofilmu bakteryjnego**

Oceny zdolności do tworzenia biofilmu bakteryjnego przez badane izolaty *K. pneumoniae* dokonano z zastosowaniem metody ilościowej wykorzystującej wiązanie się fioletu krystalicznego (ang. *crystal violet*, CV) z powstałym biofilmem bakteryjnym. Zgodnie z przyjętymi kryteriami interpretacji wyników zidentyfikowano 44,4% (n=8) izolatów jako producentów biofilmu, pozostałe 55,5% (n=10) izolatów nie tworzyło biofilmu. Cztery izolaty (50%) wykazywały średnią zdolność do tworzenia biofilmu, 50% (n=4) izolatów charakteryzowało się słabą zdolnością do tworzenia biofilmu. W badanej puli szczepów nie wykryto izolatów *K. pneumoniae* tworzących silny biofilm (Ryc. 10).

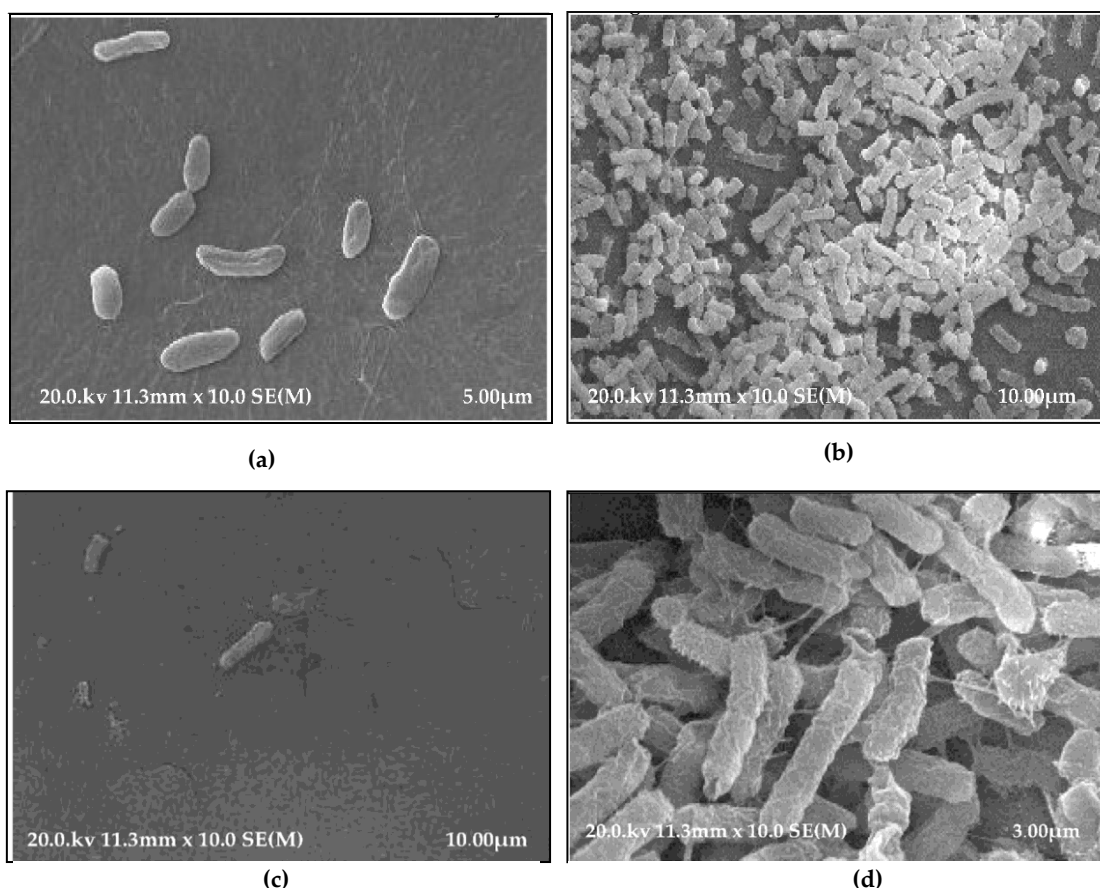




**Ryc. 10** Ocena tworzenia biofilmu przez szczepy *K. pneumoniae* wyizolowane od pacjentów po przebytych zabiegach tracheotomii przy zastosowaniu metody kolorymetrycznej z fioletem krystalicznym. Opracowanie własne na podstawie [89].

#### 4.2.8 Obrazowanie biofilmu *K. pneumoniae* w skaningowym mikroskopie elektronowym

Obrazowanie przeprowadzone za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (ang. *scanning electron microscopy*, SEM) potwierdziło zdolność przylegania bakterii *K. pneumoniae* w różnym stopniu do powierzchni rurek tracheostomijnych wykonanych z polietylenu (ang. *polyethylene*, PE) oraz polichlorku winylu (ang. *polyvinyl chloride*, PVC). Na podstawie przeprowadzonych badań obrazowania wykazano, że powierzchnie wewnętrzne rurek tracheostomijnych, zarówno polietylenowych (PE) jak i wykonanych z polichlorku winylu (PVC), wykazują większy biofilm bakteryjny *K. pneumoniae* niż powierzchnie zewnętrzne (Ryc. 11).



**Ryc. 11** Ocena złożonej struktury biofilmu zobrażowana przy zastosowaniu metody skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) na powierzchni rurek tracheostomijnych izolowanych od pacjentów: (a) pojedyncze komórki *K. pneumoniae* na zewnętrznej powierzchni polietylenowej (PE) rurki tracheostomijnej, (b) biofilm bakteryjny *K. pneumoniae* na wewnętrznej powierzchni polietylenowej (PE) rurki tracheostomijnej, (c) komórki *K. pneumoniae* na zewnętrznej powierzchni rurki tracheostomijnej wykonanej z polichlorku winylu (PVC), (d) biofilm bakteryjny *K. pneumoniae* na wewnętrznej powierzchni rurki tracheostomijnej wykonanej z polichlorku winylu (PVC). Opracowanie własne na podstawie [89].

### 4.3 Publikacja 3:

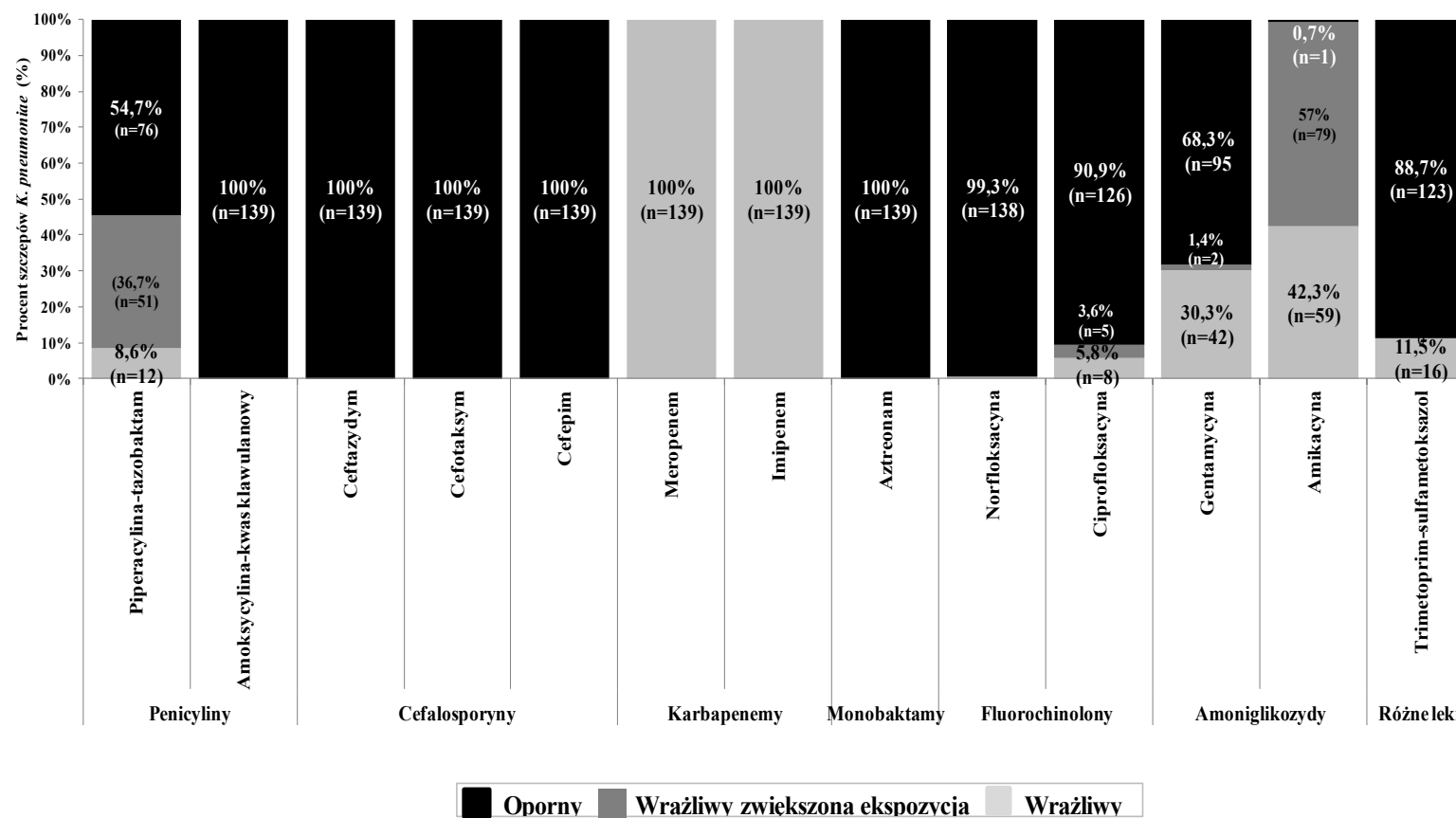
**Dorota Ochońska**, Aldona Olechowska-Jarząb, Anna Dobrut, Małgorzata Bulanda, Monika Brzychczy-Włoch. **Studies on molecular epidemiology of ESβL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients hospitalized in a specialist hospital in southern Poland.** *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* 2021,75:970-979. DOI:10.2478/ahem-2021-0039. **Punktacja MNiSW:40, IF:0,270**

#### 4.3.1 Charakterystyka kliniczna pacjentów

Badaniem objęto 139 pacjentów hospitalizowanych w okresie od 1 stycznia do 31 grudnia 2016 roku w Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym imienia Jana Pawła II w Krakowie na pięciu oddziałach: a) Kardiologii i Kardiochirurgii - CARDIO (n=75), b) Pulmonologii i Chirurgii Klatki Piersiowej - PULMO (n=45), c) Neurologii - NEURO (n=9), d) Chorób Zakaźnych i Dziecięcych - INFECT DIS (n=6), oraz e) Ośrodka Diagnostyki, Prewencji i Telemedycyny z Pododdziałem Szybkiej Diagnostyki - DIAGNOST (n=4). Od badanych pacjentów wyizolowano 139 szczepów *K. pneumoniae* o fenotypie oporności typu ESβL, które poddano szczegółowej charakterystyce.

#### **4.3.2 Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe**

Wszystkie izolaty *K. pneumoniae* (100%, n=139) były odporne na amoksycylinę z kwasem klawulanowym, ceftazydym, cefotaksym, cefepim i aztreonam. Ponadto, badane izolaty wykazywały oporność różnego stopnia na antybiotyki z innych grup terapeutycznych oraz chemioterapeutyki takie jak: norfloksacyna (99,3%, n=138), ciprofloksacyna (90,6%, n=126), trimetoprim z sulfametoksazolem (kotrimoksazol) (88,5%, n=123), piperacylina z tazobaktamem (54,7%, n=76), gentamycyna (68,3%, n=42) oraz amikacyna (0,7%, n=1). Sto piętnaście (82,7%) badanych izolatów sklasyfikowano jako izolaty MDR (Ryc. 12).



**Ryc. 12** Profil antybiotykooporności izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L. Opracowanie własne zmodyfikowane na podstawie [87].

#### 4.3.3 Detekcja genów kodujących $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L

Wśród wszystkich 139 badanych izolatów *K. pneumoniae* odnotowano wysoki odsetek (85,6%, n=112) izolatów, u których wykryto obecność genu *bla*<sub>CTX-M-type</sub>, przy czym 105 izolatów (75,6%) posiadało wariant genu *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, natomiast wariant genu *bla*<sub>CTX-M-1</sub> wykryto w 2 izolatach (1,4%). Poza tym, w 114 izolatach (82%) wykryto geny kodujące  $\beta$ -laktamazy typu SHV (*bla*<sub>SHV</sub>), z kolei w 108 izolatach (77,7%) wykryto geny kodujące  $\beta$ -laktamazy typu TEM (ang. *Temoneira  $\beta$ -lactamase*) (*bla*<sub>TEM</sub>). Analiza współwystępowania poszczególnych genów kodujących  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L wśród analizowanych izolatów wykazała, że najczęstszymi kombinacjami obserwowanymi w 108 (77,7%) izolatach było współlistnienie trzech różnych genów: *bla*<sub>CTX-M-9</sub>/*bla*<sub>SHV</sub>/*bla*<sub>TEM</sub> (65,5%, n=91), *bla*<sub>CTX-M-type</sub>/*bla*<sub>SHV</sub>/*bla*<sub>TEM</sub> (5,8%, n=8), a także *bla*<sub>CTX-M-1</sub>/*bla*<sub>SHV</sub>/*bla*<sub>TEM</sub> (0,7%, n=1). Ponadto, odnotowano współwystępowanie dwóch różnych genów, z czego 7 izolatów (5%) posiadało *bla*<sub>CTX-M-9</sub>/*bla*<sub>SHV</sub>, 4 izolaty (2,9%) posiadały *bla*<sub>CTX-M-9</sub>/*bla*<sub>TEM</sub>, 3 izolaty (2,2%) posiadały *bla*<sub>SHV</sub>/*bla*<sub>TEM</sub>, a 2 izolaty (1,4%) *bla*<sub>CTX-M-type</sub>/*bla*<sub>SHV</sub>. W 9 izolatach (6,5%) wykryto tylko jeden gen  $\beta$ -laktamazy, w tym przeważały 3 izolaty posiadające wariant genu *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (2,2%).

#### 4.3.4 Typowanie molekularne izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L

Wśród 139 szczepów klinicznych pochodzących od pacjentów zidentyfikowano 41 różnych profili genetycznych *Spe*I-REA-PFGE, w tym 4 główne klony (A-D) skupiające 85 izolatów stanowiących 61% całości kolekcji. Pozostałe 22 izolaty (16%) zgrupowano w 7 mniejszych linii klonalnych: G (n=3), H (n=3), I (n=2), J (n=2), K (n=2), L (n=2), M (n=2). Trzydzieści dwa izolaty (23%) prezentowały unikatowe wzory restrykcyjne (ang. *singletons*). Za poziom podobieństwa izolatów przyjęto punkt odcięcia (ang. *cut-off*)  $\geq$  98%. Izolaty wykazujące identyczny układ prążków lub układ na poziomie co najmniej 98% zostały zaklasyfikowane jako jeden klon.

Największy klon A obejmował 39 izolatów (28,1%) pochodzących z czterech oddziałów szpitalnych, w tym 19 (48,7%) izolatów z oddziału Kardiologii i Kardiochirurgii, 15 (38,5%) izolatów z oddziału Pulmonologii, 4 (10,2%) izolaty z oddziału Neurologii i 1 (2,6%) izolat z oddziału Ośrodka Diagnostyki, Prewencji i Telemedycyny z Pododdziałem Szybkiej Diagnostyki. Klon B składał się z 23 izolatów (16,5%), w tym 14 (60,9%) izolatów z oddziału Kardiologii i Kardiochirurgii, 6 (26%) izolatów z oddziału Pulmonologii i Chirurgii Klatki Piersiowej, 2 (8,7%) izolaty z oddziału

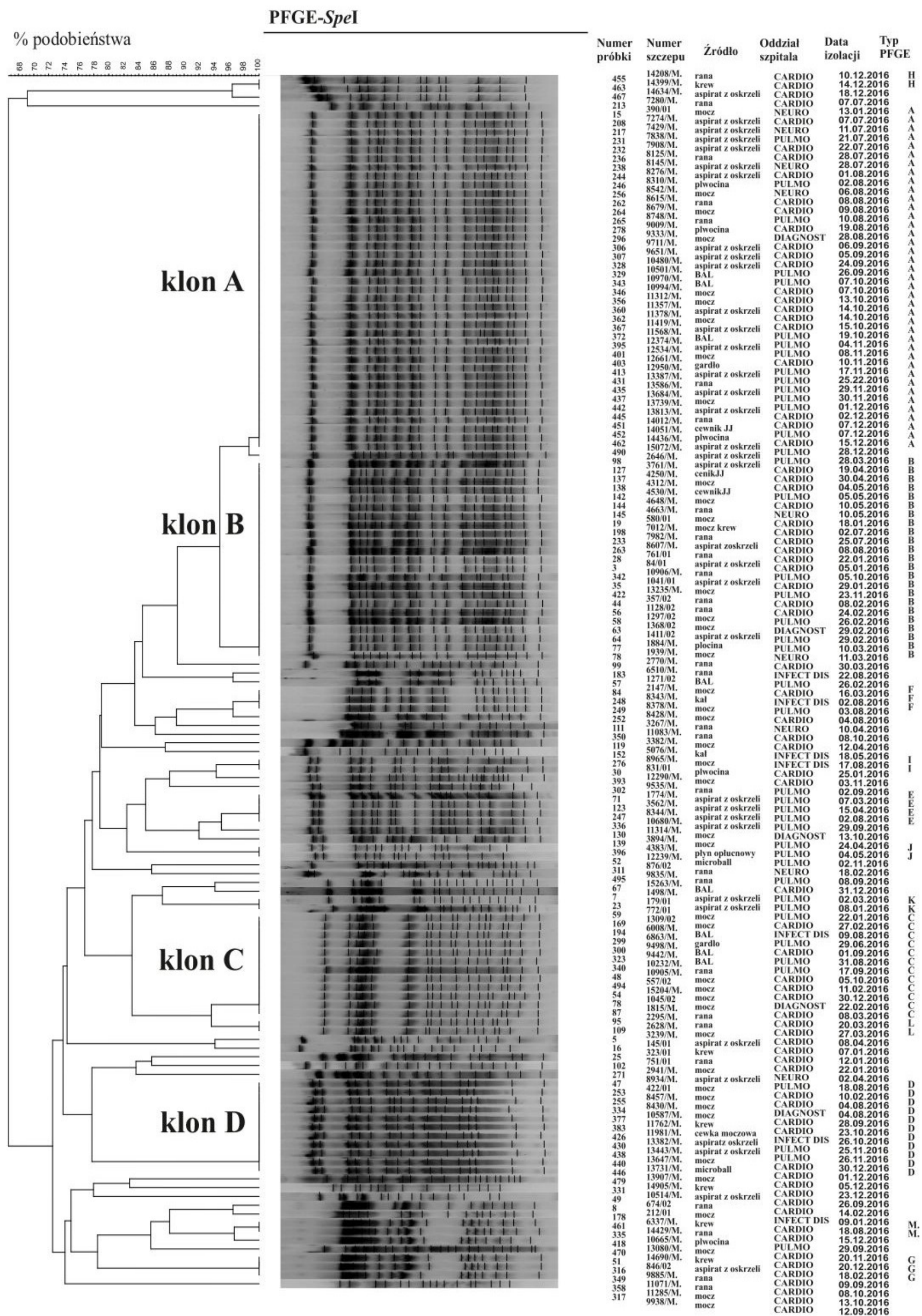
Neurologii oraz 1 (4,3%) izolat z oddziału Ośrodka Diagnostyki, Prewencji i Telemedycyny z Pododdziałem Szybkiej Diagnostyki. Klon C obejmujący 12 izolatów (8,6%) z 7 (58,3%) izolatami z Kardiologii i Kardiochirurgii, 3 (25%) izolatami z Pulmonologii i Chirurgii Klatki Piersiowej, 1 (8,3%) izolatem z Chorób Zakaźnych i Dziecięcych oraz 1 (8,3%) izolatem z oddziału Ośrodka Diagnostyki, Prewencji i Telemedycyny z Pododdziałem Szybkiej Diagnostyki. Klon D obejmujący 10 izolatów (7,2%) z 7 (70%) izolatami z Kardiologii i Kardiochirurgii, 2 (20%) izolaty z Pulmonologii i Chirurgii Klatki Piersiowej oraz 1 (10%) izolat z Chorób Zakaźnych i Dziecięcych.

Klon A był głównie reprezentowany przez izolaty pochodzące z aspiratów oskrzelowych (46%), w skład klonów B i C wchodziły głównie izolaty pochodzące z moczu (34,8% i 41,7%, odpowiednio), klon D zawierał izolaty pochodzące z aspiratów oskrzelowych i z moczu po 25% oraz klon F tworzyły izolaty z moczu i ran po 25%.

Izolaty zaklasyfikowane do klonu A wykazały znacznie wyższą wrażliwość na trimetoprim z sulfametoksazolem niż izolaty z trzech innych głównych typów klonalnych *SpeI*-REA-PFGE (B-D) ( $p=0,06$ ). Izolaty zaklasyfikowane do typu klonalnego C wykazały istotnie mniejszą oporność na amikacynę i piperacylinę z tazobaktamem niż izolaty z pozostałych głównych typów klonalnych A, B i D ( $p<0,001$ ). Izolaty zaklasyfikowane do klonalnego typu D wykazały znacząco wyższą wrażliwość na gentamycynę niż izolaty z pozostałych typów klonalnych A, B i C ( $p<0,001$ ). W przypadku pozostałych antybiotyków wyniki nie były istotne statystycznie.

Wśród głównych typów klonalnych A-D wyróżniono trzy podgrupy istotnie statystycznie ( $p<0,001$ ) różniące się obecnością genu *bla<sub>SHV</sub>*. Najwyższą wykrywalność *bla<sub>SHV</sub>* potwierdzono w obrębie klonu D (93,75%) następnie w obrębie klonu A (82,05%) w dalszej kolejności w obrębie klonów B i C (odpowiednio, 79,17% i 77,78%). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między przynależnością izolatów do głównych typów klonalnych (A-D) a ich zjadliwością, rodzajem oddziału (miejscem pochodzenia czy rodzajem materiału klinicznego, z którego zostały wyizolowane (Ryc. 13).





**Ryc. 13** Dendrogram ilustrujący profile genetyczne 139 izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L po trawieniu restrykcyjnym enzymem *SpeI* rozdzielonego z zastosowaniem metody REA-PFGE przy użyciu systemu CHEF DR<sup>®</sup> II oraz poddanego analizie przy zastosowaniu oprogramowania Gel Compar<sup>®</sup> II wersja 6.5 (współczynnik podobieństwa - Dice, optymalizacja - 1%, tolerancja - 1%, metoda grupowania - UPGMA). Opracowanie własne zmodyfikowane na podstawie [87].

#### 4.3.5 Detekcja genów kodujących wybrane czynniki wirulencji

W badanej puli izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L wykryto geny kodujące poszczególne siderofory w tym: gen kodujący enterobaktynę (*entB*) był oznaczony w 91,4% (n=127) izolatach, gen kodujący jersiniabaktynę (*ybtS*) w 55,4% (n=77) izolatach oraz gen kodujący układ syderoforowy aerobaktyny (*iutA*) w 55,4% (n=77) izolatach. Otoczkowy serotyp K1 (gen *magA*) występował u 53,2% izolatów zaś serotyp K2 (gen *K2*) potwierdzono w 11,5% (n=16) izolatów. Gen *kfu* kodujący transport żelaza i funkcje fosfotransferazy oraz gen *mrkD* kodujący adhezyny fimbrialne typu 3 były obecne odpowiednio w 14,4% (n=20) oraz 10,1% (n=14) izolatach, Z kolei gen *rmpA* - regulator syntezy polisacharydów otoczkowych wykryto w 11 (7,9%) izolatach, natomiast gen *allS* kodujący metabolizm allantoiny posiadało 7 (5%) izolatów. Zaobserwowano trzydzieści dziewięć kombinacji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji z wyraźną dominacją następujących genotypów: *ybtS/entB/iutA* w 16,5% (n=23) izolatów, *ybtS/entB/magA* w 14,4% (n=20) oraz *ybtS/entB/iutA/magA* w 8,6% (n=12).

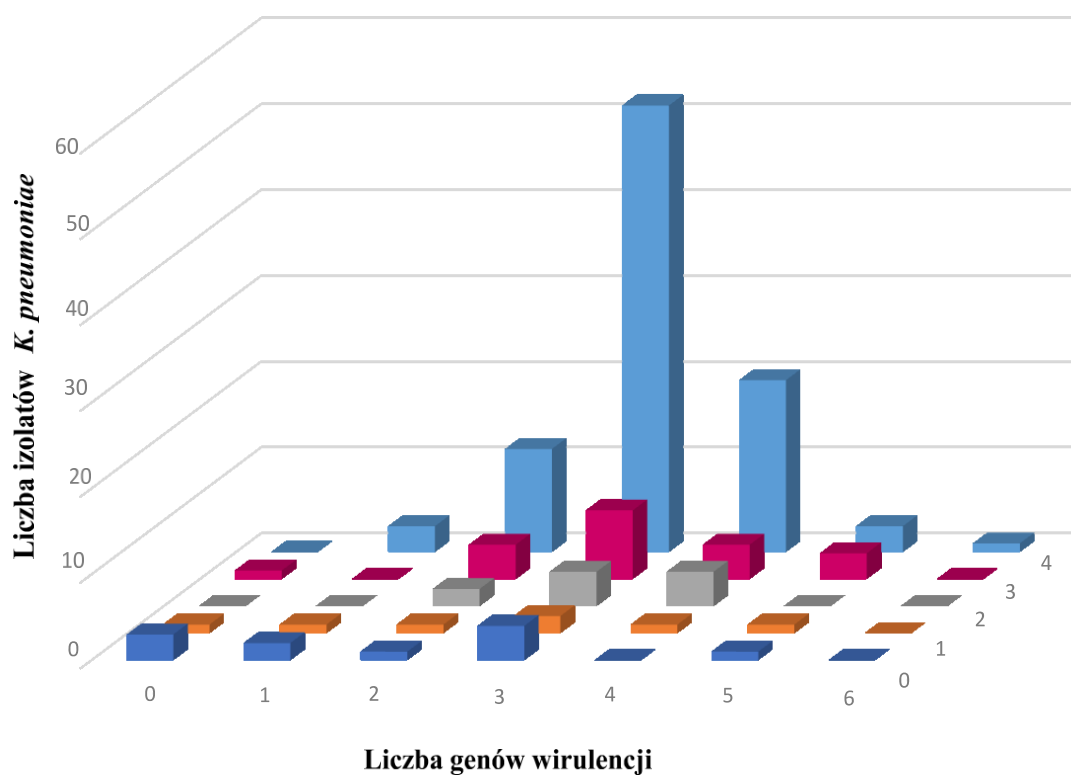
#### 4.3.6 Korelacja pomiędzy występowaniem genów kodujących oporność i genów kodujących wybrane czynniki wirulencji

Zaobserwowano 25 różnych kombinacji w oparciu o współwystępowanie genów kodujących oporność i genów kodujących wybrane czynniki wirulencji. Najliczniejszą grupę izolatów (n=52, 37,4%) stanowiły izolaty z czterema genami oporności i trzema genami kodującymi czynniki wirulencji w różnych konfiguracjach:

- a) *bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>TEM</sub>/bla<sub>CTX-M-type</sub>/bla<sub>CTX-M-9</sub>+ybtS/entB/iutA* (n=17, 32,7%),
- b) *bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>TEM</sub>/bla<sub>CTX-M-type</sub>/bla<sub>CTX-M-9</sub>+ybtS/entB/magA* (n=51, 28,8%),
- c) *bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>TEM</sub>/bla<sub>CTX-M-type</sub>/bla<sub>CTX-M-9</sub>+entB/iutA/magA* (n=10, 19,2%),
- d) *bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>TEM</sub>/bla<sub>CTX-M-type</sub>/bla<sub>CTX-M-9</sub>+entB/iutA/magA* (n=10, 19,2%),
- e) *bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>TEM</sub>/bla<sub>CTX-M-type</sub>/bla<sub>CTX-M-9</sub>+mrkD/entB/iutA* (n=6, 11,5%),
- f) *bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>TEM</sub>/bla<sub>CTX-M-type</sub>/bla<sub>CTX-M-9</sub>+entB/kfu/magA* (n=3, 5,8%),
- g) *bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>TEM</sub>/bla<sub>CTX-M-type</sub>/bla<sub>CTX-M-9</sub>+ybtS/entB/magA* (n=1, 1,9%).

Uzyskany współczynnik Pearsona ( $r_{xy}=0,27$ ,  $p=0,001$ ) wskazuje na słabą korelację ( $0,1 \leq r_{xy} < 0,3$ ) pomiędzy współwystępowaniem genów kodujących oporność oraz genów kodujących wybrane czynniki wirulencji u badanych *K. pneumoniae* (Ryc. 14).





**Ryc. 14** Określenie korelacji pomiędzy współwystępowaniem genów kodujących oporność i genów kodujących wybrane czynniki wirulencji u izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L. Współczynnik Pearsona  $r_{xy}=0,27$ ;  $p=0,001$ . Opracowanie własne zmodyfikowane na podstawie [87].

## 5. DYSKUSJA

Prezentowana praca powstała w związku z obserwowanym w ostatnich latach problemem wzrostu częstości izolacji szczepów pałeczek *K. pneumoniae* wytwarzających karbapenemazy (CPE) oraz  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L [87-89]. Szczepy CPE jak i szczepy ES $\beta$ L-dodatknie charakteryzują się opornością na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe w tym na karbapenemy. Antybiotyki te stanowią najliczniejszą i najczęściej stosowaną grupę leków podczas terapii zakażeń [41].

Liczne badania naukowe dowodzą, że wysoce wirulentne oraz wielolekooporne szczepy *K. pneumoniae* (hvKP) wytwarzające różne  $\beta$ -laktamazy rozprzestrzeniają się w szpitalach zarówno w Polsce jak i na świecie w postaci klonów o zwiększonej zjadliwości wywołując zakażenia szpitalne wyróżniające się ciężkim przebiegiem i wysokim odsetkiem śmiertelności [17]. Cechy te są ściśle powiązane z powszechną obecnością tych pałeczek u ludzi i zwierząt jako naturalnych składników mikrobioty przewodu pokarmowego oraz ich dużym znaczeniem jako częstych czynników etiologicznych zakażeń w podmiotach leczniczych zapewniających leczenie w trybie ambulatoryjnym lub stacjonarnym [94].

Antybiotykooporność pałeczek *K. pneumoniae* budzi coraz częstsze, coraz bardziej odczuwalne i uzasadnione obawy u pacjentów. Zakres tego zjawiska powoduje, że jest ono jednym z podstawowych zagrożeń dla zdrowia publicznego na całym świecie. Niektóre szczepy pałeczek są odporne na około 95% środków przeciwdrobnoustrojowych dostępnych na rynku farmaceutycznym, co oznacza, że opcje terapeutyczne leczenia zakażeń bakteryjnych wywoływanych przez ten drobnoustrój ulegają wyczerpaniu, a co za tym idzie wzrasta śmiertelność z powodu nowych infekcji [95].

Na przestrzeni lat w toku przeprowadzonych badań bakteriologicznych zaobserwowano znaczne zmiany w profilach fenotypów oporności pomiędzy izolowanymi szczepami pałeczek *K. pneumoniae* [10, 13, 27]. Zgodnie z aktualnymi doniesieniami naukowymi, znaczna zmienność wrażliwości bakterii *K. pneumoniae* na antybiotyki w dużej mierze zależy od regionu geograficznego [38, 96-97].

Obecnie zarówno w Polsce jak i na całym świecie szczególnie niebezpieczne są *K. pneumoniae* zaliczane do szczepów CPE reprezentujące grupę pałeczek *Enterobacterales* wytwarzających karbapenemazy [98]. Określenie szczepu CPE odnosi się do mechanizmu produkcji karbapenemazy [98]. W literaturze naukowej szczepy te określane są również terminem CRE (ang. *carbapenem-resistant Enterobacterales*), który odnosi się do

fenotypu oporności [98]. Najczęściej do szczepów CPE/CRE zalicza się gatunek *E. coli* oraz przedstawicieli rodzajów: *Klebsiella* spp. i *Enterobacter* spp. [99]. Szczepy CPE/CRE charakteryzują się opornością jednocześnie na antybiotyki z kilku różnych grup terapeutycznych w tym cefalosporyny III generacji, aminoglikozydy oraz fluorochinolony [100]. Ponadto, szczepy te łatwo utrzymują się w środowisku szpitalnym, wyróżniają się dużym potencjałem epidemicznym oraz długotrwałą kolonizacją przewodu pokarmowego hospitalizowanych pacjentów [99]. Szczepy CPE/CRE należą do najczęstszych patogenów alarmowych odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne [99].

Dane naukowe dotyczące występowania nosicielstwa/kolonizacji oraz zakażeń objawowych powodowanych przez *K. pneumoniae* należących do szczepów CPE/CRE oraz jednocześnie wytwarzających  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L są raportowane z licznych krajów europejskich, Azji, Stanów Zjednoczonych oraz Australii [18, 36, 38, 101-102]. Zgodnie z najnowszym raportem opublikowanym przez Amerykańskie Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) spośród 9000 infekcji zgłoszonych w 2013 roku spowodowanych przez szczepy CRE około 80% było wywołanych przez *K. pneumoniae* [98]. W Polsce zgodnie z Narodowym Programem Ochrony Antybiotyków obowiązującym w latach 2016-2020, w związku z dużą skalą obserwowanego zjawiska w wyniku wzrostu częstości izolacji szczepów CPE, a co za tym idzie w związku z tym rosnącego zagrożenia epidemiologicznego zalecane jest zgłaszanie i monitorowanie każdego przypadku izolacji szczepu CPE niezależnie od oceny klinicznej nosicielstwa/kolonizacji lub objawowego zakażenia co wymaga zgłoszenia, rejestracji oraz wdrożenia działań zapobiegających rozprzestrzenianiu się szczepów CPE [103].

W niniejszej pracy szczepy CPE reprezentowane były przez izolaty *K. pneumoniae* odporne na karbapenemy (CRKP) wytwarzające karbapenemazy typu KPC-2, VIM-1 i OXA-48 [88]. Szczepy te stanowiły 8,7% całej kolekcji. Izolaty CRKP pochodziły z wymazów z odbytu, dodatkowo jeden izolat pochodził z krwi. Dla porównania, zgodnie z Yang i inni w różnych prowincjach Chin częstość występowania izolatów CRKP wahała się od 0,9% do 23,6% ze średnią wartością wynoszącą 8,7% [51]. Dla kontrastu, inny polski zespół badawczy Sarowska i inni zidentyfikował izolaty *K. pneumoniae* odporne na karbapenemy wytwarzające karbapenemazy typu MBL/NDM (82,1%), VIM (14,3%) oraz MBL/NDM+OXA-48 (3,6%) pochodzących z wymazów z odbytu od pacjentów poddanych badaniom przesiewowym w kierunku nosicielstwa bakterii CPE [104]. Podobnie w badaniach przeprowadzonych przez Martin i inni obejmujących 1765 pacjentów średnia częstość kolonizacji przewodu pokarmowego szczepami CRKP u tych

chorych wynosiła 23% [57]. Ponadto, w badaniu zespołu amerykańskich naukowców wykazano istotność statystyczną pomiędzy potwierdzoną kolonizacją a późniejszym rozwojem pozajelitowego zakażenia objawowego o etiologii *K. pneumoniae* u 5,2% pacjentów [57]. W odróżnieniu, w badaniach przesiewowych przeprowadzonych przez Sun i inni na 106 szczepach *K. pneumoniae* aż 95,3% okazało się być szczepami CRKP [105]. Według Falcone i inni objawy bakteriemii spowodowanej przez szczepy *K. pneumoniae* produkujące różne  $\beta$ -laktamazy w tym karbapenemazy typu KPC rozwinęły się u 8,1% pacjentów skolonizowanych przez identyczne szczepy tych pałeczek jelitowych [106]. W prospektywnym międzynarodowym badaniu o akronimie EuSCAPE (ang. *European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*) przeprowadzonym przez Grundmann i inni analizującym występowanie w szpitalach europejskich pałeczek *Enterobacteriaceae* w tym między innymi *K. pneumoniae* produkujących karbapenemazy typu KPC, NDM, VIM i OXA-48-like wykazano, że częstość występowania tych izolatów w Grecji była na poziomie 91,9%, w Belgii - 68,6%, w Serbii - 64,2%, we Francji - 40,7%, a także w Polsce - 11,8% [97]. Opublikowane wyniki badań naukowych pokazują, że u pacjentów hospitalizowanych w oddziałach intensywnej terapii następuje dynamiczna kolonizacja szczepami CRKP co może stanowić źródło zakażeń objawowych spowodowanych przez szczepy o takim samym fenotypie [57, 105-106].

Wyniki badań antybiotykooporności badanych izolatów CRKP potwierdziły typowy dla producentów karbapenemaz profil oporności na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe z charakterystyczną opornością na oksymino- $\beta$ -laktamy (cefuroksym, cefalosporyny III i IV generacji oraz aztreonam), a także cefalosporyny III generacji połączone z inhibitorem i karbapenemy [88]. Wszystkie badane izolaty CRKP wykazywały wysoki poziom oporności na doripenem, ertapenem i meropenem. Równocześnie izolaty te prezentowały różne poziomy oporności na imipenem [88]. Przeprowadzone reakcje PCR oraz sekwencjonowanie potwierdziły występowanie u wszystkich badanych izolatów CRKP genów kodujących poszczególne karbapenemazy: *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> i *bla*<sub>OXA-48</sub>. Lee i inni wykazali, że jednoczesne występowanie u pojedynczego szczepu *K. pneumoniae* kilku typów genów oporności (*bla*) we wszystkich możliwych kombinacjach. Właściwość ta jest naukowo udokumentowaną zdolnością u tego gatunku bakterii [38].

W niniejszej pracy u wszystkich badanych izolatów CRKP wykryto wariant karbapenemazy typu KPC-2 [88]. Liczba wariantów enzymów KPC wykazuje duże zróżnicowanie i wynosi ponad 120, przy czym ciągle najczęściej wykrywane są najstarsze warianty KPC-2 oraz KPC-3 [97, 108-109]. W skali globalnej *K. pneumoniae* pozostaje

dominującym producentem karbapenemaz typu KPC niemniej enzymy te są identyfikowane także u innych gatunków pałeczek *Enterobacterales* (*E. coli*, *S. marcescens*), a także innych Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*) [13]. W populacjach bakterii rozprzestrzenianie się genów *bla*<sub>KPC</sub> ułatwia ich lokalizacja. Geny te bowiem zlokalizowane są w specyficznych elementach aktywnych transpozonach typu Tn4401. Elementy te duplikują się z wysoką częstością w obrębie lub pomiędzy nośnikowymi cząsteczkami DNA (chromosomami, plazmidami) co może prowadzić do zwiększania liczby kopii genów *bla*<sub>KPC</sub> w komórce i przenoszenia ich na coraz to nowe, między innymi wysoce transmisyjne plazmidy [13].

Wśród karbapenemaz klasy A, enzymy KPC są obecnie enzymami o największym znaczeniu klinicznym w skali globu. Należy podkreślić, że wytwarzanie karbapenemaz typu KPC nie zawsze powoduje u badanych szczepów ujawnienie się *in vitro* oporności na imipenem i meropenem, gdyż karbapenemaza ta wykazuje ograniczoną wydajność hydrolizy pierścienia  $\beta$ -laktamowego w cząsteczkach karbapenemów. Na podstawie dostępnych rekomendacji EUCAST dla producentów karbapenemaz zalecane jest badanie przesiewowe (ang. *scrining*) do określenia wartości odcięcia (ang. *cut-off*) karbapenemów wśród których meropenem został zaproponowany jako antybiotyk wskaźnikowy obecności tej karbapenemazy charakteryzujący się najlepszą czułością i swoistością. Ertapenem uważany jest za najczulszy ale zarazem najmniej specyficzny wskaźnik [86]. Dla przykładu, w prezentowanej pracy u trzech badanych izolatów CRKP w metodzie gradientowo-dyfuzyjnej z użyciem E-testu wykazano oporność na ertapenem i meropenem. Dla obu antybiotyków uzyskano wysokie wartości MIC powyżej 32  $\mu\text{g/ml}$ . Jednocześnie u tych samych izolatów odnotowano wrażliwość i średnią wrażliwość na imipenem przy wartościach MIC w zakresie od 4  $\mu\text{g/ml}$  do 8  $\mu\text{g/ml}$ . W reakcji PCR potwierdzono obecność genu *bla*<sub>KPC-2</sub> u wszystkich trzech izolatów [88]. Oporność pozostałych badanych izolatów CRKP na imipenem może być na przykład wynikiem działania czynników obniżających przepuszczalność błony zewnętrznej bakterii [110-111]. Zróżnicowanie uzyskanych wyników oznaczenia lekooporności na karbapenemy badanych izolatów CRKP ilustruje trudności diagnostyczne jakie można napotkać przy identyfikacji szczepów produkujących karbapenemazy oraz różne  $\beta$ -laktamazy w laboratoriach szpitalnych. Ocena profili oporności określonych metodą gradientowo-dyfuzyjną z użyciem E-testu wydaje się być niewystarczająca. Wiarygodna diagnostyka mikrobiologiczna gwarantująca właściwe rozpoznanie takich szczepów wymaga zastosowania dodatkowych testów potwierdzających, przykładowo zmodyfikowanego testu Hodge’a lub bardziej

specyficznych testów opartych na działaniu inhibitorów karbapenemaz takich jak: EDTA czy kwas fenyloboronowy [88]. Ponadto, zalecane jest zastosowanie reakcji PCR do wykrywania konkretnych genów w tym *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> i *bla*<sub>VIM/IMP</sub> [108, 112].

Poza karbapenemazą typu KPC-2 u wszystkich badanych izolatów CRKP wykryto metalo- $\beta$ -laktamazy (MBL) typu VIM-1 [88]. Zgodnie z Matsumura i inni w zaprezentowanym raporcie dotyczącym globalnego rozprzestrzeniania się szczepów z rzędu *Enterobacterales* posiadających geny *bla*<sub>VIM</sub>, posługując się technologią sekwencjonowania całego genomu (ang. *Whole Genome Sequencing*, WGS) wykazano, że szczepy te występują głównie w Europie, zwłaszcza w Grecji, Hiszpanii, na Węgrzech i we Włoszech [113]. Według Protonotariou i inni duży problem zwiększonej izolacji szczepów *K. pneumoniae* MBL-dodatnich wytwarzających enzym typu VIM-1 dotyczy przede wszystkim Grecji, gdzie w ciągu dwóch lat szczepy te odpowiedzialne były za śmiertelność 48% pacjentów [110]. W Polsce szczegółowy raport dotyczący rozprzestrzeniania się *K. pneumoniae* produkujących *bla*<sub>VIM</sub> został zaprezentowany przez zespół naukowy Izdebski i inni [112]. Raport ten przedstawia wyniki badań epidemiologicznych prowadzonych na przestrzeni 7 lat nad rozprzestrzenianiem się  $\beta$ -laktamaz typu VIM/IMP w szczepach CPE w Polsce w tym *K. pneumoniae* i wykazał szereg nowych cech organizmów. Ich zróżnicowanie wynikało przede wszystkim z pozyskania integronów *bla*<sub>VIM</sub> od lokalnych populacji *P. aeruginosa*, ich horyzontalnego rozprzestrzeniania się i różnicowania, ale także z kilku prawdopodobnych importów między innymi z Grecji [112].

Trzecią karbapenemazą wykrytą u wszystkich badanych izolatów CRKP była karbapenemaza typu OXA-48 [88]. Wyniki najnowszego raportu grupy naukowej OXA-48-PL zajmującej się monitorowaniem sytuacji rozprzestrzeniania się szczepów wytwarzających karbapenemazy typu OXA-48 w Polsce wskazują, że w naszym kraju są one izolowane stosunkowo rzadko niemniej jednak obserwowany jest ciągły wzrost występowania tych bakterii [114]. Szczepy *K. pneumoniae* z  $\beta$ -laktamazami typu OXA-48 są przykładem przenikania do Europy w szczególności Belgii, Francji, Hiszpanii, Niemczech i Wielkiej Brytanii niebezpiecznych drobnoustrojów z regionów endemicznych, którymi są w tym przypadku głównie kraje wschodniej i południowej części basenu Morza Śródziemnego takie jak Egipt, Tunezja, Maroko oraz Turcja [44, 97, 115]. Doniesienia te potwierdzają globalne badania obserwacyjne przeprowadzone przez międzynarodowy zespół naukowy pod kierunkiem Pitout i inni [47] oraz liczne raporty opracowane przez inne europejskie i międzynarodowe zespoły badawcze między innymi z

Chorwacji, Macedonii, Szwecji, Kanady, Południowej Afryki oraz Japonii [44, 47, 97, 115]. Za główny mechanizm rozprzestrzeniania się OXA-48 w populacjach pałeczek jelitowych z rzędu *Enterobacterales* uważa się koniugacyjny transfer specyficznej grupy plazmidów pOXA-48a-like IncL [44, 47]. Zgodnie z Pitout i inni u 75% izolatów *K. pneumoniae* zaobserwowano jednoczesną produkcję karbapenemazy typu OXA-48 wraz z innymi  $\beta$ -laktamazami typu ES $\beta$ L w szczególności wariantem CTX-M-15 [47]. W nawiązaniu do powyższych spostrzeżeń w niniejszych badaniach odnotowane wysokie wartości MIC powyżej >256  $\mu$ g/ml dla cefotaksymu zasugerowały możliwość wytwarzania przez badane szczepy CRKP  $\beta$ -laktamaz o aktywności cefotaksymaz z rodziny CTX-M [88]. Przeprowadzona reakcja multiplex PCR (CTX-Mplex) oraz sekwencjonowanie potwierdziły obecność genów *bla*<sub>CTX-M-15</sub> u wszystkich badanych izolatów CRKP [88]. W Polsce dominującą obecność cefotaksymaz stanowiących ponad 80% spośród wszystkich zgłaszanych ES $\beta$ L należących do różnych wariantów CTX-M, w tym CTX-M-15 u pałeczek *K. pneumoniae* w Polsce potwierdzają wyniki badań zrealizowanych przez polskie zespoły badawcze [108, 112]. W badanej puli izolatów CRKP nie wykryto genów *bla*<sub>SHV</sub> i *bla*<sub>TEM</sub>. Uzyskane wyniki są zgodne z utrzymującym się globalnym trendem udokumentowanego zmniejszenia częstości występowania szpitalnych szczepów *K. pneumoniae* wytwarzających  $\beta$ -laktamazy SHV lub TEM na rzecz przewagi szczepów produkujących cefotaksymazy CTX-M [13, 18, 42].

Analizując profile lekooporności badanych izolatów CRKP na pozostałe grupy antybiotyków poza antybiotykami  $\beta$ -laktamami wykazano, że 100% izolatów było opornych na ciprofloksacynę, trimetoprim z sulfametoksazolem (kotrimoksazol) oraz fosfomycynę. Na amikacynę oporność wykazywało 26,7% izolatów [88]. W odróżnieniu Yu i inni w swoich badaniach wśród izolatów CRKP odnotowali 78,1% izolatów opornych na amikacynę [61]. Z kolei Guo i inni wykazali całkowitą oporność badanych pałeczek *K. pneumoniae* na amikacynę [62]. Pozostałe aminoglikozydy takie jak gentamycyna, netylmycyna i tobramycyna były nieaktywne wobec badanych izolatów CRKP. Identyczne wyniki profili lekooporności na wyżej wymienione aminoglikozydy zostały opublikowane przez inne zespoły badawcze [62, 109, 117]. Z kolei Yu i inni, zaprezentowali odmienne profile wrażliwości na aminoglikozydy szczepów opornych na karbapenemy (CRKP) [61]. Uzyskane rozbieżności najprawdopodobniej wynikają z różnej liczebności lub pochodzenia badanych szczepów, ale także mogą być związane z polityką antybiotykową danego szpitala czy oddziału. W przeprowadzonej analizie zaobserwowano stosunkowo wysoki odsetek szczepów CRKP dodatkowo opornych na tigecyklinę (42,8%).

Tygecyklina to syntetyczny analog minocykliny, charakteryzujący się szerokim spektrum działania. Antybiotyk ten z powodzeniem znajduje zastosowanie w leczeniu zakażeń wywoływanych przez wielolekooporne szczepy bakteryjne *K. pneumoniae*. W trakcie leczenia tigeceklina może dojść do nabycia oporności u przedstawicieli z rzędu *Enterobacterales*, łącznie z szczepami CRKP co pokazali w swoich badaniach Pfarell i inni [117]. Autorzy wykazali występowanie oporności krzyżowej pomiędzy tigeceklina i opornymi na minocyklinę wyizolowanymi szczepami pałeczek z rzędu *Enterobacterales*, wywołane działaniem opornych na wiele leków (MDR) pomp usuwających lek z komórki [117].

Na oddziałach szpitalnych poza szczepami *K. pneumoniae* opornymi na karbapenemy ciągłe zagrożenie poprzez wzrastające ryzyko infekcji wywoływanych przez szczepy wytwarzające  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L. Kolonizacja środowiska szpitalnego szczepami o tym fenotypie oporności może stanowić istotny czynnik ryzyka, mający wpływ na zwiększenie liczby zakażeń szpitalnych stwarzających trudności terapeutyczne.

W różnych częściach świata odnotowywane jest ciągłe, globalne rozprzestrzenianie się szczepów z rzędu *Enterobacterales* [94]. Zdrowi ludzie są bardzo często bezobjawowymi nosicielami szczepów ES $\beta$ L-dodatnich [94]. Odsetek osób skolonizowanych tymi szczepami waha się od zaledwie 1% do nawet 76% w zależności od kraju objętego badaniem i jest szczególnie wysoki w krajach Azji Południowo-Wschodniej, nieco niższy w Europie [94].

U *K. pneumoniae* wytwarzanie  $\beta$ -laktamaz typu ES $\beta$ L wciąż pozostaje jednym z najważniejszych klinicznie i epidemiologicznie mechanizmów oporności na leki [18, 107, 118]. W przeprowadzonym badaniu szczepy *K. pneumoniae* wytwarzające  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L stanowiły 82,5%. Najwięcej izolatów ES $\beta$ L-dodatnich pochodziło z materiałów z dróg oddechowych (40,3%), w dalszej kolejności z moczu (32,4%), z wymazów z ran (19,4%) oraz z krwi (5%) [89]. Dla porównania w badaniach przeprowadzonych przez Wang i inni przeważająca większość izolatów *K. pneumoniae* ES $\beta$ L-dodatnich była wyhodowana z moczu (38,8%), następnie z materiałów z dróg oddechowych (28,25%), wymazów z ran (11,04%) oraz z krwi (7,22%) [36]. W pracy Castanheira i inni drobnoustroje patogenne z gatunku *K. pneumoniae* najczęściej izolowane były z przypadków zakażeń objawowych w tym zakażeń ran (20,8%), zapaleń płuc (16,3%) oraz infekcji dróg moczowych (13%) [96].

Wyniki badań lekooporności badanej populacji *K. pneumoniae* wytwarzających  $\beta$ -laktamazy ES $\beta$ L wykazały typowy dla producentów tych enzymów profil oporności na



antybiotyki  $\beta$ -laktamowe [87]. Stwierdzono oporność wszystkich izolatów na kilka markerowych oksymino- $\beta$ -laktamów mechanizmu ES $\beta$ L w tym ceftazydymu, cefotaksymu, cefepimu oraz aztreonamu. Wyniki badań lekooporności badanych *K. pneumoniae* izolowanych od pacjentów po przebytym zabiegu tracheotomii wyłoniły 16,7% izolatów opornych na ceftazydym, cefotaksym, cefepim i aztreonam oraz 33,3% izolatów opornych na cefuroksym [89]. Przeciwnie, wyniki uzyskane przez grupę amerykańskich badaczy prezentowały 97% izolatów *K. pneumoniae* opornych na cefuroksym, 81,5% opornych na aztreonam, 72% izolatów opornych na ceftazydym, 68,5% izolatów opornych na cefotaksym oraz 8,9% opornych na cefepim [119]. Z kolei analiza przeprowadzona przez meksykański zespół badawczy Cruz-Cordova i inni wykazała 88% szczepów *K. pneumoniae* opornych na aztreonam, 80% opornych na ceftazydym i 26% opornych na cefepim [120]. Przeprowadzone badania wyłoniły wysoki odsetek (54,7%) szczepów ES $\beta$ L-dodatnich opornych na piperacylinę z tazobaktamem [87]. Zbliżone wyniki uzyskał inny polski zespół naukowy Mrowiec i inni odnotowując 53,5% izolatów *K. pneumoniae* w populacji dorosłych opornych na ten antybiotyk [121]. Z kolei analiza profili lekooporności przeprowadzona przez koreańskich badaczy Lee i inni wykazała nieco niższy odsetek (20,9%) szczepów *K. pneumoniae* opornych na ten lek [128]. Brytyjczyk Livermoore w swojej pracy udowodnił, że szczepy produkujące ES $\beta$ L nierzadko okazują się być odporne *in vitro* na połączenia  $\beta$ -laktamów z inhibitorami, pomimo że ES $\beta$ L z definicji są hamowane przez inhibitory  $\beta$ -laktamaz takie jak kwas klawulanowy, sulbaktam oraz tazobaktam [48]. Z danych literaturowych wynika, że rozwój oporności na piperacylinę z tazobaktamem u klinicznych izolatów *K. pneumoniae* może być konsekwencją kilku różnych mechanizmów oporności, w tym nadprodukcji konstytutywnych chromosomalnych  $\beta$ -laktamaz SHV-1 oraz TEM-1 [128]. Zaobserwowana w naszym badaniu oporność na piperacylinę z tazobaktamem wynikała najprawdopodobniej z ekspresji wielu  $\beta$ -laktamaz typów CTX-M-type, SHV i TEM w jednym szczepie, co mogło doprowadzić do różnych wzorców oporności i wyjaśniałoby zmniejszoną wrażliwość na inhibitory  $\beta$ -laktamaz [87].

U wszystkich badanych izolatów *K. pneumoniae* zaklasyfikowanych jako szczepy o fenotypie oporności typu ES $\beta$ L za pomocą reakcji PCR potwierdzono obecność genów kodujących  $\beta$ -laktamaz ES $\beta$ L należących do trzech różnych rodzin: CTX-M-type (85,6%), SHV (82%) i TEM (77,7%) [87]. W obrębie cefotaksymaz wykazano wyraźną dominację grupy enzymów CTX-M-9 (75,6%), natomiast wariant CTX-M-1 stwierdzono jedynie u dwóch (1,4%) szczepów. Przeprowadzone badania wykazały wysoki odsetek izolatów

(72%) charakteryzujących się współwystępowaniem trzech genów w tym: (65,5%) szczepów posiadających  $bla_{CTX-M-9}+bla_{SHV}+bla_{TEM}$ , 5,8% szczepów posiadających  $bla_{CTX-M-type}+bla_{SHV}+bla_{TEM}$  oraz jeden szczep (0,7%) posiadający  $bla_{CTX-M-1}+bla_{SHV}+bla_{TEM}$ . Poza tym, zaobserwowano 5% szczepów  $bla_{CTX-M-9}+bla_{SHV}$ , 2,9% szczepów posiadających geny  $bla_{CTX-M-9}+bla_{TEM}$ , 2,2% szczepów posiadających geny  $bla_{SHV}+bla_{TEM}$  oraz 1,4% szczepów posiadających  $bla_{CTX-M-type}+bla_{SHV}$ . Dziewięć izolatów (6,5%) posiadało tylko jeden gen, w tym 2,2% szczepów posiadało gen  $bla_{CTX-M-9}$  (n=3) [87]. W przeciwieństwie, badanie przeprowadzone przez inny zespół polskich naukowców Mrowiec i inni w 2019 roku obejmujące populację *K. pneumoniae* wykazało, że 7% szczepów posiadało trzy geny:  $bla_{CTX-M-1}+bla_{TEM}+bla_{SHV}$ , 67,4% posiadało  $bla_{CTX-M-1}+bla_{TEM}$ , 1,2% posiadało  $bla_{TEM}+bla_{SHV}$ , jednocześnie, 1,2% posiadało  $bla_{CTX-M-1}+bla_{SHV}$ , 91,2% izolatów posiadało tylko jeden gen  $bla_{CTX-M-1}$ , 63,5% posiadało gen  $bla_{TEM}$  oraz 11,8% izolatów posiadało gen  $bla_{SHV}$  [121]. Kolejna populacja *K. pneumoniae* ES $\beta$ L-dodatnich scharakteryzowana w Polsce przez zespół naukowy Walter de Walthoffen i inni cechowała się obecnością genu  $bla_{CTX-M}$  na poziomie 94%,  $bla_{TEM}$  na poziomie 94%, i  $bla_{SHV}$  na poziomie 52,8%, w tym 41,6% szczepów posiadało wszystkie trzy geny, 86,1% izolatów posiadało geny  $bla_{TEM}+bla_{CTX-M}$ , 50% posiadało  $bla_{SHV}+bla_{CTX-M}$ , oraz 44,4% posiadało  $bla_{TEM}+bla_{SHV}$  [122]. W Portugalii, badania przeprowadzone przez Rodrigues i inni potwierdziły wśród szczepów *K. pneumoniae* ES $\beta$ L-dodatnich występowanie  $\beta$ -laktamaz należących do rodzin CTX-M-15, SHV i TEM, wykrywanych odpowiednio na poziomach 47%, 45% i 9% [123].

Geny kodujące plazmidowo przenoszone  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L, często współwystępują z innymi plazmidowo kodowanymi mechanizmami oporności na antybiotyki z innych grup niż  $\beta$ -laktamy między innymi na fluorochinolony, aminoglikozydy, trimetoprim z sulfametoksazolem (kotrimoksazol), tetracykliny czy chloramfenikol [124-125]. Przeprowadzona charakterystyka kolekcji szczepów *K. pneumoniae* ES $\beta$ L-dodatnich potwierdziła wysoki odsetek izolatów opornych na antybiotyki z innych niż penicyliny grup terapeutycznych w tym: fluorochinolonów (ciprofloksacyny, 90,9%), trimetoprimu z sulfametoksazolem (kotrimoksazolu) (88,7%) oraz aminoglikozydów (amikacyny, 42,3%) [87]. Dla porównania przeprowadzone także w Polsce badania przez zespół Ojdana i inni wykazały wysoki odsetek szczepów *K. pneumoniae* ES $\beta$ L-dodatnich opornych na trimetoprim z sulfamethoksazolem (kotrimoksazol) (100%), aminoglikozydy (amikacynę, 58,3%) oraz fluorochinolony (ciprofloksacynę, 16,7%) [132]. Podobnie w Brazylii, Wang i inni odnotowali 80,6%, 59,8% i 10,5% szczepów opornych odpowiednio na trimetoprim z sulfametoksazolem

(kotrimoksazol), ciprofloksacynę oraz amikacynę [36]. W puli testowanych *K. pneumoniae* wyizolowanych z rurek tracheostomijnych użytkowanych przez pacjentów po przebytym zabiegu tracheotomii w grupie fluorochinolonów 22,2% izolatów było opornych na ofloksacynę [89]. Odmienne, w badaniu przeprowadzonym przez Cruz-Cordova i inni, odnotowano 2% szczepów opornych na ten antybiotyk [120]. Ponadto, dokonana charakterystyka wyłoniła 22,2% izolatów *K. pneumoniae* opornych na ciprofloksacynę. Podobnie chińscy badacze wykazali oporność na ciprofloksacynę wyizolowanych *K. pneumoniae* wynoszącą 26% [83]. W pracach opublikowanych przez inne zespoły naukowe opisano oporność *K. pneumoniae* na ciprofloksacynę wahającą się na poziomie od 6% do 8% [119-120]. Wśród aminoglikozydów w niniejszym badaniu nie wykryto szczepów *K. pneumoniae* opornych na amikacynę, w odróżnieniu od grup naukowców z Meksyku, które odnotowały stosunkowo wysoki odsetek, 70%, izolatów *K. pneumoniae* opornych na ten lek [119-120]. Przeprowadzone przez nas badania nie wykazały obecności szczepów *K. pneumoniae* opornych na imipenem i meropenem [89]. Nieco odmienne wyniki uzyskano w badaniach przeprowadzonych przez Cruz-Cordova i inni, w których wykryto 4% izolatów *K. pneumoniae* opornych na imipenem oraz 2% izolatów opornych na meropenem [120]. Różnice w profilach lekooporności szczepów *K. pneumoniae* ESβL-dodatnich obserwowane w cytowanych pracach potwierdzają, że wzory te są charakterystyczne dla danego regionu, szpitala lub oddziału.

W niniejszej pracy, 82,7% badanych izolatów *K. pneumoniae* ESβL-dodatnich zaklasyfikowano do kategorii szczepów wielolekoopornych (MDR), podobnie naukowcy z Brazylii, którzy odnotowali 84% szczepów o fenotypie MDR [125]. Od momentu pojawiania się szczepów produkujących karbapenemazy zaczęto odnotowywać zwiększony odsetek izolatów *K. pneumoniae* zaliczanych do kategorii XDR - rozszerzonej oporności [126]. W prezentowanej pracy 40% izolatów CRKP zaliczono do kategorii XDR, porównywalnie do naukowców z Iranu, którzy zidentyfikowali 35,7% izolatów *K. pneumoniae* zaliczonych do kategorii XDR [126]. Światowy wzrost występowania *K. pneumoniae* o fenotypach MDR i XDR odzwierciedla wieloczynnikowe procesy rozpowszechniania, które są wynikiem (i) rozprzestrzeniania się globalnych linii genetycznych wielooporności wysokiego ryzyka (HiR), pozyskanie plazmidów wieloopornych oraz pozyskanie genów oporności zlokalizowanych na transpozonach [13].

Dla potrzeb dochodzenia epidemiologicznego do typowania molekularnego badanych szczepów klinicznych *K. pneumoniae* zastosowano metodę opartą na analizie makrorestrykcyjnej chromosomalnego DNA połączonej z elektroforezą w zmiennym polu

elektrycznym (REA-PFGE), ponadto, użyto metody sekwencjonowania genów metabolizmu podstawowego (MLST). Zastosowane metody typowania są powszechnie używane i opisywane przez wielu naukowców badających ogniska epidemiczne powstałe wskutek transmisji klonalnej *K. pneumoniae* [61-63, 110]. Genetyczne podobieństwo badanych izolatów opornych na karbapenemy (CRKP) oraz izolatów *K. pneumoniae* pochodzących z rurek tracheostomijnych użytkowanych przez pacjentów po przebytych zabiegach tracheotomii określono porównując uzyskane profile genetyczne REA-PFGE po trawieniu enzymem restrykcyjnym *XbaI* zgodnie z protokołem Han i inni [63]. W przypadku izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L zastosowano trawienie restrykcyjne enzymem *SpeI* także zgodnie z protokołem Han i inni [63]. W toku przeprowadzonego typowania molekularnego zaobserwowano zróżnicowanie genetyczne badanej populacji *K. pneumoniae* ze specyficznymi cechami charakterystycznymi dla izolatów pochodzących z danego szpitala.

Analiza klonalna 15 izolatów *K. pneumoniae* opornych na karbapenemy (CRKP) pozyskana od skolonizowanych pacjentów Górnośląskiego Centrum Medycznego Śląskiego Uniwersytetu w Katowicach wykazała, że wszystkie badane izolaty zostały przyporządkowane do jednej grupy klonalnej A w oparciu o ogólnie przyjęte kryteria interpretacji wyników *XbaI*-REA-PFGE [88]. Uzyskane wyniki genotypowania wskazały na wysoki odsetek kolonizacji przewodu pokarmowego szczepami opornymi na karbapenemy (CRKP) u chorych leczonych na trzech oddziałach szpitala. Ponadto, genotypowanie potwierdziło epidemiczne (klonalne) szerzenie się izolatów opornych na karbapenemy (CRKP) wśród pacjentów szpitala [88].

W odróżnieniu analiza klonalna szczepów pałeczek *K. pneumoniae* wyizolowanych z rurek tracheostomijnych użytkowanych przez pacjentów po przebytych zabiegach tracheotomii hospitalizowanych w 5 Wojskowym Szpitalu Klinicznym z Polikliniką Samodzielnego Publicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej w Krakowie przeprowadzona z zastosowaniem metody *XbaI*-REA-PFGE wykazała duże zróżnicowanie genetyczne badanych izolatów [89]. Wynik ten można tłumaczyć pochodzeniem szczepów klinicznych z przypadków kolonizacji rurki tracheostomijnej przez izolaty *K. pneumoniae*, nie zaś z ognisk epidemicznych. Niemniej, przeprowadzona analiza wśród przebadanych szczepów wykazała obecność 2 typów PFGE (A i B) charakterystycznych dla więcej niż jednego szczepu każdy, co mogłoby świadczyć o wspólnym pochodzeniu tych izolatów. Podobne wyniki dużego zróżnicowania genetycznego populacji szpitalnych *K. pneumoniae* przebadanych metodą *XbaI*-REA-PFGE uzyskali w swoich badaniach Alcántal-Curiel i

inni którzy wśród 168 izolatów *K. pneumoniae* wyodrębnili 59 różnych profili *Xba*I-REA-PFGE [119].

Przy zastosowaniu metody sekwencjonowania genów metabolizmu podstawowego (MLST) określono przynależność badanych izolatów *K. pneumoniae* opornych na karbapenemy (CRKP) pozyskanych od pacjentów Górnośląskiego Centrum Medycznego Śląskiego Uniwersytetu w Katowicach i przyporządkowanych w metodzie PFGE do jednej grupy klonalnej A do typu sekwencyjnego ST147 [88]. Navon-Venezia i inni potwierdzili, że oznaczony typ sekwencyjny ST147 *K. pneumoniae* należący do kompleksu klonalnego CC147 reprezentowany przez wielolekooporne izolaty *K. pneumoniae* (MDR) to klon wysokiego ryzyka, który rozprzestrzenił się na całym świecie [13]. Ten pandemiczny klon był zaangażowany w rozprzestrzenianie się cefotaksymazy CTX-M-15 i różnych karbapenemaz w tym KPC-2, OXA-48, NDM-1 i VIM-1 w krajach Europy, Azji i Bliskiego Wschodu [62, 123, 127]. Do rozpowszechnienia się karbapenemaz i innych  $\beta$ -laktamaz wśród różnych klonów i gatunków z rodziny *Enterobacteriaceae* przyczyniła się również transmisja plazmidowa co zostało potwierdzone w 2013 roku w pracy zespołu naukowego Rodrigues i inni, w której udowodniono rozprzestrzenianie się wśród izolatów *K. pneumoniae* należących do różnych klonów w tym ST15, ST147 i ST336 różnych  $\beta$ -laktamaz takich jak: KPC-2, OXA-48, VIM-1 i CTX-M-15 głównie za pośrednictwem epidemicznych plazmidów (IncF, IncN, IncA/C, IncL/M) [123].

Analiza profili genetycznych *Spe*I-REA-PFGE populacji 139 szczepów *K. pneumoniae* produkujących  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L pochodzących od pacjentów hospitalizowanych w Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym imienia Jana Pawła II w Krakowie wykazała dużą różnorodność genetyczną wśród badanych izolatów [87]. Najwyższy stopień podobieństwa (100%) wykazano pomiędzy izolatami zaklasyfikowanymi do czterech głównych typów klonalnych (A-D) oraz siedmiu mniejszych linii klonalnych (G-M) [87]. Izolaty te pochodziły z różnych materiałów klinicznych od pacjentów hospitalizowanych na różnych oddziałach szpitalnych. Podobnie, badania przeprowadzone przez Morris i inni wykazały strukturę klonalną 137 izolatów *K. pneumoniae* wśród których zidentyfikowano sto jedenaście różnych profili genetycznych reprezentujących 16 głównych klonów (A-P) i skupiających 112 izolatów na podstawie podobieństwa >85% przy czym każdy klon składał się z różnej liczby izolatów w przedziale od 2 do 43 [129]. Klonalną strukturę genetyczną *K. pneumoniae* potwierdzili również Lascols i inni w pracy opublikowanej w 2013 roku, w której zidentyfikowano 3 główne klony wśród badanych izolatów *K. pneumoniae* zawierające więcej niż 10 izolatów

w obrębie klonu, ponadto, wyróżniono dziesięć mniejszych linii klonalnych zawierających mniej niż 10 izolatów w obrębie jednej linii klonalnej, dodatkowo 13 izolatów reprezentowało unikatowe wzory restrykcyjne [130]. W naszym badaniu większość izolatów (28%) zostało zaklasyfikowanych do grupy klonalnej A, podobnie, w badaniach przeprowadzonych przez Morris i inni odsetek izolatów *K. pneumoniae* zaklasyfikowanych do największej grupy klonalnej A wynosił 31% [129]. Także Lascols i inni wyodrębnili największą linię klonalną C grupującą 53% izolatów *K. pneumoniae* [130]. Podsumowując, uzyskane wyniki genotypowania *K. pneumoniae* wytwarzających  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L wskazują na szerzenie się klonów epidemicznych pomiędzy oddziałami szpitala [87].

Genotypowanie izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających zarówno karbapenemazy jak i  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L, potwierdziło, że badane populacje szczepów miały strukturę klonalną. Obserwacje te są zgodne z ogólnosiwiatowymi danymi literaturowymi potwierdzającymi, że REA-PFGE jest najczęściej stosowaną metodą molekularną na świecie dedykowaną do genotypowania bakterii z rzędu *Enterobacterales* wytwarzających różne karbapenemazy oraz  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L [63]. Potwierdzają to zarówno polskie jak i liczne międzynarodowe publikacje dotyczące analizy molekularnej populacji *K. pneumoniae* opublikowane między innymi we Francji, w Chinach, w Brazylii oraz w Irlandii [63, 125, 129, 131, 133].

Wśród genów kodujących wybrane czynniki wirulencji u badanych *K. pneumoniae* wykrywano geny związane z typem otoczki w tym gen *magA* związany z serotypem otoczkowym typu K1, który był obecny u 53,2% szczepów *K. pneumoniae*. Z kolei charakterystyczny dla otoczki typu K2 - gen *K2* wykryto u 11,5% szczepów [87]. Dla porównania Compain i inni przebadali 65 izolatów *K. pneumoniae* w tym 23,1% izolatów *K. pneumoniae* z typem otoczki K1 oraz 55,4% szczepów z typem otoczki K2 [64]. Obecność genu *magA* potwierdzono u 23,1% wszystkich badanych izolatów z typem otoczki K1 [64]. W przeciwieństwie, inne zespoły badawcze we Francji oraz w Kanadzie nie wykazały obecności genu *magA* u badanych izolatów *K. pneumoniae* [130, 133].

W badaniach własnych wśród izolatów *K. pneumoniae* z typem otoczki K1 przeważająca liczba szczepów posiadała geny kodujące poszczególne siderofory w tym: 100% szczepów posiadało gen kodujący enterobaktynę (*entB*), 54,1% szczepów posiadało gen kodujący jersiniabaktynę (*ybtS*) oraz 44,6% szczepów posiadało gen kodujący aerobaktynę (*iutA*), ponadto, 14,9% szczepów posiadało gen kodujący system transportu żelaza i funkcje fosfotransferazy (*kfu*), po 2,7% szczepów posiadało gen kodujący

regulator syntezy polisacharydów otoczkowych (*rmpA*) oraz gen kodujący metabolizm allantoiny (*allS*) [87].

Wśród izolatów z typem otoczki K2 81,25% izolatów posiadało gen *entB*, 62,5% szczepów posiadało gen *iutA*, 56,25% szczepów posiadało gen *kfu*, 37,5% szczepów posiadało gen *rmpA*, 25% szczepów posiadało gen *ybtS*, 18,75% szczepów posiadało gen *mrkD*, 12,5% szczepów posiadało gen *allS* [87]. Dla porównania w badaniach przeprowadzonych przez Compain i inni u wszystkich izolatów z typem otoczki K1 wykryto geny: *entB*, *mrkD*, *iutA*, *kfu*, *rmpA* oraz *allS*. Gen *ybtS* francuscy naukowcy wykryli u 93,3% badanych izolatów *K. pneumoniae* [64]. Z kolei u szczepów z otoczką typu K2 analizowanych przez ten sam zespół badawczy poszczególne geny: *entB*, *mrkD*, *iutA*, *rmpA*, *ybtS*, *kfu* oraz *allS* posiadało 100%, 97,2%, 80,6%, 80,6%, 69,4%, 36,1% oraz 2,8% izolatów, odpowiednio [64].

W ramach naszych badań wykazano wyraźną dominację genów kodujących poszczególne siderofory [87]. Podobnie badacze brazylijscy Ferreira i inni wykryli gen *entB* u 100% izolatów *K. pneumoniae*, gen *ybtS* u 60% izolatów oraz gen *iutA* u 40% izolatów [125]. Zgodnie z Russo zdolność drobnoustrojów do wytwarzania sideroforów o różnorodnym charakterze chemicznym wiąże się z ich zwiększoną wirulencją [134]. U *K. pneumoniae* wysoka produkcja sideroforów powyżej >30 µg/ml łączona jest z hiperwirulentnym typem i hypermukoidalnym fenotypem [134]. Jak dotąd nie zidentyfikowano zestawu genów wymaganych do ujawnienia się u omawianego gatunku bakterii tego fenotypu w pełnym zakresie jednakże, udowodniono, że w dużej mierze istotne są geny związane z sideroforami, w tym między innymi gen *iuc* kodujący syntetazę uczestniczącą w szlaku syntezy aerobaktyny [134].

Wśród genów kodujących białka adhezyjne fimbrii typu 1 gen *fimA* wykryto u 27,8% szczepów natomiast gen *fimH* u 27,8% izolatów [89]. Dla porównania, opublikowane w 2013 roku badania przeprowadzone przez Alcántal-Curiel i inni wykazały obecność genu *fimA* u 78% szczepów, z kolei *fimH* u 22% izolatów [67]. W niniejszej pracy wśród genów kodujących białka adhezyjne fimbrii typu 3 gen *mrkA* wykryto u 100% izolatów natomiast gen *mrkD* u 38,9% szczepów [89]. Podobnie, w badaniach przeprowadzonych przez Alcántal-Curiel i inni gen *mrkA* wykryto u 100% izolatów *K. pneumoniae*, natomiast gen *mrkD* u 20% izolatów [67]. Uzyskane wyniki pokazują, że nie wszystkie szczepy *K. pneumoniae* niosące gen *mrkA* koniecznie zawierają gen *mrkD*. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, w których stwierdzono, że gen *mrkD* jest bardziej konserwatywny wśród *K. oxytoca* niż w szczepach *K. pneumoniae* [67]. W

pracy gen *ecpA* wykryto u 50% izolatów [89]. Odmienne, Alcántal-Curiel i inni obecność genu *ecpA* wykazali u 96% szczepów [67].

W związku z wzrastającą w ciągu ostatnich lat częstością izolacji *K. pneumoniae* z próbek materiału klinicznego pobieranych od hospitalizowanych pacjentów poddawanych zabiegom tracheotomii w prezentowanej pracy poddano ocenie zdolność do tworzenia biofilmu przez izolaty *K. pneumoniae* pochodzące z wydzielin tchawiczych z rurek tracheostomijnych pobranych od pacjentów hospitalizowanych w 5 Wojskowym Szpitalu Klinicznym z Polikliniką Samodzielnego Publicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej (SPZOZ) w Krakowie [89]. Pałeczki *K. pneumoniae* jako jedne z najliczniejszych etiologicznych czynników zakażeń szpitalnych, nierzadko są odpowiedzialne za infekcje szpitalne związane z zakażeniami dróg oddechowych manifestujących się zapaleniem płuc związanym z mechaniczną wentylacją (ang. *ventilator associated pneumonia*, VAP) co może wynikać z ich zdolności do tworzenia biofilmu na biomateriałach rurek tracheostomijnych [135]. Ponadto, ważną grupę zakażeń stanowią infekcje pozostające w ścisłym związku z szeroko stosowanymi w medycynie biomateriałami (BAIs), których przykładem są biomateriały przeznaczone do produkcji rurek tracheostomijnych (TTs). W świetle bieżących naukowych danych literaturowych wiadomo, że biofilmy bakteryjne są obecne w ponad 90% rurek tracheostomijnych [135]. Rurki tracheostomijne wykonane z różnych biomateriałów służą jako elementy pozwalające na właściwe sterowania drogami oddechowymi u pacjentów z tracheostomią [65]. Niewątpliwie rodzaj biomateriału z jakiego wykonana jest rurka tracheotomijna włączając polietylen (PE), polichlorek winylu (PVC), silikon (Si) czy poliuretan (PU) ma istotny wpływ na adhezję komórek drobnoustrojów oraz tempo rozwoju biofilmu bakteryjnego [136]. Chropowata, hydrofobowa powierzchnia rurki tracheostomijnej sprzyja adhezji mikroorganizmów, zarówno wewnątrz rurki, jak i na jej zewnętrznej powierzchni. Stąd niezwykle istotna jest prawidłowa higiena rurki tracheostomijnej polegająca na regularnym odssysaniu wydzieliny w niej zalegającej. Przeprowadzenie właściwych zabiegów pielęgnujących gwarantuje utrzymanie odpowiedniej wentylacji pacjenta [136].

Szerokie spektrum drobnoustrojów chorobotwórczych wykazuje zdolność do adhezji, kolonizacji, a w konsekwencji do rozwoju biofilmu na powierzchni rurek tracheostomijnych. Spośród bakterii Gram-ujemnych *K. pneumoniae* pozostają jednymi z najczęściej raportowanych patogenów bakteryjnych zdolnych do tworzenia biofilmu na tych biomateriałach, tym samym są dominującymi pałeczkami izolowanymi od skolonizowanych i/lub manifestujących cechy objawowego zakażenia pacjentów po



przebytym zabiegu tracheotomii [84]. Umieszczenie w ciele ludzkim obcego biomateriału zawsze wiąże się z ryzykiem rozwoju związanego z nim zakażenia. Wytworzony biofilm bakteryjny stanowi trudny zarówno do wykrycia, jak i eliminacji rezerwuuar drobnoustrojów będących przyczyną infekcji nawrotowych. Zakażenia takie są częstsze u pacjentów nadużywających tytoń, otyłych, ze współistniejącymi chorobami takimi jak cukrzyca, nowotwory, obniżone odporności lub poddawanych częstym zabiegom chirurgicznym. Stan zapalny może być wyłącznie miejscowy zlokalizowany w miejscu umieszczonego biomateriału, jak również może dotyczyć całego organizmu, w sytuacji gdy bakterie przedostaną się do krwi [135-137].

W niniejszej pracy badania oceny zdolności tworzenia biofilmu przeprowadzono na szczepach klinicznych *K. pneumoniae* wyizolowanych z wydzielin tchawiczych pochodzących z rurek tracheostomijnych pozyskanych od dorosłych pacjentów z tracheostomią. Wytypowane izolaty analizowano pod względem zdolności do produkcji biofilmu przy pomocy metody kolorymetrycznej opartej na absorbancji fioletu krystalicznego [89]. W przeprowadzonych badaniach 22,2% izolatów *K. pneumoniae* charakteryzowało się tworzeniem biofilmu na średnim poziomie, 22,2% izolatów *K. pneumoniae* tworzyło biofilm na niskim poziomie, 55,5% izolatów *K. pneumoniae* nie tworzyło biofilmu [89]. Dla porównania w pracy Alcántal-Curiel i inni obejmującej kolekcję 168 szpitalnych izolatów *K. pneumoniae* wykazano duży biofilm wytworzony przez 69% izolatów *K. pneumoniae*, 20,3% izolatów charakteryzowało się słabą produkcją biofilmu oraz 10,1% izolatów nie produkowało biofilmu w ogóle [119]. Z kolei opublikowane w 2014 roku badania przeprowadzone przez Cruz-Córdova i inni wykazały wśród 50 przebadanych izolatów *K. pneumoniae* 64% szczepów tworzących duży biofilm, 26% szczepów tworzących średni biofilm oraz 10% szczepów tworzących słaby biofilm [107]. Natomiast wyniki opublikowane w 2016 roku przez Seifi i inni pokazały wśród 94 przebadanych *K. pneumoniae*, że 33% izolatów produkowało duży biofilm, 52,1% izolatów produkowało umiarkowany biofilm, 8,5% izolatów produkowało niewielki biofilm, 6,4% izolatów nie produkowało biofilmu [138]. Odmienne, w badaniach przeprowadzonych przez Hassan i inni obejmujących 110 Gram-dodatnich i Gram-ujemnych izolatów wykryto 15,7% szczepów *K. pneumoniae* produkujących biofilm [139].

W badaniach z użyciem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) potwierdzono znacznie większą kolonizację pałeczkami *K. pneumoniae* wewnętrznych powierzchni rurek tracheostomijnych wykonanych zarówno z polietylenu (PE) jak i polichlorku winylu (PVC) [89]. Badania struktury materiałów stosowanych do produkcji

rurek tracheostomijnych przeprowadzone przez Björling i inni oparte na skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) pokazały, że tracheostomia przedłużająca się do 30 dni może powodować zmiany struktury powierzchni większości rurek tracheostomijnych wykonanych z różnych biomateriałów w wyniku degradacji łańcuchów polimerowych [140]. Dodatkowo badania przeprowadzone przez ten zespół badawczy wykazały, że rurki silikonowe są bardziej odporne na degradację, niż rurki wykonane z polichlorku winylu czy poliuretanu [140]. Z klinicznego punktu widzenia diagnostyka oraz terapia infekcji układu oddechowego u pacjentów po przebytym zabiegu tracheotomii zidentyfikowanych jako skolonizowanych i/lub manifestujących zakażenie objawowe spowodowane przez lekooporne drobnoustroje i stanowiących ich główny rezerwuár jest nadal wyzwaniem dla współczesnej medycyny.

Z uwagi na powszechność wykonywania zabiegów tracheotomii w związku z rosnącą liczbą nowotworów głowy i szyi wysiłki grup badawczych powinny być ukierunkowane na prowadzenie dalszych badań mających na celu pogłębienie wiedzy z zakresu charakterystyki patogenów bakteryjnych wykazujących zdolność do tworzenia biofilmu na powierzchni rurek tracheostomijnych i jego struktury a także poszukiwaniu nowatorskich metod jego ograniczenia lub modyfikacji już istniejących biomateriałów ograniczających ryzyko jego tworzenia.

Podsumowując, badania nad epidemiologią molekularną wielolekoopornych izolatów *K. pneumoniae* są istotne, w związku z koniecznością organizacji nadzoru epidemiologicznego w środowisku szpitalnym. Monitorowanie dróg transmisji *K. pneumoniae* pozyskanych z różnych ośrodków było podyktowane potrzebą zbadania epidemiologii molekularnej przypadków nosicielstwa/kolonizacji i/lub zakażeń objawowych w sytuacji obserwowanego w naszym kraju wzrostu izolacji i rozprzestrzeniania się izolatów lekoopornych

## 6. WNIOSKI

1. Wśród przebadanych szczepów klinicznych *K. pneumoniae* wykryto izolaty wytwarzające  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L typów CTX-M-type, CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-15, SHV i TEM (82,5%) oraz karbapenemazy typu KPC-2, VIM-1 i OXA-48 (8,7%) co wskazuje, że identyfikacja fenotypów oporności na antybiotyki ma kluczowe znaczenie dla monitorowania ich w populacjach pacjentów hospitalizowanych oraz stanowi istotny element kontroli i profilaktyki zakażeń patogenami alarmowymi.

2. Określenie częstości występowania u badanych izolatów *K. pneumoniae* genów oporności w tym genów kodujących  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L (*bla*<sub>SHV-type</sub>, *bla*<sub>TEM-type</sub>), genów kodujących  $\beta$ -laktamazy typu CTX-M (*bla*<sub>CTX-M-type</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1 group</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9 group</sub>), genów kodujących karbapenemazy typu KPC (*bla*<sub>KPC</sub>), karbapenemazy typu MBL (*bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> i *bla*<sub>NDM-type</sub>) oraz karbapenemazy typu OXA-48 (*bla*<sub>OXA-48</sub>) dostarcza istotnych informacji o molekularnych uwarunkowaniach tych mechanizmów oraz przyczynia się do nadzoru i monitorowania obserwowanego zjawiska narastającej lekooporności.

3. Oznaczenie w badanej populacji izolatów *K. pneumoniae* typu sekwencyjnego ST147 charakteryzującego się wielolekoopornością i wysoką wirulencją potwierdza jego występowanie w Polsce oraz globalny zasięg.

4. Ocena pokrewieństwa badanych szczepów *K. pneumoniae* wytwarzających  $\beta$ -laktamazy ES $\beta$ L typu CTX-M, CTX-M-1, CTX-M-9, SHV i TEM oraz karbapenemazy typu KPC-2, VIM-1 i OXA-48 przeprowadzona techniką analizy restrykcyjnej chromosomalnego DNA połączoną z elektroforezą pulsową (REA-PFGE) wykazała występowanie lokalnych klonów, które utrzymywały się w populacji pacjentów oraz w środowisku szpitalnym w badanym okresie.

5. Wykazano duże zróżnicowanie genów kodujących wybrane czynniki wirulencji, wśród izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L, przy czym w najwyższym odsetku szczepów wykryto geny kodujące siderofory, w tym enterobaktynę (*entB*) - 91,4%, jersiniabaktynę (*ybtS*) - 55,4%, aerobaktynę (*iutA*) - 55,4% oraz otoczkowy serotyp K1 (*magA*) - 53,2%. Analiza współwystępowania genów kodujących czynniki wirulencji oraz genów oporności wykazała słabą korelację pomiędzy

współwystępowaniem badanych czynników, co wskazuje na odmienny mechanizm rozprzestrzeniania się tych genów w populacji *K. pneumoniae*.

7. W badaniach *in vitro* potwierdzono zdolność szczepów klinicznych *K. pneumoniae* izolowanych od pacjentów z tracheostomią do tworzenia struktur biofilmu co wskazuje na fakt, iż szczepy te mogą nieść ryzyko zakażeń w tej grupie pacjentów związanych z powstaniem biofilmu na użytkowanych rurkach tracheotomijnych.

## 7. PIŚMIENNICTWO

1. **Froböse NJ, Bjedov S, Schuler F i inni.** Gram Staining: a Comparison of Two Automated Systems and Manual Staining. *Journal of Clinical Microbiology* 2020;58(12):e01914-20.
2. **Grimont PAD, Grimont F.** “*Klebsiella*” in Bergey’s Manual of Systematics in Archaea and Bacteria. Editors Trujillo ME, Dedys P, DeVos B. i inni. (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.) 2015.
3. **Ma Y, Wu X, Li S i inni.** Proposal for reunification of the genus *Raoultella* with the genus *Klebsiella* and reclassification of *Raoultella electrica* as *Klebsiella electrica* comb. nov. *Research in Microbiology* 2021;172(6):103851.
4. **Szewczyk EM.** Diagnostyka bakteriologiczna. Warszawa, Państwowe Wydawnictwo Naukowe (PWN), 2019;wydanie 3:1-500.
5. **Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M i inni.** Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogen. *PLoS One* 2015;6:1-22.
6. **He Y, Guo X, Xiang S i inni.** Comparative analyses of phenotypic methods and 16S rRNA, *khe*, *rpoB* genes sequencing for identification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2016;109:1029-40.
7. **Kim D, Park S, Chun J.** Introducing EzAAI: a pipeline for high throughput calculations of prokaryotic average amino acid identity. *Journal of Microbiology* 2021;59(5):476-80.
8. **Adeolu M, Alnajar S, Naushad S i inni.** Genome based phylogeny and taxonomy of the “*Enterobacteriales*”: proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2016;66:5575-99.
9. **Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M i inni.** NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database* (Oxford) 2020:baaa062.
10. **Wyres KL, Holt KE.** *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 2018;45:131-9.
11. **Friedländer C.** Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie, und für klinische Medizin* 1882;87:319-24.
12. **Umpruss B, Raparia K.** Rhinoscleroma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2018;142:1533-6.

13. **Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A.** *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews* 2017;41:252-75.
14. **Sobiszewski P.** Bakterie w środowisku roślin - wrogowie i sprzymierzeńcy. *KOSMOS* 2021;70(4):685-96.
15. **Huang M, Pengfei HE, Shahzad M i inni.** Ecology and etiology of bacterial top rot in maize caused by *Klebsiella pneumoniae* KpC4. *Microbial Pathogenesis* 2020;139:103906.
16. **Khan R, Petersen FC, Shekhar S.** Commensal Bacteria: An Emerging Player in Defense Against Respiratory Pathogens. *Frontiers in Immunology* 2019;10(1203):1-9.
17. **Ali S, Manzar Alam M, Hasan GM i inni.** Potential therapeutic targets of *Klebsiella pneumoniae*: a multi-omics review perspective. *Briefings in Functional Genomics* 2022;21(2):63-77.
18. **Chang D, Sharma L, Charles S i inni.** Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Frontiers in Microbiology* 2021;12(750662):1-9.
19. **Carabarin-Lima A, León-Izurieta L, del Carmen Rocha-Gracia R i inni.** First evidence of polar flagella in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient with neonatal sepsis. *Journal of Medical Microbiology* 2016;65:729-37.
20. **Murray PP, Rosenthal KS, Pfaller MA.** Medical Microbiology, 8th Edition, *Elsevier Urban & Partner* 2022.
21. **Cheng F, Li Z, Lan S i inni.** Characterization of *Klebsiella pneumoniae* associated with cattle infections in southwest China using multi-locus sequence typing (MLST), antibiotic resistance and virulence associated gene profile analysis. *Brazilian Journal of Microbiology* 2018;S1517-8382(18):30184-9.
22. **Lam MMC, Wyres KL, Wick RR i inni.** Convergence of virulence and MDR in a single plasmid vector in MDR *Klebsiella pneumoniae* ST15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2019;74(5):1218-22.
23. **Clegg S, Murphy CN.** Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum* 2016;4(1):UTI-0005-2012:1-17.
24. **Mączyńska B, Neumann K, Junka A i inni.** Analysis of properties related to selection and survival in hospital environment of *Klebsiella* strains isolated from nosocomial outbreaks. *Forum Zakazeń* 2015;4(2):77-97.
25. **Eisenmenger EF, Guajardo E, Finch N i inni.** 'String Test' for Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*. *The American Journal of Medicine* 2021;134(10):e520-1.

26. **Master RN, Deane J, Opiela C i inni.** Recent trends in resistance to cell envelope–active antibacterial agents among key bacterial pathogens. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2013;1277:1-7.
27. **Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN i inni.** Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology* 2019;10(549):1-24.
28. **Váradi L, Luo JL, Hibbs DE i inni.** Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. *Chemical Society Reviews* 2017;46(16):4818-32.
29. **Zhu H, Xu Y, Laššáková S i inni.** PCR past, present and future. *BioTechniques* 2020;69(4):317-25.
30. **Iliyasu G, Daiyab FM, Tihamiyu AB i inni.** Nosocomial infections and resistance pattern of common bacterial isolates in an intensive care unit of a tertiary hospital in Nigeria: A 4-year review. *Journal of Critical Care* 2016;34:116-20.
31. **Hermansen LT, Loft AG, Christiansen AA i inni.** No diagnostic utility of antibody patterns against *Klebsiella pneumoniae* capsular serotypes in patients with axial spondyloarthritis vs. patients with non-specific low back pain: a cross-sectional study. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 2017;46(4):296-302.
32. **Walker KA, Miller VL.** The intersection of capsule gene expression, hypermucoviscosity and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Current Opinion in Microbiology* 2020;54:95-102.
33. **Chen H, Fang L, Chen W i inni.** Pyogenic liver abscess-caused *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in China in 2017: implication of hypervirulent carbapenem-resistant strains. *BMC Infectious Diseases* 2022;9;22(1):685.
34. **Dzierżanowska-Fangrat.** Przewodnik antybiotykoterapii 2023. *Wydawca Alfa Medica Press*:1-132.
35. **Chung PY.** The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: Carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters* 2016;363(20):1-6.
36. **Wang Y, Zhang Q, Jin Y i inni.** Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in China. *Brazilian Journal of Microbiology* 2019;50(3):669-75.
37. **Wyres KL, Lam MMC, Holt KE.** Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology* 2020;18:344-59.

38. **Lee CR, Lee JH, Park KS i inni.** Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in Microbiology* 2016;7(895):1-30.
39. **Meek RW, Vyas H, Piddock LJV.** Nonmedical Uses of Antibiotics: Time to Restrict Their Use? *PLoS Biology* 2015;13(10):e1002266.
40. **Dziewit Ł, Bartosik D.** Genomy prokariotyczne w świetle analiz genomicznych. *Postępy Mikrobiologii* 2011;50(2):87-96.
41. **Galani I, Karaikos I, Giamarellou H.** Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: mechanisms of resistance including updated data for novel  $\beta$ -lactam- $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2022;19(11):1457-68.
42. **Calbo E, Garau J.** The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ES $\beta$ L-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. *Future Microbiology* 2015;10(6):1063-75.
43. **Caltagirone M, Nucleo E, Spalla M i inni.** Occurrence of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases, KPC-Type, and MCR-1.2-Producing *Enterobacteriaceae* from Wells, River Water, and Wastewater Treatment Plants in Oltrepò Pavese Area, Northern Italy. *Frontiers in Microbiology* 2017;10(8):2232.
44. **Nordmann P, Poirel L.** The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* world. *Clinical Microbiology and Infections* 2014;20(9):821-30.
45. **Chong Y, Shimoda S, Shimono N.** *Infection, Genetics and Evolution* 2018;61:185-8.
46. **Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM i inni.** Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003;47(11):3554-60.
47. **Pitout JDD, Peirano G, Kock MM i inni.** The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clinical Microbiology Reviews* 2020;33(1):e00102-19.
48. **Livermore D. M.** Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1995;8:557-84.
49. **Butler DA, Rana AP, Krapp F i inni.** Optimizing aminoglycoside selection for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* with the aminoglycoside-modifying enzyme (AME) gene *aac(6')-Ib*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2021;76(3):671-9.
50. **Ishizaki Y, Shibuya Y, Hayashi Ch i inni.** Instability of the 16S rRNA methyltransferase-encoding *npmA* gene: why have bacterial cells possessing *npmA* not spread



despite their high and broad resistance to aminoglycosides? *The Journal of Antibiotics* 2018;71(9):798-807.

51. **Yang X, Sunb Q, Lib J i inni.** Molecular epidemiology of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in China. *Emerging Microbes & Infections* 2022;11:841-9.

52. **Rocker A, Lacey JA, Belousoff MJ i inni.** Global Trends in Proteome Remodeling of the Outer Membrane Modulate Antimicrobial Permeability in *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular Biology and Physiology* 2020;11(2):e00603-20.

53. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Assessing the health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU/EEA, 2016-2020. Stockholm: ECDC 2022.

54. **Ashurst JV, Dawson A.** Klebsiella Pneumonia. 2022 Feb 2. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 30085546.

55. **Osei M-M, Dayie NTKD, Azaglo GSK i inni.** Alarming Levels of Multidrug Resistance in Aerobic Gram-Negative Bacilli Isolated from the Nasopharynx of Healthy Under-Five Children in Accra, Ghana. *International Journal of Enviromental Research and Public Health* 2022;19(10927):1-9.

56. **Lepuschitz S, Hauser K, Schriebl A i inni.** Fecal *Klebsiella pneumoniae* Carriage Is Intermittent and of High Clonal Diversity. *Frontiers in Microbiology* 2020;11(581081):1-17.

57. **Martin RM, Cao J, Brisse S i inni.** Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *American Society for Microbiology* 2016;1(5):e00261-16.

58. **Simar SR, Hansona BM, Arias CA.** Techniques in bacterial strain typing: past, present, and future. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2021;34(4):339-45.

59. **Lee CR, Lee JH, Park KS i inni.** Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2017;21(483):1-13.

60. **Protonotariou E, Poulou A, Politi L i inni.** Hospital outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* ST147 clonal strain coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases in a tertiary teaching hospital in Northern Greece. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2018;52(3):331-7.

61. **Yu J, Wan Y, Chen Z i inni.** Outbreak of nosocomial NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST1419 in a neonatal unit. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2017;8:135-9.

62. **Guo L, An J, Ma Y i inni.** Nosocomial outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: clonal transmission of ST147 and ST383. *PLoS One* 2016;11(8):e0160754.
63. **Han H, Zhou H, Li H i inni.** Optimization of Pulse-Field Gel Electrophoresis for Subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2013;10:2720-31.
64. **Compain F, Babosan A, Brisse S i inni.** Genel Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology* 2014;52(12):4377-80.
65. **Cader SHA, Shah FA, Nair SKGR.** Tracheostomy colonisation and microbiological isolates of patients in intensive care units- a retrospective study. *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery* 2020;6(1):49-52.
66. **Choi M, Hegerle N, Nkeze J i inni.** The Diversity of Lipopolysaccharide (O) and Capsular Polysaccharide (K) Antigens of Invasive *Klebsiella pneumoniae* in a Multi-Country Collection. *Frontiers in Microbiology* 2020;11(1249):1-12.
67. **Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z i inni.** Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence* 2013;4(2):129-38.
68. **Hennequin C, Robin F.** Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infections Diseases* 2016;35:333-41.
69. **Chan Ch-H, Chen F-J, Huang Y-J i inni.** Identification of Protein Domains on Major Pilin MrkA That Affects the Mechanical Properties of *Klebsiella pneumoniae* Type 3 Fimbriae. *Langmuir* 2012;28(19):7428-35.
70. **Farzand R, Rajakumar K, Barer MR i inni.** A Virulence Associated Siderophore Importer Reduces Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology* 2021;12(Article 607512):1-9.
71. **Chhabra R, Saha A, Chamani A i inni.** Iron Pathways and Iron Chelation Approaches in Viral, Microbial, and Fungal Infections. *Pharmaceuticals* 2020;13(275):1-23.
72. **Holden VI, Bachman MA.** Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics* 2015;7(6):986-95.
73. **O’Ryan ML, Nataro JP, Cleary TG.** Microorganisms responsible for neonatal diarrhea. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn* 2011:359-418.

74. **Szramka B, Kurlenda J, Podhajska AJ.** Thiol-activated hemolysins as virulence markers of bacteria. *Biotechnologia* 2001;3(54):152-68.
75. **Dsouza R, Spillman Jr DR, Barkalifa R i inni.** In vivo detection of endotracheal tube biofilms in intubated critical care patients using catheter-based optical coherence tomography. *Journal of Biophotonics* 2019;12(5):e201800307.
76. **De La Cruz M, Islam S, Cloyes R.** Novel modification of tracheostomy tube to allow speech and manage tracheal stenosis. *BMJ Case Reports* 2013;bcr2013200622:1-5.
77. **Thorarinsdottir HR, Kander T, Holmberg A i inni.** Biofilm formation on three different endotracheal tubes: A prospective clinical trial. *Critical Care* 2020;24:382.
78. **Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouvelekis LS i inni.** *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2017;36(10):1002-5.
79. **Souza Guerra ME, Destro G, Vieira B.** *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2022;12(877995):1-13.
80. **Garcia AB, Percival SL.** Zoonotic infections: The role of biofilm. *Biofilms and Veterinary Medicine* 2011;6:69-110.
81. **Czyżewska-Dors E, Dors A, Pomorska-Mól M.** Properties of bacterial biofilm conditioning resistance to antimicrobial agents and methods of biofilm elimination. *Życie Weterynaryjne* 2018;93(11):765-71.
82. **She P, Liu Y, Xu L i inni.** SPR741, Double- or Triple-Combined With Erythromycin and Clarithromycin, Combats Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, Its Biofilms, and Persister Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2022;12:858606.
83. **Zheng J, Lin ZW, Chen C i inni.** Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of *wcaG*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2018;8:1-9.
84. **Mishra SK, Basukala P, Basukala O i inni.** Detection of Biofilm Production and Antibiotic Resistance Pattern in Clinical Isolates from Indwelling Medical Devices. *Current Microbiology* 2014;70(1):128-34.
85. **EUCAST.** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 9.0. Valid from 2019-01-01. Available online: <http://www.eucast.org> (accessed on 1 January 2019).

86. **EUCAST.** EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0, Valid from 2017-07-11. [http://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms/](http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/).
87. **Ochońska D, Olechowska-Jarząb A, Dobrut A i inni.** Studies on molecular epidemiology of ES $\beta$ L-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients hospitalized in a specialist hospital in southern Poland. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* 2021;75:970-9.
88. **Ochońska D, Klamińska-Cebula H, Dobrut A i inni.** Clonal Dissemination of KPC-2, VIM-1, OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Katowice, Poland. *Polish Journal of Microbiology* 2021;70(1):107-16.
89. **Ochońska D, Ścibik Ł, Brzywczy-Włoch M.** Biofilm Formation of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity. *Pathogens* 2021;10:1345.
90. **Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ i inni.** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology* 1985;22(6):996-1006.
91. **Stepanović S, Vuković D, Hola V i inni.** Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica (Apmis)* 2007;115(8):891-9.
92. **Jarrett WA, Ribes J, Manaligod JM.** Biofilm formation on tracheostomy tubes. *Ear, Nose & Throat Journal* 2002;81:659-61.
93. **Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB i inni.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 2012;18(3):268-81.
94. **Cho S, Jackson ChR, Frye JG.** Freshwater environment as a reservoir of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Applied Microbiology* 2023;134:1-22.
95. **da Silva Y, Ferrari R, Marin, VA, Junior CA.** A Global Overview of  $\beta$ -lactam Resistance Genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Open Forum Infectious Diseases* 2019;11:22-34.
96. **Castanheira M, Deshpande LM, Mendes RE i inni.** Variations in the occurrence of resistance phenotypes and carbapenemase genes among *Enterobacteriaceae* isolates in 20 years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Open Forum Infectious Diseases* 2019;6:S23-3.

97. **Grundmann H, Glasner C, Albiger B i inni.** Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infectious Diseases* 2017;17(2):153-63.
98. **ECDC.** Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ang. *European Centre for Disease Prevention and Control*), <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>.
99. **van Duin D, Doi Y.** The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence* 2017;8(4):460-9.
100. **EARS-Net.** Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ang. *European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC*) 2022. W trakcie publikacji 2022. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. *Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*.
101. **Bukavaz S, Budak M, Celik AD.** bla KPC-2 and bla OXA-48 producing *Klebsiella pneumoniae* found in a Turkish hospital in the Balkans. *African Journal of Microbiology Research* 2018;12(16):370-9.
102. **Ny S, Kozlov R, Dumpis U i inni.** Large variation in ESβL-producing *Escherichia coli* carriers in six European countries including Russia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2018;37:2347-54.
103. **NPOA.** Narodowy program ochrony antybiotyków na lata 2016-2020, <https://www.gov.pl/>, [www.antybiotyki.edu.pl](http://www.antybiotyki.edu.pl).
104. **Sarowska J, Choroszy-Król I, Jama-Kmiecik A i inni.** Occurrence and Characteristics of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Hospitalized Patients in Poland - A Single Centre Study. *Pathogens* 2022;11(859):1-18.
105. **Sun Q-I, Gu D, Wang Q i inni.** Dynamic Colonization of *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Gastrointestinal Tract of Intensive Care Patients. *Frontiers in Microbiology* 2019;10(230):1-9.
106. **Falcone M, Tiseo G, Galfo V i inni; Italian Group of Antimicrobial Stewardship (the GISA study group).** Bloodstream infections in patients with rectal colonization by *Klebsiella pneumoniae* producing different type of carbapenemases: a prospective, cohort study (CHIMERA study). *Clinical Microbiology and Infections* 2022;28(2):298.e1-7.
107. **Ranjbar R, Kelishadrokh AF, Chehelgerdi M.** Molecular characterization, serotypes and phenotypic and genotypic evaluation of antibiotic resistance of the *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different types of hospital-acquired infections. *Infection and Drug Resistance* 2019;12:603-11.

108. **Baraniak A, Izdebski R, Żabicka D i inni.** Multiregional dissemination of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258/ST512 genotypes in Poland, 2010-14. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2017;72(6):1610-16.
109. **Zacharczuk K, Piekarska K, Szych J i inni.** Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase *ArmA* in Poland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55(1):443-6.
110. **Protonotariou E, Poulou A, Politi L i inni.** Hospital outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* ST147 clonal strain co-producing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases in a tertiary teaching hospital in Northern Greece. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2018 Sep; 52(3):331-7.
111. **Bush K, Jacoby GA.** Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010;54(3):969-76.
112. **Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D i inni.** VIM/IMP carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Poland: epidemic *Enterobacter hormaechei* and *Klebsiella oxytoca* lineages. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy* 2018;73(10):2675-81.
113. **Matsumura Y, Peirano G, Devinney R i inni.** Genomic epidemiology of global VIM-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2017;72(8):2249-58.
114. **Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D i inni.** *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in Poland, 2013-January 2017. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy* 2018;73(3):620-5.
115. **Shaker OA, Gomaa HE, ElMasry SA i inni.** Evaluation of Combined Use of Temocillin Disk and Mastdisks Inhibitor Combination Set Against Polymerase Chain Reaction for Detection of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 2018;6(2):242-7.
116. **Hosseinzadeh Z, Sedigh Ebrahim-Saraie H, Sarvari J i inni.** Emerge of *bla*<sub>NDM-1</sub> and *bla*<sub>OXA-48-like</sub> harboring carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized patients in southwestern Iran. *Journal of the Chinese Medical Association* 2018;81:536e540.
117. **Pfaller MA, Huband MD, Streit JM i inni.** Surveillance of tigecycline activity tested against clinical isolates from a global (North America, Europe, Latin America, and Asia-Pacific). *International Journal of Antimicrobial Agents* 2018;51(6):848-53.
118. **Xercavins M, Jiménez E, Padilla E i inni.** High clonal diversity of ES $\beta$ L-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples in a non-outbreak situation. A cohort study. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 2020;9(5):1-9.

119. **Alcántal-Curiel MD, Ledezma-Escalante CA, Jarillo-Quijada MD i inni.** Association of Antibiotic Resistance, Cell Adherence, and Biofilm Production with the Endemicity of Nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. *BioMed Research International* 2018;(7012958):1-9.
120. **Cruz-Córdova, A, Esteban-Kenel V, Espinosa-Mazariego K i inni.** Hospital Infantil de México Pathogenic determinants of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* 2014;71(1):15-24.
121. **Mrowiec P, Klesiewicz K, Malek M i inni.** Antimicrobial susceptibility and prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from pediatric and adult patients of two Polish hospitals. *New Microbiologica* 2019;42(4):197-204.
122. **de Walthoffen SW, Mlynarczyk A, Sawicka-Grzelak A i inni.** Strains of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamases, isolated from organ recipients. *Transplantation Proceedings* 2011;43:3128-9.
123. **Rodrigues C, Machado E, Ramos H i inni.** Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK). *International Journal of Medical Microbiology* 2014;304(8):1100-8.
124. **Liu Ch, Du P, Yang P i inni.** Fusion plasmid enhanced the endemic extensively drug resistant *Klebsiella pneumoniae* clone ST147 harbored *bla*<sub>OXA-48</sub> to acquire the hypervirulence and cause fatal infection. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2023;22(1):11.
125. **Ferreira RL, Da Silva BCM, Rezende GS i inni.** High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and  $\beta$ -lactamase encoding genes in a brazilian intensive care unit. *Frontiers in Microbiology* 2019;9(3198):1-15.
126. **Davoudabadi S, Goudarzi H, Goudarzi M i inni.** Detection of extensively drug-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST15, ST147, ST377 and ST442 in Iran. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2022;69:77-86.
127. **Zautner AE, Bunk B, Pfeifer Y i inni.** Monitoring microevolution of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in a hospital setting by SMRT sequencing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2017;72(10):2737-44.
128. **Lee J, Oh CE, Choi EH i inni.** The impact of the increased use of piperacillin/tazobactam on the selection of antibiotic resistance among invasive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *International Journal of Infectious Diseases* 2013;17:e638-e643.□

129. **Morris D, O'Connor M, Izdebski R i inni.** Dissemination of clonally related multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Ireland. *Epidemiology & Infection* 2016;144:443-8.
130. **Lascols C, Peirano G, Hackel M i inni.** Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: First report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013;57:130-6.
131. **Sękowska A, Kamińska D, Nakonowska B i inni.** Nosocomial outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* at a neurosurgery unit. *Polish Journal of Microbiology* 2012;61(4):311-3.
132. **Ojdana D, Sacha P, Wieczorek P i inni.** The occurrence of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, and *bla*<sub>TEM</sub> genes in extended spectrum  $\beta$ -lactamase-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland. *International Journal of Antibiotics* 2014;2014:935842.
133. **Brisse S, Passet V, Grimont PAD.** Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2014;64(9):3146-52.
134. **Percival SL, Suleman L, Vuotto C i inni.** Healthcare-Associated infections, medical devices and biofilms: Risk, 434 tolerance and control. *Journal of Medical Microbiology* 2015;64:323-34.
135. **Weissbrod PA, Merati AL.** Is percutaneous dilational tracheotomy equivalent to traditional open surgical tracheotomy with regard to perioperative and postoperative complications? *Laryngoscope* 2012;122:1423-4.
136. **Rouzé A, Jaillette E, Poissy J i inni.** Tracheal tube design and ventilator-associated pneumonia. *Respiratory Care* 2017;62:1316-23.
137. **Russo TA, MacDonald U, Hassan S i inni.** An Assessment of Siderophore Production, Mucoviscosity, and Mouse Infection Models for Defining the Virulence Spectrum of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere* 2021;6(2):e00045-21.
138. **Seifi K, Kazemian H, Heidari H i inni.** Evaluation of biofilm formation among *Klebsiella pneumoniae* isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2016;9(1):2-7.



139. **Hassan A, Usman J, Kaleem F i inni.** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2011;15(4):305-11.
140. **Björling G, Axelsson S, Johansson UB i inni.** Clinical use and material wear of polymeric tracheostomy tubes. *Laryngoscope* 2007;117(9):1552-7.

### **8.1 Publikacja nr 1**

**Dorota Ochońska, Hanna Klamińska-Cebula, Anna Dobrut, Małgorzata Bulanda, Monika Brzychczy-Włoch. Clonal Dissemination of KPC-2, VIM-1, OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Katowice, Poland. *Polish Journal of Microbiology* 2021,70(1):107-116. PMID: 33815532. DOI:10.33073/pjm-2021-010. Punktacja MNiSW:40, IF:1,280**

## Clonal Dissemination of KPC-2, VIM-1, OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Katowice, Poland

DOROTA OCHOŃSKA<sup>1</sup>, HANNA KLAMIŃSKA-CEBULA<sup>2</sup>, ANNA DOBRUT<sup>1</sup>, MAŁGORZATA BULANDA<sup>1</sup>  
and MONIKA BRZYCHCZY-WŁOCH<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Department of Molecular Medical Microbiology, Chair of Microbiology, Faculty of Medicine,  
Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

<sup>2</sup>Department of Bacteriology, Leszek Giec Upper-Silesian Medical Centre of the Silesian  
Medical University in Katowice, Katowice, Poland

Submitted 27 October 2020, revised 4 February 2021, accepted 8 February 2021

### Abstract

Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) is an important bacterium of nosocomial infections. In this study, CRKP strains, which were mainly isolated from fecal samples of 14 patients in three wards of the hospital in the Silesia Voivodship, rapidly increased from February to August 2018. Therefore, we conducted microbiological and molecular studies of the CRKP isolates analyzed. Colonized patients had critical underlying diseases and comorbidities; one developed bloodstream infection, and five died (33.3%). Antibiotic susceptibilities were determined by the E-test method. A disc synergy test confirmed carbapenemase production. CTX-Mplex PCR evaluated the presence of resistance genes *bla*<sub>CTX-M-type</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, and the genes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, and *bla*<sub>VIM-1</sub> was detected with the PCR method. Clonality was evaluated by Multi Locus Sequence Typing (MLST) and Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Six (40%) strains were of XDR (Extensively Drug-Resistant) phenotype, and nine (60%) of the isolates exhibited MDR (Multidrug-Resistant) phenotype. The range of carbapenem minimal inhibitory concentrations (MICs, µg/mL) was as follows doripenem (16 to >32), ertapenem (>32), imipenem (4 to >32), and meropenem (>32). PCR and sequencing confirmed the *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, and *bla*<sub>VIM-1</sub> genes in all strains. The isolates formed one large PFGE cluster (clone A). MLST assigned them to the emerging high-risk clone of ST147 (CC147) pandemic lineage harboring the *bla*<sub>OXA-48</sub> gene. This study showed that the *K. pneumoniae* isolates detected in the multi-profile medical centre in Katowice represented a single strain of the microorganism spreading in the hospital environment.

**Key words:** clonal dissemination, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, hospital, PFGE, MLST

### Introduction

*Klebsiella pneumoniae* is a critical multidrug-resistant (MDR) bacterium in humans responsible for numerous hospital infections linked to high morbidity and mortality since treatment options are limited (Navon-Venezia et al. 2017). *K. pneumoniae* from the family *Enterobacteriaceae*, occurs in the human and animal gastrointestinal tract microbiome. It is a commonly found opportunistic pathogen associated with the hospital environment and, overall, accountable for approximately a third of all Gram-negative infections. It has a role in extraintestinal infections, such as urinary tract infections, pneumonia, surgical site infections, cystitis, and life-threatening infections, including endo-

carditis and septicemia. It is also a significant cause of severe community-onset infections, such as necrotizing pneumonia, endogenous endophthalmitis, and pyogenic liver abscesses (Podschun and Ullmann 1998).

With the ever-growing antibiotic resistance, *K. pneumoniae* is a pathogen recognized for its antibiotic resistance; hence, it is categorized as an ESKAPE organism, besides other essential MDR pathogens (Boucher et al. 2009). The accumulation of ARGs by *K. pneumoniae*, by de novo mutations, is continuous under antibiotic selective pressure, and through the acquisition of plasmids and transferable genetic elements, it stimulates extensively drug-resistant (XDR) strains harboring a 'super resistome'. In the past twenty years, many high-risk (HiR) MDR and XDR *K. pneumoniae* sequence

\* Corresponding author: M. Brzychczy-Włoch, Department of Molecular Medical Microbiology, Chair of Microbiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland; e-mail: [mbrzych@cm-uj.krakow.pl](mailto:mbrzych@cm-uj.krakow.pl)

© 2021 Dorota Ochońska et al.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

types have appeared that exhibit great capacity of causing multicontinental outbreaks and continued global dissemination (Navon-Venezia et al. 2017).

Currently, the spread of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CRKP) has become a severe problem in the molecular epidemiology of hospital infections.

Frequently, carbapenems serve as the last resort in the effective treatment of serious infections caused by multidrug-resistant bacteria. Enzymes that hydrolyze carbapenems, called carbapenemases, are the major cause of carbapenem resistance (Matsumura et al. 2017). The molecular classes A, B, and D carbapenemases are rapidly disseminated worldwide, challenging the treatment of Gram-negative infections (Nordmann and Poirel 2014). Recent reports have demonstrated that various carbapenem-hydrolyzing enzymes are disseminated worldwide in CRKP isolates. The fast evolution of carbapenem resistance quickly evolved in *Enterobacteriaceae* in the past decade and became a developing global threat. The majority of studies on antibiotic-resistant *K. pneumoniae* focus on characterizing carbapenemase producers (KPC, NDM, VIM, and OXA-48), various clonal groups or complexes (e.g., CG15, CG17, CG258, or CC147), and epidemic plasmids (IncA/C, IncFII, IncL/M, and IncN) that have been suggested to participate in their global expansion (Nordmann and Poirel 2014). Carbapenemase co-producers have been reported in distinct geographic locations: European countries (France, Germany, Greece, Italy, and Poland), Israel, the United States, China, and West Asia (Turkey) (Baraniak et al. 2011; Nordmann and Poirel 2014; Baraniak et al. 2015; Guo et al. 2016; Lee et al. 2016; Zautner et al. 2017; Bukavaz et al. 2018).

The majority of KPC-producing microorganisms also express  $\beta$ -lactamases and possess genes conferring resistance to other antimicrobials, i.e. aminoglycosides, fluoroquinolones, or co-trimoxazole (Nordmann and Poirel 2014). The resistance rates vary significantly across countries; MDR *K. pneumoniae* is endemic in Mediterranean countries, and Eastern and South-Western Europe. It stems from ES $\beta$ L production in more than 50–60% strains, and non-susceptibility to third-generation cephalosporins, fluoroquinolones, and aminoglycosides (Navon-Venezia et al. 2017).

In 2011, the National Reference Center for Susceptibility Testing (NRCTS) and the KPC-PL Study Group published the first report from Poland that presented the molecular characteristics of *K. pneumoniae* producing KPC carbapenemases (Baraniak et al. 2011). Between 2011 and 2015, the bacteria caused 1,067 infection outbreaks; among them, 123 were caused by *K. pneumoniae*, and a higher number of outbreaks were reported from Masovian and Silesian voivodships (Baraniak et al. 2011). Poland belongs to the countries of the highest rate of *K. pneumoniae*

isolates' resistance to all groups of drugs subjected to monitoring, and these rates are twice as high as elsewhere in the European Union (EU)/European Economic Area (EEA). In these countries, resistant *K. pneumoniae* isolates consist on average 20.5% of all MDR multidrug-resistant strains (Bukavaz et al. 2018).

Given the abovementioned data and the increased frequency of isolation of CRKP strains from the hospital environment, we conducted a microbiological and molecular characterization of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates with emphasis on the antibiotic resistance profile, identification of ES $\beta$ L genes, detection of carbapenemase genes, and the isolates' genetic relationship.

## Experimental

### Materials and Methods

**Hospital settings and sample collection.** The study was performed in the Upper-Silesian Medical Centre of the Silesian Medical University in Katowice (GCM), one of the largest multi-profile medical centres, and one of the largest hospitals in Poland. The hospital consists of 24 departments and treats over 160 thousand patients per year. Between February and August 2018, 15 non-duplicate CPKP isolates were collected from fecal samples of 14 patients admitted to three hospital wards characterized below. The Department of Neurology with the Stroke Sub-department (NR) receives 1,750 admissions per year and has 14 rooms with 44 beds; the Department of Internal Medicine and Rheumatology (REU) receives 1,935 admissions per year and has 12 rooms with 37 beds, and the Department of Anaesthesia and Intensive Care (OAiT) receives 1,750 admissions per year and has five rooms with ten beds (Table I). A total of 505 *Enterobacteriaceae* isolates were obtained from the patients in these wards over one-year.

**Bacterial identification, antimicrobial susceptibility testing and phenotypic screening.** Bacterial identification and preliminary susceptibility testing were performed using the automated VITEK® 2 Compact System (bioMérieux, France). The MICs of the 23 antimicrobial agents were evaluated with E-test strips (AB BIODISK, bioMérieux, France). MIC value results were interpreted according to the EUCAST breakpoints (EUCAST 2019). All isolates were screened phenotypically for the presence of KPC-, OXA-48-, and metallo- $\beta$ -lactamases (MBL). Double-disc synergy tests (DDST) were carried out to confirm ES $\beta$ L production (CLSI 2018) and to detect MBL production, as published previously (Matsumura et al. 2017). The phenotypic detection of KPC-producing isolates was assessed

Table I  
Demographic data and characteristics of the fourteen patients with *K. pneumoniae* co-producing KPC-2, OXA-48, VIM-1 and CTX-M-15 during the outbreak

| Patient ID/<br>Isolate no. | Age (years) /sex | Hospital ward(s) | Date of isolation        | Type of specimen     | Status (type) of colonization/ infection | Duration of hospitalization (days) | Underlying conditions                                                                                                         | Antimicrobial used prior to isolation of carbapenemase producer(s) | Antimicrobial used as treatment for infections | Outcome Alive/Dead |
|----------------------------|------------------|------------------|--------------------------|----------------------|------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------|
| 3                          | 74/M             | OAIT             | 08/03/2018               | Rectal swab          | Colonization                             | 03/01–14/04/2018 (102 days)        | Abdominal Aortic Aneurysm (AAA)                                                                                               | Ciprofloxacin + Gentamycin + Itraconazole                          | Metronidazole                                  | Dead               |
| 6965                       | 60/F             | OAIT             | 28/02/2018               | Rectal swab          | Colonization                             | 08/02–01/04/2018 (53 days)         | Tuberculosis, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)                                                                    | Colistin + Voriconazole                                            | –                                              | Dead               |
| 6976/1<br>6976/2           | 45/M             | OAIT             | 01/03/2018<br>12/03/2018 | Rectal swab<br>Blood | Colonization<br>Bacteremia               | 21/02–29/03/2018 (37 days)         | Guillain–Barré Syndrome (GBS)                                                                                                 | Colistin + Linezolid                                               | Ampicillin/sulbactam + Amikacin                | Alive              |
| 1                          | 67/F             | OAIT             | 07/03/2018               | Rectal swab          | Colonization                             | 02/03–29/06/2018 (112 days)        | COPD, diabetes, hypertension                                                                                                  | Ceftriaxone + Levofloxacin                                         | –                                              | Dead               |
| 6968 (index case)          | 63/M             | NR               | 28/02/2018               | Rectal swab          | Colonization                             | 16/02–31/03/2018 (44 days)         | Hypertension, atherosclerosis                                                                                                 | Ceftriaxone + Metronidazole                                        | –                                              | Alive              |
| 2                          | 69/M             | NR               | 07/03/2018               | Rectal swab          | Colonization                             | 23/02–28/03/2018 (34 days)         | Post-stroke conditions                                                                                                        | –                                                                  | –                                              | Alive              |
| 4                          | 43/M             | NR               | 08/03/2018               | Rectal swab          | Colonization                             | 26/02–12/03/2018 (15 days)         | Hypertension                                                                                                                  | Ceftriaxone + Metronidazole                                        | –                                              | Dead               |
| 154/25428                  | 61/M             | NR               | 30/07/2018               | Rectal swab          | Colonization                             | 04/07–06/08/2018 (34 days)         | Stroke                                                                                                                        | –                                                                  | –                                              | Dead               |
| 7/25804                    | 70/M             | NR               | 04/08/2018               | Rectal swab          | Colonization                             | 25/07–02/08/2018 (9 days)          | Stroke                                                                                                                        | Amoxicillin/ clavulanic acid                                       | –                                              | Alive              |
| 11/25808                   | 50/F             | NR               | 04/08/2018               | Rectal swab          | Colonization                             | 23/07–03/08/2018 (12 days)         | Stroke                                                                                                                        | –                                                                  | –                                              | Alive              |
| 13/25810                   | 77/M             | NR               | 04/08/2018               | Rectal swab          | Colonization                             | 22/07–09/08/2018 (19 days)         | Hypertension, ischemic heart disease                                                                                          | Amoxicillin/ clavulanic acid                                       | –                                              | Alive              |
| 6                          | 70/F             | REU              | 09/03/2018               | Rectal swab          | Colonization                             | 26/02–14/03/2018 (17 days)         | Diabetes, metastatic lung cancer                                                                                              | –                                                                  | –                                              | Alive              |
| 7                          | 78/F             | REU              | 09/03/2018               | Rectal swab          | Colonization                             | 27/02–16/03/2018(18 days)          | Rheumatoid Arthritis (RA), hemorrhagic diathesis, coronary disease, peptic ulcer disease, hypertension, atherosclerosis, gout | Imipenem                                                           | Vancomycin                                     | Alive              |
| 5                          | 90/F             | REU              | 08/03/2018               | Rectal swab          | Colonization                             | 03.03–17.03.2018 (14 days)         | Atherosclerosis, acute arterial thrombosis of the lower extremity                                                             | Meropenem + Amikacin                                               | –                                              | Alive              |

F – Female; M – male; NR – Department of Neurology with the Stroke Subdepartment; OAIT – Department of Anaesthesiology and Intensive Care; REU – Department of Internal Medicine and Rheumatology

by an available protocol (Doi et al. 2008). According to the protocol, the boronic acid combined-disk tests using meropenem (10 µg) as the antibiotic substrate and 3-aminophenylboronic acid (3-APBA) (300 g, Sigma-Aldrich) as the inhibitor of KPC production was used. The detection of OXA-48 was performed in line with the EUCAST guidelines (Shaker et al. 2018). MDR and XDR were defined according to a standardized international document (Magiorakos et al. 2012).

**Extended-spectrum β-lactamase genes (ESβLs) identification.** Polymerase chain reaction (PCR), as described by Caltagirone et al. (2017) was used to determine *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub>. CTX-Mplex PCR was used to detect *bla*<sub>CTX-M-type</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (Xu et al. 2005).

**Carbapenemase genes detection.** The existence of carbapenemase encoding genes (*bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> and *bla*<sub>VIM-1</sub>) was confirmed using the PCR method (Bukavaz et al. 2018).

**PFGE.** The genetic relatedness of isolates was investigated using the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) method, following genomic DNA extraction and digestion with *Xba*I endonuclease (Fermentas, Lithuania), as described previously (Han et al. 2013). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup strain H9812 (ATCC® BAA664™) and *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705™ were used as reference markers. PFGE banding patterns were compared using BioNumerics v.6.5 (Applied Maths, Belgium) software. The relatedness was determined by the unweighted pair group method using the average linkages (UPGMA), and the similarity of bands was calculated using the Dice coefficient.

**MLST.** Multilocus Sequence Typing (MLST) was conducted with the use of seven conserved housekeeping genes (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, and *tonB*) (Guo

et al. 2016). A complete protocol of the MLST procedure, including the allelic profile and sequence type (ST) assignment techniques, is available in MLST databases.

Results

**Patients’ characteristics.** Patients’ characteristics is presented in Table I. During seven months, the 15 *K. pneumoniae* isolates were collected from fourteen patients aged 65.5 years on average. The average duration of hospitalization was 37 days. All patients were found to be colonized by similar CRKP isolates. One patient developed a bloodstream infection (only blood isolate available) and was successfully treated with linezolid and colistin. Two of the improved patients were treated with carbapenem. Five patients died; their deaths were not associated with any particular etiology, though. CRKP strains were isolated at various stages of patients’ hospital stay. An average time from patient admission to the microorganism isolation was 16 days; in patient no. 3 the corresponding period was 64 days, while in patients nos. 1 and 5 – the period was only five days. None of the patients had traveled abroad shortly before their hospital admissions, so any travel experience could explain the colonization.

**Epidemiologic investigation.** The studied *K. pneumoniae* isolates’ epidemic curve exhibited a bimodal distribution of cases with two peaks separated by 148 days (Fig. 1). It could indicate double discrete periods (February-March 2018 and July-August 2018) with unobserved cases in January, April, May, and June. The NR ward was involved in these distinct periods. Following the index case, four new cases were registered in the OAIT, six cases in the NR, and three in the REU (Table I).

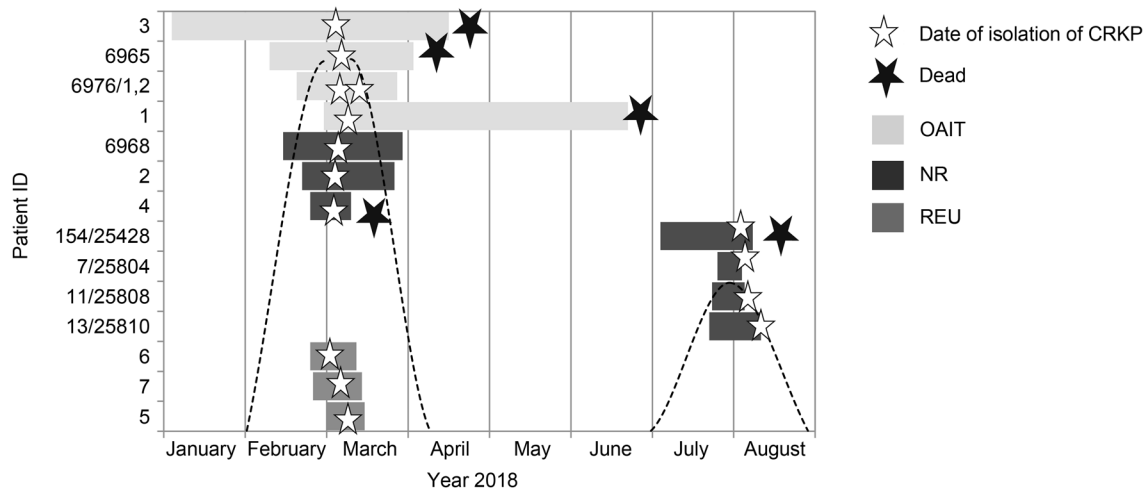


Fig. 1. Gantt diagram depicting a timeline of patients’ admissions in relationship with the three wards and the length of stay in each ward. Epidemic curve based on the number of *K. pneumoniae* isolated in the time frame of the study. Abbreviations: OAIT-Department of Anaesthesia and Intensive Care, NR-Department of Neurology with the Stroke Subdepartment, REU-Department of Internal Medicine and Rheumatology.



**Antimicrobial resistance.** The antimicrobial resistance profiles for the isolates are listed in Table II. We have classified nine (60%) strains as MDR and six (40%) as XDR. All isolates showed resistance to penicillins, cephalosporins, carbapenems (doripenem, ertapenem, meropenem), quinolone (ciprofloxacin), aminoglycosides (amikacin, gentamycin, netilmycin, tobramycin), and other antibiotics (aztreonam, trimethoprim/sulfamethoxazole, fosfomycin). Eleven isolates (73.3%) were sensitive to amikacin, two isolates (13.3%) were in the intermediate range with the MIC values equal to 12 µg/ml, and two isolates (13.3%) were resistant. Moreover, seven strains (42.8%) were resistant to tigecycline, five (35.7%) were in the intermediate range with the MIC values above 2 µg/ml. Interestingly, two isolates (13.3%) showed susceptibility to imipenem, and the resistance of one isolate (6.7%) to imipenem was within the intermediate range.

**Phenotypic screening of carbapenemases and associated β-lactamases.** In all *K. pneumoniae* isolates (n = 15, 100%), the ESβL mechanism was not found in phenotypic tests. Also, MBL production was not phenotypically detected in these isolates. However, all strains were positive for *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) production by the modified Hodge test (n = 15, 100%). In addition, phenotyping detection of carbapenem-resistant class D using the carbapenemase detection set with temocillin disc (30 µg) revealed that all isolates were positive for OXA-48 (n = 15, 100%).

**β-lactamase genes detection.** PCR amplification and sequencing analysis confirmed the presence of

*bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> in all 15 of the *K. pneumoniae* isolates. In addition, the only identified *bla*<sub>CTX-M</sub> variant in all 15 strains was *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. The results are presented in Fig. 2. No isolate was found to be positive for *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and *bla*<sub>IMP</sub>.

**Molecular epidemiology.** Out of fifteen isolates concerned, all belonged to a single PFGE cluster (clone A) (Fig. 2).

Moreover, an MLST analysis allowed us to classify all isolates as the sequence type ST147 (allelic profile: 3-4-6-1-7-4-38) belonging to the CC147 clonal complex. It confirmed clonal relationships between the isolates.

Discussion

The presented work stems from the problem of clonal dissemination of KPC-2, VIM-1, and OXA-48-producing *K. pneumoniae* ST147 noticed in one hospital in Katowice, the Silesian Voivodeship, Poland.

*K. pneumoniae* belongs to Gram-negative bacteria of the family *Enterobacteriaceae*. The pathogens can easily cause hazardous epidemic outbreaks and spread globally in the form of clones with increased virulence and epidemicity. These features are associated with the widespread presence of *Enterobacteriaceae* in humans (gastrointestinal carriage) and their great importance as frequent infection etiologic agent in facilities that carry out inpatient and outpatient treatment (Navon-Venezia et al. 2017). Studies that focus on *K. pneumoniae* are therefore desired, as they provide vital scientific

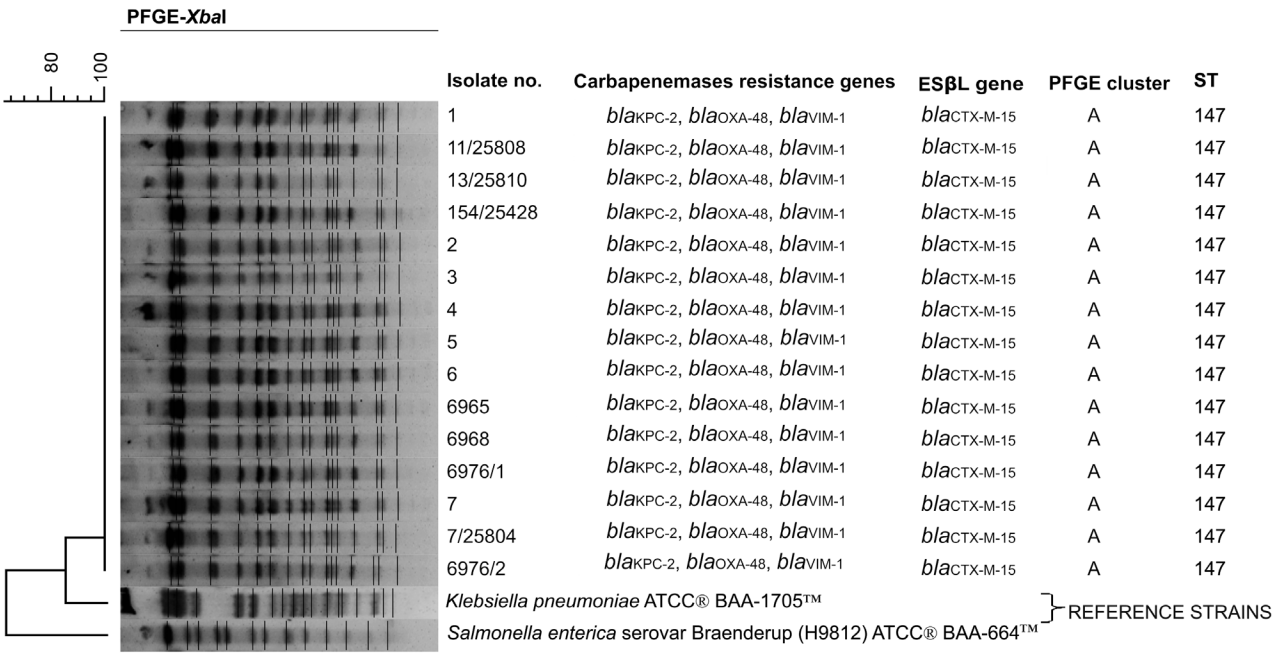


Fig. 2. Dendrogram of *Xba*I-digested genomic DNA from carbapenemase-co-producing *K. pneumoniae* isolates, additionally presenting the results of PCRs for genes encoding carbapenemases and other β-lactamase. PFGE settings: similarity coefficient, Dice; optimization, 1%; tolerance, 1%; clustering method, UPGMA.

Table II  
Antimicrobial resistance profiles of the studied *K. pneumoniae* isolates.

| Patient ID/Isolate no. |                                           | 3           |       | 6965        |       | 6976/1      |       | 6976/2      |       | 1           |       | 6968        |       | 2           |       | 4           |       | 154/25428   |       | 7/25804     |       | 11/25808    |       | 13/25810    |       | 6           |       | 7           |       | 5           |       |
|------------------------|-------------------------------------------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|
| Antibiotics:           |                                           | MIC (µg/ml) | R/I/S | MIC (µg/ml) | R/I/S | MIC (µg/ml) | R/I/S | MIC (µg/ml) | R/I/S | MIC (µg/ml) | R/I/S | MIC (µg/ml) | R/I/S | MIC (µg/ml) | R/I/S | MIC (µg/ml) | R/I/S | MIC (µg/ml) | R/I/S | MIC (µg/ml) | R/I/S | MIC (µg/ml) | R/I/S | MIC (µg/ml) | R/I/S | MIC (µg/ml) | R/I/S | MIC (µg/ml) | R/I/S | MIC (µg/ml) | R/I/S |
|                        |                                           |             |       |             |       |             |       |             |       |             |       |             |       |             |       |             |       |             |       |             |       |             |       |             |       |             |       |             |       |             |       |
| Penicillins            | Amoxicillin/Clavulanic acid               | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     |
|                        | Ampicillin                                | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     |
| Cephalosporins         | Cefaclor                                  | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     |
|                        | Cefuroxime                                | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     |
|                        | Cefotaxime                                | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     |
|                        | Cefotaxime/Cefotaxime + clavulanic acid   | >16/>1      | R     | >16/>1      | R     | >16/>1      | R     | >16/>1      | R     | >16/>1      | R     | >16/>1      | R     | >16/>1      | R     | >16/>1      | R     | >16/>1      | R     | >16/>1      | R     | >16/>1      | R     | >16/>1      | R     | >16/>1      | R     | >16/>1      | R     | >16/>1      | R     |
|                        | Ceftazidime                               | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     |
|                        | Ceftazidime/Ceftazidime + clavulanic acid | >34/>4      | R     | >34/>4      | R     | >34/>4      | R     | >34/>4      | R     | >34/>4      | R     | >34/>4      | R     | >34/>4      | R     | >34/>4      | R     | >34/>4      | R     | >34/>4      | R     | >34/>4      | R     | >34/>4      | R     | >34/>4      | R     | >34/>4      | R     | >34/>4      | R     |
| Carbapenems            | Cefepime                                  | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     |
|                        | Doripenem                                 | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     |
|                        | Ertapenem                                 | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     |
|                        | Imipenem                                  | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     |
|                        | Meropenem                                 | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     |
| Quinolone              | Ciprofloxacin                             | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     |
| Aminoglycosides        | Amikacin                                  | 4           | S     | 8           | S     | 32          | R     | 32          | R     | 8           | S     | 12          | R     | 6           | S     | 4           | S     | 8           | S     | 8           | S     | 8           | S     | 8           | S     | 12          | R     | 6           | S     | 6           | S     |
|                        | Gentamycin                                | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     |
|                        | Netilmycin                                | 128         | R     | 4           | I     | 64          | R     | 64          | R     | 128         | R     | 32          | R     | 16          | R     | 16          | R     | 12          | R     | 16          | R     | 16          | R     | 16          | R     | 32          | R     | 16          | R     | 16          | R     |
|                        | Tobramycin                                | 64          | R     | 64          | R     | 32          | R     | 32          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 32          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     | 64          | R     |
| Other                  | Aztreonam                                 | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     |
|                        | Colistin                                  | 0.50        | S     | 0.75        | S     | 0.125       | S     | 0.125       | S     | 0.50        | S     | 0.50        | S     | 0.50        | S     | 0.50        | S     | 0.50        | S     | 0.50        | S     | 0.75        | S     | 0.50        | S     | 0.50        | S     | 0.50        | S     | 0.50        | S     |
|                        | Tetracycline                              | 32          | R     | 128         | R     | 8           | R     | 8           | R     | 32          | R     | 32          | R     | 32          | R     | 32          | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | 8           | R     | 8           | R     | 128         | R     |
|                        | Tigecycline                               | 2           | R     | 8           | R     | 4           | R     | 4           | R     | 2           | R     | 2           | R     | 2           | R     | 4           | R     | 0.75        | R     | 0.75        | R     | 1.0         | R     | 2           | R     | 4           | R     | 4           | R     | 8           | R     |
|                        | Trimethoprim/Sulfamethoxazole             | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     | >32         | R     |
|                        | Fosfomycin                                | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     | >256        | R     |

MIC – Minimum Inhibitory Concentration; R – Resistant; I – Susceptible, increased exposure; S – Susceptible



grounds for the relevant action to be taken in the field of public health in respect of molecular epidemiology.

This study's subject was a particular group of microorganisms classified as bacterial alarm agents (BCA) of particular virulence or resistance, i.e., carbapenemase-producing *K. pneumoniae* strains belonging to the order *Enterobacterales*. All *K. pneumoniae* isolates were derived from intestinal colonization cases in the patients studied. This work elaborated epidemiological opinions on the BCA epidemic threat occurrence in the multi-profile medical center in Katowice. It was also based on suspicion of an epidemic outbreak since we noticed clonal dissemination of several CRKP isolates and one case of symptomatic hospital infection with a blood CRKP strain. This strain was isolated in a given department 48 hours after the patient's admission. The colonization of fourteen consecutive hospitalized patients with the same strain of the CRKP was also reported. CRKP isolates had unique properties such as the accumulation of numerous antibiotic resistance mechanisms and the capability to persist in a hospital environment. It resulted in special attention being paid to CRKP strains' health care risk (Navon-Venezia et al. 2017). The genes encoding KPC, MBL, and OXA-48 are located on the so-called mobile genetic elements (plasmids, transposons) that allow effective spreading within bacterial populations. The genes encoding KPC carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub>) are located on the Tn4401 transposon located on plasmids with different types of replicons (IncF, IncL/M, ColE1, IncR, and IncX3). These plasmids show the ability to conjugate and propagate the *bla*<sub>KPC</sub> genes to new bacterial populations (Baraniak et al. 2011).

On the other hand, the most important families of the MBL acquired are the enzymes IMP and VIM occurring both in non-fermenting and intestinal bacilli. The *bla*<sub>IMP</sub> and *bla*<sub>VIM</sub> genes always exist as cassettes inserted into integrons. In turn, integrons can be located on transposons and move with them between DNA molecules (Izdebski et al. 2018b). ES $\beta$ L enzymes exist mainly as acquired, plasmid-encoded  $\beta$ -lactamases. ES $\beta$ L-encoding genes are often located on conjugation plasmids (IncFII, IncI), including those with a broad host range (IncA/C, IncL/M). It allows them to spread rapidly, also between strains belonging to different species. Frequently noted are encoded by *bla*<sub>CTX-M</sub> genes ES $\beta$ L enzymes, active against cefotaxime CTX-M and localized on plasmids in *Enterobacterales* (Izdebski et al. 2018a; 2018b).

The isolates' antibiotic susceptibility testing confirmed the  $\beta$ -lactamase antibiotics resistance profile typical for carbapenemase producers, as presented elsewhere (Zacharczuk et al. 2011; Guo et al. 2016; Izdebski et al. 2018a). All strains expressed high-level resistance to doripenem, ertapenem, meropenem, although they showed varying levels of resistance to imipenem. Ertapenem is the carbapenem that has been suggested as

most suitable for detecting the presence of *bla*<sub>KPC</sub>, which was confirmed by high MIC values for ertapenem (> 32  $\mu$ g/ml) in the present study. The presence of KPC does not always result in expression of *in vitro* resistance to imipenem or meropenem, as this carbapenemase shows limited efficiency of  $\beta$ -lactam ring hydrolysis in carbapenem particles. In this study, E-test showed resistance to ertapenem of 7/25804, 11/25808, 13/25810 strains, and susceptibility or medium susceptibility to imipenem (MICs 4–8  $\mu$ g/ml), while PCR confirmed the presence of the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene in all three isolates. Imipenem and meropenem resistance of other strains might have resulted from decreased outer membrane permeability or other  $\beta$ -lactamases providing a synergistic effect with KPC (Protonotariou et al. 2018). The strains' resistance to third-generation cephalosporins confirmed this hypothesis similarly to the various  $\beta$ -lactamases production by *K. pneumoniae*. The variability in CRKP strains' carbapenem susceptibility illustrates the difficulties encountered while trying to identify strains producing carbapenemases only with the E-testing of resistance profiles. To reliably identify such strains, additional and more specific techniques should be applied (Xu et al. 2005; Magiorakos et al. 2012; Han et al. 2013; Caltagirone et al. 2017; Bukavaz et al. 2018).

The *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> and *bla*<sub>VIM-1</sub> carbapenemase encoding genes and an additional *bla*<sub>CTX-M-15</sub> cefotaxime encoding genes have been found to coexist in all the strains concerned. Lee et al. (2016) found that *K. pneumoniae* can carry multiple  $\beta$ -lactamase genes in the same strain, which could be partly responsible for the pathogen's selective success. All types of the *bla* genes were reported in combinations for this species (Lee et al. 2016). So far, *K. pneumoniae* that produce KPC-2 and KPC-3 carbapenemases have been frequently found in Europe, including Poland (Baraniak et al. 2011; Zacharczuk et al. 2011; Baraniak et al. 2015; Grundmann et al. 2017). On the other hand, Matsumura et al. (2017) presented the global dissemination of *Enterobacteriaceae* strains carrying the *bla*<sub>VIM</sub> genes. The VIM-producing *Enterobacteriaceae* are generally present in Europe, particularly in Greece, Spain, Hungary, and Italy (Matsumura et al. 2017). Significantly, an increasing problem with VIM-producing *K. pneumoniae* has been recorded in Greece, where the strains have accounted for the deaths of 48% of patients over the last two years (Protonotariou et al. 2018). In Poland, Izdebski et al. (2018b), collected one hundred and nineteen cases of VIM/IMP-positive *Enterobacteriaceae* in the period from 2006 to 2012, and showed many specific or entirely new features of these microorganisms, undoubtedly related to the properties of pathogens isolated in the abovementioned central-southern countries Europe, including several likely imported from abroad (e.g., from Greece) (Izdebski et al. 2018b).

The strains containing OXA-48  $\beta$ -lactamases provide another example of rapid immigration of harmful microorganisms to Europe from their endemic regions, mostly eastern and southern Mediterranean countries (Egypt, Morocco, and Turkey). OXA-48-like-positive strains cause hospital outbreaks of epidemics in Belgium, France, Netherlands, Germany, Spain, and other countries (Nordmann and Poirel 2014; Grundmann et al. 2017). In the most recent report developed by OXA-48-PL Study Group monitoring the *Enterobacteriaceae* OXA-48-positive strains' spread, the authors demonstrate that these strains have been isolated relatively rarely in Poland (Izdebski et al. 2018a). It was confirmed by other European and international research teams (Nordmann and Poirel 2014; Grundmann et al. 2017). Conjugative transfer of a specific plasmid group is regarded to be the central mechanism in the spread of OXA-48 among the *Enterobacteriaceae* populations (Nordmann and Poirel 2014).

The high MIC values ( $>256 \mu\text{g/ml}$ ) for cefotaxime may suggest that the strains produced CTX-M  $\beta$ -lactamases. Multiplex PCR and sequencing have confirmed *bla*<sub>CTX-M-15</sub> presence in all isolates. The presence of various CTX-M  $\beta$ -lactamases in *K. pneumoniae* in Poland has been confirmed by other research teams (Baraniak et al. 2011; Izdebski et al. 2018a; 2018b). No *bla*<sub>SHV</sub> or *bla*<sub>TEM</sub> have been identified among the isolates. These results are in line with the persisting trend of diminished prevalence of hospital-associated *K. pneumoniae* strains producing SHV or TEM  $\beta$ -lactamases, which has also been noted by other scientists (Rodrigues et al. 2014). The type of ES $\beta$ Ls present in *K. pneumoniae* shifted in the 2000s, which caused outbreaks in hospitals due to the acquisition of plasmids and transposons encoding *bla*<sub>CTX-M-type</sub> ES $\beta$ Ls, consequently resulting in the predominance of CTX-M-producing strains (Calbo and Garau 2015).

Among non- $\beta$ -lactam antibiotics, colistin has shown the highest activity towards the strains concerned. Similar results have been published by other authors (Zacharczuk et al. 2011). Among aminoglycosides, amikacin showed the highest activity. The vast majority of strains (92.8%) were susceptible to amikacin, unlike in China, where total *K. pneumoniae* resistance to amikacin was demonstrated (Guo et al. 2016). The other aminoglycosides (gentamicin, netilmicin, and tobramycin) were nonreactive to the CRKP isolates concerned, in line with data reported by other authors (Zacharczuk et al. 2011; Guo et al. 2016). On the other hand, Bukavaz et al. (2018) presented other aminoglycoside susceptibility profiles in CRKP strains. These discrepancies are most likely due to different quantities or origins of the strains concerned, though they might as well be related to particular hospitals' or ward's antibiotic policies.

The present analysis has shown a relatively high percentage of isolates resistant to tigecycline (42.8%), a synthetic minocycline analogue with a broad spectrum of activity. The antibiotic is successfully applied to treat infections caused by multi-resistant bacterial strains, including *K. pneumoniae*. During tigecycline treatment, *Enterobacteriaceae* representatives, including CRKP strains, may become resistant to the antibiotic, as evidenced by Pfarrell et al. (2018). They demonstrated cross-resistance between tigecycline and minocycline in resistant *Enterobacteriaceae* strains due to the MDR pumps, which remove drugs from cells. The distribution of acquired tigecycline resistance can vary depending on the geographic location or time; therefore, it is recommended to concern data on local resistance, particularly while treating severe infections (Pfarrell et al. 2018).

Genetic similarity of CRKP isolates was determined by comparing PFGE profiles (Han et al. 2013). This method has been widely used by European and non-European research teams that study epidemic outbreaks of *K. pneumoniae* and evidence global spread of this species' epidemic clones (Guo et al. 2016; Bukavaz et al. 2018; Protonotariou et al. 2018). All *K. pneumoniae* strains analyzed in this study belonged to ST147 (CC147). Navon-Venezia et al. (2017) reported that ST147 *K. pneumoniae* clone spread globally. The involvement of this pandemic clone in the spread of CTX-M-15 and other carbapenemases in European, Asian, and Middle East countries was confirmed by others (Rodrigues et al. 2014; Guo et al. 2016; Zautner et al. 2017). The data found in the literature on *K. pneumoniae* clonal organization has been confirmed by research focused on the molecular epidemiology of infections due to antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* (Guo et al. 2016; Protonotariou et al. 2018).

Because of the clonal nature of the isolates studied, the clinical data about their origin was reviewed to examine whether the same clonal type was circulating in the three various hospital wards. The study focused mainly on stroke patients or patients suffering from cardiovascular complications who were transferred to multiple-bed hospital rooms in Stroke Recovery Units, which were the only places where they were in touch. Moreover, it is plausible that the neurology ward played a major role in disseminating the bacteria throughout the hospital. The spread of the pathogen isolates across three different hospital wards could imply that the personnel who can access all hospital wards freely, unlike the patients and their relatives, might have transmitted the infections. Scientific literature emphasizes the role of hospitalization (and its duration) in the process of bacterial colonization. The frequency of gastrointestinal colonization with *K. pneumoniae* strains in hospitalized patients was high in our study. Gastrointestinal

colonization with CRKP is an important risk factor for infections with strains of the same phenotype due to the easy transfer of the genes and strains' persistence in hospital environments, which hinders their eradication. This research evidences *K. pneumoniae* adaptation typical of endemic hospital strains, which are corroborated by the accumulation of locally spreading resistance mechanisms to the antibiotics most commonly used for therapeutic purposes.

#### ORCID

Monika Brzychczy-Włoch <https://orcid.org/0000-0002-7415-0154>

#### Ethics approval

The study was approved by the Bioethics Committee of the Jagiellonian University in Krakow, Poland (KBET/1072.6120.264.2019).

#### Authors' contributions

DO collected the data, performed the molecular analysis and drafted the manuscript; HK-C collected the isolates with clinical data, performed the hospital laboratory analysis and coordinated the microbiological analysis; MB consulted the cases and edited the manuscript; MBW supervised the research and analysis, coordinated and edited the manuscript.

#### Funding

The present work was financially supported by Jagiellonian University Medical College in Krakow (Poland), Grant No: K/ZDS/007829.

#### Acknowledgments

The authors are thankful to Karolina Winiewicz and Renata Wrona-Moczurad, the employees of the Department of Bacteriology of the GCM for their cooperation and assistance in conducting the study.

#### Conflict of interest

The authors do not report any financial or personal connections with other persons or organizations, which might negatively affect the contents of this publication and/or claim authorship rights to this publication.

## Literature

- Baraniak A, Grabowska A, Izdebski R, Fiett J, Herda M, Bojarska K, Żabicka D, Kania-Pudło M, Młynarczyk G, Żak-Puławska Z, et al.; KPC-PL Study Group. Molecular characteristics of KPC-producing *Enterobacteriaceae* at the early stage of their dissemination in Poland, 2008–2009. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Dec;55(12):5493–5499 <https://doi.org/10.1128/AAC.05118-11>
- Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Herda M, Derde LP, Bonten MJ, Adler A, Carmeli Y, Goossens H, Hryniewicz W, et al.; MOSAR WP2, WP3, and WP5 Study Groups. KPC-Like Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Colonizing Patients in Europe and Israel. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Dec 28;60(3):1912–1917. <https://doi.org/10.1128/AAC.02756-15>
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009 Jan 1;48(1):1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>
- Bukavaz S, Budak M, and Celik AD. *bla*<sub>KPC-2</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub> producing *Klebsiella pneumoniae* found in a Turkish hospital in the Balkans. *Afr J Microbiol Res*. 2018;12(16):370–379. <https://doi.org/10.5897/AJMR2018.8841>
- Calbo E, Garau J. The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. *Future Microbiol*. 2015;10(6):1063–1075. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.22>
- Caltagirone M, Nucleo E, Spalla M, Zara F, Novazzi F, Marchetti VM, Piazza A, Bitar I, De Cicco M, Paolucci S, et al. Occurrence of extended spectrum  $\beta$ -lactamases, KPC-type, and MCR-1.2-producing *Enterobacteriaceae* from wells, river water, and wastewater treatment plants in Oltrepò Pavese area, Northern Italy. *Front Microbiol*. 2017 Nov 10;8:2232. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02232>
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100: 282. Wayne (USA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pascual AW, Paterson DL. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type  $\beta$ -lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol*. 2008 Dec;46(12):4083–4086. <https://doi.org/10.1128/JCM.01408-08>
- EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0. Basel (Switzerland): The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2019.
- Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, Cantón R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske et al.; European Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) Working Group. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis*. 2017 Feb;17(2):153–163. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30257-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30257-2)
- Guo L, An J, Ma Y, Ye L, Luo Y, Tao C, Yang J. Nosocomial outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: clonal transmission of ST147 and ST383. *PLoS One*. 2016 Aug 4; 11(8):e0160754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160754>
- Han H, Zhou H, Li H, Gao Y, Lu Z, Hu K, Xu B. Optimization of pulse-field gel electrophoresis for subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*. 2013 Jul 1;10(7):2720–2731. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072720>
- Izdebski R, Baraniak A, Zabicka D, Machulska M, Urbanowicz P, Fiett J, Literacka E, Bojarska K, Kozinska A, Zieniuk B, et al.; OXA-48-PL Study Group. Enterobacteriaceae producing OXA-48-like carbapenemases in Poland, 2013–January 2017. *J Antimicrob Chemother*. 2018a Mar 1;73(3): 620–625. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx457>
- Izdebski R, Baraniak A, Zabicka D, Sekowska A, Gospodarek-Komkowska E, Hryniewicz W, Gniadkowski M. VIM/IMP carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Poland: epidemic *Enterobacter hormaechei* and *Klebsiella oxytoca* lineages. *J Antimicrob Chemother*. 2018b Oct 1;73(10):2675–2681. <https://doi.org/10.1093/jac/dky257>
- Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol*. 2016 Jun 13;7:895. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for

- interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Mar;18(3):268–281.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Matsumura Y, Peirano G, Devinney R, Bradford PA, Motyl MR, Adams MD, Chen L, Kreiswirth B, Pitout JDD.** Genomic epidemiology of global VIM-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Aug 1;72(8):2249–2258.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkx148>
- Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A.** *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2017 May 1;41(3):252–275.  
<https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
- Nordmann P, Poirel L.** The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Sep;20(9):821–830.  
<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>
- Pfaller MA, Huband MD, Streit JM, Flamm RK, Sader HS.** Surveillance of tigecycline activity tested against clinical isolates from a global (North America, Europe, Latin America, and Asia-Pacific). *Int J Antimicrob Agents.* 2018 Jun;51(6):848–853.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.01.006>
- Podschun R, Ullmann U.** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Oct;11(4):589–603.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>
- Protonotariou E, Poulou A, Politi L, Sgouropoulos I, Metallidis S, Kachrimanidou M, Pournaras S, Tsakris A, Skoura L.** Hospital outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* ST147 clonal strain co-producing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases in a tertiary teaching hospital in Northern Greece. *Int J Antimicrob Agents.* 2018 Sep; 52(3):331–337. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.04.004>
- Rodrigues C, Machado E, Ramos H, Peixe L, Novais Â.** Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFII<sub>K</sub>). *Int J Med Microbiol.* 2014 Nov;304(8):1100–1108.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.08.003>
- Shaker OA, Gomaa HE, ElMasry SA, Halim RMA, Abdelrahman AH, Kamal JS.** Evaluation of combined use of temocillin disk and mastdisks inhibitor combination set against polymerase chain reaction for detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018 Feb 1;6(2):242–247.  
<https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.090>
- Xu L, Ensor V, Gossain S, Nye K, Hawkey P.** Rapid and simple detection of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes by multiplex PCR assay. *J Med Microbiol.* 2005 Dec;54(Pt 12):1183–1187.  
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.46160-0>
- Zacharczuk K, Piekarska K, Szych J, Zawidzka E, Sulikowska A, Wardak S, Jagielski M, Gierczynski R.** Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase ArmA in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jan;55(1):443–446.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00386-10>
- Zautner AE, Bunk B, Pfeifer Y, Spröer C, Reichard U, Eiffert H, Scheithauer S, Groß U, Overmann J, Bohne W.** Monitoring microevolution of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in a hospital setting by SMRT sequencing. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Oct 1;72(10):2737–2744.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkx216>

## **8.2 Publikacja nr 2**

**Dorota Ochońska, Łukasz Ścibik, Monika Brzychczy-Włoch. Biofilm Formation of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity. *Pathogens* 2021,10:1345:1-15. PMID: 34684294. DOI:10.3390/pathogens10101345.**

**Punktacja MNiSW:100, IF:3,492**



## Article

# Biofilm Formation of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity

Dorota Ochońska <sup>1,\*</sup>, Łukasz Ścibik <sup>2</sup> and Monika Brzychczy-Włoch <sup>1,\*</sup>
<sup>1</sup> Department of Molecular Medical Microbiology, Chair of Microbiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, 18 Czysa Street, 31-121 Krakow, Poland

<sup>2</sup> Department of Otolaryngology and Oncological Surgery of the Head and Neck, 5th Military Hospital with Polyclinic in Krakow, 1-3 Wroclawska Street, 30-901 Krakow, Poland; l.scibik@5wzsk.com.pl

\* Correspondence: dorota.ochonska@uj.edu.pl (D.O.); mbrzych@cm-uj.krakow.pl (M.B.-W.); Tel.: +48-12633-2567 (D.O. &amp; M.B.-W.); Fax: +48-91454-0733 (D.O. &amp; M.B.-W.)



**Citation:** Ochońska, D.; Ścibik, Ł.; Brzychczy-Włoch, M. Biofilm Formation of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity. *Pathogens* **2021**, *10*, 1345. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101345>

Academic Editor: Gianfranco Donelli

Received: 7 September 2021

Accepted: 14 October 2021

Published: 18 October 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** (1) Background: Due to the commonness of tracheotomy procedures and the wide use of biomaterials in the form of tracheostomy tubes (TTs), the problem of biomaterial-associated infections (BAIs) is growing. Bacterial colonization of TTs results in the development of biofilms on the surface of biomaterials, which may contribute to the development of invasive infections in tracheostomized patients. (2) Methods: Clinical strains of *K. pneumoniae*, isolated from TTs, were characterized according to their ability to form biofilms, as well as their resistance to antibiotics, whether they harbored ESβL genes, the presence of selected virulence factors and genetic diversity. (3) Results: From 53 patients, *K. pneumoniae* were detected in 18 of the TTs examined, which constituted 34% of all analyzed biomaterials. Three of the strains (11%) were ESβL producers and all had genes encoding CTX-M-1, SHV and TEM enzymes. 44.4% of isolates were biofilm formers, SEM demonstrating that *K. pneumoniae* formed differential biofilms on the surface of polyethylene (PE) and polyvinyl chloride (PVC) TTs in vitro. A large range of variation in the share of fimbrial genes was observed. PFGE revealed sixteen genetically distinct profiles. (4) Conclusions: Proven susceptibility of TT biomaterials to colonization by *K. pneumoniae* means that the attention of research groups should be focused on achieving a better understanding of the bacterial pathogens that form biofilms on the surfaces of TTs. In addition, research efforts should be directed at the development of new biomaterials or the modification of existing materials, in order to prevent bacterial adhesion to their surfaces.

**Keywords:** biofilm; *Klebsiella pneumoniae*; PFGE; PCR; SEM; tracheostomy tube

## 1. Introduction

Tracheotomy is one of the oldest and most often conducted otolaryngological surgical procedures. It involves the creation of an opening in the front wall of the trachea so that a tracheostomy tube can be inserted into the lumen of the airways [1–3]. Healthcare-associated infections (HAIs) developing in patients with tracheostomy are a significant problem for modern medicine and are much more common in this group of patients than in others. The risk of acquiring an infection in these individuals is related to the presence of predisposing factors, as well as the increased invasiveness of diagnostic and therapeutic procedures, staff behavior and the growing resistance of microorganisms to commonly used antibiotics [4]. It should be emphasized that patients with tracheostomies are colonized by a variety of bacterial microflora as a result of massive colonization of the tracheostomy tube. Along with insufficient care of the patient, this may lead to a relocation of the microorganisms in the lower parts of the respiratory tract and thence to the initiation of the inflammatory process [1,5]. The most common infections reported among patients with tracheostomies are respiratory tract infections manifesting as ventilator-associated pneumonia (VAP), which can be expected to develop in 4–28% of patients [1,4,6,7].

Other important complications following this procedure include wound infections around the stomata and the possibility of the development of chronic otitis media with effusion, which is commonly observed in Ear, Nose and Throat (ENT) units [1,2,8,9]. A clinically significant group of infections are those closely related to the biomaterials applied in modern medicine (biomaterial-associated infections—BAIs). The ability of bacteria to form biofilm plays a key role in the pathogenesis of infections associated with the use of biomaterials, which form a susceptible surface for microbial colonization [10]. It is estimated that approximately 60–70% of hospital-acquired infections stem from the formation of biofilms on the surface of biomaterials used [11]. Diagnosing infections associated with biofilm formation on the surface of biomaterials is often problematic, as well as time-consuming [4]. Compared to free-flowing cells, microorganisms growing in a biofilm are much less sensitive to the action of antibiotics, antiseptics and the defense mechanisms of the human body [12]. Therefore, biofilm-associated infections can lead to numerous therapeutic complications which often become chronic, and which may recur after recovery [12]. Symptoms of chronic infections may be non-specific and reveal themselves only after a considerable amount of time. Chronic infections may eventually require removal and replacement of implanted devices or products, including tracheostomy tubes [13].

Bacterial biofilms are present in more than 90% of tracheostomy tubes collected in both inpatient and outpatient settings [12]. All indwelling tracheostomy tubes are contaminated with normal and sometimes pathogenic flora [1,8]. A wide spectrum of pathogenic microorganisms have the ability to adhere, colonize and, consequently, to form biofilms on the surface of tracheostomy tubes [14,15]. According to current data available in the literature, *K. pneumoniae* remains one of the most frequently reported bacterial pathogens out of all Gram-negative microorganisms capable of forming biofilms on these biomaterials, and therefore, they are the predominant bacilli isolated from tracheostomized patients exhibiting colonization, and the predominant etiological factors in the pathogenesis of infections in hospitalized patients undergoing tracheostomy procedures [4,16–18].

*K. pneumoniae* is an opportunistic pathogen responsible for hospital-acquired and community-acquired infections, such as pneumonia, urinary tract infection (UTI) and pyogenic liver abscess (PLA) [10]. The bacterium is able to form biofilms, i.e., aggregates of bacterial cells which embed within a self-produced matrix consisting of an extracellular polymeric substance (EPS) and which adhere to each other and/or to a surface. EPS is a complex structure comprising polysaccharides, proteins and DNA [12]. Important virulence factors that contribute to biofilm formation in *K. pneumoniae* are the capsular polysaccharides and type 1 and type 3 fimbriae [10]. Type 3 fimbriae are mainly composed of subunits of the protein MrkA and instigate biofilm formation [10]. Another protein, MrkD, which is found at the tip of fimbriae, gives the appendages their adhesive properties, allowing them to bind to polyethylene (PE) and polyvinyl chloride (PVC) surfaces, and defines the fimbrial binding capacity [10]. The present study was conceived in response to the commonness of tracheostomy procedures and the sparse data on the characteristics of the main bacterial pathogens, including the clinical strains of *K. pneumoniae* isolated from tracheostomy tubes from patients hospitalized in southern Poland. Our aim was to characterize clinical strains of *K. pneumoniae* isolated from patients with tracheostomies according to their ability to form biofilms, associated with their resistance to antibiotics, the harboring of genes for producing ES $\beta$ L, the presence of selected virulence factors and genetic diversity. In addition, we assessed the formation of *K. pneumoniae* biofilms on tracheostomy tubes by determining their structure using scanning electron microscopy (SEM).

## 2. Results

### 2.1. Patients' Clinical Characteristics

Patients' clinical characteristics were reviewed and recorded (Table 1). During the 30 months, 18 *K. pneumoniae* isolates were collected from eighteen patients aged 77 years on average. The average duration of hospitalization was 22.4 days. Tracheostomy was performed on all patients at the Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery

(ORL) to treat laryngeal cancer, whereas, in the Department of Anesthesiology and Intensive Therapy (OAIT), it was conducted on account of the need for prolonged mechanical ventilation of the lungs. All six OAIT patients experienced VAP episodes, three of them correlated with *K. pneumoniae* pneumonia, of which one *K. pneumoniae* isolate showed moderate biofilm production; the other two isolates did not produce biofilm. The remaining patients were diagnosed with pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* and *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* and *P. aeruginosa* VAP recurrence occurred in one patient. VAP episodes did not occur in patients of the ORL Department because they were not undergoing ventilator therapy. Two patients died.

**Table 1.** Characteristics of patients with tracheostomy, 5th Military Clinical Hospital with Polyclinic, Independent Public. Health Care Facility in Krakow—5WSzKzP SPZOZ, with isolated strain of *K. pneumoniae*.

| Patient No. | ID/Isolate No. | Age (Years)/Sex | Hospital Ward(s) | Length of Stay in the Ward | Final Diagnosis. ICD9 Treatments/Procedures/Consultation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Antibiotic Treatment                                                       |
|-------------|----------------|-----------------|------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 1.          | 5              | 98/M            | ORL              | 31.07–03.08.2017           | Dyspnoea. A tumor in the larynx. Endoscopic laryngeal biopsy. Emergency tracheostomy. Laryngeal microsurgery using the Kleinsasser instrument set.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Amoxicillin + Clavulanic acid                                              |
| 2.          | 9              | 68/M            | ORL              | 11.12–15.12.2018           | Laryngeal cancer (Carcinoma planoepitheliale GII). Dyspnoea. Permanent tracheostomy.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Amoxicillin + Clavulanic acid                                              |
| 3.          | 12             | 77/M            | ORL              | 20.11–22.12.2018           | Laryngeal cancer (Squamous cell carcinoma GIII, Carcinoma planoepitheliale laryngis GIII). Extended excision of regional lymph nodes. Excision of the larynx and pharynx. Esophageal repair procedures. Gastrointestinal obstruction. Exploratory laparotomy. Sigmoid tumor excision (adenocarcinoma of the colon). Perforation of the ascending colon in the course of surgery. Relaparotomy. Necrosis of the caecum due to ischemia. Diffuse peritonitis. Acute circulatory and respiratory failure. Multiple organ failure. Dementia syndrome. Chronic respiratory failure. Temporary tracheostomy. Sepsis. Death.                                             | Amoxicillin + Clavulanic acid, Ciprofloxacin                               |
| 4.          | 15             | 93/F            | OAIT             | 18.10–29.11.2018           | Septic shock. Acute respiratory failure. State after aspiration of gastric contents. Aspiration pneumonia. Status after a stroke of the right hemisphere of the brain. Left-sided hemiparesis. Epilepsy of vascular aetiology.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Ampicillin + Sulbactam, Ciprofloxacin, Fluconazole, Gentamicin, Meropenem  |
| 5.          | 18             | 90/F            | OAIT             | 15.11.2018–03.01.2019      | Type 2 diabetes. Goiter of the thyroid gland with displacement of the trachea. Ischemic heart disease. Persistent atrial fibrillation. Coagulopathy resulting from acenocoumarol overdose. Hypertension. Condition after left femoral neck fracture. State after amputation of the lower right limb. Temporary tracheostomy. Death. Squamous cell carcinoma of the larynx GII. Status after right-sided pneumectomy due to squamous cell carcinoma of the lung followed by radiotherapy due to cancer infiltration in the bronchial stump. Hypertension. Complete removal of the larynx with simultaneous reconstruction of the cervical esophagus. Tracheostomy. | Ampicillin + Sulbactam, Clindamycin, Piperacillin + Tazobactam, Vancomycin |
| 6.          | 21             | 75/M            | ORL              | 21.01–08.02.2019           | Carcinoma planoepitheliale laryngis GII.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Amoxicillin + Clavulanic acid, Metronidazole                               |
| 7.          | 22             | 61/M            | ORL              | 23.01–25.01.2019           | Suspicion of recurrence of laryngeal cancer. Status after radiotherapy for laryngeal cancer. Permanent tracheostomy.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Amoxicillin + Clavulanic acid                                              |
| 8.          | 23             | 65/M            | ORL              | 17.01–20.01.2019           | Carcinoma planoepitheliale laryngis GI. Condition after duodenal ulcer bleeding. Acute haemorrhagic anemia. Hypertension. Type 2 diabetes. Condition after myocardial infarction. Total laryngectomy. Removal of the neck lymph nodes on the right side. Esophageal surgery.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Amoxicillin + Clavulanic acid                                              |
| 9.          | 28             | 69/M            | ORL              | 01.03–12.03.2019           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                            |



Table 1. Cont.

| Patient No. | ID/Isolate No. | Age (Years)/ Sex | Hospital Ward(s) | Length of Stay in the Ward | Final Diagnosis. ICD9 Treatments/Procedures/Consultation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Antibiotic Treatment                                                 |
|-------------|----------------|------------------|------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 10.         | 29             | 89/M             | ORL              | 06.03–27.03.2019           | Recurrence of laryngeal squamous cell carcinoma GII. Condition after radiotherapy and partial surgery. Total laryngectomy. Esophageal surgery. Acute respiratory failure. Hypercapnia. Respiratory acidosis.                                                                                                                                                                                                                      | Amoxicillin + Clavulanic acid                                        |
| 11.         | 30             | 74/M             | OAIT             | 15.03–07.04.2019           | Persistent atrial fibrillation. Hypertension. Condition after cholecystectomy. Condition after myocardial infarction. Pulmonary hypertension. Tracheostomy. Puncture of the pleural cavities. Blood transfusion. Respirator therapy.                                                                                                                                                                                              | Colistin, Imipenem, Vancomycin                                       |
| 2.          | 38             | 88/F             | OAIT             | 14.05–19.06.2019           | Stroke. Chronic respiratory failure. Chronic heart failure. Persistent atrial fibrillation. Condition after ICD implantation. Status after PCI LAD. Hypertension. Pulmonary hypertension. Insulin-dependent type 2 diabetes mellitus. Tracheostomy. Craniotomy for a subarachnoid hematoma.                                                                                                                                       | Ciprofloxacin, Meropenem                                             |
| 13.         | 42             | 84/F             | OAIT             | 03.10–28.11.2018           | Chronic respiratory failure. Tracheostomy. Acute postoperative respiratory failure. Condition after fronto-temporo-parital craniotomy due to acute subdural hematoma over the right hemisphere. Status after iatrogenic gastrointestinal perforation. Hypertension. Digestive tract cancer (area of the major duodenal papilla). Cancer cachexia. Hypoalbuminemia. History of gastric polyp. Dysphagia. Type 2 diabetes mellitus. | Amoxicillin + Clavulanic acid, Gentamicin, Piperacillin + Tazobactam |
| 14.         | 43             | 65/F             | ORL              | 27.11–17.12.2018           | Cancer of the middle throat and left side of the tongue (recurrent). State after RTH-CHTH in 2012. Partial pharyngotomy. Exploring the neck area through the incision. One-sided radical neck dissection. Throat repair operations other.                                                                                                                                                                                         | Amoxicillin + Clavulanic acid, Cefazidime, Cefuroxime, Metronidazole |
| 15.         | 45             | 95/F             | OAIT             | 23.08–20.09.2019           | Oedema pulmonalis, COPD, brain infarction, insulin-dependent type 2 diabetes mellitus. Hypertension. Ischemic heart disease. Alcohol dependence syndrome. Liver damage. Tracheostomy. Respirator therapy.                                                                                                                                                                                                                         | Ceftriaxone, Cefuroxime, Levofloxacin                                |
| 16.         | 46             | 70/M             | ORL              | 12.09–14.09.2019           | Acute respiratory failure in the course of laryngeal cancer. End-stage renal failure during renal replacement therapy. Hypertension. Ischemic heart disease. Status after STEMI. Secondary hypoparathyroidism. Tracheostomy.                                                                                                                                                                                                      | Ampicillin                                                           |
| 17.         | 47             | 65/M             | ORL              | 26.11–17.12.2019           | Recurrence of laryngeal squamous cell carcinoma GII. Condition after partial laryngectomy. Total laryngectomy. Purulent fistula starting 4 days after surgery ( <i>K. pneumoniae</i> in swab).                                                                                                                                                                                                                                    | Clindamycin, Ceftriaxone, Ciprofloxacin                              |
| 18.         | 48             | 61/M             | ORL              | 27.10–20.11.2019           | Laryngeal squamous cell carcinoma GII. Excision of the larynx and pharynx. Bilateral lymph node removal. Esophageal surgery.                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Amoxicillin + Clavulanic acid, Ciprofloxacin                         |

CHTH, Chemotherapy; ICD, implantable cardioverter defibrillator; COPD, Chronic obstructive pulmonary disease; LAD, left anterior descending; OAIT, Department of Anaesthesiology and Intensive Therapy; ORL, Department of Otolaryngology and Oncological Surgery of the Head and Neck Surgery; PCI, percutaneous coronary intervention; RTH, radiotherapy; STEMI, ST-segment elevation myocardial infarction.

## 2.2. Antimicrobial Resistance Pattern

Among the *K. pneumoniae* isolates studied, 33.3% (n = 6) were resistant to cefuroxime; 27.8% (n = 5) to trimethoprim–sulfamethoxazole; 22.2% (n = 4) to ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, ofloxacin, ceftriaxone and piperacillin; 16.7% (n = 3) to tobramycin, ceftazidime, cefotaxime, aztreonam and cefepime; 11% (n = 2) to netilmicin; and 5.5% (n = 1) to gentamicin. The results are presented in Table 2. *K. pneumoniae* isolates resistant to amikacin, doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem and colistin were not found.

**Table 2.** Patterns of antibiotic resistance of clinical *K. pneumoniae* strains isolated from tracheal secretions from patients who had undergone a tracheostomy.

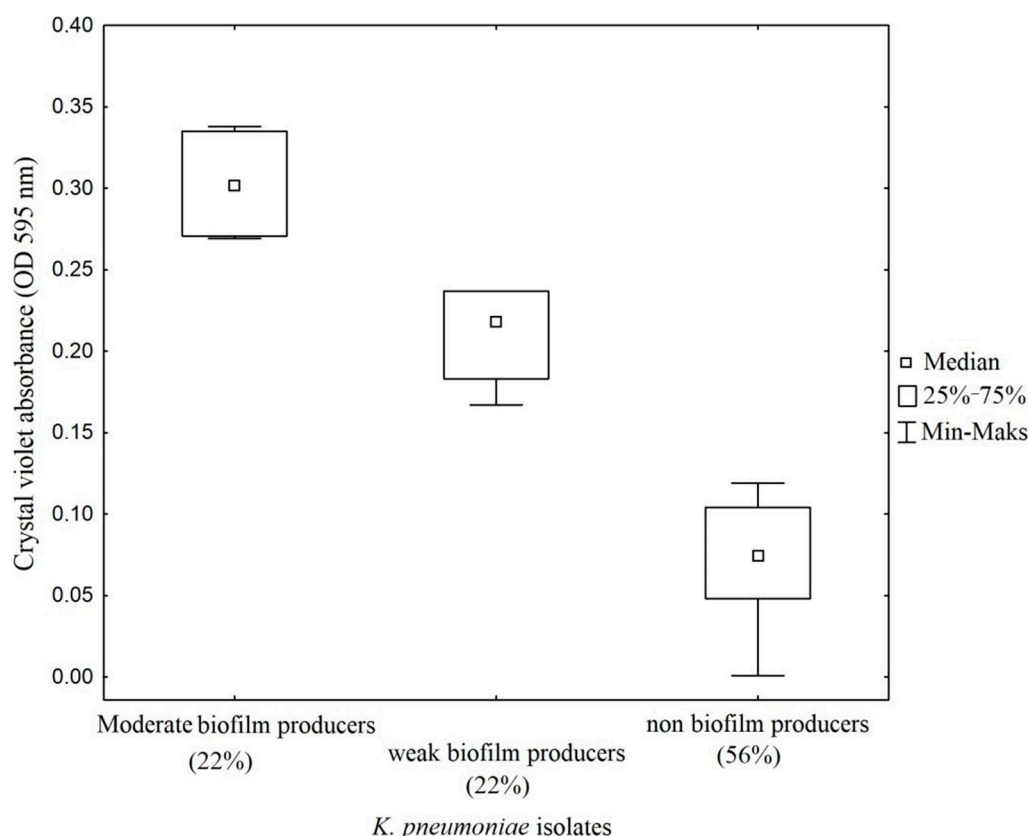
| Microorganism<br><i>Klebsiella pneumoniae</i> | n (%)<br>18 (100) | Resistance (%) |
|-----------------------------------------------|-------------------|----------------|
| <b>Penicillins</b>                            |                   |                |
| Piperacillin                                  | 4                 | 22.2           |
| <b>Cephalosporins</b>                         |                   |                |
| Cefepime                                      | 3                 | 16.7           |
| Cefotaxime                                    | 3                 | 16.7           |
| Ceftazidime                                   | 3                 | 16.7           |
| Ceftriaxone                                   | 4                 | 22.2           |
| Cefuroxime                                    | 6                 | 33.3           |
| <b>Monobactams</b>                            |                   |                |
| Aztreonam                                     | 3                 | 16.7           |
| <b>Fluoroquinolones</b>                       |                   |                |
| Ciprofloxacin                                 | 4                 | 22.2           |
| Levofloxacin                                  | 4                 | 22.2           |
| Moxifloxacin                                  | 4                 | 22.2           |
| Ofloxacin                                     | 4                 | 22.2           |
| <b>Aminoglycosides</b>                        |                   |                |
| Gentamycin                                    | 1                 | 5.5            |
| Netilmicin                                    | 2                 | 11             |
| Tobramycin                                    | 3                 | 16.7           |
| <b>Miscellaneous agents</b>                   |                   |                |
| Trimethoprim-sulfamethoxazole                 | 5                 | 27.8           |

## 2.3. ESβL Gene Detection

Three (16.7%) ceftazidime and cefotaxime resistant isolates were positive for ESβL production. PCR amplification of the extended spectrum β-lactamase genes revealed that all three isolates harbored *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> genes. In addition, all three isolates were positive for *bla*<sub>CTX-M group 1</sub>. Moreover, one of the studied isolates with a *bla*<sub>CTX-M group 1</sub> also had a group 9 CTX-M (*bla*<sub>CTX-M group 9</sub>) ESβL (Figure 1).

## 2.4. PCR Detection of Fimbrial Genes

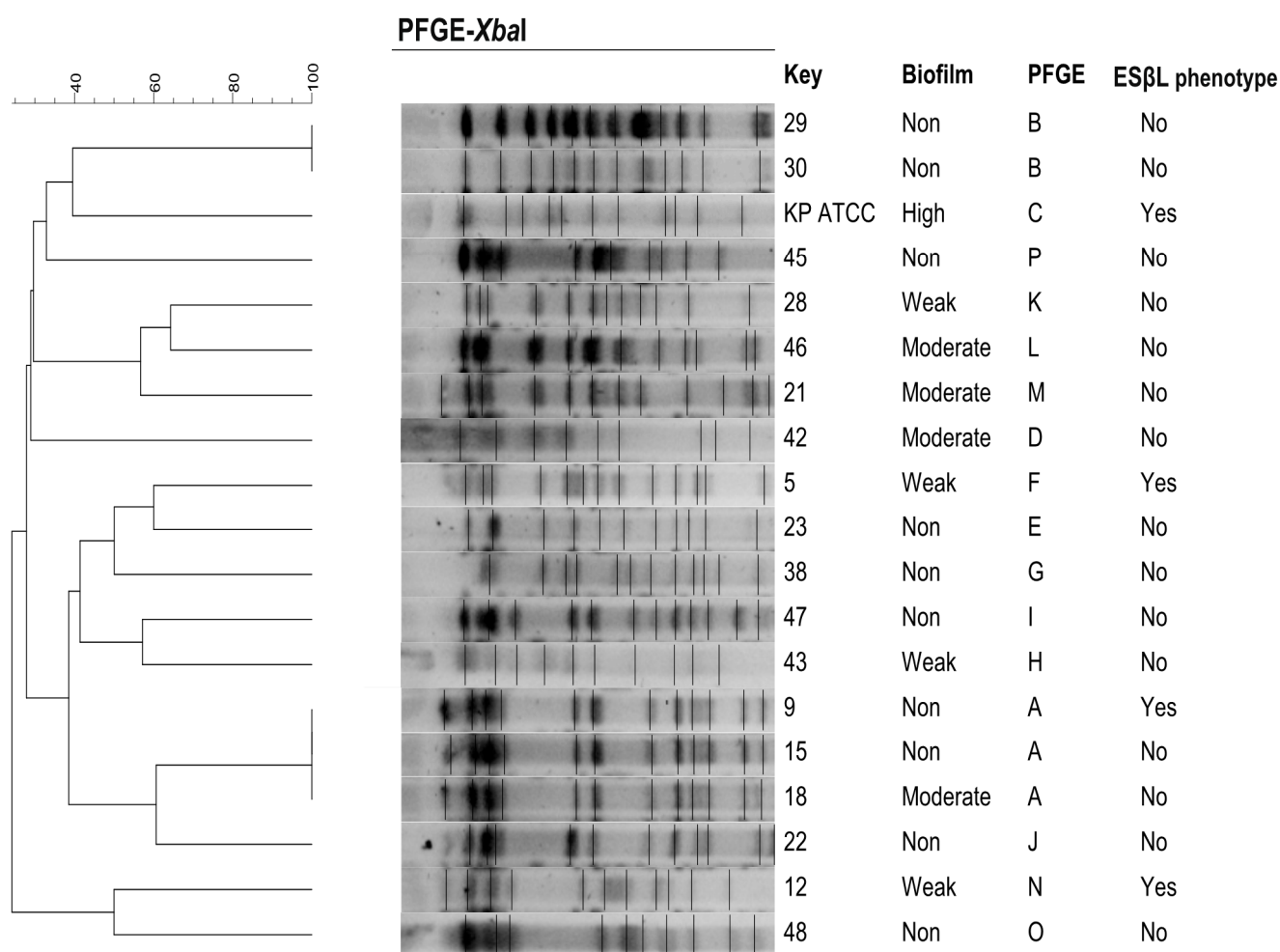
The PCR-based survey of *ecpA*, *fimA*, *fimH*, *mrkA* and *mrkD* fimbrial genes in the tested *K. pneumoniae* showed that 100% (n = 18) of strains carried the *mrkA* adhesin gene, while 27.8% (n = 5) carried the *fimA* gene. The *mrkD* adhesin gene was present in 38.9% (n = 7) of isolates. Moreover, 50% (n = 9) and 27.8% (n = 5) of isolates amplified *ecpA* and *fimH* genes, respectively.



**Figure 1.** Quantitative assays of biofilm formation on abiotic surface (polystyrene microtiter plate) of clinical strains of *K. pneumoniae* isolated from patients with tracheostomies. Absorbance values of 0.254–0.509 of OD<sub>595nm</sub> were classified as moderate biofilm producers. Absorbance values of 0.127–0.254 were considered as weak biofilm producers and values <0.127 were classed as non-biofilm producers.

### 2.5. Biofilm Production

The classification of biofilm-producing strains was established based on absorbance readings obtained from the ratio of the blank (0.069) and the positive control (1.74). Strains with absorbance readings <0.127 were considered non-biofilm formers. Absorbance values between two and four times the reading of the blank (0.127–0.254) were considered low biofilm-forming strains. Values between four and six times the blank reading (0.254–0.509) were considered medium biofilm-forming strains. When applying qualitative methods to interpret the ability of *K. pneumoniae* to form biofilm in vitro, 44.4% (n = 8) of the examined isolates were interpreted as biofilm producers and 56% (n = 10) as non-biofilm producers. Among biofilm producers, 22% (n = 4) of isolates classified as moderate biofilm producers and 22% (n = 4) of isolates identified as weak biofilm producers. Strong biofilm producers were not found (Figures 1 and 2).



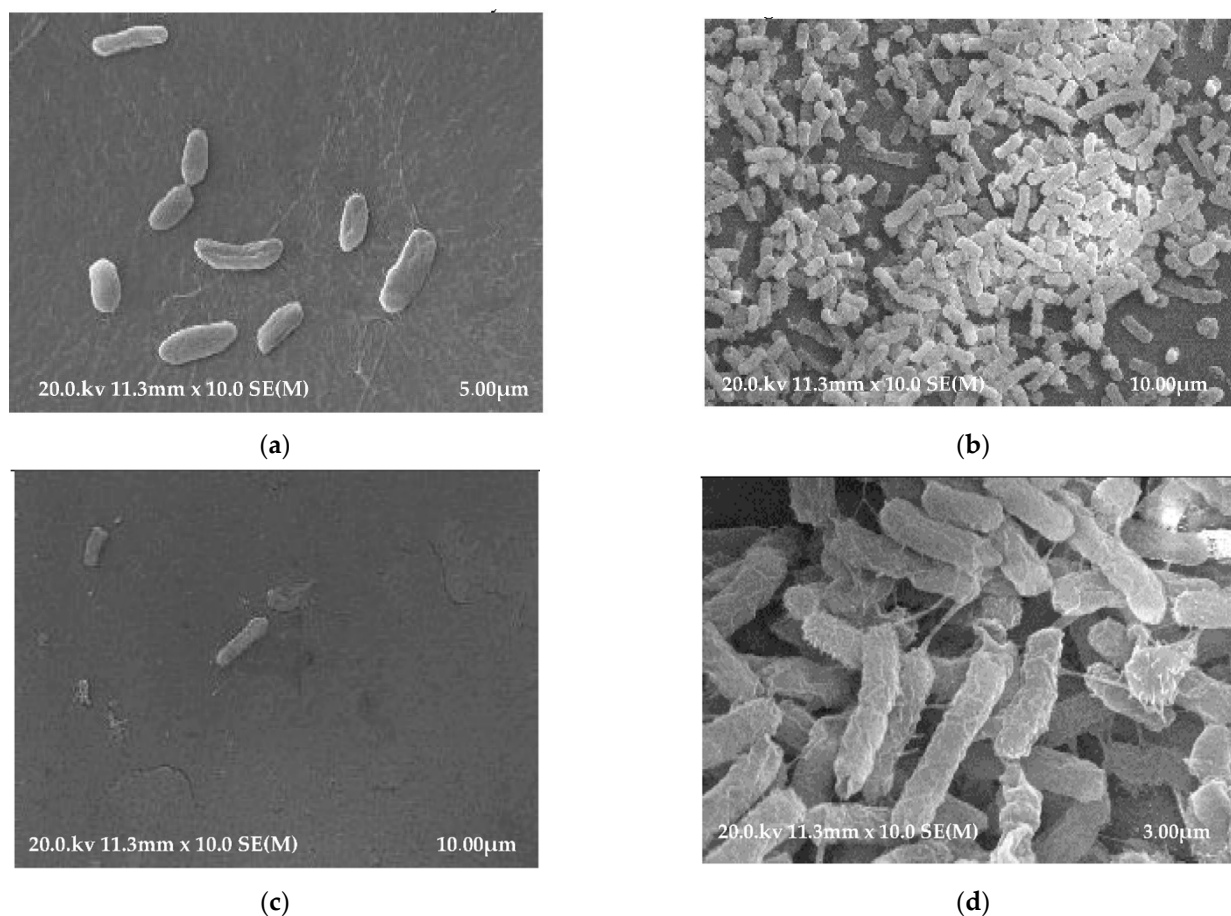
**Figure 2.** Dendrogram representing the genetic relationship between 18 *K. pneumoniae* isolates after restriction with *Xba*I enzyme. ESβL-producing strains were part of three different PFGE profiles. DNA fragments were separated by PFGE using a CHEF DR®II system. PFGE profiles were compared according to their percentage of similarity, estimated by the Dice coefficient and clustered by UPGMA using GelCompar II v.6.5 software. PFGE settings: optimization, 1%; tolerance, 1%. Images were captured and converted to TIFF for computer analysis.

## 2.6. PFGE

On the basis of the chromosomal DNA patterns obtained, 16 PFGE profiles were identified among the 18 isolates. The PFGE clonal groups were designated by the letters A–P according to differences in banding patterns. The dominant PFGE clonal group types: A (16.7%,  $n = 3$ ) and B (11%,  $n = 2$ ) were found. The remaining isolates were clustered into 13 singletons (C–P). ESβL-producing *K. pneumoniae* were part of three different PFGE profiles (A, F and N) (Figure 2).

## 2.7. SEM

SEM revealed the presence of *K. pneumoniae* bacteria adhering to the surfaces of the polyethylene and polyvinyl chloride tracheostomy tubes (Figure 3a–d). The conducted imaging studies revealed that the inner surfaces of both polyethylene and polyvinyl chloride tracheostomy tubes exhibit greater bacterial biofilm growth than the outer surfaces.



**Figure 3.** (a) SEM micrograph of a polyethylene tracheostomy tube (PE) showing *K. pneumoniae* bacterial biofilm on the outer surface. (b) SEM micrograph of a polyethylene tracheostomy tube (PE) showing *K. pneumoniae* bacterial biofilm on the inner surface. (c) SEM micrograph of a polyvinyl chloride tracheostomy tube (PVC) showing *K. pneumoniae* bacterial biofilm on the outer surface. (d) SEM micrograph of a polyvinyl chloride tracheostomy tube (PVC) showing *K. pneumoniae* bacterial biofilm on the inner surface.

### 3. Discussion

As a life-saving procedure, tracheotomy is considered the “gold standard” for securing the patient’s airways and has been carried out for many years, the origins of the technique dating back to ancient times. In addition, the 19th century saw the introduction of various types of tracheostomy tubes [3]. With time, scientists started focusing their interests on the bacterial biofilms forming on the surface of tracheostomy tubes, and the first reports on this subject appeared as early as 1989 [18]. On the other hand, the first literature reports underlining the ability of *K. pneumoniae* to form biofilms on the surface of tracheostomy tubes come from 1988 [19]. It is worth noting that the construction of tracheostomy tubes has really not changed significantly since they were first used; however, there are constant innovations aimed at modifying the physicochemical properties and the structure, texture or composite makeup, with the objective of reducing the risk of bacterial biofilm formation on their inner surface [6].

Several projects are currently underway investigating the impact of tracheal tube design on the prevention of VAP [6,20]. A promising strategy used in the fight against infections associated with the use of biomaterials is the use of coatings made of precious metals with bacteriostatic or bactericidal properties. Coating endotracheal tubes with silver ions has been shown to effectively inhibit biofilm formation and has resulted in significant improvements to the prognoses of intubated ICU patients [21]. A statistically significant reduction in the frequency of VAP episodes in these patients has been indicated [22]. Similar

observations also apply to patients using silicone-coated endotracheal tubes (ETTs) [23]. The use of micropatterned ETTs has also shown promising results [24], and in addition, high hopes are placed on the testing of modern equipment (endoClear) for cleaning ETTs [25].

The results presented and discussed below were collected and evaluated with special attention paid to the characteristics of *K. pneumoniae* isolates coming from adult patients with tracheostomies, hospitalized in two hospital units—otolaryngology and Intensive Therapy—in south-eastern Poland. All strains were isolated from secretions (tracheal aspirates) from 18 tracheostomy tubes constituting 34% out of a total of 53 (all tubes collected). In studies on the microbiology of tracheal secretions carried out by the Brazilian researchers El Cheik et al., among all Gram-negative isolates from adults and children with tracheostomy, *K. pneumoniae* strains were isolated from 5% [5]. On the other hand, the American scientists Mishra et al. described the predominant pathogens capable of biofilm formation and causing infections associated with different medical devices, of which *K. pneumoniae* accounted for 20% [26]. The results of drug resistance testing of the studied *K. pneumoniae* demonstrated that 33.3% of isolates were resistant to cefuroxime and 16.7% of isolates were resistant to several other marker ES $\beta$ L-mechanism oxyimino- $\beta$ -lactams (ceftazidime, cefotaxime, ceftipime and aztreonam). Contrarily, the results obtained by an American team of researchers showed that 97% of *K. pneumoniae* isolates were resistant to cefuroxime, 81.5% resistant to aztreonam, 72% resistant to ceftazidime, 68.5% resistant to cefotaxime and 8.9% resistant to ceftipime [14]. Meanwhile the analysis conducted by a Mexican research team, Cruz-Cordova et al., found 88% of *K. pneumoniae* strains resistant to aztreonam, 80% resistant to ceftazidime and 26% resistant to ceftipime [16]. In the pool of the *K. pneumoniae* tested, in the group of fluoroquinolones, 22.2% of the isolates were resistant to ofloxacin, which contrasts with the study by Cruz Cordova et al., in which 2% of strains were found to be resistant to this antibiotic [16]. Furthermore, the characterization that was carried out found 22.2% of *K. pneumoniae* isolates to be resistant to ciprofloxacin. Similarly, Chinese researchers showed resistance to ciprofloxacin in 26% of isolated *K. pneumoniae* [27]. Studies published by other teams describe the resistance of *K. pneumoniae* to ciprofloxacin, ranging from 6% to 8% [14,16]. Among the aminoglycosides in this study, no strains of *K. pneumoniae* resistant to amikacin were detected, in contrast to the results of groups of scientists from Mexico, who recorded the relatively high percentage of 70% of *K. pneumoniae* isolates as being resistant to this drug [14,16]. The studies carried out by us did not show the presence of *K. pneumoniae* strains resistant to imipenem and meropenem, while in the studies conducted by Cruz-Cordova et al. slightly different results were obtained: 4% of *K. pneumoniae* isolates were resistant to imipenem and 2% of isolates were resistant to meropenem [16]. Due to the fact that the most important mechanism of *K. pneumoniae* resistance to beta-lactam antibiotics is the production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ES $\beta$ L), the study assessed the prevalence of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> type genes among the ES $\beta$ L-positive *K. pneumoniae* strains [28,29]. In all three isolates (11%), the presence of *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M group 1</sub> was confirmed. Additionally, one isolate had the gene *bla*<sub>CTX-M group 9</sub>. For comparison, in the research conducted by Cruz-Cordova et al., the presence of the ES $\beta$ L phenotype was confirmed in 97% of the strains [16]. We have also assessed the ability of the *K. pneumoniae* isolates studied to form biofilms. The strains were analyzed in terms of their biofilm production using the crystal violet absorption method [30]. According to the definition proposed in the protocol prepared by Stepanovic et al., biofilm-forming clinical strains are classified into four categories as strong biofilm producers, moderate biofilm producers, weak biofilm producers and non-biofilm producers [31]. The proposed criteria for classifying biofilm producers are also widely used by researchers working with *K. pneumoniae* strains [32–34].

In the present study, *K. pneumoniae* strains forming strong biofilm were not detected, 22% of isolates were characterized by average biofilm formation, 22% of isolates produced small biofilm, and 56% of isolates did not form biofilm. For comparison, the study by Dolores Alcántar-Curiel et al., encompassing a collection of 168 hospital isolates of *K. pneumoniae*, demonstrated significant biofilm formation in 69% of isolates, weak biofilm



production in 20.3% of isolates, while 10.1% of isolates did not produce biofilm at all [14]. On the other hand, research carried out on 50 isolates of *K. pneumoniae* by Cruz-Cordova et al. (published in 2014), demonstrated that 64% of strains were strong biofilm producers, 26% were moderate, and 10% of isolates were weak producers [16]. Whereas the results published by Seifi et al. showed that, among 94 *K. pneumoniae* analyzed, 33% of the isolates produced fully established biofilms, 52.1% formed biofilms moderately, 8.5% were categorized as weak biofilm-producing, and 6.4% were classified as non-biofilm producers [15]. Adhesive properties of *Klebsiella* are associated with the presence of fimbriae and non-fimbrial adhesion factors in these bacteria [35]. The variety of structural and morphological properties of the fimbrial projections and the specificity of the proper adhesins which are part of their structure may pose some difficulties in their classification. In this study, the presence of the encoding gene *mrkA* was demonstrated in all (100%) isolates of *K. pneumoniae*, while the gene *fimA* was found in 27.8% of the strains. For comparison, the studies conducted by Alcántar-Curiel et al. revealed the presence of *mrkA* in 100% of isolates, while *fimA* was found in 78% of strains [35]. On the other hand, in the aforementioned study, the encoding genes *ecpA*, *mrkD* and *fimH* were found in 84%, 38.9% and 27.8% of isolates, respectively [35]. In this study, *ecpA* was found in 50%, *mrkD* in 20%, and *fimH* in 22% of the strains.

The PFGE molecular method was used to assess the genetic relationship between the *K. pneumoniae* studied, mainly due to the repeatability of the results and the high level of discrimination [36,37]. The conducted analysis revealed a great genetic diversity across *K. pneumoniae* strains isolated from tracheostomy tubes for the study. This result might be explained by the origin of the strains, i.e., from one center, but from sporadic cases of *K. pneumoniae* colonization/infections, not from epidemic outbreaks. Furthermore, the collected isolates were not related epidemiologically. Nevertheless, the analysis carried out among the tested strains made it possible to demonstrate the presence of two pulsotypes (A and B) characteristic of more than one strain each, which may indicate a common origin. Similar results of large genetic diversity among hospital-sourced *K. pneumoniae* examined using the PFGE method were obtained by Alcántar-Curiel et al., who identified among 168 isolates 59 different PFGE profiles [14]. However, the above observations are difficult to discuss with other Polish and international authors due to the small number of studies covering genetic relatedness and concentrating solely on *K. pneumoniae* strains isolated from tracheal secretions from tracheostomy tubes rather than isolates derived from a variety of other clinical materials [1,5,14,36].

In our own investigations using SEM, significantly greater bacterial colonization with *K. pneumoniae* was found on the internal surfaces of the examined biomaterials used in the production of tracheostomy tubes. Similar observations had already been made in 1989 by Inglis et al. [18]. It is worth remembering that all commonly used and available biopolymers affect the tissues of the human body. Without a doubt, the type of material the tracheostomy tube is made of has a significant influence on the adherence of microbial cells and the rate of bacterial biofilm development. Since tracheostomy tubes are movable, they rub against the patients' tissues, therefore the bacterial biofilm can be mechanically torn off. An examination of the structure of the materials used for the production of tracheostomy tubes carried out by Björling et al., based on scanning electron microscopy, established that tracheostomy prolonged up to 30 days can cause morphological changes on the surface of most tracheostomy tubes made of various biomaterials due to the degradation of polymer chains (with degradation of the polymer chains as a result) [38]. Additionally, the research carried out by this team has demonstrated that silicone tubes are more resistant to degradation than tubes made of polyvinyl chloride or polyurethane [38].

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Ethical Approval

The study was approved by the Ethics Committee of the Jagiellonian University Medical College (KBET/1072.6120.153.2019).

#### 4.2. Bacterial Strains, Identification and Growth Conditions

Tracheal secretion cultures were collected from 53 tracheostomy tubes (TTs) used to treat adult patients admitted to the Department of Otolaryngology and Oncological Surgery of the Head and Neck Surgery (ORL) and the Department of Anesthesiology and Intensive Therapy (OAIT), 5th Military Hospital with Polyclinic in Krakow (Poland), during a 30-month period, from July 2017 to December 2019. The tested materials were inoculated onto BD™ Columbia Agar with 5% Sheep Blood (BBL, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) and BBL™ MacConkey II Agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Of the total number of samples, 18 grew *K. pneumoniae*, which was identified by the analysis of biochemical profiles of the isolates using the miniAPI System with API 20E test (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), according to the manufacturer's instructions. All isolates were stored in the Mikrobank™ Preservation System (BIOMAXIMA, Lublin, Poland) at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further investigation.

#### 4.3. Antibiotic Susceptibility Testing

Antibiotic susceptibility testing was performed by the E-test method according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines [39]. The antibiotics (The Liofilchem® MIC Test Strips, Roseto degli Abruzzi, Italy) evaluated included: amikacin (0.016–256 µg/mL); gentamicin (0.016–256 µg/mL); netilmicin (0.016–256 µg/mL); tobramycin (0.016–256 µg/mL); ciprofloxacin (0.002–32 µg/mL); levofloxacin (0.002–32 µg/mL); moxifloxacin (0.002–32 µg/mL); ofloxacin (0.002–32 µg/mL); imipenem (0.002–32 µg/mL); meropenem (0.002–32 µg/mL); ertapenem (0.002–32 µg/mL); doripenem (0.002–32 µg/mL); colistin (0.016–256 µg/mL); trimethoprim-sulfamethoxazole (0.002–32 µg/mL); piperacillin (0.016–256 µg/mL); ceftriaxone (0.016–256 µg/mL); ceftazidime (0.016–256 µg/mL); cefotaxime (0.016–256 µg/mL); cefepime (0.016–256 µg/mL); aztreonam (0.016–256 µg/mL) and cefuroxime (0.016–256 µg/mL). Production of extended spectrum beta-lactamases (ESβLs), including ceftazidime and cefotaxime, was screened with clavulanate by the double disk synergism method according to the CLSI criteria [40]. *K. pneumoniae* ATCC®700603™ and *Escherichia coli* ATCC®25922™ were used as positive and negative controls, respectively.

#### 4.4. Biofilm Production Assay

Biofilm formation in the studied *K. pneumoniae* was evaluated according to the method published by Christensen et al., with a few modifications [24]. Fresh colonies of *K. pneumoniae* isolates were used to inoculate 3 mL BACTO™ Tryptic Soy broth (TSB, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The cultures were incubated aerobically for 24 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Following incubation, the number of cells in each culture was quantified and adjusted to 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL), then the cultures were diluted 1:100 with fresh medium. A sterile individual plate with 12 flat-bottom polystyrene wells (Corning® Costar®, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was filled with 3 mL of the diluted culture. *K. pneumoniae* ATCC®700603™ was used as a positive control strain in the biofilm assays and was also processed in a similar manner. Sterile TSB was incorporated as a negative control. The inoculated microtiter plates were incubated on a shaking platform at  $37^{\circ}\text{C}$  for 48 h. Subsequently, the wells were gently washed three times with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Lonza, pH = 7.4) to remove free-floating bacteria. Biofilm mass was fixed with methanol and stained with 1% crystal violet (CV, Sigma-Aldrich) for 20 min. The plates were washed exhaustively with distilled water and set aside to dry. Optical density (OD) measurement was performed using a microplate reader Tecan Infinite® 200 PRO (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) at a wavelength of 595 nm supported by the i-control 2.0.10.0. software. The experiment was performed in triplicate. The interpretation for biofilm production was made according to the criteria of Stepanovic et al. [31].



#### 4.5. Multiplex PCRs for $\beta$ -Lactamase Encoding Genes (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M-type</sub>)

Genes encoding SHV, TEM extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ES $\beta$ Ls) were detected via multiplex polymerase chain reactions (PCRs) [28]. *bla*<sub>CTX-M-type</sub> gene families (*bla*<sub>CTX-M</sub> group 1, *bla*<sub>CTX-M</sub> group 9) were detected according to Xu et al. [29].

#### 4.6. PCR Detection of Fimbrial Genes

The presence of type 1 and 3 pili and ECP (*ecpA*, *fimA*, *fimH*, *mrkA* and *mrkD*)—major structural fimbrial genes—was determined by DNA amplification using specific primers, as described by other research teams [35]. *K. pneumoniae* ATCC<sup>®</sup>700603<sup>™</sup> was employed as a positive control for type 1 and type 3 pili production.

#### 4.7. Genotyping by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

To determine the genetic relatedness of the studied *K. pneumoniae*, PFGE analysis was performed as previously described [14,36]. Chromosomal DNA of isolates was prepared as described elsewhere [14,26]. DNA fragments were prepared by *Xba*I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) restriction analysis and separated by PFGE using a CHEF DR<sup>®</sup>II System (Bio-Rad<sup>®</sup>, Hercules, CA, USA). PFGE profiles were compared according to their percentage of similarity estimated by the Dice coefficient and clustered by UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages) using the GelCompar II software, version 6.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Restriction fragment analysis was used to define clonal related or unrelated isolates according to the Tenover criteria [37]. *K. pneumoniae* ATCC<sup>®</sup>700603<sup>™</sup> was used as a reference strain.

#### 4.8. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Two types of sterile tracheostomy tubes were used in this study as substrate biomaterials for scanning electron microscopy (SEM) observation: polyethylene (PE, Demed, Mikołów, Poland) and polyvinyl chloride (PVC, SUMI, Sulejówek, Poland). Adult tracheostomy tubes with an internal diameter of 9.5 mm were examined. For negative controls, samples of each tracheostomy tube were placed in TSB without bacteria. The experimental arm consisted of samples of each tracheostomy tube in a separate solution of *K. pneumoniae* alone. For SEM, we followed a protocol established by Jarrett et al. [41] to grow bacteria to a concentration of 106 colony forming units (CFU) per mL. A standardized laboratory strain of *K. pneumoniae* was inoculated in tryptic soy broth (TSB), a nonselective, enriched, liquid growth medium. The bacterial strain was grown to a logarithmic phase over 24 h at 37 °C. Next, the bacteria were harvested by centrifugation at 2000 rpm at 25 °C for 15 min. Three cycles of centrifugation were performed to ensure thorough bacterial isolation. Bacterial isolates were redispersed in 20 mL of TSB in sterile Falcon<sup>™</sup> Round-Bottom Polystyrene Tubes and serially diluted to a concentration of 106 CFU/mL based on McFarland turbidity. For negative controls, samples of each tracheostomy tube were placed in TSB without bacteria. The experimental arm consisted of samples of each tracheostomy tube in a separate solution of *K. pneumoniae* alone. All culture tubes were maintained at 37 °C for 48 h to promote biofilm formation. The samples were removed and rinsed ten times with 35 mL of sterile water to remove free bacteria and debris that were not attached to the samples. In preparation for scanning electron microscopy (SEM), each TT fragment was fixed in a 2.5% glutaraldehyde solution (Sigma-Aldrich) in 0.1 M DPBS for 24 h, rinsed with DPBS 2 × 10 min at room temperature and dehydrated in a graded series of ethanol concentrations (50%, 75%, 80%, 96%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) for 10 min in each solution and twice for 30 min in 99.8% ethanol at room temperature. Finally, the samples were placed in a transitional liquid (100% acetone) and transferred to a Critical Point Dryer (CPD E 3000/E3100, Quorum Technologies, Lewes, UK). Ready biomaterials were mounted on aluminum tables, sputter coated with gold particles and examined with a Hitachi S-4700 FE-SEM.

#### 4.9. Statistical Analysis

Boxplots were created with the use of STATISTICA (version 13.3, Santa Clara, CA, USA) in order to visualize the mean value of absorbance (od 595 nm) by the tested strains.

#### 5. Conclusions

Proven susceptibility of TT biomaterials to colonization by *K. pneumoniae* means that the attention of research groups should be focused on achieving a better understanding of the bacterial pathogens that form biofilms on the surfaces of TTs. In addition, research efforts should focus on the development of new biomaterials or on the modification of existing materials in order to prevent bacterial adhesion to their surfaces.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.O., Ł.Ś. and M.B.-W.; methodology, D.O., Ł.Ś. and M.B.-W.; software, D.O.; validation, D.O., Ł.Ś. and M.B.-W.; formal analysis, D.O.; investigation, D.O.; resources, Ł.Ś.; data curation, D.O. and Ł.Ś.; writing—original draft preparation, D.O.; writing—review and editing, D.O., Ł.Ś. and M.B.-W.; visualization, D.O.; supervision, M.B.-W.; funding acquisition, D.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Jagiellonian University Medical College, grant number N41/DBS/000456. Publication was funded by the Priority Research Area qLife under the program “Excellence Initiative—Research University” at the Jagiellonian University in Krakow.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the *Bioethics Committee of the Jagiellonian University in Krakow, Poland* (KBET/1072.6120.153.2019).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data sharing not applicable.

**Acknowledgments:** The authors gratefully acknowledge Kamil Drożdż for his participation in the study and assistance in carrying out the experiments. Scanning electron microscopy was made possible by the kind and considerable support of the Institute of Geological Science of the Jagiellonian University in Krakow. We would also like to thank Magdalena Jarosz (Electrochemistry Group of the Jagiellonian University) for her assistance with the photographic work. A special thank you to Katarzyna Gašior-Kulasiak for English language editing.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Cader, S.H.A.; Shah, F.A.; Nair, S.K.G.R. Tracheostomy colonisation and microbiological isolates of patients in intensive careunits—A retrospective study. *World J. Otorhinolaryngol.-Head Neck Surg.* **2020**, *6*, 49–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Weissbrod, P.A.; Merati, A.L. Is percutaneous dilational tracheotomy equivalent to traditional open surgical tracheotomy with regard to perioperative and postoperative complications? *Laryngoscope* **2012**, *122*, 1423–1424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Szmuk, P.; Ezri, T.; Evron, S.; Roth, Y.; Katz, J. A brief history of tracheostomy and tracheal intubation, from the Bronze Age to the Space Age. *Intensive Care Med.* **2008**, *34*, 222–228. [[CrossRef](#)]
4. Percival, S.L.; Suleman, L.; Vuotto, C.; Donelli, G. Healthcare-Associated infections, medical devices and biofilms: Risk, tolerance and control. *J. Med. Microbiol.* **2015**, *64*, 323–334. [[CrossRef](#)]
5. El Cheikh, M.R.; Barbosa, J.M.; Caixêta, J.A.S.; Avelino, M.A.G. Microbiology of tracheal secretions: What to expect with children and adolescents with tracheostomies. *Int. Arch. Otorhinolaryngol.* **2018**, *22*, 50–54. [[CrossRef](#)]
6. Rouzé, A.; Jaillette, E.; Poissy, J.; Préau, S.; Nseir, S. Tracheal tube design and ventilator-associated pneumonia. *Respir. Care.* **2017**, *62*, 1316–1323. [[CrossRef](#)]
7. Chastre, J.; Fagon, J. State of the Art Ventilator-associated Pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2002**, *165*, 867–903. [[CrossRef](#)]
8. Lepointeur, M.; Ogna, A.; Clair, B.; Dinh, A.; Tarragon, C.; Prigent, H.; Davido, B.; Barbot, F.; Vaugier, I.; Afif, M.; et al. Risk factors for respiratory tract bacterial colonization in adults with neuromuscular or neurological disorders and chronic tracheostomy. *Respir. Med.* **2019**, *152*, 32–36. [[CrossRef](#)]
9. McAfee, J.S.; Demarcantonio, M.; Fine, B.R.; Beydoun, H.; Derkay, C. Prevalence of ventilation tubes in children with a tracheostomy tube. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **2013**, *77*, 65–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Chung, P.Y. The emerging problems of infections: Carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **2016**, *363*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Bryers, J.D. Medical biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *100*, 1–18. [[CrossRef](#)]

12. Piperaki, E.T.; Syrogiannopoulos, G.A.; Tzouveleakis, L.S.; Daikos, G.L. *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2017**, *36*, 1002–1005. [\[CrossRef\]](#)
13. Solomon, D.H.; Wobb, J.; Buttar, B.A.; Truant, A.; Soliman, A.M.S. Characterization of bacterial biofilms on tracheostomy tubes. *Laryngoscope* **2009**, *119*, 1633–1638. [\[CrossRef\]](#)
14. Alcántar-Curiel, M.D.; Ledezma-Escalante, C.A.; Jarillo-Quijada, M.D.; Gayosso-Vázquez, C.; Morfin-Otero, R.; Rodríguez-Noriega, E.; Cedillo-Ramirez, M.L.; Santos-Preciado, J.I.; Girón, J.A. Association of Antibiotic Resistance, Cell Adherence, and Biofilm Production with the Endemicity of Nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 7012958. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Seifi, K.; Kazemian, H.; Heidari, H.; Rezagholizadeh, F.; Saei Shirvani, F.; Houri, H. Evaluation of biofilm formation among *Klebsiella pneumoniae* isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur J. Microbiol.* **2016**, *9*, 2–7. [\[CrossRef\]](#)
16. Cruz-Córdova, A.; Esteban-Kenel, V.; Espinosa-Mazariego, K.; Ochoa, S.A.; Espinosa, M.; de la Garza, D.; Fernández Rendón, E.; López Villegas, E.O.; Xicothencotl-Cortes, J. Hospital Infantil de México Pathogenic determinants of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **2014**, *71*, 15–24.
17. Samia, B.; Hafida, H.; Damien, B.; Nicolas, C.; Imane, M.H.; Ibtissem, K.T.; Merieme, L.; Wafae, D.; Christiane, F. Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen, Algeria. *African J. Microbiol. Res.* **2013**, *7*, 5558–5564. [\[CrossRef\]](#)
18. Inglis, T.J.J.; Millar, M.R.; Jones, J.G.; Robinson, D.A. Tracheal tube biofilm as a source of bacterial colonization of the lung. *J. Clin. Microbiol.* **1989**, *27*, 2014–2018. [\[CrossRef\]](#)
19. LeChevallier, M.W.; Cawthon, C.D.; Lee, R.G. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 2492–2499. [\[CrossRef\]](#)
20. Poelaert, J.; Pieter Depuydt, P.; De Wolf, A.; Van de Velde, S.; Herck, I.; Blot, S. Polyurethane cuffed endotracheal tubes to prevent early postoperative pneumonia after cardiac surgery: A pilot study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2008**, *135*, 771–776. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Mahmodiyeh, B.; Kamali, A.; Zarinfar, N.; Mohammadi Joushani, M. The Effect Of Silver-Coated Endotracheal Tube On The Incidence Of Ventilator-Induced Pneumonia In Intubated Patients Admitted To The Intensive Care Unit (ICU). *Syst. Rev. Pharm.* **2021**, *12*, 254–262.
22. Kollef, M.H.; Afessa, B.; Anzueto, A.; Veremakis, C.; Kerr, K.M.; Margolis, B.D.; Craven, D.E.; Roberts, P.R.; Arroliga, A.C.; Hubmayr, R.D.; et al. Silver-coated endotracheal tubes and incidence of ventilator-associated pneumonia: The NASCENT randomized trial. *JAMA* **2008**, *300*, 805–813. [\[CrossRef\]](#)
23. Thorarindottir, H.R.; Kander, T.; Holmberg, A.; Petronis, S.; Klarin, B. Biofilm formation on three different endotracheal tubes: A prospective clinical trial. *Crit. Care* **2020**, *24*, 382. [\[CrossRef\]](#)
24. Mann, E.E.; Magin, C.M.; Mettetal, M.R.; May, R.M.; Henry, M.M.; Deloid, H.; Prater, J.; Sullivan, L.; Thomas, J.G.; Twite, M.D.; et al. Micropatterned Endotracheal Tubes Reduce Secretion-Related Lumen Occlusion. *Ann. Biomed. Eng.* **2016**, *44*, 3645–3654. [\[CrossRef\]](#)
25. Pinciroli, R.; Mietto, C.; Piriapatsom, A.; Chenelle, C.T.; Thomas, J.G.; Pirrone, M.; Bry, L.; Wojtkiewicz, G.R.; Nahrendorf, M.P.; Kacmarek, R.M.; et al. Endotracheal Tubes Cleaned With a Novel Mechanism for Secretion Removal: A Randomized Controlled Clinical Study. *Respir. Care* **2016**, *61*, 1431–1439. [\[CrossRef\]](#)
26. Mishra, S.K.; Basukala, P.; Basukala, O.; Parajuli, K.; Pokhrel, B.M.; Rijel, B.P. Detection of Biofilm Production and Antibiotic Resistance Pattern in Clinical Isolates from Indwelling Medical Devices. *Curr. Microbiol.* **2014**, *70*, 128–134. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Zheng, J.; Lin, Z.W.; Chen, C.; Chen, Z.; Lin, F.J.; Wu, Y.; Yang, S.-Y.; Sun, X.; Yao, W.-M.; Li, D.-Y.; et al. Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of *wcaG*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 1–9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Latifpour, M.; Gholipour, A.; Damavandi, M.S. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in nosocomial and community-acquired urinary tract infections. *Jundishapur J. Microbiol.* **2016**, *9*, e31179. [\[CrossRef\]](#)
29. Xu, L.; Ensor, V.; Gossain, S.; Nye, K.; Hawkey, P. Rapid and simple detection of bla CTX-M genes by multiplex PCR assay. *J. Med. Microbiol.* **2005**, *54*, 1183–1187. [\[CrossRef\]](#)
30. Christensen, G.D.; Simpson, W.A.; Younger, J.J.; Baddour, L.M.; Barrett, F.F.; Melton, D.M.; Beachey, E.H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* **1985**, *22*, 996–1006. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukić, S.; Ćirković, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylo-484 cocci. *Apmis* **2007**, *115*, 891–899. [\[CrossRef\]](#)
32. Hassan, A.; Usman, J.; Kaleem, F.; Omair, M.; Khalid, A.; Iqbal, M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz. J. Infect. Dis.* **2011**, *15*, 305–311. [\[CrossRef\]](#)
33. Kuinkel, S.; Acharya, J.; Dhungel, B.; Adhikari, S.; Adhikari, N.; Thapa Shrestha, U.; Megha Raj Banjara, M.; Raj Rijal, K.; Ghimire, P. Biofilm Formation and Phenotypic Detection of ESBL, MBL, KPC and AmpC Enzymes and Their Coexistence in *Klebsiella* spp. Isolated at the National Reference Laboratory, Kathmandu, Nepal. *Microbiol. Res.* **2021**, *12*, 683–697. [\[CrossRef\]](#)

34. Silva, B.S.N.; Alves, G.V.P.; de Andrade Marques, L.; Silva, S.F.S.; de Oliveira Faria, G.; de Araújo, B.L.; dos Santos Pedroso, R.; Penatti, A.P.M.; de Paula Menezes, R.; von Dolinger de Brito, R. 'Duantification of biofilm produced by clinical, environment and hands' isolates *Klebsiella* species using colorimetric and classical methods. *J. Microbiol. Methods* **2021**, *185*, 106231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Alcántar-Curiel, M.D.; Blackburn, D.; Saldaña, Z.; Gayosso-Vázquez, C.; Iovine, N.; De la Cruz, M.A.; Girón, J.A. Multifunctional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence* **2013**, *4*, 129–138. [[CrossRef](#)]
36. Han, H.; Zhou, H.; Li, H.; Gao, Y.; Lu, Z.; Hu, K. Optimization of Pulse-Field Gel Electrophoresis for Subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Environmental Res. Public Health* **2013**, *10*, 2720–2731. [[CrossRef](#)]
37. Tenover, F.C.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V.; Mickelsen, P.A.; Murray, B.E.; Persing, D.H.; Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **1995**, *33*, 2233–2239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Björling, G.; Axelsson, S.; Johansson, U.B.; Lysdahl, M.; Markström, A.; Schedin, U.; Aune, R.E.; Frostell, C.; Karlsson, S. Clinical use and material wear of polymeric tracheostomy tubes. *Laryngoscope* **2007**, *117*, 1552–1559. [[CrossRef](#)]
39. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 9.0, Valid from 2019-01-01. Available online: <http://www.eucast.org> (accessed on 1 January 2019).
40. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; CLSI supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018; p. 282.
41. Jarrett, W.A.; Ribes, J.; Manaligod, J.M. Biofilm formation on tracheostomy tubes. *Ear Nose Throat J.* **2002**, *81*, 659–661. [[CrossRef](#)]

### 8.3 Publikacja nr 3

**Dorota Ochońska, Aldona Olechowska-Jarząb, Anna Dobrut, Małgorzata Bulanda, Monika Brzychczy-Włoch. Studies on molecular epidemiology of ESβL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients hospitalized in a specialist hospital in southern Poland. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* 2021,75:970-979. DOI:10.2478/ahem-2021-0039. Punktacja MNiSW:40, IF:0,270**

# Studies on molecular epidemiology of ESβL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients hospitalized in a specialist hospital in southern Poland

Dorota Ochońska<sup>1</sup>, Aldona Olechowska-Jarząb<sup>2</sup>, Anna Dobrut<sup>1</sup>, Małgorzata Bulanda<sup>1</sup>, Monika Brzychczy-Włoch<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Medical Microbiology, Chair of Microbiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

<sup>2</sup>Center for Innovative Laboratory Diagnostics, John Paul II Hospital, Krakow, Poland

## Abstract

**Introduction.** Extended-spectrum β-lactamase (ESβL)-producing *Klebsiella pneumoniae* is currently one of the most common causes of nosocomial infections worldwide. The study aimed to characterize antibiotic resistance profile, the prevalence of selected genes encoding ESβLs, virulence, and the genetic relationship in 139 *K. pneumoniae* isolates identified in John Paul II Specialist Hospital in Southern Poland, collected in 2016.

**Materials/Methods.** Bacterial identification and the preliminary antibiotic susceptibilities was performed using the VITEK® 2 Compact automated system. Genes encoding ESβLs were amplified by CTX-Mplex PCR and PCR reactions. The presence of nine genes encoding virulence factors was studied by multiplex PCR. Clonality was investigated by PFGE after digestion with *SpeI* endonuclease.

**Results.** *K. pneumoniae* were mostly recovered from the respiratory tract (40.3%), urine (32.4%), wound swabs (19.4%) and blood (5%). In summary, 82.7% of strains were classified as multidrug resistant (MDR). All isolates were confirmed as ESβL producers and carried *bla*<sub>CTX-M-type</sub> (85.6%), *bla*<sub>SHV</sub> (82%), *bla*<sub>TEM</sub> (77.7%), *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (75.6%) and *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (1.4%) in various combinations. Moreover, triple *bla* genes were observed in 72% of isolates. The most common virulence-associated genes found among the isolates were *entB* (91.4%), *ybtS* (55.4%), *iutA* (55.4%), *magA* (53.2%), *kfu* (14.4%), *K2* (11.5%), *mrkD* (10.1%), *rmpA* (7.9%) and *aII*S (5%). The PFGE analysis identified 4 major clusters (A–D) comprising 61% of the entire collection.

**Conclusions.** Our results indicate that the presence of a wide variety of MDR *K. pneumoniae* harbor ESβLs and virulence genes. Studies on molecular epidemiology of ESβL-producing *K. pneumoniae* isolates are needed, particularly for epidemiological surveillance in the hospital environment.

## Keywords

ESβL-producing *K. pneumoniae* • MDR • molecular epidemiology • PFGE • virulence-associated genes

Received: 02.12.2020, Accepted: 09.08.2021

## INTRODUCTION

The effective worldwide spread of extended-spectrum β-lactamase (ESβL)-producing *Enterobacteriaceae*, particularly *Klebsiella pneumoniae*, remains a critical concern for therapies against multidrug-resistant (MDR) bacteria [1]. *K. pneumoniae* is an opportunistic ESKAPE pathogen responsible for a wide spectrum of infections, including bacteremia, pneumonia, meningitis, purulent abscesses, urinary tract infections, and wound infections, at diverse sites [2]. Additionally, *K. pneumoniae* is known for its high prevalence and variety of antimicrobial resistance (AMR) genes [3]. These microorganisms are intrinsically resistant to ampicillin due to the presence of the SHV-1

penicillinase in their chromosomes. Resistance to additional drugs sporadically occurs through chromosomal mutations; however, most AMR in this species results from acquisition of these genes via HGT (horizontal gene transfer) mainly via large conjugative plasmids [3]. The most common mechanism of resistance to oxyimino-cephalosporins observed in *K. pneumoniae* is the production of ESβLs (extended-spectrum β-lactamases), followed by AmpC-like cephalosporinases, and KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) [4].

ESβLs are β-lactamases able of conferring bacterial resistance to the penicillins; first-, second-, third-generation cephalosporins; and aztreonam (but not the cephamycins or carbapenems) by hydrolysis of these antibiotics, which are inhibited by β-lactamase inhibitors such as clavulanic

\*Corresponding author e-mail: mbrzych@cm-uj.krakow.pl

© 2021 Brzychczy-Włoch et al., This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 License.



acid [5]. In recent years, most ES $\beta$ L-producing organisms have also been found to be resistant to other major classes of antibiotics, such as aminoglycosides, fluoroquinolones, and sulfonamides, owing to the coexistence of associated resistant genes encoded in and transmitted by plasmids [6].

ES $\beta$ L-producing bacteria were first detected in Europe in the 1980s. Although the initial reports were from Germany and England, the vast majority of reports in the first decade after the discovery of ES $\beta$ LS were from France [5]. According to the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997 to 2016), the prevalence rate of ES $\beta$ L-producing *Enterobacteriaceae* in 4 main geographic areas is high, although the rates vary substantially in different regions: Europe (19.5%), North America (12.3%), Latin America (11%), and Asia-Pacific (10.2%) [7]. The study conducted in 16 European countries over 20 years reported that ES $\beta$ L screen-positive *Enterobacteriaceae* showed an increasing trend from 10.3% in 1997–2000 to 24% in 2013–2016, and the percentage of ES $\beta$ L screen-positive *K. pneumoniae* isolates increased from 7.1% to 19.4% [7]. In this global survey, MDR *K. pneumoniae* rates decreased from 18.9% in 2013 to 15.8% in 2016; however, in many European countries these rates ranged from 16.9% to 55.7% in 2016 [7]. Meanwhile, the proportions of MDR *K. pneumoniae* in the study by Chong *et al.* in 2018 were 15%–60% [1]. By contrast, already in 2016, Morris *et al.* published data from the European Antimicrobial Surveillance Network which indicated that across Europe the percentages of invasive *K. pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins ranged from 0% to 70.1%, with ES $\beta$ L producers accounting for between 85% and 100% of all strains reported [8].

The global problem of the presence of ES $\beta$ L-producing *K. pneumoniae* is treated with great care; but still, the epidemiological situation in individual countries varies. In Poland, it is diverse, as it ranges from sporadic cases to dangerous epidemic outbreaks. Due to the small number of scientific reports on the spread of pathogenic *K. pneumoniae* strains in southern Poland, there is a need to learn more about the epidemiological situation in highly specialized hospitals in this area. This need served as a launching pad for carrying out this study.

Our work aimed to characterize a collection the clinical isolates of *K. pneumoniae* with an emphasis on the antibiotic resistance profile, identification of ES $\beta$ L genes, virulence-associated gene detection, and the genetic relationship, thereby helping guide the monitoring of the status, prevalence, and intra-hospital spread of such pathogenic strains.

## MATERIAL AND METHODS

### Bacterial strains

A total of 139 *K. pneumoniae* isolates were collected from adult patients hospitalized at the John Paul II (JPII) Specialist Hospital in Krakow (Poland). The study period ran from January 1 to December 31, 2016. Most of the patients came from five different hospital wards: Cardiology and Cardiac Surgery with Cardiac Rehabilitation and Prevention (CARDIO); Pulmonology and Chest Medicine (PULMO); Neurology (NEURO); The Ward of Pediatric Infectious Diseases and Hepatology (INFECT DIS); and The Center for Diagnosis, Prevention and Telemedicine (DIAGNOST). *K. pneumoniae* isolates were mainly obtained from the respiratory tract (40.3%, *n*=56) and included: bronchial aspirates (62.5%, *n*=35); bronchoalveolar lavage, BAL (16.1%, *n*=9); sputum (10.7%, *n*=6); microball (3.6%, *n*=2); sore swabs (3.6%, *n*=2); pleural fluid (1.8%, *n*=1); and vac swab (1.8%, *n*=1). Isolates were also derived from: urine (32.4%, *n*=45); wound swabs (19.4%, *n*=27); blood (5%, *n*=7); fecal samples (1.4%, *n*=2); catheter JJ (0.8%, *n*=1); and urethral swab (0.8%, *n*=1).

### Data collection

The demographic information (sample type, ward) of the patients and ES $\beta$ L-producing isolate information (number, infectious site, and antibiotic susceptibility profile) were collected from the microbiological laboratory in the hospital.

### Species identification, antimicrobial susceptibility testing, and phenotype definitions

The initial species identification, performed by the laboratory staff as part of routine diagnostics, was based on the assays of biochemical profiles of the isolates using the VITEK® 2 Compact system with GN ID card (bioMérieux, France). In vitro susceptibility of *K. pneumoniae* to 15 antibacterial agents including penicillins (amoxicillin/clavulanic acid, piperacillin/tazobactam), cephalosporins (ceftazidime, cefotaxime, cefepime), carbapenems (imipenem, meropenem), monobactams (aztreonam), aminoglycosides (amikacin, gentamicin), fluoroquinolones (ciprofloxacin, norfloxacin), and miscellaneous agents (colistin, nitrofurantoin, trimethoprim/sulfamethoxazole) was analyzed by the VITEK® 2 Compact system with AST-N332 cards according to the EUCAST recommendations and interpreted according to the EUCAST breakpoints [9]. The reference strain was *Escherichia coli* ATCC® 25922™. ES $\beta$ L production was confirmed by the standard double disc synergy test (DDST) [10]. Multidrug-resistant (MDR) isolates were defined as non-susceptible to at least one agent in three or more antibiotic categories in accordance with the international protocol proposed by Magiorakos *et al.* [11].

### ES $\beta$ L gene identification

Confirmed ES $\beta$ L-producing strains were screened for *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> by polymerase chain reaction (PCR) assays using primers and protocols as described previously [12]. A multiplex PCR assay (CTX-Mplex PCR) was used to detect *bla*<sub>CTX-M-type</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-9</sub> genes, as described by Xu et al. [13].

### Virulence-associated gene detection

Multiplex PCR assays as published by Compain et al. were used to detect the presence of nine virulence-associated genes, including those encoding for regulators of capsular serotype K1 and hypermucoviscosity phenotype (*magA*), capsular serotype K2 and hypermucoviscosity phenotype (K2), mucoid phenotype A (*rmpA*), type 3 adhesins (*mrkD*), allantoin metabolism (*allS*), iron transport and phosphotransferase function (*kfu*), enterobactin (*entB*), yersiniabactin (*ybtS*) and aerobactin siderophore system (*iutA*) [2].

### Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

The genetic relatedness of the ES $\beta$ L-producing *K. pneumoniae* isolates was examined by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) following the extraction of genomic DNA and digestion with *SpeI* as the restriction enzyme and under the following experimental conditions: 0.5 s–20 s pulses for 18 h, 14°C, 6V/cm<sup>2</sup> [14]. *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705™ was used as the reference strain. The electrophoresis was run on the CHEF DR®II system (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Images were captured on the Gel Doc 2000 system (Bio-Rad). The PFGE patterns were analyzed using GelCompar II and BioNumerics software packages (version 6.5, Applied Maths, Belgium). Similarity analysis was performed by Dice coefficients with customized tolerance of 1%. Additionally, PFGE types and subtypes were discerned visually according to the criteria by Tenover et al. [15].

### Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R (version 3.5.3; The R Foundation for Statistical Computing, Austria). Statistical significance was assessed via the Fisher's exact test for categorical variables in order to compare the resistance to selected antibiotics and the presence of virulence factors among the four main PFGE clonal types identified (A–D). The correlation analysis between virulence genes and resistance genes in the studied *K. pneumoniae* isolates was performed by calculating the Pearson's linear correlation coefficient ( $r_{xy}$ ). P-values of <0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

### Antibiotic resistance patterns

All examined *K. pneumoniae* (100%, n=139) were resistant to amoxicillin with clavulanic acid, ceftazidime, cefotaxime, cefepime, and aztreonam. These isolates also showed different degrees of resistance to other antibiotics, such as norfloxacin (99.3%, n=138); ciprofloxacin (90.6%, n=126); trimethoprim/sulfamethoxazole (88.5%, n=123); piperacillin/tazobactam (54.7%, n=76); gentamicin (68.3%, n=42); and amikacin (0.7%, n=1) [Fig. 1]. In summary, 82.7% (n=115) of the strains were classified as MDR.

### ES $\beta$ Ls

The isolates were phenotypically confirmed as ES $\beta$ L producers and carried *bla*<sub>CTX-M-type</sub> (85.6%, n=112); followed by *bla*<sub>SHV</sub> (82%, n=114) and *bla*<sub>TEM</sub> (77.7%, n=108). The strains produced mostly ES $\beta$ L-types CTX-M-9 (75.6%, n=105) and less frequently CTX-M-1 (1.4%, n=2). Our analysis of the co-occurrence of the detected ES $\beta$ L-encoding genes among the strains tested has revealed that the most common phenomenon is the co-existence of three genes observed in 72% (n=100) of the isolates, including *bla*<sub>CTX-M-9</sub>/*bla*<sub>SHV</sub>/*bla*<sub>TEM</sub> (65.5%, n=91); *bla*<sub>CTX-M-type</sub>/*bla*<sub>SHV</sub>/*bla*<sub>TEM</sub> (5.8%, n=8) and *bla*<sub>CTX-M-1</sub>/*bla*<sub>SHV</sub>/*bla*<sub>TEM</sub> (0.7%, n=1). We have even observed that 5% (n=7) of strains harbored *bla*<sub>CTX-M-9</sub>/*bla*<sub>SHV</sub>, 2.9% (n=4) of strains harbored *bla*<sub>CTX-M-9</sub>/*bla*<sub>TEM</sub>, 2.2% (n=3) of strains harbored *bla*<sub>SHV</sub>/*bla*<sub>TEM</sub>, and 1.4% (n=2) of strains harbored *bla*<sub>CTX-M-type</sub>/*bla*<sub>SHV</sub>. Nevertheless, considering 6.5% (n=9) of isolates having only a single  $\beta$ -lactamase gene, we noted a predominance of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (2.2%, n=3).

### Virulence

Multiplex polymerase chain reaction analysis demonstrated that the *kfu* and *mrkD* genes, encoding iron transport and phosphotransferase function and type 3 fimbrial adhesins, were present in 14.4% (n=20) and 10.1% (n=14) of isolates, respectively. The regulators of the mucoid phenotype A (*rmpA*) gene were detected in 7.9% (n=11) of isolates. Seven isolates (5%) were positive for *allS* gene encoding allantoin metabolism. Additionally, the enterobactin (*entB*) gene was found in 91.4% (n=127), the yersiniabactin (*ybtS*) gene in 55.4% (n=77), and the aerobactin siderophore system (*iutA*) gene in 55.4% (n=77) of isolates. Seventy-four isolates (53.2%) presented the capsular serotype K1 (*magA* gene), and the capsular K2 (*K2* gene) was found in 11.5% (n=16) of isolates. Thirty-nine combinations of genes encoding selected virulence factors were observed, with clear dominance of: *ybtS/entB/iutA* in 16.5% (n=23) of isolates, *ybtS/entB/magA* in 14.4% (n=20), and *ybtS/entB/iutA/magA* in 8.6% (n=12).



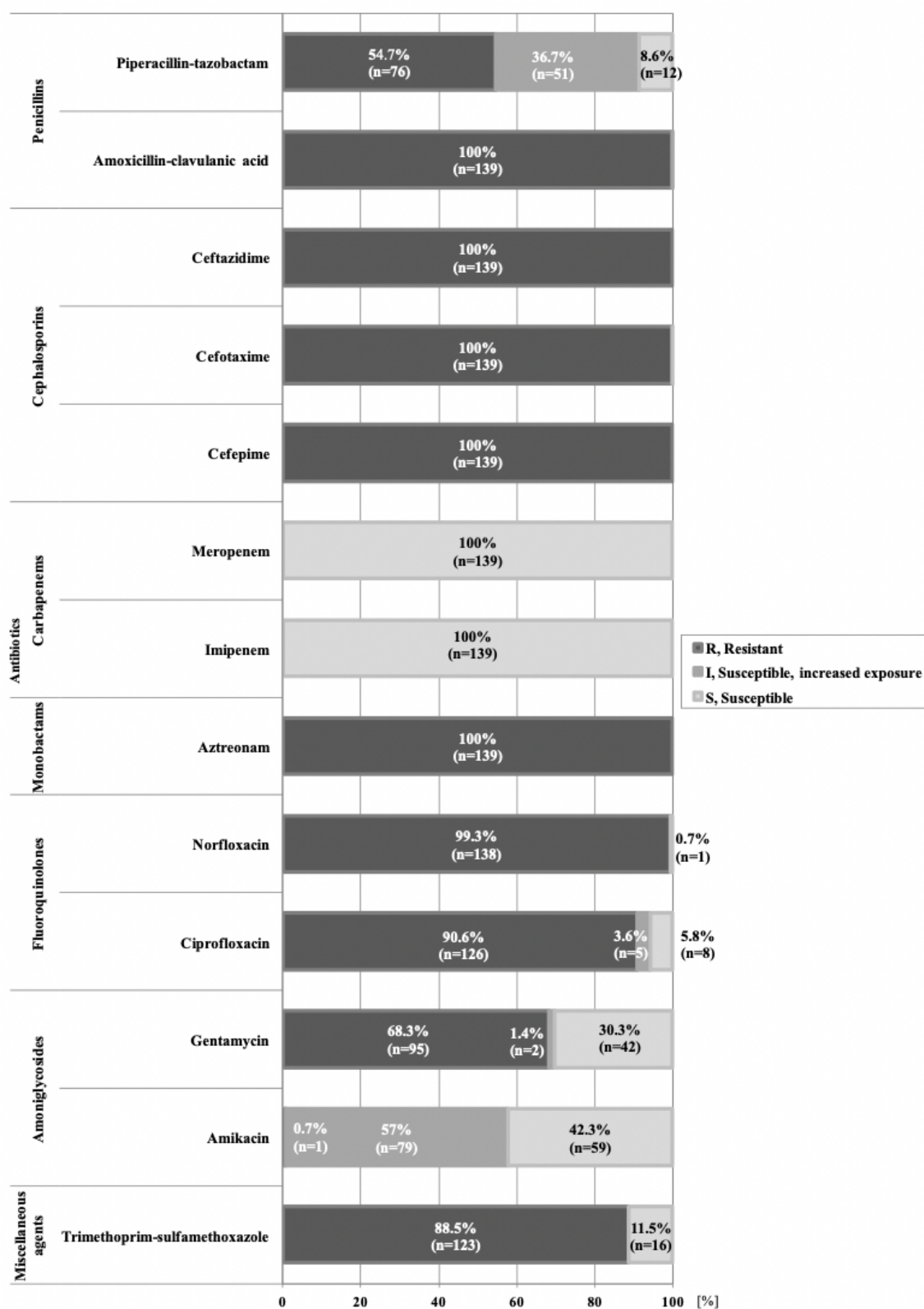


Figure 1: Antimicrobial resistance patterns of ESβL-producing *K. pneumoniae* isolates.

### Correlation between virulence genes and resistance genes

Twenty-five different combinations were observed based on the coexistence of virulence genes with resistance genes [Fig. 3]. The largest group of isolates ( $n=52$ , 37.4%) were strains with three genes encoding virulence factors and four resistance genes in different lists:  $bla_{SHV}/bla_{TEM}/bla_{CTX-M-type}/bla_{CTX-M-9}+ybtS/entB/iutA$  ( $n=17$ , 32.7%);  $bla_{SHV}/bla_{TEM}/bla_{CTX-M-type}/bla_{CTX-M-9}+ybtS/entB/magA$  ( $n=51$ , 28.8%);  $bla_{SHV}/bla_{TEM}/bla_{CTX-M-type}/bla_{CTX-M-9}+entB/iutA/magA$  ( $n=10$ , 19.2%);  $bla_{SHV}/bla_{TEM}/bla_{CTX-M-type}/bla_{CTX-M-9}+entB/iutA/magA$  ( $n=10$ , 19.2%);  $bla_{SHV}/bla_{TEM}/bla_{CTX-M-type}/bla_{CTX-M-9}+mrkD/entB/iutA$  ( $n=6$ , 11.5%);  $bla_{SHV}/bla_{TEM}/bla_{CTX-M-type}/bla_{CTX-M-9}+entB/kfu/magA$  ( $n=3$ , 5.8%);  $bla_{SHV}/bla_{TEM}/bla_{CTX-M-type}/bla_{CTX-M-9}+ybtS/entB/magA$  ( $n=1$ , 1.9%). The obtained Pearson's coefficient ( $r_{xy}=0.27$ ,  $P=0.001$ ) indicates a weak correlation ( $0.1 \leq r_{xy} < 0.3$ ) between the coexistence of virulence genes and resistance genes in the studied *K. pneumoniae* isolates.

### PFGE

PFGE identified 41 different profiles which fell into 4 major clusters (A–D) in 85 isolates (comprising 61% of the entire collection), based on a similarity of  $\geq 98\%$  (cut-off) [Fig. 2]. The largest cluster, A, accounted for 28.1% ( $n=39$ ) of all isolates and contained strains from four hospital wards, including 19 (48.7%) isolates from CARDIO, 15 (38.5%) from PULMO, 4 (10.2%) isolates from NEURO, and 1 (2.6%) isolate from the DIAGNOST ward. The next clusters were B (16.5%,  $n=23$ ) with 14 (60.9%) isolates from CARDIO, 6 (26%) isolates from PULMO, 2 (8.7%) isolates from NEURO, and 1 (4.3%) isolate from the DIAGNOST ward; cluster C (8.6%,  $n=12$ ) with 7 (58.3%) isolates from CARDIO, 3 (25%) isolates from PULMO, 1 (8.3%) isolate from INFECT DIS, and 1 (8.3%) isolate from the DIAGNOST ward; cluster D (7.2%,  $n=10$ ) with 7 (70%) isolates from CARDIO, 2 (50%) isolates from PULMO, and 1 (10%) isolates from INFECT DIS. Clone A was mostly isolates extracted from bronchial aspirates (46%), clones B and C were mostly isolates from urine (34.8% and 41.7%, respectively), clone D was mostly isolates from urine (50%). Isolates classified into clonal type A demonstrated a significantly higher sensitivity to trimethoprim/sulfamethoxazole than isolates from the other three main PFGE clonal types (B–D) ( $p=0.06$ ). Isolates classified into clonal type C demonstrated a significantly lower resistance to amikacin and piperacillin/tazobactam than isolates from the remaining main clonal types A, B, D ( $p<0.001$ ). Isolates classified into clonal type D showed a significantly higher sensitivity to gentamicin than isolates from the remaining clonal types A, B, and C ( $p<0.001$ ). As for other antibiotics, the results were not statistically significant. Among the main clonal types A–D, three subgroups were distinguished, which differed as regards the presence of

$bla_{SHV}$  statistically significantly ( $p<0.001$ ), starting from the highest detectability: D (93.75%), A (82.05%), B and C (79.17% and 77.78%, respectively). No statistically significant differences were found between the affiliation of the strains to main clonal types (A–D) and virulence, the type of the ward, or the kind of clinical material they were isolated from. The remaining strains, 16% ( $n=22$ ), were clustered into 7 minor clonal lineages: G ( $n=3$ ), H ( $n=3$ ), I ( $n=2$ ), J ( $n=2$ ), K ( $n=2$ ), L ( $n=2$ ), M ( $n=2$ ), and 32 singletons.

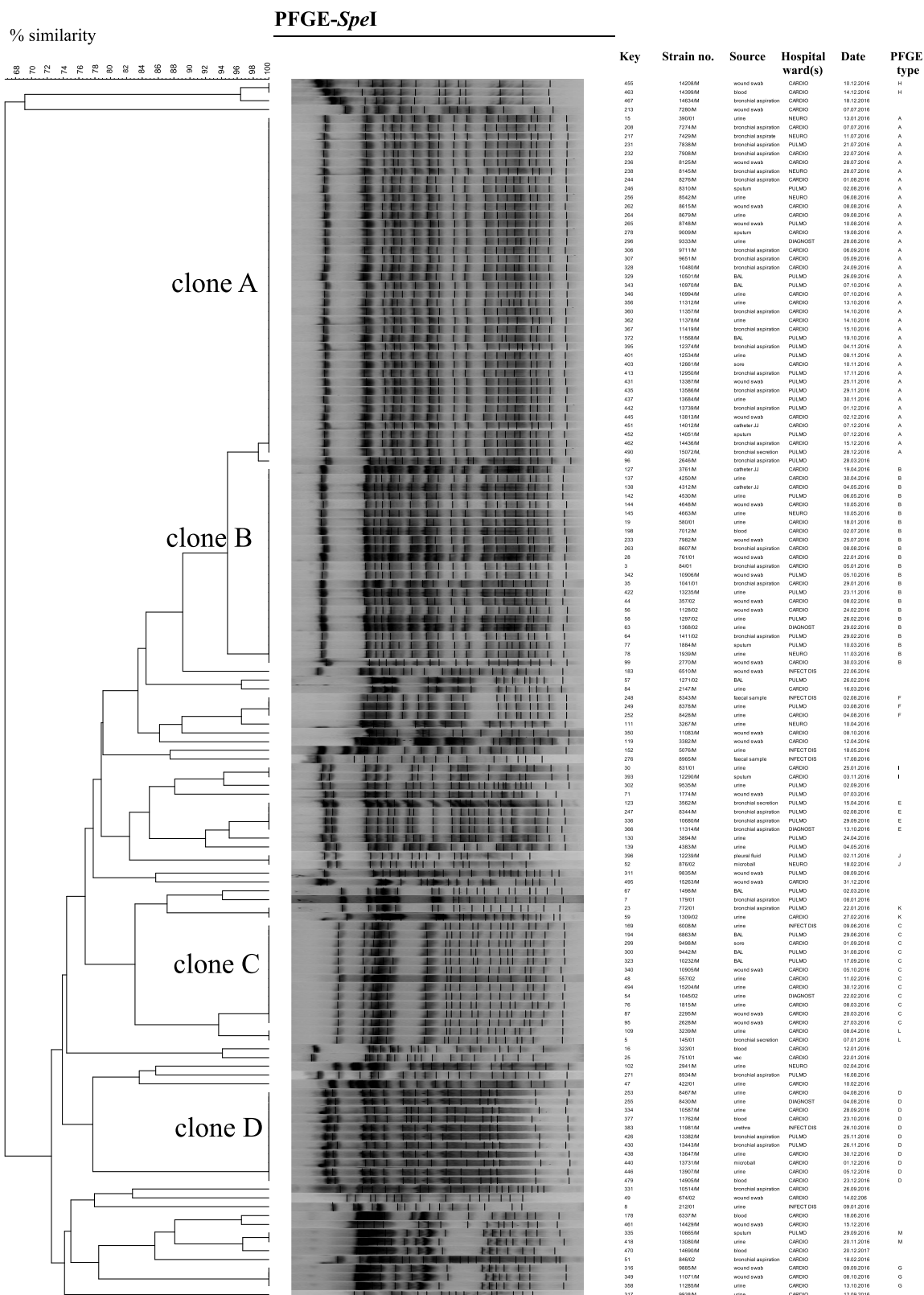
## DISCUSSION

ES $\beta$ L-producing *Enterobacteriaceae* are among the most common pathogens involved in nosocomial infections worldwide, with species other than *Escherichia coli* (especially *K. pneumoniae*) being increasingly reported in recent years [16].

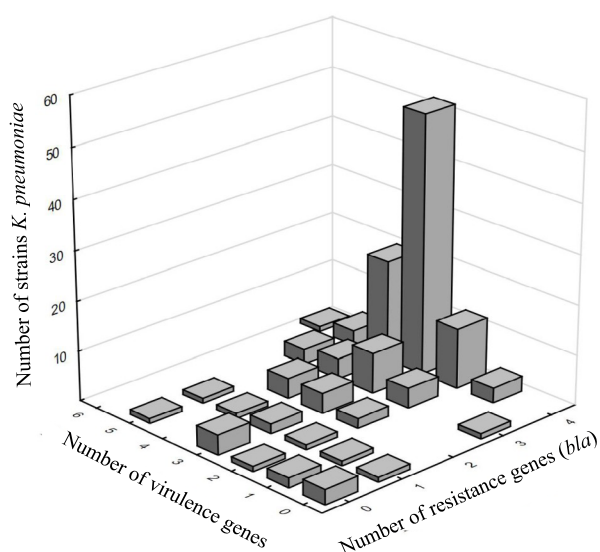
In *K. pneumoniae* rods, ES $\beta$ LS are still some of the most important mechanisms of drug resistance clinically and epidemiologically, due to their potential for rapid spread, as the genes encoding them are usually transferred on mobile genetic elements such as plasmids. Moreover, the widespread use of antibiotics has led to the emergence of MDR strains which accumulate mechanisms conditioning resistance to various groups of antibiotics. Currently, such strains are a global problem [3, 6, 7, 17]. Studies on molecular epidemiology of ES $\beta$ L-producing *K. pneumoniae* isolates are needed, particularly under multi-level epidemiological monitoring, which is considered essential to understanding trans-hierarchical evolutionary changes in antibiotic resistant populations, and ultimately to establish appropriate control interventions [16].

This study investigates drug resistance profiles, the presence of genes encoding selected virulence factors, and genetic diversity of the ES $\beta$ L-producing *K. pneumoniae* strain collection. Considering the latest research, this examination is part of a general trend of research on the molecular epidemiology of the species *K. pneumoniae*, and the obtained strain characterization results are similar to the results presented by other Polish authors [4, 18, 19, 20].

In their analysis of hospital-acquired infections caused by ES $\beta$ L-producing *K. pneumoniae*, Castanheira et al. demonstrated that these rods were mainly the cause of wound infections (20.8%), respiratory tract infections (16.3%), urinary tract infections (13%), and generalized infections (11.9%) [7]. Therefore, respiratory secretions, urine, wound swabs, and blood are the main materials from which these pathogens were isolated [7]. In our study, the greatest number of *K. pneumoniae* isolates (40.3%) came from materials from the respiratory tract, urine (32.4%), wound swabs (19.4%), and blood (5%). Similarly, Wang et al. described



**Figure 2.** Dendrogram illustrating the PFGE patterns of 139 ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates after restriction with *SpeI* enzyme. PFGE settings: Similarity coefficient: Dice, Optimization: 1%, Tolerance: 1%, Clustering method: UPGMA.



**Figure 3.** Correlation between virulence genes and resistance genes in ESβL-producing *K. pneumoniae* isolates. Pearson's correlation coefficient  $r_{xy}=0.27$ ,  $P=0.001$ .

most *K. pneumoniae* isolates that were cultured from urine (38.8%), materials from the respiratory tract (28.25%), followed by wound swabs (11.04%) and blood (7.22%) [6]. Correspondingly, most *K. pneumoniae* isolates characterized by Ranjbar et al. came from urine (63.75%), blood (37.5%), sputum (35.21%) and wounds (33.33%) [21].

The results of drug susceptibility testing as regards the *K. pneumoniae* collection under study demonstrated a resistance profile to β-lactam antibiotics that is typical of ESβL producers. All isolates were found to be resistant to several marker oxyimino-β-lactams of the ESβL mechanism: for instance, ceftazidime, cefotaxime, cefepime and aztreonam.

It should be underlined that our investigations revealed a high percentage (54.7%) of strains resistant to piperacillin/tazobactam. Similar results were obtained by other Polish researchers, Mrowiec et al., who recorded 53.5% of *K. pneumoniae* isolates resistant to this antibiotic in the adult population [18]. On the other hand, an investigation carried out by Korean researchers, Lee et al., found a lower percentage (20.9%) of *K. pneumoniae* strains which were resistant to piperacillin/tazobactam [22]. In his 1995 study, Livermore proved that ESβL-producing strains frequently turn out to be resistant in vitro to combinations of β-lactams with inhibitors, despite the fact that ESβLs, by definition, are inhibited by β-lactamase inhibitors (clavulanic acid, sulbactam, or tazobactam) [23]. Furthermore, literature data indicate that the development of resistance to piperacillin/tazobactam in clinical *K. pneumoniae* isolates may be the result of several different resistance mechanisms, including the hyperproduction of constitutive chromosomal

β-lactamases SHV-1 or the hyperproduction of TEM-1 β-lactamase due to the presence of either strong promoters or multiple  $bla_{TEM-1}$  copies [22]. In our study, among all isolates resistant to piperacillin/tazobactam, as many as 93.4% of the strains demonstrated the presence of several (2–3) variants of ESβL enzymes. Hence, the observed growing resistance to piperacillin/tazobactam in *K. pneumoniae* is caused by the co-occurrence of different variants of ESβL enzymes in individual strains.

In this study, examinations conducted using PCR confirmed the presence of genes encoding ESβL in all the studied *K. pneumoniae* isolates; in as many as 72% of the strains, genes belonging to three different families were detected: CTX-M-type (85.6%), SHV (82%), and TEM (77.7%). Within the cefotaxime group, however, a clear dominance of the CTX-M-9 enzyme group was demonstrated at 75.6%, while the presence of CTX-M-1 was confirmed in only two (1.4%) strains. The study showed a high percentage of isolates (65.5%) that were characterized by the coexistence of three genes:  $bla_{CTX-M-9}/bla_{SHV}/bla_{TEM-1}$ . We have even observed that 5% of strains harbored  $bla_{CTX-M-9}$  and  $bla_{SHV}$ , 2.9% of strains harbored  $bla_{CTX-M-9}$  and  $bla_{TEM-1}$ , and 2.2% of strains harbored  $bla_{SHV}$  and  $bla_{TEM-1}$ . Contrarily, in 2019, a similar Polish research into *K. pneumoniae* isolates carried out by Mrowiec et al. showed that 91.2% of strains carried  $bla_{CTX-M-1}$ , 63.5% carried  $bla_{TEM-1}$ , and 11.8% carried  $bla_{SHV}$ ; 7% of strains had all 3 genes, 67.4% had  $bla_{CTX-M-1}$  and  $bla_{TEM-1}$ , 1.2% had  $bla_{TEM-1}$  and  $bla_{SHV}$ , and 1.2% had  $bla_{CTX-M-1}$  and  $bla_{SHV}$  [18]. However, the *K. pneumoniae* isolates coming from 2011 and described by Walter de Walthoffen et al. in Poland demonstrated the presence of  $bla_{CTX-M}$  at 94%,  $bla_{TEM}$  at 94%, and  $bla_{SHV}$  at 52.8%, while at the same time, 41.6% of strains had all 3 genes, 86.1% had  $bla_{TEM}$  and  $bla_{CTX-M}$ , 50% had  $bla_{SHV}$  and  $bla_{CTX-M}$ , and 44.4% had  $bla_{TEM}$  and  $bla_{SHV}$  [24]. The studies quoted above show that a spread of many different variants of ESβL enzymes is observed in Poland. In Portugal, studies carried out by Rodrigues et al. confirm the fact that, among *K. pneumoniae* strains, there is coexistence of β-lactamases belonging to CTX-M-15, SHV and TEM, detected at 47%, 45%, and 9%, respectively [16]. Yet, as early as in 2003 in North America, Paterson et al. documented the occurrence of *K. pneumoniae* with multiple ESβL types in different regions of the world, among others, Argentina, Australia, South Africa, Turkey, and United States [25].

A review of the literature indicates that in *K. pneumoniae* genes encoding plasmid-transmitted ESβL β-lactamases often coexist with other plasmid-encoded resistance mechanisms, including to fluoroquinolones, aminoglycosides, co-trimoxazole, tetracyclines, and chloramphenicol [26]. The characterization of the collection of ESβL-producing *K. pneumoniae* strains that was carried out confirmed the high percentage of isolates resistant to antibiotics from therapeutic

groups other than penicillins, such as fluoroquinolones (ciprofloxacin, 90.6%), aminoglycosides (amikacin, 0.7%) and trimethoprim/sulfamethoxazole (88.5%). Studies carried out in Poland by Ojdana et al. found a high percentage of *K. pneumoniae* strains resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole (100%), amikacin (58.3%), and 16.7% of isolates resistant to ciprofloxacin [19]. In Brazil, Wang et al. recorded 10.5%, 59.8%, and 80.6% of strains resistant to, respectively, amikacin, ciprofloxacin, and trimethoprim/sulfamethoxazole [6]. The differences observed in the above-mentioned investigations prove the fact that drug resistance profiles in individual ESβL-producing *K. pneumoniae* strains vary and can be characteristic of a given region, hospital, or unit. In this study, 82.7% of the examined *K. pneumoniae* isolates were classified into the category of MDR strains, which is similar to the results of the Brazilian researchers, who recorded 84% of strains from this species with the MDR phenotype [26].

In the course of analysis of the most common genes encoding virulence factors in the studied pool of *K. pneumoniae* isolates, 55.4%, 10.1%, and 7.9% demonstrated the presence of genes *iutA*, *mrkD*, and *rmpA*, respectively. Contrarily, in the examination by Compain et al., the *mrkD* gene was detected in 100% of *K. pneumoniae* isolates, while the presence of the *iutA* gene was not found [2]. Also Ranjbar et al. demonstrated the presence of the *mrkD* gene in 84.34% and the *rmpA* gene in 13.91% of the studied *K. pneumoniae* isolates [21]. On the other hand, Ferreira et al. recorded *iutA* in 40% and *mrkD* in 96% of isolates, but they did not detect the presence of the *rmpA* gene [26]. Compain et al. showed the presence of the *rmpA* gene in 7.1% of isolates, which is similar to the proportion in this study (7.9%). The remaining virulence-associated genes found among the isolates were *entB* (91.4%), *ybtS* (55.4%), *kfu* (14.4%), *K2* (11.5%), *allS* (5%). The French researchers also detected these virulence genes: *entB* (100%), *kfu* (35.7%), *ybtS* (21.4%), and *allS* (7.1%) [2], and the researchers from Brazil, respectively: *entB* (100%), and *ybtS* (60%) [26]. The *magA* gene was detected in 53.2% of the strains, contrary to Brisse et al. in France and Lascols et al. in Canada, who did not demonstrate the presence of the *magA* gene in any of the *K. pneumoniae* isolates studied [27, 28].

As for the *K. pneumoniae* strains under study, it was observed according to the data in the literature [8, 20], that the majority of the isolates (61%) were of clonal origin. The assessment of the genetic similarity of the studied *K. pneumoniae* rods was done with the use of PFGE. According to Paterson and Bonomo, PFGE is the most frequently used molecular reference method to genotype ESβL-producing *Enterobacteriaceae* in the world [5]. It is confirmed by

numerous international, as well as Polish, publications concerning molecular analysis of the *K. pneumoniae* population: in France, Ireland, Brazil, China, and Poland [8, 14, 20, 26, 27]. Our work showed good typeability, reproducibility of *SpeI* for *K. pneumoniae* subtyping, and revealed high genetic diversity among the studied isolates. Analysis of the *SpeI*-PFGE genetic profiles of the strains demonstrated that their genetic similarity ranged from 66.6% to 100%. The highest degree of similarity (100%) was found between isolates classified into four PFGE clonal types (A–D) and seven minor clonal lineages (G–M). These isolates came from various clinical materials from patients hospitalized in different hospital wards. The obtained results of genotyping indicate that *K. pneumoniae* epidemic clones spread between different hospital departments. Similarly, Morris et al. demonstrated clonal organization of the *K. pneumoniae* strain collection: among 137 isolates, they identified 111 various PFGE profiles, which fell into 16 major clusters (A–P) in 112 isolates based on similarity of >85%, with each cluster comprising 2–43 isolates [8]. The clonal genetic structure in *K. pneumoniae* was also confirmed by Lascols et al. in their work published in 2013, which identified 3 major clonal groups among the isolates under study with more than 10 isolates per cluster, 10 minor clusters with less than 10 isolates per cluster, and 13 singletons [28]. In our study, most isolates (28%) were classified into clonal group A (cluster A), and in the research by Morris et al., the percentage of isolates classified into the largest clonal group (cluster A) was very similar and amounted to 31% (Morris et al. 2016). Yet, Lascols et al. described the largest clonal group (cluster C) comprising 53% of *K. pneumoniae* isolates [28].

The epidemiological situation of a hospital or a given ward may be influenced by many factors; among them, the specificity of the facility, the profile of patients that are treated there, the antibiotics employed, hygienic and sanitary measures undertaken or the persistence of certain pathogenic microorganisms.

To conclude, due to worldwide reports of a significant increase in resistance of *K. pneumoniae* to the antibacterial drugs used and the observed regional changes in the scale of this phenomenon, it is necessary to find the ESβL+ phenotype in all *K. pneumoniae* isolates as part of routine microbiological diagnostics. In addition, it should be remembered that when choosing empirical therapy for serious infections with an etiology of *K. pneumoniae* ESβL+, it is extremely important to take into account the local epidemiological characteristics. The application of molecular techniques to identify multidrug-resistant strains can contribute to improved surveillance and rapid detection of epidemic clones, and as a consequence, to a reduction in their spread in the hospital environment.



## Acknowledgments

We would like to thank the staff and employees of the microbiological laboratory at John Paul II Hospital in Krakow for their participation in the study. A special thank you to Catherine Gąsior-Kulasiak for English language editing.

## Authors' Contribution

**D.O.:** research concept and design; supervising the project; carrying out the experiments; data analysis and interpretation; writing – original draft preparation; writing – review and editing; visualization; literature review; final proofreading and approval of the version for publication; funding acquisition; **A.O.J.:** acquisition of data; final proofreading and approval of the version for publication; **A.D.:** carrying out the experiments; final proofreading and approval of the version for publication; **M.B.:** acquisition of data; final proofreading and approval of the version for publication; **M.B.W.:** research concept and design; content-related supervision over research; final proofreading and approval of the version for publication.

## Funding

This research was financially supported by the Jagiellonian University Medical College (Grant/K/ZDS/007829).

## Conflict of Interest

The authors have no potential conflicts of interest to declare.

## Ethics Approval

The study was approved by the Bioethics Committee of the Jagiellonian University in Krakow, Poland (KBET/1072.6120.264.2019).

## References

- [1] Chong Y., Shimoda S., Shimono N. (2018). Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Genet. Evol.*, 61: 185-188.
- [2] Compain F., Baboson A., Brisse S., Genel N., Audo J., Ailloud F., Kassis-Chikhani N., Arlet G., Decré D. (2014). Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 52: 4377-4380.
- [3] Wyres K.L., Holt K.E. (2018). *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 45: 131-139.
- [4] Baraniak A., Izdebski R., Fiett J., Sadowy E., Adler A., Kazma M., Salomon J., Lawrence C., Rossini A., Salvia A., et al. (2013). Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57: 1992-1997.
- [5] Paterson D.L., Bonomo R.A. (2005). Clinical update extended-spectrum  $\beta$ -lactamases : A clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18: 657-686.
- [6] Wang Y., Zhang Q., Jin Y., Jin X., Yu J., Wang K. (2019). Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in China. *Braz. J. Microbiol.*, 50: 669-675.
- [7] Castanheira M., Deshpande L.M., Mendes R.E., Canton R., Sader H.S., Jones R.N. (2019). Variations in the occurrence of resistance phenotypes and carbapenemase genes among *Enterobacteriaceae* isolates in 20 years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Open Forum Infect. Dis.*, 6: S23-S33.
- [8] Morris D., O'Connor M., Izdebski R., Corcoran M., Ludden C.E., McGrath E., Buckley V., Cryan B., Gniadkowski M., Cormican M. (2016). Dissemination of clonally related multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Ireland. *Epidemiol. Infect.*, 144: 443-448.
- [9] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>
- [10] CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. (2018). 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [11] Magiorakos A., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18: 268-281.
- [12] Latifpour M., Gholipour A., Damavandi M.S. (2016). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in nosocomial and community-acquired urinary tract infections. *Jundishapur J. Microbiol.*, 9: e31179.
- [13] Xu L., Ensor V., Gossain S., Nye K., Hawkey P. (2005). Rapid and simple detection of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes by multiplex PCR assay. *J. Med. Microbiol.*, 54: 1183-1187.
- [14] Han H., Zhou H., Li H., Gao Y., Lu Z., Hu K., Xu B. (2013). Optimization of pulse-field gel electrophoresis for subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 10: 2720-2731.
- [15] Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 2233-2239.

- [16] Rodrigues C., Machado E., Ramos H., Peixe L., Novais Â. (2014). Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: A successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFII<sub>K</sub>). *Int. J. Med. Microbiol.*, 304: 1100-1108.
- [17] Ny S., Kozlov R., Dumpis U., Edquist P., Gröndahl-Yli-Hannuksela K., Kling A.M., Lis D.O., Lübbert C., Pomorska-Wesołowska M., Palagin I., et al. (2018). Large variation in ESBL-producing *Escherichia coli* carriers in six European countries including Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 37: 2347-2354.
- [18] Mrowiec P., Klesiewicz K., Małek M., Skiba-Kurek I., Sowa-Sierant I., Skalkowska M., Budak A., Karczewska E. (2019). Antimicrobial susceptibility and prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from pediatric and adult patients of two Polish hospitals. *New Microbiol.*, 42: 197-204.
- [19] Ojdana D., Sacha P., Wiecek P., Czaban S., Michalska A., Jaworowska J., Jurczak A., Poniatowski B., Tryniszewska E. (2014). The occurrence of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, and *bla*<sub>TEM</sub> genes in extended-spectrum β-lactamase-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland. *Int. J. Antibiot.*, 2014: 935842.
- [20] Sękowska A., Gospodarek E., Kamińska D. (2012). Antimicrobial susceptibility and genetic similarity of ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *Arch. Med. Sci.*, 8: 993-997.
- [21] Ranjbar R., Kelishadrokh A.F., Chehelgerdi M. (2019). Molecular characterization, serotypes and phenotypic and genotypic evaluation of antibiotic resistance of the *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different types of hospital-acquired infections. *Infect. Drug Resist.*, 12: 603-611.
- [22] Lee J., Oh C.E., Choi E.H., Lee H.J. (2013). The impact of the increased use of piperacillin/tazobactam on the selection of antibiotic resistance among invasive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Int. J. Infect. Dis.*, 17: e638-e643.
- [23] Livermore D.M. (1995). Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 557-584.
- [24] de Walthoffen S.W., Młynarczyk A., Sawicka-Grzelak A., Durlik M., Paczek L., Chmura A., Ciszek M., Chabros L., Baczowska T., Młynarczyk G. (2011). Strains of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamases, isolated from organ recipients. *Transplant Proc.*, 43: 3128-3129.
- [25] Paterson D.L., Hujer K.M., Hujer A.M., Yeiser B., Bonomo M.D., Rice L.B., Bonomo R.A., International Klebsiella Study Group (2003). Extended-spectrum β-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47: 3554-3560.
- [26] Ferreira R.L., Da Silva B.C., Rezende G.S., Nakamura-Silva R., Pitondo-Silva A., Campanini E.B., Brito M.C., da Silva E.M., de Melo Freire C.C., da Cunha A.F., da Silva Pranchevicius M.C. (2019). High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β-lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. *Front. Microbiol.*, 9: 3198.
- [27] Brisse S., Fevre C., Passet V., Issenhuth-Jeanjean S., Tournebise R., Diancourt L., Grimont P. (2009). Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One*, 4: e4982.
- [28] Lascols C., Peirano G., Hackel M., Laupland K.B., Pitout J.D. (2013). Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: First report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57: 130-136.

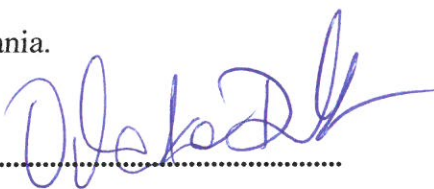
mgr Dorota Ochońska  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Wydział Lekarski  
Katedra Mikrobiologii  
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: **"Clonal Dissemination of KPC-2, VIM-1, OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Katowice, Poland"** Ochońska D, Klamińska-Cebula H, Dobrut A, Bulanda M, Brzywczy-Włoch M.; Pol J Microbiol. 2021 Mar;70(1):107-116. DOI: 10.33073/pjm-2021-010,

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 70% i polegał na\*\*:

- a. napisaniu planu pracy
- b. opracowaniu koncepcji badań
- c. pozyskaniu środków na przeprowadzenie badania
- d. administrowaniu projektem
- e. wykonaniu doświadczalnej części pracy:
  - identyfikacji szczepów metodami fenotypowymi oraz genotypowymi
  - fenotypowej charakterystyce profili lekooporności z określeniem fenotypów oporności typu AmpC, ESβL, KPC, OXA-48 zebranych szczepów na wybrane leki przeciwdrobnoustrojowe
  - detekcji genów oporności u zebranych izolatów
  - przeprowadzeniu analizy genotypowego podobieństwa pomiędzy badanymi szczepami z zastosowaniem metody PFGE w celu wykrycia możliwych epidemii klonalnych (ognisk epidemicznych)
  - określeniu przynależności badanych szczepów w odniesieniu do typów sekwencyjnych oraz kompleksów klonalnych CC uzyskanych dzięki metodzie MLST
- f. opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań
- g. projektowaniu graficznym - sporządzeniu tabel i rycin
- h. przygotowaniu manuskryptu
- i. wiodącej roli w realizacji merytorycznej badania.



(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu określonych eksperymentów, i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.



mgr Hanna Klamińska-Cebula  
Kierownik Zakładu Bakteriologii  
Górnośląskie Centrum Medyczne im. prof. Leszka Gieca  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: "**Clonal Dissemination of KPC-2, VIM-1, OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Katowice, Poland**" Ochońska D, Klamińska-Cebula H, Dobrut A, Bulanda M, Brzywczy-Włoch M.; Pol J Microbiol. 2021 Mar;70(1):107-116. DOI: 10.33073/pjm-2021-010, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 8% i polegał na\*\*:

- A. opracowaniu koncepcji i projektu badań
- B. zebraniu materiału biologicznego oraz danych klinicznych niezbędnych do przeprowadzenia badania
- C. pomocy w przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Dorotę Ochońską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Doroty Ochońskiej polegający na\*\*:

- a. napisaniu planu pracy
- b. opracowaniu koncepcji badań
- c. pozyskaniu środków na przeprowadzenie badania
- d. administrowaniu projektem
- e. wykonaniu doświadczalnej części pracy:
  - identyfikacji szczepów metodami fenotypowymi oraz genotypowymi
  - fenotypowej charakterystyce profili lekooporności z określeniem fenotypów oporności typu AmpC, ESβL, KPC, OXA-48 zebranych szczepów na wybrane leki przeciwdrobnoustrojowe
  - detekcji genów oporności u zebranych izolatów
  - przeprowadzeniu analizy genotypowego podobieństwa pomiędzy badanymi szczepami z zastosowaniem metody PFGE w celu wykrycia możliwych epidemii klonalnych (ognisk epidemicznych)
  - określeniu przynależności badanych szczepów w odniesieniu do typów sekwencyjnych oraz kompleksów klonalnych CC uzyskanych dzięki metodzie MLST
- f. opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników pracy
- g. projektowaniu graficznym - sporządzeniu tabel i rycin
- h. przygotowaniu manuskryptu
- i. wiodącej roli w realizacji merytorycznej badania



.....  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony;

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu określonych eksperymentów, i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy

Dr n. med. Anna Dobrut  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Wydział Lekarski  
Katedra Mikrobiologii  
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: "**Clonal Dissemination of KPC-2, VIM-1, OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Katowice, Poland**" Ochońska D, Klamińska-Cebula H, Dobrut A, Bulanda M, Brzychczy-Włoch M.; Pol J Microbiol. 2021 Mar;70(1):107-116. DOI: 10.33073/pjm-2021-010, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 8% i polegał na\*\*:

- A. opracowaniu koncepcji i projektu badań
- B. amplifikacji metodą PCR oraz multiplex PCR genów kodujących wybrane czynniki wirulencji

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Dorotę Ochońską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Doroty Ochońskiej polegający na\*\*:

a. napisaniu planu pracy

- b. opracowaniu koncepcji badań
- c. pozyskaniu środków na przeprowadzenie badania
- d. administrowaniu projektem
- e. wykonaniu doświadczalnej części pracy:

- identyfikacji szczepów metodami fenotypowymi oraz genotypowymi
- fenotypowej charakterystyce profili lekooporności z określeniem fenotypów oporności typu AmpC, ESBL, KPC, OXA-48 zebranych szczepów na wybrane leki przeciwdrobnoustrojowe

- detekcji genów oporności u zebranych izolatów
- przeprowadzeniu analizy genotypowego podobieństwa pomiędzy badanymi szczepami z zastosowaniem metody PFGE w celu wykrycia możliwych epidemii klonalnych (ognisk epidemicznych)
- określeniu przynależności badanych szczepów w odniesieniu do typów sekwencyjnych oraz kompleksów klonalnych CC uzyskanych dzięki metodzie MLST

- f. opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań
- g. projektowaniu graficznym - sporządzeniu tabel i rycin
- h. przygotowaniu manuskryptu
- i. wiodącej roli w realizacji merytorycznej badania.

  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu określonych eksperymentów, i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy

Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Bulanda  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Wydział Lekarski  
Katedra Mikrobiologii

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: "**Clonal Dissemination of KPC-2, VIM-1, OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Katowice, Poland**" Ochońska D, Klamińska-Cebula H, Dobrut A, Bulanda M, Brzychczy-Włoch M.; Pol J Microbiol. 2021 Mar;70(1):107-116. DOI: 10.33073/pjm-2021-010,

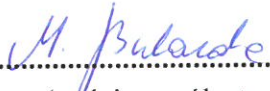
oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5% i polegał na\*\*:

- A. opracowaniu koncepcji i projektu badań
- B. nadzorze nad przebiegiem badań

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Dorotę Ochońską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Doroty Ochońskiej polegający na\*\*:

- a. napisaniu planu pracy
- b. opracowaniu koncepcji badań
- c. pozyskaniu środków na przeprowadzenie badania
- d. administrowaniu projektem
- e. wykonaniu doświadczalnej części pracy:
  - identyfikacji szczepów metodami fenotypowymi oraz genotypowymi
  - fenotypowej charakterystyce profili lekooporności z określeniem fenotypów oporności typu AmpC, ESβL, KPC, OXA-48 zebranych szczepów na wybrane leki przeciwdrobnoustrojowe
  - detekcji genów oporności u zebranych izolatów
  - przeprowadzeniu analizy genotypowego podobieństwa pomiędzy badanymi szczepami z zastosowaniem metody PFGE w celu wykrycia możliwych epidemii klonalnych (ognisk epidemicznych)
  - określeniu przynależności badanych szczepów w odniesieniu do typów sekwencyjnych oraz kompleksów klonalnych CC uzyskanych dzięki metodzie MLST
- f. opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań
- g. projektowaniu graficznym - sporządzeniu tabel i rycin
- h. przygotowaniu manuskryptu
- i. wiodącej roli w realizacji merytorycznej badania

  
.....  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu określonych eksperymentów, i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

Kraków, 29 maj 2023 rok

Prof. dr hab. n. med. Monika Brzychczy-Włoch  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Wydział Lekarski  
Katedra Mikrobiologii  
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: "**Clonal Dissemination of KPC-2, VIM-1, OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Katowice, Poland**" Ochońska D, Klamińska-Cebula H, Dobrut A, Bulanda M, Brzychczy-Włoch M.; Pol J Microbiol. 2021 Mar;70(1):107-116. DOI: 10.33073/pjm-2021-010,

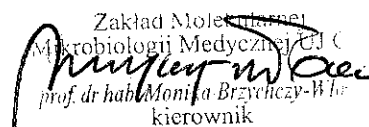
oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 9% i polegał na\*\*:

- A. opracowaniu koncepcji i projektu badań
- B. nadzorze merytorycznym nad całością pracy

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Dorotę Ochońską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Doroty Ochońskiej polegający na\*\*:

- a. napisaniu planu pracy
- b. opracowaniu koncepcji badań
- c. pozyskaniu środków na przeprowadzenie badania
- d. administrowaniu projektem
- e. wykonaniu doświadczalnej części pracy:
  - identyfikacji szczepów metodami fenotypowymi oraz genotypowymi
  - fenotypowej charakterystyce profili lekooporności z określeniem fenotypów oporności typu AmpC, ESβL, KPC, OXA-48 zebranych szczepów na wybrane leki przeciwdrobnoustrojowe
  - detekcji genów oporności u zebranych izolatów
  - przeprowadzeniu analizy genotypowego podobieństwa pomiędzy badanymi szczepami z zastosowaniem metody PFGE w celu wykrycia możliwych epidemii klonalnych (ognisk epidemicznych)
  - określeniu przynależności badanych szczepów w odniesieniu do typów sekwencyjnych oraz kompleksów klonalnych CC uzyskanych dzięki metodzie MLST
- f. opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników pracy
- g. projektowaniu graficznym - sporządzeniu tabel i rycin
- h. przygotowaniu manuskryptu
- i. wiodącej roli w realizacji merytorycznej badania

Zakład Molekularnej  
Mikrobiologii Medycznej  
  
prof. dr hab. Monika Brzychczy-Włoch  
kierownik

.....  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu określonych eksperymentów, i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.



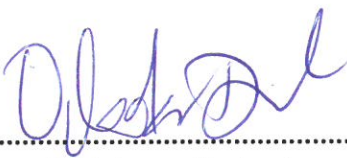
mgr Dorota Ochońska  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Wydział Lekarski  
Katedra Mikrobiologii  
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: **"Biofilm Formation of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity"** Ochońska D, Ścibik Ł, Brzychczy-Włoch M. Pathogens. 2021 Oct 18;10(10):1345. DOI: 10.3390/pathogens10101345,

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 70% i polegał na\*\*:

- a. napisaniu planu pracy
- b. opracowaniu koncepcji badań
- c. pozyskaniu środków na przeprowadzenie badania
- d. administrowaniu projektem
- e. wykonaniu doświadczalnej części pracy:
  - identyfikacji szczepów metodami fenotypowymi oraz genotypowymi
  - oznaczeniu profilu lekooporności zebranych szczepów na wybrane antybiotyki
  - ocenie zdolności badanych szczepów do tworzenia biofilmu na biomateriałach rurek tracheostomijnych
  - analizie genotypowego podobieństwa pomiędzy badanymi szczepami z zastosowaniem metody PFGE
  - analizie i wizualizacji powierzchni próbek za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej, SEM
- f. opracowanie i interpretacja uzyskanych wyników badań,
- g. opracowaniu graficznym - sporządzeniu tabel i rycin,
- h. przygotowaniu manuskryptu,
- i. wiodącej roli w realizacji merytorycznej badania.



(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu określonych eksperymentów, i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: "**Biofilm Formation of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity**" Ochońska D, Ścibik Ł, Brzychczy-Włoch M. Pathogens. 2021 Oct 18;10(10):1345. DOI: 10.3390/pathogens10101345,

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 15% i polegał na\*\*:

- A. opracowaniu koncepcji i projektu badań
- B. zebraniu materiału biologicznego oraz danych klinicznych niezbędnych do przeprowadzenia badania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Dorotę Ochońską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Doroty Ochońskiej polegający na\*\*:

- a. napisaniu planu pracy
- b. opracowaniu koncepcji badań
- c. pozyskaniu środków na przeprowadzenie badania
- d. administrowaniu projektem
- e. wykonaniu doświadczalnej części pracy:
  - identyfikacji szczepów metodami fenotypowymi oraz genotypowymi
  - oznaczeniu profili lekooporności zebranych szczepów na wybrane antybiotyki
  - ocenie zdolności badanych szczepów do tworzenia biofilmu na biomateriałach rurek tracheostomijnych
  - analizie genotypowego podobieństwa pomiędzy badanymi szczepami z zastosowaniem metody PFGE
  - analizie i wizualizacji powierzchni próbek za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej, SEM
- f. opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań,
- g. projektowaniu graficznym - sporządzeniu tabel i rycin,
- h. przygotowaniu manuskryptu,
- i. wiodącej roli w realizacji merytorycznej badania.



.....  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu określonych eksperymentów, i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników pracy oraz przygotowaniu manuskryptu pracy.

Prof. dr hab. n. med. Monika Brzychczy-Włoch  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Katedra Mikrobiologii  
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: "**Biofilm Formation of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity**" Ochońska D, Ścibik Ł, Brzychczy-Włoch M. Pathogens. 2021 Oct 18;10(10):1345. DOI: 10.3390/pathogens10101345.

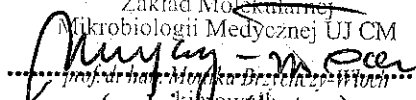
oświadczam, że mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 15% i polegał na\*\*:

- A. opracowaniu koncepcji i projektu badań
- B. nadzorze merytorycznym na całością pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Dorotę Ochońską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Doroty Ochońskiej polegający na\*\*:

- a. napisaniu planu pracy
- b. opracowaniu koncepcji badań
- c. pozyskaniu środków na przeprowadzenie badania
- d. administrowaniu projektem
- e. wykonaniu doświadczalnej części pracy:
  - identyfikacji izolatów metodami fenotypowymi oraz genotypowymi
  - oznaczeniu profili lekooporności zebranych szczepów na wybrane środki przeciwdrobnoustrojowe
  - analizie genotypowego podobieństwa pomiędzy badanymi szczepami z zastosowaniem metody PFGE
  - ocenie zdolności badanych izolatów do tworzenia biofilmu na biomateriałach rurek tracheostomijnych
  - analizie i wizualizacji powierzchni próbek za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej, SEM
- f. opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań
- g. projektowaniu graficznym - sporządzeniu tabel i rycin
- h. przygotowaniu manuskryptu
- i. wiodącej roli w realizacji merytorycznej badania.

Zakład Molekularnej  
Mikrobiologii Medycznej UJ CM  
  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu określonych eksperymentów, i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

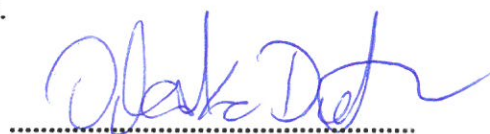


mgr Dorota Ochońska  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Wydział Lekarski  
Katedra Mikrobiologii  
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: "**Studies on molecular epidemiology of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients hospitalized in a specialist hospital in southern Poland**" Dorota Ochońska, Aldona Olechowska-Jarząb, Anna Dobrut, Małgorzata Bulanda, Monika Brzychczy-Włoch; *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (Advances in Hygiene and Experimental Medicine). 2021 Dec;75(1):970-979. DOI: 10.2478/ahem-2021-0039, oświadczam, że mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 60% i polegał na\*\*:

- a. napisaniu planu pracy
- b. opracowaniu koncepcji badań
- c. pozyskaniu środków na przeprowadzenie badania
- d. administrowaniu projektem
- e. wykonaniu doświadczalnej części pracy:
  - identyfikacji szczepów metodami fenotypowymi i genotypowymi
  - oznaczeniu lekooporności badanych szczepów przy zastosowaniu metod fenotypowych
  - wykrywaniu genów kodujących oporność na wybrane antybiotyki
  - detekcji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji
  - typowaniu badanych szczepów metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym, PFGE
- f. opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań
- g. projektowaniu graficznym - sporządzeniu tabel i rycin
- h. przygotowaniu manuskryptu
- i. wiodącej roli w realizacji merytorycznej badania.



(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu określonych eksperymentów, i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.



Dr n. med. Aldona Olechowska -Jarząb  
Kierownik Pracowni Mikrobiologii  
Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: "**Studies on molecular epidemiology of ESBLproducing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients hospitalized in a specialist hospital in southern Poland**" Dorota Ochońska, Aldona Olechowska-Jarząb, Anna Dobrut, Małgorzata Bulanda, Monika Brzychczy-Włoch; Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Advances in Hygiene and Experimental Medicine). 2021 Dec;75(1):970-979. DOI: 10.2478/ahem-2021-0039, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 10% i polegał na\*\*:

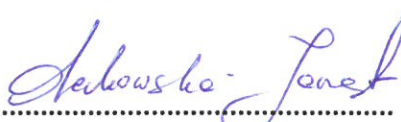
A. kolekcjonowaniu izolatów oraz zbieraniu danych klinicznych niezbędnych do przeprowadzenia badania

B. nadzorowaniu wstępnych badań identyfikacji szczepów i oznaczenia lekooporności wykonywanej w ramach rutynowej diagnostyki bakteriologicznej przez szpitalną pracownię mikrobiologii.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Dorotę Ochońską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Doroty Ochońskiej polegający na\*\*:

- a. napisaniu planu pracy
- b. opracowaniu koncepcji badań
- c. pozyskaniu środków na przeprowadzenie badania
- d. administrowaniu projektem
- e. wykonaniu doświadczalnej części pracy:
  - identyfikacji szczepów metodami fenotypowymi i genotypowymi
  - oznaczeniu lekooporności badanych szczepów przy zastosowaniu metod fenotypowych
  - wykrywaniu genów kodujących oporność na wybrane antybiotyki
  - detekcji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji
  - typowaniu badanych szczepów metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym, PFGE
- f. opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań
- g. projektowaniu graficznym - sporządzeniu tabel i rycin
- h. przygotowaniu manuskryptu
- i. wiodącej roli w realizacji merytorycznej badania.

  
.....  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu określonych eksperymentów, i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

Dr n. med. Anna Dobrut  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Wydział Lekarski  
Katedra Mikrobiologii  
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: "**Studies on molecular epidemiology of ES $\beta$ L-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients hospitalized in a specialist hospital in southern Poland**" Dorota Ochońska, Aldona Olechowska-Jarząb, Anna Dobrut, Małgorzata Bulanda, Monika Brzychczy-Włoch; Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Advances in Hygiene and Experimental Medicine). 2021 Dec;75(1):970-979. DOI: 10.2478/ahem-2021-0039, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 10% i polegał na\*\*:

- A. wykrywaniu genów kodujących oporność na wybrane antybiotyki
- B. amplifikacji metodą PCR oraz multiplex PCR genów kodujących wybrane czynniki wirulencji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Dorotę Ochońską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Doroty Ochońskiej polegający na\*\*:

- a. napisaniu planu pracy
- b. opracowaniu koncepcji badań
- c. pozyskaniu środków na przeprowadzenie badania
- d. administrowaniu projektem
- e. wykonaniu doświadczalnej części pracy:
  - identyfikacji szczepów metodami fenotypowymi i genotypowymi
  - oznaczeniu lekooporności badanych szczepów przy zastosowaniu metod fenotypowych
  - wykrywaniu genów kodujących oporność na wybrane antybiotyki
  - detekcji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji
  - typowaniu badanych szczepów metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym, PFGE
- f. opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań
- g. projektowaniu graficznym - sporządzeniu tabel i rycin
- h. przygotowaniu manuskryptu
- i. wiodącej roli w realizacji merytorycznej badania.

  
.....  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu określonych eksperymentów, i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Bulanda  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Wydział Lekarski  
Katedra Mikrobiologii

## OŚWIADCZENIE

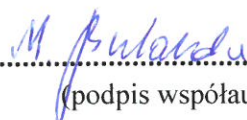
Jako współautor pracy\*: "**Studies on molecular epidemiology of ES $\beta$ L-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients hospitalized in a specialist hospital in southern Poland**" Dorota Ochońska, Aldona Olechowska-Jarząb, Anna Dobrut, Małgorzata Bulanda, Monika Brzychczy-Włoch; Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Advances in Hygiene and Experimental Medicine). 2021 Dec;75(1):970-979. DOI: 10.2478/ahem-2021-0039, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5% i polegał na\*\*:

A. opracowaniu koncepcji i projektu badań

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Dorotę Ochońską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Doroty Ochońskiej polegający na\*\*:

- a. napisaniu planu pracy
- b. opracowaniu koncepcji badań
- c. pozyskaniu środków na przeprowadzenie badania
- d. administrowaniu projektem
- e. wykonaniu doświadczalnej części pracy:
  - identyfikacji szczepów metodami fenotypowymi i genotypowymi
  - oznaczeniu lekooporności badanych szczepów przy zastosowaniu metod fenotypowych
  - wykrywaniu genów kodujących oporność na wybrane antybiotyki
  - detekcji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji
  - typowaniu badanych szczepów metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym, PFGE
- f. opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań
- g. projektowaniu graficznym - sporządzeniu tabel i rycin
- h. przygotowaniu manuskryptu
- i. wiodącej roli w realizacji merytorycznej badania.

  
.....  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu określonych eksperymentów, i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

Prof. dr hab. n. med. Monika Brzychczy-Włoch  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Wydział Lekarski  
Katedra Mikrobiologii  
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej

## OŚWIADCZENIE

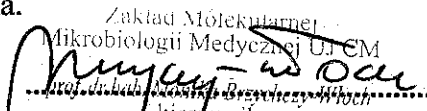
Jako współautor pracy\*: "**Studies on molecular epidemiology of ESβL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients hospitalized in a specialist hospital in southern Poland**" Dorota Ochońska, Aldona Olechowska-Jarząb, Anna Dobrut, Małgorzata Bulanda, Monika Brzychczy-Włoch; Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Advances in Hygiene and Experimental Medicine). 2021 Dec;75(1):970-979. DOI: 10.2478/ahem-2021-0039, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 15% i polegał na\*\*:

- A. opracowaniu koncepcji i projektu badań
- B. nadzorem merytorycznym nad całością pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Dorotę Ochońską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Doroty Ochońskiej polegający na\*\*:

- a. napisaniu planu pracy
- b. opracowaniu koncepcji badań
- c. pozyskaniu środków na przeprowadzenie badania
- d. administrowaniu projektem
- e. wykonaniu doświadczalnej części pracy:
  - identyfikacji szczepów metodami fenotypowymi i genotypowymi
  - oznaczeniu lekooporności badanych szczepów przy zastosowaniu metod fenotypowych
  - wykrywaniu genów kodujących oporność na wybrane antybiotyki
  - detekcji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji
  - typowaniu badanych szczepów metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym, PFGE
- f. opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań
- g. projektowaniu graficznym - sporządzeniu tabel i rycin
- h. przygotowaniu manuskryptu
- i. wiodącej roli w realizacji merytorycznej badania.

Zakład Molekularnej  
Mikrobiologii Medycznej UJ CM  
  
Prof. dr hab. n. med. Monika Brzychczy-Włoch  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu określonych eksperymentów, i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.





UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

## OPINIA

**nr 1072.6120.153.2019 z dnia 27 czerwca 2019 roku**

Na zebraniu w dniu 27 czerwca 2019 r. Komisja zapoznała się z wnioskiem z dnia 11 czerwca 2019 r.

złożonym:

przez kierownika tematu: **dr hab. n. med. Monika Brzywczy - Włoch**  
zatrudnionego

**Katedra Mikrobiologii UJCM**

**31 – 121 Kraków, ul. Czysza 18**

oraz jego merytorycznym uzasadnieniem dotyczącym przeprowadzenia eksperymentu medycznego pt. „Analiza mikrobiologiczna i fizykochemiczna oraz funkcjonalizacja powierzchni polietylenowych i poliwinylowych rurek tracheostomijnych u pacjentów z tracheostomią”.

Komisja Bioetyczna

Uniwersytetu

Jagiellońskiego

### Do wniosku dołączono:

1. Protokół badania, wersja 1 z dnia 03.06.2019 r.
2. Informacja dla uczestnika badania, wersja 1 z dnia 03.06.2019 r.
3. Formularz świadomej zgody na udział w badaniu, wersja 1 z dnia 03.06.2019 r.
4. Informacja o przetwarzaniu danych osobowych dla uczestnika/opiekuna prawnego uczestnika badania, wersja 1 z dnia 03.06.2019 r.
5. Życiorys naukowy Wnioskodawcy.
6. Lista piśmiennictwa, wersja 1 z dnia 03.06.2019 r.
7. Zgoda jednostki zewnętrznej na realizację badania.
8. Oświadczenie o realizacji projektu w ramach prac badawczych UJ/UJCM.

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

1/ obowiązek uzyskania pisemnej zgody każdej osoby wyrażającej wolę (gotowość) udziału w danym eksperymencie, zgodnie z obowiązującymi przepisami

2/ obowiązek przedstawienia Komisji:

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

**Badanie może być prowadzone do dnia 27 czerwca 2020 roku.**

**Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi.**

**Lista członków Komisji biorących udział w podjęciu uchwały stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.**

Kraków, dnia 27 czerwca 2019 r.

Przewodniczący  
Komisji Bioetycznej UJ

*prof. dr hab. n. med. Monika Brzywczy - Włoch*

ul. Grzegorzewska 20

PL 31-531 Kraków

tel. + 48 (12) 433 27 39

+ 48 (12) 433 27 43

kbet@cm-uj.krakow.pl

www.kbet.cm-uj.krakow.pl

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

## AKCEPTACJA

dot. opinii nr: 1072.6120.153.2019 z dnia 27 czerwca 2019 roku

### TYTUŁ BADANIA:

„Analiza mikrobiologiczna i fizykochemiczna oraz funkcjonalizacja powierzchni polietylenowych i poliwinylowych rurek tracheostomijnych u pacjentów z tracheostomią”

### WNIOSKODAWCA:

dr hab. Monika Brzywczy-Włoch, prof. UJ  
Katedra Mikrobiologii UJ CM  
31-121 Kraków, ul. Czysta 18

### PRZEDSTAWIONE DOKUMENTY:

Zgłoszenie poprawki z dnia 30 października 2020 r. dotyczącej wyrażenia zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego na wznowienie badania do 31 grudnia 2021 roku.

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Jagiellońskiego na posiedzeniu w dniu 25 listopada 2020 r., po zapoznaniu się z wyżej wymienionym dokumentem pozytywnie zaopiniowała zgłoszoną poprawkę.

### Lista członków Komisji Bioetycznej biorących udział w posiedzeniu:

Przewodnicząca: prof. dr hab. n. med. Dominika Dudek – lekarz – psychiatra  
Zastępca przewodniczącej: dr hab. Jacek Jaśtał, prof. PK – filozof

#### Członkowie:

dr hab. n. med. Ewa Cichocka-Jarosz, prof. UJ – lekarz – pediatra, alergolog  
dr hab. n. med. Tomasz Kaczmarzyk, prof. UJ – lekarz stomatolog, chirurg stomatolog  
dr hab. n. med. Ewa Konduracka, prof. UJ – lekarz – specjalista chorób wewnętrznych, kardiolog  
dr hab. n. med. Piotr Major, prof. UJ – lekarz – chirurg ogólny, chirurg onkolog  
dr hab. n. med. Agnieszka Olszanecka – lekarz – specjalista chorób wewnętrznych, hipertensjolog, kardiolog  
dr hab. n. med. Szymon Skoczeń – lekarz – pediatra, onkolog, hematolog dziecięcy, transplantolog kliniczny  
dr hab. n. med. Klaudia Stangel-Wójcikiewicz – lekarz – ginekolog-położnik  
dr n. med. Stefan Bednarz – lekarz – specjalista chorób wewnętrznych – przedstawiciel Okręgowej Rady Lekarskiej w Krakowie  
dr n. farm. Łukasz Hołdo – farmaceuta – specjalista farmacji klinicznej  
dr Jacek Prusak – duchowny, psycholog  
mgr Anna Layer-Janiga – radca prawny  
Jolanta Kopeć - położna

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

Kraków, 25 listopada 2020 r.

ul. Grzegorzewska 20

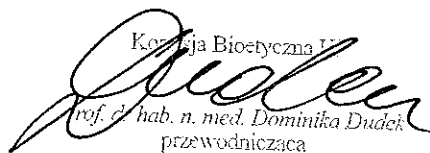
PL 31-531 Kraków

tel. + 48 (12) 433 27 39

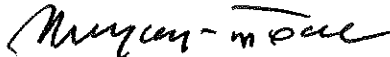
+ 48 (12) 433 27 43

kbet@cm-uj.krakow.pl

www.kbet.cm-uj.krakow.pl

  
Komisja Bioetyczna UJ  
prof. dr hab. n. med. Dominika Dudek  
przewodnicząca

Potwierdzenie odbioru 16.12.2020 r.





WYRAŻAM ZGODĘ  
03. CZE. 2019

ZASTĘPCA KOMENDANTA  
5 Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką  
SPZOZ w Krakowie  
płk lek. Piotr MARSZAŁEK

**Komendant  
5 Wojskowego Szpitala Klinicznego  
z Polikliniką w Krakowie**

**Wniosek dotyczący możliwości pobierania rurek tracheostomijnych do badania klinicznego.**

Zwracam się z uprzejmą prośbą o wyrażenie zgody na pobieranie odpadu medycznego jaki stanowią rurki tracheostomijne od pacjentów 5 Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką ul. Wrocławska 1-3, 30-309 Kraków. Rurki zostaną wykorzystane do realizacji pracy doktorskiej pt: „Analiza mikrobiologiczna i fizykochemiczna oraz funkcjonalizacja powierzchni polietylenowych i poliwinylowych rurek tracheostomijnych u pacjentów z tracheostomią.”.

Zgoda wymagana jest celem przedłożenia Komisji Bioetycznej CM UJ.

*Proszę wyrazić zgodę*

ORDYNATOR  
KLINICZNEGO ODDZIAŁU OTOLARYNGOLOGICZNEGO  
5 Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką  
SP ZOZ w Krakowie

*ppłk dr n. med. Paweł DOBOSZ*

Z poważaniem

*Łukasz Andrzej Ścibik*  
Lekarz  
3246005  
Lekarz Dentysta  
2646749



UNIwersYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

## OPINIA

**nr 1072.6120.264.2019 z dnia 21 listopada 2019 roku**

Na zebraniu w dniu 21 listopada 2019 r. Komisja zapoznała się z wnioskiem z dnia 7 listopada 2019 r.

złożonym:

przez kierownika tematu: **mgr Dorota Ochońska**

zatrudnionego

**Katedra Mikrobiologii UJCM**

**31 – 121 Kraków, ul. Czysa 18**

oraz jego merytorycznym uzasadnieniem dotyczącym przeprowadzenia eksperymentu medycznego pt. „Badania nad molekularną epidemiologią klinicznych szczepów *Klebsiella pneumoniae*”.

Komisja Bioetyczna

Uniwersytetu

Jagiellońskiego

### Do wniosku dołączono:

1. Protokół badania, wersja nr 1 z dnia 07.11.2019 r.
2. Życiorys naukowy wnioskodawcy, wersja nr 1 z dnia 07.11.2019 r.
3. Lista piśmiennictwa, wersja nr 1 z dnia 07.11.2019 r.
4. Oświadczenie o braku załączenia formularza informacji dla pacjenta, formularza zgody uczestnika badania, formularza o ochronie danych osobowych, wersja nr 1 z dnia 07.11.2019 r.
5. Kopia oświadczenia dyrektora Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II z dnia 10.06.2019 r.
6. Oświadczenie Dyrektora Górnośląskiego Centrum Medycznego im. prof. Leszka Gieca Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.
7. Oświadczenie o realizacji projektu w ramach prac badawczych UJ/UJCM, wersja 1 z dnia 07.10.2019 r.

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

1/ obowiązki przedstawienia Komisji:

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

**Badanie może być prowadzone do dnia 20 listopada 2020 roku.**

**Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi.**

**Lista członków Komisji biorących udział w podjęciu uchwały stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.**

Kraków, dnia 21 listopada 2019 r.

Przewodniczący  
Komisji Bioetycznej UJ

*prof. dr hab. n. med. Piotr Thor*

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

ul. Grzegorzewska 20

PL 31-531 Kraków

tel. + 48 (12) 433 27 39

+ 48 (12) 433 27 43

kbet@cm-uj.krakow.pl

www.kbet.cm-uj.krakow.pl



## AKCEPTACJA

dot. opinii nr: 1072.6120.264.2019 z dnia 21 listopada 2019 roku

### TYTUŁ BADANIA:

„Badania nad molekularną epidemiologią klinicznych szczepów *Klebsiella pneumoniae*”

### WNIOSKODAWCA:

mgr Dorota Ochońska  
Katedra Mikrobiologii UJ CM  
31-121 Kraków, ul. Czysa 18

### PRZEDSTAWIONE DOKUMENTY:

Zgłoszenie poprawki z dnia 4 listopada 2020 r. dotyczącej wyrażenia zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego na przedłużenie badania do 31 grudnia 2021 roku.

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Jagiellońskiego na posiedzeniu w dniu 25 listopada 2020 r., po zapoznaniu się z wyżej wymienionym dokumentem pozytywnie zaopiniowała zgłoszoną poprawkę.

### Lista członków Komisji Bioetycznej biorących udział w posiedzeniu:

Przewodnicząca: prof. dr hab. n. med. Dominika Dudek – lekarz – psychiatra  
Zastępca przewodniczącej: dr hab. Jacek Jaśtał, prof. PK – filozof

#### Członkowie:

dr hab. n. med. Ewa Cichońska-Jarosz, prof. UJ – lekarz – pediatra, alergolog  
dr hab. n. med. Tomasz Kaczmarzyk, prof. UJ – lekarz stomatolog, chirurg stomatolog  
dr hab. n. med. Ewa Konduracka, prof. UJ – lekarz – specjalista chorób wewnętrznych, kardiolog  
dr hab. n. med. Piotr Major, prof. UJ – lekarz – chirurg ogólny, chirurg onkolog  
dr hab. n. med. Agnieszka Olszanecka – lekarz – specjalista chorób wewnętrznych, hipertensjolog, kardiolog  
dr hab. n. med. Szymon Skoczeń – lekarz – pediatra, onkolog, hematolog dziecięcy, transplantolog kliniczny  
dr hab. n. med. Klaudia Stangel-Wójcikiewicz – lekarz – ginekolog-położnik  
dr n. med. Stefan Bednarz – lekarz – specjalista chorób wewnętrznych – przedstawiciel Okręgowej Rady Lekarskiej w Krakowie  
dr n. farm. Łukasz Hońdo – farmaceuta – specjalista farmacji klinicznej  
dr Jacek Prusak – duchowny, psycholog  
mgr Anna Lajer-Janiga – radca prawny  
Jolanta Kopeć - położna

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

Kraków, 25 listopada 2020 r.

Komisja Bioetyczna UJ  
  
prof. dr hab. n. med. Dominika Dudek  
przewodnicząca



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Komisja Bioetyczna

Uniwersytetu

Jagiellońskiego

ul. Grzegorzewska 20

PL 31-531 Kraków

tel. + 48 (12) 433 27 39

+ 48 (12) 433 27 43

kbet@cm-uj.krakow.pl

www.kbet.cm-uj.krakow.pl

