

*Agnieszka Milner¹, Danuta Bieńko¹, Renata Kamola¹, Agnieszka Kraśnicka¹, Halina Marchel¹, Olga Saran¹, Grażyna Dulny³, Ewa Swoboda-Kopec^{1,2}

Analiza częstości występowania i ocena lekowrażliwości szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 na oddziale chirurgii CSK WUM w okresie 1.01.2012-30.09.2014 roku

Klebsiella pneumoniae NDM-1 prevalence and drug-sensitivity at CSK WUM between January 1, 2012 and September 30, 2014

¹Zakład Mikrobiologii, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopec

²Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik Katedry: prof. nadzw. dr hab. med. Grażyna Młynarczyk

³Naczelný Epidemiolog, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Dyrektor Szpitala: mgr Ewa Marzena Pełszyńska

Słowa kluczowe

K. pneumoniae, karbapenemazy, NDM-1, wielooporność

Key words

K. pneumoniae, carbapenemases, NDM-1, multiresistance

Streszczenie

Wstęp. *Klebsiella pneumoniae* to ważny czynnik etiologiczny zakażeń szpitalnych i pozaszpitalnych. Na całym świecie (w tym w Polsce) w ostatnich latach coraz częściej identyfikuje się szczepy *K. pneumoniae* produkujące karbapenemazy, czyli enzymy hydrolizujące karbapenemy – antybiotyki uważane dotąd za leki „ostatniej szansy” w leczeniu ciężkich zakażeń wywołanych przez drobnoustroje Gram-ujemne.

Cel pracy. Celem pracy była retrospektywna analiza częstości występowania oraz ocena lekooporności na antybiotyki bakterii *K. pneumoniae* produkujących karbapenemazy. Analizie poddano wyniki badań mikrobiologicznych wykonanych z materiałów pobranych od chorych oddziału chirurgii CSK WUM w okresie 1.01.2012-30.09.2014 roku.

Materiał i metody. Analizie poddano łącznie 17 986 materiałów od chorych oraz 1459 wymazów z odbytu od chorych w kierunku nosicielstwa. Produkcję karbapenemaz szczepów *K. pneumoniae* oceniano za pomocą metod biochemicznych, fenotypowych i genetycznych. Wrażliwości na antybiotyki izolowanych szczepów *K. pneumoniae* oceniano jakościową metodą dyfuzyjno-krażkową oraz ilościową metodą wykorzystującą paski wysycone antybiotykiem w gradiencie stężeń.

Wyniki. W badanych materiałach klinicznych zidentyfikowano 236 szczepów *K. pneumoniae* – był to drugi co do częstości występowania gatunek z rodziny *Enterobacteriaceae*. Wśród szczepów *K. pneumoniae* 67% (n = 158) wytwarzało enzym β-laktamazę o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL), a 6% (n = 14) produkowało metalo-β-laktamazę typu NDM-1. Dla wszystkich 14 szczepów *K. pneumoniae* NDM-1 stwierdzono całkowitą wrażliwość jedynie na gentamycynę, 12 szczepów było wrażliwych na kolistynę, dla 2 szczepów wykazano wrażliwość na imipenem, a tylko 1 szczep był wrażliwy na meropenem.

Wnioski. Wyniki badań wskazują na rosnący w analizowanych latach odsetek szczepów *K. pneumoniae* NDM-1 izolowanych z materiałów od chorych oraz występowanie wśród tego gatunku znacznego odsetka (67%) szczepów produkujących β-laktamazę o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL). Wszystkie szczepy *K. pneumoniae* NDM-1 wykazywały oporność na większość dostępnych antybiotyków, poza tym charakteryzowały się różnymi fenotypami oporności na karbapenemy. Wykazano, że szczepy *K. pneumoniae* NDM-1 izolowane z materiałów klinicznych pochodziły od osób będących nosicielami drobnoustroju w przewodzie pokarmowym.

Adres/address:

*Agnieszka Milner
Zakład Mikrobiologii CSK WUM
ul. Banacha 1A, 02-097 Warszawa
tel. +48 (22) 599-17-77
aga.milner@gmail.com

Summary

Introduction. *Klebsiella pneumoniae* causes nosocomial and outside-of-hospital-acquired infections. In the past years, carbapenem-producing *K. pneumoniae* strains, i.e. enzymes hydrolysing carbapenems, considered to be drugs of last resort in treating severe Gram-negative infections, have been more and more often identified all around the world (including Poland).

Aim. The study was to retrospectively assess carbapenem-producing *K. pneumoniae* prevalence and antibiotic-resistance. The results of the microbiological examination of samples collected at the CSK WUM surgery unit, between January 1, 2012 and September 30, 2014, were assessed.

Material and methods. Together, 17 986 patient samples and 1459 rectal swabs were tested. *K. pneumoniae* carbapenem production was assessed with biochemical, phenotypic, and genetic techniques. The antibiotic sensitivity of the isolated *K. pneumoniae* strains was assessed with the disc diffusion method and the quantitative method, using bands saturated with antibiotic within the concentration gradient.

Results. *K. pneumoniae* was the second most prevailing *Enterobacteriaceae* species – 236 strains were identified from samples. Sixty-seven percent K (n = 158) of *K. pneumoniae* produced extended spectrum beta-lactamases (ESBL) and 6% (n = 14) produced New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1). All 14 *K. pneumoniae* NDM-1 strains were totally sensitive only to gentamicin, 12 strains were sensitive to colistin, two strains were sensitive to imipenem, and only one strain was sensitive to meropenem.

Conclusions. The study results indicated the percentage of *K. pneumoniae* NDM-1 isolated from patients was increasing and extended spectrum beta-lactamases were prevailing (67%). All *K. pneumoniae* NDM-1 strains presented resistance to most available antibiotics and different phenotypes of carbapenem resistance. *K. pneumoniae* NDM-1 isolated from samples were confirmed to come from individuals carrying the microorganism in their gut flora.

WSTĘP

Klebsiella pneumoniae to Gram-ujemna pałeczka należąca do rodziny *Enterobacteriaceae* – pałeczek jelitowych zasiedlających przewód pokarmowy ludzi i zwierząt. Stanowi ważny czynnik etiologiczny zakażeń zarówno szpitalnych, jak i pozaszpitalnych. *Klebsiella pneumoniae* powoduje ok. 8% wszystkich zakażeń szpitalnych (1). Infekcje wywołane przez ten gatunek mają zwykle charakter endogeny, a głównym rezerwuarem jest przewód pokarmowy. Potencjalnym źródłem zakażenia mogą być również górne drogi oddechowe oraz skóra pacjenta, kolonizowane przez bakterię. W populacji ogólnej nosicielstwo *Klebsiella pneumoniae* w jamie nosowo-gardłowej waha się w zakresie 1-6%, a w odbytnicy pomiędzy 5-38%. Szpitalni pacjenci są zdecydowanie częściej kolonizowani przez *Klebsiella pneumoniae* niż osoby spoza środowiska szpitalnego. Podaje się, że wśród osób hospitalizowanych odsetek pacjentów, u których stwierdza się nosicielstwo *Klebsiella pneumoniae* w odbytnicy, wynosi 77%, w gardle 19%, a procent chorych, u których bakteria bytuje na powierzchni rąk, wynosi 42%. Ponadto wskaźnik kolonizacji *Klebsiella pneumoniae* zwiększa się wprost proporcjonalnie do długości pobytu chorego w szpitalu (2).

Głównym czynnikiem sprzyjającym procesowi nabywania nosicielstwa w warunkach szpitalnych jest stosowanie nieracjonalnej antybiotykoterapii. Pacjenci leczeni szerokospektralnymi antybiotykami są czterokrotnie częściej kolonizowani niż osoby nieotrzymujące antybiotyków. Zdolność *Klebsiella pneumoniae* do intensywnej i efektywnej kolonizacji osób hospitalizowanych wynika głównie z jej oporności na stosowane antybiotyki. W polskich szpitalach obserwuje się niepokojący wzrost oporności drobnoustroju na antybiotyki β -laktamowe, które są największą i najbardziej różnicowaną grupą antybiotyków, stosowaną do leczenia

niemal wszystkich rodzajów zakażeń. Oporność bakterii na β -laktamy jest uwarunkowana różnymi mechanizmami. Może być związana z wytwarzaniem białek PBP o niskim powinowactwie do leku, zmniejszeniem przepuszczalności osłon komórkowych bakterii, aktywnym wypompowywaniem antybiotyku z komórki bakteryjnej czy też produkcją enzymów hydrolizujących cząsteczki β -laktamów (3).

Największe znaczenie w mechanizmach oporności na antybiotyki β -laktamowe u pałeczek *Klebsiella pneumoniae* ma wytwarzanie β -laktamaz. Enzymami najczęściej wykrywanymi w tej grupie są β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ang. *Extended spectrum beta-lactamase* – ESBL), które po raz pierwszy wyizolowano ze szczepu *Klebsiella pneumoniae* w 1983 roku w Niemczech (4). β -laktamazy hydrolizują wszystkie penicyliny, cefalosporyny (z wyjątkiem cefamycyn) i monobaktamy. Działanie ich jest hamowane przez inhibitory β -laktamaz, takie jak: tazobactam, sulbactam, kwas klawulanowy. Wrażliwość szczepów *Klebsiella pneumoniae* na penicyliny może być osiągnięta poprzez połączenie antybiotyków z grupy β -laktamów z inhibitorami β -laktamaz. Wiadomo jednak, że wykorzystanie penicylin z inhibitorami sprawdza się wyłącznie w leczeniu infekcji układu moczowego powodowanych przez szczepy ESBL+ o udowodnionej na te antybiotyki wrażliwości *in vitro* (5). W związku z powyższym lekami z wyboru stosowanymi w terapii zakażeń o etiologii *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających ESBL są karbapenemy. Niestety ze względu na częste i nieuzasadnione stosowanie karbapenemów patogeny wykształciły mechanizmy oporności na te antybiotyki. Do najważniejszych z nich należy zaliczyć produkcję karbapenemaz, czyli enzymów, mających zdolność hydrolizy karbapenemów oraz wszystkich pozostałych grup antybiotyków β -laktamowych.

Według klasyfikacji Amblera (6) karbapenemazy należą do trzech klas strukturalnych β -laktamaz: A, B i D. W klasie A do najważniejszych enzymów hydrolizujących karbapenemy zalicza się β -laktamazy z rodziny KPC. Nazwa KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) wynika stąd, że *Klebsiella pneumoniae* była pierwszym szczepem, u którego zidentyfikowano i u którego najczęściej obserwowane są tego typu enzymy. Obecnie karbapenemazy typu KPC identyfikuje się również w innych gatunkach *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. i innych pałeczkach niefermentujących. W Polsce szczep *Klebsiella pneumoniae* KPC opisano po raz pierwszy w 2008 roku. Był to szczep wielolekooporny, należący do hiperepidemicznego klonu ST258, który wcześniej spowodował szereg epidemii na świecie (7).

Enzymy klasy B, czyli metalo- β -laktamazy (ang. *metallo- β -lactamases* – MBL) to jedyna grupa β -laktamaz, która nie posiada reszty serynowej w centrum aktywnym. Jak wskazuje nazwa, enzymy te wymagają jonów cynku jako kofaktora reakcji hydrolizy pierścienia β -laktamowego. Enzymy te są gatunkowo specyficzne dla wielu bakterii środowiskowych, takich jak: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Caulobacter crescentus*, u których kodowane są chromosomalnie. Pierwsze nabyte metalo- β -laktamazy zlokalizowane na ruchomych elementach DNA opisano w Japonii w 1988 roku u pałeczki *Pseudomonas aeruginosa*; w Europie szczepy *Enterobacteriaceae* z nabytymi metalo- β -laktamazami obserwuje się od 2001 roku. Najczęstszymi producentami nabytych MBL są pałeczki *Pseudomonas*; w Polsce obserwuje się je od 1998 roku (8). Pierwszy szczep *Klebsiella pneumoniae* MBL+ zidentyfikowano w naszym kraju w bydgoskim szpitalu w 2008 roku (9). Od tego czasu notowane są ogniska szpitalne wywołane pałeczkami *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp., *E. coli*, *E. cloacae*, *S. marcescens*) z opornością typu MBL. Najważniejszymi rodzinami nabytych MBL są imipenemazy IMP, VIM (*Verona-integron-imipenemase*) oraz rozprzestrzeniający się obecnie na świecie nowy wariant MBL NDM-1 (*New Delhi metallo- β -lactamases-1*). Enzym ten zidentyfikowano po raz pierwszy w Szwecji, w wieloopornym szczepie *Klebsiella pneumoniae*. Został on wyizolowany od chorego, który wcześniej był hospitalizowany w szpitalu w Indiach (10). Obecnie w wielu krajach europejskich szczepy NDM+ identyfikowane są u gatunków *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, *E. cloacae*) (11, 12). W Polsce pierwszym wyhodowanym szczepem produkującym metalo- β -laktamazę New Delhi-1 był szczep *Escherichia coli* wyizolowany w 2011 roku od chorego przetransportowanego ze szpitala w Kongo (13).

β -laktamazy klasy D to tzw. enzymy CHDL (ang. *carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases*) występujące głównie u pałeczek z rodzaju *Acinetobacter*, u których kodowane są w większości chromosomalnie. Nabyte CHDL u pałeczek *Enterobacteriaceae* to enzymy oksacylinazy OXA-48 zidentyfikowane po raz pierwszy

w Turcji w 2001 roku (14). Obecnie pałeczki *Enterobacteriaceae* produkujące enzym OXA-48 występują endemicznie nie tylko w Turcji, ale również w innych krajach basenu Morza Śródziemnego, takich jak Egipt, Tunezja czy Maroko (15). Drobnoustroje te niestety coraz częściej wykrywane są także w Europie: głównie we Francji, w Holandii i Niemczech, wywołując epidemie szpitalne (16-18). W Polsce pałeczkę *Enterobacter cloacae* wytwarzającą karbapenemazę OXA-48 wyizolowano w 2013 roku od chorego hospitalizowanego w Białymstoku (19). Wyizolowany szczep został zakwalifikowany do klonu ST 89, wykrywanego wcześniej w Turcji, Senegal, Maroko, we Francji, w Belgii, Wielkiej Brytanii oraz Niemczech. Niezwykle istotny w tym przypadku wydaje się fakt, że chory z Polski, u którego wyizolowano szczep *Enterobacter cloacae* OXA-48, nigdy nie był hospitalizowany zagranicą. Jak wynika z doświadczeń własnych, obecnie w Polsce coraz częściej obserwuje się nowe przypadki pałeczek *Enterobacteriaceae*, w tym *Klebsiella pneumoniae* produkujących OXA-48, które nie zostały jak dotąd opisane w literaturze.

CEL PRACY

Celem pracy była retrospektywna ocena lekowrażliwości oraz częstości występowania szczepów z gatunku *Klebsiella pneumoniae* produkujących karbapenemazy, izolowanych z próbek materiałów pobranych z jednego z oddziałów chirurgii Centralnego Szpitala Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (CSK WUM) w okresie 1.01.2012- 30.09.2014 roku.

MATERIAŁ I METODY

W ramach pracy przeanalizowano 17 986 materiałów klinicznych pochodzących od chorych leczonych w oddziale chirurgii w okresie 1.01.2012-30.09.2014 roku. Materiał do badań mikrobiologicznych pobierano zgodnie z zasadami obowiązującymi w CSK WUM. W celu wykrycia nosicielstwa CPE (ang. *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*) pobrano 1459 wymazów z odbytu. Wymazy wykonano zgodnie z wytycznymi Konsultanta Krajowego w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej. Materiał pobierano od trzech grup chorych:

1. osób, które były hospitalizowane w ostatnich sześciu miesiącach, przebywały w domu opieki lub innym zakładzie opiekuńczym oraz pacjentów kwalifikowanych do zabiegów przeszczepu narządu – od wszystkich tych osób wymaz pobrano w dniu przyjęcia do szpitala,
2. osób, u których w dokumentacji medycznej odnotowano nosicielstwo lub zakażenie CPE – wymazy okołodobytnicze u tych pacjentów pobierano dwukrotnie, dzień po dniu, pierwszy wymaz w dniu przyjęcia do szpitala,
3. pacjentów hospitalizowanych należących do grupy wysokiego ryzyka kolonizacji szczepem CPE, czyli chorych przebywających w szpitalu

powyżej siedmiu dni, poddanych intensywnej antybiotykoterapii, obłożnie chorych lub osób hospitalizowanych w okresie, w którym na oddziale zidentyfikowano pacjenta zakażonego albo skolonizowanego CPE – materiał od tych chorych pobierano raz w tygodniu (20).

Do hodowli bakterii z materiałów klinicznych zastosowano standardowe procedury.

Materiał badany w kierunku nosicielstwa CPE posiewano na podłoże selektywne – Chrom Agar KPC firmy Graso – wykrywające bakterie Gram-ujemne o zredukowanej wrażliwości na karbapenemy w materiale klinicznym (21). W celu identyfikacji gatunkowej pałeczek Gram-ujemnych wykorzystano metodę spektrometrii masowej w systemie MALDI TOF firmy BRUCER. Wszystkie szczepy *Klebsiella pneumoniae* wyizolowane z materiałów klinicznych miały określony profil wrażliwości na antybiotyki. Wrażliwość szczepów na leki przeciwbakteryjne określano za pomocą metody jakościowej dyfuzyjno-krażkowej oraz metody ilościowej wykorzystującej paski wysycone antybiotykiem w gradiencie stężeń (22). Uzyskane wyniki interpretowano w oparciu o tabele Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (23).

Pałeczki *Klebsiella pneumoniae* pochodzące z materiałów klinicznych oraz z badań przesiewowych w kierunku CPE poddano testom wykrywania produkcji β-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) oraz produkcji karbapenemaz. Zdolność wytwarzania przez wyhodowane szczepy *Klebsiella pneumoniae* β-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) badano przy użyciu testu DDST (ang. *double disk synergy test*), stosując krążki z ceftazydymem (30 μg), cefotaksymem (30 μg) oraz amoksyycyną z kwasem klawulanowym (20/10 μg). W celu zwiększenia czułości testu dodano krążek z aztreonamem (30 μg) oraz z cefepimem (30 μg).

Wykrywanie produkcji karbapenemaz u badanych szczepów *Klebsiella pneumoniae* prowadzono metodami biochemicznymi, fenotypowymi i genetycznymi. W badaniach wykorzystano test biochemiczny Carba NP, którego podstawą jest hydroliza imipenemu przez enzymy uwolnione z lizatów komórek bakteryjnych (24).

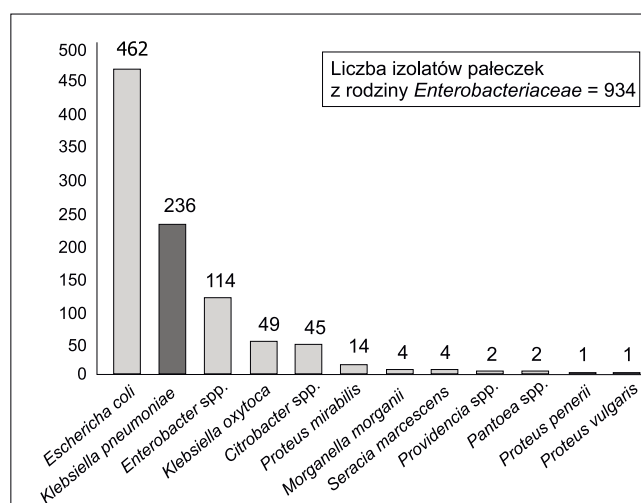
Testy fenotypowe w kierunku nabytych karbapenemaz: klasy A (KPC), klasy B (MBL) oraz klasy D (OXA-48) wykonano i interpretowano według zaleceń Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORDL) (25). Test w kierunku MBL wykonano przy użyciu krążków z imipenemem (10 μg), ceftazydymem (30 μg) i EDTA jako inhibitora metalo-β-laktamaz (26). W detekcji produkcji enzymu z rodziny KPC wykorzystano kwas boronowy i krążki meropenemu (10 μg) (27). Identyfikacja szczepów wytwarzających β-laktamazę OXA-48 możliwa była przez zastosowanie krążka z temocyną (30 μg) (28, 29). Wszystkie szczepy pałeczek *Klebsiella pneumoniae* dodatnie w badaniu wykrywania karbapenemaz w metodzie fenotypowej czy biochemicznej przesłano do Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażli-

wości Drobnoustrojów celem wykrycia genów kodujących karbapenemazy metodą PCR.

WYNIKI

Z materiałów klinicznych pobranych od chorych oddziału chirurgii w okresie od 1.01.2012 do 30.09.2014 roku wyizolowano łącznie 934 niepowtarzalnych szczepów pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Najczęściej izolowanym gatunkiem w badanych materiałach klinicznych była pałeczka *Escherichia coli* (n = 426; 45,6%), następnie *Klebsiella pneumoniae* (n = 236; 25,3%) (ryc. 1).



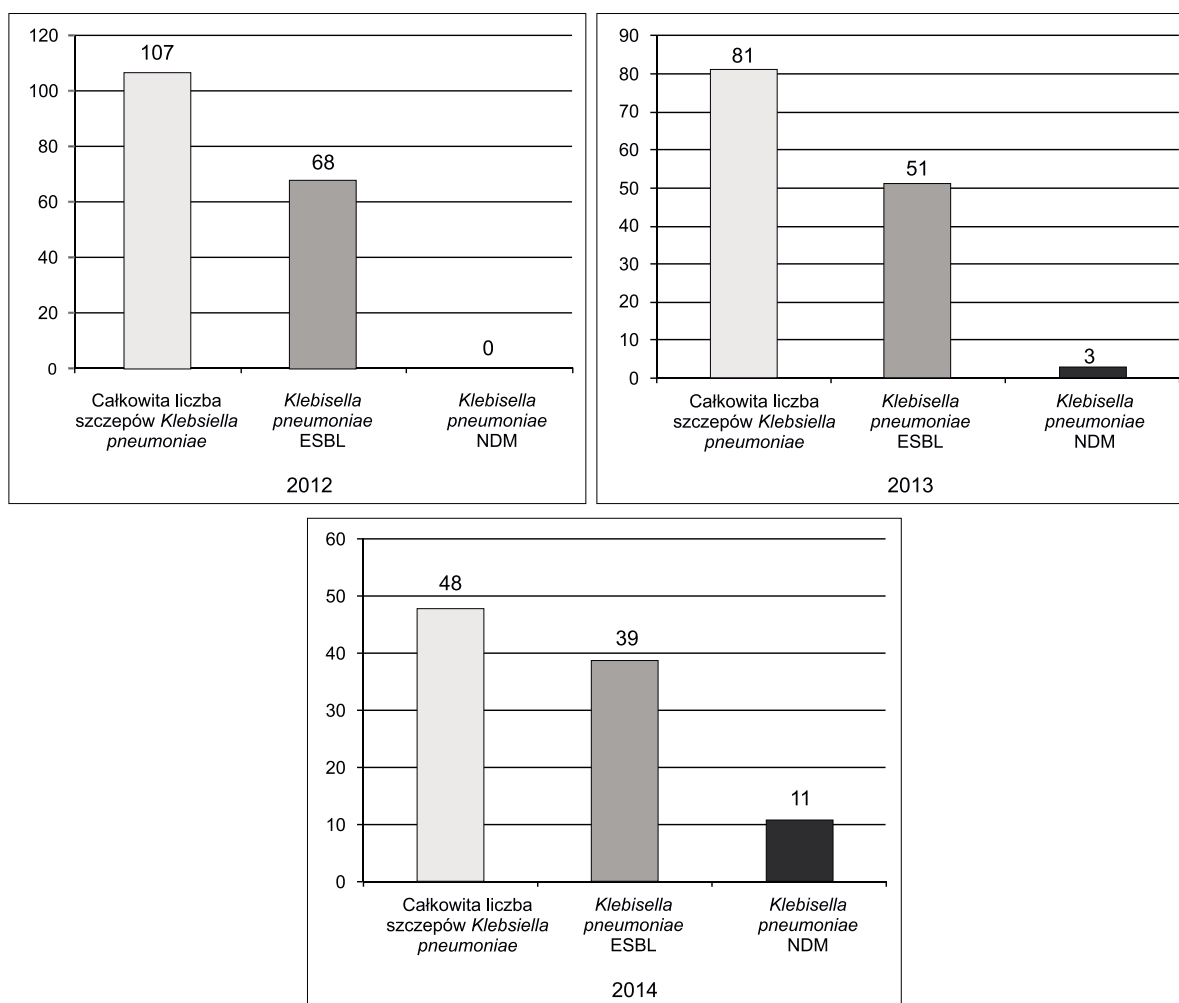
Ryc. 1. Częstość występowania oraz gatunki drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae* wyizolowane z materiałów klinicznych w okresie 1.01.2012-30.09.2014 roku (n = 934).

Liczbę szczepów *Klebsiella pneumoniae* izolowanych z materiałów w analizowanym przedziale czasowym 1.01.2012-30.09.2014 roku przedstawia rycina 2.

W roku 2012 od chorych pobrano 7227 materiałów. Szczepy bakterii patogennych uzyskano w 1186 próbkach, w tym 107 szczepów pałeczek *Klebsiella pneumoniae*. W roku 2013 z 7475 pobranych materiałów wyizolowano 1178 szczepów, wśród których zidentyfikowano 81 szczepów *Klebsiella pneumoniae*. W trzech pierwszych kwartałach 2014 roku z 3284 pobranych materiałów hodowle patogenów uzyskano w 654 próbkach, w tym 48 szczepów *Klebsiella pneumoniae*.

W analizowanym okresie wśród 236 szczepów *Klebsiella pneumoniae* zidentyfikowano 158 (67%) szczepów wytwarzających β-laktamazę o rozszerzonym spektrum substratowym. W roku 2012 takich szczepów zidentyfikowano 68, w roku 2013 – 51, a w trzech kwartałach 2014 roku – 39 szczepów ESBL.

W okresie tym w materiałach od chorych wykryto 14 (6%) niepowtarzalnych szczepów *Klebsiella pneumoniae* produkujących karbapenemazy, które jednocześnie posiadały mechanizm oporności ESBL. Jak pokazuje rycina 2, w analizowanym



Ryc. 2. Szczepy *Klebsiella pneumoniae* wyizolowane z materiałów klinicznych w różnych przedziałach czasowych w okresie od 1.01.2012 do 30.09.2014 roku.

okresie od chorych oddziału chirurgii w roku 2012 nie wyizolowano żadnego szczepu *Klebsiella pneumoniae* wytwarzającego karbapenemazy (NDM-1). Pierwsze trzy szczepy bakterii wytwarzające enzymy NDM-1 z mechanizmem ESBL zidentyfikowano u chorych z oddziału chirurgii po raz pierwszy w 2013 roku. W 2014 roku w czasie trzech pierwszych kwartałów zidentyfikowano prawie czterokrotnie więcej ($n = 11$) szczepów *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających karbapenemazy z mechanizmem ESBL.

Wszystkie szczepy karbapenemazo-pozytywne były dodatnie w metodzie biochemicznej Carba NP i metodzie fenotypowej w kierunku MBL. Wyniki badań genetycznych przeprowadzonych w ośrodku referencyjnym wykazały, że u wszystkich szczepów wykryto obecność genu *blaNDM-1*. Na tej podstawie stwierdzono, że wszystkie szczepy należące do tej grupy wytwarzały metalo- β -laktamazę typu NDM-1.

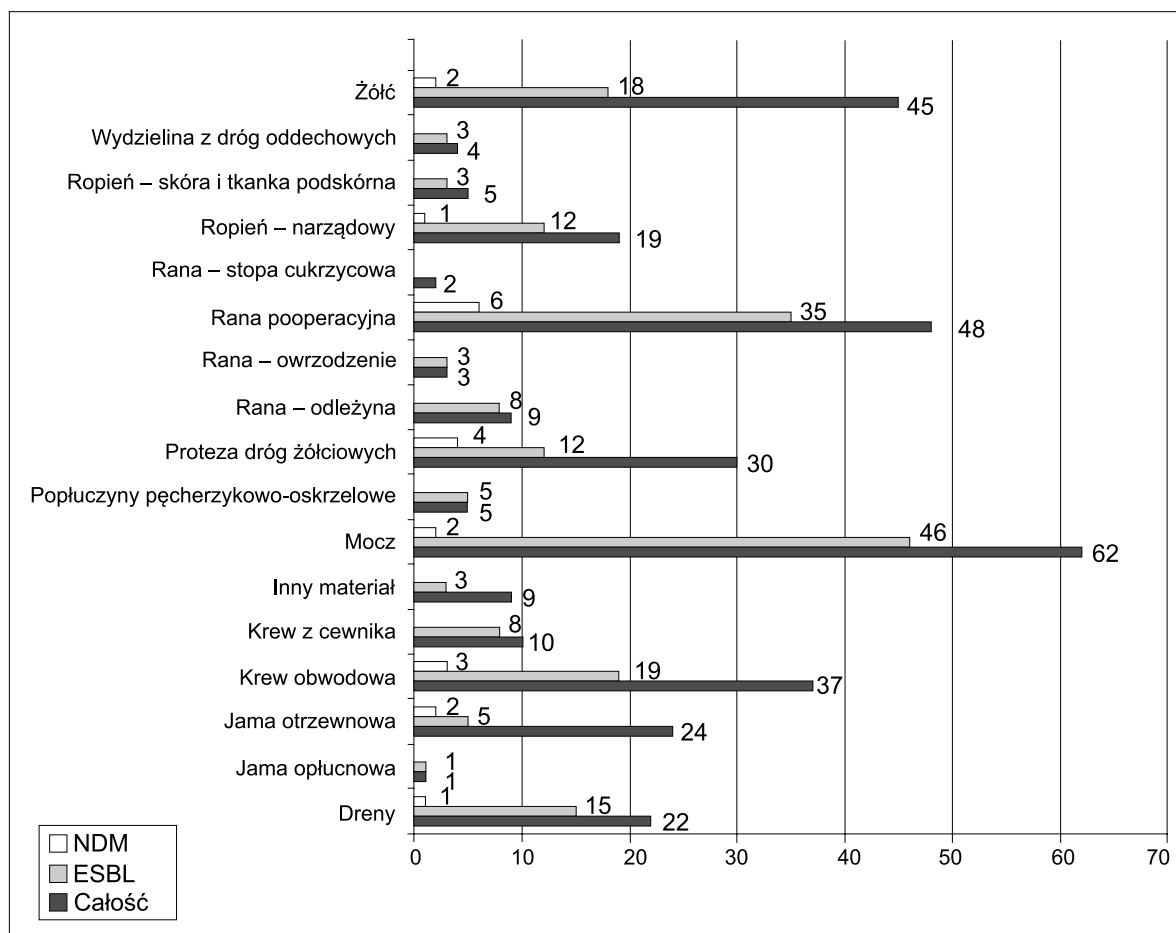
Klebsiella pneumoniae izolowane były najczęściej z: próbek moczu ($n = 62$; 18%), wymazów z ran pooperacyjnych ($n = 48$; 14%), żółci ($n = 45$; 13%), krwi ($n = 37$; 11%), protez dróg żółciowych ($n = 30$; 9%), wymazów z jamy otrzew-

nej ($n = 25$; 7%), drenów ($n = 22$; 6,5%), ropni narządowych ($n = 19$; 5,6%), krwi z cewnika ($n = 10$; 3%), wymazów z odleżyn ($n = 9$; 2,6%) oraz BAL-u ($n = 5$; 1,5%) (ryc. 3).

Najczęściej szczepy *Klebsiella pneumoniae* wytwarzające β -laktamazy ESBL izolowano z: moczu ($n = 46$; 23%), wymazów z ran pooperacyjnych ($n = 35$; 17%), krwi ($n = 19$; 9,7%), żółci ($n = 18$; 9%), drenów ($n = 15$; 7,6%), protez dróg żółciowych ($n = 12$; 6%), ropni narządowych ($n = 12$; 6%) oraz wymazów z odleżyn ($n = 8$; 4%) (ryc. 3).

Pałeczki *Klebsiella pneumoniae* wytwarzające metalo- β -laktamazę typu NDM-1 wyizolowano od chorych z wymazów z: ran pooperacyjnych ($n = 6$), krwi ($n = 3$), protez dróg żółciowych ($n = 3$), żółci ($n = 3$), wymazów z jamy otrzewnej ($n = 2$), wymazów z ropni narządowych ($n = 1$), próbek moczu ($n = 2$) oraz z drenów z jamy brzusznej ($n = 1$) (ryc. 3).

Wszystkie szczepy bakterii typu NDM-1 charakteryzowały się opornością na penicyliny, penicyliny z inhibitorami, cefalosporyny wszystkich generacji i monobaktamy. Wysoką oporność na imipenem (MIC w zakresie 16-32) stwierdzono u 6, średnio-

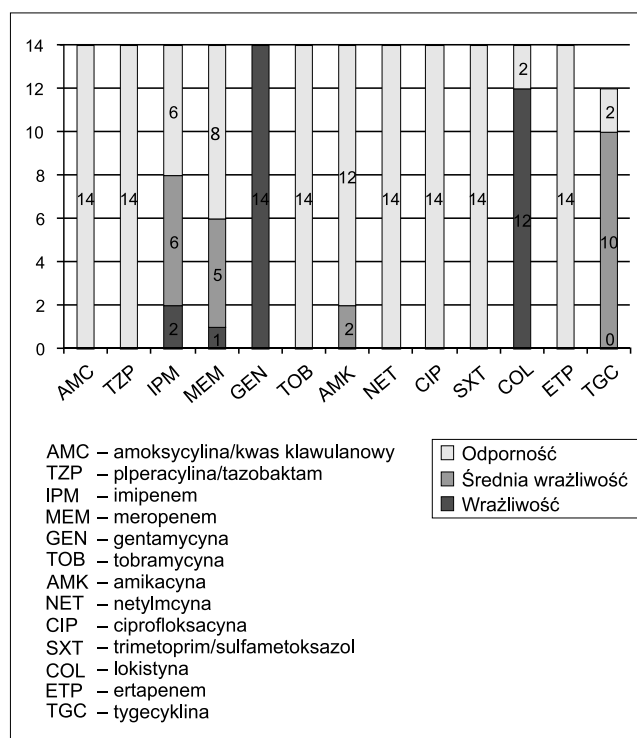


Ryc. 3. Częstość występowania szczepów *Klebsiella pneumoniae* w różnych próbkach materiałów klinicznych pobranych w okresie 1.01.2012-30.09.2014 roku.

wrażliwość (MIC w zakresie 4-8) również u 6, natomiast 2 szczepy charakteryzowały się wrażliwością na ten lek (MIC 1,5, 2) (ryc. 4).

W populacji szczepów *Klebsiella pneumoniae* z mechanizmem oporności NDM-1 8 szczepów było opornych na meropenem (MIC w zakresie 16-32), 5 szczepów średniowrażliwych (MIC w zakresie 4-8) oraz 1 szczep wrażliwy (MIC 2) na ten lek. Wszystkie 14 badanych szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 wykazywało całkowitą oporność na ertapenem. Wśród szczepów nie stwierdzono oporności na gentamycynę (MIC w zakresie 1-2), a tylko 2 szczepy były średniowrażliwe (MIC 16) na amikacynę. Ponadto, wszystkie szczepy NDM-1 wykazywały oporność na netylmocynę i tobramycynę. Szczepy *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 były również w 100% oporne na ciprofloksacynę, trimetoprim/sulfametoksazol. W analizowanym materiale wykryto także 2 szczepy oporne na kolistynę (MIC 16, 32) oraz 12 wrażliwych (MIC w zakresie 0,094-0,25) Żaden z analizowanych szczepów nie wykazywał wrażliwości na tygecyklinę, w tym 10 izolatów charakteryzowało się średniowrażliwością (MIC w zakresie 1,5-2), a 2 opornością (MIC 3) na ten antybiotyk (ryc. 4).

W pracy analizowano również próbki z badań przesiewowych w kierunku nosicielstwa CPE.



Ryc. 4. Lekowrażliwość szczepów *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających metalo-β-laktamazę NDM-1 wyizolowanych z materiałów klinicznych w okresie 1.01.2012-30.09.2014 roku.

W okresie 1.01.2012-30.09.2014 roku w tych materiałach zidentyfikowano 10 szczepów *Klebsiella pneumoniae* produkujących karbapenemazy. Analiza częstości ich występowania w analizowanym w pracy okresie wykazała, że w roku 2012 w badaniach screeningowych nie stwierdzono szczepów *Klebsiella pneumoniae* produkujących karbapenemazy. Pozytywne wyniki w kierunku nosicielstwa CPE otrzymano w czasie od 1.01.2013 do 30.09.2014 roku. W tym okresie szczepy *Klebsiella pneumoniae* produkujące karbapenemazy stwierdzono u 10 chorych, w tym 7 z chorych hospitalizowano w 2013 roku, a 3 pozostałych przyjęto do szpitala w 2014 roku. Wśród 7 nosicieli, których leczono w 2013 roku, 4 przyjęto ponownie do szpitala w roku następnym, stwierdzając w badaniach przesiewowych w dniu przyjęcia utrzymujące się nosicielstwo u 3 chorych. Chorzy zgłosili się do szpitala po pięciu, siedmiu i dziesięciu miesiącach od ostatniej hospitalizacji. U czwartego chorego wyniki badań w kierunku nosicielstwa wykonane po ośmiu miesiącach od ostatniej hospitalizacji okazały się ujemne.

Analiza szczepów *Klebsiella pneumoniae* produkujących karbapenemazy zidentyfikowanych w badaniach przesiewowych wykazała, że wszystkie wyizolowane szczepy wzrastały na podłożu selektywnym Chrom Agar KPC. Ponadto były dodatnie w metodzie biochemicznej Carba NP i metodzie fenotypowej w kierunku MBL. Stosując metodę PCR u wszystkich 10 szczepów, wykryto również obecność genu *blaNDM-1*, co potwierdziło produkcję metalo- β -laktamazy typu NDM-1.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

Wyniki przeprowadzonych badań pokazują, że pałeczki *Klebsiella pneumoniae* stanowią drugi pod względem częstości występowania gatunek w obrębie rodziny *Enterobacteriaceae* identyfikowany w materiałach chorych z oddziału chirurgii CSK WUM. Ze względu na duży odsetek (67%) szczepów *Klebsiella pneumoniae* produkujących β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) sytuacja wydaje się bardzo niekorzystna pod względem epidemiologicznym. Największy niepokój budzi jednak występowanie wśród 236 wyizolowanych szczepów *Klebsiella pneumoniae* aż 14 (6%) szczepów wytwarzających metalo- β -laktamazy typu NDM-1. Alarmujący jest również fakt prawie czterokrotnego wzrostu izolacji od chorych oddziału chirurgii CSK szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 w ostatnich trzech kwartałach roku 2014 w stosunku do roku 2013. Analiza wyników badań przesiewowych pokazała, że pacjenci z dodatnimi izolacjami *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 byli jednocześnie nosicielami drobnoustroju w przewodzie pokarmowym. Wyniki te potwierdzają istotną rolę kolonizacji jelitowej w zakażeniach o etiologii *Klebsiella pneumoniae*. Obecność *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 w przewodzie pokarmowym pacjenta stanowi duże zagrożenie zarówno dla skolonizowanego chorego, jak również osób

w jego otoczeniu. Pacjenci skolonizowani *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 są bowiem doskonałym rezerwuarem bakterii z wysoce niebezpiecznym mechanizmem oporności. W związku z tym wydaje się, że izolacja skolonizowanych chorych oraz stały epidemiologiczny nadzór są niezbędnymi elementami przeciwdziałania i zapobiegania powstaniu lokalnych epidemii. *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 rozprzestrzenia się najczęściej poprzez ręce personelu i w pierwszym etapie kolonizuje przewód pokarmowy chorego, a w sprzyjających warunkach, takich jak chemioterapia, zabiegi operacyjne, intubacja, cewnikowanie prowadzi do rozwoju zakażenia. Ponadto kolonizacja *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 w przewodzie pokarmowym może utrzymywać się długo (5, 7, 10 miesięcy), ponieważ nosicielstwo nie wywołuje żadnych objawów klinicznych, w związku z tym jest często niewykrywane. Stwarza to duże zagrożenie epidemiologiczne dla oddziałów szpitalnych na terenie całego kraju. Poza tym możliwości leczenia infekcji o etiologii *Klebsiella pneumoniae* produkujących metalo- β -laktamazę typu NDM są bardzo ograniczone. Szczepy analizowane w pracy były odporne na większość antybiotyków z wyjątkiem gentamycyny i kolistyny, przy czym wrażliwość na kolistynę stwierdzono u 12 z 14 analizowanych szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w przypadku karbapenemów – leków ostatniej szansy – wrażliwość na imipenem (MIC 1,5, 2) wykazano tylko u dwóch szczepów, na meropenem (MIC 2) u jednego, a na ertapenem nie stwierdzono wrażliwości u żadnego ze szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1. Wyniki oznaczeń minimalnego stężenia hamującego (MIC) wykazały, że pałeczki *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 prezentowały odmienne fenotypy oporności na karbapenemy. Różnorodność fenotypowa może wynikać z innego poziomu ekspresji enzymu, stopnia powinowactwa do określonego antybiotyku oraz obecności innych mechanizmów oporności w komórce (3). Zjawisko to stwarza dodatkowe utrudnienia w diagnostyce szczepów produkujących metalo- β -laktamazy. Jest to szczególnie widoczne w przypadku pałeczek wykazujących wrażliwość *in vitro* na karbapenemy. Użyteczność tych leków w leczeniu zakażeń wywołanych przez *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających karbapenemazy jest wciąż dyskutowana. W badaniach Tzouvelekisa i wsp. stwierdzono, że skuteczność terapeutyczna karbapenemów przy ich właściwym dawkowaniu zależy od wartości MIC, dla wartości MIC > 8 wynosi ona 25%, dla MIC = 8 – 66,7%, 71,4% dla MIC = 4 i 72,4% przy wartości MIC \leq 2 (30). Ponadto zastosowanie karbapenemów w monoterapii zawsze stwarza ryzyko niepowodzenia terapeutycznego. Obecnie zaleca się terapie skojarzone z antybiotykami, wykazującymi wrażliwość *in vitro* w antybiogramie. Niestety wyniki przedstawione w pracy, jak również doniesienia wielu innych autorów (31-34) wykazały, że wśród pałeczek *Klebsiella pneumoniae* produkujących metalo- β -laktamazę typu NDM występuje powszechna wielooporność. Cecha ta związana jest z obecnością na ruchomych elementach genetycznych (plazmidach,

transpozonach) genów kodujące karbapenemazy oraz innych genów kodujących oporności na różne inne grupy terapeutyczne leków. Poza tym taka lokalizacja genów sprzyja rozprzestrzenianiu się wielooporności wśród drobnoustrojów nie tylko tego samego gatunku. W związku z tym można stwierdzić, że pałeczki *Klebsiella pneumoniae* produkujące karbapenemazy są obecnie największym zagrożeniem dla polskich szpitali zarówno z punktu widzenia epidemiologicznego, jak i terapeutycznego.

WNIOSKI

1. Wśród 236 szczepów *Klebsiella pneumoniae* wyizolowanych z materiałów klinicznych 158 (67%)

wytwarzało enzym β -laktamazę o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL), a 14 (6%) metalo- β -laktamazę typu NDM-1.

2. Szczepy *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 charakteryzowały się wieloopornością. Wszystkie wykazywały 100% wrażliwość na gentamycynę, w 86% wrażliwość na kolistynę, w 14% na imipenem i w 7% na meropenem. Wszystkie były odporne na ertapenem.
3. Liczba szczepów *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających metalo- β -laktamazę typu NDM-1 wzrosła prawie 4-krotnie w stosunku do roku poprzedniego.

PIŚMIENNICTWO

1. Dzierżanowska D: Zakażenia szpitalne. Wyd. 2, Alfa Medica Press, Białko-Biała 2008.
2. Podschun R, Ullmann U: *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998; 11(4): 589-603.
3. Nikonorow E, Baraniak A, Gniadkowski M: Oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na antybiotyki β -laktamowe wynikająca z wytwarzania β -laktamaz. Post Mikrobiol 2013; 52(3): 261-271. <http://www.pm.microbiology.pl/web/archiwum/vol5232013261.pdf>.
4. Knothe H, Shah P, Krcmery V et al.: Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefepime and ceftazidime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983; 11(6): 315-317.
5. Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ et al.: EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing: EUCAST expert rules. Clin Microbiol Infect 2013; 19(2): 141-160.
6. Ambler RP: The Structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980; 289(1036): 321-331.
7. Baraniak A, Izdebski R, Herda M et al.: Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(10): 4565-4567.
8. Fiett J, Baraniak A, Mrowka A et al.: Molecular Epidemiology of Acquired-Metallo- β -Lactamase-Producing Bacteria in Poland. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(3): 880-886.
9. Sękowska A, Gospodarek E, Kruszyńska E et al.: Izolacja pierwszego w Polsce szczepu *Klebsiella pneumoniae* wytwarzającego metalo- β -laktamazę. Anestezjologia Intensywna Terapia 2010; XLII(1): 27-30.
10. Yong D, Giske CG, Toleman M et al.: A novel subgroup metallo-beta-lactamase (MBL), NDM-1 emerges in *Klebsiella pneumoniae* (KPN) from India. 48th Annual ICAAC/IDSA 46th Annual Meeting, Washington DC 2008: C1-105.
11. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR et al.: Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis 2010; 10(9): 597-602.
12. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA et al.: Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? J Antimicrob Chemother 2011; 66(4): 689-692.
13. Fiett J, Baraniak A, Izdebski R et al.: The first NDM metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolate in Poland: evolution of IncFII-type plasmids carrying the *bla*(NDM-1) gene. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(2): 1203-1207.
14. Nordmann P, Naas T, Poirel L: Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis 2011; 17(10): 1791-1798.
15. Nordmann P, Poirel L: The difficult-to-control spread of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* worldwide. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 2014; 20(9): 821-830.
16. Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E et al.: Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(4): 2125-2128.
17. Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, de Kraker ME et al.: Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing *Enterobacteriaceae* in the Netherlands, 2009 to 2011. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull 2014; 19(9): 20723.
18. Robert J, Pantel A, Mérens A et al.: Incidence rates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011-12. J Antimicrob Chemother 2014; 69(10): 2706-2712.
19. Majewski P, Wieczorek P, Sacha PT et al.: Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* ST89 infection in Poland. Int J Infect Dis 2014; 25: 107-109.
20. Hryniewicz W: Zalecenia dotyczące postępowania w przypadku zachorowań sporadycznych i ognisk epidemicznych wywołanych przez Gram-ujemne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*. 2012; <http://www.antybiotki.edu.pl>.
21. Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L et al.: Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2008; 46(9): 3110-3111.
22. Gniadkowski M, Żabicka D, Hryniewicz W: Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009. Oznaczenie wrażliwości pałeczek Gram-ujemnych. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów; 2009: 1-29. http://www.korid.edu.pl/pdf/02-Rek2009-Paleczki_z_rodziny_Enterobacteriaceae.pdf.
23. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zones diameters. Version 4.0. 2014. <http://www.eucast.org>.
24. Dortet L, Poirel L, Nordmann P: Rapid Identification of Carbapenemase Types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by Using a Biochemical Test. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(12): 6437-6440.
25. Żabicka D, Baraniak A, Gniadkowski M et al.: Wykrywanie karbapenemaz – zalecenia 2013. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów, Warszawa 2013.
26. Lee K, Lim YS, Yong D et al.: Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2003; 41(10): 4623-4629.
27. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM et al.: Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. J Clin Microbiol 2008; 46(12): 4083-4086.
28. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W et al.: Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. Int J Antimicrob Agents 2012; 39(2): 168-172.
29. Van Dijk K, Voets GM, Scharringa J et al.: A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 2014; 20(4): 345-349.
30. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M et al.: Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev 2012; 25(4): 682-707.
31. Nordmann P, Couard JP, Sansot D et al.: Emergence of an Autochthonous and Community-Acquired NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Europe. Clin Infect Dis 2012; 54(1): 150-151.
32. Poirel L, Benouda A, Hays C et al.: Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. J Antimicrob Chemother 2011; 66(12): 2781-2783.
33. Poirel L, Fortineau N, Nordmann P: International Transfer of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* from Iraq to France. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(4): 1821-1822.
34. Poirel L, Özdamar M, Ocampo-Sosa AA et al.: NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Now in Turkey. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(5): 2784-2785.