

Agnieszka Chmielarczyk¹, Jadwiga Wójkowska-Mach¹, Alicja Grzesik², Dorota Romaniszyn¹,
Monika Brzychczy-Włoch¹, Ewa Helwich³, Piotr B. Heczko¹

WYSTĘPOWANIE LEKOOPORNÝCH PAŁECZEK Z RODZINY *ENTEROBACTERIACEAE* U DZIECI HOSPITALIZOWANYCH NA ODDZIAŁACH PEDIATRYCZNYCH SZPITALA WYSOKOSPECJALISTYCZNEGO

OCCURRENCE OF RESISTANT *ENTEROBACTERIACEAE* ISOLATED FROM CARRIERS AND INFECTIONS IN PEDIATRIC WARDS OF A POLISH REFERENCE HOSPITAL

¹ Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

² Centralne Laboratorium Instytut Matki i Dziecka w Warszawie

³ Klinika Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka Instytut Matki i Dziecka w Warszawie

STRESZCZENIE

Od dzieci hospitalizowanych na oddziałach pediatrycznych szpitala wysokospecjalistycznego, z badań przesiewowych jak i od pacjentów z objawami zakażeń, wyizolowano dwadzieścia sześć ESBL-dodatnich szczepów pałeczek z rodziny. Stwierdzono zachorowalność związaną z zakażeniami o etiologii bakteryjnej na poziomie 3,4/1000 osobodni pobytu, wśród zakażeń dominowały: zakażenie krwi (41%) oraz zapalenie płuc (31%). Wszystkie izolaty zostały przebadane pod kątem obecności genów oporności *bla* (*bla*SHV, *bla*TEM i *bla*CTX-M) oraz określono podobieństwo pomiędzy szczepami poszczególnych gatunków metodą PFGE. Wykazano dominujące występowanie β-laktamazy typu CTX-M. Większość szczepów ESBL było szczepami poliklonalnymi, wyodrębniono trzy endemiczne kłony bakterii (wśród *Enterobacter* i *Klebsiella*), które mogły zostać przeniesione pomiędzy pacjentami. Stwierdzono brak związku pomiędzy kolonizacją pacjentów, a obserwowanymi przypadkami zakażeń objawowych. Pałeczki ESBL rozprzestrzeniać się mogą zarówno poprzez namnażanie i przenoszenie klonów epidemicznych, jak i poprzez przenoszenie genów oporności kodujących β-laktamazy ESBL, głównie przy udziale plazmidowego DNA.

Słowa kluczowe: pałeczki ESBL dodatnie, geny oporności *bla*, multiplex PCR, PFGE, nadzór nad zakażeniami

ABSTRACT

Study was carried out from June to November 2008 in the group of newborn babies hospitalized at the highly specialized hospital. Twenty-six clinical isolates of ESBL-positive rods were collected from 24 patients. Infections incidence was confirmed on the level 3.4/1000 patientdays (pds), among infection dominated blood infection (41%) and pneumonia (31%). All isolates were analyzed for the presence of genes of the resistance *bla*SHV, *bla*TEM i *bla*CTX-M by the multiplex PCR amplification. Isolates were genotyped by PFGE. All isolates were characterized by the presence of the *bla*CTX-M gene. The most of ESBL-positive strains were polyclonal. Three endemic clones of the bacteria were distinguished (among *Enterobacter* and *Klebsiella*) which could be moved between patients.

Appearing of infection among hospitalized newborn babies showed no relation with the frequency isolation of strains with ESBL phenotype during the period of the study at hospital. The dissemination of ESBLs is due to clonal spread or plasmid dissemination among or between species.

Key words: ESBL rods, genes of resistance *bla*, multiplex PCR, PFGE, infection control

WSTĘP

Najbardziej rozpowszechnionym mechanizmem oporności pałeczek Gram ujemnych na antybiotyki β-laktamowe jest wytwarzanie β-laktamazy, enzymów

zdolnych do hydrolizy pierścienia β-laktamowego (1). Leczenie zakażeń bakteryjnych antybiotykami oksymino-β-laktamowymi (cefalosporyny III generacji i monobaktamy) doprowadziło do selekcji szczepów wytwarzających β-laktamazy o rozszerzonym spek-

trum substratowym (ESBLs, ang. *extended-spectrum β -lactamases*) (2, 3). ESBL-dodatnie szczepy bakterii wykazują często również oporność na inne grupy antybiotyków stosowane powszechnie w leczeniu. Rozprzestrzenianie się wieloopornych szczepów pałeczek stało się dużym problemem na oddziałach szpitalnych; powodowane jest poprzez ich selekcję w trakcie terapii antybiotykowej zakażeń bakteryjnych, a także poprzez horyzontalną transmisję szczepów pomiędzy pacjentami (4, 5). Aby zoptymalizować kontrolę nad zakażeniami, trzeba uwzględnić obie te składowe. Dotychczas w większości badań uwaga była skupiona na rozprzestrzenianiu się szczepów epidemicznych pałeczek ESBL, zwłaszcza wywołujących epidemie na oddziałach intensywnej terapii (6-8). Jednak szczepy ESBL wywołujące zakażenia w szpitalach nie zawsze są szczepami epidemicznymi, mogą to być również szczepy selekcyjonowane z własnej flory fizjologicznej pacjentów; selekcja antybiotykowa i przekazywanie genów oporności za pośrednictwem plazmidów i transpozonów sprzyjają zwiększeniu częstości izolacji takich szczepów (9). Podczas analizy zarówno szczepów epidemicznych, jak i endemicznych dużą rolę odgrywają metody molekularne (10, 7). Elektroforeza pulsacyjna (PFGE) pozwala ustalić klonalne pokrewieństwo w obrębie szczepów pałeczek ESBL z poszczególnych gatunków. Metoda multipleks PCR pozwala określić ogólny profil β -laktamaz występujących u pałeczek *Enterobacteriaceae* w zależności od obecności w genomie genów *bla*^{TEM}, *bla*^{SHV} i *bla*^{CTX-M}.

Celem pracy była analiza występowania ESBL-dodatnich pałeczek *Enterobacteriaceae* pochodzących zarówno od skolonizowanych pacjentów oddziałów noworodkowych szpitala wysokospecjalistycznego jak również będących czynnikami zakażeń. Badania objęły cztery gatunki izolowanych drobnoustrojów: *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae* i *Klebsiella oxytoca*.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono w grupie noworodków hospitalizowanych w szpitalu wysokospecjalistycznym o profilu perinatologicznym w okresie od czerwca do listopada 2008 r. Był to okres, kiedy w części szpitala prowadzono remont, co stwarzało dodatkowe zagrożenie epidemiczne. W analizowanym czasie prowadzono nadzór nad zakażeniami metodą łączności oddziału z laboratorium mikrobiologicznym. Wszystkie hospitalizowane noworodki poddawane były cotygodniowemu badaniu przesiewowemu w kierunku obecności drobnoustrojów lekoopornych, w tym celu pobierano wymaz okołoodbytniczy bądź inny materiał od dzieci, które pozostają pod opieką szpitala 7 dni i więcej. W przypad-

ku dodatniego wyniku, dzieci poddawano procedurze izolacji kontaktowej (11). W przypadku podejrzenia rozwoju zakażenia pobierano w miarę możliwości odpowiedni materiał do badania mikrobiologicznego, w zależności od klinicznej postaci zakażenia.

Pacjenci. Nadzór epidemiologiczny objął 874 hospitalizowanych dzieci. W okresie objętym badaniami stwierdzono 22 przypadki zakażeń (5 przypadków zakażeń wczesnych i 17 przypadków zakażeń późnych) głównie u dzieci z małą (<1 500 gramów) bądź bardzo małą (<750 gramów) masą urodzeniową. W 11 przypadkach wykryto bakteryjny czynnik etiologiczny.

Pacjenci z grupy podwyższonego ryzyka wystąpienia zakażenia, lub ci, u których występowało podejrzenie jego rozwoju, otrzymywali w okresie poporodowym ampicylinę lub ampicylinę w skojarzeniu z gentamycyną przez pięć dni. W praktyce postępowanie to dotyczyło wszystkich dzieci w grupie, w której izolowano badane drobnoustroje.

Kolekcja izolatów. Badane szczepy drobnoustrojów pochodziły zarówno z badań przesiewowych wykonywanych w jednostce (23 izolaty, w większości z wymazów z odbytu) jak i z zakażeń objawowych: rany – jeden izolat, układu moczowego – jeden izolat oraz zakażenia uogólnionego (z krwi) – jeden izolat. Wszystkich przebadanych izolatów pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* było 26, natomiast pacjentów od których je izolowano 24 – trzy izolaty (*E.coli* nr 24, *Enterobacter* nr 8, *K. pneumoniae* nr 15) pochodziły od jednego pacjenta.

Szczepy referencyjne *E. coli* (niosący gen oporności *bla*^{TEM}-1) i *Klebsiella pneumoniae* (niosący gen oporności *bla*^{SHV}-1) pochodziły z kolekcji ATCC (odpowiednio: ATCC-35218 i ATCC-700603). Szczep kontrolny *E. coli* niosący gen oporności *bla*^{CTX-M}-1 pochodził z kolekcji własnej, szczep kontrolny *E.coli* 3290/96 niosący geny oporności *bla*^{CTX-M}-3 oraz *bla*^{TEM}-1 otrzymano dzięki uprzejmości dr hab. M. Gniadkowskiego z Centralnego Laboratorium Surowic i Szczepionek z Warszawy.

Analiza fenotypowa. Badane szczepy identyfikowano stosując metody typowania biochemicznego przy użyciu testów API firmy Bio-Merieux. Lekowrażliwość oznaczano przy zastosowaniu metody dyfuzyjno - krążkowej, a wynik interpretowano zgodnie z zaleceniami CLSI (ang. *Clinical Laboratory Standards Institute*). Zdolność do syntezy β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym wykrywano fenotypowo testem dwóch krążków (ang. *double disk synergy test – DDST*) (12, 13).

Multipleks PCR. Bakteryjne DNA było oczyszczane przy pomocy gotowego zestawu kolumnkowego do izolacji DNA z firmy A&A Biotechnology. Wszystkie izolaty były zbadane pod kątem obecności genów oporności *bla*^{SHV}, *bla*^{TEM} i *bla*^{CTX-M} w reakcji

multipleks PCR wg. *Monstein* (14). Dane o zastosowanych starterach zebrano w tabeli I. Temperatura przyłączania starterów wynosiła 60°C. Reakcja amplifikacji prowadzona była w objętości 25 µl. Stężenie każdego ze starterów wynosiło 10 pmoli w pojedynczej próbówce. Polimerazę Taq (Fermentas) dodawano w ilości 1U na próbkę. Do każdej reakcji PCR dodawano 1µl wyizolowanego DNA. Warunki reakcji były następujące: wstępna denaturacja 15 minut w 95°C, 30 cykli złożonych z denaturacji w 94°C przez 30 sekund, przyłączania starterów w temp. 60°C przez 30 sekund i elongacji w 72°C przez 2 minuty, reakcję zamykała końcowa elongacja w 72°C przez 10 minut. Produkty amplifikacji były rozdzielane na 1,5% żelu agarozowym w buforze 0,5xTBE (ang. TRIS borate-EDTA).

Tabela I. Startery oraz wielkości produktów w reakcji multipleks PCR

Table I. Primers and size of amplicons in reaction multiplex PCR

Starter	Sekwencja (kierunek 5'-3')	Wielkość produktu (pz)
SHV.SE	atgcttatattcgctgtg	747
SHV.AS	tgcttgatttcggccaa	
TEM.SE	tcgccatacactatttcagaatga	445
TEM.AS	acgctcaccggctccagatttat	
CTX-M-U1	atgtgcagaccagtaargtkatggc	593
CTX-M-U2	tgggtraartargtsaccagaaycagcgg	

Elektroforeza pulsacyjna (PFGE). Wszystkie izolaty zostały poddane typowaniu molekularnemu z zastosowaniem metody elektroforezy pulsacyjnej PFGE na aparacie CHEF III (Bio-Rad Laboratories). Stosowano procedurę według *Manzur i wsp.* z własnymi modyfikacjami (6).

DNA genomowy był izolowany przy użyciu bloczków agarozowych, poddawany lizie z użyciem Proteinazy K (Polgen), a następnie poddany trawieniu restrykcyjnemu. W przypadku szczepów z rodzaju *Klebsiella* i *Enterobacter* zastosowano enzym restrykcyjny *Xba*I, w przypadku szczepów *E. coli* enzym restrykcyjny *Sfi*I (Fermentas). Warunki reakcji dla wszystkich gatunków były jednakowe: temp. 14°C, napięcie 6V/cm, puls początkowy 2s, puls końcowy 40s, czas reakcji 22,5 godziny. Wzory prążków uzyskane po elektroforezie pulsacyjnej porównywano przy użyciu programu Molecular Analyst (Applied Maths). Stosowano współczynnik podobieństwa Dice, UPGMA (ang. *unweighted pair group method using arithmetic averages*).

WYNIKI

Zachorowalność związana z zakażeniami o różnej etiologii drobnoustrojowej wyniosła ogółem w badanej

populacji 3,4/1 000 osobodni pobytu. Dominowały zakażenia późne (17 przypadków, tj. 77,3%), natomiast wśród zakażeń wczesnych obserwowano: zakażenie krwi - 2 przypadki, zapalenie płuc - 2 przypadki oraz 1 zachorowanie NEC (martwicze zapalenie jelit, ang. *necrotizing enterocolitis*).

Spośród rozpoznanych zakażeń (wczesnych i późnych) najczęściej obserwowano i laboratoryjnie potwierdzono zakażenia krwi: 9 przypadków tj. 40,9% ze wszystkich rozpoznanych zakażeń. Ich etiologię stanowiły głównie ziarenkowce Gram-dodatnie (99,7%), a wśród nich dominowały gronkowce koagulazoujemne (1 szczerp przejawiał oporność na metycylinę MRCNS - 25%).

Drugą wśród dominujących postacią zakażeń stanowiło zapalenie płuc: 7 przypadków tj. 31,8% rozpoznanych przypadków zakażeń, w tym 2 u pacjentów wentylowanych mechanicznie (VAP). W 1 przypadku uzyskano informację o etiologii (*Enterobacter sp.*) u pozostałych chorych stosowano leczenie empiryczne.

Martwicze zakażenie jelit (NEC) obserwowano w trzech przypadkach, tylko u dzieci z bardzo małą masą urodzeniową.

U dwojga dzieci poddawanych zabiegom operacyjnym (przepuklina pępkowa oraz przetrwały przewód tętniczy) stwierdzono objawy zakażenia operowanego miejsca. Ponadto u jednego z dzieci wystąpiły objawy zakażenia układu moczowego o etiologii grzybiczej (grzyby drożdżopodobne).

Podczas 5-miesięcznego okresu badań wyizolowano 26 szczepów pałeczek *Enterobacteriaceae* wyróżniających się fenotypem ESBL od 24 pacjentów (tab. II). Wśród nich były 4 szczepy *E. coli*, 8 szczepów *Enterobacter sp.*, 5 szczepów *Klebsiella oxytoca* i 9 szczepów *Klebsiella pneumoniae*. Dwa izolaty *E. coli* pochodziły z wymazów z odbytu, po jednym z wymazów z rany operacyjnej i z posiewu krwi. Siedem izolatów *Enterobacter* pochodziło z wymazów z odbytu. Wszystkie izolaty *Klebsiella oxytoca* pochodziły z wymazów okołodobytniczych, wśród *Klebsiella pneumoniae* 7 było z wymazów z odbytu, 2 z posiewu moczu (jedno zakażenie objawowe).

Równoległe z wykonaniem testu wykrywającego produkcję β-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym oznaczano wrażliwość badanych szczepów na: penicyliny w połączeniu z inhibitorami β-laktamaz, gentamycynę, ciprofloksacynę, kotrimoksazol i imipenem. Wobec gentamycyny opornych było 65,3% szczepów, 26,9% izolatów nie wykazywało wrażliwości wobec działania kotrimoksazolu. Szczepy wykazujące mechanizm ESBL, które były dodatkowo odporne na więcej niż jeden antybiotyk, stanowiły 19,2% badanej populacji (tab. II). Wszystkie badane drobnoustroje były wrażliwe na preparaty skojarzone: amoksycylina/

Tabela II. Wyizolowane pałeczki *Enterobacteriaceae* o fenotypie ESBLTable II. *Enterobacteriaceae* with ESBL phenotype isolated from patients

Numer szczepu	Pobrano materiał	Data pobrania	Identyfikacja	Lekooporność				
				Obecność genów oporności potwierdzona metodą PCR			Badanie fenotypu	
				<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> CTX-M	<i>bla</i> SHV	Gentamycyna	Kotrimoksazol
3	Wymaz z rany operacyjnej	08.09.2008	<i>E.coli</i>	+	+	-	0	0
23	Krew	20.09.2008	<i>E.coli</i>	-	+	-	0	0
24	Wymaz z odbytu	06.10.2008	<i>E.coli</i>	+	+	-	W	0
32	Wymaz z odbytu	13.10.2008	<i>E.coli</i>	+	+	-	0	0
2	Wymaz z odbytu	09.09.2008	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	-	0	W
8	Wymaz z odbytu	18.08.2008	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	-	0	W
9	Wymaz z odbytu	17.06.2008	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	+	0	0
11	Wymaz z odbytu	27.06.2008	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	-	0	W
12	Wymaz z odbytu	14.07.2008	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	-	0	W
14	Kał	10.09.2008	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	-	0	W
18	Wymaz z odbytu	30.09.2008	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	-	W	W
22	Wymaz z odbytu	23.09.2008	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	-	0	W
17	Wymaz z odbytu	30.09.2008	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	-	0	W
20	Wymaz z odbytu	30.09.2008	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	-	0	W
21	Wymaz z odbytu	23.09.2008	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	-	0	W
28	Wymaz z odbytu	21.10.2008	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	-	0	W
31	Wymaz z odbytu	14.10.2008	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	-	0	W
1	Wymaz z odbytu	07.08.2008	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	W	W
4	Wymaz z odbytu	09.09.2008	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	W	W
6	Wymaz z odbytu	23.09.2008	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	W	W
7	Wymaz z odbytu	23.09.2008	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-	W	W
10	Mocz	01.09.2008	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-	W	W
15	Wymaz z odbytu	25.08.2008	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	0	W
16	Wymaz z odbytu	09.09.2008	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	W	W
27	Wymaz z odbytu	15.09.2008	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-	0	0
33	Mocz	04.11.2008	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-	W	W

Legenda: W - szczep wrażliwy na gentamycynę bądź kotrimoksazol, O - szczep oporny na gentamycynę bądź kotrimoksazol.

Legend: W- sensitivity on gentamycin or co-trimoxazole, O- resistance on gentamycin or co-trimoxazole

kwasy klawulanowy, piperacylina/tazobaktam, oraz na ciprofloksacynę i imipenem.

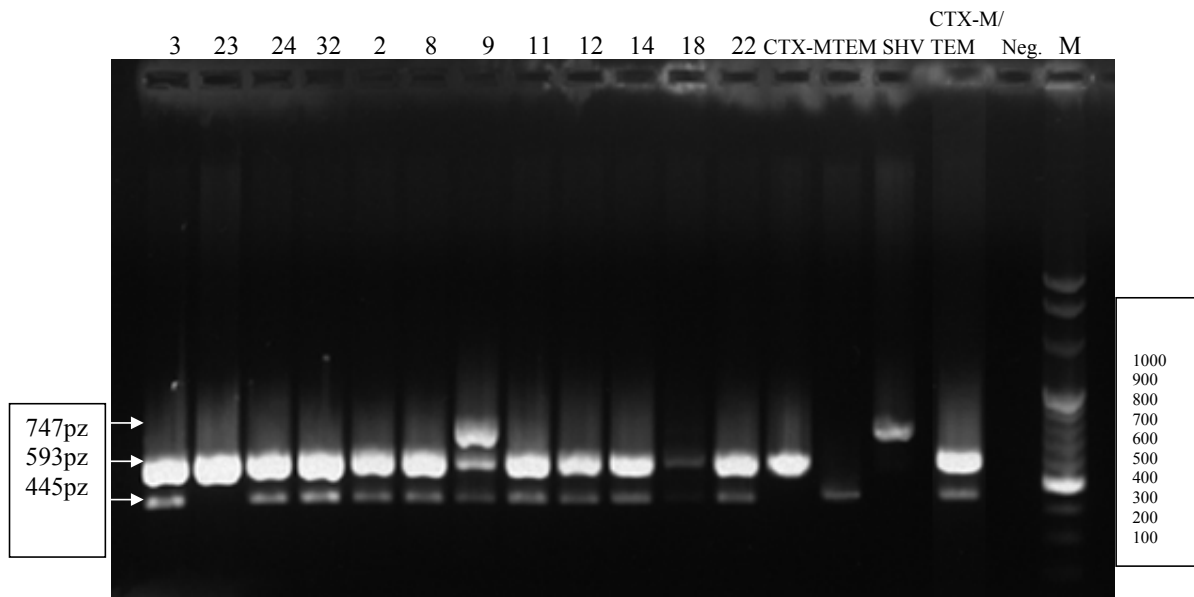
Wszystkie izolaty zostały przebadane pod kątem obecności genów oporności *bla* (*bla*SHV, *bla*TEM, *bla*CTX-M) przy zastosowaniu metody multiplex PCR. Wśród 26 izolatów pałeczek *Enterobacteriaceae* wszystkie charakteryzowały się obecnością genu *bla*CTX-M. Gen *bla*TEM był dodatkowo obecny u trzech szczepów *E.coli*, wszystkich 8 szczepów *Enterobacter*, wszystkich 5 szczepów *Klebsiella oxytoca* i u 5 szczepów *Klebsiella pneumoniae*. Obecność genu *bla*SHV potwierdzono u jednego szczepu *Enterobacter* (nr 9), oraz u jednego szczepu *K. pneumoniae* (nr 15) łącznie z genem *bla*TEM. Określano tylko ogólny profil β-laktamaz, nie przeprowadzono sekwencjonowania produktów PCR, zatem nie określono konkretnych β-laktamaz jedynie ich typ (ryc.1).

Cztery izolaty *E.coli* reprezentowały unikatowe wzory restrykcyjne (szczepy niespokrewnione). Wśród

izolatów *Enterobacter* cztery wykazywały identyczny układ prążków (szczepy o numerach 2, 11, 12, i 22), dlatego zaliczono je do jednego klonu. Spośród 5 izolatów *Klebsiella oxytoca* trzy były jednym klonem (szczepy o numerach 17, 20 i 21), natomiast w przypadku *Klebsiella pneumoniae* do jednego klonu zaliczono 5 izolatów (szczepy o numerach 1, 4, 6, 7 i 16) (ryc.2).

Izolaty *Enterobacter* należące do jednego klonu charakteryzowały się obecnością genów dwóch typów β-laktamaz (*bla*TEM, *bla*CTX-M) oraz identycznym wzorem oporności na antybiotyki (oporność na gentamycynę). Trzy identyczne izolaty *K. oxytoca*, które posiadały geny *bla*TEM i *bla*CTX-M wykazywały identyczny wzór lekooporności. W obrębie klonu *K. pneumoniae* cztery izolaty miały tylko geny β-laktamazy CTX-M, jeden izolat miał geny dla *bla*CTX-M i *bla*TEM.

Przeprowadzone badania wskazały, że żadnego z izolatów *E.coli* nie można uznać za szczep epidemiczny, wykazały one duże zróżnicowanie zarówno w typie



Ryc. 1. Przykładowy obraz uzyskany w metodzie multipleks PCR. Trzy typy β -laktamaz występujące wśród pałeczek *Enterobacteriaceae*. Wielkość amplikonu to 747 par zasad, blaCTX-M 593 pz i blaTEM 445pz. Kontrole: blaCTX-M- szczep z kolekcji własnej, blaTEM- *E. coli* ATCC 35218, blaSHV- *K. pneumoniae* ATCC 700603, blaCTX-M i blaTEM szczep *E. coli* 3290/96, Neg.-kontrola negatywna-woda, M-wzorzec wielkości.

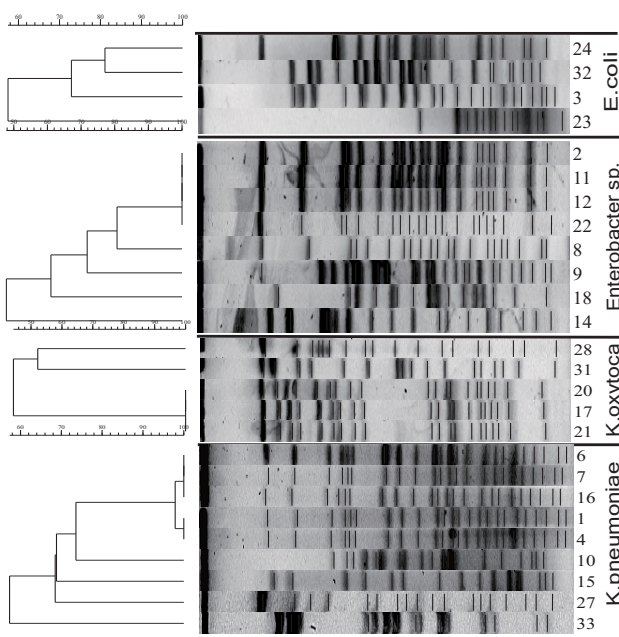
Fig. 1. Image get in the PCR multiplex method. Three types of *Enterobacteriaceae* β -lactamases: size of amplicons blaSHV 747bp, blaCTX-M 593 bp, blaTEM 445bp. Control strains: blaCTX-M- own collection, blaTEM- *E. coli* ATCC 35218, blaSHV- *K. pneumoniae* ATCC 700603, blaCTX-M i blaTEM strain *E. coli* 3290/96, Neg.-negative control, M- DNA ladder.

występujących u nich β -laktamaz jak i w profilach restrykcyjnych (szczepy niespokrewnione). Szczepy *Enterobacter* sp. będące jednym klonem pochodziły z Kliniki Neonatologii i Intensywnej Terapii Nowo-

rodka, a izolowane były w okresie od 27 czerwca do 23 września 2008 roku. Szczepy *Klebsiella oxytoca* będące jednym klonem pochodziły z tego samego oddziału, izolowane były w okresie od 23 września do 30 września 2008r. Cztery izolaty *Klebsiella pneumoniae* o jednakowym profilu restrykcyjnym izolowano od 7 sierpnia do 23 września 2008 roku (ryc.2).

DYSKUSJA

Występowanie zakażeń oraz drobnoustrojów lekoopornych (izolowanych zarówno od pacjentów z objawami choroby, jak i od pacjentów skolonizowanych) jest częstym zjawiskiem na oddziałach neonatologicznych. Dzieci przedwcześnie urodzone, a szczególnie noworodki z małą masą urodzeniową, są w znacznie większym stopniu narażone na ryzyko wystąpienia zakażeń. Związane jest to z występowaniem szeregu czynników predysponujących. Należą do nich przede wszystkim niedojrzałość immunologiczna i niedostatecznie rozwinięte inne mechaniczne bariery ochronne organizmu: skóry i błon śluzowych wyściełających naturalne otwory ciała wraz z ich fizjologiczną florą drobnoustrojową, które stanowią pierwszą linię obrony organizmu. Następnym problemem jest długa hospitalizacja i stosowanie wielu inwazyjnych zabiegów diagnostycznych i leczniczych, tj. cewnikowanie naczyń, mechaniczna wentylacja, żywienie pozajelitowe.



Ryc. 2. Dendrogramy podobieństwa szczepów *E.coli*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella oxytoca* i *Klebsiella pneumoniae* uzyskane w metodzie PFGE

Fig. 2. Dendrograms of strains similarity obtained thanks to PFGE method

W Stanach Zjednoczonych średnia długość pobytu noworodków z masą urodzeniową < 800 gramów wynosi 112 dni, cewnik centralny bądź pępkowy oraz wentylacja mechaniczna stosowane są średnio przez 50% dni pobytu na oddziale (15).

Zachorowalność związana z zakażeniami krwi sięga od 8,5 (na 1000 osobodni) u dzieci z masą urodzeniową <1000 gramów do 4,0 u dzieci do 1500 gramów (16). Uważa się, że zakażenie krwi jest jednym z silniejszych czynników ryzyka rozwoju zapaleń płuc u noworodków, co uwydatnia znaczenie tych zakażeń w nadzorze, szczególnie u pacjentów wentylowanych (17). Średnia zachorowalność związana z zapaleniem płuc sięga od 1,3 (na 1000 osobodni) u dzieci z masą <1000 gramów do 0,4 u dzieci do 1500 gramów (16).

Pałeczki Gram-ujemne nie są obecnie dominującymi czynnikami zakażeń na oddziałach neonatologicznych, jednak mimo że ich izolacja zdarza się obecnie rzadziej, nadal mają duże znaczenie w zakażeniach późnych – trudniejszych i bardziej wymagających większego zaangażowania w nadzorze nad zakażeniami. Dane *Grahama* nt. późnych przypadków sepsy wskazują, że w badanej przez niego grupie pacjentów zachorowalność (związana tylko z pałeczkami Gram –) wyniosła 16,9% (18). Szczególnie ważnymi czynnikami ryzyka zwiększającymi zakażenia o omawianej etiologii są: wiek urodzeniowy, mała masa urodzeniowa, długie stosowanie centralnych cewników naczyniowych (powyżej 10 dni), stosowanie oddechu wspomaganego, wady wrodzone układu pokarmowego (18). Dzieci objęte badaniem spełniały wszystkie te warunki.

Sytuacja epidemiologiczna na badanych oddziałach różniła się od oczekiwanej. Stwierdzono niższą od oczekiwanej zachorowalność, co było wynikiem stosunkowo krótkiego pobytu pacjentów na oddziałach, jak również było wynikiem metody wykrywania przypadków zakażeń w oparciu o pracę laboratorium mikrobiologicznego. Jednym z elementów ograniczających wyniki tego typu analiz (z zastosowaniem wyników badań mikrobiologicznych) jest problem pobierania materiałów do tego typu badań, co w przypadku np. zapalenia płuc w grupie najmniejszych dzieci jest niezwykle utrudnione, a czasami zupełnie niemożliwe. Potwierdzają to również wyniki niniejszej pracy. Żaden z obserwowanych przypadków zapalenia płuc nie został potwierdzony dodatnim wynikiem posiewu mikrobiologicznego. Dlatego jest prawdopodobne, że pewna liczba zakażeń nie została rozpoznana i zakwalifikowana ze względu na brak w strukturach szpitala zarówno aktywnie pracującego zespołu kontroli zakażeń, jak i pielęgniarek epidemiologicznych.

Stwierdzono natomiast efektywnie prowadzony i w pełni wykorzystany nadzór nad badaniami mikrobiologicznymi z oddziałów pediatrycznych i między innymi dlatego w badanym okresie obserwowano zja-

wisko izolacji szczepów z rodzaju *Enterobacteriaceae* o fenotypie ESBL. Zjawisko to jest bardzo częstym problemem w polskich szpitalach, gdzie od kilku lat prowadzi się intensywne badania nad opornością drobnoustrojów – w tym szczególnie wielolekoopornymi pałeczkami Gram-ujemnymi – bez objęcia nadzorem hospitalizowanych pacjentów. Sprawia to, że osobom zarządzającym szpitalami często umyka problem konieczności wprowadzenia do struktur szpitala efektywnej kontroli zakażeń, która jest trudna i czasochłonna, ale jednocześnie umożliwia uzyskanie rzeczywistego obrazu sytuacji epidemiologicznej w danej jednostce.

Wykorzystanie metod molekularnych pozwoliło na dokonanie szczegółowej charakterystyki szczepów ESBL-dodatnich pałeczek należących do czterech gatunków, a pojawiających się coraz częściej na oddziałach pediatrycznych. Wykazano, że wszystkie ESBL-dodatnie szczepy zawierały gen kodujący β -laktamazę typu CTX-M (100%). Inne typy β -laktamaz pojawiały się rzadziej: typ TEM u 21 szczepów (80,7%), typ SHV u 2 szczepów (7,7%). Choć w Stanach Zjednoczonych dominują szczepy z enzymami należącymi do rodziny TEM i SHV (4), β -laktamazy CTX-M u pałeczek ESBL-dodatnich są najszybciej ewoluującą obecnie klasą rozpowszechnioną w świecie (19). Wskazują na to podobne doniesienia ze Szwajcarii (91%) (20), Norwegii (90%) (21), Szwecji (92%) (10), a nawet Tajlandii (100%) (22). W Polsce β -laktamazy typu CTX-M występowały w 81,7% (23). Dodatkowo u szczepów ESBL obserwuje się oporność na aminoglikozydy i trimetoprim-sulfametoksazol, związane jest to z przenoszeniem genów oporności na tym samym plazmidzie (24). Wśród analizowanych 26 szczepów pałeczek, pięć możemy określić jako szczepy wielolekooporne.

Analiza PFGE wykazała 17 różnych pulsotypów: 4 w przypadku *E.coli*, 5 w przypadku *Enterobacter*, 3 u *K. oxytoca* i 5 u *K. pneumoniae*. Wyizolowane szczepy ESBL-dodatnich pałeczek były to szczepy poliklonalne, w trakcie badania nie zidentyfikowano żadnego szczepu, który mógłby być uznany za szczep epidemiczny. W przypadku szczepów z rodzaju *Klebsiella* i *Enterobacter* można wyodrębnić 3 endemiczne klony bakterii, które podlegały transmisji horyzontalnej. Pojawiające się endemicznie klony bakterii na niewielkim obszarze w krótkim okresie czasu mogą ulegać transmisji pomiędzy pacjentami (25).

Porównując profile β -laktamaz z pulsotypami PFGE w większości przypadków wykazano zgodność: jeden klon charakteryzował się jednakowym profilem β -laktamaz. Różnice występowały jedynie w przypadku jednego szczepu *K. pneumoniae*, szczep mający ten sam pulsotyp co pozostałe cztery miał inny profil β -laktamaz.

Ten fakt pozwala poprzeć sugestię, że szczepy ESBL-dodatnich pałeczek mogą być częściej roz-

przestrzeniane zarówno poprzez namnażanie się i przenoszenie klonów epidemicznych, jak i za pomocą przenoszenia genów oporności kodujących β -laktamazy ESBL, głównie przez DNA plazmidowe (26). Obie drogi rozprzestrzeniania, które obserwowane były również w badaniu populacji, powinny podlegać kontroli zakażeń.

Stwierdzono jednak brak związku pomiędzy kolonizacją pacjentów a obserwowanymi przypadkami zakażeń. Potwierdzeniem tego zjawiska był przypadek pacjenta, u którego rozpoznano w 2 dobie życia zakażenie krwi o etiologii *E. coli*. Szczep ten (nr 23 na ryc. 2) był szczepem unikatowym, niezwiązanym więc z transmisją horyzontalną oddziału. Stąd pozostaje otwarte pytanie o celowość prowadzenia rutynowych badań przesiewowych w kierunku wykrywania tzw. alarmowych czynników drobnoustrojowych, podczas kiedy wśród czynników zakażeń dominują drobnoustroje nieuznawane powszechnie za „alertowe”, tj. bez mechanizmów oporności.

Natomiast w badanym ośrodku należy przeprowadzić szczegółową analizę dotyczącą zasadności stosowania antybiotyków i wprowadzenia receptariusza szpitalnego przeznaczonego dla populacji badanych oddziałów. Podstawą jego przygotowania powinna być informacja o dominujących postaciach zakażeń (w badanym okresie: zakażenie krwi) oraz drobnoustrojach najczęściej izolowanych z zakażeń objawowych (w badanym okresie: bakterie z rodzaju *Staphylococcus*). Wysoka częstość kolonizacji przewodu pokarmowego pacjentów przez drobnoustroje z rodzaju *Enterobacteriaceae* o fenotypie ESBL może wskazywać właśnie na problem z właściwym stosowaniem leków przeciwdrobnoustrojowych. Aby skutecznie zapobiegać i leczyć zakażenia wywoływane przez szczepy wielolekooporne, badania epidemiologiczne powinny łączyć dane kliniczne z badaniami molekularnymi izolowanych szczepów.

PODSUMOWANIE

1. W badanym okresie w badanej jednostce stwierdzono obecność szczepów pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* o fenotypie ESBL w materiałach pobranych od pacjentów z objawami i bez objawów zakażenia. Wyniki wskazują na wysoki endemiczny poziom obecności genów oporności wśród drobnoustrojów izolowanych od pacjentów jednostki jak i na horyzontalne przeniesienie wybranych klonów – szczególnie *Enterobacter sp.*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*.
2. Sytuacja epidemiologiczna panująca na oddziale, tj. występowanie zakażeń wśród hospitalizowanych noworodków, pozostawała bez związku z częstością

izolacji pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* o fenotypie ESBL.

3. Ze względu na liczbę obserwowanych przypadków zakażeń szpitalnych oraz różnice w ich rozpowszechnieniu w stosunku do wielkości oczekiwanych, należy poprawić efektywność nadzoru nad zakażeniami, ich wykrywalność oraz ograniczenie transmisji horyzontalnej drobnoustrojów poprzez zatrudnienie pielęgniarek epidemiologicznych i lekarza – przewodniczącego zespołu kontroli zakażeń.
4. Należy wprowadzić bieżący nadzór nad lekoopornością drobnoustrojów zgodny z rzeczywistą sytuacją w badanej populacji oraz wynikami nadzoru epidemiologicznego.

PIŚMIENNICTWO

1. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24:19-45
2. Knothe H, Shah P, Kremery V. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11:315-317
3. DiPersio JR, Deshpande LM, Biedenbach DJ, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Evolution and dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and molecular report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2003). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51:1-7
4. Paterson DL. The role of antimicrobial management programs in optimizing antibiotic prescribing within hospitals. *Clin Infect Dis* 2006; 42(Supp 2):S90-S95
5. Strausbaugh LJ, Siegel JD, Weinstein RA. Preventing transmission of multidrug-resistant bacteria in health care settings: a tale of guidelines. *Clin Infect Dis* 2006; 42:828-835
6. Manzur A, Tubau F, Pujol M, Calatayud L, Dominguez MA, Pena C, Sora M, Gudiol F, Ariza J. Nosocomial outbreak due to extender-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a cardiothoracic intensive care unit. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2365-2369
7. Bagattini M, Crivaro V, DiPopolo A, Gentile F, Scarcella A, Triassi M, Villari P, Zarrilli R. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:979-982
8. Gupta A, Ampofo K, Rubenstein D, Saiman L. Extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. *J Perinatol* 2003; 23:439-443
9. Moustauoui N, Soukri A, Elmdaghri N, Boudouma M, Benbachir M. Molecular biology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* responsible for digestive tract colonization. *J Hosp Infect* 2004; 57:202-208

10. Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K: Molecular epidemiology of extended-spectrum β lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 707-712
11. Sigel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L: Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings 2007. <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf> (26.06.2007)
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 15th information supplement. Wayne PA, CLSI; 2005; M100-S15
13. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*; hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10:867-78
14. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*SHV, *bla*TEM and *bla*CTX-M genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS* 2007; 115:1400-1408
15. Gladstone IM, Ehrenkranz RA, Edberg SC, Baltimore RS.: A ten-year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-year experience. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9: 819-825.
16. Geffers C, Baerwolff, Schwab F, Gastmeier P: Incidence of healthcare-associated infections in high-risk neonates: results from the Germen surveillance system for very-low-birthweight infants. *J Hosp Infect* 2008; 68:214-221
17. Suara RO, Young M, Reeves I: Risk factors for nosocomial infection in a high-risk nursery. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 250-251
18. Graham PL, Begg MD, Larson E, Della-Latta P, et al: Risk factors for late onset Gram-negative sepsis in low birth weight infants hospitalized in the neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J* 25(2):113-117
19. Bush K. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1085-1089
20. Lartigue MF, Zinsius C, Wenger A, Bille J, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M type now in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2855-2860
21. Tofteland S, Haldorsen B, Dahl KH, Simonsen GS, Steinbakk M, Walsh TR, Sundsfjord A. Effects of phenotype and genotype on methods for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. *J Clin Microbiol* 2007; 45:199-205
22. Apisarnthanarak A, Kitarisin P, Mundy LM. Clinical and molecular epidemiology of healthcare-associated infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* that harbor multiple ESBL genes. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29:1026-1034
23. Empel J, Baraniak A, Literacka E, Mrówka A, Fiett J, Sadowy E, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Beta-PL Study Group. Molecular survey of β -lactamases conferring resistance to newer β -lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2449-2454
24. Jacoby GA, Sutton L. Properties of plasmid responsible for production of extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:164-169
25. Willemsen I, Mooij M, Wiel M, Bogaers D, Bijl M, Savelkoul P, Kluytmans J. Highly resistant microorganisms in a teaching hospital: the role of horizontal spread in a setting of endemicity. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29: 1110-1116
26. Franciczek R, Dolna I, Krzyżanowska B, Szufnarowski K, Kowalska-Krochmal B, Zielińska M. Częstość koniugacyjnego transferu genów lekooporności z ESBL-dodatnich pałeczek *Enterobacteriaceae* izolowanych od chorych z oddziałów pediatrycznych. *Med. Dośw Mikrobiol* 2006; 58:41-51

Otrzymano: 6.10.2009 r.

Zaakceptowano do druku: 10.01.2010 r.

Adres do korespondencji:

Dr Agnieszka Chmielarczyk
Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum UJ,
ul. Czysza 18; 31-121 Kraków,
tel. 0126330788 wew. 203,
e-mail: achmiel@cm-uj.krakow.pl