

# Covid a karbapeném-rezistentná *Klebsiella pneumoniae* v nemocničnom prostredí

## Covid and Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* in A Hospital Setting

Jozef Ficik<sup>1,2</sup>, Michal Andrežal<sup>3</sup>, Hana Drahovská<sup>3</sup>, Miroslav Böhmer<sup>4,5</sup>, Tomáš Szemes<sup>3,4,5</sup>,  
Adriána Liptáková<sup>2</sup>, Lívia Slobodníková<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav klinickej mikrobiológie, Ústredná vojenská nemocnica SNP-FN v Ružomberku, Ružomberok, Slovenská republika

<sup>2</sup> Mikrobiologický ústav, Lekárska fakulta Univerzity Komenského a Univerzitná nemocnica Bratislava, Bratislava, Slovenská republika

<sup>3</sup> Katedra molekulárnej biológie prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského, Bratislava, Slovenská republika

<sup>4</sup> Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava, Slovenská republika

<sup>5</sup> Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky, Bratislava, Slovenská republika

<https://doi.org/10.54937/zs.2023.15.2.13-22>

### Abstrakt

Obdobie pandémie COVID-19 prinieslo nové medicínske výzvy, ktoré spolu s nozokomiálnymi bakteriálnymi infekciami znamenali pre zdravotníctvo obrovskú záťaž. Jednou z najalarmujúcejších nozokomiálnych hrozieb bola *Klebsiella pneumoniae* rezistentná voči karbapenémom (CRKP). Je nesmierne dôležité monitorovať výskyt CRKP kmeňov a ich antimikrobiálnu rezistenciu, a to ako na globálnej, tak na lokálnej úrovni. V retrospektívnej štúdií realizovanej v Ústrednej vojenskej nemocnici v Ružomberku bol zisťovaný výskyt CRKP kmeňov v období pred COVID-19 (2017–2019) a počas pandémie COVID-19 (2020–2022). Relatívny výskyt CRKP sa počas obdobia COVID-19 výrazne zvýšil – 4,8-krát, z 0,18 na 0,76 %. Zároveň 47 % CRKP-pozitívnych pacientov malo súčasne aj COVID-19. Identifikovalo sa 26 izolátov produkujúcich KPC enzýmy a 69 izolátov produkujúcich enzýmy NDM. Vybrané CRKP kmene izolované v roku 2022 boli podrobené celogenómovému sekvenovaniu a ich citlivosť bola testovaná na cefiderokol, ceftazidím–avibaktám, imipeném–relebaktám a meropeném–vaborbaktám s vynikajúcimi výsledkami. Izoláty produkujúce KPC boli tiež vysoko citlivé na kolistín (92 %). Izoláty NDM mali nižšiu mieru citlivosti na kolistín (iba 57 %). U KPC izolátov prevládala sekvenčný typ ST-307 a u NDM izolátov ST-11. Napriek vynikajúcej aktivite nových antimikrobiálnych látok je nevyhnutné dôsledné dodržiavanie racionálnej antibiotickej politiky podporené doplnkovou liečbou a prísnyimi protiepidemickými opatreniami.

**Kľúčové slová:** *Klebsiella pneumoniae* rezistentná voči karbapenémom. KPC. NDM. COVID-19. Antimikrobiálna rezistencia. Celogenómové sekvenovanie.

### Abstract

The COVID-19 pandemic era brought about new medical challenges, which, together with nosocomial bacterial infections, resulted in an enormous burden for the healthcare system. One of the most alarming nosocomial threats was carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP). Monitoring CRKP incidence and antimicrobial resistance globally and locally is vitally important. In a retrospective study, the incidence of CRKP in the pre-COVID-19 period (2017–2019) and the COVID-19 pandemic (2020–2022) was investigated in the Central Military Hospital in Ružomberok, Slovak Republic. The relative incidence of CRKP significantly increased during the COVID-19 period—by 4.8 times, from 0.18 to 0.76%. At the same time, 47% of CRKP-positive patients also had COVID-19. Twenty-six KPC and sixty-nine NDM-producing isolates were identified. CRKPs isolated in the year 2022 were submitted to whole genome sequencing, and their susceptibility was tested to cefiderocol, ceftazidime–avibactam, imipenem–relebactam and meropenem–vaborbactam, with excellent results. KPC-producing isolates were also highly susceptible to colistin (92%). The NDM isolates revealed lower susceptibility rates, including only 57% colistin susceptibility. ST-307 prevailed in KPC and ST-11 in NDM isolates. Despite the excellent activity of new antimicrobials, rational antibiotic policy must be thoroughly followed, supported by complementary treatments and strict anti-epidemic precautions.

**Key words:** Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. KPC. NDM. COVID-19. Antimicrobial resistance. Whole genome sequencing.

### Úvod

Výskyt a šírenie kmeňov *Klebsiella pneumoniae* rezistentných voči karbapenémom (CRKP) v nemocniciach po celom svete [1,2], vrátane Slovenskej republiky [3,4], predstavuje naliehavý globálny problém verejného zdravotníctva a predstavuje obrovskú záťaž pre nemocničné zariadenia u vysokorizikových pacientov [5]. Infekcie spôsobené týmito bakteriálnymi agensami predstavujú významný terapeutický problém, predovšetkým u pacientov na jednotkách intenzívnej starostlivosti, kde bakteriálne superinfekcie zvyšujú morbiditu a mortalitu kriticky chorých a oslabených pacientov, s enormným dopadom na náklady spojené so zdravotnou starostlivosťou [6,7]. Predhádžajúce analýzy ukazujú, že baktérie produkujúce karbapenemázy sa efektívne šíria v časoch chaosu – vo

vojne alebo v krajinách, ktoré čelia sociálno-ekonomickým a prisťahovaleckým výzvam [8]. Podobná situácia bola zaznamenaná v ére COVID-19. Začiatok pandémie COVID-19 priniesol nové výzvy v oblasti zdravotnej starostlivosti, pričom sekundárne bakteriálne infekcie u hospitalizovaných pacientov predstavovali ďalšie zdravotné hrozby. U pacientov s COVID-19 sa vyskytla koinfekcia s producentmi karbapenemáz [9]. Štúdie z rôznych regiónov začali hlásiť zvyšujúcu sa rezistenciu na karbapenémy, v ktorej dominovali predovšetkým kmene *Klebsiella pneumoniae*, vyskytujúce sa najmä na jednotkách intenzívnej starostlivosti, kde sa liečili pacienti s ťažkým ochorením COVID-19 [10–13]. Enormný nárast ťažko chorých pacientov počas pandémie COVID-19 viedol k prepĺneniu

nemocníc, najmä jednotiek intenzívnej starostlivosti, čo viedlo k zvýšenému riziku šírenia nozokomiálnych infekcií. Nedostatok lôžok intenzívnej starostlivosti a mechanických ventilátorov tiež viedol k medzinemocničným presunom pacientov s ďalším rizikom šírenia nozokomiálnych agensov, keďže pandémia ovplyvnila programy kontroly a dohľadu, ktoré boli predtým zavedené proti týmto baktériám [14]. Z tohto hľadiska Ústredná vojenská nemocnica v Ružomberku (ÚVN), najväčšie vojenské zdravotnícke zariadenie na území Slovenskej republiky, ktoré poskytuje zdravotnú starostlivosť nielen profesionálnym vojakom, ale aj civilnému obyvateľstvu z celej republiky, patrí do kategórie významných zdravotníckych centier ohrozených príchodom COVID-19. Dali sme si za cieľ retrospektívne analyzovať výskyt *Klebsiella pneumoniae* produkujúcich karbapenemázy v tejto nemocnici počas pandémie COVID-19 a porovnať ju s obdobím pred COVID-19. Následne sme diskutovali o pravdepodobných faktoroch vedúcich k zmenenému výskytu CRKP počas pandémie COVID-19. Hodnotili sme antimikrobiálnu citlivosť CRKP kmeňov z obdobia COVID-19 a na základe výsledkov sme zvažovali antibiotické terapeutické možnosti infekcií spôsobených CRKP v ÚVN počas pandémie COVID-19. Vybrané izoláty CRKP z roku 2022 boli podrobené celogenómovému sekvenovaniu (WGS), čo pomohlo k ich bližšej identifikácii a klonálnej príslušnosti a umožnilo presnejšie vyhodnotenie epidemiologických vzťahov.

## Materiál a metódy

### Zdroje údajov

V tejto retrospektívnej štúdií boli analyzované údaje o izolátoch *Klebsiella pneumoniae* z databázy laboratórneho informačného systému Ústavu klinickej mikrobiológie Ústrednej vojenskej nemocnice v Ružomberku z rokov 2017–2022. Retrospektívne sa analyzoval výskyt kmeňov CRKP v období COVID-19 a pred COVID-19 (roky 2020–2022, resp. 2017–2019) a antimikrobiálna citlivosť kmeňov CRKP počas obdobia COVID-19. Skúmali sa aj údaje o distribúcii kmeňov CRKP medzi pacientmi, nemocničnými jednotkami a typmi biologických vzoriek. Viacnásobné izolácie rovnakého kmeňa od toho istého pacienta boli z analýzy vylúčené. Pri analýze bola aplikovaná ochrana osobných údajov pacientov v súlade s GDPR.

### Izolácia, identifikácia a dlhodobá konzervácia bakteriálnych kmeňov

Klinické vzorky boli odobraté, transportované a spracované v súlade so štandardnými diagnostickými postupmi. Identifikácia kmeňov *Klebsiella pneumoniae* bola uskutočnená pomocou biochemickej súpravy ENTEROtest 16 (Erba Lachema sro, Brno, Česká republika). Nejednoznačné výsledky boli potvrdené použitím MALDI-TOF MS. Všetky CRKP izolované počas roku 2022 boli dlhodobo konzervované zmrazením v kryoprotektívnom médiu (5 % w/v skim milk, Biolife, Miláno, Taliansko) pri -20 °C.

### Testovanie antimikrobiálnej citlivosti a detekcia typu karbapenemázy

Na testovanie citlivosti na 18 antimikrobiálnych látok (ampicilín, ampicilín-sulbaktám, piperacilín) bola použitá kolorimetrická mikrometóda na automatizované testovanie citlivosti MIDITECH (Bell Novaman, Bratislava, Slovenská

republika), spĺňajúca odporúčania CLSI na testovanie antimikrobiálnej citlivosti [47]. – tazobaktám, cefuroxím, cefotaxím, ceftazidím, cefoperazón – sulbaktám, cefepím, ertapeném, meropeném, gentamycín, tobramycín, amikacín, tigecyclín, ciprofloxacín, tetracyklín, kolistín a kotrimoxazol a 2 kombinácie cefalosporínov s inhibítormi beta-laktamázy na detekciu beta-laktamáz s rozšíreným spektrom účinku (cefotaxim-klavulanát, ceftazidim-klavulanát). Na zistenie citlivosti na cefiderokol, imipeném-relebaktám, ceftazidim-avibaktám a meropeném-vaborbaktám sa použil E-test (Liofilchem, S.r.l., Roseto degli Abruzzi, Taliansko). Hodnoty MIC sa interpretovali podľa klinických break-pointov EUCAST-u [48]. Skrining karbapenemáza-pozitívnych kmeňov a detekcia produkcie karbapenemázy (pomocou chromogénneho pH metrického Carba NP testu; Diagnostics, s.r.o., Galanta, Slovenská republika) prebiehala podľa smerníc EUCAST-u [49]. Rýchla fenotypová identifikácia karbapenemázového typu sa uskutočnila pomocou imunochromatografického testu CARBA-5 (NG-Biotech Laboratoires, Guipry-Messac, Francúzsko), ktorý bol navrhnutý na detekciu piatich hlavných typov karbapenemáz (KPC, NDM, VIM, IMP a OXA-48). V súlade s usmerneniami Ministerstva zdravotníctva SR boli kmene *Klebsiella pneumoniae* produkujúce karbapenemázy zaslané na potvrdenie do Národného referenčného centra pre sledovanie antimikrobiálnej rezistencie.

### Analýza genómu izolátov *Klebsiella pneumoniae*

Na analýzu genómu izolátov *K. pneumoniae* sa použili bakteriálne kultúry kultivované cez noc na médiu Luria-Bertani (LB) pri 37 °C. DNA bola izolovaná pomocou súpravy Higher Purity™ Bacterial Genomic DNA Isolation Kit (CanvaxBiotech; Cordoba, Španielsko) a bola kvantifikovaná pomocou súpravy Qubit ds-DNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific; Eugene, OR, USA). Sekvenčné knižnice boli pripravené pomocou protokolu Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina; San Diego, CA, USA) a purifikované na magnetických guľôčkach AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences; Indianapolis, IN, USA). Kvalita knižnice bola skontrolovaná pomocou vysoko citlivého DNA elektroforézneho čipu a 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA). Sekvenovanie sa uskutočňovalo s 2 x 150 bp odčítaním s použitím platformy Illumina NextSeq 500 (Illumina). Získané sekvenčné údaje boli de novo zostavené pomocou SPAdes s použitím štandardného nastavenia parametrov (Centrum pre algoritmicke biotechnológie; St. Petersburg State University, St Petersburg, Rusko) [50] a anotované pomocou online programu BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center, <https://www.bv-brc.org> (prístup 14. júla 2023)). Kritérium 100 % identity a 100 % pokrytia referenčným génom sa použilo ako prah pre prítomnosť génu. Genómy sa ďalej analyzovali pomocou databázy CGE (Center for Genomic Epidemiology; Kongens, Lyngby, Dánsko), servera BV-BRC a databázy BIGSdb (Institut Pasteur MLST). Na určenie príbuznosti kmeňov boli použité štandardné MLST a cgMLST založené na 629 génoch dostupných v databáze *Klebsiella* BIGSdb (<https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/>, prístup 16. júla 2023)). GrapeTree bol použitý na vizualizáciu zhlukov kmeňov na základe analýzy *Klebsiella* cgMLST. Sekvenované genómy boli uložené v NCBI databázy pod prírastkovým číslom bioprojektu PRJNA996751 a do databázy BIGSdb-Pasteur *Klebsiella pneumoniae* pod prístupovým číslom 57223–57235.

### Štatistická analýza

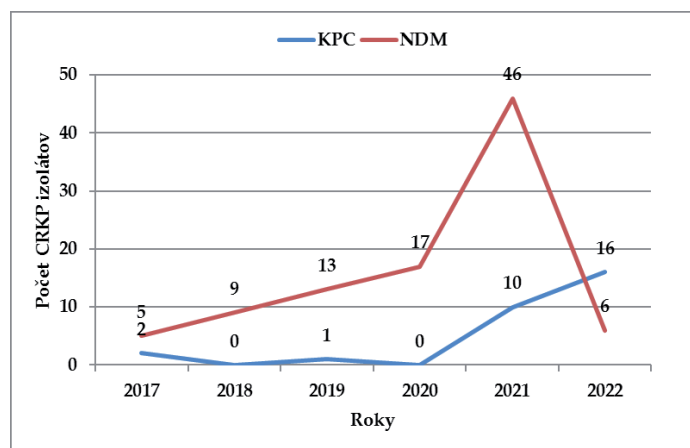
Výsledky boli štatisticky analyzované pomocou chí-kvadrátového testu s použitím softvéru Excel verzie 2019 (Microsoft Corporation, USA). Za štatisticky významné sa považovali p hodnoty <0,05.

### Výsledky

V tejto retrospektívnej štúdii sa incidencia a distribúcia *Klebsiella pneumoniae* rezistentnej voči karbapenémom (CRKP) analyzovala od roku 2017 do roku 2022 a obdobie pred COVID-19 sa porovnávalo s obdobím COVID-19. Zahnuté boli klinické vzorky 28 808 pacientov odoslaných na mikrobiologickú analýzu, kde bola skúmaná antimikrobiálna citlivosť kmeňov CRKP izolovaných počas pandémie COVID-19 a vybrané kmene izolované v roku 2022 boli podrobené celogenómovému sekvenovaniu. Vo všetkých analýzach sme vylúčili viacnásobné izolácie rovnakého kmeňa CRKP od toho istého pacienta.

### Výskyt *Klebsiella pneumoniae* produkujúcej karbapenemázy

V období pred COVID-19 v rokoch 2017–2019 sme mikrobiologickému vyšetreniu podrobili klinické vzorky od 16 250 pacientov. U 30 pacientov (0,18 %) boli izolované CRKP kmene. Celkovo 3 kmene produkovali KPC enzýmy a 27 produkovalo enzýmy typu NDM. Počas obdobia COVID-19 (2020–2022) bolo vyšetrených 12 558 pacientov. Z nich 95 (0,76 %) bolo CRKP pozitívnych a v rovnakom čase malo 45 z nich aj COVID-19 (47 %). Celkovo 26 pacientov malo KPC a 69 malo kmene CRKP produkujúce karbapenemázu typu NDM. Distribúcia pohlaví bola približne rovnaká, a to v základnej aj CRKP-pozitívnej skupine pacientov (55 % vs. 56,7 % žien v rokoch 2017–2019; 52,6 % vs. 49,5 % v rokoch 2020–2022). Počas obdobia COVID-19 bol zistený významný, 4,8-násobný nárast relatívneho výskytu CRKP ( $p < 0,0001$ ). CRKP produkujúce NDM mali vrchol výskytu v roku 2021, po ktorom nasledoval prudký pokles. Podiel CRKP produkujúcich KPC enzýmy sa od roku 2020 mierne zvyšoval (obrázok 1).

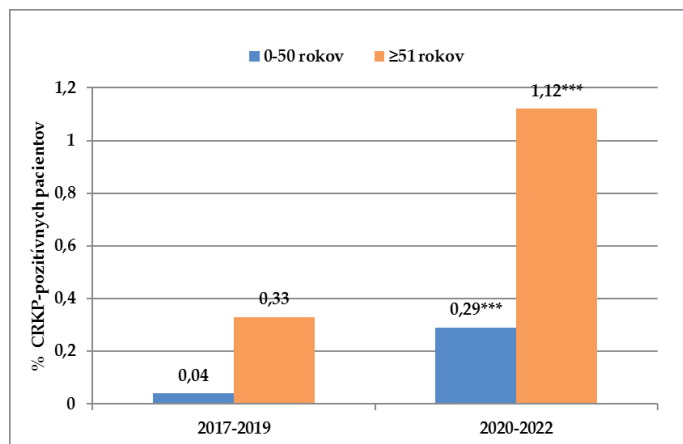


**Obrázok 1** Výskyt *Klebsiella pneumoniae* produkujúcej karbapenemázy počas analyzovaných rokov. CRKP—*Klebsiella pneumoniae* rezistentná voči karbapenémom; KPC—*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM – New Delhi metallo-beta-lactamase

Poznámka: viaceré izoláty CRKP od toho istého pacienta boli vylúčené.

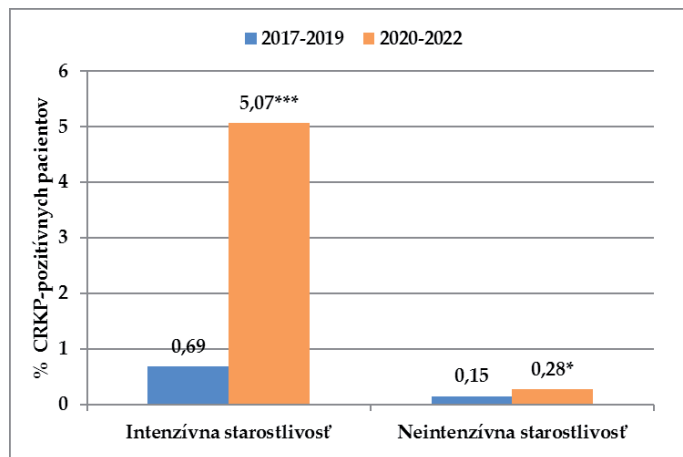
### Distribúcia *Klebsiella pneumoniae* produkujúcich karbapenemázy u rôznych vekových skupín, na jednotkách intenzívnej starostlivosti a v rôznych klinických vzorkách

Vek CRKP-pozitívnych pacientov počas pandémie COVID-19 sa pohyboval od 2 do 91 rokov, s mediánom veku 67 rokov. Pacienti starší ako 50 rokov predstavovali väčšinu CRKP-pozitívnych prípadov v oboch skúmaných obdobiach. V rokoch 2017–2019 predstavovali 90 % všetkých CRKP-pozitívnych prípadov; v rokoch 2020–2022 bol tento podiel 83 % (obrázok 2).

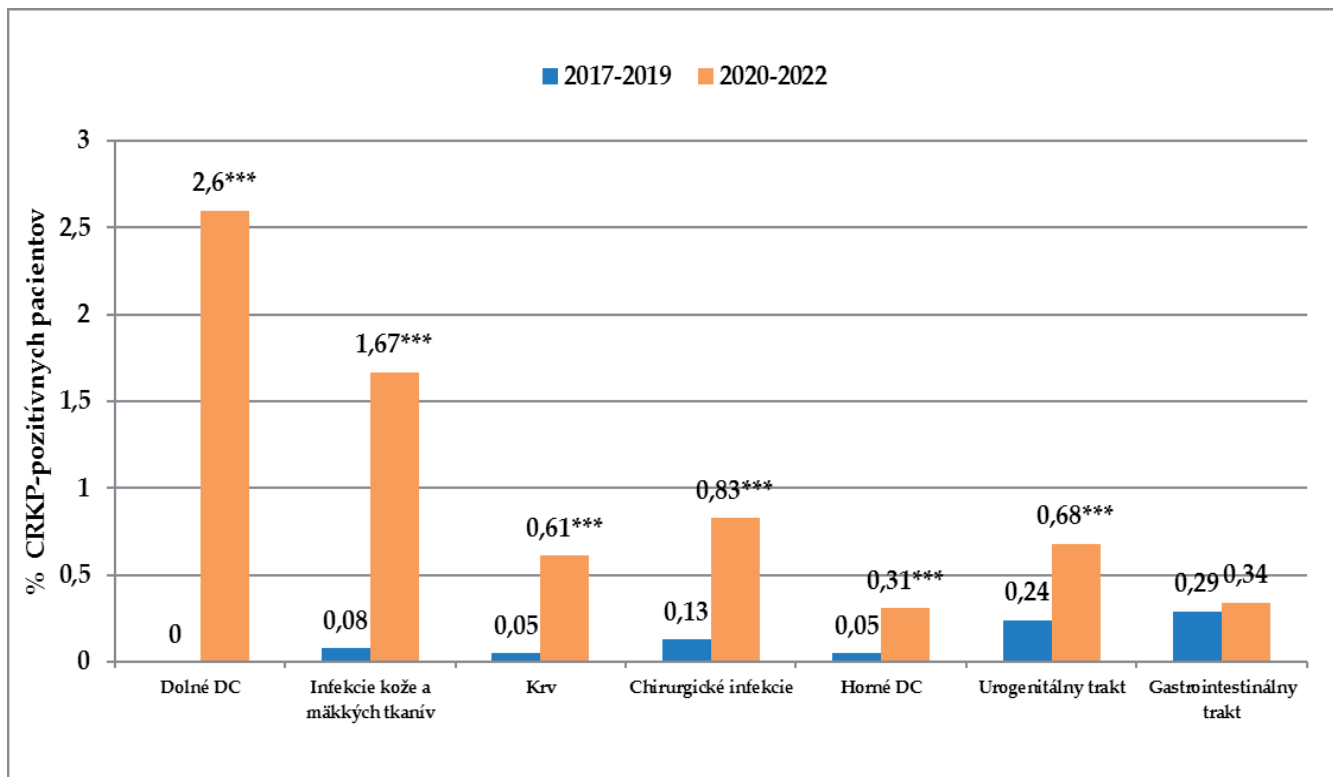


**Obrázok 2** Veková distribúcia CRKP-pozitívnych pacientov s ohľadom na rizikový vek pre závažný COVID. 0–50 rokov:  $p = 0,0003$ ; ≥ 51 rokov:  $p < 0,0001$ .

Počas analyzovaných časových období bol podiel CRKP signifikantne vyšší na jednotkách intenzívnej starostlivosti (obrázok 3). Počas obdobia COVID-19 bola ako pôvodca zápalu pľúc izolovaná *K. pneumoniae* z dolných dýchacích ciest u 167 pacientov na jednotkách intenzívnej starostlivosti. Celkovo 58 z nich malo CRKP kmene (38 pacientov bolo pozitívnych na COVID-19) a 48 z nich trpelo ventilátorovou pneumóniou (VAP) spôsobenou CRKP (34 bolo pozitívnych na COVID-19). U šiestich pacientov s VAP spôsobenou CRKP bola zistená *K. pneumoniae* v hemokultúre; všetci pacienti trpeli na COVID. Celkovo 31 pacientov s VAP zomrelo počas hospitalizácie, čo predstavuje takmer 65 % hospitalizačnú mortalitu; 24 z nich boli pacienti s COVID-19 (úmrtosť 71 %). Z týchto údajov bol najvýraznejší nárast pozitivity na CRKP počas pandémie COVID-19 zistený vo vzorkách z dolných dýchacích ciest (z 0 na 2,6 %). Po nich nasledovali vzorky z infekcií kože a mäkkých tkanív (z 0,08 % na 1,67 %) a hemokultúr (z 0,05 na 0,61 %) (obrázok 4).



**Obrázok 3** Distribúcia *Klebsiella pneumoniae* rezistentnej na karbapenémom na jednotkách intenzívnej starostlivosti a na ostatných oddeleniach. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

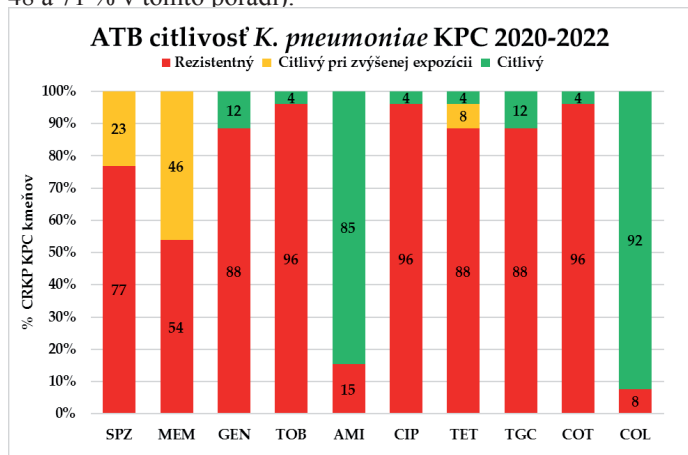


Obrázok 4 Distribúcia *Klebsiella pneumoniae* rezistentnej na karbapenémy v klinických vzorkách z rôznych telesných lokalít. \*\*\* p < 0,0001.

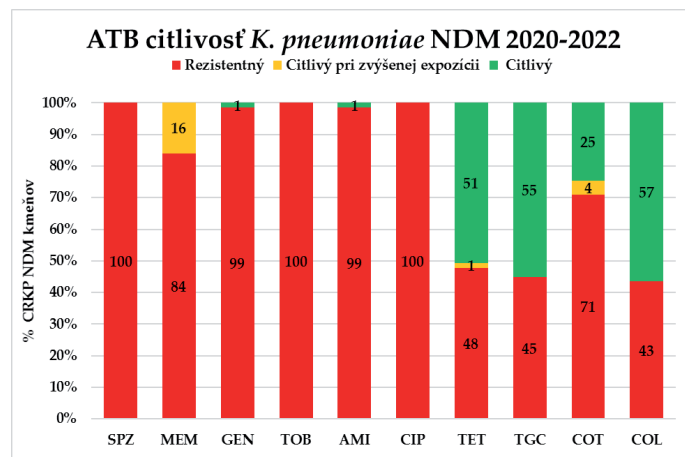
#### Antimikrobiálna citlivosť *Klebsiella pneumoniae* produkujúcej karbapenémázy

Výsledky citlivosti na antibiotiká boli analyzované u CRKP kmeňov z obdobia COVID-19. Z 18 testovaných antibiotík bolo 8 (ampicilín – vnútorná rezistencia; ampicilín – sulbaktám, piperacilín – tazobaktám, cefuroxím, cefotaxím, ceftazidím, cefepím a ertapeném) neúčinných. Antimikrobiálna citlivosť na zvyšok antibiotík sa medzi producentmi KPC a NDM značne líšila (obrázky 5 a 6). Spomedzi KPC-pozitívnych kmeňov sa najnižšia miera rezistencie zistila u kolistínu (8 %) a amikacínu (15 %), po ktorých nasledoval gentamicín a tigecyklín (oba 88 %). Najnižšia rezistencia u producentov NDM bola opäť zistená pre kolistín, ale bola oveľa vyššia ako u KPC kmeňov: 43 %. Po kolistíne nasledoval tigecyklín, tetracyklín a kotrimoxazol (45, 48 a 71 % v tomto poradí).

tetracyklín, TGC tigecyklín, COT kotrimoxazol (trimetoprim-sulfametoxazol), COL colistin. Všetky izoláty boli rezistentné na ampicilín (vnútorná rezistencia); ampicilín-sulbaktám, piperacilín-tazobaktám, cefuroxím, cefotaxím, ceftazidím, cefepím a ertapeném (nie sú znázornené na obrázku 5).



Obrázok 5 Citlivosť *Klebsiella pneumoniae* produkujúcej KPC izolovanej počas pandémie COVID-19. SPZ cefoperazón-sulbaktám, MEM meropeném, GEN gentamicín, TOB tobramycín, AMI amikacín, CIP ciprofloxacín, TET



Obrázok 6 Citlivosť *Klebsiella pneumoniae* produkujúcej NDM izolovanej počas pandémie COVID-19. SPZ cefoperazón-sulbaktám, MEM meropeném, GEN gentamicín, TOB tobramycín, AMI amikacín, CIP ciprofloxacín, TET tetracyklín, TGC tigecyklín, COT kotrimoxazol (trimetoprim-sulfametoxazol), COL colistin. Všetky izoláty boli rezistentné na ampicilín (vnútorná rezistencia); ampicilín-sulbaktám, piperacilín-tazobaktám, cefuroxím, cefotaxím, ceftazidím, cefepím a ertapeném (nie sú znázornené na obrázku 6).

### In vitro aktivita nových beta-laktámov

V skupine 12 kmeňov CRKP izolovaných v roku 2022 bola testovaná aktivita jedného nového cefalosporínu a troch nových kombinácií beta-laktámov s inhibítormi beta-laktamáz. Izoláty produkujúce KPC boli testované na cefiderokol (break-point 2 mg/l) ceftazidim-avibaktám (break-point 8 mg/l), imipeném-relebaktám (break-point 2 mg/l) a meropeném-vaborbaktám (break-point 8 mg/l). Všetky štyri terapeutiká boli navrhnuté na liečbu infekcií spôsobených multirezistentnými gramnegatívnymi

baktériami, vrátane CRKP. Izoláty produkujúce NDM boli testované iba na cefiderokol, pretože inhibítory beta-laktamáz kombinované s ďalšími tromi beta-laktamovými liekmi sú neaktívne proti metallo-beta-laktamázam triedy B. Vo všetkých analyzovaných izolátoch bola zistená vynikajúca *in vitro* aktivita. Aj keď hodnoty MIC cefiderokolu boli mierne vyššie v kmeňoch produkujúcich NDM, boli značne vzdialené od hraničných hodnôt (tabuľky 1 a 2).

**Tabuľka 1** Ceftazidim-avibaktám, imipeném-relebaktám a meropeném-vaborbaktám in vitro aktivita proti KPC-produkujúcim karbapeném-rezistentným kmeňom *Klebsiella pneumoniae*.

Ceftazidim-avibaktám MIC [mg/L]	KPC (n)	Imipeném-relebaktám MIC [mg/L]	KPC (n)	Meropeném-vaborbaktám MIC [mg/L]	KPC (n)
0.032	1	0.094	1	0.023	3
0.094	1	0.125	2	0.032	3
0.190	2	0.190	1	0.047	1
0.380	1	0.250	1		
0.750	2	0.380	1		
		0.5	1		

MIC – minimálna inhibičná koncentrácia; KPC - *Klebsiella pneumoniae* - carbapenemase

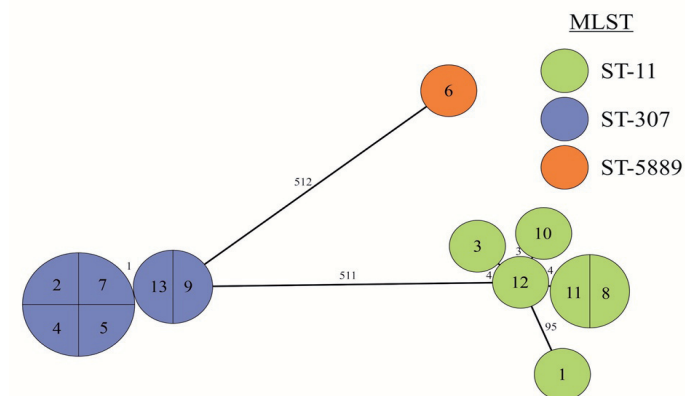
**Tabuľka 2** In vitro aktivita cefiderokolu proti *Klebsiella pneumoniae* rezistentnej na karbapenémy.

Cefiderokol MIC [mg/L]	KPC (n)	NDM (n)
0.016	1	-
0.032	4	-
0.064	1	1
0.094	1	1
0.19	-	2
0.25	-	1

MIC - minimálna inhibičná koncentrácia; KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM – New Delhi metallo-beta-lactamase

### Sekvenovanie genómu vybraných kmeňov *Klebsiella pneumoniae* rezistentných na karbapenémy

Dvanásť izolátov CRKP z roku 2022 bolo analyzovaných prostredníctvom WGS (Whole Genome Sequencing). Dĺžka genómov sa pohybovala od 5,38 do 6,04 Mbp, a keď sa analyzovali pomocou MLST (Multi-Locus Sequence Typing), izoláty patrili k trom typom sekvencií (ST) (obrázok 7, tabuľka 3). Päť kmeňov patrilo do ST-11 sublinie SL-258, ďalších šesť bolo ST-307 a SL-307 a posledný kmeň bol vzácného typu ST-5889. Vzájomná príbuznosť kmeňov priradených k rovnakému ST bola ďalej hodnotená pomocou cgMLST (core genome MLST). Kmene boli zoskupené podľa typov sekvencií (obrázok 7). Štyri z piatich kmeňov ST-11 boli navzájom blízko príbuzné, pretože sa líšili menej ako štyrmi alelami; posledný kmeň bol odlišný, pretože mal 95 odlišných alel a patril do inej klonálnej skupiny. Kmene ST-307 boli veľmi homogénne a nemali medzi sebou takmer žiadne rozdiely.



**Obrázok 7** GrapeTree 12 izolátov *Klebsiella pneumoniae* rezistentných na karbapenémy na základe cgMLST. Veľkosti prstencov zodpovedajú počtu kmeňov s rovnakým genotypom; označenie kmeňov je vyznačené vo vnútri krúžku a ST sú označené farbou. Čísla na čiarach medzi krúžkami zodpovedajú číslam rôznych alel.

**Tabuľka 3** Charakterizácia 12 izolátov *Klebsiella pneumoniae* rezistentných na karbapenémy so sekvenovanými genómami.

Sublinia	ST	Klonálna skupina	Sérotyp (wzi) <sup>1</sup>	Karbapenemázový gén	Počet kmeňov
SL-258	11	CG340	K15:O4 (50)	NDM-1	4
		CG3666	? (24)	NDM-1	1
SL-307	307	CG307	K2:O1/2 (173)	KPC-2	6
CG11340	5889	CG11340	K14/15:O3 (new)	KPC-2	1

<sup>1</sup> Sérotyp určený podľa K-PAM (číslo alely génu wzi)

Vzor fenotypu antimikrobiálnej rezistencie a zodpovedajúce typy sekvencií analyzovanej *Klebsiella pneumoniae* produkujúcej karbapenemázu sú znázornené na obrázku 8.

	SPZ	MEM	GEN	TOB	AMI	CIP	TET	TGC	COT	COL	FDC	CAZ/AVI	IMP/REL	MEM/VAB	MLST	
KPC kmene	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	5889
	Red	Yellow	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	307
	Red	Yellow	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	307
	Red	Yellow	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	307
	Red	Yellow	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	307
	Red	Yellow	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	307
	Red	Yellow	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	307
NDM kmene	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Grey	Grey	Grey	Grey	11
	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Grey	Grey	Grey	Grey	11
	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Grey	Grey	Grey	Grey	11
	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Grey	Grey	Grey	Grey	11
	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Grey	Grey	Grey	Grey	11
	Citlivý		Citlivý pri zvýšenej expozícii				Rezistentný				Netestované					

**Obrázok 8** Antibiogram a distribúcia sekvenčných typov u kmeňov *Klebsiella pneumoniae* rezistentných na karbapenémy z roku 2022. SPZ cefoperazón–sulbaktám, MEM meropeném, GEN gentamicín, TOB tobramycín, AMI amikacín, CIP ciprofloxacín, TET tetracyklín, TGC tigecyklin, COT kotrimoxazol (trimetoprim–sulfametoxazol), COL kolistín, FDC cefiderokol, CAZ/AVI ceftazidím–avibaktám, IMP/REL imipeném–relebaktám, MEM/VAB meropeném–vaborbaktám, KPC *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, NDM—New Delhi metallo-beta-lactamase. Všetky izoláty boli rezistentné na ampicilín (vnútorná rezistencia); ampicilín–sulbaktám, piperacilín–tazobaktám, cefuroxím, cefotaxím, ceftazidím, cefepim a ertapeném (nie sú znázornené na obrázku 8).

## Diskusia

Bližšie štúdium nozokomiálnych kmeňov ako aj analýza ich výskytu a antimikrobiálnej citlivosti je enormne dôležitá z hľadiska liečby a prevencie nozokomiálnych nákaz. Z nich majú obrovský význam infekcie spôsobené CRKP. Počas pandémie COVID-19 boli z rôznych krajín sveta hlásené zvýšené počty nozokomiálnych bakteriálnych superinfekcií spôsobených CRKP [10–13,15]. Ústredná vojenská nemocnica (ÚVN) nebola výnimkou: relatívna incidencia *Klebsiella pneumoniae* rezistentnej na karbapenémy sa zvýšila 4,8-krát. Naše výsledky sú však v rozpore s niektorými čínskymi a talianskymi štúdiami, ktoré nezistili žiadny štatisticky významný rozdiel v pomere incidencie, kolonizácii a miere infekcie Enterobacterales rezistentných na karbapenémy počas pandémie [16,17]. Takmer polovica CRKP-pozitívnych pacientov v ÚVN mala v rovnakom čase infekciu COVID-19.

Ludia nad 50 rokov patria do rizikovej skupiny pre závažný priebeh COVID-19 [18] a pacienti s COVID-19 sú obzvlášť ohrození sekundárnou infekciou CRKP pre ich extrémnu krehkosť a potrebu dlhodobého pobytu na jednotkách intenzívnej starostlivosti (JIS) [19]. Preto sme sa pokúsili pozrieť na vekové rozloženie CRKP-pozitívnych pacientov. Počas obdobia COVID-19 (2020–2022) táto veková skupina predstavovala 79 % všetkých pacientov s pozitívnym nálezom CRKP. Aj keď boli CRKP kmene izolované od pacientov nad 50 rokov s výrazne vyššou frekvenciou v období COVID-19, podobné výsledky sa dosiahli v období pred COVID-19. V tomto ohľade môžu mať starší pacienti niekoľko ďalších individuálnych rizikových faktorov, ktoré prispievajú k infekcii spôsobenej CRKP [20], rovnako ako niektorí mladí pacienti s ťažkým ochorením COVID-19 [19]. V našej štúdii neboli žiadne významné rozdiely vo výskyte CRKP medzi mužskými a ženskými pacientmi, na rozdiel od Yang et al., ktorí zistili vyššie podiely CRKP a rezistenciu u mužských pacientov [16]. Podobné výsledky prezentovali Mędrzycka-Dąbrowska et al. vo svojom rozsiahlom prehľade infekcií CRKP u pacientov s COVID-19

[21], ktorí uviedli, že väčšina pacientov s CRKP boli muži s priemerným vekom 61 rokov.

Výskyt izolátov CRKP bol signifikantne vyšší na JIS v súlade so výsledkami mnohých iných štúdií [pre prehľad pozri 21]. Tento jav bol ešte výraznejší počas obdobia COVID-19, keď sa zmenili podmienky v ÚVN. Vyššie boli počty ťažko chorých pacientov, a to najmä so zápalom pľúc, často s potrebou umelej pľúcnej ventilácie (UPV), čo zvyšovalo riziko sekundárneho bakteriálneho zápalu pľúc. V ÚVN bola zaznamenaná takmer 71 % úmrtnosť medzi pacientmi s COVID-19 na UPV so sekundárnou bakteriálnou pneumóniou spôsobenou CRKP kmeňmi. Podobné miery úmrtnosti boli hlásené v retrospektívnej case-control štúdii v jednom centre zo Španielska, kde Enterobacterales produkujúce karbapenemázy boli príčinou smrti približne dvoch tretín kriticky chorých pacientov s COVID-19 [22]. Štúdia Dumitru et al. uvádza deväť pacientov na JIS s ťažkou invazívnou koinfekciou CRKP s COVID-19. Všetci pacienti okrem jedného boli starší ako 50 rokov so značnými komorbiditami. Päť pacientov zomrelo, čo predstavuje viac ako 50 % mortalitu [23].

Paralelne s nárastom pacientov na UPV v ÚVN sa zvýšila aj pozitívita CRKP kmeňov vo vzorkách spúta; podobne čínska štúdia identifikovala spútum ako primárny zdroj CRKP počas pandémie COVID-19 [16]. Hlavným rezervoárom infekcií *K. pneumoniae* je gastrointestinálne nosičstvo [24]; výskyt CRKP v gastrointestinálnych vzorkách pacientov v ÚVN počas obdobia COVID-19 sa však zvýšil len mierne. Umelá pľúcna ventilácia predstavuje zvýšené riziko sekundárnej nozokomiálnej pľúcnej infekcie, ktorú môže ešte zhoršiť primárna vírusová pľúcna infekcia. Aj keď nález CRKP v horných dýchacích cestách svedčí skôr o kolonizácii, môže sa stať zdrojom pľúcnej infekcie počas intubácie [25]. Napriek tomu naša štúdia odhalila len mierny nárast výskytu CRKP kmeňov vo vzorkách z horných dýchacích ciest. Analýzou možných príčin prudkého nárastu

incidencie CRKP v ÚVN počas roku 2021 sa odhalilo viacero faktorov, ktoré postihli predovšetkým pacientov Kliniky anestéziológie a intenzívnej medicíny (KAIM). V roku 2021 sa počet pacientov na umelej pľúcnej ventilácii zvýšil štvornásobne v porovnaní s obdobím pred COVID-19. Malo to za následok obrovskú záťaž pre personál a nehovoriac o nedostatku sestier a lekárov. Dôležitú úlohu by mohol zohrať aj pocit falošnej čistoty. Personál bol oblečený v kombinézach s dvoma ochrannými rukavicami. Multirezistentné kmene klebsiel však dokážu prežiť aj dezinfekciu a zostať na kombinézach, čo umožňuje šírenie z pacienta na pacienta, pričom v ÚVN na KAIM boli hospitalizovaní pacienti z celého Slovenska. Okrem toho sa KAIM z technických a organizačných dôvodov niekoľkokrát sťahovala do rôznych nemocničných priestorov. Je známe, že takéto bezprecedentné podmienky môžu prispieť k šíreniu antimikrobiálnej rezistencie vrátane rezistencie na karbapenémy [17], ako to potvrdila analýza výskytu Enterobacterales rezistentných na karbapenémy (CRE) v talianskej štúdií Tiri et al. [15]. Zistili nárast akvizícií CRE zo 6,7 % v roku 2019 na 50 % v marci až apríli 2020 (najkritickejšie obdobie COVID-19 v Taliansku). V ďalšom roku sa počet pacientov na KAIM v ÚVN znížil na polovicu v porovnaní s rokom 2021. Pracovníci KAIM sa navyše poučili z predchádzajúcej krízy. Zaviedli sa prísnejšie protiepidemické opatrenia, vrátane nosenia jednorazového plášt'a na vrchnej časti kombinézy počas starostlivosti o pacientov kolonizovaných multirezistentnými kmeňmi, zvýšenej hygieny rúk a dodatočných rukavíc, izolácie alebo kohortizácie CRKP-pozitívnych pacientov, reedukácia personálu, monitorovanie povrchov prostredia sústreďujúc sa na CRKP kmene, okamžité hlásenie nových pozitívnych prípadov a celkovo zvýšený hygienický režim v nemocnici. To viedlo k poklesu incidencie CRKP produkujúcich NDM na úroveň predpandemického obdobia; objavil sa však mierny vzostup CRKP kmeňov produkujúcich KPC.

Vybrané CRKP kmene z roku 2022 boli podrobené celogenómovému sekvenovaniu. Na základe výsledkov sekvenovania predstavovala *K. pneumoniae* rezistentná na karbapenémy izolovaná v ÚVN fylogeneticky málo rôznorodú skupinu, čo naznačuje epidemické nozokomiálne rozšírenie. Väčšina izolátov bola typu ST-11 (producenti NDM-1) a ST-307 (producenti KPC-2). Iba jeden izolát KPC-2 bol iného typu ST: ST-5889. V Európe sú CRKP ST 11, 15, 101 a 258/512 široko distribuované [1]. Okrem toho je ST-11 dominantným klonom CRKP v Číne s alarmujúcim rozšírením [26], úspešným medzinárodným prenosom [27] a schopnosťou premeny na hypervirulentné (hv) infekčné agensy produkujúce karbapenemázy, ako dokazujú nedávno objavené kmene ST-11 CR-HvKP [28]. Na druhej strane, CRKP ST-11 môžu tiež stratiť antimikrobiálnu rezistenciu a virulenciu [29], čo znamená, že ich genóm musí byť veľmi plastický a vyžaduje trvalé monitorovanie; táto vlastnosť je však typická pre mnohé ďalšie typy sekvencií *Klebsiella pneumoniae*. *Klebsiella pneumoniae* ST-307 sa objavila v roku 2008 a odvtedy sa rozšírila do rôznych častí sveta, kde spôsobovala nemocničné epidémie [30]. O unikátnom CRKP ST-5889 chýbajú literárne údaje. Len jeden ďalší izolát (z Číny) je uložený v databáze *Klebsiella* BIGSdb. Náš izolát CRKP ST-5889 sa podstatne líšil od ostatných CRKP z ÚVN nižším počtom beta-laktamáz a vyššou citlivosťou na ne-beta-laktámové antibiotiká. K dispozícii je len jedna štúdia týkajúca sa distribúcie typu sekvencie CRKP v iných nemocniciach v SR. Trochu širšie spektrum typov sekvencií CRKP bolo prítomné

v troch zdravotníckych zariadeniach Univerzitetnej nemocnice v Bratislave, ako uvádza Koreň et al. [4]. Podobne ako pri našich výsledkoch, väčšina CRKP boli producentmi ST-11 NDM-1. Po nich nasledovali KPC-2 producenti ST-258 – dominantný ST u CRKP kmeňov v Európe a Amerike [1] – a zriedkavý ST-584. Len jeden izolát bol hlásený z ST-15 a ST-340 a žiadny z našich najhojnejšie sa vyskytujúcich KPC-2 produkujúcich ST-307 v našej nemocnici.

Liečba pacientov infikovaných CRKP kmeňmi predstavuje veľkú medicínsku výzvu. V závislosti od typu produkovanej karbapenemázy sú tieto kmene rezistentné na rôzne beta-laktámové antibiotiká a ich citlivosť na ne-beta-laktámové liečivá nie je možné predvídať v dôsledku získania rôznych dodatočných mechanizmov rezistencie [31,32], ako ukazujú aj naše výsledky. Preto sú terapeutické možnosti obmedzené a odpoveď na liečbu je často neistá [33]. KPC kmene a metalo-beta-laktamázy, ako NDM, predstavujú základný molekulárny mechanizmus rezistencie CRKP kmeňov voči karbapenémom [34]. CRKP v našej štúdií produkovali iba tieto dve triedy karbapenemáz. Medzi producentmi KPC a NDM boli identifikované rôzne modely antimikrobiálnej rezistencie. Najvýraznejší rozdiel bol v citlivosti na amikacín, pričom väčšinou boli citliví producenti KPC a rezistencia u takmer všetkých producentov NDM. Podstatné rozdiely sa zistili aj v citlivosti na kolistín – „starý“ liek, ktorý v súčasnosti zažíva renesanciu v klinickom používaní, pri rozsiahlom šírení gramnegatívnych paličiek odolných voči viacerým antibiotikám v nemocničnom prostredí. Aj keď bol kolistín relatívne toxický, v mnohých prípadoch sa považoval za liek poslednej voľby. Kvôli šíreniu antimikrobiálnej rezistencie a objaveniu sa CRKP kmeňov sa v súčasnosti často používa ako liečba prvej voľby pri infekciách spôsobených týmito baktériami [35]. S čoraz častejším používaním kolistínu v terapii sa začali objavovať kmene rezistentné na kolistín s modifikovanými molekulami LPS (lipopolysacharidu) [36]. V našej štúdií mali CRKP kmene produkujúce KPC len nízku mieru rezistencie na kolistín; neočakávali sme však takú vysokú kolistínovú rezistenciu u producentov NDM (nad 40 %). Rastúce počty izolátov CRKP rezistentných na kolistín boli hlásené aj zo zariadení fakultných nemocníc v SR, aj keď nie až také alarmujúce – z 0 % publikovaných v roku 2019 na 2,5 % v roku 2022 [3,4]. Pri analýze tejto extrémne vysokej miery rezistencie na kolistín v ÚVN medzi kmeňmi NDM je najpravdepodobnejším dôvodom epidemické rozšírenie rovnakého kmeňa *Klebsiella pneumoniae* NDM rezistentného na kolistín počas obdobia COVID-19 (ako je uvedené vyššie). Na základe *in vitro* štúdií [37] a klinických štúdií [38] by kolistín v kombinácii s meropenémom alebo amikacínom mohol predstavovať reálnu terapeutickú možnosť proti CRKP izolátom rezistentným na kolistín. Bohužiaľ táto možnosť nemohla byť použitá u väčšiny pacientov v ÚVN s CRKP produkujúcimi NDM kvôli ich vysokej miere rezistencie voči týmto antimikrobiálnym liekom. Tigecyklín je ďalším liekom s aktivitou proti CRKP a pozitívnym vplyvom na prežívanie pacientov s ťažkými infekciami spôsobenými CRKP kmeňmi pri aplikácii vo vysokých dávkach v kombinovanej liečbe [39]. Počas liečby infekcií CRKP však bola popísaná rastúca rezistencia [40]. V našej štúdií možno na základe výsledkov testu citlivosti očakávať úspešný efekt kombinovanej terapie s tigecyklínom u viac ako polovice infekcií spôsobených CRKP kmeňmi produkujúcimi NDM, ale iba v menej ako 20 % prípadov spôsobených KPC- producentmi. Nezvyčajná kombinácia ertapenému s iným karbapenémom v terapii infekcií

spôsobených CRKP kmeňmi je založená na dôkaze, že ertapeném sa môže viazať na karbapeném s veľmi vysokou afinitou, ktorá zabraňuje hydrolyze ďalšej molekuly karbapenému a zachováva jej baktericidnú aktivitu [41].

Správna identifikácia typu karbapenemázy je kľúčová pre výber najvhodnejšieho antimikrobiálneho lieku spomedzi tých, ktoré boli nedávno zavedené do terapeuticko-praxe [34]. Vo všeobecnosti sú CRKP kmene, ktoré produkujú metalo-beta-laktamázu (vrátane NDM), rezistentné voči všetkým beta-laktámom (a ich kombináciám s inhibítormi beta-laktamáz), okrem cefiderokolu – prvého sideroforového cefalosporínu – a monobaktámu aztreonamu [42]. Pri CRKP kmeňoch produkujúcich metalo-beta-laktamázu môže byť aztreonam často inaktivovaný inými beta-laktamázami. Kombinácia ceftazidím-avibaktámu a aztreonamu môže mať synergický účinok, pretože avibaktám môže inaktivovať iné beta-laktamázy na zachovanie aktivity aztreonamu [43,44]. Testovanie týchto dvoch antimikrobiálnych látok však nebolo zahrnuté do rutinnej schémy testovania citlivosti našich CRKP kmeňov.

Na liečbu infekcií spôsobených producentmi KPC sa odporúčajú kombinácie betalaktamov s novými inhibítormi betalaktamáz, ako sú ceftazidím-avibaktám, meropeném-vaborbaktám alebo imipeném-relebaktám alebo nový cefalosporín, cefiderokol [45]. Tieto nové lieky sa v SR zatiaľ používajú len ojedinele. Ich zriedkavé použitie je v súlade s vynikajúcou citlivosťou zistenou u CRKP kmeňov izolovaných v roku 2022 v ÚVN. Žiaľ, vo svete už existujú správy o vzniku rezistencie aj voči týmto novým efektívnym liekom [45,46]. Klinické zlyhanie liečby ceftazidím-avibaktámom opísali Dumitru et al. [25] u pacientov, ktorých diagnóza bola stanovená neskoro. Riešením môže byť včasná a správna identifikácia typu karbapenemázy produkovanej CRKP, včasná terapia účinnými liekmi, prísne dodržiavanie racionálnej antimikrobiálnej liečby a uvážlivé predpisovanie týchto cenných antimikrobiálnych látok. Tieto opatrenia môžu spomaliť vznik a šírenie rezistentných kmeňov a zachovať aktivitu vyššie uvedených liečiv do budúcnosti [45,46].

## Záver

Počet CRKP izolátov sa v ÚVN počas pandémie COVID-19 signifikantne zvýšil 4,8-krát. Produkcia karbapenemáz typu KPC a NDM predstavovala základné molekulárne mechanizmy zodpovedné za rezistenciu na karbapenémy. Izoláty z roku 2022 mali relatívne nízku fylogenetickú diverzitu, čo môže naznačovať epidemické šírenie; všetky boli citlivé na nové antimikrobiálne látky určené na liečbu infekcií spôsobených CRKP kmeňmi. Napriek vynikajúcej aktivite nových antimikrobiálnych látok sa však musí dôsledne dodržiavať racionálna antibiotická politika podporená doplnkovou liečbou a prísnyimi protiepidemickými opatreniami, zvlášť v nemocničných zariadeniach.

## Literatúra

- David, S.; Reuter, S.; Harris, S.R.; Glasner, C.; Feltwell, T.; Argimon, S.; Abudahab, K.; Goater, R.; Giani, T.; Errico, G.; et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat. Microbiol.* 2019, 4, 1919–1929. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0492-8>
- Wang, N.; Zhan, M.; Liu, J.; Wang, Y.; Hou, Y.; Li, C.; Li, J.; Han, X.; Liu, J.; Chen, Y.; et al. Prevalence

of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection in a Northern Province in China: Clinical Characteristics, Drug Resistance, and Geographic Distribution. *Infect. Drug Resist.* 2022, 15, 569–579. <https://doi.org/10.2147/IDR.S347343>

- Koreň, J.; Andrežal, M.; Drahovská, H.; Hubenáková, Z.; Liptáková, A.; Maliar, T. Next-Generation Sequencing of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Patients Hospitalized in the University Hospital Facilities. *Antibiotics* 2022, 11, 1538. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111538>
- Koren, J.; Hubenakova, Z.; Drahovska, H.; Ozaee, E.; Markuskova, B.; Lichvarikova, A. Emergence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and/or carbapenemase producing Enterobacteriaceae (CPE) and their antimicrobial resistance. *Bratisl. Lek. Listy* 2019, 120, 935–940. [https://doi.org/10.4149/BLL\\_2019\\_157](https://doi.org/10.4149/BLL_2019_157)
- Avendano, E.E.; Raman, G.; Chan, J.; McCann, E. Burden of carbapenem non-susceptible infections in high-risk patients: Systematic literature review and meta-analysis. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 2020, 9, 193. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00858-8>
- Wang, F.; Zou, X.; Zhou, B.; Yin, T.; Wang, P. Clinical characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection/colonisation in the intensive care unit: A 9-year retrospective study. *BMJ Open* 2023, 13, e065786. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2022-065786>
- Zhen, X.; Stålsby Lundborg, C.; Sun, X.; Gu, S.; Dong, H. Clinical and Economic Burden of Carbapenem-Resistant Infection or Colonization Caused by *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*: A Multicenter Study in China. *Antibiotics* 2020, 9, 514. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080514>
- Dandachi, I.; Azar, E.; Hamouch, R.; Maliha, P.; Abdallah, S.; Kanaan, E.; Badawi, R.; Khairallah, T.; Matar, G.M.; Daoud, Z. *Acinetobacter* spp. in a Third World Country with Socio-economic and Immigrants Challenges. *J. Infect. Dev. Ctries* 2019, 13, 948–955. <https://doi.org/10.3855/jidc.11341>
- Arcari, G.; Raponi, G.; Sacco, F.; Bibbolino, G.; Di Lella, F.M.; Alessandri, F.; Coletti, M.; Trancassini, M.; Deales, A.; Pugliese, F.; et al. *Klebsiella pneumoniae* infections in COVID-19 patients: A 2-month retrospective analysis in an Italian hospital. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2021, 57, 106245. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106245>
- Chatterjee, N.; Nirwan, P.K.; Srivastava, S.; Rati, R.; Sharma, L.; Sharma, P.; Dwivedi, P.; Jaggi, N. Trends in carbapenem resistance in Pre-COVID and COVID times in a tertiary care hospital in North India. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2023, 22, 1. <https://doi.org/10.1186/s12941-022-00549-9>
- Despotovic, A.; Milosevic, B.; Cirkovic, A.; Vujovic, A.; Cucanic, K.; Cucanic, T.; Stevanovic, G. The Impact of COVID-19 on the Profile of Hospital-Acquired Infections in Adult Intensive Care Units. *Antibiotics* 2021, 10, 1146. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101146>



12. Karataş, M.; Yaşar-Duman, M.; Tünger, A.; Çilli, F.; Aydemir, Ş.; Özenci, V. Secondary bacterial infections and antimicrobial resistance in COVID-19: Comparative evaluation of pre-pandemic and pandemic-era, a retrospective single center study. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2021, 20, 51. <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00454-7>
13. Karruli, A.; Boccia, F.; Gagliardi, M.; Patauner, F.; Ursi, M.P.; Sommese, P.; De Rosa, R.; Murino, P.; Ruocco, G.; Corcione, A.; et al. Multidrug-Resistant Infections and Outcome of Critically Ill Patients with Coronavirus Disease 2019: A Single Center Experience. *Microb. Drug Resist.* 2021, 27, 1167–1175. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0489>
14. Belvisi, V.; Del Borgo, C.; Vita, S.; Redaelli, P.; Dolce, P.; Pacella, D.; Kertusha, B.; Carraro, A.; Marocco, R.; De Masi, M.; et al. Impact of SARS CoV-2 pandemic on carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. prevention and control programme: Convergent or divergent action? *J. Hosp. Infect.* 2021, 109, 29–31. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.11.030>
15. Tiri, B.; Sensi, E.; Marsiliani, V.; Cantarini, M.; Priante, G.; Vernelli, C.; Martella, L.A.; Costantini, M.; Mariottini, A.; Andreani, P.; et al. Antimicrobial Stewardship Program, COVID-19, and Infection Control: Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Colonization in ICU COVID-19 Patients. What Did Not Work? *J. Clin. Med.* 2020, 9, 2744. <https://doi.org/10.3390/jcm9092744>
16. Yang, X.; Liu, X.; Li, W.; Shi, L.; Zeng, Y.; Xia, H.; Huang, Q.; Li, J.; Li, X.; Hu, B.; et al. Epidemiological Characteristics and Antimicrobial Resistance Changes of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* under the COVID-19 Outbreak: An Interrupted Time Series Analysis in a Large Teaching Hospital. *Antibiotics* 2023, 12, 431. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030431>
17. Pascale, R.; Bussini, L.; Gaibani, P.; Bovo, F.; Fornaro, G.; Lombardo, D.; Ambretti, S.; Pensalfine, G.; Appolloni, L.; Bartoletti, M.; et al. Carbapenem-resistant bacteria in an intensive care unit during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: A multicenter before-and-after cross-sectional study. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2022, 43, 461–466. <https://doi.org/10.1017/ice.2021.144>
18. Berek, M.A.; Aziz, M.A.; Islam, M.S., Impact of age, sex, comorbidities and clinical symptoms on the severity of COVID-19 cases: A meta-analysis with 55 studies and 10,014 cases. *Heliyon* 2020, 6, e05684. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05684>
19. Montrucchio, G.; Corcione, S.; Sales, G.; Curtoni, A.; De Rosa, F.; Brazzi, L. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in ICU-admitted COVID-19 patients: Keep an eye on the ball. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2020, 23, 398–400. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.11.004>
20. Liu, P.; Li, X.; Luo, M.; Xu, X.; Su, K.; Chen, S.; Qing, Y.; Li, Y.; Qiu, J. Risk Factors for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection: A Meta-Analysis. *Microb. Drug Resist.* 2018, 24, 190–198. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0061>
21. Mędrzycka-Dąbrowska, W.; Lange, S.; Zorena, K.; Dąbrowski, S.; Ozga, D.; Tomaszek, L. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections in ICU COVID-19 Patients-A Scoping Review. *J. Clin. Med.* 2021, 10, 2067. <https://doi.org/10.3390/jcm10102067>
22. Pintado, V.; Ruiz-Garbajosa, P.; Escudero-Sanchez, R.; Gioia, F.; Herrera, S.; Vizcarra, P.; Fortún, J.; Cobo, J.; Martín-Dávila, P.; Morosini, M.I.; et al. Carbapenemase-producing Enterobacterales infections in COVID-19 patients. *Infect. Dis.* 2022, 54, 36–45. <https://doi.org/10.1080/23744235.2021.1963471>
23. Dumitru, I.M.; Dumitrascu, M.; Vlad, N.D.; Cernat, R.C.; Ilie-Serban, C.; Hangan, A.; Slujitoru, R.E.; Gherghina, A.; Mitroi-Maxim, C.; Curtali, L.; et al. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Associated with COVID-19. *Antibiotics* 2021, 10, 561. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050561>
24. Gorrie, C.L.; Mirčeta, M.; Wick, R.R.; Edwards, D.J.; Thomson, N.R.; Strugnell, R.A.; Pratt, N.F.; Garlick, J.S.; Watson, K.M.; Pilcher, D.V.; et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clin. Infect. Dis.* 2017, 65, 208–215. <https://doi.org/10.1093/cid/cix270>
25. Messika, J.; La Combe, B.; Ricard, J.D., Oropharyngeal colonization: Epidemiology, treatment and ventilator-associated pneumonia prevention. *Ann. Transl. Med.* 2018, 6, 426. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.10.17>
26. Liao, W.; Liu, Y.; Zhang, W., Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: A review over the last 10 years. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2020, 23, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.09.004>
27. Wang, J.; Feng, Y.; Zong, Z., Worldwide transmission of ST11-KL64 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: An analysis of publicly available genomes. *mSphere* 2023, e0017323, Advance online publication. <https://doi.org/10.1128/msphere.00173-23>
28. Xie, M.; Yang, X.; Xu, Q.; Ye, L.; Chen, K.; Zheng, Z.; Dong, N.; Sun, Q.; Shu, L.; Gu, D.; et al. Clinical evolution of ST11 carbapenem-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Commun. Biol.* 2021, 4, 650. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02148-4>
29. Xu, M.; Qian, C.; Jia, H.; Feng, L.; Shi, S.; Zhang, Y.; Wang, L.; Cao, J.; Zhou, T.; Zhou, C. Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance and Decreased Virulence in Carbapenem-Resistant ST11 *Klebsiella pneumoniae* During Antibiotics Treatment. *Infect. Drug Resist.* 2022, 15, 6881–6891. <https://doi.org/10.2147/IDR.S387187>
30. Heiden, S.E.; Hübner, N.-O.; Bohnert, J.A.; Heidecke, C.-D.; Kramer, A.; Balau, V.; Gierer, W.; Schaefer, S.; Eckmanns, T.; Gatermann, S.; et al. A *Klebsiella pneumoniae* ST307 outbreak clone from Germany demonstrates features of extensive drug resistance, hypermucoviscosity, and enhanced iron acquisition. *Genome Med.* 2020, 12, 113. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00814-6>
31. Fritzenwanker, M.; Imirzalioglu, C.; Herold, S.; Wagenlehner, F.M.; Zimmer, K.P.; Chakraborty, T. Treatment Options for Carbapenem-Resistant Gram-

- Negative Infections. Dtsch. Arztebl. Int. 2018, 115, 345–352. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0345>
32. Zhu, J.; Chen, Y.; Yang, X., Antibiotic Resistance, Molecular Characteristics and Risk Factors of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Clinical Isolates. *Infect. Drug Resist.* 2022, 15, 6671–6680. <https://doi.org/10.2147/IDR.S383010>
  33. Rodríguez-Baño, J.; Gutiérrez-Gutiérrez, B.; Machuca, I.; Pascual, A. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018, 31, e00079-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00079-17>
  34. Karamatakis, T.; Tsergouli, K.; Behzadi, P. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options. *Antibiotics* 2023, 12, 234. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020234>
  35. El-Sayed Ahmed, M.A.E.G.; Zhong, L.-L.; Shen, C.; Yang, Y.; Doi, Y.; Tian, G.-B. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: An extended review (2000–2019). *Emerg. Microbes. Infect.* 2020, 9, 868–885. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133>
  36. Torres, D.A.; Seth-Smith, H.M.B.; Joosse, N.; Lang, C.; Dubuis, O.; Nüesch-Inderbinen, M.; Hinic, V.; Egli, A. Colistin resistance in Gram-negative bacteria analysed by five phenotypic assays and inference of the underlying genomic mechanisms. *BMC Microbiol.* 2021, 21, 321. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02388-8>
  37. Yu, L.; Zhang, J.; Fu, Y.; Zhao, Y.; Wang, Y.; Zhao, J.; Guo, Y.; Li, C.; Zhang, X. Synergetic Effects of Combined Treatment of Colistin With Meropenem or Amikacin on Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in vitro. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019, 9, 422. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00422>
  38. Paul, M.; Daikos, G.L.; Durante-Mangoni, E.; Yahav, D.; Carmeli, Y.; Benattar, Y.D.; Skiada, A.; Andini, R.; Eliakim-Raz, N.; Nutman, A.; et al. Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: An open-label, randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 2018, 18, 391–400. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30099-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30099-9)
  39. Geng, T.T.; Xu, X.; Huang, M. High-dose tigecycline for the treatment of nosocomial carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: A retrospective cohort study. *Medicine* 2018, 97, e9961. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009961>
  40. Jin, X.; Chen, Q.; Shen, F.; Jiang, Y.; Wu, X.; Hua, X.; Fu, Y.; Yu, Y. Resistance evolution of hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 during treatment with tigecycline and polymyxin. *Emerg. Microbes. Infect.* 2021, 10, 1129–1136. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1937327>
  41. Bulik, C.C.; Nicolau, D.P. Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, 55, 3002–3004. <https://doi.org/10.1128/AAC.01420-10>
  42. Tan, X.; Kim, H.S.; Baugh, K.; Huang, Y.; Kadiyala, N.; Wences, M.; Singh, N.; Wenzler, E.; Bulman, Z.P. Therapeutic Options for Metallo-beta-Lactamase-Producing Enterobacteriales. *Infect. Drug Resist.* 2021, 14, 125–142. <https://doi.org/10.2147/IDR.S246174>
  43. Marshall, S.; Hujer, A.M.; Rojas, L.J.; Papp-Wallace, K.M.; Humphries, R.M.; Spellberg, B.; Hujer, K.M.; Marshall, E.K.; Rudin, S.D.; Perez, F. et al. Can Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam Overcome beta-Lactam Resistance Conferred by Metallo-beta-Lactamases in Enterobacteriaceae? *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017, 61, e02243-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02243-16>
  44. Mauri, C.; Maraolo, A.E.; Di Bella, S.; Luzzaro, F.; Principe, L. The Revival of Aztreonam in Combination with Avibactam against Metallo-beta-Lactamase-Producing Gram-Negatives: A Systematic Review of In Vitro Studies and Clinical Cases. *Antibiotics* 2021, 10, 1012. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10081012>
  45. Spaziante, M.; Oliva, A.; Ceccarelli, G.; Venditti, M. What are the treatment options for resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria? *Expert Opin. Pharmacother.* 2020, 21, 1781–1787. <https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1779221>
  46. Jean, S.S.; Harnod, D.; Hsueh, P.R. Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022, 12, 823684. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.823684>
  47. Gattringer, R.; Nikš, M.; Ostertág, R.; Schwarz, K.; Medvedovic, H.; Graninger, W.; Georgopoulos, A. Evaluation of MIDITECH automated colorimetric MIC reading for antimicrobial susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002, 49, 651–659. <https://doi.org/10.1093/jac/49.4.651>
  48. EUCAST Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 13.0.2023. Available online: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_13.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.0_Breakpoint_Tables.pdf). (accessed on 27 June 2023).
  49. EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance, Version 2.01. 2017. Available online: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_170711.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf). (accessed on 27 June 2023).
  50. Prjibelski, A.; Antipov, D.; Meleshko, D.; Lapidus, A.; Korobeynikov, A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr. Protoc. Bioinform.* 2020, 70, e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>

**Kontakt:**

MUDr. Jozef FICIK, MPH  
 Ústav klinickej mikrobiológie  
 Ústredná vojenská nemocnica SNP-FN v Ružomberku  
 Ul. gen. Miloša Vesela 21  
 03426 Ružomberok  
 e-mail: [ficikj@uvn.sk](mailto:ficikj@uvn.sk)