



Ksenia Szymanek-Majchrzak

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Warszawski Uniwersytet Medyczny

AUTOREFERAT

Warszawa 2019

1. Imię i nazwisko: Ksenia Szymanek-Majchrzak

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

- **18.06.2003** – uzyskanie tytułu zawodowego licencjata w zakresie biotechnologii, na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego; praca licencjacka wykonana w Zakładzie Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii UW
- **17.06.2005** – uzyskanie tytułu zawodowego magistra biotechnologii, specjalność biotechnologia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, praca magisterska pt.: „Wpływ mutacji w genach *cjaA*, *dsbI* i *dsbB* *Campylobacter coli* na zdolność kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt”, wykonana w Zakładzie Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii UW, promotor Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka
- **08.12.2010** – uzyskanie stopnia doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, z wyróżnieniem, nadanym przez Radę I Wydziału Lekarskiego, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Praca doktorska wykonana w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej WUM, promotor **prof. dr hab. n. med. Grażyna Młynarczyk**, recenzenci pracy: prof. dr hab. n. med. Danuta Dzierżanowska, prof. dr hab. n. farm. Stefan Tyski. Tytuł rozprawy: „**Wykrywanie i charakterystyka szczepów VISA i hetero-VISA wśród szczepów *Staphylococcus aureus* pochodzących z materiałów klinicznych**”
- **10.05.2017** - ukończenie kursów i staży oraz zaliczenie programu specjalizacyjnego w ramach specjalizacji z „Mikrobiologii” (opiekun specjalizacji prof. dr hab. n. med. Grażyna Młynarczyk)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych i innych:

- **01.10.2005 – 30.09.2009** - Warszawski Uniwersytet Medyczny, I Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej – studia doktoranckie
- **01.11.2008 – do chwili obecnej** - Szpital Kliniczny im. Dzieciątka Jezus w Warszawie (od 01.01.2019 r. Uniwersyteckie Centrum Kliniczne WUM), Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, stanowisko - młodszy asystent, w niepełnym wymiarze czasu pracy, obecnie 1/8 etatu
- **05.01.2009 – 30.06.2009** - Warszawski Uniwersytet Medyczny, I Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, stanowisko – asystent, w wymiarze 1/2 etatu

- **01.10.2009 – 30.09.2011** - Warszawski Uniwersytet Medyczny, I Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, stanowisko – asystent, w pełnym wymiarze czasu pracy
- **01.10.2011 - do chwili obecnej** - Warszawski Uniwersytet Medyczny, I Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, stanowisko – adiunkt, w pełnym wymiarze czasu pracy

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Charakterystyka fenotypowa oraz molekularna metycylino-opornych szczepów *Staphylococcus aureus*, pochodzących od pacjentów warszawskich szpitali klinicznych, ze szczególnym uwzględnieniem izolatów pochodzących od pacjentów z oddziałów chirurgii i transplantologii”

Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego stanowi cykl siedmiu powiązanych tematycznie prac naukowych, opublikowanych w czasopiśmie recenzowanych, których łączny **IF wynosi 7,341; punktacja MNiSW 112.**

4.2. Spis publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe:

- **H1. Szymanek-Majchrzak K**, Młynarczyk A, Dobrzaniecka K, Majchrzak K, Mierzwińska-Nastalska E, Chmura A, Kwiatkowski A, Durlik M, Dęborska-Materkowska D, Pączek L, Młynarczyk G. Epidemiological and drug-resistance types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from surgical and transplantation ward patients during 2010 to 2011. *Transplant Proc.* 2016;48(5):1414-7. **IF 0,908; MNiSW 15**
- **H2.** Młynarczyk A, **Szymanek-Majchrzak K**, Grzybowska W, Durlik M, Dęborska-Materkowska D, Pączek L, Chmura A, Swoboda-Kopeć E, Tyski S, Młynarczyk G. Molecular and phenotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospitalized patients in transplantation wards. *Transplant Proc.* 2014;46(8):2579-82. **IF 0,982; MNiSW 15**
- **H3. Szymanek-Majchrzak K**, Młynarczyk A, Kawecki D, Pacholczyk M, Durlik M, Dęborska-Materkowska D, Pączek L, Młynarczyk G. Resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, originating in the surgical and

transplantation wards of the Warsaw clinical center - a retrospective analysis. *Transplant Proc.* 2018;50(7):2170-5. **IF 0,806; MNiSW 15**

- **H4. Szymanek-Majchrzak K**, Młynarczyk A, Bilińska M, Równicki M, Majchrzak K, Chmura A, Kwiatkowski A, Durlik M, Dęborska-Materkowska D, Pączek L, Młynarczyk G. The effect of selective antibiotic pressure on the MLS-B phenotype in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains originating from patients from transplantation wards: 24 years of observations. *Transplant Proc.* 2018;50(7):2164-9. **IF 0,806; MNiSW 15**
- **H5. Szymanek-Majchrzak K**, Młynarczyk A, Młynarczyk G. Oporność *Staphylococcus aureus* na glikopeptydy. *Post Mikrobiol.* 2013;52(2):171-84. **IF 0,271; MNiSW 15**
- **H6. Szymanek-Majchrzak K**, Młynarczyk A, Młynarczyk G. Characteristics of glycopeptide-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients of three teaching hospitals in Warsaw, Poland. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2018;7(105):1-6. **IF 3,568; MNiSW 25**
- **H7. Szymanek-Majchrzak K**, Wodzyńska S, Młynarczyk A, Młynarczyk G. Produkcja zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu oraz biofilmu w warunkach zróżnicowanej dostępności tlenu, przez kliniczne izolaty *Staphylococcus aureus* niewrażliwe na glikopeptydy. *Epidemiol Rev.* 2018;72(4):487-98. **MNiSW 12**

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

4.3.1. Wprowadzenie oraz uzasadnienie celu przeprowadzonych prac badawczych

Staphylococcus aureus, biorąc pod uwagę zarówno częstość, jak i postaci kliniczne zakażeń, jest jednym z najbardziej niebezpiecznych ludzkich patogenów bakteryjnych. Wykazuje złożone mechanizmy chorobotwórczości oraz posiada bogaty arsenał czynników zjadliwości. Powszechność stosowania antybiotykoterapii w leczeniu oraz profilaktyce zakażeń, jak również szerokie zastosowanie antybiotyków poza medycyną, prowadziły i prowadzą do selekcji szczepów bakterii wysoce opornych na chemioterapeutyki. Szczególnie niebezpieczne okazały się metycylinooporne szczepy *S. aureus* (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA), które po raz pierwszy opisano w roku 1961. Warianty MRSA, dzięki obecności genu *mecA* (najczęściej), *mecC* lub opisanego w 2018 roku genu *mecB*, kodujących zmodyfikowane białko PBP2a (PBP2'), wykazują oporność na prawie wszystkie antybiotyki beta-laktamowe, z wyjątkiem najnowszych cefalosporyn (V generacji),

do których należy fosamil ceftaroliny i ceftobiprol. Ekspersi World Health Organization, podczas spotkania w Genewie w lutym 2017 roku zdecydowali o umieszczeniu MRSA na liście dwunastu szczególnie niebezpiecznych patogenów “global priority pathogens list (global PPL) of antibiotic resistant bacteria”, stanowiących zagrożenie dla zdrowia publicznego.

Grupę pacjentów szczególnie predysponowanych do zakażeń, w tym również o etiologii MRSA, stanowią chorzy leczeni przeszczepami narządowymi. Medycyna transplantacyjna jest w ostatnich latach bardzo prężnie rozwijającą się dziedziną poprawiającą komfort, przedłużającą lub nawet częściej, ratującą życie chorych. Niestety ten postęp współczesnej medycyny pociąga w konsekwencji podwyższone ryzyko powikłań oraz niepożądanych następstw w postaci infekcji o charakterze pierwotnym, jak również reaktywacji zakażeń zarówno bakteryjnych, grzybiczych, jak i wirusowych. Zarówno sam zabieg chirurgiczny, jak i późniejsze długoterminowe leczenie immunosupresyjne prowadzą do obniżenia wydolności immunologicznej organizmu biorcy. Stanowią przez to istotny czynnik sprzyjający rozwojowi infekcji, które w tych grupach pacjentów występują szczególnie często, a ich przebieg jest z reguły szybszy, bardziej rozległy i trudniejszy w terapii, w porównaniu do analogicznych występujących u osób immunokompetentnych. Infekcje jako powikłania post- transplantacyjne mogą stanowić bezpośrednią przyczynę śmierci pacjenta po przeszczepieniu narządu, ale mogą również pośrednio prowadzić do przełamania tolerancji transplantacyjnej, niewydolności lub odrzucenia przeszczepionego narządu, co również w konsekwencji może doprowadzić do zgonu chorego.

Szczepki *S. aureus*, a zwłaszcza MRSA stanowią istotny czynnik etiologiczny zakażeń bakteryjnych, szczególnie we wczesnym okresie post- transplantacyjnym, ale również w okresach późniejszych. Pacjenci po przeszczepie narządowym, z racji obniżonej wydolności immunologicznej, częstych i długich hospitalizacji, jak również częstych i długich antybiotykoterapii są częściej kolonizowani przez bakterie wielolekooporne, co w sytuacji zakażenia stwarza dodatkowe problemy natury terapeutycznej. Wśród szczepów MRSA szczególnie istotne są warianty o fenotypie HA-MRSA (health care associated MRSA). Dlatego też we współpracy z Klinikami: Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej; Immunologii Transplantologii i Chorób Wewnętrznych oraz Medycyny Transplantacyjnej, Nefrologii i Chorób Wewnętrznych, Instytutu Transplantologii, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego podjęto badania, których celem była charakterystyka fenotypowa oraz molekularna szczepów HA-MRSA, pochodzących od pacjentów zakwalifikowanych lub po przeprowadzonym przeszczepie narządowym. Wyniki przeprowadzonych analiz zostały opublikowane w latach 2014-2018, w czasopiśmie *Transplantation Proceedings* w pracach: **H1, H2, H3 i H4**, o łącznym **IF 3,502; MNiSW 60**. Przeprowadzone badania były częściowo finansowane z **Projektu Młodego Badacza nr 1M20/PM11/13**, pt.: „Ocena przydatności metod różnicowania szczepów bakteryjnych możliwych do zastosowania w rutynowym dochodzeniu

epidemiologicznym. Analiza epidemiologiczna zakażeń MRSA na oddziałach warszawskiego szpitala klinicznego”, realizowanego w latach 2013-2014, którego byłam kierownikiem naukowym.

W ramach podjętego projektu przeprowadzono genetyczne różnicowanie szczepów, którego zasadniczym celem było: i) porównanie oraz ocena stopnia pokrewieństwa szczepów HA-MRSA, izolowanych na poszczególnych oddziałach w klinikach chirurgicznych i transplantacyjnych analizowanego szpitala; ii) ocena występowania typów gronkowcowych kaset chromosomowych SCC*mec* (staphylococcal chromosome cassettes *mec*), ocena przynależności do typu kompleksu genów *ccr* oraz klasy kompleksu genu *mec*; iii) ocena przynależności szczepów do międzynarodowych typów sekwencyjnych (ST), kompleksów klonalnych (CC) oraz klonów epidemicznych; jak również iv) ocena tendencji ewolucyjnej *S. aureus* w badaniach zarówno krótko-, jak i długo- okresowych. Do realizacji postawionych celów posłużono się kilkoma metodami genotypowania, tj.: RFLP-PFGE (restriction fragment length polymorphism analysis pulsed-field gel electrophoresis); SCC*mec* typing (staphylococcal chromosome cassettes *mec* typing); MLST (multi-locus sequence typing) dla siedmiu genów metabolizmu podstawowego, u *S. aureus*: *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* oraz *yqiL*; VNTR/MLVA (multi-locus variable-number tandem repeat analysis) oraz RAPD/AP-PCR (random amplified of polymorphic DNA/arbitrarily primed PCR). Możliwości przeprowadzenia oraz przydatność poszczególnych metod mogą się znacząco różnić, dlatego zastosowanie kilku z nich jednocześnie pozwoliło na uzyskanie pełniejszej charakterystyki analizowanych szczepów.

Drugim zasadniczym celem projektu było oznaczenie profilu lekowrażliwości oraz mechanizmów oporności analizowanych szczepów HA-MRSA. Posłużono się standardowymi metodami określającymi fenotypową wrażliwość, należały do nich: system automatyczny Vitek 2, (bioMerieux); metoda dyfuzyjno-krażkowa; metoda E-testu; metoda rozcieńczeń antybiotyku w podłożu stałym. Stosowano również metody fenotypowe mające na celu określenie mechanizmu oporności szczepów bakteryjnych – metodę D-testu i testu GRD (glycopeptide resistance detection test), zgodnie z rekomendacjami EUCAST lub instrukcją producenta. Uzyskane wyniki mogą stanowić wartościowe dane do opracowań o charakterze epidemiologicznym, mogą być również przydatne do ustalenia wzorców farmakologicznych antybiotykoterapii empirycznych dedykowanych indywidualnie dla poszczególnych klinik lub oddziałów. Dla izolatów klinicznych HA-MRSA niewrażliwych na antybiotyki z wybranych grup, przeprowadzono bardziej szczegółowe analizy, polegające na wykazaniu obecności genów i/lub określeniu mechanizmów genetycznych determinujących ekspresję cechy oporności, przy użyciu metod molekularnych (klasyczny PCR oraz modyfikacje tej metody). Prace **H3**, **H4**, **H6**, wchodzące w skład dzieła habilitacyjnego szczegółowo charakteryzują izolaty MRSA odporne na: aminoglikozydy, makrolidy, linkozamidy, streptograminy B (MLS-B) oraz glikopeptydy.

Problemy z leczeniem zakażeń o etiologii GRSA (glycopeptide-resistant *S. aureus*, GRSA), a właściwie HA-MRSA-GRSA, oprócz specyficznych mechanizmów oporności na liczne antybiotyki, mogą być również związane z występowaniem mechanizmów o charakterze niespecyficznym. Ważną rolę w wyrażaniu fenotypu braku wrażliwości na leki przypisuje się zdolności szczepów do formowania biofilmu. W ostatnich latach właściwość ta jest uznawana za jeden z najważniejszych czynników wirulencji *S. aureus*. O ile wiadomo, że bakterie znajdujące się w biofilmie są mniej wrażliwe na antybiotyki, o tyle niewyjaśnione jest, czy sama potencjalna zdolność do tworzenia biofilmu jest w jakikolwiek sposób skorelowana z opornością na niektóre antybiotyki, stwierdzoną u bakterii rosnących w formie „planktonowej”. Szczególnie interesująca wydawała się korelacja z opornością na glikopeptydy, ponieważ u gronkowców ten mechanizm oporności nie jest do końca poznany. Poszczególne szczepy *S. aureus* wykazują zróżnicowaną zdolność do wytwarzania biofilmu. Dlatego trzecim celem omawianego cyku publikacji było ustalenie związku pomiędzy zdolnością do wytwarzania biofilmu, a opornością na glikopeptydy. Badanie obejmowało dwa etapy, pierwszy to oznaczenie zdolności szczepów do wytwarzania zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu, a drugi ocenę zdolności do adhezji i produkcji biofilmu.

Wszystkie przedstawione założenia i cele zostały zrealizowane, a wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w cyklu siedmiu prac (sześciu artykułów oryginalnych oraz jednej pracy poglądowej), które stanowią podstawę ubiegania się przeze mnie o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego. W sześciu z przedstawionych publikacji jestem zarówno pierwszym autorem, jak i autorem korespondencyjnym. Najważniejsze wyniki uzyskane w poszczególnych pracach przedstawiono poniżej.

4.3.2. Omówienie uzyskanych wyników

- **Analizy z zakresu typowania molekularnego - genetyczne różnicowanie szczepów**

Publikacja H1: Epidemiological and drug-resistance types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from surgical and transplantation ward patients during 2010 to 2011

Publikacja H2: Molecular and phenotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospitalized patients in transplantation wards

Obydwie prace poświęcone były przede wszystkim typowaniu molekularnemu HA-MRSA, pochodzących z zakażeń oraz nosicielstwa od pacjentów z trzech powiązanych ze sobą klinik jednego szpitala. Szczepy stanowiące materiał badań, w przypadku jednej pracy pochodziły z okresu

1991–2007, wszystkie pochodziły z objawowych zakażeń. W przypadku drugiej pracy, połowa szczepów pochodziła z bezobjawowej kolonizacji, a połowa z objawowych zakażeń, i wszystkie były izolowane w ciągu jednego roku od października 2010 do września 2011. Oporność na metycylinę dla wszystkich szczepów była udokumentowana testem fenotypowym z cefoksytiną oraz poprzez wykazanie obecności genu *mecA*. Badane szczepy zostały poddane typowaniu molekularnemu przy zastosowaniu metod: RFLP-PFGE; SCC*mec* typing; MLST; VNTR/MLVA i/lub RAPD/AP-PCR, a uzyskane wyniki poddano analizie porównawczej.

Na podstawie typowania metodą MLST oraz typu kasety SCC*mec* w publikacjach wykazano, że analizowane HA-MRSA pochodzące z lat 1991–2007 należały do pięciu kompleksów klonalnych: CC8 (78%), CC5 (12%), CC1 (ST1-SCC*mec*-IV, 4%), CC51 (ST120-SCC*mec*-IA, 4%) oraz CC30 (ST30-SCC*mec*-III, 2%). W obrębie dominującego kompleksu CC8 wyodrębniono pięć grup, które zakwalifikowano do międzynarodowych klonów: ST239-SCC*mec*-III (EMRSA-1, -4, -11, Brazilian-Hungarian), (35,9%); ST254-SCC*mec*-IV (EMRSA-10, Hannover), (33,3%); ST247-SCC*mec*-I (EMRSA-5,-7, Iberian), (20,5%); ST241-SCC*mec*-III (Finland-UK), (5,15%) oraz ST8-SCC*mec*-IV (EMRSA-2,-6), (5,15%). W obrębie CC5 zidentyfikowano dwa klony: ST461-SCC*mec*-I, (83,3%) oraz ST5-SCC*mec*-IV (Pediatric), (16,7%). Zaobserwowano wyraźne zmiany jeśli chodzi o dominację określonych klonów w poszczególnych latach. W roku 1991 dominował klon EMRSA-10 (Hannover), (50%); w 1994 klon EMRSA-1, -4, -11 (Brazilian-Hungarian), (36,4%); w roku 1996 klon EMRSA-5,-7 (Iberian), (50%); a w latach 2005–2007, ponownie klon EMRSA-1, -4, -11 (Brazilian-Hungarian), (41,7%). Wszystkie izolaty były typowane również metodą PFGE, wykazano 18 typów.

W pracy, w której badano izolaty MRSA pochodzące z lat 2010–2011, wykazano, że dominującym był CC30/ST36 (65,4%), najprawdopodobniej był to klon UK EMRSA-16 lub USA200 (typ kasety SCC*mec*-II), którego obecności nie stwierdzono wśród szczepów HA-MRSA pochodzących z lat 1991–2007. Pozostałe zidentyfikowane w pracy klony to: CC8/ST8 (15,4%), CC5/ST1827 (11,5%) oraz CC1/ST1 (7,7%). Nie stwierdzono występowania dominujących w poprzednim badaniu klonów CC8/ST239, CC8/ST254 ani CC8/ST247. Analizowane szczepy zostały przyporządkowane do sześciu typów MLVA oraz sześciu typów RAPD. Dominujący typ CC30/ST36 należał do jednego typu MLVA-1 oraz dwóch blisko spokrewnionych typów RAPD-1A i 1B. ST8 należał do dwóch blisko spokrewnionych typów MLVA-2 i 2A i trzech typów RAPD-2, 2B i 3; ST1827 do jednego typu MLVA-2B i jednego RAPD-2A; ST1 został przyporządkowany do dwóch blisko spokrewnionych typów MLVA-3A i 3B oraz jednego RAPD-3.

Wszystkie analizowane szczepy, pochodzące z lat 2010–2011 wykazywały fenotyp MDR (multidrug resistant) i oprócz braku wrażliwości na antybiotyki beta-laktamowe, wszystkie również wykazywały brak wrażliwości na ciprofloksacynę. Szczególnie wysoką opornością odznaczały się

izolaty zaklasyfikowane do klonu MRSA CC30/ST36, gdzie 100% izolatów było konstytutywnie opornych również na antybiotyki z grupy MLS-B oraz na neomycynę, a 23,5% na gentamycynę. Wśród izolatów z lat 1991–2007 oporność na ciprofloksacynę wykazano jedynie u 44% izolatów, na erytromycynę i klindamycynę u 82%, zaś na gentamycynę u 60%.

Warte podkreślenia jest, iż połowa pacjentów, od których w latach 2010–2011 pozyskano te wielolekooporne izolaty MRSA była bezobjawowymi nosicielami. Dane te pokazują, że pacjenci z obniżoną reaktywnością immunologiczną łatwo ulegają kolonizacji MDR, w tym też HA-MRSA, stanowiąc rezerwuar patogenu oraz potencjalne zagrożenie dla siebie i innych osób z kontaktu.

- **Analizy z zakresu oporności szczepów na wybrane grupy antybiotyków**
 - **Oporność na aminoglikozydy**

Publikacja H3: Resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, originating in the surgical and transplantation wards of the Warsaw clinical center - a retrospective analysis

Aminoglikozydy (AGs) stanowią ważną grupę leków przeciwoznaczonych. Pojawianie się wariantów MRSA dodatkowo niewrażliwych na aminoglikozydy, znacznie redukuje i tak już ograniczone możliwości terapeutyczne zakażeń tymi drobnoustrojami. Dodatkowym czynnikiem ograniczającym zastosowanie tej grupy antybiotyków jest silna nefro- oraz ototoksyczność AGs. Mechanizm oporności na aminoglikozydy, najbardziej istotny u *S. aureus*, związany jest ze zdolnością szczepów do produkcji enzymów modyfikujących antybiotyki (AME, aminoglycoside modifying enzymes). U HA-MRSA najczęściej występują: dwudomenowa, bifunkcyjna acetylotransferaza/ fosfotransferaza AAC(6')-Ie/APH(2'')-Ia, nukleotydylotransferaza ANT(4')-Ia oraz fosfotransferaza APH(3'')-IIIa, kodowane przez geny: *aacA-aphD*, *aadD* oraz *aph(3'')-IIIa*. Geny te są przenoszone na ruchomych elementach genetycznych, na drodze różnych mechanizmów horyzontalnego transferu genów, dlatego też cecha oporności warunkowana obecnością AMEs jest cechą nabytą i wysoce zmienną. Oznaczenie poziomu oporności (wartości MIC) pozwala na weryfikację możliwości zastosowania terapii skojarzonej aminoglikozydów z penicylinami lub glikopeptydami oraz ustalenie optymalnych dawek leku.

Analizy obejmowały określenie poziomu wrażliwości (wartości MIC) na cztery najpowszechniej stosowane AGs; ocenę występowania wybranych genów oporności na aminoglikozydy; określenie typów genetycznych gronkowcowych kaset chromosomowych SCC*mec*; określenie typów (STs) oraz (CCs) w genotypowaniu MLST oraz zdefiniowanie przynależności do międzynarodowych klonów epidemicznych.

Materiał badań stanowiły 54 szczepy HA-MRSA, pochodzące z objawowych zakażeń od 54 chorych hospitalizowanych w latach 1991-2007. Oznaczano MIC dla czterech antybiotyków aminoglikozydowych: gentamycyny (GEN), tobramycyny (TOB), amikacyny (AMI) oraz netylmycyny (NET) metodą E-testu (bioMerieux), wg rekomendacji EUCAST. Geny oporności: *aacA-aphD*, *aadD* oraz *aph(3'')-IIIa* wykrywano przy zastosowaniu techniki PCR oraz odpowiednich par starterów. U wszystkich szczepów GEN-R stwierdzono obecność genu *aacA-aphD*, który warunkuje oporność m.in. na GEN, TOB, NET oraz AMI i jest dotychczas jedynym znanym enzymem AME, który determinuje oporność na GEN i NET. Fenotypy TOB-R oraz AMI-R występowały również pojedynczo, a poziom wyrażanej oporności był bezpośrednio związany z liczbą determinant genetycznych. Potwierdzono to wynikami oznaczeń wartości MIC. W przypadku szczepu zawierającego tylko gen *aadD*, $MIC_{TOB} = 16$ mg/L, szczepu zawierającego tylko gen *aacA-aphD*, $MIC_{TOB} = 64$ mg/L, natomiast w przypadku szczepów kodujących obywa te geny, $MIC_{TOB} = 256-512$ mg/L. W konsekwencji, wśród badanych izolatów oporność na tobramycynę stwierdzano najczęściej i wyrażała się na najwyższym poziomie. Obecność przynajmniej jednego genu warunkującego oporność na antybiotyki aminoglikozydowe stwierdzono u 77,8% badanych HA-MRSA, w tym u wszystkich wariantów AG-R. Najczęściej występował gen *aacA-aphD* (29/54), co stanowiło 80,6% wszystkich wariantów opornych. Warianty AG-R zaklasyfikowano do siedmiu typów sekwencyjnych (ST239, ST247, ST241, ST254, ST120, ST30, ST8); trzech kompleksów klonalnych (CC8, CC30, CC120) oraz pięciu klonów epidemicznych (Brazilian, Iberian, Finland-UK, Hannover oraz UK EMRSA-2). Zidentyfikowano u nich kasety *SCCmec* typu I/IA, III oraz IV. 27/36 (75%) wyselekcjonowanych AG-R-MRSA należało do kompleksu klonalnego CC8 (ST239, ST247, ST241, ST254 oraz ST8) i zawierało kasety *SCCmec* typu III (15/27; 55,6% AR-CC8-MRSA), IA (8/27; 29,7% AR-CC8-MRSA) oraz IV (4/27; 14,9% AR-CC8-MRSA). Klony: Brazilian – CC8/ST239 oraz Finland-UK – CC8/ST241, które stanowiły 15/36 (prawie 42%) wariantów opornych, zawierały gronkowcowe kasety *SCCmec* typu III. Są to największe kasety, osiągające rozmiary nawet 34-67 kbp, na których mogą być przenoszone transpozony Tn4001 oraz Tn4001-like, kodujące gen *aacA-aphD*.

Najstarszy szczep AR-MRSA, pochodzący z roku 1975 należał do najliczniej reprezentowanego typu CC8/ST239-*SCCmec*-III, klonu Brazilian, który stabilnie utrzymywał się w populacji polskich HA-MRSA, aż do początku XXI wieku. Izolat ten był jedynym, który wyrażał oporność na tobramycynę związaną z obecnością tylko jednego genu - *aadD*. Dowodzi to, że gen O-nukleotydylo-transferazy ANT jest ewolucyjnie starszy od genu *aacA-aphD*, ale przez komórki patogenu jest mniej promowany, niż gen enzymu bifunkcyjnego.

- **Oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B (MLS-B)**

Publikacja H4: The effect of selective antibiotic pressure on the MLS-B phenotype in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains originating from patients from transplantation wards: 24 years of observations

Antybiotyki MLS-B, choć należą do trzech zróżnicowanych pod względem struktury i zastosowania grup leków przeciwdrobnoustrojowych, łączy wspólny mechanizm działania na komórkę bakteryjną. W konsekwencji niektóre z mechanizmów oporności mają charakter krzyżowy i prowadzą do braku wrażliwości szczepów na wszystkie antybiotyki MLS-B. U *S. aureus* najczęstszą przyczyną oporności na MLS-B jest synteza N6-dimetylotransferaz Erm (najczęściej ErmA), powodujących dimetylację adeniny (A2058) w V domenie 23S rRNA. Oporność ta może mieć charakter indukcyjny iMLS-B lub konstytutywny cMLS-B. W podjętych badaniach oceniano częstość występowania poszczególnych fenotypów oporności na MLS-B u HA-MRSA, izolowanych od pacjentów kwalifikowanych lub po przeprowadzonych przeszczepach narządowych. Oceniano również, czy zużycie klindamycyny na badanych oddziałach koreluje z częstością występowania oporności na MLS-B, a zwłaszcza fenotypu cMLS-B. Przeprowadzone badania finansowane były z **Projektu Młodego Badacza nr 1M20/WB2/10**, pt.: „Badanie mechanizmów molekularnych prowadzących do braku wrażliwości na klindamycynę szczepów MRSA, izolowanych z materiałów klinicznych”, realizowanego w latach 2010–2012, którego byłam kierownikiem naukowym.

Do badań użyto 112 szczepów HA-MRSA, izolowanych z różnych materiałów od różnych pacjentów z trzech oddziałów, chirurgicznego i dwóch transplantacyjnych analizowanego szpitala klinicznego (TW1, TW2 i SW), w wybranych latach w okresie od 1991 do 2014. Wartość MIC klindamycyny oznaczano przy użyciu metody E-testu. Fenotyp oporności na MLS-B, oznaczano metodą D-testu. Analizę zużycia klindamycyny przeprowadzono dla klinik w latach 2008–2014, zgodnie z wytycznymi WHO. Wyliczono liczbę zdefiniowanych dawek dobowych (DDD, średnia podtrzymująca terapeutyczna dawka dobową, stosowana w głównym wskazaniu u osób dorosłych), przypadających statystycznie na 1000 osobodni. Wyniki zostały poddane analizie statystycznej przy zastosowaniu testu korelacji liniowej Pearsona. Przyjęto współczynnik istotności statystycznej $p \leq 0,5$.

W wyniku przeprowadzonych badań, najniższy odsetek szczepów opornych na klindamycynę stwierdzono w roku 1991 (11,8%). W kolejnych latach obserwowano tendencję wzrostową (wzrost statystycznie znamieny) tego odsetka do maksimum, które zostało osiągnięte w 2014 i wynosiło 83,3%. W tym samym okresie częstość pojawiania się wariantów cMLS-B wzrosła znamiennie od 5,9% do 83,3%. W podobnym przedziale czasowym oporność wyselekcjonowanych MRSA na erytromycynę wzrosła z 64,7% w 1991 do 100% w latach 2004-2007, a następnie lekko spadła do 91,7% w 2014. Wśród izolatów wrażliwych na klindamycynę, których odsetek sukcesywnie malał z poziomu 88,2% w 1991 roku do 16,6% w 2014, stwierdzono zarówno warianty nieposiadające

swoistego mechanizmu oporności, jak również warianty iMLS-B (znamienny statystycznie spadek częstości izolacji z 52,9% w 1991 do 8,3% w 2014).

Na podstawie danych uzyskanych z archiwum szpitalnego wyliczono, że na oddziale TW1 zużycie klindamycyny w latach 2008-2010 było dość niskie i wynosiło 1,342; 1,214 i 0,861 DDD na 1000 osobodni, w roku 2011 wzrosło 5,5- krotnie, w porównaniu z rokiem poprzednim, do wartości 4,767, a następnie naprzemiennie spadało i wzrastało osiągając wartości: w roku 2012 – 2,29; 2013 – 4,184; 2014 – 2,094 DDD/1000 osobodni. Na oddziale TW2 obserwowano podobną tendencję, z tą tylko różnicą, że w roku 2008 zużycie klindamycyny w porównaniu z TW1 było wysokie i wynosiło 4,523 DDD/1000 osobodni. W latach 2009-2010 spadło do wartości 0,455 oraz 1,37, natomiast w roku 2011 ponownie wzrosło do wartości 5,137 DDD/1000 osobodni. W latach 2012-2014 na TW2 obserwowano naprzemiennie wzrosty i spadki zużycia antybiotyku linkozamidowego, wartości współczynnika DDD/1000 osobodni wynosiły wówczas 1,142, 4,961 oraz 3,153. Średnie zużycie klindamycyny w latach 2008–2014 na oddziałach chirurgicznych (SW) wynosiło 6,89 DDD/1000 osobodni i było 2,3- do 2,9- krotnie wyższe niż w dwóch pozostałych klinikach transplantacyjnych. Wskaźnik zużycia antybiotyku najniższy był, podobnie jak na TW2, w roku 2009 (2,288 DDD/1000 osobodni), lecz od tamtej pory sukcesywnie wzrastał, osiągając w roku 2014 wartość 11,161.

Analizę uzyskanych wyników badania fenotypowego przeprowadzono dla izolatów uzyskanych od pacjentów każdej kliniki indywidualnie w latach 2010–2012. W klinice TW1 90% izolatów pochodzących z 2010 i 2011 roku, było konstytutywnie opornych na wszystkie MLS-B, natomiast 10% było sMLS-B. W roku następnym szczepy cMLS-B oraz iMLS-B stanowiły po 50% wyzolowanych MRSA. Na TW2 100% izolatów wykazywało fenotyp oporny w 2010 i 2011 roku, zaś w 2012 odsetek wariantów cMLS-B spadł do 61,5%, a sMLS-B wzrósł od zera do 30,8%. W klinice chirurgicznej w 2010 i 2011 roku wyselekcjonowano 64,3% oraz 14,3% wariantów cMLS-B oraz iMLS-B, natomiast w 2012 87,5% oraz 12,5% wariantów odpowiednio cMLS-B oraz sMLS-B.

- o **Oporność na glikopeptydy**

- Publikacja H5: Oporność *Staphylococcus aureus* na glikopeptydy**

Praca pogładowa, wydana w roku 2013 stanowiła podłoże merytoryczne do przeprowadzonych w późniejszych latach badań laboratoryjnych. Przedstawiono w niej podstawowe informacje dotyczące wankomycyny, najważniejszego przedstawiciela antybiotyków z grupy glikopeptydów. Charakterystyka dotyczyła pochodzenia, budowy, mechanizmu działania na komórkę bakteryjną, spektrum przeciwdrobnoustrojowego tego antybiotyku, jak również jego podstawowych właściwości farmakokinetycznych oraz farmakodynamicznych. Scharakteryzowano również inne zarejestrowane

w UE glikopeptydy i glikolipopeptydy: teikoplaninę, telawancynę, dalbawancynę oraz oritawancynę. Ponadto, ponieważ kryteria oznaczania wrażliwości na glikopeptydy różnią się w zależności od stosowanego systemu: CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) oraz EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) i na przestrzeni ostatnich lat ulegały częstym modyfikacjom, w publikacji przedstawiono kryteria oporności na wankomycynę i teikoplaninę, według rekomendacji CLSI oraz EUCAST, obowiązujące w latach od 2002 do 2013. Ta niejednolitość kryteriów jest przyczyną stosowania różnej kwalifikacji izolatów bakteryjnych, zwłaszcza *S. aureus* o takich samych wartościach MIC dla glikopeptydów przez różnych autorów i w różnych latach jako „wrażliwe”, „średniowrażliwe”, „o obniżonej wrażliwości” lub „oporne”. Obecnie obowiązujące w Polsce rekomendacje EUCAST, w przypadku *S. aureus* definiują szczepy jako odporne na wankomycynę i teikoplaninę, jeśli MIC > 2 mg/L, a np.: koagulazo-ujemne gronkowce oraz enterokoki są odporne na wankomycynę jeśli MIC > 4 mg/L. W dalszej części artykułu przedstawiono mechanizmy prowadzące do powstawania szczepów bakteryjnych opornych na glikopeptydy. Jako pierwsze opisano wankomycynooporne *Enterococcus* spp. (vancomycin-resistant *Enterococcus*, VRE), u których oporność na wankomycynę wystąpiła historycznie jako pierwsza. Następnie scharakteryzowano mechanizmy prowadzące do powstawania oporności na glikopeptydy występujące u szczepów *S. aureus*. Opisano mechanizm oporności występujący u wariantów VRSA (vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA), warunkowany obecnością operonu zawierającego gen *vanA* i heterologiczną ekspresję tego operonu u wankomycynoopornych *S. aureus*. Przedstawiono analizę przypadków klinicznych oraz występowanie szczepów VRSA *vanA*-pozytywnych, które zostały opisane w literaturze w latach 2002-2013. W dalszej części pracy zamieszczono charakterystykę wariantów VRSA – *vanA*-negatywnych, czyli dawnych *S. aureus* o obniżonej wrażliwości na wankomycynę (vancomycin-intermediate *S. aureus*, VISA) oraz wykazujących fenotyp zróżnicowany heterogeneous-VISA (hetero-VISA/hVISA). Scharakteryzowano również rozprzestrzenienie szczepów oraz występowanie zakażeń wywoływanych przez warianty hVISA i VISA. W ostatniej części artykułu przedstawiono informacje na temat potencjalnych opcji terapeutycznych (stan wiedzy do początku roku 2013), możliwych do zastosowania w leczeniu ciężkich zakażeń o etiologii *S. aureus*, wobec których terapia wankomycyną pozostaje nieskuteczna.

Publikacja H6: Characteristics of glycopeptide-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients of three teaching hospitals in Warsaw, Poland

Niniejsze opracowanie powstało w powiązaniu z przedstawioną powyżej pracą poglądową.

Glikopeptydy, a w szczególności wankomycyna przez wiele lat stanowiły skuteczną opcję terapeutyczną w leczeniu ciężkich, zagrażających życiu zakażeń o etiologii MRSA. Przez ponad 30 lat od wprowadzenia w 1958 roku wankomycyny do lecznictwa, nie odnotowano przypadku izolacji szczepu gronkowca złocistego opornego (VRSA). Uważano wręcz, że *S. aureus* wykazują gatunkową

wrażliwość na ten glikopeptyd. Dlatego też odnotowanie na początku lat '90 XX wieku pierwszych przypadków niepowodzeń terapeutycznych przy zastosowaniu tego antybiotyku, wzbudziło duży niepokój w środowisku mikrobiologów oraz klinicystów. Dodatkowym problemem jest występowanie różnych, o odmiennym podłożu genetycznym, mechanizmów oporności na glikopeptydy. W Polsce sytuacja dotycząca występowania oraz charakterystyki VRSA była jeszcze do niedawna słabo poznana, a w literaturze były dostępne jedynie pojedyncze doniesienia na ten temat. Dlatego też podjęto badania, których celem była ocena występowania oraz charakterystyka szczepów *S. aureus* opornych na wankomycynę (VRSA) i/lub teikoplaninę (teicoplanin-resistant *S. aureus*, TRSA) w Polsce. Ponieważ oporność na glikopeptydy występuje wśród izolatów *S. aureus* bardzo rzadko, do badań zostały włączone szczepy HA-MRSA, pochodzące od pacjentów z trzech dużych warszawskich ośrodków klinicznych, izolowane w okresie 17-letnim. Zakres analiz obejmował określenie mechanizmu prowadzącego do wyrażenia fenotypu GRSA (glycopeptide-resistant *S. aureus*) oraz szczegółową charakterystykę molekularną wyselekcjonowanych izolatów. Ponieważ tematyką braku wrażliwości *S. aureus* na wankomycynę zajmowałam się jeszcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych, przeprowadzone po roku 2010 analizy stanowiły kontynuację badań. W prezentowanej pracy scharakteryzowano 47 izolatów klinicznych HA-MRSA, które wykazywały fenotyp oporności na przynajmniej jeden antybiotyk glikopeptydowy. Selekcji szczepów dokonywano na podstawie testów wstępnych AST-P580 (Vitek 2, bioMerieux), E-testów z wankomycyną i teikoplaniną, testu GRD, firmy bioMerieux oraz metody rozcieńczeń antybiotyku w podłożu stałym, zgodnie z wytycznymi EUCAST lub instrukcją producenta. Charakterystyka wyselekcjonowanych izolatów obejmowała wykrywanie genów: *vanA* i *vanB*, warunkujących wysoki poziom oporności na glikopeptydy; genów: *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *msrB*, *linA* i *linB* – warunkujących oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B (MLS-B); genów *aacA-aphD*, *aadD*, i *aph(3'')-IIIa* – determinujących oporność na aminoglikozydy; określenie typu gronkowcowych kaset chromosomowych *SCCmec*, przynależności do kompleksu genów *ccr* oraz klasy kompleksu genu *mec*, jak również genotypowanie MLST.

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że wśród 47 badanych szczepów HA-MRSA-GRSA 45 (95,7%) wykazywało oporność na teikoplaninę, przy jednoczesnej oporności na wankomycynę lub wrażliwości na wankomycynę (vancomycin-susceptible *S. aureus*, VSSA) (VRSA/TRSA, VSSA/TRSA), a 11 (23,4%) wykazywało oporność na wankomycynę, i tu również były możliwe fenotypy VRSA/TRSA lub VRSA/TSSA (teicoplanin-susceptible *S. aureus*, TSSA). Jednoczesna oporność na VAN (wankomycyna) i TEI (teikoplanina) występowała u 9 (19,1%) izolatów klinicznych (VRSA/TRSA), pojedyncza, tylko na VAN – u 2 (4,2%) (VRSA/TSSA), a pojedyncza tylko na TEI – u 36 (76,6%) (VSSA/TRSA) szczepów. Wszystkie badane HA-MRSA-GRSA były *vanA/vanB*-negatywne i wyrażały fenotyp oporności na obydwie glikopeptydy na niskim poziomie (MIC w zakresie od 4 – 16 mg/L). Większość szczepów GRSA (45/47; 95,8%) posiadało

kasety *SCCmec* (kompleks genów *ccr*, klasa kompleksu genu *mec*) typu: *SCCmec-I/IA* (1B), 19 izolatów; *SCCmec-III* (3A), 16 izolatów; *SCCmec-IV* (2B), 10 izolatów, które są typowe dla wariantów MRSA pochodzenia szpitalnego. Ponad 80% szczepów należało do kompleksu klonalnego MLST CC8, wśród których dominowały typy sekwencyjne oraz klony (STs/clones): ST247-*SCCmec-IA/Iberian*, ST241-*SCCmec-III/Finland-UK* oraz ST239-*SCCmec-III/Brazilian*. Wszystkie warianty VRSA/TRSA pochodziły z lat 2003 i 2005, należały do jednego kompleksu klonalnego CC8 i reprezentowały dwa międzynarodowe klony: ST247-*SCCmec-IA/Iberian* oraz ST241-*SCCmec-III/Finland-UK*. W ciągu 17-letniego okresu obejmującego badanie dało się zaobserwować ewolucję szczepów blisko spokrewnionych ze sobą, w obrębie tego samego kompleksu klonalnego CC8 (ewolucja klonalna) oraz tzw. zjawisko wypierania kompetycyjnego. Przedstawiciele klonu ST239-*SCCmec-III/Brazilian* występowali wyłącznie w latach 90-tych, ST241-*SCCmec-III/Finland-UK* wyłącznie po roku 2000, natomiast klon ST247-*SCCmec-IA/Iberian* wydawał się stabilnie utrzymywać w populacji polskich HA-MRSA-GRSA. Zaobserwowana ewolucja dotyczyła również samego antybiotyku szczepów. Wykazano, iż dominujący w latach 90-tych klon ST239-*SCCmec-III/Brazilian* wyrażał fenotyp oporności przede wszystkim na teikoplaninę (warianty VSSA/TRSA), natomiast młodszy klon ST241-*SCCmec-III/Finland-UK*, to wariant VRSA/TRSA.

U 91,5% analizowanych szczepów wykryto obecność przynajmniej jednego genu związanego z opornością na antybiotyki z grupy MLS-B oraz przynajmniej jednego genu warunkującego oporność na antybiotyki aminoglikozydowe. Dominowały geny *ermA* u 80,9% (oporność na makrolidy) oraz *aacA-aphD* u 72,3% (oporność na aminoglikozydy) u analizowanych HA-MRSA-GRSA. Ich obecność stwierdzono u wszystkich izolatów VRSA/TRSA, jak również u wszystkich przedstawicieli klonów: ST247-*IA/Iberian*, ST241-*III/Finland-UK* oraz ST239-*III/Brazilian*.

Publikacja H7: Produkcja zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu oraz biofilmu w warunkach zróżnicowanej dostępności tlenu, przez kliniczne izolaty *Staphylococcus aureus* niewrażliwe na glikopeptydy

Biofilm jest trójwymiarową, dynamiczną społecznością bakteryjną, osadzoną w macierzy zewnątrzkomórkowej, zbudowanej z lipidów; polisacharydów (PIA/PNSG, polysaccharide intercellular adhesin/ poly-N-succinyl- β -1,6-glucosamine), determinowanych obecnością genów *icaABCD*; adhezyn (m.in. ClfA/B, FnbA/B, Cna, SpaA, Emb, Alt, Bap, SasG) oraz eDNA (extracellular DNA). Może powstawać na powierzchniach nieożywionych oraz tkankach żywych, a wieloetapowy proces formowania tej naturalnej biostruktury może przebiegać w mechanizmie zależnym lub niezależnym od genów operonu *ica* i podlega złożonym wewnątrzkomórkowym mechanizmom regulacyjnym (m.in. AgrAC, SrrAB, SigB, SarA, Spx, Rbf, ArlRS, CidA). Biofilm *S. aureus* odgrywa szczególną rolę w rozwoju zakażeń, zarówno o charakterze przewlekłym,

jak i uogólnionym. Zakażenia te często są związane z wprowadzeniem do organizmu człowieka ciała obcego: implantu, protezy czy cewnika. Uznaje się, iż w warunkach szpitalnych nawet 80% zakażeń o etiologii gronkowcowej, może być związane ze zdolnością szczepów do produkcji biofilmu. Jeszcze do niedawna, to właśnie wankomycyna stanowiła lek z wyboru, skuteczny w leczeniu ciężkich postaci zakażeń o etiologii MRSA. Pojawianie się wariantów *S. aureus* opornych na glikopeptydy w mechanizmie *vanA*- niezależnym, przede wszystkim związane jest z występowaniem ściany komórkowej o nietypowej strukturze oraz grubości. Modyfikacjom tym z reguły towarzyszą również zaburzenia procesów autolitycznych w peptydoglikanie, co może potęgować efekt amorficzności ściany komórkowej i jednocześnie stanowić ważny czynnik predysponujący do tworzenia biofilmu. Przeprowadzono badania, których celem było określenie zdolności szczepów *S. aureus* opornych na glikopeptydy w mechanizmie niezwiązanym z operonem genu *vanA*, do produkcji zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu oraz biofilmu, przy zastosowaniu dwóch metod fenotypowych. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w roku 2018 w czasopiśmie *Epidemiological Review* (H7, MNiSW 12). Przeprowadzone badania częściowo finansowane były w ramach dwóch Projektów Młodego Badacza WUM, o numerach 1M20/PM11/15 oraz 1M20/PM15/16, realizowanych w latach 2014-2016, których byłam kierownikiem naukowym.

W omawianej pracy postanowiono określić, czy szczepy GRSA *vanA*- negatywne, wykazują podwyższoną zdolność do produkcji biofilmu, czy proces formowania biostruktury u GRSA przebiega w mechanizmie *ica*- zależnym czy adherentnym oraz czy mają na niego wpływ warunki stresu oksydacyjnego. Uzyskane wyniki dla szczepów GRSA, będących jednocześnie HA-MRSA, postanowiono odnieść i porównać z analogicznymi uzyskanymi dla: szczepów HA-MRSA, wyrażających fenotyp obniżonej wrażliwości na wankomycynę na zróżnicowanym poziomie (MRSA/hVISA); HA-MRSA wrażliwych na wankomycynę (MRSA/VSSA) oraz szczepów wrażliwych zarówno na metycylinę (methicillin-susceptible *S. aureus*, MSSA), jak i wankomycynę (MSSA/VSSA).

Materiał badań stanowiło łącznie 129 klinicznych izolatów *S. aureus*, pochodzących od pacjentów z 12 oddziałów, z trzech warszawskich ośrodków klinicznych. Wśród nich 47 szczepów wykazywało fenotyp MRSA/GRSA, 8 MRSA/hVISA, 55 MRSA/VSSA oraz 19 MSSA/VSSA.

Oznaczenie zdolności szczepów do wytwarzania zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu przeprowadzono na podłożu tryptozowo-sojowym z dodatkiem czerwieni kongo (CRA), przy zastosowaniu metody jakościowej według Freeman oraz jej modyfikacji. Ocenę zdolności do adhezji oraz produkcji biofilmu przeprowadzono przy zastosowaniu metody półilościowej z fioletem krystalicznym według Christensena oraz jej modyfikacji.

Szczepy MRSA wykazujące fenotyp braku wrażliwości na antybiotyki glikopeptydowe (47 MRSA/GRSA oraz 8 MRSA/h-VISA), produkowały mukopolisacharyd (fenotyp

mucopolysaccharide producer, MP- pozytywny) w warunkach tlenowych na wysokim i zbliżonym poziomie 87,3% i 87,5%, ale wyniki te były znacząco niższe od analogicznych uzyskanych dla wariantów MSSA/VSSA (100%). Największy odsetek wariantów SMP (strong mucopolysaccharide producer) w puli szczepów biofilm- pozytywnych odnotowano wśród izolatów MRSA niewrażliwych na glikopeptydy. W atmosferze beztlenowej w metodzie Freeman wszystkie analizowane warianty *S. aureus* wykazywały fenotyp MP i u wszystkich izolatów zaobserwowano wzrost zdolności do produkcji zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu w porównaniu do warunków tlenowych (wzrost od 2,6- do 15,8- krotny). Podobnie jak w warunkach tlenowych najwyższy odsetek wariantów SMP odnotowano wśród szczepów MRSA/h-VISA (75%), natomiast najniższy u izolatów wrażliwych MSSA/VSSA (15,8%). Zastosowana w niniejszym opracowaniu metoda z fioletem krystalicznym wg Christensena umożliwiła ilościową ocenę zdolności szczepów bakteryjnych do adhezji na powierzchni polistyrenowej. Uzyskane wyniki powinny być traktowane jako bardziej miarodajne, zarówno dla mechanizmu zależnego od genów *ica*, jak i dla mechanizmu adherentnego tworzenia biofilmu w warunkach *in vitro*, a oznaczony fenotyp jako wypadkowa działania obydwu mechanizmów. Dodatkowo wyniki uzyskane w tej metodzie dla szczepów wykazujących fenotyp braku wrażliwości na antybiotyki glikopeptydowe (MRSA/GRSA oraz MRSA/h-VISA) wynosiły, w warunkach tlenowych 63,9% i 62,5%, natomiast w grupach kontrolnych odpowiednio: 80% dla MRSA/VSSA i 94,7% MSSA/VSSA, co daje wartości niższe dla produkcji biofilmu od uzyskanych w metodzie Freeman. W każdej analizowanej puli szczepów występowały warianty SSP, a ich udział w puli szczepów biofilm- pozytywnych mieścił się w zakresie 30 – 60% i były to wyniki wyższe od uzyskanych dla tych samych izolatów w metodzie płytkowej z czerwienią kongo.

4.3.3. Podsumowanie cyklu prac stanowiących dzieło habilitacyjne

1. Przeprowadzone badania, ze względu wieloletni charakter, pozwoliły zaobserwować wyraźne trendy w zastępowaniu jednych klonów MRSA przez inne na tych samych oddziałach szpitalnych.
2. Wśród szczepów pochodzących z oddziałów chirurgiczno-transplantacyjnych, izolowanych w latach 1991–2007 najczęściej izolatów HA-MRSA należało do CC8 (78%), a wśród nich dominowały klony: CC8/ST239-SCC*mec*-III, CC8/ST254-SCC*mec*-IV oraz CC8/ST247-SCC*mec*-I. Nie stwierdzono występowania CC30/ST36.
3. W latach 2010-2011 dominowały (65%) izolaty należące do CC30/ST36-SCC*mec*-II, nie stwierdzono występowania CC8/ST239, CC8/ST254 ani CC8/ST247.

4. Na podstawie przeprowadzonych badań obejmujących okres 21 lat, wyraźnie daje się zaobserwować zarówno zjawisko, „ewolucji klonalnej”, polegające na zmienności genetycznej w obrębie klonu, prowadzącej do powstawania nowych typów sekwencyjnych, jak również zjawisko „wypierania kompetycyjnego” przez przedstawicieli innych klonów zawleczonych z innych ośrodków.
5. Konsekwencją tych zjawisk jest także ewolucja profili lekowrażliwości szczepów endemicznych.
6. Częstość występowania determinant oporności na antybiotyki inne niż beta-laktamowe u szczepów MRSA, pochodzących z lat 2010–2011, była ogólnie wyższa niż u szczepów MRSA z lat 1991-2007.
7. Wśród szczepów pochodzących z oddziałów chirurgicznych i transplantacyjnych, oporność na aminoglikozydy występowała u 66,7% badanych HA-MRSA.
8. Najczęściej, u ponad 80% szczepów AG-R występował gen *aacA-aphD*, który warunkuje oporność m.in. na GEN, TOB, NET oraz AMI i jego obecność jest wystarczająca do wyrażenia fenotypu oporności na wszystkie cztery antybiotyki. U wszystkich szczepów GEN-R stwierdzono obecność genu *aacA-aphD*.
9. Wielogenowość determinowanego mechanizmu oporności na AGs oraz nakładanie się efektów fenotypowych, warunkowanych przez poszczególne geny kodujące AME, prowadzą do wyrażenia oporności na zróżnicowanym poziomie. Narzuca to konieczność oznaczania wartości MIC na AGs dla każdego szczepu indywidualnie.
10. Większość (75%) wyselekcjonowanych AG-R-MRSA należało do kompleksu klonalnego CC8, zawierającego kasyety *SCCmec* typu III, dominowały klony: Brazilian – CC8/ST239-*SCCmec*-III oraz Finland-UK – CC8/ST241-*SCCmec*-III, które stanowiły prawie 42% wariantów opornych.
11. Oporność na antybiotyki z grupy MLS-B u HA-MRSA najczęściej związana jest z występowaniem genu *ermA*, który może ulegać ekspresji w mechanizmie konstytutywnym lub indukowanym.
12. Konwersja fenotypu iMLS-B na cMLS-B zachodzi w wyniku mutacji (SNP, insercji, delecji, duplikacji, transpozycji), zachodzących *in vivo* najczęściej w obrębie regionu regulatorowego *ermAR*, znajdującego się powyżej sekwencji kodującej genu *ermA*.
13. Czynnikiem sprzyjającym powstawaniu mutantów jest presja selekcyjna klindamycyny. Obserwowany w okresie 24- letnim ponad 14- krotny wzrost odsetka szczepów *S. aureus*

konstytutywnie opornych na MLS-B koreluje ze spadkiem częstości izolacji wariantów iMLS-B (spadek 12,3- krotny).

14. Konwersja fenotypu iMLS-B na cMLS-B jest zjawiskiem odwracalnym, a zredukowanie presji selekcyjnej klindamycyny może prowadzić do rewersji cMLS-B do wariantu indukcyjnego lub nawet w pełni wrażliwego.
15. U żadnego ze szczepów HA-MRSA-GRSA pochodzących z różnych ośrodków klinicznych nie stwierdzono obecności genu *vanA*, co oznacza, że oporność ta ma charakter endogeny i nie ma ryzyka jej przekazania na drodze mechanizmów horyzontalnego transferu genów.
16. W populacji badanych HA-MRSA-GRSA dominują warianty odporne na teikoplaninę, natomiast jedynie co czwarty izolat wykazuje fenotyp VRSA.
17. Wyselekcjonowane HA-MRSA-GRSA należały przede wszystkim do kompleksu CC8 i nosły kasety *SCCmec* typu IA i III, były to: CC8/ST247-*SCCmec*-IA - klon Iberian oraz CC8/ST241-*SCCmec*-III - klon Finland-UK. Obserwowane w tym przypadku wypieranie kompetycyjne dotyczyło przede wszystkim klonów CC8/ST239-*SCCmec*-III/Brazilian oraz CC8/ST241-*SCCmec*-III/Finland-UK.
18. Większość analizowanych HA-MRSA-GRSA wykazywała fenotypową oporność również na aminoglikozydy i antybiotyki MLS-B, co zostało potwierdzone badaniami molekularnymi.
19. Szczepy GRSA wykazują podwyższoną zdolność do produkcji zarówno zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu, jak i biofilmu (SMP/SSP), co związane jest najprawdopodobniej z występowaniem zaburzeń struktury i funkcji peptydoglikanu ściany komórkowej oraz defektem globalnego systemu regulatorowego Agr. Pośrednim skutkiem dysfunkcji Agr jest przełączenie fenotypu toksynotwórczego na fenotyp adhezyjny, czyli biofilm- pozytywny.
20. Na podstawie wyników uzyskanych w metodzie Freeman możliwa jest ocena jedynie zdolności szczepów do wytwarzania zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu oraz możliwość wystąpienia mechanizmu *ica*- zależnego, który nie zawsze prowadzi do utworzenia biofilmu. W metodzie Christensena ustalono faktyczną zdolność do formowania biofilmu. Daje się tu zaobserwować wzmocnienie efektu tworzenia biostruktury tzw. „biofilm booster effect” (dotyczy udziału wariantów SSP w puli SP), najprawdopodobniej o efekt mechanizmu związanego z produkcją białek adhezyjnych z rodziny MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule), białka SasG, Bap, otoczki polisacharydowej oraz z uwalnianiem eDNA.

21. Cecha SMP/SSP wyraża się przede wszystkim w mechanizmie *ica*- niezależnym i wykazuje niższą wrażliwość na warunki stresu oksydacyjnego, w porównaniu do szczepów *S. aureus* wrażliwych zarówno na metycylinę, jak i wankomycynę.
22. Uzyskana w trzech ostatnich pracach charakterystyka szczepów *S. aureus* niewrażliwych na glikopeptydy potwierdza i dokumentuje, iż warianty GRSA należą do wysoce opornych, wysoce zjadliwych i przez to niezwykle niebezpiecznych patogenów, a problem zakażeń przez nie wywoływanych jest aktualny również w Polsce.
23. Uzyskane w cyklu prac wyniki mogą stanowić wartościowe dane do opracowań o charakterze epidemiologicznym, do oceny tendencji ewolucyjnych szczepów HA-MRSA występujących na analizowanych oddziałach chirurgicznych oraz transplantacyjnych; mogą być również przydatne do ustalenia wzorców farmakologicznych antybiotykoterapii empirycznych dedykowanych indywidualnie dla poszczególnych klinik lub oddziałów.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych*:

* numery wymienianych prac odpowiadają pozycjom w wykazie dorobku publikacyjnego (Załącznik nr 5, sekcja IIA i D)

5.1. Badania dotyczące oporności *S. aureus* na antybiotyki z grupy MLS-B, prace nr: 18, 19, 20, 30

Tematyka oporności *S. aureus* na antybiotyki stanowiła jeden z głównych przedmiotów moich badań, zarówno przed, jak i po doktoracie. Oprócz prac wchodzących w skład dzieła, jeszcze 6 publikacji było poświęconych oporności *S. aureus* na leki. Szczególną uwagę poświęciłam badaniom mechanizmów oporności na antybiotyki z grupy MLS-B, i tej tematyki dotyczą prace (18, 20 i 30) w wykazie publikacji.

W pracy nr (18) wykazano, że połowa analizowanych szczepów MRSA wyrażała fenotyp iMLS-B, dominującym genem był *ermA*, który występował najczęściej pojedynczo lub łącznie z *ermC*. Izolaty zawierające gen *ermA* były oporne również na spektynomycynę, a ponadto w teście indukcyjności (D-test) w obrębie strefy zahamowania wzrostu nie obserwowano żadnych pojedynczych kolonii. W przypadku szczepów zawierających pojedynczy gen *ermC*, genotyp korelował z wrażliwością na spektynomycynę, a w strefie D-testu obserwowano występowanie pojedynczych kolonii bakteryjnych opornych na klindamycynę (praca 20). Przeprowadzone w latach późniejszych (2012-2014) analizy porównawcze wykazały znaczący wzrost odsetka wariantów szczepów konstytutywnie opornych na MLS-B, któremu jednocześnie towarzyszył spadek udziału

iMLS-B oraz wzrost odsetka wariantów wrażliwych. Znacząco wzrósł również udział szczepów *ermC*- pozytywnych (praca 30). W przedstawionych pracach wykazano, że szczepy MRSA pochodzące od pacjentów warszawskiego szpitala klinicznego nieustannie ewoluują w kierunku wariantów konstytutywnie opornych na MLS-B oraz w kierunku wariantów zawierających gen *ermC*, które ulegają spontanicznym mutacjom do fenotypu cMLS-B ze znacznie wyższą częstością niż izolaty zawierające gen *ermA*. Wyniki te skłoniły mnie do przeprowadzenia analizy retrospektywnej oporności szczepów MRSA na antybiotyki MLS-B na przestrzeni 24 lat oraz oceny korelacji uzyskanych fenotypów ze zużyciem klindamycyny na wybranych oddziałach szpitalnych analizowanego ośrodka klinicznego, co stało się zasadniczym celem pracy (H4).

W powiązaniu z pracami dotyczącymi oporności szczepów *S. aureus* na MLS-B, przeprowadzono również badania oceny wrażliwości klinicznych izolatów MRSA na komercyjny preparat złożony, chinupristina/dalfopristina. Na podstawie danych literaturowych wiadomo było, iż szczepy *S. aureus* zawierające geny *erm* zachowują wrażliwość na działanie bakteriostatyczne chinupristyny/dalfopristyny. Brakowało jednak danych na temat właściwości bakteriobójczych tego preparatu w stosunku do szczepów MRSA. Przeprowadzono badania, których celem była ocena wartości minimalnych stężeń bójczych (MBC) oraz tolerancji szczepów opornych na chinupristinę/dalfopristinę. Materiał do badań stanowiły szczepy MRSA o fenotypie iMLS-B i różnych genotypach *erm* oraz odpowiadające im mutanty wykazujące fenotyp konstytutywnej oporności na MLS-B. Wykazano, że analizowane iMLS-B wykazywały wrażliwość na zabijanie przez chinupristinę/dalfopristinę, a odpowiadające im mutanty cMLS-B charakteryzowały się nawet 16- krotnym wzrostem wartości MBC w porównaniu do wariantów macierzystych. Wyniki niniejszych analiz zostały opublikowane w pracy nr (19).

5.2. Badanie nosicielstwa *S. aureus* wśród studentów wydziałów lekarskich, praca nr 32

Praca (32) jest efektem współpracy o charakterze naukowo-dydaktycznym ze studentami Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania zostały przeprowadzone w ramach działalności Studenckiego Koła Naukowego przy Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej WUM, którego jestem opiekunem. Publikacja dotyczy oceny występowania metycylinoopornych oraz mupirocynoopornych szczepów *S. aureus* wśród studentów kierunku lekarskiego WUM, w latach 2014-2016. W pracy wykazano, iż studenci medycyny mogą być bezobjawowo skolonizowani zarówno szczepami MRSA, jak i wariantami niewrażliwymi na mupirocynę, przez co mogą stanowić potencjalne zagrożenie dla siebie oraz innych osób z kontaktu, w tym również dla leczonych pacjentów.

5.3. Mechanizmy regulacyjne u *S. aureus* (praca poglądowa), praca nr 3

Wyrażenie fenotypu bakteryjnego o określonej charakterystyce jest uzależnione od wielu czynników i podlega złożonym, zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowym mechanizmom regulacyjnym. W kolejnej pracy poświęconej tematyce *S. aureus* podjęłam temat globalnych systemów regulacyjnych u gronkowca złocistego. W efekcie została wydana publikacja poglądowa (3). Analizowane w niniejszej pracy mechanizmy podzieliłam na dwie zasadnicze grupy, tj.: dwuskładnikowe systemy przekazywania sygnału (TCSTS - two component signal transduction system), aktywne również w układach „quorum sensing”, takie jak: AgrAC, SaeSR, SrrAB, ArlSR, LytSR, Rap/TraP oraz czynniki transkrypcyjne np.: Rot, Sigma_B, MgrA, białka SarA, SarR, SarS, SarT, SarU, SarV, SarX, SarY czy SarZ. Modyfikacja ekspresji genów u *S. aureus* może przebiegać również na poziomie inicjacji translacji, przy wykorzystaniu mechanizmu małych antysensownych cząsteczek RNA, RNA III lub na poziomie dojrzałego produktu genu, przy udziale proteaz Clp, o czym także wspomniałam w niniejszym opracowaniu. W poszczególnych akapitach pracy szczegółowo opisano strukturę i organizację TCSTS na przykładzie najlepiej poznanego globalnego systemu regulacyjnego genów *agr* (accessory gene regulator). W przedstawionej pracy poglądowej dużo uwagi poświęciłam również na charakterystykę znaczenia systemu genów *agr* w wyrażaniu zróżnicowanego fenotypu, ze szczególnym uwzględnieniem fenotypu: adherentnego, czyli zdolnego do kolonizacji i tworzenia biofilmu; fenotypu toksynotwórczego (inwazyjnego) oraz fenotypu niewrażliwego na antybiotyki, zwłaszcza z grupy glikopeptydów.

5.4. Prace dotyczące charakterystyki klinicznych izolatów *Bacteroides fragilis* oraz *Parabacteroides* sp., prace nr: 16, 17, 31

Ponieważ jednym z moich głównych zainteresowań naukowych była tematyka związana z opornością szczepów bakteryjnych na antybiotyki z grupy MLS-B, zdecydowałam się na uczestnictwo w projekcie, którego celem było oznaczenie fenotypu oraz genotypu oporności typu MLS-B u klinicznych izolatów bezwzględnie beztlenowych pałeczek Gram-ujemnych z rodzaju *Bacteroides* oraz *Parabacteroides*. W toku przeprowadzanych badań oceniano występowanie oporności na klindamycynę (metodą E-testu), występowanie oporności krzyżowej na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B, jak również, przy zastosowaniu techniki PCR, wykrywano determinanty genetyczne, które najczęściej warunkują fenotyp MLS-B u bezwzględnych beztlenowców (*ermF*, *ermB* oraz *ermG*). Podjęto także próbę korelacji uzyskanych wyników fenotypowych z genotypem. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, pozytywną korelację fenotypu oporności na klindamycynę z obecnością genu *ermF*. Ponadto stwierdzono, że wśród 42% izolatów wrażliwych na klindamycynę, przy jednoczesnej oporności na erytromycynę, u 7,1% występuje w genomie gen *ermF*. W zaleceniach EUCAST wrażliwość bezwzględnych beztlenowców powinna

być badana tylko wobec klindamycyny. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w dwóch pracach oryginalnych (16 i 31), o łącznym IF 2,022, MNiSW 22. Ostatnia praca (17), powiązana z tematyką *Bacteroides* oraz *Parabacteroides*, która została opublikowana w marcu 2019 w czasopiśmie *Anaerobe*, IF 2,742; MNiSW 25 dotyczyła charakterystyki fenotypowej oraz genetycznej analizowanych szczepów pałeczek Gram- ujemnych na antybiotyki z innych grup oraz występowania genu *bft*.

5.5. Prace dotyczące typowania molekularnego izolatów *Enterococcus faecium*, prace nr: 6, 10

W toku swojej działalności brałam również udział w realizacji projektu dotyczącego charakterystyki molekularnej wankomycynoopornych szczepów *Enterococcus faecium* (VRE), pochodzących od pacjentów z klinik chirurgicznych i transplantacyjnych warszawskiego szpitala klinicznego. Efektem współpracy była publikacja dwóch prac oryginalnych (6) oraz (10).

W pracy z roku 2011 (6) przeprowadzono analizę różnicową klinicznych izolatów VRE, przy zastosowaniu dwóch metod typowania genetycznego, tj.: PFGE oraz MLST. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wszystkie badane szczepy są blisko spokrewnione ze sobą i należą do jednego kompleksu klonalnego CC17, który zaliczany jest do klonów epidemicznych i charakteryzuje się globalnym rozprzestrzenieniem w Polsce, w Europie i na świecie. W obrębie CC17 zidentyfikowano przedstawicieli ośmiu typów sekwencyjnych ST, z czego trzy były dominujące (ST78, ST440 oraz ST192) i stanowiły łącznie 82,8% wszystkich analizowanych szczepów VRE. Uzyskane wyniki sugerowały wprowadzenie na właściwych oddziałach wzmożonego nadzoru sanitarno-epidemiologicznego. Rezultaty dalszych badań (10) pozwoliły na wzbogacenie charakterystyki szczepów VRE, o wykrywanie obecności w genomie izolatów sekwencji insercyjnej IS16, specyficznej dla wariantów pochodzenia szpitalnego.

5.6. Prace dotyczące kolonizacji protez zębowych przez mikroflorę gronkowcową u pacjentów leczonych przeszczepem narządowym, prace nr: 12, 13, 27, 28, 33

Niniejsze prace powstały we współpracy z Katedrą Protetyki Stomatologicznej oraz klinikami transplantacyjnymi Szpitala Dzieciątka Jezus. Zakażenia bakteryjne u pacjentów leczonych przeszczepem narządowym stanowią w ostatnich latach narastający problem. Zagadnienie to poruszałam już na początku mojego autoreferatu, uzasadniając celowość przeprowadzanych badań, będących ważnym elementem mojego dorobku habilitacyjnego. Zasadniczym celem projektu badawczego była weryfikacja, jakie oprócz endemicznej mikroflory szpitalnej oraz endogennej flory fizjologicznej pacjentów mogą być inne potencjalne źródła infekcji u osób poddawanych transplantacjom narządowym. Ze względu na specyfikę wieku tej grupy pacjentów (są to najczęściej

osoby powyżej 50 roku życia), długi czas utrzymywania w organizmie oraz porowatość struktury tworzywa akrylowego, ocenie postanowiono poddać ruchome uzupełnienia protetyczne. Warto zaznaczyć jest, iż w przypadku osób przygotowywanych do zabiegu transplantacji narządowej, rutynowo są wykonywane badania przesiewowe w kierunku kolonizacji wielolekoopornymi szczepami bakteryjnymi. Jednak zakres tych badań jest ograniczony do początkowego i końcowego odcinka przewodu pokarmowego (wymazy z błony śluzowej gardła i odbytu) oraz górnych dróg oddechowych (wymazy z błony śluzowej przedsionka jamy nosowej). Protezy zębowe, które są często użytkowane przez pacjentów z tej grupy ryzyka mogą stanowić ważny rezerwuuar potencjalnych patogenów, pomijanych w postępowaniu standardowym. Podjęty projekt naukowy został przeprowadzony w latach 2012-2017, przy współpracy czterech jednostek, tj.: Katedry Protetyki Stomatologicznej, Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej, Kliniki Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej oraz Kliniki Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Efektem przeprowadzonych badań było opublikowanie cyklu pięciu prac oryginalnych, oznaczonych numerami: 12, 13, 27, 28 i 33. Badanie dotyczyło pacjentów kwalifikowanych lub po przeprowadzonym przeszczepie narządowym nerki, użytkujących trwale uzupełnienia protetyczne. Jako marker mikrobiologiczny podjętych analiz postanowiono potraktować ziarenkowce z rodzaju *Staphylococcus*.

Grupę badaną, którą stanowiło łącznie 57 pacjentów kwalifikowanych do leczenia przeszczepem narządowym nerki oraz 27 osób z grupy kontrolnej, którą stanowili pacjenci ogólnie zdrowi, użytkujący protezy zębowe, leczeni stomatologicznie w Katedrze Protetyki Stomatologicznej WUM. Od pacjentów pobierano wymazy z gardła oraz powierzchni dośluzówkowej płyty akrylowej protezy górnej. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, przy wykorzystaniu oprogramowania STATISTICA 6.1.

Łącznie, wyizolowane od grupy badanej oraz kontrolnej szczepy, przyporządkowano do 15 gatunków w obrębie rodzaju *Staphylococcus*. Zarówno w grupie pacjentów badanych, jak i grupie kontrolnej, najczęściej izolowanym gatunkiem był *Staphylococcus epidermidis* (46,7% oraz 38,5%). Obecność *S. aureus* stwierdzono jedynie w grupie badanej. W okresie rocznej obserwacji grupy badanej udział szczepów *S. epidermidis* w kolonizacji gardła uległ znaczącemu obniżeniu z prawie 57% do 27%, natomiast udział *S. aureus* w tej samej lokalizacji oraz w tym samym okresie czasu uległ znacznemu podwyższeniu z 5,4% do 16,7%. Poziom kolonizacji protez przez gatunek *S. epidermidis* utrzymywał się stabilnie (ok. 47,7%) przez cały okres badany, natomiast *S. aureus* po całkowitej eliminacji w wyniku zastosowania profilaktyki okołoperacyjnej, pod koniec analizowanego okresu ponownie kolonizował protezy na poziomie zbliżonym do stanu wyjściowego. Częstość izolacji szczepów *Staphylococcus* wykazywała tendencję wzrostową w okresie przyjmowania terapii immunosupresyjnej, co w niniejszych badaniach było skorelowane ze wzrastającymi dawkami leków immunosupresyjnych: mykofenolanu mofetylu oraz azatiopryny.

5.7. Praca z zakresu protetyki estetycznej, praca nr 25

Niniejsza praca jest to opis przypadku klinicznego, dotyczący zastosowania licówek ceramicznych, wykonanych w technice napalania na folii platynowej, w celu poprawy estetyki uzębienia, po zastosowanym uprzednio leczeniu ortodontycznym. Jest to innowacyjna i mało inwazyjna metoda, która umożliwia poprawę jakości uzębienia, z pominięciem etapu preparacji filarów. Efektem zastosowanego leczenia była poprawa estetyki uzębienia oraz zadowolenie pacjentki, przy jednocześnie minimalnym uszkodzeniu tkanek twardych własnych. Praca (25) została opublikowana w czasopiśmie Protetyka Stomatologiczna.

5.8. Prace dotyczące analizy wrażliwości na antybiotyki oraz charakterystyki genetycznej wielolekoopornych szczepów pałeczek Gram-ujemnych, pochodzących od pacjentów z oddziałów chirurgicznych i transplantacyjnych, prace nr: 1, 2, 5, 7, 11, 14, 15, 26

Problemy zakażeń wywoływanych przez wielolekooporne szczepy bakteryjne (MDR), szczególnie na oddziałach szpitalnych, na których hospitalizowani są pacjenci z obniżoną reaktywnością immunologiczną, są niewątpliwym faktem. W dotychczas opisywanych przeze mnie projektach naukowych nasza uwaga koncentrowała się przede wszystkim na ziarenkowcach Gram-dodatnich z rodzajów *Staphylococcus* oraz *Enterococcus*. I jak początek problemu z występowaniem infekcji o etiologii MRSA, głównym obiektem moich zainteresowań, sięga początku lat '60 XX wieku, co czyni ten problem starym, ale jednocześnie wciąż bardzo aktualnym, tak trudności związane z pojawianiem się wielolekoopornych pałeczek Gram-ujemnych (MDR-PGN) są istotnym problemem ostatnich kilkunastu lat. Dlatego też, dotychczasową współpracę z klinikami chirurgiczno-transplantacyjnymi warszawskiego szpitala klinicznego postanowiliśmy poszerzyć również o zakres MDR-PGN.

Do szczególnie niebezpiecznych zaliczamy pałeczki, które wykazują fenotyp braku wrażliwości na antybiotyki z grupy karbapenemów, w mechanizmie polegającym na wytwarzaniu karbapenemaz kodowanych plazmidowo. W zakażeniach u ludzi ważną rolę odgrywają pałeczki fermentujące glukozę z rodzin *Enterobacteriaceae*, *Morganellaceae* i *Yersiniaceae*, jak również pałeczki niefermentujące, z rodzajów *Pseudomonas* czy *Acinetobacter*. Wśród karbapenemaz najbardziej istotne z klinicznego i epidemiologicznego punktu widzenia są KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases), zaliczane do beta-laktamaz klasy A oraz metalo-beta-laktamazy MBL (NDM, IMP, VIM, GIM, SIM, SPM), zaliczane do klasy B wg klasyfikacji Amblera. Na szczególną uwagę zasługują szczepy posiadające zdolność do produkcji karbapenemaz KPC i NDM (New Delhi metallo beta-lactamases), ze względu na bardzo szerokie spektrum tych enzymów wobec antybiotyków beta-laktamowych, jak również łatwości przekazywania determinant pomiędzy szczepami tego samego lub różnych gatunków. Prowadzone badania dotyczyły wykrywania, oceny

profilu lekowrażliwości oraz mechanizmu molekularnego w przypadku wariantów opornych, jak również typowania genetycznego szczepów w celu oceny pokrewieństwa izolatów bakteryjnych i ich potencjału epidemicznego (RLFP-PFGE) i/lub określenia przynależności do międzynarodowych klonów (MLST). Rezultaty przeprowadzonych badań zostały opublikowane w cyklu ośmiu prac oryginalnych (1, 2, 5, 7, 11, 14, 15, 26), wydanych w okresie od 2009 do 2018 (najważniejsze z nich zostały wypunktowane poniżej). Jedna praca, w której uwzględnione zostały izolaty *K. pneumoniae* KPC- pozytywne z różnych oddziałów analizowanego szpitala klinicznego, stanowiła wielośrodkowe opracowanie skoordynowane przez Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) (publikacja 7; IF 4,841).

- W latach 2003-2009 na oddziałach warszawskiego szpitala klinicznego oporność na karbapenemy występowała częściej u pałeczek Gram-ujemnych niefermentujących niż u *Enterobacteriaceae*.
- Szczepy *Pseudomonas aeruginosa* niewrażliwe na karbapenemy, występujące na oddziałach chirurgiczno-transplantacyjnych analizowanego szpitala, w latach 2007-2011, wyrażały fenotyp oporności w 60-82% w mechanizmie związanym z produkcją beta-laktamaz MBL, determinowanym przede wszystkim obecnością genu *blaVIM*.
- Od 2008 roku na oddziałach analizowanego ośrodka klinicznego (w tym również w klinikach chirurgicznych i transplantacyjnych) są odnotowywane przypadki izolacji, szczepów PGN (głównie *K. pneumoniae*) posiadających zdolność do produkcji karbapenemaz typu KPC. Przypadki te dotyczą przede wszystkim zakażeń pełno- objawowych.
- Izolowane szczepy KPC- pozytywne najczęściej wyrażają fenotyp MDR lub nawet XDR (extensively drug resistant), z fenotypową wrażliwością jedynie na kolistynę, tigecyklinę i/lub amikacynę.
- Izolowane szczepy *K. pneumoniae* KPC- pozytywne najczęściej należą do wysoce epidemicznego typu sekwencyjnego ST258, który charakteryzuje się wysoką heterogennością oraz globalnym rozprzestrzenieniem o charakterze klonalnym.
- Od 2014 roku na oddziałach chirurgiczno-transplantacyjnych analizowanego szpitala pojawiają się przypadki izolacji szczepów, głównie z gatunku *K. pneumoniae*, posiadających zdolność do produkcji karbapenemazy NDM.
- Izolowane szczepy wytwarzające NDM, najczęściej wyrażają fenotyp MDR, a potencjalne opcje terapeutyczne stanowią jedynie: kolistyna, gentamycyna, amikacyna, tigecyklina i/lub trimetoprim/sulfametoksazol.

- Wprowadzenie obowiązkowych badań przesiewowych w kierunku bezobjawowej kolonizacji pałeczkami NDM przy przyjęciu pacjentów na oddziały szpitalne, skutkowało ogólnym wzrostem częstości izolacji szczepów NDM- pozytywnych (izolacje od pacjentów skolonizowanych), przy jednoczesnym spadku częstości izolacji z zakażeń o charakterze objawowym.
- W 2008 roku wyizolowano trzy pierwsze izolaty *S. marcescens* odporne na karbapenemy.
- Ważną rolę w zakażeniach o charakterze inwazyjnym u pacjentów poddawanych leczeniu immunosupresyjnemu odgrywają pałeczki *Stenotrophomonas maltophilia*, charakteryzujące się naturalną opornością na karbapenemy.

5.9. Prace dotyczące badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowo zsyntetyzowanych związków chemicznych, prace nr: 8, 9, 23, 24

W latach 2009-2012 uczestniczyłam również w badaniach prowadzonych we współpracy z Katedrą i Zakładem Chemii Medycznej WUM. Celem prowadzonych analiz była ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowo zsyntetyzowanych związków, będących pochodnymi kwasu 2-benzofuranokarboksylowego, pochodnymi 17-azapentacyclo [6.6.5.0^{2,7}.0^{9,14}.0^{15,19}] nonadec-2,4,6,9,11,13-heksaen-16,18-dionu i 1-bromo-17-azapentacyclo [6.6.5.0^{2,7}.0^{9,14}.0^{15,19}] nonadec-2,4,6,9,11,13-heksaen-16,18-dionu oraz 1*H*-benzo[*de*]jizokwinolino-1,3(2*H*)-dionu. Efektem publicystycznym tej współpracy była publikacja czterech artykułów oryginalnych (8, 9, 23, 24), za które autorzy prac zostali nagrodzeni w roku 2013 Nagrodą Rektora: „Nagroda Naukowa I stopnia za współautorstwo cyklu prac dotyczących syntezy związków biologicznie czynnych”.

5.10. Prace dotyczące wykrywania oraz charakterystyki czynników wirulencji u pałeczek *Campylobacter*, prace nr: 4, 21

W roku 2007 i 2010 zostały opublikowane dwie prace, które powstały w powiązaniu z tematyką, którą zajmowałam się podczas wykonywania pracy magisterskiej w Instytucie Genetyki Bakterii, Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Pierwsza z nich (21) była to praca pogładowa, w której scharakteryzowano podstawy genetyczne kolonizacji przewodu pokarmowego u drobiu przez szczepy mikroaerofilnych pałeczek Gram-ujemnych *Campylobacter jejuni*. Natomiast druga publikacja (4) stanowiła oryginalne opracowanie dotyczące wykrywania i charakterystyki molekularnej potencjalnych czynników zjadliwości *C. jejuni*, determinujących kolonizację oraz inwazyjność tych drobnoustrojów. Łączna punktacja opublikowanych prac wynosiła IF 1,482; MNiSW 29.

5.11. Praca dotycząca występowania wirusów HPV w wycinkach z polipów jelita grubego, praca nr 29

W toku współpracy naukowej, jaką nasza Katedra prowadziła z Kliniką Dermatologii i Wenerologii WUM, uczestniczyłam również w badaniach z zakresu wirusologii. Celem podjętego projektu była ocena, czy wirusy HPV mogą stanowić czynnik sprzyjający powstawaniu łagodnych oraz złośliwych zmian nowotworowych w jelicie grubym. Przeprowadzono badanie występowania wirusów HPV-6, -11, -16 i -18 w wycinkach z polipów jelita grubego pobranych od pacjentów Kliniki Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych WUM. Badanie przeprowadzono na wycinkach pobranych od 24 pacjentów. Obecność DNA HPV-6, -11, -16 i -18 badano przy zastosowaniu metody real-time PCR w aparacie Smart CyclerDx, Cepheid. Stwierdzono, że udział HPV w patogenezie polipów jelita grubego i ewentualna ich rola w transformacji nowotworowej polipów nadal pozostają niewyjaśnione, a onkogenne HPV najprawdopodobniej nie odgrywają roli w patogenezie polipów jelita grubego (29).

5.12. Kierowanie i/lub udział w realizacji projektów naukowo-badawczych

W trakcie swojej działalności naukowo-badawczej uczestniczyłam w realizacji jednego grantu finansowanego z funduszy KBN (zrealizowanego oraz pozytywnie rozliczonego w latach 2008-2010). Byłam również kierownikiem oraz wykonawcą w czterech Projektach Młodego Badacza, finansowanych z funduszy Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (zrealizowanych oraz pozytywnie rozliczonych w latach 2010-2016). Szczegółowe informacje o udziale w projektach naukowych zostały zamieszczone w Załączniku nr 5 pt.: „Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki”.

5.13. Moje osiągnięcia naukowe otrzymały następujące nagrody oraz wyróżnienia

- **Nagroda Naukowa im. Janusza Jeljaszewicza**, nadana przez: Annę Dąbrowską-Jeljaszewicz, Danutę Dzierżanowską, Jana Wiliama oraz Wydawnictwo Medyczne Alfa-Medica Press, dla **Kseni Szymanek-Majchrzak** za pracę doktorską pt.: „Wykrywanie i charakterystyka szczepów VISA i hetero-VISA wśród szczepów *Staphylococcus aureus* pochodzących z materiałów klinicznych” (2010)
- **Wyróżnienie** nadane uchwałą Rady Wydziału I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego dla **Kseni Szymanek-Majchrzak** za pracę doktorską pt.: „Wykrywanie i charakterystyka szczepów VISA i hetero-VISA wśród szczepów *Staphylococcus aureus* pochodzących z materiałów klinicznych” (2010)

- **Nagroda Naukowa im. Prof. Edmunda Mikulaszka**, przyznana przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów oraz Komisję Konkursową o Nagrodę Naukową im. Prof. E. Mikulaszka, za pracę naukową: Lasica A, Wyszyńska A, **Szymanek K**, Majewski P, Jagusztyn-Krynicka EK. „Inactivation of the *Campylobacter* Dsb oxidative pathway Walters invasion and colonization”. J Appl Gen. 2010;51:383-93. (2012)
- **Wyróżnienie nadane przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów** za pracę naukową: **Szymanek-Majchrzak K**, Majchrzak K, Wodzyńska S, Młynarczyk A, Młynarczyk G. „Wpływ atmosfery beztlenowej na zdolność klinicznych izolatów *Staphylococcus aureus* oraz *S. epidermidis* do produkcji zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu oraz biofilmu” (2014)

5.14. W ramach samodoskonalenia oraz rozwoju zawodowo-naukowego uczestniczyłam również w stażach, kursach oraz warsztatach zarówno w zagranicznych, jak i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich

- **Staż zagraniczny - European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Public Health England (PHE), Colindale, London NW9 5HT, UK, 17-21.11.2014**
- **Stáže oraz kursy w ramach specjalizacji z „Mikrobiologii”** (w toku) organizowane przez instytucje oraz jednostki szkolące, uprawnione do przeprowadzania kursów specjalizacyjnych
- **Kursy, staże, szkolenia, warsztaty doskonalące w zakresie pracy dydaktycznej i naukowej oraz posiedzenia i wykłady organizowane m.in. przez: European Centre for Disease Prevention and Control, Technical University of Denmark (DTU), Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD), Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej, Fundację Centrum Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Program Ochrony Antybiotyków, Polskie Towarzystwo Mikrobiologów.** Niniejsze formy doskonalenia dotyczyły przede wszystkim zastosowań nowoczesnych metod biologii molekularnej w diagnostyce mikrobiologicznej oraz w genetycznych analizach genomów mikroorganizmów. Ostatnie szkolenie, w którym brałam udział pt.: **„Whole genome sequencing of bacterial genomes - tools and applications”**, zorganizowane przez **Technical University of Denmark (DTU)**, w terminie 30.04 – 11.06.2018, dotyczyło możliwości zastosowania technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS) w globalnych oraz porównawczych analizach genomów bakteryjnych.

Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz szczegółowe informacje o pozostałych osiągnięciach habilitanta (m.in.: udziale w projektach naukowych, uzyskanych nagrodach, udziale w licznych kursach, stażach oraz warsztatach, promotorstwie pomocniczym w otwartym przewodzie doktorskim, opiece nad pracami magisterskimi, opiece nad Studenckim Kołem Naukowym oraz innych osiągnięciach o charakterze dydaktycznym i/lub organizacyjnym), zostały zamieszczone w Załączniku nr 5 pt.: „Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki”.

Podsumowanie osiągnięć naukowo – badawczych

Jestem autorem lub współautorem 40 publikacji naukowych, w tym 35 prac oryginalnych, pełnotekstowych (IF 23,995; MNiSW 449), trzech prac poglądowych (IF 0,379; MNiSW 37), jednej pracy wielośrodkowej (IF 4,841) oraz jednego opisu przypadku (MNiSW 5).

Tabela: Prace opublikowane przed i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Dorobek publikacyjny	Przed doktoratem			Po doktoracie		
	Liczba	IF	MNiSW	Liczba	IF	MNiSW
Prace oryginalne	9	3,47	106	26	20,525	343
Opisy przypadków	-	-	-	1	-	5
Prace poglądowe	2	0,108	22	1	0,271	15
Prace wielośrodkowe	-	-	-	1	4,841	-
RAZEM	11	3,578	128	29	25,637	363

Łączny IF mojego dorobku naukowego wynosi: **29,215**

Łączna punktacja MNiSW: **491**

Liczba cytowań wg Bazy Web of Science (bez autocytoowań): **107**

Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **5**

Korszecha, 08.04.2019r
Miejscowość i data

Grzegorz Szymanek-Majchrzak
Podpis habilitanta