



AUTOREFERAT

dr n. med. Radosław Izdebski
Zakład Mikrobiologii Molekularnej
Narodowy Instytut Leków

Warszawa, 2019

1. Dane osobowe

Radosław Izdebski

Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, Tel. 22 851 43 88, fax 22 841 29 49, e-mail r.izdebski@nil.gov.pl

Obecne stanowisko: adiunkt

Stopień naukowy: doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej

2. Wykształcenie

1997-2002. Studia magisterskie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł magistra biologii w zakresie mikrobiologii uzyskany 3 lipca 2002r. Praca magisterska pt. „Eksprymacja determinantów patogenezы *Listeria monocytogenes* w szczepach *Bacillus subtilis*”. Promotor prof. dr hab. Jacek Bielecki.

2009. Tytuł doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej nadany 18 marca 2009r. uchwałą Rady I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pt. „Oporność *Streptococcus pneumoniae* na β -laktamy i tetracykliny na tle struktury klonalnej tego drobnoustroju w Polsce”. Promotor prof. dr hab. Marek Gniadkowski.

2013-2018. Kursy i staże kierunkowe w ramach specjalizacji w dziedzinie mikrobiologii.

3. Przebieg pracy zawodowej

2002-2004. Pracownik inżynierijno techniczny, Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Centralne Laboratorium Surowic i Szczepionek (od 1.10.2002 Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego).

2004-2005. Specjalista ds. biologii bakterii, Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego.

2006-2009. Asystent, Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego (od 8.12.2006 Narodowy Instytut Leków).

2009-obecnie. Adiunkt, Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. 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.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Analiza struktur klonalnych wybranych populacji bakterii rzędu *Enterobacterales* niewrażliwych na działanie cefalosporyn o rozszerzonym spektrum substratowym, wytwarzających karbapenemazy typu VIM/IMP lub OXA-48/181 w Polsce i w Europie, 2006-2017.

Osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl 7 oryginalnych, pełnotekstowych publikacji naukowych. Sumaryczny Impact Factor prac stanowiących osiągnięcie naukowe wynosi **34,093**. Łączna liczba punktów zgodnie z obowiązującymi kryteriami MNiSW wynosi **280**.

b) wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe:

Publikacja 1.

Izdebski R*, Baraniak A*, Fiett J, Adler A, Kazma M, Salomon J, Lawrence C, Rossini A, Salvia A, Vidal Samsó J, Fierro J, Paul M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, Lammens C, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Carmeli Y, Gniadkowski M; MOSAR WP2 and WP5 Study Groups. Clonal structure, extended-spectrum β -lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jan;57(1):309-16. PMID: 23114774 *- równe współautorstwo. **IF 4,451; MNiSW 40**

Mój udział wyniósł **25%** i polegał na zaplanowaniu i doborze metod badawczych, wykonaniu badań laboratoryjnych (identyfikacja gatunkowa metodą automatyczną Vitek 2, analiza fenotypów ESBL i AmpC tzw. testem dwóch krążków na podłożach z i bez kloksacyliny, typowanie metodami PFGE i MLST, analiza eBURST,), analizie i opracowaniu wyników.

Publikacja 2.

Baraniak A*, **Izdebski R***, Fiett J, Sadowy E, Adler A, Kazma M, Salomon J, Lawrence C, Rossini A, Salvia A, Vidal Samsó J, Fierro J, Paul M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, Lammens C, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Carmeli Y, Gniadkowski M; MOSAR WP2 and WP5 Study Groups. Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Apr;57(4):1992-7. *-równe współautorstwo. **IF 4,451; MNiSW 40**

Mój udział wyniósł **25%** i polegał na zaplanowaniu i doborze metod badawczych, wykonaniu badań laboratoryjnych (identyfikacja gatunkowa metodą automatyczną Vitek 2, analiza fenotypów ESBL i AmpC tzw. testem dwóch krążków na podłożach z i bez kloksacyliny, typowanie metodami PFGE i MLST), analizie i opracowaniu wyników.

Publikacja 3.

Izdebski R, Baraniak A, Herda M, Fiett J, Bonten MJ, Carmeli Y, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Gniadkowski M; MOSAR WP2, WP3 and WP5 Study Groups. MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Jan;70(1):48-56. **IF 4,919; MNiSW 40**

Mój udział wyniósł **65%** i polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i doborze metod badawczych, wykonaniu badań laboratoryjnych (identyfikacja gatunkowa metodą automatyczną Vitek 2, analiza fenotypów ESBL i AmpC tzw. testem dwóch krążków na podłożach z i bez kloksacyliny, typowanie metodami PFGE i MLST, analiza eBURST, analiza filogenetyczna na podstawie konkatamerów sekwencji alleli MLST, charakterystyka β -laktamaz za pomocą reakcji PCR i sekwencjonowania), analizie i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

Publikacja 4.

Papagiannitsis CC*, **Izdebski R***, Baraniak A, Fiett J, Herda M, Hrabák J, Derde LP, Bonten MJ, Carmeli Y, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Gniadkowski M; MOSAR

WP2, WP3 and WP5 study groups; MOSAR WP2 WP3 and WP5 study groups. Survey of metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* colonizing patients in European ICUs and rehabilitation units, 2008-11. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Jul;70(7):1981-8. *-równe współautorstwo. **IF 4,919; MNiSW 40**

Mój udział wyniósł **25%** i polegał na zaplanowaniu i doborze metod badawczych, wykonaniu badań laboratoryjnych (identyfikacja gatunkowa metodą automatyczną Vitek 2, analiza fenotypów MBL testem dyfuzyjno-krażkowym z EDTA, typowanie metodami PFGE i MLST, sekwencjonowanie genów *bla_{VIM}* oraz integronów je zawierających, charakterystyka plazmidów metodą PFGE S1 i hybrydyzacja z sondą *bla_{VIM}*), analizie i opracowaniu wyników.

Publikacja 5.

Izdebski R, Fiett J, Urbanowicz P, Baraniak A, Derde LP, Bonten MJ, Carmeli Y, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Brisse S, Gniadkowski M; MOSAR WP2, WP3 and WP5 Study Groups; MOSAR WP2 WP3 and WP5 Study Groups. Phylogenetic lineages, clones and β -lactamases in an international collection of *Klebsiella oxytoca* isolates non-susceptible to expanded-spectrum cephalosporins. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Dec;70(12):3230-7. **IF 4,919; MNiSW 40**

Mój udział wyniósł **65%** i polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i doborze metod badawczych, wykonaniu badań laboratoryjnych (identyfikacja gatunkowa metodą automatyczną Vitek 2, analiza fenotypów ESBL i AmpC tzw. testem dwóch krążków na podłożach z i bez kloksacyliny, typowanie metodami PFGE i MLST, analiza eBURST, analiza filogenetyczna na podstawie konkatamerów sekwencji alleli MLST, charakterystyka β -laktamaz OXY za pomocą reakcji PCR i sekwencjonowania, charakterystyka nabytych β -laktamaz za pomocą reakcji PCR i sekwencjonowania), analizie i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

Publikacja 6.

Izdebski R, Baraniak A, Zabicka D, Machulska M, Urbanowicz P, Fiett J, Literacka E, Bojarska K, Kozinska A, Zieniuk B, Hryniewicz W, Gniadkowski M. *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in Poland, 2013-January 2017. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73(3):620–5. **IF 5,217; MNiSW 40**

Mój udział wyniósł **55%** i polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i doborze metod badawczych, wykonaniu badań laboratoryjnych (typowanie metodami PFGE i MLST, sekwencjonowanie genów typu *bla_{OXA}* oraz transpozonów je zawierających, charakterystyka plazmidów metodą PFGE S1 i hybrydyzacja z sondą *bla_{OXA-48}*, charakterystyka β -laktamaz za pomocą reakcji PCR i sekwencjonowania), analizie i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

Publikacja 7.

Izdebski R, Baraniak A, Zabicka D, Sękowska A, Gospodarek E, Hryniewicz W, Gniadkowski M. VIM/IMP carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Poland: epidemic *Enterobacter hormaechei* and *Klebsiella oxytoca* lineages. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73(10):2675-81. **IF 5,217; MNiSW 40**

Mój udział wyniósł **50%** i polegał na zaplanowaniu i doborze metod badawczych, wykonaniu badań laboratoryjnych (typowanie metodami PFGE i MLST, sekwencjonowanie genów *bla_{VIM}* oraz integronów je zawierających, charakterystyka plazmidów metodą PFGE S1 i hybrydyzacja z sondą *bla_{VIM}*, charakterystyka β -laktamaz za pomocą reakcji PCR i sekwencjonowania), analizie i opracowaniu wyników.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

Ostatnie dziesięciolecie to czas ogromnego postępu medycyny związanego z rozwojem naukowym i technologicznym. W obliczu tych pozytywnych zmian, u progu poważnego kryzysu znajduje się niewątpliwie obszar, coraz częściej nazywany, medycyną zakażeń. Związane jest to z szybkim narastaniem oporności bakterii na antybiotyki, napędzanym m. in. masowym ich stosowaniem w medycynie, weterynarii i rolnictwie. Dodatkowo, narastaniu oporności towarzyszy stały wzrost liczby pacjentów z podwyższonym ryzykiem nabycia infekcji tj. ze skrajnych grup wiekowych, o przedłużonej hospitalizacji, poddawanych immunosupresji czy intensywnej opiece medycznej. Nie bez znaczenia pozostaje tu również częstość przenoszenia pacjentów pomiędzy szpitalami o różnym stopniu referencyjności, masowe podróże czy migracje umożliwiające przenoszenie drobnoustrojów na duże odległości. Oporność bakterii obejmuje wszystkie stosowane grupy leków, a poprzez akumulacje w pojedynczych szczepach może prowadzić do poważnych ograniczeń opcji terapeutycznych, a w skrajnych przypadkach do ich całkowitego braku. Wobec zaistniałych faktów, liczne światowe autorytety zaczęły przedstawiać realną groźbę nadejścia tzw. ery postantybiotykowej. W obliczu tego narastającego problemu, ogromnego znaczenia nabierają badania naukowe w zakresie epidemiologii lekoopornych szczepów bakteryjnych, polegające na analizie struktur ich populacji, wyróżnianiu i śledzeniu tempa rozprzestrzeniania pandemicznych klonów tzw. wysokiego ryzyka, oraz charakterystyce elementów genetycznych determinujących lekooporność. Akumulacja wiedzy o biologii chorobotwórczych patogenów jest konieczna do wyjaśnienia powstania, dróg i mechanizmów ciągłego ich rozprzestrzeniania się, a uzyskane wyniki pomagają opracować strategie ograniczające i w jak największym stopniu eliminujące ten niebezpieczny proces, wliczając w to nowe leki oraz szczepionki. Nowoczesna epidemiologia zrewolucjonizowana dzięki wykorzystywaniu technik biologii molekularnej znacznie przyczyniła się do rozwoju wiedzy w zakresie genetyki molekularnej, populacyjnej i ewolucyjnej bakterii.

Badania epidemiologiczne drobnoustrojów patogennych są fundamentem tworzenia racjonalnej polityki antybiotykowej oraz zwalczania zakażeń i chorób zakaźnych, od lokalnego poziomu pojedynczego oddziału czy szpitala, poprzez regiony i kraje, kończąc na kontynentach i całym globie. Jednym z głównych narzędzi stosowanych w epidemiologii jest różnicowanie wewnątrzgatunkowe izolatów bakteryjnych, zwane typowaniem lub genotypowaniem. Umożliwia ono identyfikację, charakterystykę oraz ewentualne śledzenie dróg i tempa rozprzestrzeniania się poszczególnych szczepów bakteryjnych. Na poziomie oddziału szpitalnego typowanie może potwierdzić lub wykluczyć wystąpienie ogniska epidemicznego, dostarczając jednocześnie wskazówek umożliwiających wygaszenie i zapobieganie ich występowaniu w przyszłości. W większej skali, poprzez poznanie

drobnoustrojów odnoszących sukces epidemiczny i śledzenie dróg ich rozprzestrzeniania, pozwala opracować skuteczne metody profilaktyki, zarówno na poziomie indywidualnym jak i populacji, oraz leczenia osób zakażonych.

Metody typowania oparte na analizie DNA, mają na celu wyróżnienie charakterystycznych cech poszczególnych izolatów bakteryjnych, umożliwiając tym samym ich zaszeregowanie w grupy wykazujące podobieństwo lub pokrewieństwo. W zależności od potrzeb, w różnicowaniu wewnątrzgatunkowym stosuje się szeroki wachlarz technik badania DNA, od pojedynczych reakcji PCR, poprzez analizę restrykcyjną, hybrydyzację czy sekwencjonowanie, kończąc na różnorodnych metodach elektroforetycznego rozdziału DNA. W ostatnich latach do repertuaru metod genetycznych wykorzystywanych w genotypowaniu zostały dołączone techniki bazujące na sekwencjonowaniu genomowym (ang. whole genome sequencing, WGS). WGS umożliwia uzyskanie kompleksowej, genetycznej charakterystyki badanego izolatu, na poziomie rozdzielczym niespotykanym do tej pory w tradycyjnych metodach. Z tego też względu, w połączeniu z stale zmniejszającymi się cenami, WGS rewolucjonizuje nie tylko badania naukowe, czy podejście do rutynowych dochodzeń epidemiologicznych, ale również otwiera nowe możliwości prowadzenia analiz o szerszym zakresie terytorialnym i czasowym. Chociaż zastępowanie konwencjonalnych metod typowania przez WGS jest procesem nieodwracalnym, w dalszym ciągu ze względu na koszty, dostęp do technologii oraz niezbędny warsztat bioinformatyczny, w krajach o ograniczonych budżetach służby zdrowia i nauki pozostaje technologią relatywnie bliskiej przyszłości. Dlatego też, niektóre metody typowania oparte na tradycyjnej biologii molekularnej, ze względu na stosunkowo wysoką siłę rozdzielczą, w dalszym ciągu zaliczane są do metod referencyjnych i powszechnie stosowane są w badaniach epidemiologicznych. Analiza zmienności długości fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA z użyciem elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym, potocznie zwaną elektroforezą pulsacyjną (ang. restriction fragment length polymorphism – pulsed-field gel electrophoresis, RFLP-PFGE lub PFGE), przez wiele lat była uważana za metodę referencyjną w typowaniu molekularnym wielu gatunków bakterii. Poprzez rozdział w zmiennym polu elektrycznym fragmentów genomu, powstałych w wyniku trawienia rzadko tnącą endonukleazą restrykcyjną, uzyskuje się charakterystykę całego chromosomu bakteryjnego. Podobieństwa i różnice uzyskiwanych wzorów restrykcyjnych, regulowane ściśle określonymi kryteriami, odzwierciedlają relacje pokrewieństwa zachodzące między badanymi izolatami. Metoda PFGE doskonale sprawdza się w analizach zarówno pojedynczych ognisk epidemicznych, jak również w szeroko zakrojonych badaniach porównawczych. Niewątpliwą wadą metody, oprócz czasochłonności są trudności w porównywaniu uzyskiwanych wyników pomiędzy różnymi ośrodkami. Dlatego też, w uzupełnieniu analiz PFGE stosuje się często metodę typowania poprzez sekwencjonowanie wybranych loci (ang. multilocus sequence typing, MLST). Technika MLST polega na sekwencjonowaniu, najczęściej siedmiu, wybranych fragmentów genów metabolizmu podstawowego komórki. Warianty otrzymanych sekwencji są przypisywane zapisowi numerycznemu, który z kolei przekłada się na profil alleliczny tj. uszeregowany zestaw numerów alleli poszczególnych genów badanych w ramach, właściwego dla gatunku, schematu MLST. Do każdego profilu allelicznego jest również przypisywany unikatowy numer i określany jako typ sekwencyjny (ang. sequence type, ST). Metoda MLST stosowana jest powszechnie w typowaniu drobnoustrojów, zarówno na

poziomie lokalnym jak i globalnym, zwłaszcza w wielośrodkowych analizach porównawczych, poruszających zagadnienia rozprzestrzeniania się szczepów na dużych obszarach i w dłuższej skali czasowej. Ogromną zaletą metody MLST jest jednoznaczność otrzymywanych wyników i łatwość wymiany danych, uzyskiwanych w laboratoriach na całym świecie. Stosowanie tej metody umożliwiło identyfikację wielu szczególnie niebezpiecznych, pandemicznych klonów rozprzestrzeniających się na całym świecie, często związanych z szerzeniem lekooporności w populacjach drobnoustrojów.

Rząd *Enterobacterales* (od 2016 r. zmiana w taksonomii, dawniej rodzina *Enterobacteriaceae*) składa się z szeregu powszechnie występujących organizmów, kolonizujących przewody pokarmowe ssaków i będących naturalną komensalną mikroflorą jelitową. Przedstawiciele tego rzędu są również oportunistycznymi patogenami powodującymi szereg zakażeń zarówno szpitalnych, jak i poza szpitalnym pochodzeniu. Do najczęstszych infekcji wywoływanych przez te bakterie należy wymienić zakażenia układu moczowego, bakteremie, pozaszpitalne zapalenia płuc oraz zakażenia skóry i tkanki miękkiej. Dwa główne gatunki *Escherichia coli* oraz *Klebsiella pneumoniae* są odpowiedzialne za ogromną liczbę zakażeń układu moczowego w skali całego świata. Szacuje się, że ok. 25% wszystkich zakażeń układu moczowego jest wywoływanych przez *E. coli*, natomiast ok. 15% szpitalnych zakażeń układu moczowego jest powodowane przez *K. pneumoniae*. Dwa wspomniane gatunki są również najczęstszymi, spośród bakterii Gram-ujemnych, przyczynami bakteriemii i sepsy. *E. coli* jest także częstym czynnikiem zakażeń jamy brzusznej lub zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków, a *K. pneumoniae* jednym z kluczowych czynników szpitalnych zapaleń płuc. Pomimo potencjalnie ogromnego zestawu leków antybakteryjnych, które w teorii mogłyby być stosowane w leczeniu zakażeń wywoływanych przez *Enterobacterales*, wiele spośród nich, a w skrajnych przypadkach wszystkie, nie wywołują pożądanego efektu w związku z coraz powszechniejszą wielolekoopornością. Listę potencjalnych leków stanowią przede wszystkim antybiotyki β -laktamowe, od penicylin o szerokim spektrum działania, poprzez cefalosporyny i monobaktamy do karbapenemów, jak również aminoglikozydy, fluorochinolony, tetracykliny oraz kotrimoksazol. Wytwarzanie β -laktamaz, czyli enzymów hydrolizujących antybiotyki β -laktamowe, jest u *Enterobacterales* główną strategią prezentowania oporności na antybiotyki β -laktamowe. Zdecydowana większość *Enterobacterales* wytwarza naturalne β -laktamazy, enzymy hydrolizujące antybiotyki β -laktamowe, o najróżniejszych cechach biochemicznych i reprezentujące różne klasy strukturalne. Wytwarzanie naturalnych β -laktamaz, bez modyfikacji w rejonach promotorowych, podnosi poziom niewrażliwości na antybiotyki β -laktamowe w sposób nieznaczny lub, z punktu widzenia klinicznego, nie zmienia go wcale. W przeciwieństwie do naturalnych enzymów, nabyte β -laktamazy klas A-D odgrywają główną rolę w prezentowaniu oporności na antybiotyki β -laktamowe. Enzymy te bardzo często są ulokowane na plazmidach należących do różnych grup niezgodności, czasami o wysokim potencjale koniugacyjnym i szerokim spektrum gospodarzy. Dodatkowym czynnikiem sprzyjającym rozprzestrzenianiu się oporności na antybiotyki, w tym antybiotyki β -laktamowe, jest klonalne rozprzestrzenienie się mikroorganizmów je wytwarzających. Wyróżnienie wielu takich klonów, często tworzących kompleksy klonalne, które rozprzestrzeniły się na wszystkich kontynentach, odgrywając tym samym kluczową rolę w szerzeniu się oporności na antybiotyki było możliwe dzięki wprowadzeniu schematów MLST

dla różnych gatunków *Enterobacterales*. Prace prowadzone nad strukturami populacji bakterii umożliwiają poszerzenie wiedzy na temat ich biologii, pozwalają zrozumieć podstawy sukcesu epidemicznego oraz dostarczają wskazówek do kontroli ich rozprzestrzeniania.

Przedstawiane osiągnięcie naukowe składa się z dwóch przenikających się części. W pierwszej zostały przedstawione wyniki uzyskane podczas realizacji międzynarodowego projektu EU MOSAR, w drugiej opisano rezultaty molekularnych analiz izolatów nadesłanych do Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD). Uzyskane wyniki w znaczący sposób przyczyniły się do pogłębienia wiedzy na temat struktur populacji badanych gatunków, wyróżnienia dominujących klonów i śledzenia dynamiki zmian zachodzących zarówno w kraju jak i Europie.

Projekt MOSAR (ang. Mastering hOSpital Antimicrobial Resistance) sfinansowany przez Komisję Europejską w ramach 6 Programu Ramowego, miał na celu wieloaspektowe badania rozprzestrzeniania się lekooporności u istotnych klinicznie drobnoustrojów na oddziałach intensywnej opieki medycznej, oddziałach chirurgicznych oraz rehabilitacyjnych zlokalizowanych w wielu krajach Europy i na terytorium Izraela. Jednym z celów projektu była analiza struktur populacji gatunków należących do rodziny *Enterobacteriaceae* (obecnie rząd *Enterobacterales*) niewrażliwych na działanie cefalosporyn o rozszerzonym spektrum substratowym wraz z molekularną analizą determinant oporności. Badaniem zostali objęci pacjenci 13 oddziałów intensywnej opieki medycznej zlokalizowanych w szpitalach we Francji (3 szpitale), Grecji (2), Hiszpanii (1), Luksemburgu (1), Łotwie (1), Portugalii (2), Słowenii (2) i Włoszech (1), oraz pięciu oddziałów rehabilitacyjnych z Francji (2 szpitale), Hiszpanii (1) i Izraela (2 szpitale). Od połowy 2008 do połowy 2011 roku wszystkim 17945 pacjentom przyjmowanym na wymienione oddziały zostały pobrane wymazy z odbytu w kierunku nosicielstwa d. *Enterobacteriaceae* i były one powtarzane regularnie podczas hospitalizacji i w momencie wypisu. Pobrany materiał był następnie wysiewany na podłoża chromogenne w kierunku bakterii wytwarzających ESBL i interpretowane zgodnie z instrukcją producenta. Materiał zinterpretowany jako d. *Enterobacteriaceae* odporne na cefalosporyny o rozszerzonym spektrum substratowym (n=8230) został przesłany do Narodowego Instytutu Leków w celu dalszych badań molekularnych. W ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego przedstawiono prace dotyczące następujących gatunków: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* i *Klebsiella oxytoca*, jak również omówiono analizę wszystkich zidentyfikowanych izolatów wytwarzających metallo- β -laktamazy typu VIM.

Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD), wchodzący w struktury Narodowego Instytutu Leków, w ramach działalności referencyjno-diagnostycznej i monitorującej wykonuje m. in. badania potwierdzenia istotnych mechanizmów oporności zarówno metodami fenotypowymi jak i molekularnymi dla laboratoriów i szpitali z terenu całej Polski. Przeprowadzane są również typowania metodami biologii molekularnej szczepów pochodzących w ognisk epidemii szpitalnych i pozaszpitalnych z opracowywaniem ekspertyz dla celów epidemiologicznych, jak również monitorowaniem rozprzestrzeniania się w środowisku szpitalnym i pozaszpitalnym wieloopornych szczepów bakteryjnych tzw. patogenów alarmowych istotnych z punktu widzenia klinicznego i epidemiologicznego. W skład opisywanego osiągnięcia naukowego

zostały włączone dwie prace opisujące analizy struktur populacji *Enterobacterales* wytwarzających karbapenemazy typu VIM/IMP MBL z lat 2006-12 oraz typu OXA-48/181 z lat 2013-17 nadesłanych do KORLD w celu potwierdzenia mechanizmów oporności.

Publikacja 1. – Clonal structure, extended-spectrum β -lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries.

Tytuł polski: Struktura klonalna izolatów *Escherichia coli* wytwarzających cefalosporynazy o rozszerzonym spektrum substratowym oraz nabyte AmpC, kolonizujących pacjentów oddziałów rehabilitacyjnych zlokalizowanych w czterech krajach.

Omawiana publikacja jest pierwszą z cyklu prac zrealizowanych w ramach projektu EU MOSAR ukierunkowanego na nosicielstwo *Enterobacteriaceae* opornych na cefalosporyny o rozszerzonym spektrum substratowym. Celem omawianego manuskryptu była analiza klonalna izolatów *Escherichia coli* zebranych od pacjentów oddziałów rehabilitacyjnych kilku europejskich szpitali oraz z Izraela, wraz z charakterystyką wytwarzanych przez nie β -laktamaz.

Badaniem objęto 376 izolatów *E. coli* zebranych w latach 2008-09 od pacjentów pięciu szpitali zlokalizowanych we Francji (n=31 pacjentów), Hiszpanii (n=32), Włoszech (n=108) i Izraelu (dwa szpitale oznaczone jako LH n=64 i TA=141). Wszystkie izolaty zostały poddane analizie PFGE. Na podstawie uzyskanych wyników, 240 izolatów reprezentujących główne typy PFGE oraz po kilka izolatów reprezentujących najliczniejsze typy, zostało poddanych analizie MLST umożliwiającej wyróżnienie 76 typów sekwencyjnych (ST). Wskaźnik zróżnicowania klonalnego badanej populacji został określony na poziomie 81,9% (z przedziałem ufności 77,9%-85,8%) i różnił się w zależności od ośrodka: 73,8% (64,3%-83,2%) we Włoszech, 80,9% (74,8%-87,0%) w szpitalu TA w Izraelu, 83,0% (69,4%-96,2%) we Francji, 86,0% (79,6%-92,4%) w szpitalu LH w Izraelu oraz 91,3% (85,4%-97,3%) w Hiszpanii. Uzyskane wyniki pokazały znaczące zróżnicowanie w strukturze klonalnej *E. coli* w zależności od ośrodka, z większym rozprzestrzenieniem spokrewnionych izolatów we Włoszech i Izraelu (szpital TA) oraz wskazały na wysoką różnorodność genetyczną badanej grupy izolatów w Hiszpanii.

W przynajmniej dwóch szpitalach umiejscowionych w różnych krajach scharakteryzowano 22 ST skupiające 292 izolaty (77,7%). Spośród 10 ST zaobserwowanych w co najmniej trzech szpitalach, siedem liczyło 10 lub więcej reprezentantów. Do ST10, ST38, ST69, ST131, ST405, ST410 i ST648 przyporządkowano 245 izolatów (65,2%). ST131 (n=155; 41,2%) okazał się być najliczniej reprezentowanym typem sekwencyjnym, w różnej skali dominującym w każdym z badanych ośrodków, od 25,0% w Hiszpanii, 32,8% i 41,1% w Izraelu (szpitale LH i TA), 41,9% we Francji do 50,9% we Włoszech. Dodatkowo, pojedynczy izolat z Włoch, prezentował nowy typ sekwencyjny ST1827 po raz pierwszy opisany w omawianej pracy, będący wariantem ST131 w pojedynczym allelu (ang. single locus variant, SLV). Izolaty ST131 i ST1827 tworzyły, najliczniejszy w badanej populacji, kompleks klonalny (CC) 131. ST131 budził już wcześniej szczególne zainteresowanie wielu

badaczy ze względu na powszechne, globalne występowanie i częste wytwarzanie CTX-M-15. Częstość jego występowania w Hiszpanii oraz Francji i Włoszech była zgodna z wcześniejszymi doniesieniami, natomiast dane z Izraela były pierwszymi tego rodzaju i jednymi z pierwszych z rejonu Środkowego Wschodu. ST10 był znacznie mniej licznie reprezentowany (n=19; 5,1%), ale podobnie jak ST131, występował we wszystkich szpitalach. ST10 wraz z ST48, ST167, ST617, ST744, ST1488, ST1830, ST1831 i ST2519 tworzył CC10 grupujący 34 izolaty (9,0%). Cztery spośród nich ST1488 i ST1831 (Włochy), ST1830 (Hiszpania) oraz ST2519 (Izrael szpital LH) zostały po raz pierwszy scharakteryzowane podczas realizacji projektu. Trzy spośród wymienionych zostały zidentyfikowane w szpitalu w którym stwierdzono występowanie ich wcześniej znanych SLV, co mogłoby sugerować ewolucję ST w danym szpitalu. Występowanie ST10 i jego rola w rozprzestrzenianiu oporności były wcześniej raportowane w Hiszpanii, Włoszech, Egipcie i Kanadzie. Pięćdziesiąt cztery ST, w tym 16 nowych, zostało zidentyfikowanych w zaledwie jednym szpitalu. Stanowiły one 22,6% wszystkich izolatów (n=84), ze szczególnym udziałem w Hiszpanii (40,6%) i Francji (32,3%). Niektóre spośród nich odgrywały lokalnie znaczącą rolę np. ST156 (12,5%) i ST393 (9,4%) w Hiszpanii oraz ST372 (9,2%) i ST398 (6,4%) w Izraelu (szpital TA), będąc jednocześnie pośrednią przyczyną różnorodności badanych populacji.

Najliczniej reprezentowane klonów *E. coli* o szerokim zasięgu rozpowszechnienia prezentowały wiele typów PFGE, również w pojedynczych ośrodkach. Niektóre spośród nich tworzyły większe liczebnie grupy, sięgające powyżej 5% izolatów w ośrodku i osiągające maksymalne wartości przekraczające 20% we Włoszech i Izraelu. Najbardziej zróżnicowany pod tym względem był ST131 reprezentowany przez 5-7 typów PFGE pochodzących z poszczególnych ośrodków we Francji, Hiszpanii i Izraelu (szpital TA), 13 typów z drugiego izraelskiego szpitala oraz 19 typów z Włoch. Różnorodność wzorów rozdziału elektroforetycznego wspomnianych typów osiągało wartości nawet poniżej 60% podobieństwa. Heterogenność typów PFGE ST131 była już wcześniej obserwowana, i najprawdopodobniej związana jest z długotrwałą ewolucją klonu, prowadzącą do wyróżnienia kilku linii klonalnych o możliwym zwiększonym potencjale epidemicznym. Podobnie, sukces ewolucyjny niektórych typów PFGE ST10, ST69 i ST648 występujących w poszczególnych ośrodkach, mógł być związany ze zwiększoną ich wirulencją w połączeniu z nabytą opornością na antybiotyki.

Zdecydowana większość analizowanych izolatów *E. coli* wytwarzała β -laktamazy typu ESBL (n=356; 94,7%), i wliczając dwa izolaty wytwarzające dwa enzymy, byli to przedstawiciele rodzin CTX-M (n=303; 79,9%), SHV (n=51; 13,5%) i TEM (n=4; 1,1%). Częstość występowania enzymów CTX-M była różna w zależności od ośrodka, od 66,7% w Hiszpanii, 69,2% i 77,3% w Izraelu, 78,1% we Francji do 94,4% we Włoszech. Reprezentowane one były przez cztery grupy CTX-M-1, -2, -9 i -25, z 1-5 wariantami. Grupy CTX-M-1 i CTX-M-9 były najliczniejsze i występowały powszechnie (odpowiednio 50,1% i 23,5%). Najliczniej scharakteryzowanym enzymem był CTX-M-15 produkowanym przez 154 izolaty należące do 29 klonów (40,6% spośród wszystkich enzymów). Częstość występowania CTX-M-15 różniła się znacząco w zależności od ośrodka, wahając się 60,2% we Włoszech od 12,1% w Hiszpanii. W tym ostatnim kraju najliczniej reprezentowany był CTX-M-14 (39,4%). Ciekawym spostrzeżeniem było porównanie częstości występowania i

dystrybucji klonów wytwarzających CTX-M-27 i CTX-M-1, obecnych w trzech ośrodkach i liczących odpowiednio 42 i 30 producentów (11,1% i 7,9% spośród wszystkich enzymów). CTX-M-27 był najliczniej charakteryzowanym enzymem w jednym ze szpitali izraelskich (TA; 24,8%), wytwarzanym przez zaledwie trzy ST, podczas gdy CTX-M-1 był powszechny w ośrodku włoskim (23,1%) był związany z 26 klonami. Powyższe spostrzeżenia ukazały powszechne rozprzestrzenienie enzymów CTX-M, ze szczególnym uwzględnieniem CTX-M-15 i CTX-M-14, obserwowane wcześniej w ostatnich latach w różnych rejonach świata. Enzymy SHV (cztery warianty) najliczniej reprezentowane były wśród izolatów z Hiszpanii (27,3%) i Izraela (szpital TA; 17,7%), podczas gdy enzymy TEM (dwa warianty) występowały jedynie we Francji, w kraju w którym w przeszłości doszło do intensywnego ich rozprzestrzenienia. β -laktamazy typu AmpC zostały zidentyfikowane w niewielkiej liczbie izolatów (n=21; 5,6%) i były to enzymy typu CMY-2 (n=20; 5,3%) oraz DHA-1 (n=1; 0,3%). Enzymy typu CMY-2 były oprócz CTX-M-15 i CTX-M-14, jedynymi β -laktamazami obecnymi we wszystkich ośrodkach.

Analiza porównawcza klonów cechujących się dużym rozpowszechnieniem i wytwarzanych przez nie β -laktamaz, wykazała brak ścisłej korelacji. Przedstawiciele poszczególnych klonów wytwarzali różne β -laktamazy, jednak można było zaobserwować związek pomiędzy typem PFGE i wytwarzaną β -laktamazą. U ST131 zostało zidentyfikowanych 10 różnych β -laktamaz, z dominacją CTX-M-15 (58,7% izolatów ST131), jednakże przedstawiciele poszczególnych podtypów PFGE (izolaty prezentujące identyczne wzory rozdziału elektroforetycznego) wytwarzali jeden wariant enzymu. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia o pandemicznych klonach *E. coli* i ich niezależnym rozprzestrzenianiu, oraz lokalnym nabywaniu plazmidów z genami oporności będących dodatkowym wzmocnieniem i czynnikiem ułatwiającym dalszą ekspansję.

Podsumowując, omawiana praca była jedną z większych międzynarodowych analiz populacji *E. coli* w chwili jej publikowania, ukazującą kompleksowy obraz epidemiologii *E. coli* z uwzględnieniem wielu podobieństw i różnic pomiędzy ośrodkami reprezentującymi trzy europejskie kraje i Izrael. Do podobieństw należy zaliczyć niewątpliwie występowanie klonów o zasięgu globalnym, głównie ST131, i dominację enzymów typu ESBL, głównie CTX-M-15 i CTX-M-14. Z drugiej strony, lokalne populacje różniły się między sobą w sposób zasadniczy, składając się w połowie z ST nie widzianych w innych ośrodkach. Na podstawie otrzymanych wyników wyróżniono kilka wariantów klonów, które mogą stać się w przyszłości liniami filogenetycznymi o potencjalnie istotnym znaczeniu klinicznym.

Publikacja 2. – Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries.

Tytuł polski: Analiza porównawcza populacji izolatów *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających cefalosporynazy o rozszerzonym spektrum substratowym, kolonizujących pacjentów oddziałów rehabilitacyjnych zlokalizowanych w czterech krajach.

Celem omawianej pracy była analiza klonalna izolatów *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających ESBL lub AmpC, zebranych podczas realizacji projektu EU MOSAR, pochodzących z nosicielstwa jelitowego pacjentów pięciu oddziałów rehabilitacyjnych zlokalizowanych w czterech krajach.

Dwieście dwadzieścia dziewięć izolatów *K. pneumoniae* z lat 2008-09 reprezentowało Francję (n=19), Hiszpanię (n=25), Włochy (n=41) i Izrael (dwa szpitale oznaczone jako LH n=26 i TA=118). Wszystkie izolaty zostały poddane analizie PFGE, a izolaty reprezentujące wyróżnione na tej podstawie typy i podtypy PFGE zostały skierowane do analizy MLST. Na tej podstawie scharakteryzowano 56 typów sekwencyjnych (ST) spośród których 17 okazało się być nowymi: ST378, ST483-485, ST630, ST833-836, ST843-846, ST869, ST904, ST906 i ST910. Porównanie wyników analiz PFGE i MLST potwierdziło wcześniejsze doniesienia o dobrej korelacji zastosowanych metod, z jednoczesnym wskazaniem na technikę PFGE prezentującą wyższą siłę rozdzielczą. Analiza eBURST wszystkich 1001 ST zdeponowanych w bazie danych *K. pneumoniae* MLST (sierpień 2012r.) ukazała relacje pokrewieństwa i przynależność klonalną poszczególnych ST badanej kolekcji. Trzydzieści ST, reprezentujące 138 izolatów, zostało zaklasyfikowanych do jednego centralnego kompleksu klonalnego (CC), składającego się z 319 (31,9%) znanych ST. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, pojedyncze CC zawierające powyżej 25% znanych ST powinny ulec rozgrupowaniu na mniejsze grupy. Tworzenie dużych, nieprawdziwych CC związane jest z powstawaniem tzw. polifiletycznych grup, powstałych w wyniku transferu DNA i rekombinacji pomiędzy pokrewnymi i niespokrewnionymi ST. W takich przypadkach przyjęto rozdzielać sztuczny CC na grupy klonalne (CG), składające się z centralnego ST oraz jego warianty w pojedynczym allelu (ang. single locus variant, SLV) i w dwóch allelach (ang. double locus variant, DLV). Przyjmując wspomnianą zasadę, 30 ST wchodzące w skład fałszywego CC zostało przyporządkowanych do 12 CG: wyróżnionych wcześniej CG15, CG17, CG39, CG65, CG101 i CG258, o zmienionych centralnych genotypach CG35, CG37 i CG485, oraz nowo zaproponowanych CG22, CG76 i CG292. Spośród pozostałych ST, dziewięć skupiających 71 izolatów (31,0%) zostało zaklasyfikowanych do sześciu kompleksów klonalnych: CC34, CC42, CC147, CC221, CC611 i CC656. Siedemnaście pozostałych ST zostało sparowanych z pojedynczym SLV lub nie tworzyło żadnych grup.

Jedenaście ST było reprezentowane przez przynajmniej pięć izolatów ($n_{\max}=26$) w przynajmniej dwóch szpitalach, grupując 158 izolatów (69,0%). Należały one do dziewięciu CG lub CC w większości opisywanych wcześniej jako globalne genotypy: ST15 (CG15), ST16 i ST20 (CG17), ST37 (CG37), ST45 (CG485), ST101 (CG101), ST147 i ST392 (CC147), ST327 (CG35), ST383 (CC42) oraz ST833 (CG258). Dodatkowo, trzy kolejne ST reprezentowane przez 2-3 izolaty były widziane w dwóch placówkach. Czterdzieści dwa ST skupiające 64 izolaty (27,9%) zidentyfikowano w pojedynczych placówkach. W grupie tej występowały również genotypy o zasięgu globalnym, na czele z ST11 (CG258; Hiszpania). Udział ST charakterystycznych dla pojedynczych ośrodków różnił się znacząco w zależności od kraju, od 4,9% we Włoszech do 64,0% w Hiszpanii. Obecność nowych ST stwierdzono we wszystkich ośrodkach.

Cztery spośród CG/CC były reprezentowane przez wyraźnie większą liczbę izolatów, szczególnie w niektórych lokalizacjach. Izolaty należące do CG15 występowały we wszystkich szpitalach i stanowiły najliczniejszą zidentyfikowaną grupę klonalną (n=33;

14,4%). Spośród czterech ST reprezentujących tę grupę: ST15, ST277, ST326 i ST709, dominującym był ST15 (n=25) będąc jednocześnie jedynym ST obecnym we wszystkich ośrodkach. Przedstawiciele CG15 (ST15 i ST326) stanowili najliczniejszą grupę w hiszpańskim ośrodku (48,0%), ukazując tym samym znacząco wyższą częstość występowania, w porównaniu z danymi raportowanymi przez inne grupy z tego kraju w analogicznym okresie czasu. Największą grupę izolatów w omawianym badaniu tworzyły izolaty sklasyfikowane w CC147 (n=42; 18,3%) występujące w czterech szpitalach. Grupę tworzyły ST147 i ST392, opisane głównie w izraelskich ośrodkach, gdzie stanowiły najliczniejszą grupą klonalną (26,9-28,0%). W chwili pisania manuskryptu, ST147 był często wiązany z opornością na karbapenemy ale nie odnotowano jego występowania w Izraelu. Kolejną znaczącą grupę, CG17, skupiającą sześć genotypów: ST16, ST17, ST20, ST630, ST676 i ST845, zaobserwowano w czterech szpitalach, w tym w ośrodku francuskim gdzie stanowiła dominującą grupę (42,1%). W przeszłości, CG17 była jedną z głównych grup związanych z wytwarzaniem ESBL w Kandzie, jak również była obserwowana w wielu innych zakątkach świata. ST101 zaobserwowano jedynie w dwóch ośrodkach, z ogromną dominacją we włoskim szpitalu (58,5%), w kraju w którym wspomniany ST był już wcześniej opisywany.

Dwieście dwadzieścia sześć (98,7%) izolatów wytwarzało ESBL należące do trzech rodzin: CTX-M (n=202; 88,2%), SHV (n=22; 9,6%) i TEM (n=2; 0,9%). Częstość występowania ESBL typu CTX-M była różna w zależności od ośrodka i wahała się między 63,2% we Francji a 97,5% we Włoszech. Stwierdzono występowanie 8 wariantów należących do wszystkich znanych pięciu podgrup CTX-M: -1, -2, -8, -9 i -25. Podgrupa CTX-M-1 była najliczniej reprezentowana (n=180; 78,6%), z najczęściej występującym przedstawicielem CTX-M-15 (n=175; 76,4%), potwierdzonym u izolatów pochodzących ze wszystkich ośrodków, z bardzo dużą różnicą częstości występowania w zależności od kraju, od 52,6% we Francji do 92,7% we Włoszech. Obecność CTX-M-15 została stwierdzona u 27 ST. Obecność enzymów SHV, najliczniejsze SHV-5 i SHV12, został potwierdzona we wszystkich krajach, natomiast β -laktamazy typu AmpC zostały wyróżnione u trzech izolatów i były to CMY-2 (n=2; 0,9%) oraz DHA-1 (n=1; 0,5%). Izolaty reprezentujące ST o licznym udziale w badanej populacji lub szeroko rozpowszechnione wytwarzały od dwóch do czterech różnych enzymów. Obserwacja ta była zgodna z wcześniejszymi doniesieniami o rozprzestrzenianiu się enzymów CTX-M, w szczególności CTX-M-15 często przypisywanemu rozprzestrzenianiu się plazmidów niosących geny *bla*_{CTX-M-15}, jak również rozprzestrzenianiu się klonalnemu. Brak bezpośredniej korelacji pomiędzy klonami a wytwarzanymi przez nie β -laktamazami ukazał niezależne rozprzestrzenianie się klonów oraz lokalne nabywanie genów β -laktamaz. Obserwacja ta była wcześniej podkreślana w przypadku *E. coli*, natomiast postulat związany z *K. pneumoniae* był znacznie mniej udokumentowany.

Podsumowując, omawiana publikacja była jedną z pierwszych międzynarodowych i kompleksowych prac opisujących, z wykorzystaniem techniki MLST, populacje *K. pneumoniae* wytwarzającej ESBL izolowane w ośrodkach rehabilitacyjnych. Wieloośrodkowy materiał ukazał niezwykłą różnorodność organizmów kolonizujących pacjentów, pozwolił wyróżnić międzynarodowe klony, podkreślił różnorodność β -laktamaz związanych z niewrażliwością na cefalosporyny o rozszerzonym spektrum substratowym oraz umożliwił zaobserwowanie różnic pomiędzy ośrodkami. Uzyskane dane w znaczący sposób

przyczyniły się do uaktualnienia wiedzy o międzynarodowych klonach i ich cyrkulacji w Europie i Izraelu, jak również pozwoliły poznać klony o istotnym znaczeniu lokalnym, wskazując miejscowym zespołom kontroli zakażeń wskazówki do ograniczenia ich rozprzestrzeniania.

Publikacja 3. – MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*.

Tytuł polski: Wyróżnione metodą MLST międzynarodowe klony tzw. wysokiego ryzyka *Enterobacter cloacae*.

Impulsem do rozpoczęcia prac nad poznaniem struktury klonalnej kompleksu *Enterobacter cloacae* w Europie było opracowanie w 2013 roku schematu MLST przez badaczy z Japonii. Metoda MLST stała się w ostatnich latach podstawową metodą służącą do wyróżniania klonów bakteryjnych różnych gatunków, obserwowania wewnątrzgatunkowej zmienności i śledzenia geograficznego rozprzestrzeniania istotnych klinicznie klonów czy grup klonalnych. Schemat MLST kompleksu *E. cloacae* opracowany został na pięciu szczepach wzorcowych m.in. z kolekcji ATCC a następnie przetestowany na izolatach klinicznych pochodzących wyłącznie z Japonii. Z tego też powodu wiedza o molekularnej epidemiologii kompleksu *E. cloacae* w momencie prezentacji schematu była bardzo ograniczona. Dodatkowo autorzy nie porównali opracowanego schematu z innymi metodami typowania molekularnego, nie przedstawiając tym samym środowisku naukowemu dowodów na prawidłowe opracowanie metody. Celem omawianej publikacji była ewaluacja metody MLST poprzez porównanie z referencyjną metodą PFGE, oraz przeprowadzenie analizy klonalnej międzynarodowej kolekcji *E. cloacae* wraz z charakterystyką wytwarzanych β -laktamaz.

Materiałem badawczym omawianej pracy była kolekcja 195 izolatów klinicznych, pochodzących z nosicielstwa jelitowego, zebranych podczas realizacji projektu EU MOSAR od pacjentów siedmiu oddziałów intensywnej opieki medycznej zlokalizowanych we Francji, Grecji, Luksemburgu, Łotwie, Słowenii i Włoszech oraz pięciu oddziałów rehabilitacyjnych z Francji, Hiszpanii, Włoch i Izraela. W wyniku przeprowadzonej analizy klonalnej wyróżniono 88 typów sekwencyjnych (ST) z czego 77 zostało po raz pierwszy scharakteryzowane w tej pracy. Nowe typy sekwencyjne: ST85, ST86, ST88, ST90, ST92, ST93, ST98, ST105-171 oraz ST187-189 zostały zdeponowane w bazie danych *E. cloacae* MLST (<https://pubmlst.org/ecloacae/>) i w chwili zakończenia projektu stanowiły największą grupę zgłoszoną przez pojedynczą grupę badawczą (ok. 32%; maj 2014). Wskaźnik zróżnicowania klonalnego badanej populacji został określony na poziomie 97,5% (z przedziałem ufności 96,6%-98,4%), wskazując na wysoką różnorodność genetyczną. Uzyskane wyniki ukazały korelacje opracowanego schematu MLST z metodą PFGE tzw. „złotym standardem” typowania molekularnego, ze wskazaniem na PFGE jako metodę o większej sile różnicującej, rozdzielając dwadzieścia dwa spośród wyróżnionych ST na 2-6 pulsotypów PFGE. Analiza eBURST wszystkich znanych 241 ST zdeponowanych w bazie danych *E. cloacae* MLST (Maj 2014r.) pozwoliła na określenie stopnia ich pokrewieństwa i wyróżnienie 53 ST (60,2%)

niespokrewnionych z żadnym innym znanym ST, 8 ST (9,1%) posiadających jeden blisko spokrewniony ST (ang. single-locus variant, SLV), oraz 27 ST (30,7%) zaszeregowanych w 13 grup, w tym 5 podniesionych do rangi kompleksów klonalnych (ang. clonal complex, CC) liczących 3-14 ST. Pięć CC skupiało 76 (39,0%) badanych izolatów reprezentowanych przez 13 ST zidentyfikowanych w przynajmniej czterech krajach. Do najliczniej reprezentowanego w badanej populacji CC74 zostało sklasyfikowanych 21 izolatów z sześciu szpitali na terenie Francji, Łotwy, Włoch i Izraela reprezentujących ST78 (n=20) i ST86 (n=1) oraz dodatkowo 10 ST z bazy danych pochodzących z Francji i Japonii. Kompleks CC114 tworzyły 23 izolaty z Francji, Grecji, Hiszpanii, Włoch i Izraela o ST66 (n=10) i ST114 (n=13) oraz dodatkowo 4 ST z Francji i Japonii. Kolejną grupę, CC234, formowało 14 izolatów z 7 szpitali z Francji, Łotwy, Hiszpanii, Włoch i Izraela reprezentujących ST45 (n=3), ST50 (n=6), ST107 (n=1), ST112 (n=1) i ST124 (n=2) oraz dziewięć innych ST z Francji, Japonii i Zjednoczonych Emiratów Arabskich. Dwa kolejne wyróżnione kompleksy klonalne CC182 i CC133 tworzyły po trzy izolaty z odpowiednio Grecji, Łotwy i Włoch oraz Grecji i Izraela, a także po 4 ST z bazy danych. Na uwagę zasługują jeszcze bardzo licznie reprezentowany w badanej populacji ST108 (n=11) z Francji, Grecji, Luksemburga i Włoch oraz grupa klonalna ST118-ST145-ST152 (odpowiednio n=4, n=2 i n=1) z Francji, Luksemburga, Łotwy i Izraela. Porównanie składu grup eBURST z liniami filogenetycznymi wyróżnionymi na podstawie analizy konkatamerów sekwencji alleli MLST wykazała pełną korelację, grupując ST reprezentujące poszczególne grupy eBURST w odpowiednie linie filogenetyczne z wyraźnym bliskim ulokowaniem par SLV. Szerokie rozpowszechnienie wyróżnionych ST wraz z ich grupami klonalnymi, wskazywało na potencjalnie epidemiczny a nawet pandemiczny ich charakter, jak to miało miejsce w przypadku niektórych klonów *K. pneumoniae* i *E. coli*.

Fenotyp nadprodukcji AmpC, związany z derepresją, był prezentowany przez 101 izolatów, z pośród których 95 (48,7%) o 66 ST nie wytwarzało innych β-laktamaz związanych z opornością na cefalosporyny o rozszerzonym spektrum substratowym. Takie izolaty dominowały (ponad 75%) w jednym francuskim i dwu greckich szpitalach. Pozostałe 100 izolatów, wliczając w to sześć z nadprodukcją AmpC, o 38 ST wytwarzało ESBL (n=96; 49,2% wszystkich izolatów), oraz karbapenemazy typu MBL (n=6; 3,1%) i KPC (n=3; 1,5%). Dwadzieścia dwa izolaty wytwarzały dwie a nawet trzy wspomniane β-laktamazy. Spośród ESBL najliczniej reprezentowane były enzymy typu CTX-M (n=74; 77,1% izolatów z ESBL) z CTX-M-15 (n=58; 60,4% izolatów z ESBL; 15 ST w siedmiu krajach) z sześcioma innymi wariantami. Enzymy typu SHV (n=32; 33,3% izolatów z ESBL) ograniczały się do czterech wariantów z dominującym SHV-12 (n=24; 25,0% izolatów z ESBL; 15 ST w sześciu krajach) i nowym wariantem SHV-183 opisanym w ST62 ze Słowenii. ESBL typu TEM zostały zidentyfikowane w dwóch przypadkach. Sześć izolatów MBL, prezentujących różne ST, pochodziło z Grecji, Łotwy i Włoch i wytwarzało karbapenemazę VIM-1. Trzy izolaty KPC-dodatnie o różnych ST pochodziły wyłącznie z Izraela i wytwarzały karbapenemazę KPC-2. Obserwacje te pokazały, że mimo długotrwałego rozprzestrzeniania się mechanizmów ESBL, derepresja AmpC pozostawała równie ważnym mechanizmem oporności na cefalosporyny o rozszerzonym spektrum substratowym u przedstawicieli kompleksu *E. cloacae*. Wykazały również, brak ścisłej korelacji pomiędzy wytwarzanymi β-laktamazami, a przynależnością do najliczniej i powszechnie rozprzestrzenionych klonów. Sugerowało to, podobnie jak w

przypadku *K. pneumoniae* i *E. coli*, rozprzestrzenianie się niezależne klonów kompleksu *E. cloacae* i lokalne nabywanie plazmidów z genami kodującymi różne typy β -laktamaz.

Podsumowując, wyniki uzyskane podczas realizacji opisywanego projektu stały się podstawą do poznania struktury klonalnej kompleksu *E. cloacae* opartej o międzynarodowe dane. Analiza pozwoliła na wyróżnienia kilku grup pokrewieństwa, które ze względu na międzynarodowe rozprzestrzenienie nazwano kompleksami klonalnymi. Praca stała się podstawą nomenklatury klonów kompleksu *E. cloacae*, będąc punktem wyjściowym wielu innych opracowań. W późniejszych latach badania wielu grup doprowadziły do znacznego poszerzenia wiedzy na temat struktury klonalnej omawianego drobnoustroju, jednakże zaproponowany podział i nazewnictwo CC nie uległo zasadniczym zmianom. Analiza filogenetyczna oparta na konkatamerach alleli MLST pozwoliła na wyróżnienie kilku grup, skupiających blisko spokrewnione ze sobą izolaty, pokazując prawdopodobne zróżnicowanie gatunkowe w obrębie kompleksu *E. cloacae*. Dopiero rozwój i rozpowszechnienie techniki sekwencjonowania genomowego (WGS), umożliwił wyróżnienie nowych gatunków i podgatunków w pełni korelujących z opisanymi kompleksami klonalnymi. Znaczenie przeprowadzonej analizy i wprowadzenie nomenklatury klonów znalazło odzwierciedlenie w dużej liczbie cytowań omawianej pracy.

Publikacja 4. – Survey of metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* colonizing patients in European ICUs and rehabilitation units, 2008-11.

Tytuł polski: Analiza wytwarzających metalo- β -laktamazy izolatów *Enterobacteriaceae* kolonizujących pacjentów wybranych europejskich oddziałów intensywnej opieki medycznej i rehabilitacyjnych w latach 2008-11.

Celem omawianej pracy była analiza klonalna kolekcji szczepów *Enterobacteriaceae* wytwarzających karbapenemazy typu MBL zebranych podczas realizacji projektu EU MOSAR wraz z molekularną charakterystyką struktur genetycznych zawierających geny warunkujące ten mechanizm oporności.

Materiałem wyjściowym omawianej pracy były izolaty pochodzące z nosicielstwa w przewodzie pokarmowym pacjentów hospitalizowanych w siedmiu oddziałach intensywnej opieki medycznej (OIOM) we Francji (2 szpitale), Grecji (2), Łotwie, Portugalii i Włoszech, oraz dwóch oddziałach rehabilitacyjnych w Hiszpanii i Włoszech. Od 91 skolonizowanych pacjentów zostały wyhodowane 94 izolaty, w tym od trzech pacjentów po dwóch różnych producentów MBL. Sześćdziesięciu dwóch (68,1%) pacjentów pochodziło z greckich oddziałów OIOM, gdzie 52 pacjentów skolonizowanych MBL *Enterobacteriaceae* stanowiło 9,3% wszystkich badanych. Wśród izolatów wytwarzających MBL wyróżniono dziewięć gatunków i kompleksów gatunkowych: *Klebsiella pneumoniae* (n=65; 69,1%), *Enterobacter cloacae* (n=9; 9,6%), *Citrobacter freundii* (n=7; 7,4%), *Escherichia coli* (n=5; 5,3%), *Proteus mirabilis* (n=2; 2,1%), *Enterobacter aerogenes* (n=2; 2,1%), *Klebsiella oxytoca* (n=2; 2,1%), *Enterobacter asburiae* (n=1; 1,1%) i *Providencia stuartii* (n=1; 1,1%). Dominująca pozycja *K. pneumoniae* wynikała z rozprzestrzenienia się tego gatunku z mechanizmem MLB w Grecji (n=57; 89,1% spośród wszystkich izolatów w tym kraju). Wszystkie izolaty *K.*

pneumoniae analizowane w omawianej pracy prezentowały dziewięć ST, spośród których siedem zostało zidentyfikowanych wyłącznie w Grecji. Najliczniej reprezentowany był ST147 (n=30), podobnie jak ST383 (n=7), obecne w obu greckich szpitalach. Pozostałe ST występowały w jednym z greckich szpitali: ST36 (n=13), ST17 (n=3), ST427 (n=2), ST323 (n=1) i ST29 (n=1). ST252 występował w dwóch krajach, w Hiszpanii (n=3) i Portugalii (n=1), natomiast ST1067, po raz pierwszy opisany podczas realizacji omawianego projektu i należący do globalnego kompleksu klonalnego CG101, we Francji (n=4). Izolaty kompleksu *E. cloacae* reprezentowały siedem ST, każdy obecny wyłącznie w jednym spośród trzech ośrodków: w Grecji (ST88 i ST98), na Łotwie (ST85 i ST87) lub we Włoszech (ST86, ST114 i ST134). Spośród wymienionych ST kompleksu *E. cloacae*, po raz pierwszy opisany w omawianej pracy został ST87, natomiast pierwsza informacja o pozostałych ST znalazła się w Publikacji 3 omawianego osiągnięcia naukowego. Pięć izolatów *E. coli* z Francji i Włoch prezentowało różne ST, włączając w to ST410 będący reprezentantem pandemicznego kompleksu klonalnego CC23. Wszystkie zidentyfikowane ST *C. freundii* (ST9, ST16-19 z Grecji i Łotwy) oraz *K. oxytoca* (ST137 z Hiszpanii) były wcześniej nieznanymi i informacje o nich zostały zdeponowane w odpowiednich bazach danych. Uzyskane wyniki ukazały różnorodność gatunkową i klonalną MBL CPE w badanych ośrodkach, ze szczególną rolą rozprzestrzenienia klonalnego *K. pneumoniae* ST147 w Grecji.

Wszystkie izolaty, z wyjątkiem jednego, wytwarzały karbapenemazy MBL typu VIM-1. Jedynym wyjątkiem był szczep *K. pneumoniae* ST252 z Portugalii który okazał się być producentem karbapenemazy IMP-8 i został opisany w publikacji nie wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego (Papagiannitsis CC, Izdebski R, Baraniak A, Fiett J, Herda M, Hrabák J, Derde LP, Bonten MJ, Carmeli Y, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Gniadkowski M. Survey of metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae colonizing patients in European ICUs and rehabilitation units, 2008-11. J Antimicrob Chemother. 2015 Jul;70(7):1981-8.). W izolatach z Grecji wyróżniono pięć genów typu *bla*_{VIM}: *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-12}, *bla*_{VIM-19}, *bla*_{VIM-26} oraz *bla*_{VIM-39}. Wśród izolatów pochodzących z pozostałych krajów stwierdzono występowanie jedynie *bla*_{VIM-1}. VIM-39 został po raz pierwszy opisany w omawianej pracy i różnił się od VIM-1 dwoma substytucjami aminokwasowymi Thr35Ala i His201Leu. Geny typu *bla*_{VIM} były zlokalizowane na siedmiu typach integronów, spośród których cztery były identyfikowane głównie w Grecji. Najliczniej reprezentowany był integron typu In-e541 (n=53; 56,4%) występujący u różnych gatunków o różnych ST. Klasyczna struktura integronu z układem kaset *bla*_{VIM-1}-*aacA7*-*dfrA1*-*aadA1* została zidentyfikowana w jednym greckim izolacie *C. freundii* ST18. Najliczniej reprezentowanymi wariantami typu In-e541 były klasyczne układy kaset z delecją genu Δ *aadA1* (n=26), wśród których warianty z kasetami *bla*_{VIM-26} (n=4) oraz *bla*_{VIM-39} (n=1) zostały opisane w omawianej pracy po raz pierwszy i występowały jedynie u *K. pneumoniae* ST147 w Grecji. Kolejny wariant In-e541 z kasetą *bla*_{VIM-26} i klasycznym układem pozostałych kaset (n=13) został wyróżniony u *K. pneumoniae* ST36 w jednym greckich szpitali. Ostatni z wariantów In-e541 o klasycznym układzie kaset zakończonym insercją IS1- Δ IS26 (n=13) występował w Grecji, głównie u *K. pneumoniae* o różnych ST, jak również u *P. mirabilis* i *P. stuartii*, oraz w jednym szczepie *E. coli* ST3188 we Francji. Omówione wyniki ukazały ewolucję In-e541 w Grecji związaną z generowaniem nowych wariantów genu *bla*_{VIM} oraz zmianami w kasetach genowych. Wśród greckich izolatów wyróżniono jeszcze In4873 z *bla*_{VIM-1} (n=1; *E. cloacae*

ST88) oraz In4863 z *bla*_{VIM-19} (n=7; *K. pneumoniae* ST383) będące nowymi wariantami In416 z układem kaset *bla*_{VIM-4}-*aacA7-dhfr1-ΔaadA1-smr-ISPa21*. Obecność integronów typu In-416 w Grecji, w przeszłości obserwowanych również we Włoszech, Rosji oraz Zjednoczonych Emiratach Arabskich, wzmacnia hipotezę o wspólnym ewolucyjnym przodku z elementami In-e541 zawierającymi *ΔaadA1*, ze względu na bardzo podobny układ kaset genowych. In916 *bla*_{VIM-1}-*aacA4-aphA15-aadA1-catB2* (n=16) był najliczniej reprezentowaną strukturą w grupie izolatów międzynarodowych (Francja, Hiszpania i Włochy) i reprezentujących różne gatunki (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*). Integron In110 *bla*_{VIM-1}-*aacA4-aadA1* (n=10) wykazywał specyficzność geograficzną występując jedynie we wszystkich izolatach z Łotwy niezależnie od przynależności gatunkowej (*C. freundii* i *E. cloacae*) czy klonalnej. Były to pierwsze, potwierdzone przypadki izolatów *Enterobacteriaceae* VIM na Łotwie.

Na podstawie analizy S1 PFGE stwierdzono dużą różnorodność plazmidów w badanej grupie izolatów, widzianą również wśród plazmidów niosących geny *bla*_{VIM} u 20 rekombinantów *E. coli*. Najliczniej reprezentowane integrony, typu In-e541, znajdowały się na plazmidach z replikonami typu IncR lub IncFII_k, jak również z dwoma replikonami IncR z IncFII_k lub IncR z IncA/C, oraz plazmidach nietypowalnych lub posiadały lokalizację chromosomalną. Plazmidy IncR były niekoniugujące i o wielkości ~50kb, podczas gdy pozostałe, o innych replikonach, różniły się wielkością i posiadały zdolność koniugacyjną. Pozostałe integrony pochodzące z greckich izolatów były ulokowane na plazmidach IncA/C (In4873), IncHI2 (In87) lub na plazmidach niepoddających się typowaniu (In4863 i In-h12). Integrony In916 we Włoszech były związane albo z plazmidami IncA/C (~150kb) albo IncFII_k (~110kb), natomiast w Hiszpanii z IncHI2 (~330kb) lub plazmidami nietypowymi (~80kb). Większość wymienionych była plazmidami koniugującymi. In110 znajdował się na koniugującym plazmidzie ~330kb.

Podsumowując, omawiana praca była pierwszą wielośrodkową, międzynarodową analizą nosicielstwa *Enterobacteriaceae* wytwarzających MBL wśród pacjentów OIOM i oddziałów rehabilitacyjnych w Europie. W związku z tym, że materiał został pobrany w tym samym czasie i opracowany tą samą metodą, uzyskane wyniki przedstawiały w pełni porównywalne wyniki i znacząco przyczyniły się do aktualnej, w momencie publikowania wyników, wiedzy o częstości występowania, strukturze klonalnej i mechanizmach związanych z rozprzestrzenianiem się mechanizmu MBL pomiędzy różnymi europejskimi ośrodkami. Uzyskane wyniki potwierdziły wiele wcześniejszych, lokalnych doniesień o występowaniu *Enterobacteriaceae* MBL w Europie i ich molekularnej charakterystyce, ze szczególną rolą szczepów greckich lub o greckim pochodzeniu, w tym *K. pneumoniae* ST147. Ukazały ponadto, zmiany zachodzące w integronach typu In-e541 i ich rolę w Grecji, wskazując na ich ewentualne powiązania ewolucyjne z In-416, jak również podkreśliły wzrastające znaczenie plazmidów IncR i IncFII_k niosących geny *bla*_{VIM} u *Enterobacteriaceae* w Europie.

Publikacja 5. – Phylogenetic lineages, clones and β-lactamases in an international collection of *Klebsiella oxytoca* isolates non-susceptible to expanded-spectrum cephalosporins.

Tytuł polski: Linie filogenetyczne, klony i β -laktamazy wyróżnione w międzynarodowej kolekcji izolatów *Klebsiella oxytoca* niewrażliwych na cefalosporyny o rozszerzonym spektrum substratowym.

Celem omawianej publikacji była analiza klonalna międzynarodowej kolekcji niewrażliwych na cefalosporyny o rozszerzonym spektrum substratowym izolatów *Klebsiella oxytoca*, zebranych podczas realizacji projektu EU MOSAR, z wykorzystaniem zaproponowanej kilka miesięcy wcześniej nowej metody MLST dedykowanej typowaniu molekularnemu izolatów tego gatunku. Metoda została opracowana przez badaczy austrijskich na izolatach pochodzących głównie z tego kraju i w chwili rozpoczęcia opisywanego projektu znanych było 44 typów sekwencyjnych (ST) *K. oxytoca*.

Sześćdziesiąt osiem izolatów objętych analizą pochodziło z 14 ośrodków medycznych zlokalizowanych w 8 krajach: Francji, Grecji, Hiszpanii, Luksemburgu, Łotwie, Portugalii, Włoszech oraz w Izraelu. Poszczególne ośrodki reprezentowane były przez 1-20 izolatów. Wśród 68 badanych izolatów zidentyfikowano 34 ST w tym 24 nowe typy sekwencyjne: ST137, ST141-144, ST147-163, ST165 i ST167, zdeponowane następnie w bazie danych *K. oxytoca* MLST (<https://pubmlst.org/koxytoca/>). Wyróżniono również 61 wzory rozdziału elektroforetycznego PFGE, zaklasyfikowane następnie do 47 pulsotypów charakterystycznych dla poszczególnych ośrodków. Analiza porównawcza wyników otrzymanych za pomocą nowego schematu MLST z pulsotypami uzyskanymi techniką PFGE wykazała wysoką korelację metod, ze wskazaniem na PFGE jako metodę typowania charakteryzującą się wyższą siłą rozdzielczą i bardziej wskazaną w opracowywaniu lokalnych ognisk epidemicznych. Drzewo filogenetyczne opracowane na podstawie skonkatameryzowanych sekwencji alleli MLST pozwoliło na wyróżnienie czterech linii filogenetycznymi A-D, skupiających spokrewnione ST. Dominujące linie A i D skupiały odpowiednio 17 ST (n=23) oraz 14 ST (n=42). Osiem ST było reprezentowanych przez więcej niż jeden izolat (n=42; 61,8%), w tym pięć ST zostało zidentyfikowanych w więcej niż jednym szpitalu i kraju: ST9 (n=9), ST2 (n=8), ST88 (n=6), ST141 (n=3) i ST36 (n=2). Całościowy udział wymienionych ST w ogólnej liczbie izolatów w poszczególnych ośrodkach medycznych znacząco się różnił, osiągając najwyższe wartości na oddziale rehabilitacji w hiszpańskim szpitalu (n=13; 86,7%), najniższe zaś na oddziale intensywnej terapii na Łotwie (n=4; 20,0%). Dwadzieścia dziewięć ST było obserwowanych wyłącznie w pojedynczych ośrodkach, w tym najliczniej reprezentowany w omawianej pracy ST153 (n=10) obecny jedynie na Łotwie. Analiza eBURST wszystkich dostępnych 161 typów sekwencyjnych (Maj 2015) pozwoliła na wyróżnienie grup pokrewieństwa. Spośród 34 ST wyróżnionych w omawianej pracy 12 zostało przydzielonych do pięciu grup zawierających co najmniej trzy ST. Do największego kompleksu klonalnego CC2 z ST2 jako centralnym genotypem zostało zaliczonych 5 ST: ST2, ST9, ST141, ST154 i ST155 liczących łącznie 22 izolaty (32,4%) pochodzących z dziewięciu szpitali we Francji, Hiszpanii, Łotwy, Portugalii, Włoszech i Izraela. Do CC2 zostało dodatkowo włączonych sześć kolejnych ST nadesłanych do bazy danych *K. oxytoca* MLST z Austrii, Holandii i Chin. Rozpowszechnienie geograficzne CC2 może wskazywać na globalny charakter tego kompleksu, podobnie jak to było obserwowane wcześniej z niektórymi CC lub ST u *K. pneumoniae*, *E. coli* czy *E.*

cloacae. Kolejne grupy tworzyły: i) ST4 (Łotwa oraz Austria), ST5 (Austria) i ST161 (Grecja), ii) ST43 i ST108 (Austria) oraz ST144 (Izrael), iii) ST30 i ST 53 (USA) oraz ST150 (Grecja), iv) ST135 (Francja oraz Austria), ST149 (Luksemburg) i ST158 (Francja).

W badanej grupie izolatów wyróżniono 22 warianty β -laktamazy typu OXY, gatunkowo specyficznego enzymu warunkującego naturalną oporność *K. oxytoca* na amino- i karboksypenicyliny. Szacuje się, że 10-20% klinicznych izolatów w skutek nadprodukcji wspomnianych enzymów może prezentować fenotyp obniżonej wrażliwości lub nawet oporności na inne antybiotyki β -laktamowe jak penicyliny z inhibitorami, cefuroksym, cefotaksym i aztreonam. Nadprodukcja związana jest z mutacjami w rejonie promotorowym genów *bla*_{OXY}. Dwadzieścia jeden wyróżnionych enzymów zostało sklasyfikowanych w cztery spośród sześciu określonych wcześniej typów OXY-1, -2, -4 oraz -5. Jeden izolat ST165 pochodzący z Izraela posiadał enzym wyraźnie różny od znanych typów OXY, dlatego też został zaproponowany jako przedstawiciel nowego typu OXY-7. Najliczniej reprezentowanymi typami były OXY-2 z 12 wariantami obecnymi w 42 izolatach (61,8%) o 15 ST oraz OXY-1 z 5 wariantami w 17 izolatach (25,0%) o 12 ST. Dodatkowo, 6 (8,8%) i 2 (2,9%) izolaty posiadały odpowiednio typy OXY-5 i -4. Oprócz nowego typu OXY-7 wyróżniono osiem nowych wariantów OXY-1-8, -1-9, -2-16, -2-17, -2-18, -2-19, -2-20 oraz -5-3. Stosunkowo duży udział nowych wariantów w ich całkowitej znanej liczbie (n=37; Maj 2015r.) wskazywał na niedoszacowanie ich różnorodności, których liczba powinna się zwiększać wraz z kolejnymi pracami nad *K. oxytoca*. W przypadku ST reprezentowanego przez więcej niż jeden izolat, z jednym wyjątkiem, wariant obserwowanej β -laktamazy typu OXY korelował z ST. ST141 w zależności od obszaru geograficznego izolacji posiadał albo OXY-2-7 (Hiszpania i Portugalia) albo OXY-2-14 (Francja). Zaobserwowano również korelację sekwencji aminokwasowych β -laktamaz OXY z liniami filogenetycznymi stworzonymi na podstawie skonkatameryzowanych sekwencji alleli MLST. Obserwacja ta była zgodna z wcześniejszymi pracami nad filogenezą *K. oxytoca* opierającymi się na analizie sekwencji pojedynczego lub kilku genów metabolizmu podstawowego oraz sekwencji β -laktamaz OXY. Na podstawie przyjętego wcześniej nazewnictwa, wyróżnione linie filogenetyczne zostały przypisane do filogenetycznych grup KoI (n=23), KoII (n=42), KoIV (n=2) oraz zaproponowano nową KoVII (n=1). Mutacje w rejonie promotorowym zostały stwierdzone u 27 izolatów (38,2%) reprezentujących 13 ST. Zdecydowana większość z tych izolatów (n=26) posiadała gen typu *bla*_{OXY-2} i należała do filogenetycznej grupy KoII. Wspomniane mutacje występowały stosunkowo często u najliczniejszych ST KoII: 8/8 ST2, 6/9 ST9, 1/2 ST36 i 3/3 ST141. U 21/27 izolatów ze stwierdzonymi mutacjami w obszarze promotorowym nie stwierdzono obecności genów nabytych β -laktamaz, co wskazuje nadprodukcje OXY jako głównym mechanizm oporności na cefalosporyny o rozszerzonym spektrum substratowym w tych przypadkach. Czterdzieści siedem izolatów (69,1%) wytwarzało nabyte cefalosporyny o rozszerzonym spektrum substratowym, w tym 44 (64,7%) ESBL, 2 (2,9%) MBL i 1 (1,5%) AmpC. Fenotyp ESBL był prezentowany przez 24 ST reprezentujące wszystkie linie filogenetyczne, jednakże ciekawe różnice zostały zaobserwowane pomiędzy KoI i KoII. Pośród izolatów KoI zdecydowanie dominowali producenci ESBL (n=21; 91,3%) reprezentujący wszystkie ST należące do tej linii filogenetycznej. W przypadku KoII producenci ESBL stanowili jedynie połowę izolatów (n=20; 47,6%), reprezentując 5 z 14 ST. Enzymy typu CTX-M oraz SHV zostały

zidentyfikowane odpowiednio u 22 i 21 izolatów. Najliczniej reprezentowanymi enzymami, wytwarzanymi niezależnie przez 12 izolatów (27,3%) o 8 ST, były CTX-M-15 oraz SHV12. Każdy z głównych klonów tj. ST2, ST9 i ST88, wytwarzał różne typy ESBL, co korelowało z miejscem izolacji i pulsotypem PFGE. Spostrzeżenie to, potwierdza wcześniejsze doniesienia zaobserwowane u innych gatunków *Enterobacteriaceae* o braku ścisłego związku szeroko rozpowszechnionych ST z wytwarzanymi przez nie ESBL.

Podsumowując, omawiana praca była pierwszym międzynarodowym, molekularnym badaniem szczepów *K. oxytoca* niewrażliwych na cefalosporyny o rozszerzonym spektrum substratowym ukierunkowanym na analizy klonalną i filogenetyczną w oparciu o nowo zaproponowaną metodę MLST, wraz z charakterystyką gatunkowo specyficznych β -laktamaz typu OXY. Analiza wykazała dużą genetyczną różnorodność badanych izolatów kolonizujących pacjentów w ośrodkach medycznych w Europie i Izraelu. Wyniki uzupełnione o dane z innych krajów pozwoliły na wyróżnienie kilku ST i grup klonalnych o wyraźnym międzynarodowym charakterze. Potwierdziły również związek linii filogenetycznych z produkcją określonych typów OXY oraz dominację dwóch spośród nich KoI (OXY-1/-5) i KoII (OXY-2), oraz wyróżnienie osobnej linii filogenetycznej wytwarzającej nowy typ OXY-7. Uzyskane wyniki pozwoliły również zaobserwować znaczące różnice pomiędzy głównymi grupami w prezentowanych przez nie mechanizmach oporności na cefalosporyny o rozszerzonym spektrum substratowym, z wyraźnie częstszym nabyciem ESBL i sporadyczną nadprodukcją OXY u KoI, oraz nadprodukcją OXY i znacznie rzadziej wytwarzaniem ESBL u KoII.

Publikacja 6. – *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in Poland, 2013-January 2017.

Tytuł polski: Izolaty *Enterobacteriaceae* wytwarzające karbapenemazy typu OXA-48 w Polsce, 2013 – styczeń 2017.

Opisywana praca była pierwszą w Polsce, molekularną analizą kolekcji izolatów *Enterobacteriaceae* wytwarzających karbapenemazy typu OXA-48/181, obejmującą wszystkie przypadki potwierdzone przez KORLD w okresie 2013 – styczeń 2017. Badaniami objętych zostało 54 izolaty pochodzące od 52 pacjentów z 20 szpitali zlokalizowanych w 14 miastach na terenie 11 województw. W 14 przypadkach został potwierdzony fakt lub istniało wysokiego stopnia prawdopodobieństwo introdukcji szczepów *Enterobacteriaceae* OXA-48/181 do kraju, związane z poprzedzającą hospitalizację w Polsce długotrwałym przebywaniem późniejszych pacjentów za granicą, w niektórych przypadkach połączone z pobytem w lokalnych szpitalach. Do krajów z których doszło lub mogło dojść do potencjalnego przeniesienia należy zaliczyć Egipt, Gruzję, Kambodżę, Oman, Rosję, Rumunię, Tunezję, Turcję oraz Ukrainę. Potwierdzenie lub zwiększenie prawdopodobieństwa przeniesienia utrudnia dodatkowo niewielki stan wiedzy na temat rozprzestrzenienia *Enterobacteriaceae* OXA-48/181 w niektórych wspomnianych krajach. Z jednej strony w Turcji epidemiologia OXA-48/181 jest dobrze poznana, z drugiej strony, w niektórych państwach, jak Rosja i Gruzja, ogranicza się do kilku pojedynczych doniesień lub, jak

Ukraina czy Kambodża, całkowitego braku informacji. Materiałem do badań był materiał wyhodowany z zakażeń (34 pacjentów) lub z nosicielstwa (18 pacjentów). Głównymi materiałami były mocz (n=16), wymaz z ran (n=9) i popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelikowe (n=8), oraz wymaz o odbytu (n=11).

Identyfikacja gatunkowa badanej grupy izolatów *Enterobacteriaceae* OXA-48/181 wykazała dominację gatunków *Klebsiella pneumoniae* (n=37) oraz *Escherichia coli* (n=14), przy jednoczesnym sporadycznym reprezentowaniu *Citrobacter freundii* (n=1), *Enterobacter aerogenes* (*Klebsiella aerogenes*; n=1) oraz kompleksu *Enterobacter cloacae* (n=1). Wewnątrzgatunkowa analiza molekularna wykazała natomiast dużą różnorodność genetyczną badanych organizmów. Wśród izolatów *K. pneumoniae* wyróżniono 11 typów sekwencyjnych (ST) z dominującym ST395 (n=23) zidentyfikowanym w 6 szpitalach głównie na terenie południowej Polski. Analiza PFGE wykazała występowanie pojedynczego pulsotypu (n=18 izolatów) w 4 szpitalach, z jednym krakowskim ośrodkiem szczególnie dotkniętym tym problemem (n=13). Pozostałe ST były reprezentowane przez 1-2 izolaty. Wśród 14 izolatów *E. coli* wyróżniono 4 ST. Dominujący okazał się być ST38 (n=8) zidentyfikowany w 6 szpitalach, zróżnicowany pod względem pulsotypów. ST410 z trzema nierozróżnialnymi między sobą izolatami pochodził z jednego szpitala w centralnej Polsce. Większość z wymienionych typów sekwencyjnych różnych gatunków np. *K. pneumoniae* ST11, ST101, ST395 oraz *E. coli* ST38, było obserwowanych wcześniej z szeregiem determinant oporności w tym OXA-48/181 w wielu krajach europejskich. *K. pneumoniae* ST395 odpowiedzialna z lokalne ognisko epidemiczne w Krakowie była również opisywana we Francji oraz na Węgrzech.

Potwierdzenie wytwarzania karbapenemaz OXA-48/181 zostało przeprowadzone poprzez sekwencjonowanie genów je kodujących. Zdecydowana większość izolatów (n=49) posiadała gen *bla*_{OXA-48}, natomiast u pozostałych izolatów stwierdzono występowanie genów *bla*_{OXA-181} (n=4) oraz *bla*_{OXA-232} (n=1). Analiza bezpośredniego otoczenia genów kodujących karbapenemazy OXA-48/181 wykazała dominację dwóch wcześniej opisanych struktur: transpozonu *Tn1999.1* (n=29) lub rzadziej *Tn1999.2* (n=15). W przypadku trzech szczepów *K. pneumoniae* ST15 (n=2) and ST11 (n=1) w odległości 46 par zasad przed genem *bla*_{OXA-48} został zidentyfikowany element *ISEcp1*. Podobny układ genów był wcześniej widziany w strukturze *Tn2016*, jednakże zamiast genu *bla*_{OXA-48} został wówczas zidentyfikowany gen *bla*_{OXA-204}. Geny *bla*_{OXA-181} i *bla*_{OXA-232} występowały w strukturach typu *Tn2013*, w których element *ISEcp1* występuje w odległości 128 par zasad przed genem *bla*_{OXA-181/232}. W przypadku 2 izolatów *E. coli* ST648 nie udało się ustalić otoczenia kontekstu genetycznego genów *bla*_{OXA-48}.

Plazmidowa lokalizacja genów *bla*_{OXA-48/181} została stwierdzona u 43 izolatów, niezależnie od ich przynależności gatunkowej oraz klonalnej. Jedynie 11 izolatów reprezentujących *E. coli* ST38 i ST648 oraz *K. pneumoniae* ST336 posiadało gen *bla*_{OXA-48} zlokalizowany na chromosomie. Analiza PBRT (ang. *PCR-based replicon typing*) wybranych izolatów wykazała obecność głównie plazmidów należących do grupy niezgodności IncL (~60kb zawierające gen *bla*_{OXA-48}; n=30), jak również IncM (~80-95kb zawierające gen *bla*_{OXA-48}; n=4), IncX (~50kb zawierające gen *bla*_{OXA-181}; n=4) lub plazmidów niepoddających się typowaniu (~90-160kb zawierające gen *bla*_{OXA-48/232}; n=3). Plazmidy IncL ~60kb były prawdopodobnie wariantem opisywanych wcześniej plazmidów typu pOXA-48 IncL/M

(~62kb). Plazmidy te, zdefiniowane ostatnio powtórnie jako IncL, były wielokrotnie raportowane w szeregu gatunków i są głównym czynnikiem rozprzestrzeniania się genów typu *bla*_{OXA-48} na świecie.

Podsumowując, karbapenemazy typu OXA-48/181 w latach 2013-17 były relatywnie rzadko spotykanym mechanizmem u *Enterobacteriaceae* w Polsce, zarówno w porównaniu z innymi europejskimi krajami dotkniętymi tym problemem, jak Francja czy Hiszpania, jak również izolowanymi w Polsce *Enterobacteriaceae* wytwarzającymi karbapenemazy NDM lub KPC. Początkowy etap ich rozprzestrzeniania się związany był z kilkunastoma prawdopodobnymi importami do kraju, lokalnym rozprzestrzenieniem kilku klonów, jednym większym ogniskiem szpitalnym na południu kraju oraz transferem plazmidu typu IncL. Badanie umożliwiło również opisanie nowych szczególnych cech *Enterobacteriaceae* OXA-48/181, w tym obecności *ISEcp1* w bezpośrednim sąsiedztwie genu *bla*_{OXA-48}.

Publikacja 7. – VIM/IMP carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Poland: epidemic *Enterobacter hormaechei* and *Klebsiella oxytoca* lineages.

Tytuł polski: Karbapenemazy typu VIM/IMP wytwarzane przez izolaty *Enterobacteriaceae* w Polsce: epidemiczne klony *Enterobacter hormaechei* i *Klebsiella oxytoca*.

Omawiana praca jest opisem molekularnej analizy wszystkich nadesłanych do KORLD izolatów *Enterobacteriales* (dawniej rodzina *Enterobacteriaceae*) VIM/IMP MBL, obejmującej izolaty począwszy od pierwszego przypadku *K. pneumoniae* VIM z 2006 roku do końca roku 2012. Celem projektu było poznanie gatunków *Enterobacteriales* wytwarzających VIM/IMP MBL w Polsce, wraz z ich klonalną charakterystyką oraz identyfikacją integronów zawierających geny *bla*_{VIM/IMP}.

Badaniu zostało poddanych 121 izolatów pobranych od 119 pacjentów; od jednego pacjenta wyizolowano trzech różnych producentów MBL. Badana populacja okazała się być zdominowana przez izolaty należące do kompleksu *Enterobacter cloacae* (n=64), *Klebsiella oxytoca* (n=23), oraz *Serratia marcescens* (n=20), ze znacznie mniejszym udziałem *Klebsiella pneumoniae* (n=11), *Citrobacter freundii* (n=2) i *Enterobacter amnigenus* (n=1). Łącznie izolaty *Enterobacteriales* VIM/IMP MBL pochodziły z 54 szpitali zlokalizowanych w 33 miastach w 12/16 województw. Na podstawie badań molekularnych w 15 spośród wymienionych ośrodków medycznych stwierdzono wystąpienie ognisk epidemicznych liczących od 2 do 8 izolatów, jak również potwierdzono regionalne transmisje niektórych organizmów. W 30 placówkach odnotowano pojedyncze izolacje. W początkowym okresie izolowania szczepów *Enterobacteriales* VIM/IMP MBL tj. w latach 2006-08, obserwowano raczej sporadyczne przypadki liczące do 5 izolacji rocznie. W roku 2009 nastąpił gwałtowny wzrost notowań (22 przypadki), kontynuowany następnie w kolejnych latach (24, 29 i 36 przypadków w latach 2010-12). Szczególną, unikatową cechą polskiej populacji *Enterobacteriales* VIM/IMP MBL w latach 2006-12 była dystrybucja gatunków, z dominacją kompleksu *E. cloacae* (52,9%) oraz znaczny udział izolatów reprezentujących *K. oxytoca* (19,0%) i *S. marcescens* (16,5%). Izolaty należące do kompleksu *E. cloacae* wytwarzające VIM MBL były w podobnym okresie izolowane w różnych europejskich krajach, jednakże

nigdzie nie stanowiły tak dominującej roli jak w Polsce. Ponadto, nasz kraj, w odróżnieniu do wielu innych europejskich obszarów dotkniętych problemem *Enterobacteriales* VIM/IMP MBL, charakteryzował się stosunkowo niewielkim udziałem izolatów *K. pneumoniae* MBL (9,1%).

Analiza klonalna izolatów należących do kompleksu *E. cloacae* pozwoliła na wyróżnienie i opisanie 10 nowych typów sekwencyjnych (ST), zdeponowanych następnie w bazie *E. cloacae* MLST. Większość izolatów kompleksu *E. cloacae* (n=37) należało do ST90, reprezentowanego głównie przez jeden typ PFGE (n=35) i obserwowanego od 2009 roku w 23 ośrodkach medycznych, w niemalże połowie kraju. Na podstawie aktualnej wiedzy o strukturze globalnej populacji kompleksu *E. cloacae* stwierdzono, że ST90 jest prawdopodobnym założycielem kompleksu klonalnego (CC) 90 skupiającego ST90 i kilka jego wariantów (ang. single locus variant, SLV). ST90 został zidentyfikowany przez inne grupy badawcze jako *Enterobacter hormaechei* ssp. *steigerwaltii* wytwarzający w różnych rejonach świata β -laktamazy w tym VIM MBL. Drugi z wyróżnionych klonów (n=15), ST89, również scharakteryzowany jako *Enterobacter hormaechei* ssp. *steigerwaltii*, był obserwowany od 2006 roku w zachodnich a następnie w północnych rejonach kraju. Izolaty należące do tego typu sekwencyjnego charakteryzowały się degradacją DNA podczas analizy PFGE, dlatego też dalsze ich różnicowanie możliwe było dzięki analizom genów *bla*_{VIM}. ST89 w czasie pisania publikacji był pojedynczym typem sekwencyjnym (ang. singleton) raportowanym uprzednio w Polsce jako producent OXA-48 oraz w Niemczech jako producent GIM-1 MBL. Dwadzieścia trzy izolaty *K. oxytoca* reprezentowały trzy nowe ST, spośród których ST145 (n=19), raportowany od 2009 roku w centralnej i zachodniej Polsce, był drugim najliczniej reprezentowanym typem sekwencyjnym w badanej populacji izolatów. Ze względu na szczątkowe, jak dotąd, dane zdeponowane w bazie *K. oxytoca* MLST, nie było możliwe oszacowanie rzeczywistego zasięgu występowania ST145 na świecie. Izolaty *K. pneumoniae* (n=11) reprezentowały 5 ST, wykazujących głównie charakter sporadycznych przypadków. Pierwszy izolat d. *Enterobacteriaceae* MBL w Polsce, wytwarzający karbapenemazę VIM-1 z 2006 roku reprezentował ST1237, będący SLV ST147 który w Grecji jest głównym producentem VIM u *Enterobacteriaceae*.

Występowanie karbapenemazy typu VIM zostało potwierdzone u 118 izolatów. Wyróżniono pięć wariantów karbapenemazy VIM-1: -1, -4, -28, -37 i -40, z dominacją VIM-4 (n=66) i VIM-1 (n=23). Nowo opisana w tej pracy karbapenemaza VIM-40 różniła się jedną zmianą aminokwasową A146V z karbapenemazą VIM-4. Karbapenemaza VIM-2 była reprezentowana przez VIM-20 (n=11) oraz VIM-2 (n=8). Trzy izolaty wytwarzały karbapenemazę IMP-19. Geny *bla*_{VIM/IMP} ulokowane były w 12 różnych integronach klasy 1, włączając w to sześć nowych struktur opisanych po raz pierwszy w omawianej pracy. Najliczniej reprezentowaną grupę stanowiło pięć wariantów integronu typu In238 (n=96; 79,3%) zawierających większość ze scharakteryzowanych w pracy genów typu *bla*_{VIM-1}: In238 (n=64), In238a (n=2), In1445 (n=7), In1451 (n=4) oraz integron typu In237 (n=19). Integrony typu In238 zawierały układ kaset *aacA4-bla*_{VIM}, z wyjątkiem In238a dodatkowo zakończonym na końcu 3' 169-nukleotydowym powtórzeniem genu *bla*_{VIM} (*bla*_{VIMpowt}). Integron In238 z układem kaset *aacA4-bla*_{VIM-4powt} był najliczniej reprezentowaną strukturą obecną we wszystkich wyróżnionych gatunkach i w wielu klonach, włączając w to większość *E. hormaechei* ST90, podczas gdy obecność In238a z układem *aacA4-bla*_{VIM-4} bez

charakterystycznego powtórzenia została potwierdzona w dwóch izolatach ST90. Nowe integrony In1445 oraz In1451, o strukturach odpowiednio *aacA4-bla_{VIM-40powt}* i *aacA4-bla_{VIM-37powt}*, były pojedynczymi mutantami In238 w obrębie genów *bla_{VIM}*. Występowały one wyłącznie w wariantach klonu *E. hormaechei* ST89 (In1445) oraz w pojedynczym pulsotypie PFGE *S. marcescens* (In1451). Integron In238 po raz pierwszy w Polsce został zidentyfikowany w 1998 w szczepie *Pseudomonas aeruginosa* wyizolowanym w jednym z warszawskich szpitali, natomiast u *Enterobacteriaceae* w 2008 roku w szczepie *K. pneumoniae* ST11 pochodzącym z okolic Warszawy. Te następujące po sobie wydarzenia pozwoliły wysnuć hipotezę, o możliwym przekazaniu In238 przez szczepy *Pseudomonas* do *Enterobacteriaceae*, oraz następującym później dalszym jego rozprzestrzenieniu i modyfikacji. Integron typu In237 z układem kaset *aacA4-bla_{VIM-1powt}* został stwierdzony wyłącznie u izolatów *K. oxytoca* ST145. Cechą charakterystyczną tego integronu były dwie nukleotydowe substytucje w obrębie elementu 59-be genu *bla_{VIM}* (C oraz T w pozycjach 60 i 68), znalezione pierwotnie w *E. coli* z 2001 w Grecji, w jednym z pierwszych przypadków na świecie *Enterobacteriaceae* VIM. Wszystkie te obserwacje wskazują rejony centralnej i południowej Europy jako tereny rozprzestrzeniania, cyrkulacji i ewolucji integronów typu In238. Pozostałe integrony kodujące karbapenemazę typu VIM-1 zostały scharakteryzowane jako: nowy integron In1517 (*gcu180-bla_{VIM28powt}*), integron typu In590 (*bla_{VIM-1}-aacA7-dfrA1-aadA1*) obserwowany wcześniej u *K. pneumoniae* ST147 w Grecji oraz In70 (*bla_{VIM-1}-aacA4-aphA15-aadA1*) opisany w szczepach *P. aeruginosa* we Włoszech i Francji. Integrony zawierające gen typu *bla_{VIM-2}* zostały zidentyfikowane u 17 izolatów reprezentujących różne gatunki. Były to integrony typu In1008: In1008 z układem kaset *bla_{VIM-2}-aacA4* (n=5) oraz In1444 z układem kaset *bla_{VIM-20}-aacA4* (n=11), różniące się między sobą pojedynczą mutacją w obrębie genów *bla_{VIM}*. Pierwotnie, integron In1008 był obserwowany u *P. aeruginosa* w latach 2001-04 w południowej Polsce, częściowo pokrywając terytorium na terenach których od 2006 roku stwierdzano jego obecność w szczepach *Enterobacteriaceae*. Geny *bla_{IMP-19}* zostały zlokalizowane w obrębie integronów In1518 (n=3; *aadB-bla_{IMP19}-aadA6*) jedynie u *S. marcescens*.

Hybrydyzacja z sondą *bla_{VIM}* wykazała chromosomalną lokalizację integronów u 32 izolatów posiadających sześć typów integronów, w tym 18 *K. oxytoca* ST145. U pozostałych izolatów stwierdzono występowanie integronów zawierających geny kodujące VIM MBL na szeregu koniugacyjnych i niekoniugacyjnych plazmidach o różnych typach replikonów: IncM, IncHI2, IncA/C₂ oraz na plazmidach niepoddających się typowaniu. Hipoteza o horyzontalnym rozprzestrzenieniu genów *bla_{VIM}* u d. *Enterobacteriaceae* znalazła potwierdzenie w obserwacji plazmidów typu IncM o wielkości ~50~80kb niosących integron typu In238 w niespokrewnionych organizmach: *C. freundii* ST11, *E. amnigenus*, *E. cloacae* complex ST92 czy *K. oxytoca* ST146 oraz ST166.

Podsumowując, omawiana praca porusza tematykę pierwszych siedmiu lat rozprzestrzeniania się szczepów *Enterobacteriales* VIM/IMP w Polsce, ukazując szereg charakterystycznych cech badanej grupy izolatów. Różnorodność populacji *Enterobacteriales* VIM/IMP w Polsce związana jest zapewne z kilkoma wydarzeniami, do których zaliczyć należy niezależne importy np. z Grecji, jak również z nabycie integronów zawierających geny *bla_{VIM}* od lokalnej populacji *P. aeruginosa* i dalsze ich rozprzestrzenienie i różnicowanie u *Enterobacteriales*. Ważnym czynnikiem było również klonalne rozprzestrzenienie *E.*

hormaechei ST90 i ST89, oraz *K. oxytoca* ST145. Wspomniane zjawisko było niemal niezauważone ze względu na relatywnie niewielką liczbę przypadków opisywanych rocznie oraz brak dużych ognisk szpitalnych.

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć naukowych cyklu prac:

Przedstawione prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego były jednymi z pierwszych lub jednymi z większych kompleksowych analiz nad strukturami populacji *E. coli*, *K. pneumoniae*, kompleksu *E. cloacae* i *K. oxytoca* w chwili ich publikowania. Międzynarodowy materiał ukazał niezwykłą różnorodność organizmów kolonizujących pacjentów w Europie i Izraelu, pozwolił wyróżnić klonów o szerokim zasięgu występowania, podkreślił różnorodność β -laktamaz związanych z niewrażliwością na cefalosporyny o rozszerzonym spektrum substratowym oraz umożliwił zaobserwowanie różnic pomiędzy ośrodkami reprezentującymi poszczególne kraje. Podczas realizacji prac wyróżniono szereg nowych typów sekwencyjnych, oraz zidentyfikowano lub zdefiniowano na nowo struktury klonalne, istotne z klinicznego punktu widzenia. Przyczyniło się to w znacznym stopniu do pogłębienia wiedzy o różnorodności populacji wspomnianych patogenów w Europie, poznania lepiej dystrybucji poszczególnych klonów w skali międzynarodowej oraz opisanie charakterystycznych cech lokalnych. Prace nad kompleksem *E. cloacae*, jak również *K. oxytoca*, stały się podstawą nomenklatury klonów i dalszych prac nad poznaniem różnorodności wewnątrzgatunkowej wymienionych gatunków, jak również stały się impulsem do rozpoczęcia analiz związanych z rozprzestrzenianiem się klonów tych drobnoustrojów na świecie. Prace na temat szczepów *Enterobacteriaceae* wytwarzających karbapenemazy MBL typu VIM/IMP, przedstawiły aktualny stan ich rozprzestrzenienia się w Polsce, oraz przyczyniły się do aktualizacji wiedzy o ich występowaniu w Europie. Ukazały również szereg charakterystycznych cech badanych grup izolatów, opisując ich dominujące lokalnie klonów, występowanie i ewolucję integronów zawierających geny *bla*_{VIM/IMP} oraz mechanizmy związane z ich rozprzestrzenianiem. Praca na temat karbapenemaz typu OXA-48/181 u *Enterobacteriaceae* w Polsce była pierwszą tego rodzaju opracowaniem z naszego kraju, ukazując początkowy etap ich rozprzestrzenienia, związany był z prawdopodobnymi importami do kraju, lokalnym rozprzestrzenieniem kilku klonów oraz transferem plazmidu. Umożliwiła również wyróżnienie nowych struktur zawierających geny typu *bla*_{OXA-48}.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

a) Publikacje oryginalne pełno tekstowe, opisy przypadków, prace poglądowe, listy do redakcji czasopism oraz publikacje z badań wielośrodkowych.

Jestem współautorem 33 oryginalnych pełnotekstowych prac naukowych, z czego 27 zostało opublikowanych po otrzymaniu stopnia naukowego doktora nauk medycznych, jednego opisu przypadku oraz trzech prac poglądowych.

| | Przed doktoratem | | | Po doktoracie | | |
|--|------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|--------------|
| | Liczba prac | ImpactFactor | Punkty MNiSW | Liczba prac | ImpactFactor | Punkty MNiSW |
| Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe | 6 | 24,931 | 158 | 27 | 108,671 | 960 |
| Opisy przypadków | - | - | - | 1 | 4,476 | 40 |
| Prace poglądowe | 2 | - | 4,50 | 1 | - | 2 |
| Razem | 8 | 24,931 | 162,50 | 29 | 113,147 | 1002 |

Łącznie:

IF = 138,078;

MNiSW = 1164,50

Dodatkowo, jestem współautorem trzech listów do redakcji czasopism oraz jednej publikacji w badaniach wielośrodkowych.

| | Przed doktoratem | | | Po doktoracie | | |
|--|------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
| | Liczba prac | ImpactFactor | Punkty MNiSW | Liczba prac | ImpactFactor | Punkty MNiSW |
| Publikacje pełnotekstowe w suplementach czasopism | - | - | | - | - | |
| Listy do redakcji czasopism | - | - | | 3 | 14,026 | |
| Publikacje z udziałem autora w badaniach wielośrodkowych | - | - | | 1 | 5,768 | |
| Razem | - | - | | 4 | 19,794 | |

Sumaryczny IF całego dorobku wynosi **157,872**.

Liczba cytowań z bazy Web of Science z dnia 31.01.2019, bez autocytowań = **620**

Indeks Hirscha z bazy Web of Science z dnia 31.01.2019 = **15**

b) Doniesienia zjazdowe

Jestem współautorem 30 doniesień zjazdowych na międzynarodowych konferencjach naukowych. Do najważniejszych kongresów należy zaliczyć:

- Beta-Lactamase Meeting (2014)

- European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2005, 2010-18)
- International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (2003, 2013, 2016)
- International Conference on Pseudomonas (2017)
- International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (2006)
- Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2003)

Jestem współautorem 9 doniesień zjazdowych na krajowych konferencjach naukowych. Do najważniejszych zjazdów należy zaliczyć:

- Symposium Naukowe "Postępy w Medycynie Zakażeń" (2003, 2016-18)
- Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (2012)

c) Kurator bazy *Institut Pasteur K. pneumoniae MLST and whole genome MLST databases*.

Od marca 2013 roku jestem członkiem zespołu kuratorów bazy danych *K. pneumoniae MLST and whole genome MLST databases* Instytutu Pasteura w Paryżu we Francji. Celem funkcjonowania bazy jest dostarczenie użytkownikom bezpłatnego, publicznie dostępnego narzędzia wykorzystywanego w genotypowaniu izolatów *K. pneumoniae* metodą MLST. Baza umożliwia charakterystykę izolatów i ich opis w zunifikowany, numeryczny sposób, jak również przechowuje informacje o izolatach prezentujących poszczególne typy sekwencyjne (ST). Dodatkowo baza dostarcza schematy typowania oparte na całym genomie (cgMLST), genach zjadliwości i oporności. Od momentu rozpoczęcia współpracy w bazie *K. pneumoniae MLST* zostało zarejestrowanych 356 nowych zgłaszających z całego świata, 2362 nowych typów sekwencyjnych oraz zdeponowano informacje o 6345 izolatach *K. pneumoniae* (stan na dzień 31.01.2019).

d) Współautor książki pt. Genetyka medyczna i molekularna

Jestem współautorem rozdziału XV.2.2. Analiza genetyczna w bakteriologii i epidemiologii zakażeń bakteryjnych, w książce pt. Genetyka medyczna i molekularna, pod redakcją naukową prof. dr hab. Jerzego Bala, wydanej przez Wydawnictwo Naukowe PWN SA w Warszawie w 2017r.

e) Recenzje manuskryptów wykonane na prośbę czasopism naukowych posiadających współczynnik wpływu Impact Factor

Byłem recenzentem prac badawczych zgłoszonych do następujących czasopism naukowych:

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy
- BMC Microbiology
- International Journal of Infectious Diseases
- International Journal of Medical Microbiology
- Journal of Antimicrobial Chemotherapy
- Polish Journal of Microbiology
- Scientific Reports

f) Opiekun naukowy grantu „Preludium” Narodowego Centrum Nauki

Jestem opiekunem naukowym grantu „Preludium” 2016/21/N/NZ7/03328 Narodowego Centrum Nauki pt. Opracowanie schematu typowania sekwencyjnego MLST *Pseudomonas putida* wraz z molekularną charakterystyką szczepów tego gatunku wytwarzających metalo- β -laktamazy w Polsce” realizowanego przez mgr. Pawła Urbanowicza. Termin zakończenia realizacji grantu przewidziano na 31.01.2020r.

g) Kierownik projektów badawczych

Byłem kierownikiem dwóch projektów naukowych:

1. W okresie 9.12.2005-9.12.2006 pełniłem funkcję kierownika projektu badawczego Nr. 2 P05D 095 29 Ministerstwa Edukacji i Nauki pt. „Analiza klonalności niewrażliwych na antybiotyki tetracyklinowe izolatów *Streptococcus pneumoniae* wraz z określeniem molekularnych mechanizmów oporności na tę grupę leków”
2. W okresie 18.08.2017-18.08.2018 pełniłem funkcję kierownika projektu badawczego Miniatura 1 Nr. DEC-2017/01/X/NZ7/00220 Narodowego Centrum Nauki pt. „Sekwencjonowanie genomowe grupy szczepów klinicznych *Klebsiella pneumoniae*, wytwarzających karbapenemazy typu KPC lub NDM, izolowanych z epidemii szpitalnych w Polsce”

h) Wykonawca projektów badawczych

Brałem udział jako wykonawca/główny wykonawca następujących projektów badawczych:

1. „Mastering hospital antimicrobial resistance and its spread into the community” (projekt EU MOSAR). 6. Program Ramowy UE LSHP-CT-2007-037941. 2008-2012r.
2. „Ujarzmienie szpitalnej oporności na antybiotyki i jej rozprzestrzeniania się w środowisku pozaszpitalnym”. Projekt badawczy MNiSW komplementarny do projektu UE „MOSAR” 934/6.PR UE/2009/7. 2008-2012r.
3. „Ruchome elementy genetyczne bakterii - analiza molekularna i wykorzystanie do konstrukcji narzędzi dla przemysłu biotechnologicznego” Projekt badawczy zamawiany MNiSW PBZ-MNSiW-04/1/2007. 2009-2011r.
4. Narodowy Program Ochrony Antybiotyków w Polsce (NPOA) na lata 2006-2010. Program Polityki Zdrowotnej MZ.
5. NPOA Moduł I: „Monitorowanie zakażeń szpitalnych oraz inwazyjnych zakażeń bakteryjnych dla celów epidemiologicznych, terapeutycznych i profilaktycznych na lata 2009 – 2013”. Program Polityki Zdrowotnej MZ.
6. Narodowy Program Ochrony Antybiotyków w Polsce (NPOA) na lata 2011-2016. Program Polityki Zdrowotnej MZ.

7. NPOA Moduł I: „Monitorowanie zakażeń szpitalnych oraz inwazyjnych zakażeń bakteryjnych dla celów epidemiologicznych, terapeutycznych i profilaktycznych w roku 2015”. Program Polityki Zdrowotnej MZ.
8. Narodowy Program Ochrony Antybiotyków w Polsce (NPOA) na lata 2016-2020. Program Polityki Zdrowotnej MZ.
9. NPOA Moduł I: „Monitorowanie zakażeń szpitalnych oraz inwazyjnych zakażeń bakteryjnych dla celów epidemiologicznych, terapeutycznych i profilaktycznych na lata 2016 – 2020”. Program Polityki Zdrowotnej MZ.
10. „Molekularna analiza epidemiologiczna szczepów pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae wytwarzających karbapenemazy, izolowanych z polskich środowisk szpitalnych”. Projekt badawczy NCN 2012/07/B/NZ6/03528. 2012-2015r.
11. Projekt MNiSzW: Specjalne Urządzenie Badawcze "MIKROBANK 2"
12. „Wielolekooporne szczepy *Pseudomonas aeruginosa* wytwarzające metalo- β -laktamazy w Polsce: rozwój sytuacji epidemiologicznej na przestrzeni ponad 10 lat (2005-2015)”. Projekt badawczy NCN 2016/21/B/NZ7/02075. 2017-2020r.

i) Nagrody i wyróżnienia

1. W 2003 roku abstrakt pt. „*Streptococcus pneumoniae* from respiratory tract diseases in Poland – complex relationships between drug – resistant isolates” prezentowany podczas konferencji naukowej International Meeting on Microbial Epidemiological Markers, która odbyła się w Szwajcarii w dniach 27-30 sierpnia, został wyróżniony i opublikowany w czasopiśmie Infection, Genetics and Evolution (Izdebski R., Sadowy E., Skoczyńska A. and Hryniewicz W. Selected abstracts from the 6th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers, Les Diablerets, Switzerland, 27-30 August 2003. *Streptococcus pneumoniae* from respiratory tract diseases in Poland – complex relationships between drug – resistant isolates. Infection, Genetics and Evolution 4, 253-292 (2004))
2. We wrześniu 2008 roku Polskie Towarzystwo Mikrobiologów przyznało mi nagrodę pierwszego stopnia im. Profesora Edmunda Mikulaszka za prace z zakresu mikrobiologii klinicznej dotyczące oporności *Streptococcus pneumoniae* na β -laktamy i tetracykliny na tle struktury klonalnej tego drobnoustroju.
3. Dnia 18.03.2009 r. uchwałą Rady I Wydziału Lekarskiego WUM przyznano mi wyróżnienie za przedstawioną rozprawę doktorską pt.: "Oporność *Streptococcus pneumoniae* na B-laktamy i tetracykliny na tle struktury klonalnej tego drobnoustroju w Polsce".

j) Stypendia i zagraniczne staże naukowe

1. W roku 2005 zostałem stypendystą Federation of European Microbiological Societies (FEMS) na realizację projektu badawczego pt. "Molecular studies on the penicillin-resistance determinants, *pbp2x*, *pbp2b* and *pbp1a* genes in international clones of *Streptococcus pneumoniae*". Grant umożliwił sfinansowanie 3-miesięcznego stażu naukowego w laboratorium prof. Reginy Hakenbeck w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Kaiserslautern w Republice Federalnej Niemiec. Wrzesień-grudzień 2005.

2. W marcu 2017 roku odbyłem 2-tygodniowy staż naukowy w Instytucie Pasteura w Paryżu we Francji w laboratorium prof. Sylvain Brisse (Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines Laboratoire). Podczas stażu zajmowałem się analizą bioinformatyczną sekwencji genomowych *K. pneumoniae*.
3. W roku 2017 zostałem stypendystą rządu francuskiego (Bourse du Gouvernement Français, BGF) na realizację projektu badawczego pt. "Klebsiella pneumoniae whole-genome sequence data". Grant umożliwił sfinansowanie miesięcznego stażu naukowego w laboratorium prof. Sylvain Brisse (Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines Laboratoire) w Instytucie Pasteura w Paryżu we Francji. Październik 2017r.

k) Współpraca z ośrodkami krajowymi i zagranicznymi

Do moich najważniejszych współprac naukowych należy zaliczyć badaczy z następujących ośrodków:

- University of Kaiserslautern, Department of Microbiology, Kaiserslautern, Germany
- Charles University in Prague, Faculty of Medicine and University Hospital in Plzeň, Plzeň, Czech Republic
- Tel-Aviv Souraski Medical Center, Section of Epidemiology, Tel-Aviv, Israel
- Universiteit Antwerpen, Department of Medical Microbiology, Antwerp, Belgium
- University Hospital for Infectious Diseases, Zagreb, Croatia
- Warszawski Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawa, Polska
- Uniwersytet Rzeszowski, Katedra Biochemii i Biologii Komórki, Rzeszów, Polska
- National University of Ireland Galway, School of Medicine, Galway, Ireland
- Institut Pasteur, Paris, France

l) Wprowadzenie techniki sekwencjonowania genomowego i bioinformatyki do Zakładów Mikrobiologii Molekularnej oraz Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej NIL

Jak już wspomniano we wstępie do omówienia celu naukowego prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, metoda sekwencjonowania genomowego (WGS) w niedalekiej przyszłości stanie się głównym narzędziem biologii molekularnej wykorzystywanym w epidemiologii. Ta niezwykle wydajna technika, ze względu na ogromną ilość uzyskiwanych danych wymaga do opracowania wyników zarówno bardzo mocnych komputerów jak również znajomości bioinformatyki, przynajmniej na podstawowym poziomie umożliwiającym sprawne poruszanie się w środowisku LINUX. Wychodząc naprzeciw oczekiwaniom nowoczesnej epidemiologii, we współpracy z Sekcją Informatyki NIL, na serwerach Instytutu przygotowałem maszynę wirtualną do pracy z tzw. surowymi danymi, otrzymywanymi z sekwenatorów nowej generacji. W tym celu zostały zainstalowane niezbędne programy do składania sekwencji (ang. assembling), opisywania sekwencji (ang. annotation) oraz do analiz porównawczych całych genomów. Następnie, dla pracowników Zakładów, przeprowadziłem cykl szkoleń wprowadzających w pracę w środowisku LINUX oraz praktyczne szkolenia z najważniejszych programów. W późniejszym czasie zostały

zakupione cztery jednostki obliczeniowe, umożliwiające prace kilku osobom równocześnie nad sekwencjami genomowymi.

W ostatnich dniach przygotowywania niniejszego autoreferatu została przyjęta do druku pierwsza publikacja grupy wykorzystująca technikę WGS: Literacka E, Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D, Schneider A, Urbanowicz P, Herda M, Hryniewicz W, and Gniadkowski M. *Proteus mirabilis* producing the OXA-58 carbapenemase in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 in press

6. Osiągnięcia dydaktyczne

a) Promotor pracy magisterskiej

Byłem promotorem pracy magisterskiej Pani Aleksandry Pajewskiej (numer indeksu 132407), studentki Wydziału Rolnictwa i Biologii, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Praca pt. „Czynniki zjadliwości szczepów *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym izolowanych w szpitalach w Polsce” została wykonana pod moim kierunkiem i została obroniona w styczniu 2015 r.

b) Promotor pomocniczy pracy doktorskiej

Byłem promotorem pomocniczym pracy doktorskiej Pani Izabeli Waško. Praca pt. „Charakterystyka populacji izolatów *Neisseria meningitidis* z kompleksu klonalnego ST-11 odpowiedzialnych za zakażenia inwazyjne w Polsce” została obroniona przed Radą Naukową Centrum Biostruktury, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w listopadzie 2016 r.

c) Organizacja konferencji i kursów międzynarodowych:

Jako członek lokalnego komitetu organizacyjnego brałem udział w organizacji międzynarodowej konferencji: 8th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers. Konferencja odbyła się w Zakopanem, w dniach 14-17 maja 2008 r.

Również jako członek lokalnego komitetu organizacyjnego brałem udział w organizacji kursu międzynarodowego: 24th Postgraduate Education Course of EDCMID. Microbial Typing Technologies: Practical Course with Theoretical Support. Kurs odbył się w Warszawie w dniach 25-30 kwietnia 2004 r.

d) Wykłady szkoleniowe na kursach, szkoleniach i konferencjach

1. Wykłady i ćwiczenia praktyczne podczas kursów specjalizacyjnych wymaganych programem specjalizacji z mikrobiologii dla lekarzy i diagnostów laboratoryjnych (lata 2005-2012). Tytuł kursów „Oporność drobnoustrojów na antybiotyki, podstawy i laboratoryjne metody oznaczania wrażliwości szczepów na antybiotyki i chemioterapeutyki, wykrywanie mechanizmów oporności”. Organizatorzy kursów:

- Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawski Uniwersytet Medyczny i Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych.
2. VII Warsztaty Mikrobiologiczne „Wiosenna Szkoła Mikrobiologii Klinicznej”, wykład pt.: „Acinetobacter baumannii – identyfikacja, mechanizmy oporności, epidemiologia”. Zakopane 14-17 kwietnia 2011r.
 3. I Ogólnopolska Konferencja Naukowo Szkoleniowa "Stare i nowe patogeny - aktualne problemy" Lublin, wykład pt.: "Zastosowanie badań molekularnych w dochodzeniach epidemiologicznych". Lublin 1-2 luty 2016r.
 4. XII Warsztaty Mikrobiologiczne „Wiosenna Szkoła Mikrobiologii Klinicznej”, wykład pt.: „Oporność na kolistynę”, Zakopane 12-15 maja 2016 r.
 5. XII Warsztaty Mikrobiologiczne „Wiosenna Szkoła Mikrobiologii Klinicznej”, wykład pt.: „Typowanie molekularne w epidemiologii zakażeń” Zakopane 12-15 maja 2016 r.
 6. V Kongres Genetyki, wykład pt.: „Molecular epidemiology of multidrug-resistant Enterobacteriaceae”, Łódź 19-22 września 2016 r.
 7. XX Sympozjum naukowe “Postępy w medycynie zakażeń”, wykład pt.: "Oporność plazmidowa na kolistynę", Warszawa 2-3 grudnia 2016 r.
 8. Posiedzenie Warszawskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, wykład pt.: „Oporność na polimyksyny”, Warszawa 8 czerwca 2017 r.
 9. XIV Warsztaty Mikrobiologiczne „Wiosenna Szkoła Mikrobiologii Klinicznej”, wykład pt.: „Charakterystyka genomowa *Klebsiella pneumoniae* w Polsce”, Zakopane 17-20 maja 2018 r.
 10. Warsztaty NPOA, wykład pt.: „Typowanie molekularne - co można powiedzieć o sytuacji w Polsce na podstawie badań molekularnych”, Warszawa 15-16 czerwca 2018 r.
 11. Warsztaty NPOA, wykład pt.: „Pałeczki jelitowe wytwarzające karbapenemazy – polskie dane epidemiologiczne”, Kielce 15 listopada 2018 r.

e) Zajęcia ze studentami

W latach 2004-18 sprawowałem opiekę naukową i/lub organizacyjną nad studentami odbywającymi praktyki zawodowe i staże naukowe w Zakładach Mikrobiologii Molekularnej oraz Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowego Instytutu Leków w Warszawie

Od 2008 roku organizuje dla studentów Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego coroczne wycieczki do NIL w ramach przedmiotu „Molekularna patogeneza bakteryjna”. Podczas spotkania studenci wysłuchują wykładów przedstawiających aktualnie poruszane zagadnienia naukowe w Zakładach Mikrobiologii Molekularnej oraz Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej oraz zapoznają się z pracą w laboratorium mikrobiologicznym.

18.03.2019r.

Radostaw Izdebski