

Streszczenie

Przybierające na sile zjawisko oporności na antybiotyki jest jednym z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny. Spośród wielu grup bakterii opornych na antybiotyki, pałeczki *Enterobacterales* wytwarzające karbapenemazy (CPE) stanowią jedno z głównych zagrożeń dla zdrowia publicznego na świecie. Kompleks gatunku *Klebsiella pneumoniae* (KpSC) należy do najważniejszych klinicznie CPE i jest obiektem szerokich badań nad czynnikami i mechanizmami swojej ekspansji. Drugą istotną grupą jest kompleks gatunku *Klebsiella oxytoca* (KoSC), który współdzieli z KpSC szeroką pulę genów wirulencji i oporności na antybiotyki. Gatunki należące do KoSC, choć przyćmiewane przez KpSC, także przyczyniają się do rozprzestrzeniania karbapenemaz na skalę globalną, jednak ich faktyczna rola w szerzeniu determinantów lekooporności nie została wystarczająco poznana. Od ponad dekady Polska jest krajem silnie dotkniętym problemem oporności na karbapenemy, Na całokształt sytuacji epidemiologicznej w kraju dominujący wpływ ma KpSC, jednak KoSC także odgrywa w niej istotną rolę.

Głównym celem niniejszej pracy było wyjaśnienie czynników i mechanizmów stojących za ekspansją *Klebsiella* spp. wytwarzających karbapenemazy (CP *Klebsiella* spp.) w Polsce, w okresie 2009-2019, oraz w czasie pierwszego roku pełnoskalowej wojny w Ukrainie (luty 2022-luty 2023). Szczególny nacisk położono na rozprzestrzenienie klonalne, horyzontalny transfer mobilnych elementów genetycznych (MGEs) i potencjalny import nowych genotypów. Niniejsza dysertacja składa się z czterech prac oryginalnych, przeprowadzonych na reprezentatywnej grupie izolatów klinicznych, zebranych z terenu całego kraju przez Krajowy Ośrodek ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów, z wykorzystaniem analiz bioinformatycznych sekwencji genomowych. Zastosowana metodologia opierała się przede wszystkim na technologii tzw. krótkich odczytów, wykorzystanej w analizach populacyjnych, która została uzupełniona o sekwencjonowanie w technologii tzw. długich odczytów, pozwalające na dokładne scharakteryzowanie konkretnych *locus* lub MGEs przyczyniających się do rozprzestrzeniania karbapenemaz.

Przedstawione analizy podkreśliły zróżnicowanie struktury klonalnej polskiej populacji KpSC wytwarzających karbapenemazy, zdominowanej w dużej mierze przez kilka tzw. światowych klonów wysokiego ryzyka. W początkowej fazie epidemii CPE w Polsce, klon *K. pneumoniae* ST147 uznawany był za jeden z mniej istotnych. Jego rosnącą rolę zaobserwowano w latach 2015-2019, kiedy to wytwarzający karbapenemazę typu NDM-1 genotyp ST147-Tn125F pochodzenia tunezyjskiego rozprzestrzenił się z jednego z warszawskich szpitali powodując regionalne ognisko na terenie miasta i na Mazowszu. Ponadto, kilka

spokrewnionych, ale nie zaliczonych do ogniska organizmów ST147-Tn/25F zidentyfikowanych w tamtym czasie w innych miastach, reprezentowało ten sam genotyp pochodzący z endemicznych rejonów basenu Morza Śródziemnego, które zostały najprawdopodobniej wprowadzone do Polski na skutek niezależnych importów przez polskich turystów. W tym samym czasie, ST147 odegrał także istotną rolę w szerzeniu karbapenemaz typu VIM. Genotypy tego klonu z różnymi wariantami integronów zawierających geny *bla*_{VIM} nazwane odpowiednio: ST147-In916, ST147-In2245 oraz ST147-In238 wywołały regionalne ogniska na terenach województw małopolskiego, śląskiego i lubelskiego. Później, po eskalacji wojny w Ukrainie, izolaty ST147 wytwarzające karbapenemazy typu NDM-1/-5 i/lub OXA-48 były jednymi z najczęściej izolowanych od pacjentów przybywających z tamtych terenów. Podczas początkowej fazy występowania klonu ST147 w Polsce, cała ówczesna populacja CPE była zdominowana przez endemiczny genotyp *K. pneumoniae* ST11-Tn/25A wytwarzający NDM-1. Niniejsza dysertacja ukazała także szerszy kontekst epidemiologiczny występowania ST11-Tn/25A w Europie, który był wykrywany także u pacjentów i migrantów przybywających z Ukrainy.

W ramach rozprawy poczyniono także kilka ważnych obserwacji epidemiologicznych dotyczących klonu *K. pneumoniae* ST395, będącego w Polsce istotnym producentem karbapenemaz typu OXA-48 już od 2013 roku. Na wzrost liczby przypadków *K. pneumoniae* ST395 w Polsce w ostatnich latach wpływ mogła mieć migracja pacjentów z Ukrainy, wśród których izolaty ST395 wytwarzające karbapenemazy typu NDM-1 i/lub OXA-48 stanowiły najliczniejszą grupę CPE i wykazały bliskie pokrewieństwo genetyczne z organizmami ST395 zidentyfikowanymi na terenie Rosji i izolowanymi od ukraińskich uchodźców wojennych w innych krajach europejskich. Innym scharakteryzowanym genotypem *K. pneumoniae*, wywodzącym się prawdopodobnie z Europy Wschodniej był ST307 wytwarzający karbapenemazy typu NDM-1 lub KPC-2/-3, który stanowił drugą pod względem liczebności grupę izolatów CPE od pacjentów przybywających z Ukrainy. Poza aspektem charakterystyki klonalnej izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających karbapenemazy wyizolowanych od pacjentów migrujących z terenu z Ukrainy, zwrócono także uwagę na stosunkowo częste występowanie genetycznych determinantów hiperwirulencji *K. pneumoniae* (hvKP) obecnych w klonach ST23, ST147, ST307 i ST395, wynikające prawdopodobnie z nabycia hybrydowych plazmidów typu IncFIB+HIIB pNDM-MAR, łączących geny AMR i wirulencji.

Spśród innych przedstawionych „klonów wysokiego ryzyka” *K. pneumoniae* ST437 i ST392 przyczyniły się w Polsce do ekspansji karbapenemaz typu VIM. Genotyp ST437-In238 był najliczniejszy wśród wszystkich izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających VIM w latach

2009-2019 i obejmował łącznie ponad 25% wszystkich przypadków. Wywołał on rozległą epidemię regionalną w województwie lubelskim, która w ciągu zaledwie jednego roku rozprzestrzeniła się na 16 placówek tego regionu. ST392-In1667 natomiast spowodował regionalne ognisko epidemiczne w siedmiu szpitalach województwa kujawsko-pomorskiego. Co ciekawe, analizy filogenetyczne ST437 i ST392 w kontekście międzynarodowym wykazały, że oba wyżej wymienione genotypy były prawdopodobnie rodzimego pochodzenia.

KoSC odegrał szczególnie ważną rolę we wczesnej fazie rozprzestrzeniania się w Polsce karbapenemaz typu VIM. Trwająca dekadę (2009-2019) i obejmująca kilka regionów ekspansja genotypu *K. oxytoca* ST145-In237 była jednym z najbardziej niezwykłych zjawisk w całej epidemiologii VIM w kraju, bezprecedensowym również w skali międzynarodowej. Inną unikalną i niezaobserwowaną wcześniej cechą tego genotypu były częste delecje fragmentów chromosomu, obejmujące naturalny gen β -laktamazy *bla_{OXY}*, uważany za swoisty dla KoSC i historycznie wykorzystywany do identyfikacji gatunkowej. Mimo, że nie udało się jednoznacznie określić molekularnych mechanizmów tego zjawiska, postawiona w niniejszej pracy hipoteza delecji indukowanej przez fagi, wydaje się być prawdopodobną przyczyną.

W rozprawie podkreślono również rolę horyzontalnego transferu różnego rodzaju MGEs w rozprzestrzenianiu się karbapenemaz. Do najważniejszych z nich należą trzy pochodne transpozonu *Tn125* przenoszące geny *bla_{NDM}*. Wariant *Tn125A*, charakterystyczny dla endemicznej w Polsce linii *K. pneumoniae* ST11, został wykryty także w organizmach reprezentujących ten klon pochodzenia ukraińskiego. Istotne powiązania z Europą Wschodnią zaobserwowano również dla wariantu *Tn125K*, dominującego w różnych klonach *K. pneumoniae* zebranych od pacjentów przybywających z Ukrainy. *Tn125F* natomiast został wykorzystany jako marker molekularny dla wspomnianego wcześniej genotypu ST147-*Tn125F* rozprzestrzeniającego się w Warszawie i na Mazowszu. Horyzontalny transfer genów kodujących VIM był uwarunkowany przede wszystkim przez plazmidy przenoszące integrony In238 i In916, oba o szerokim rozprzestrzenieniu międzygatunkowym. Praca ta przyczyniła się ponadto do scharakteryzowania kilku typów plazmidów przenoszących karbapenemazy. Były to przede wszystkim plazmidy typu IncFII_K+IncFIB_K, IncA, IncL i IncFIB+HI1B, o wysokim stopniu podobieństwa do cząsteczek tego typu obserwowanych wcześniej w Polsce i za granicą.

Przedstawione wyniki, wykazały jednoznacznie, że ekspansja wytwarzających karbapenemazy pałeczek *Klebsiella* spp. w Polsce była zjawiskiem wysoce dynamicznym i kształtowanym przede wszystkim przez: klonalne rozprzestrzenianie się genotypów epidemicznych, międzygatunkowy horyzontalny transfer MGEs zawierających geny karbapenemaz, oraz import nowych linii epidemicznych wskutek podróży i migracji. Wszystkie

cztery prace oryginalne tworzące rozprawę opisały złożoną epidemiologię CP *Klebsiella* spp. w Polsce na przestrzeni ostatnich 20 lat i znacząco przyczyniły się do pogłębienia wiedzy na temat sytuacji CPE w kraju.