

Katarzyna Piekarska

**Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny
w Warszawie**

AUTOREFERAT

Warszawa 2018

1. Imię i Nazwisko. **Katarzyna Piekarska**

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

Mgr biologii (1999) – Wyższa Szkoła Rolniczo-Pedagogiczna w Siedlcach (obecnie Uniwersytet Przyrodniczo – Humanistyczny)

Doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej (2007) – Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Genetyczne uwarunkowania mechanizmów oporności na fluorochinolony szczepów *Enterococcus faecalis* izolowanych z materiału klinicznego”.

Dyplom specjalisty w dziedzinie Zdrowie publiczne (2009), Warszawski Uniwersytet Medyczny

Dyplom specjalisty w dziedzinie Mikrobiologia medyczna (2015), Centrum Egzaminów Medycznych, Łódź

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny. Od 1.09.2000 do chwili obecnej zatrudniona jestem w Zakładzie Bakteriologii (obecnie Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych), początkowo na stanowisku biologa, od 01.04.2003 r. na stanowisku asystenta, zaś od 01.04.2008 na stanowisku adiunkta.

Od 1.02.20011 roku pełnię funkcję Kierownika Pracowni Bakteryjnych Zakażeń Układu Oddechowego (obecnie Pracowni Diagnostyki Bakteriologicznej) w Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH.

Od 1.12.2015 roku powierzono mi funkcję Kierownika w Akredytowanym Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH.

Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie, Samodzielna Pracownia Liofilizacji i Frakcjonowania Osocza (diagnostyka HCV), Stanowisko: **młodszy asystent**, okres zatrudnienia: maj - sierpień. 2000 r.

Laboratorium Mikrobiologiczne „BAKTER” w Warszawie, **laborant**, październik 1998 - kwiecień 2000

Analiza bibliometryczna dorobku naukowego:

1. Sumaryczny impact factor opublikowanych prac według listy Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **20,948 (+11,120** autorstwo grupowe w badaniach wieloośrodkowych); w tym IF 17,842 po uzyskaniu stopnia doktora

2. Impact factor dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **14,985**
3. Liczba punktów MNiSW/KBN: **374**
4. Lista cytowań publikacji według bazy Web of Science: **97 (bez autocytowań)**
5. Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **5**
6. Łączna liczba publikacji naukowych: **33** w tym **10** umieszczonych na liście JCR. W **20** publikacjach jako pierwszy autor, w **13** - autor korespondencyjny
7. Rozdział w podręczniku: **1**
8. Opublikowane streszczenia doniesień prezentowanych na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych: **19**

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego będącego podstawą do wnioskowania o uzyskanie stopnia naukowego doktora habilitowanego

Cykl prac zrealizowanych w obszarze badawczym: **Analiza wybranych mechanizmów oporności kodowanych plazmidowo występujących u *Enterobacteriaceae*.**

b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa,

1. **Piekarska K.**, Zacharczuk K., Wołkiewicz T., Wolaniuk N.,–Rzeczowska M., Gierczyński R. Emergence of *Enterobacteriaceae* coproducing CTX-M-15, ArmA and PMQR in Poland. *Adv Clin Exp Med*. 2019; 28(2). ISSN 2451-2680. doi: 10.17219/acem/94165

[IF– 1,262; MNiSW - 15]

2. **Piekarska K.**, Wołkiewicz T., Wolaniuk N., Zacharczuk K., Rzeczowska M., Gierczyński R. Analysis of draft whole genome sequences of three clinical strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis ST11 with decreased susceptibility to ciprofloxacin. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2018; 70: 25-36.

[MNiSW - 7]

3. **Piekarska K.** Mechanizmy oporności na fluorochinolony kodowane plazmidowo – PMQR. *Post. Mikrobiol.* 2018; 57: 47 – 57.

[IF– 0,354; MNiSW - 15]

4. Rzeczkowska M., **Piekarska K.**, Wołkowicz T., Semczuk K., Kamińska T., Gierczyński R. Współwystępowanie plazmidowo kodowanych mechanizmów oporności: DHA-7, CTX-M-15, *qnrB6* i *aac(6')-Ib-cr* u pałeczek *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających nabyte AmpC. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2017; 69: 115-26.

[MNIŚW - 7]

5. **Piekarska K.**, Zacharczuk K., Wołkowicz T., Rzeczkowska M., Bareja E., Olak M., Gierczyński R. Distribution of 16S rRNA methylase among different species of aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* in tertiary care hospital in Poland. *Adv Clin Exp Med.* 2016; 25: 539-44.

[IF– 1,179; MNIŚW - 15]

6. **Piekarska K.**, Zacharczuk K., Rzeczkowska M., Wołkowicz T., Januszkiewicz A., Podsiadły E., Demkow U., Gierczyński R. Probable interspecies transfer of the *bla_{VIM-4}* gene between *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* in single infant patent. *Pol. J. Microbiol.* 2015; 64: 387-9.

[IF– 0,750; MNIŚW - 15]

7. **Piekarska K.**, Wołkowicz T., Zacharczuk K., Rzeczkowska M., Chróst A., Bareja E., Olak M., Gierczyński R. Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-resistant clinical *Enterobacteriaceae* isolated in tertiary hospital in Warsaw, Poland. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2015; 45: 238-243.

[IF– 4,097; MNIŚW - 35]

8. **Piekarska K.**, Rzeczkowska M., Chróst A., Wołkowicz T., Zacharczuk K., Bareja E., Olak M., Gierczyński R. Występowanie i charakterystyka genu *aac(6')-Ib-cr* kodującego enzym modyfikujący fluorochinolony u opornych na ciprofloksacynę szczepów *Enterobacteriaceae* wyizolowanych od ludzi. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2013; 65: 39-46.

[MNIŚW - 5]

9. Rzeczkowska M., **Piekarska K.**, Gierczyński R. Charakterystyka opornych na fluorochinolony izolatów z gatunku *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* i *E. coli* wytwarzających β -laktamazy typu ESBL i AmpC. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2012; 64: 285-95.

[MNIŚW - 5]

10. **Piekarska K.**, Rzeczkowska M., Zacharczuk K., Chróst A., Januszkiewicz A., Bareja E., Olak M., Gierczyński R. Występowanie genów *qnr* u niewrażliwych na fluorochinolony pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* izolowanych z materiału klinicznego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2012; 64: 211-9.

[MNIŚW - 5]

11. Zacharczuk K., **Piekarska K.**, Szych J., Jagielski M., Hidalgo L., Millán Á.S., Gutiérrez B., Rastawicki W., Gonzáles - Zorn B., Gierczyński R. Plazmid-borne 16S rRNA methylase ArmA in aminoglycoside - resistant *Klebsiella pneumoniae* in Poland. *J. Med. Microbiol.* 2011; 60: 1306-11.

[IF– 2,502; MNiSW - 25]

12. Zacharczuk K., **Piekarska K.**, Szych J., Zawidzka E., Sulikowska A., Wardak S., Jagielski M., Gierczyński R. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase ArmA in Poland. *Antimicrob Agents Chemoth.* 2011; 55: 443 – 446.

[IF– 4,841; MNiSW - 40]

13. **Piekarska K.**, Zacharczuk K., Bareja E., Olak M., Szych J., Jagielski M., Wardak S., Gierczyński R. Występowanie w jednym z warszawskich szpitali pałeczek *Enterobacteriaceae* wytwarzających 16S rRNA metylazę ArmA. *Med Dośw Mikrobiol.* 2010; 62: 201-209.

[MNiSW - 9]

14. Zacharczuk K., **Piekarska K.**, Szych J., Sulik M., Roszko E., Łata J., Jagielski M., Gierczyński R. Oporność pałeczek *Enterobacteriaceae* wyosobnionych w szpitalu położniczo-ginekologicznym na wybrane antybiotyki aminoglikozydowe ze szczególnym uwzględnieniem zdolności do wytwarzania 16S rRNA metylaz ArmA, RmtB i RmtC. *Med Dośw Mikrobiol.* 2010; 62:97-107.

[MNiSW - 9]

15. **Piekarska K.**, Zacharczuk K., Szych J., Zawidzka E., Wilk E., Wardak S., Jagielski M., Gierczyński R. Występowanie w jednym z warszawskich szpitali pałeczek *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających karbapenemazę typu KPC. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 2010, 62: 9-20.

[MNiSW - 9]

Łączny IF prac tworzących dzieło: 14,985, (w tym IF 7,642 jako pierwszy autor); MNiSW 216 pkt.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Obecnie na całym świecie oporność bakterii na antybiotyki jest jednym z dominujących problemów zdrowia publicznego i stanowi duże wyzwanie dla współczesnej medycyny. Zakażenia wywołane przez szczepy odporne stanowią potencjalne zagrożenie dla życia pacjenta, znacząco ograniczają możliwości terapeutyczne, istotnie wydłużają również czas trwania choroby

i hospitalizacji pociągając za sobą ogromne koszty związane z opieką nad chorym ¹. Szczególny niepokój budzą zwłaszcza zakażenia wywołane przez szczepy wielolekooporne MDR (*multidrug resistant*), których izolowanych jest coraz więcej także w Europie. Zasadniczą rolę w pojawieniu się i rozpowszechnieniu mechanizmów warunkujących oporność na różne grupy antybiotyków i chemioterapeutyków odegrało powszechne i nieracjonalne, a często wręcz nieuzasadnione stosowanie tych związków zarówno w medycynie, jak i weterynarii a także gospodarce.

Wielolekooporne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* są drobnoustrojami, które w ostatnich latach uznano za jedno z najważniejszych patogenów człowieka. Bakterie te stanowią istotny problem głównie w lecznictwie zamkniętym, co ściśle związane jest z ich narastającą opornością na różne powszechnie stosowane w terapii grupy leków przeciwbakteryjnych, w tym: fluorochinolony, aminoglikozydy, cefalosporyny III generacji czy karbapenemy. Zwiększony odsetek szczepów *Enterobacteriaceae* opornych na wymienione grupy antybiotyków odnotowywany jest w wielu krajach europejskich, w tym także i w Polsce ². Dodatkowo stwierdzono, że w ostatnich dwóch dekadach w odpowiedzi na stosowane w lecznictwie antybiotyki, drobnoustroje te nabyły nowe mechanizmy oporności, takie jak: karbapenemazy (KPC, NDM, OXA-48), plazmidowo kodowane cefalosporynazy typu AmpC, 16S rRNA metylazy (ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, NpmA) czy plazmidowo kodowane mechanizmy oporności na fluorochinolony – PMQR (Qnr, Aac(6')-Ib-cr, QepA). Nabycie tych mechanizmów a często ich współwystępowanie zdecydowanie zwiększyło możliwości adaptacyjne i stopień przeżycia bakterii w środowisku szpitalnym. Co więcej, występowanie genów kodujących wymienione mechanizmy oporności na ruchomych elementach genetycznych przyczyniło się do ich szybkiego horyzontalnego rozprzestrzeniania pomiędzy różnymi szczepami i gatunkami pałeczek *Enterobacteriaceae*, stanowiąc – ze względu na skalę zjawiska – poważny problem dla zdrowia publicznego.

W Polsce, w przypadku pałeczek *Enterobacteriaceae*, na poziomie molekularnym bardzo dobrze zostały opisane i udokumentowane kodowane na ruchomych elementach, mechanizmy

¹ O'Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. 2014. Rev Antimicrob Resist Lond HM Gov.

² European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017.

oporności na antybiotyki β -laktamowe, w tym: ESBL, KPC, NDM, OXA-48^{3, 4, 5, 6}. Natomiast, dane piśmiennictwa dotyczące występowania wśród *Enterobacteriaceae* mechanizmów oporności na fluorochinolony, równie istotnej z klinicznego punktu widzenia grupy leków przeciwbakteryjnych, są znikome zwłaszcza na poziomie molekularnym. Brak jest również danych na temat mechanizmów oporności na aminoglikozydy związanych z występowaniem 16S rRNA metylaz. Szczątkowe są również krajowe dane dotyczące współwystępowania mechanizmów warunkujących oporność na różne grupy antybiotyków w pojedynczym izolacie.

Cel

Z uwagi na istotę problemu, w swojej pracy badawczej zainteresowałam się występującymi u *Enterobacteriaceae* a zarazem mało poznanymi mechanizmami warunkującymi oporność na istotne z klinicznego punktu widzenia grupy antybiotyków. Moje badania realizowane były w obszarze czterech tematów badawczych. Pierwszy kierunek badań obejmował swym zakresem tematykę oporności na fluorochinolony. Szczególnie istotne było dla mnie udzielenie odpowiedzi czy w szczepach niewrażliwych na fluorochinolony występują nabyte, kodowane plazmidowo mechanizmy oporności – PMQR, ich molekularna charakterystyka oraz określenie mutacji powodujących modyfikację sekwencji aminokwasowej poszczególnych podjednostek gyrazy i topoizomerazy IV przekładające się na wartość MIC, jak również próba oszacowania w jakim zakresie dochodzi do kumulacji tych mechanizmów (tj. mutacji i PMQR). Celem drugiego kierunku badań było zaś zbadanie czy i z jakimi mechanizmami oporności najczęściej współwystępują plazmidowo kodowane mechanizmy na fluorochinolony. Celem trzeciego kierunku badań było zaś określenie czy wśród szczepów *Enterobacteriaceae* opornych na wysokie stężenia aminoglikozydów izolowanych na terenie naszego kraju, obecne są 16S rRNA metylazy, jaki rodzaj, ich molekularna charakterystyka oraz szacunkowy udział. Czwarty kierunek badań obejmował swym zakresem oporność na antybiotyki z grupy karbapenemów.

³ Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fiett J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Kern-Zdanowicz I, Filczak K, Łopaciuk U. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:4565-7.

⁴ Fiett J, Baraniak A, Izdebski R, Sitkiewicz I, Żabicka D, Meler A, Filczak K, Hryniewicz W, Gniadkowski M. The first NDM metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolate in Poland: evolution of IncFII-type plasmids carrying the bla(NDM-1) gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:1203-7.

⁵ Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D, Machulska M, Urbanowicz P, Fiett J, Literacka E, Bojarska K, Kozinska A, Zieniuk B, Hryniewicz W, Gniadkowski M; OXA-48-PL Study Group. *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in Poland, 2013-January 2017. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Dec 9. doi: 10.1093/jac/dkx457.

⁶ Empel J, Baraniak A, Literacka E, Mrówka A, Fiett J, Sadowy E, Hryniewicz W, Gniadkowski M; Beta-PL Study Group. Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2449-54.

Wykaz prac stanowiących cykl uporządkowałam w kolejności od najnowszych do najstarszych. Jednak w opisie, ze względu na różnorodność poruszanej tematyki, zaklasyfikowałam je w zależności od omawianego tematu badawczego.

Omówienie publikacji.

Temat badawczy 1 – Oporność na fluorochinolony (PMQR i mutacje)

Piekarska K., Rzeczkowska M., Zacharczuk K., Chróst A., Januszkiewicz A., Bareja E., Olak M., Gierczyński R. Występowanie genów *qnr* u niewrażliwych na fluorochinolony pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* izolowanych z materiału klinicznego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2012; 64: 211-9.

Piekarska K., Rzeczkowska M., Chróst A., Wołkowicz T., Zacharczuk K., Bareja E., Olak M., Gierczyński R. Występowanie i charakterystyka genu *aac(6')-Ib-cr* kodującego enzym modyfikujący fluorochinolony u opornych na ciprofloksacynę szczepów *Enterobacteriaceae* wyizolowanych od ludzi. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2013; 65: 39-46.

Fluorochinolony stanowią ważną, syntetyczną grupę związków przeciwbakteryjnych szeroko stosowanych w medycynie i weterynarii. W ostatnich latach, na całym świecie obserwowany jest znaczny wzrost oporności drobnoustrojów na tę grupę leków, co znacznie ogranicza możliwości ich zastosowania w terapii. Ponadto analiza danych zebranych przez ECDC (<https://ecdc.europa.eu>) pozwoliła stwierdzić, że także w Polsce w odniesieniu do pałeczek Gram ujemnych, a szczególnie w przypadku *K. pneumoniae*, występuje wysoki odsetek szczepów opornych na fluorochinolony. To skłoniło mnie do poszukiwania odpowiedzi jakie mechanizmy są za to odpowiedzialne. Co więcej zaobserwowano także, że zdecydowana większość pałeczek *Enterobacteriaceae* opornych na fluorochinolony charakteryzuje się również opornością na inne grupy antybiotyków, a często szczepy takie cechują się wielolekoopornością.

Powszechnie jest przyjęte, że obecność mechanizmów PMQR (*plasmid-mediated quinolone resistance*) warunkuje niski poziom oporności na fluorochinolony (MIC 0,25-1 µg/ml) ⁷. Niemniej jednak, z drugiej strony wyraźnie podkreśla się również, iż występowanie tych mechanizmów sprzyja skutecznej selekcji mutacji i nabywaniu oporności na wysokie stężenia. Pierwszym wykrytym i opisanym mechanizmem PMQR były białka Qnr, których podstawową funkcją jest ochrona bakteryjnego DNA gyrazy i topoizomerazy IV przed wiązaniem z fluorochinolonom ⁷. Obecnie znanych jest pięć rodzin tych białek: QnrA, QnrB, QnrS i rzadziej występujące u pałeczek *Enterobacteriaceae*, QnrC i QnrD. Ponadto, jak wynikało z przeprowadzonej przeze mnie analizy aktualnego piśmiennictwa, na całym świecie geny *qnr* były i są nadal rozpowszechnione wśród

⁷ Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. 1998; 351:797-9.

różnych gatunków *Enterobacteriaceae* izolowanych od pacjentów szpitalnych. W związku z powyższym postanowiłam podjąć próbę oszacowania częstości występowania genów *qnr* wśród klinicznych szczepów opornych na fluorochinolony. W tym celu, w okresie od 1 marca do 31 sierpnia 2010 roku, w ramach realizacji kierowanego przeze mnie projektu badawczego, zebrano i przebadano prospektywnie 2017 izolatów pałeczek *Enterobacteriaceae* wyizolowanych z materiału klinicznego. Na podstawie identyfikacji biochemicznej i profilu lekowrażliwości do dalszych badań wytypowano 215 izolatów należących do różnych gatunków, opornych na ciprofloksacynę (według aktualnie obowiązujących kryteriów). Dla tej grupy szczepów określono wartość najmniejszego stężenia hamującego (MIC) kwasu nalidyksowego, norfloksacyny, ciprofloksacyny i moksifloksacyny, przyjmując dla trzech ostatnich związków wartość MIC >1 µg/ml, jako charakterystyczną dla izolatów opornych. W przypadku wszystkich badanych izolatów stosując technikę PCR poszukiwano fragmentów genu *qnrA*, *qnrB* i *qnrS*. Uzyskane produkty PCR poddawano reakcji sekwencjonowania. Obecność przynajmniej jednego genu *qnr* stwierdzono w przypadku 18 (8,3%) izolatów. Najczęściej wykrywaną determinantą był gen *qnrB*, którego obecność stwierdzono u 12 (5,6%) izolatów, najczęściej wśród *K. pneumoniae* (n=7). Wszystkie izolaty z wykrytym genem *qnr* poddano analizie polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych chromosomalnego DNA metodą PFGE. Wyniki genotypowania wskazywały na znaczne zróżnicowanie genetyczne badanych izolatów, co sugerowało rozprzestrzenienie genów *qnr* wśród szczepów niespokrewnionych. Co więcej, stwierdzona wśród trzech różnych gatunków (*K. pneumoniae*, *E. coli* i *E. cloacae*) obecność determinant *qnr* jednoznacznie wskazywała na horyzontalne rozprzestrzenianie plazmidów, w których znajdują się geny determinujące ten mechanizm.

Dane piśmiennictwa wyraźnie wskazywały, że geny *qnr* występują często w tym samym plazmidzie między innymi wraz z genami *bla* kodującymi oporność na antybiotyki β-laktamowe. Poza tym geny kodujące białka QnrA i QnrB najczęściej występują z genami kodującymi β-laktamazy typu ESBL należącymi do rodziny SHV i CTX-M, zaś QnrS z klasyczną β-laktamazą TEM-1⁸. W związku z tym celem pełniejszej charakterystyki sprawdziłam czy wśród badanych szczepów posiadających geny *qnr* występują także geny związane z wytwarzaniem β-laktamaz należących do rodzin: TEM, SHV i CTX-M. Przeprowadzone badania wykazały, że 16 (88,9%) izolatów posiadających gen *qnr* charakteryzowało się także obecnością genów *bla*. Do najczęściej wykrywanych genów należały *bla*_{CTX-M} (n=11) i *bla*_{TEM} (n=13), w przypadku 9 izolatów stwierdzono obecność genu *bla*_{SHV}.

⁸ Nordmann P., Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother. 2005; 56: 463-9.

Dwufunkcyjny wariant enzymu acetylotransferazy aminoglikozydowej – AAC(6')-Ib-cr to drugi plazmidowo kodowany mechanizm oporności na fluorochinolony⁹. Enzym ten oprócz modyfikacji cząsteczki aminoglikozydu prowadzącej do utraty powinowactwa do podjednostki 16S rRNA, czego skutkiem jest oporność na najczęściej stosowane w leczeniu antybiotyki tej grupy (tobramycynę, kanamycynę i amikacynę), dodatkowo posiada zdolność do strukturalnej modyfikacji hydrofilowych fluorochinolonów (ciprofloksacyny i norfloksacyny). Wariant ten charakteryzuje się obecnością dwóch określonych mutacji znaczących, prowadzących do substytucji aminokwasów w kodonach Trp102→Arg (W102→R) i Asp179→Tyr (D179→Y), które są niezbędne do redukcji wrażliwości fluorowanych chinolonów. W związku z powyższym, w drugiej prezentowanej pracy zainteresowałam się tym mechanizmem. Do badań, spośród 215 opornych na fluorochinolony, losowo wytypowano 15 izolatów pałeczek *Enterobacteriaceae*, u których za pomocą techniki PCR poszukiwano obecności genu *aac(6')-Ib-cr*. Uzyskany produkt PCR poddawano zarówno analizie restrykcyjnej stosując enzym BseGI (BtsCI), jak i sekwencjonowaniu. Gen *aac(6')-Ib-cr* stwierdzono w przypadku 11 spośród 15 badanych izolatów, co pozwoliło postawić tezę, że jest to dość powszechny mechanizm oporności występujący wśród *Enterobacteriaceae*. Wyniki genotypowania uzyskane metodą PFGE pozwoliły stwierdzić, że gen ten występował wśród izolatów niespokrewnionych, jak również wskazywały na horyzontalny transfer tego mechanizmu PMQR.

Należy zaznaczyć, że omówione powyżej prace były pierwszymi w Polsce pracami obejmującymi swym zakresem tematykę występowania plazmidowo kodowanych mechanizmów oporności na fluorochinolony – PMQR wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* izolowanych z materiału klinicznego. Jednak pomimo tego, jak również ze względu na chęć zwrócenia uwagi pracowników laboratoriów diagnostycznych na problem występowania mechanizmów PMQR w Polsce oraz brak w krajowym piśmiennictwie prac dotyczących sposobu ich wykrywania zostały one opublikowane w czasopiśmie polskojęzycznym.

Piekarska K., Wołkowicz T., Zacharczuk K., Rzeczkowska M., Chróst A., Bareja E., Olak M., Gierczyński R. Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-resistant clinical *Enterobacteriaceae* isolated in tertiary hospital in Warsaw, Poland. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2015; 45: 238-243.

Podstawowy mechanizm oporności na fluorochinolony związany jest z występowaniem mutacji znaczących w ściśle określonych rejonach zwanych QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*) chromosomowych genów gyrazy (*gyrA*, *gyrB*) i topoizomerazy IV (*parC*, *parE*). Analiza piśmiennictwa w tym zakresie pozwoliła stwierdzić, że wśród opisywanych klinicznych

⁹ Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* 2006;12:83-8.

szczepów *Enterobacteriaceae* posiadających wysoki poziom oporności na fluorochinolony obecne są zarówno mutacje, jak i mechanizmy PMQR. Dlatego też założyłam, że zróżnicowanie występowania mechanizmów oporności na fluorochinolony i/lub ich akumulacja wewnątrz jednego izolatu to główna przyczyna wysokiego poziomu oporności na fluorochinolony (MIC ≥ 32 mg/l). By zweryfikować tę hipotezę, w kolejnej swojej publikacji podjęłam próbę oszacowania częstości występowania mechanizmów PMQR (Qnr, AAC(6')-Ib-cr, QepA) i zbadania dystrybucji mutacji w QRDR genów *gyrA* i *parC*, w których najczęściej spotykane są mutacje związane z opornością na fluorochinolony. Częstość występowania determinant PMQR w populacji 215 badanych szczepów opornych na ciprofloksacynę (MIC >1 mg/l) określiłam na poziomie 22,8% (n=49). Najczęściej występowały one wśród pałeczek należących do gatunku *K. pneumoniae*, a następnie *E. coli*, *E. cloacae* i *P. mirabilis*. Co więcej, najbardziej rozpowszechnionymi determinantami występującymi u odpowiednio 85,7% (42/49) i 26,5% (13/49) szczepów okazał się gen kodujący wariant acetylotransferazy aminoglikozydowej - *aac(6')-Ib-cr* (na co wyraźnie wskazywały badania własne opisane powyżej) i *qnrB1*. U 22,4% (n=11) szczepów obserwowano współwystępowanie tych genów. W żadnym z badanych izolatów nie wykryto obecności genu *qnrC*, *qnrD* i *qepA*.

Sekwencjonowanie QRDR fragmentów chromosomowych genów *gyrA* i *parC* pozwoliło stwierdzić obecność substytucji w przypadku 44 izolatów (MIC ciprofloksacyny ≥ 4 mg/l) spośród 49 badanych *Enterobacteriaceae* posiadających PMQR. Generalnie, zmiana kodowanego aminokwasu występowała w dwóch kodonach podjednostki GyrA: 83 (Ser $\rightarrow$ Tyr, Phe, Ile, Leu) i 87 (Asp $\rightarrow$ Asn; Ala, Glu, Gly) oraz w dwóch kodonach podjednostki ParC: 80 (Ser $\rightarrow$ Ile, Arg) i 84 (Glu $\rightarrow$ Val, Gly). W przypadku 52,3% badanych izolatów *Enterobacteriaceae* z MIC ciprofloksacyny ≥ 16 mg/l obserwowano kumulację trzech substytucji (dwóch w GyrA i jednej w ParC), zaś u 18,2% izolatów stwierdzono występowanie czterech mutacji znaczących (dwóch w GyrA i dwóch w ParC). Wyniki te dostarczyły dodatkowych dowodów, że mutacje w QRDR chromosomowych genów *gyrA* i *parC* odgrywają istotną, kluczową rolę w rozwinięciu przez bakterie oporności na fluorochinolony. Co więcej, dowiodły także występowania silnej korelacji pomiędzy stopniową kumulacją tych mutacji w podjednostkach GyrA i ParC a stwierdzanym wysokim poziomem oporności.

Przeprowadzone przeze mnie badania pokazały także, iż najczęściej stwierdzana substytucja dotyczyła kodonu 83 podjednostki GyrA i wykryta była w przypadku 43/49 izolatów. Co potwierdziło, że u *Enterobacteriaceae* zmiana już pojedynczego aminokwasu w tym kodonie jest wystarczająca do obniżenia wrażliwości na fluorochinolony. Co więcej, w swych badaniach wykryłam także wyjątkowe izolaty (z MIC ciprofloksacyny w zakresie 64-128 mg/l) posiadające dwa mechanizmy PMQR i tylko pojedynczą mutację w kodonie 83 podjednostki A gyrazy. Obserwacje te istotnie podkreślają rolę

pojedynczej mutacji prowadzącej do zmiany kodowanego aminokwasu w podjednostce GyrA, szczególnie w kontekście posiadania przez ten izolat dodatkowo jeszcze mechanizmów PMQR. Ponadto, obserwacja ta pokazuje również jak wysokie może być ryzyko nabycia oporności na fluorochinolony przez pałeczki *Enterobacteriaceae* w przypadku presji antybiotykowej.

Ogólnie jest przyjęte, że podstawowym miejscem docelowego działania fluorochinolonów, czyli enzymem bardziej wrażliwym, u bakterii Gram-ujemnych jest gyraza. Jednak przeprowadzona analiza piśmiennictwa w tym zakresie wykazała, że także mutacje znaczące występujące tylko w podjednostce ParC związane są z opornością na fluorochinolony. W moich badaniach stwierdziłam jeden taki izolat, należący do gatunku *K. pneumoniae* (MIC ciprofloksacyny 16 mg/l), który posiadał podwójną mutację w ParC i dwa mechanizmy PMQR, co wyraźnie wskazuje i potwierdza zarazem, że na wartość MIC fluorochinolonów wpływ ma akumulacja różnych mechanizmów oporności. Co więcej, zdecydowana większość badanych izolatów opornych na wysokie stężenia fluorochinolonów (MIC ciprofloksacyny w zakresie 32 – 1024 mg/l) posiadających mutacje w QRDR *gyrA* i *parC* charakteryzowała się również obecnością przynajmniej jednego mechanizmu PMQR. Dane te dostarczają dodatkowych dowodów na współwystępowanie mechanizmów PMQR i mutacji w GyrA i ParC oraz ich wpływ na wysokie wartości MIC fluorochinolonów.

Natomiast, w 5 izolatach posiadających PMQR, których MIC ciprofloksacyny był w zakresie 1,5-16 mg/l w QRDR genów gyrazy i topoizomerazy IV nie znaleziono żadnej mutacji znaczącej. Obserwacja ta może potwierdzać hipotezę, że mechanizmy PMQR sprzyjają nabywaniu mutacji a w konsekwencji oporności na fluorochinolony w warunkach szpitalnych.

Przedstawiona praca to pierwsze w Polsce doniesienie dotyczące molekularnej charakterystyki mechanizmów oporności na fluorochinolony wykrytych wśród klinicznych szczepów *Enterobacteriaceae*. Ponadto, w pracy tej po raz pierwszy opisano występującą w podjednostce gyrazy substytucję Ala84→Val wykrytą u *K. pneumoniae* i Asp87→Glu stwierdzoną u *E. coli*.

Piekarska K. Mechanizmy oporności na fluorochinolony kodowane plazmidowo – PMQR. *Post. Mikrobiol.* 2018; 57: 47 – 57.

Rezultatem mojego zainteresowania tematyką oporności na fluorochinolony oraz warunkującymi ją mechanizmami była przeprowadzona przeze mnie wnikliwa analiza piśmiennictwa i powstanie pracy, której główne założenie dotyczyło przeglądu molekularnych mechanizmów leżących u podstaw oporności na tę grupę związków przeciwdrobnoustrojowych występujących u *Enterobacteriaceae*.

Pracę przeglądową rozpoczęłam od zaprezentowania krótkiej historii wprowadzenia chinolonów do leczenia i zsyntetyzowania fluorochinolonów, związków o poszerzonym spektrum działania i doskonalszych parametrach farmakokinetycznych. Zwróciłam uwagę na fakt, że aktualnie na świecie podejmowane są działania mające na celu ograniczenie stosowania fluorochinolonów natomiast w wielu krajach nadal brakuje nadzoru nad stopniem ich zużycia. Na podstawie dostępnych danych ECDC, przedstawiłam na wybranych przykładach krajów europejskich (wliczając Polskę) procentowy udział szczepów izolowanych z zakażeń inwazyjnych *E. coli* i *K. pneumoniae* opornych na fluorochinolony oraz konsumpcję tych leków uwzględniając lata 2010-2015, co zaprezentowałam na rycinie. Następnie opisałam miejsce docelowego działania fluorochinolonów czyli dwa enzymy bakteryjne: gyrazę i topoizomerazę IV oraz przedstawiłam mechanizm działania fluorochinolonów. Dalej omówiłam mechanizmy oporności na fluorochinolony kodowane chromosomowo, tj. mutacje prowadzące do zmiany kodowanego aminokwasu a w konsekwencji zmiany aktywności tych enzymów. Mutacje te najczęściej występują w ściśle określonych, krótkich odcinkach genów zwanych QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*). Innym mechanizmem kodowanym chromosomowo a opisanym przeze mnie były pompy błonowe, których obecność doprowadza do redukcji stężenia leku w cytoplazmie. Szczegółowo omówiłam również poznane dotychczas mechanizmy oporności na fluorochinolony kodowane plazmidowo, w tym: białka Qnr, dwufunkcyjny enzym AAC(6')-Ib-cr oraz plazmidowo kodowane pompy błonowe (QepA i OqxAB). Opisałam między innymi ich rolę, mechanizm działania, ich rozpowszechnienie wśród różnych gatunków *Enterobacteriaceae*, rodzaj ruchomych elementów genetycznych, na których najczęściej występują i w towarzystwie jakich innych determinant oporności. W kolejnej części pracy omówiłam wpływ występujących w komórce bakteryjnej nabytych mechanizmów PMQR na poziom oporności wyrażany wartością MIC fluorochinolonów.

Piekarska K., Wołkowicz T., Wołaniuk N., Zacharczuk K., Rzeczowska M., Gierczyński R. Analysis of draft whole genome sequences of three clinical strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis ST11 with decreased susceptibility to ciprofloxacin. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2018; 70: 25-36.

Należące do *Enterobacteriaceae* pałeczki *Salmonella* są drugą w kolejności (po *Campylobacter*) przyczyną biegunk. I choć większość zakażeń przebiega pod postacią nieżytu żołądkowo-jelitowego i nie wymaga leczenia, to zdarzają się również ciężkie przypadki inwazyjnej salmonellozy wywołanej odzwierzęcymi typami serologicznymi *Salmonella* nie-Typhi i nie-Paratyphi A, B, C, które wymagają zastosowania antybiotykoterapii. Lekami z wyboru są antybiotyki z grupy fluorochinolonów. Analiza piśmiennictwa pozwoliła stwierdzić, że w wielu krajach obserwowany jest wzrost odsetka pałeczek *Salmonella enterica ssp. enterica* wykazujących obniżoną wrażliwość na

ciprofloksacynę, co może stanowić potencjalny czynnik ryzyka niepowodzenia terapeutycznego w przypadku zastosowania fluorochinolonu w terapii. Jak dotąd w Polsce, dane dotyczące mechanizmów oporności na fluorochinolony, które występują wśród pałeczek *Salmonella* izolowanych od ludzi są mocno ograniczone. Z tego względu, w swoich badaniach opisanych w kolejnej pracy podjęłam próbę wyjaśnienia jakie mechanizmy są związane z opornością niskiego stopnia na ciprofloksacynę (MIC=0,19 mg/l), którą stwierdziłam w przypadku trzech klinicznych izolatów *S. Enteritidis*. Izolaty te zostały zidentyfikowane do poziomu podgatunku przy użyciu klasycznych testów biochemicznych, serotyp zaś określono zgodnie ze schematem White – Kauffmann – LeMinor-a. Wrażliwość na 7 antybiotyków określono stosując paski z gradientem stężeń. Izolaty przebadano na obecność plazmidowo kodowanych mechanizmów oporności na fluorochinolony – PMQR z użyciem techniki PCR. W związku z tym, że nie wykryto żadnej znanej determinanty PMQR, której obecność mogłaby być związana z redukcją wrażliwości na ciprofloksacynę badanych izolatów, ich kompletne genomowe DNA poddano analizie sekwencji nukleotydowych – WGS (*whole genome sequencing*). Przeprowadzona analiza genów kodujących determinanty oporności z zastosowaniem wymienionej metody (WGS) również nie wykazała obecności żadnych mechanizmów oporności PMQR. Natomiast, na jej podstawie u wszystkich izolatów stwierdzono obecność znaczącej mutacji w podjednostce A gyrazy, polegającej na substytucji w kodonie 83 seryny na tyrozynę. Powszechnie znany jest fakt, że mutacja ta jest związana z opornością na fluorochinolony, w tym z wysokim jej poziomem zarówno u *Salmonella*, jak i innych *Enterobacteriaceae*. Pomimo tego, iż obecność tej mutacji powodowała jedynie redukcję wrażliwości, jej obecność stanowić może potencjalne ryzyko, że przy zastosowaniu fluorochinolonów w terapii przyczyni się do szybkiej selekcji kolejnych mutacji znaczących, wzrostu poziomu oporności i niepowodzenia terapeutycznego. Istotne, że ta właśnie mutacja została opisana u *S. Typhimurium* jako pierwsza pojawiająca się zmiana w następstwie ekspozycji na ciprofloksacynę, skutkująca opornością na poziomie MIC 6 mg/l ¹⁰. W związku z powyższym przyjmując, że redukcja wrażliwości jest korzystną adaptacją bakterii do niskich stężeń antybiotyku możemy założyć, że sytuacja ta potencjalnie obrazuje reakcję badanych szczepów *S. Enteritidis* w wyniku ich ekspozycji na fluorochinolony w pierwotnym środowisku, tj. wśród zwierząt hodowlanych.

¹⁰ Fàbrega A, Soto SM, Ballesté-Delpierre C, Fernández-Orth D, Jiménez de Anta MT, Vila J. Impact of quinolone-resistance acquisition on biofilm production and fitness in *Salmonella enterica*. J Antimicrob Chemother. 2014; 69: 1815-24.

Dodatkowo, w wyniku przeprowadzonej analizy pełnogenomowej określono również podobieństwo genetyczne badanych izolatów. Wszystkie one prezentowały ten sam typ - ST11, który jest najczęściej występującym typem w grupie pałeczek *Salmonella* Enteritidis, Gallinarum, Pullorum ¹¹. Dwa izolaty posiadały ten sam wzór MLVA, trzeci zaś bardzo podobny. Co więcej, pełnogenomowa analiza SNP (*single nucleotide polymorphism*) potwierdziła bliskie podobieństwo badanych izolatów.

W kraju, prezentowana praca opisuje pionierskie badania w zakresie schematu sekwencji genomu pałeczek *Salmonella* Enteritidis izolowanych od ludzi z zastosowaniem metody pełnogenomowego sekwencjonowania (WGS).

Wnioski:

1. Analogicznie jak w innych krajach, wśród izolowanych w Polsce szczepów *Enterobacteriaceae* opornych na fluorochinolony, występują mechanizmy oporności kodowane plazmidowo – PMQR.
2. Obecność PMQR przyczynia się do rozprzestrzeniania się szczepów wielolekoopornych, bowiem najczęściej wraz z tymi mechanizmami w jednym plazmidzie przenoszone są determinanty warunkujące oporność na inne grupy antybiotyków.
3. Oporność na fluorochinolony w klinicznych szczepach *Enterobacteriaceae* jest wynikiem wzajemnych oddziaływań pomiędzy determinantami PMQR i mutacjami znaczącymi w podjednostkach gyrazy i topoizomerazy IV niż jedynie skutkiem stopniowej akumulacji tych mutacji.
4. Uzyskane wyniki potwierdzają rolę plazmidowo kodowanych mechanizmów PMQR, jak również pojedynczych mutacji znaczących w enzymach będących docelowym miejscem działania fluorochinolonów w nabywaniu kolejnych mutacji w QRDR a w konsekwencji sprzyjają oporności na wysokie stężenia fluorochinolonów w warunkach szpitalnych.
5. Oporność na fluorochinolony jest zjawiskiem złożonym, będącym często wypadkową współwystępowania kilku mechanizmów.

¹¹ Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Krauland MG, Hale JL, Harbottle H, Uesbeck A, Dougan G, Harrison LH, Brisse S; S. Enterica MLST Study Group. Multilocus Sequence Typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. PLoS Pathogens. 2012; 8: e1002776.

Temat badawczy 2 – Współwystępowanie genów PMQR z determinantami oporności na inne niż fluorochinolony grupy antybiotyków

Rzeczowska M., **Piekarska K.**, Gierczyński R. Charakterystyka opornych na fluorochinolony izolatów z gatunku *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* i *E. coli* wytwarzających β -laktamazy typu ESBL i AmpC. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2012; 64: 285-95.

Rzeczowska M., **Piekarska K.**, Wołkowicz T., Semczuk K., Kamińska T., Gierczyński R. Współwystępowanie plazmidowo kodowanych mechanizmów oporności: DHA-7, CTX-M-15, *qnrB6* i *aac(6')-Ib-cr* u pałeczek *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających nabyte AmpC. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2017; 69: 115-26.

Piekarska K., Zacharczuk K., Wołkowicz T., Wolaniuk N.,—Rzeczowska M., Gierczyński R. Emergence of *Enterobacteriaceae* coproducing CTX-M-15, ArmA and PMQR in Poland. *Adv Clin Exp Med.* 2019; 28(2). ISSN 2451-2680. doi: 10.17219/acem/94165

Analiza danych piśmiennictwa wykazała, że geny PMQR zazwyczaj występują w koniugacyjnych plazmidach MDR o różnej wielkości wraz z innymi determinantami oporności, w tym genami kodującymi β -laktamazy: ESBL, plazmidowo kodowane cefalosporynazy AmpC czy karbapenemazy. Ponadto, w wielu badaniach dotyczących częstości występowania mechanizmów PMQR, kodujących je determinant poszukiwano w kolekcjach izolatów wytwarzających ESBL. Fakt współwystępowania plazmidowo kodowanych mechanizmów oporności na fluorochinolony z determinantami oporności na inne grupy antybiotyków skłonił mnie do zbadania czy i w jakim zakresie w szczepach izolowanych w Polsce możemy obserwować takie zjawisko. W moich badaniach głównym kryterium doboru izolatów do badań stanowiła oporność na fluorochinolony. Stwierdziłam, iż ogółem 81,6% izolatów posiadających przynajmniej jeden gen PMQR było także producentami β -laktamaz ESBL (Piekarska K. i wsp. Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-resistant clinical *Enterobacteriaceae* isolated in tertiary hospital in Warsaw, Poland. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2015; 45: 238-243).

W pierwszej przedstawionej pracy w omawianym temacie badawczym, analizie poddano 19 losowo wybranych izolatów opornych na fluorochinolony należących do trzech gatunków: *K. pneumoniae* (n=7), *E. coli* (n=9) i *P. mirabilis* (n=3). Zdolność wytwarzania β -laktamaz wykrywano testami fenotypowymi. Izolaty te badano w kierunku zróżnicowania plazmidowo kodowanych β -laktamaz typu ESBL i pAmpC. Dominujący mechanizm ESBL wykryto u 9 izolatów (głównie wśród *E. coli*), nabyte pAmpC – u 6 (w tym wszystkich badanych *P. mirabilis*). Natomiast w przypadku 4 izolatów *K. pneumoniae* wykryto zarówno ESBL, jak i pAmpC. Stosując technikę PCR stwierdzono, że geny warunkujące wytwarzanie pAmpC najczęściej należały do rodziny CMY i DHA, zaś geny warunkujące wytwarzanie ESBL – do rodziny TEM, SHV i CTX-M. Co więcej, określając profil wrażliwości badanych izolatów zaobserwowano, że oprócz oporności na fluorochinolony

i cefalosporyny 13 spośród 19 charakteryzowało się również opornością na antybiotyki aminoglikozydowe i trimetoprim/sulfametoksazol. Uzyskane metodą PFGE wyniki genotypowania pozwoliły stwierdzić znaczne zróżnicowanie badanych izolatów.

Należące do rodziny *Enterobacteriaceae* pałeczki *Klebsiella pneumoniae* stanowią jeden z dominujących czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych. Często napotykanym problemem w terapii zakażeń wywoływanych przez te drobnoustroje jest ich oporność między innymi na antybiotyki β -laktamowe i fluorochinolony. W odróżnieniu od innych krajów, w Polsce problem współwystępowania plazmidowo kodowanych mechanizmów oporności pAmpC, ESBL i PMQR u pałeczek *K. pneumoniae* jest mało poznany. Z tego też względu w drugiej prezentowanej pracy podjęłam próbę oceny współwystępowania tych mechanizmów oporności u pałeczek *K. pneumoniae* wytwarzających cefalosporynazy typu pAmpC. Do badań wytypowano 22 izolaty *K. pneumoniae* odporne na cefoksytynę i cefalosporyny III generacji, wyodrębnione z materiału klinicznego od ludzi w trzech warszawskich szpitalach w okresie od 01.11.2013 r. do 31.01.2014 r. Stosując testy fenotypowe określono zdolność wytwarzania β -laktamaz typu ESBL i pAmpC oraz profil lekooporności. Fragmentów genów kodujących pAmpC (*bla*_{DHA}, *bla*_{ACC}, *bla*_{CIT}, *bla*_{EBC}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX}), ESBL (*bla*_{CTX-M}) oraz PMQR (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac*(6')-Ib-cr, *qepA*) poszukiwano stosując technikę PCR. Fenotypowe wytwarzanie i obecność genów pAmpC stwierdzono u 5 izolatów co potwierdza, że wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* mechanizm ten nie jest tak rozpowszechniony, jak ESBL. W przypadku 4 izolatów stwierdzono gen kodujący nabytą cefalosporynazę DHA-7. U wszystkich tych izolatów stwierdzono występowanie ESBL z rodziny CTX-M, która należy do najbardziej rozpowszechnionych zarówno w Polsce, jak i w innych krajach. Przy czym, dominującym wariantem nie był tak jak w poprzedniej dekadzie CTX-M-3, lecz CTX-M-15. Co więcej, 4 z 5 badanych izolatów wytwarzających DHA i CTX-M-15 posiadało także wariant acetylotransferazy aminoglikozydowej – AAC(6')-Ib-cr, zaś w przypadku dwóch izolatów wykryto dodatkowo obecność QnrB6. Nie stwierdzono obecności innych mechanizmów oporności PMQR. Analiza profili genetycznych PFGE wykazała, że stopień pokrewieństwa genetycznego badanych izolatów mieścił się w zakresie od 76% do 97%. Najwyższy stopień pokrewieństwa stwierdzony pomiędzy dwoma izolatami mógłby wskazywać na ich wzajemne powiązanie epidemiologiczne. Jednakże izolaty te zostały wyosobnione w dwóch różnych szpitalach, co raczej wskazuje na potencjalne szerzenie się klonu epidemicznego pomiędzy szpitalami. Udowodnienie tej hipotezy, wymagało by przeprowadzenia badań wśród pałeczek *K. pneumoniae* izolowanych w tym samym przedziale czasowym w większej liczbie szpitali. Należy podkreślić, że w prezentowanej pracy po raz pierwszy opisano mechanizm pAmpC typu DHA-7 występujący u *K. pneumoniae* co, potwierdza wyjątkową

zdolność tego drobnoustroju do nabywania nowych mechanizmów oporności. Współwystępowanie AmpC, ESBL i PMQR wyraźnie wskazuje na proces dostosowawczy tych drobnoustrojów do presji selekcyjnej wynikającej ze stosowania antybiotyków w środowisku szpitalnym. Należy zauważyć, że pałeczki *K. pneumoniae* przejawiają zdolności adaptacyjne typowe dla endemicznych szczepów szpitalnych, o czym świadczy kumulacja lokalnie rozpowszechnionych mechanizmów warunkujących oporność na dwie najczęściej stosowane w terapii grupy antybiotyków.

Trzecia w tym cyklu badawczym praca opisuje współwystępowanie kodowanych plazmidowo mechanizmów, tj.: CTX-M-15, ArmA i PMQR, czego rezultatem jest eliminacja trzech często stosowanych w terapii grup antybiotyków (β -laktamowych, aminoglikozydowych i fluorochinolonów). Obecnie obserwowane na świecie rozpowszechnienie szczepów wielolekoopornych (MDR) stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Z drugiej strony, w Polsce dane na temat molekularnej charakterystyki MDR-*Enterobacteriaceae* są wciąż niewystarczające. Dlatego też, w prezentowanej pracy podjęłam próbę określenia współwystępowania ESBL, pAmpC i 16S rRNA metylaz wśród klinicznych szczepów *Enterobacteriaceae* wytwarzających Qnr. Do badań wytypowano 18 izolatów należących do trzech gatunków: *K. pneumoniae* (n=8), *E. cloacae* (n=6) i *E. coli* (n=4) spośród izolatów wcześniej opisanych (Piekarska K. i wsp. Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-resistant clinical *Enterobacteriaceae* isolated in tertiary hospital in Warsaw, Poland. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2015; 45: 238-243), dla których określono profil lekowrażliwości uwzględniając 11 antybiotyków i stosując paski z gradientem stężeń. Fragmentów genów kodujących ESBL (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}), pAmpC (*bla*_{DHA}, *bla*_{ACC}, *bla*_{CIT}, *bla*_{EBC}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX}) i 16S rRNA metylazy (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*) poszukiwano stosując technikę PCR. Wszystkie uzyskane produkty PCR poddano sekwencjonowaniu, a uzyskane sekwencje nukleotydowe porównywano z sekwencjami referencyjnymi dostępnymi w bazie GenBank używając algorytmu BLAST. W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano, że 13 izolatów *Enterobacteriaceae* posiadających QnrB1 posiadało również gen kodujący AAC(6')-Ib-cr i przynajmniej jeden ESBL. Najczęściej obserwowaną kombinacją genów była *qnrB1* + *aac*(6')-Ib-cr + *bla*_{TEM-1} + *bla*_{CTX-M-15}, którą stwierdzono w przypadku 6 izolatów. Co więcej, 61% izolatów wytwarzających QnrB1 posiadało gen *bla*_{CTX-M-15}, zaś dwa spośród izolatów wytwarzających QnrB1 i CTX-M-15 dodatkowo posiadało gen *armA* kodujący 16S rRNA metylazę. Jak dotąd, takie

współwystępowanie determinat oporności (QnrB, CTX-M-15 i ArmA) odnotowano w Chinach ¹². Nie stwierdzono współwystępowania Qnr z pAmpC, gdyż żaden badany izolat nie posiadał genów odpowiedzialnych za wytwarzanie pAmpC. Stopień podobieństwa genetycznego badanych izolatów określono w zakresie od 50% do 92% stosując metodę PFGE. Wyróżniono cztery grupy klonalne (A, B, C, D), z których każda obejmowała izolaty posiadające profile PFGE o $\geq 80\%$ podobieństwa, co zobrazowano na Rycinie1. Stosując analizę sekwencji nukleotydów wybranych genów metabolizmu podstawowego - MLST (*multilocus sequence typing*), w przypadku *K. pneumoniae* wyróżniono 5 różnych ST (*sequence type*): ST15, ST323, ST336, ST147, ST525, u *E. coli* – dwa: ST131, ST1431 i u *E. cloacae* – cztery: ST90, ST89, ST133 i nowy ST407 (posiadający QnrB1, AAC(6')-Ib-cr i CTX-M-15). Izolaty *K. pneumoniae* prezentujące ST15, ST336, ST147 oraz *E. coli* ST131 wykrywane są w wielu krajach i reprezentują klony o zasięgu międzynarodowym ^{13, 14}. Generalnie, izolaty należące do tej samej grupy klonalnej reprezentowały ten sam ST i posiadały te same markery oporności. Wyjątek stanowiły dwa izolaty *E. coli* ST131 należące do grupy klonalnej C, których stopień podobieństwa genetycznego (uzyskany na podstawie porównania profili PFGE) wynosił 83%, a które charakteryzowały się różnymi determinantami oporności (jeden izolat posiadał – QnrB1, AAC(6')-Ib-cr, TEM-1 i CTX-M-15, drugi zaś – QnrS1 i TEM-1). Te dwa izolaty prezentowały także zróżnicowany profil plazmidowy (różniły się liczbą plazmidów oraz ich wielkością). Obserwowane zjawisko może odzwierciedlać dynamikę wymiany determinant oporności za pośrednictwem plazmidu w warunkach szpitalnych. Prezentowana praca dostarcza informacji o tzw. „successful clones”, które posiadają geny kodujące plazmidowe mechanizmy warunkujące oporność na klinicznie istotne grupy antybiotyków, w tym: antybiotyki β -laktamowe, aminoglikozydowe i fluorochinolony.

Wnioski

1. Szczepy *Enterobacteriaceae* odporne na fluorochinolony najczęściej wytwarzają również β -laktamazy typu ESBL.
2. Współwystępowanie PMQR, ESBL i/lub AmpC oraz ArmA stanowi formę skutecznej odpowiedzi bakterii na presję selekcyjną wynikającą ze skojarzonego stosowania

¹² Luo Y, Yang J, Zhang Y, Ye L, Wang L, Guo L. Prevalence of β -lactamases and 16S rRNA methylase genes amongst clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37:352-5.

¹³ Paltansing S, Kraakman ME, Ras JM, Wessels E, Bernards AT. Characterization of fluoroquinolone and cephalosporin resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* isolated in a Dutch teaching hospital reveals the presence of an *Escherichia coli* ST131 clone with a specific mutation in *parE*. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:40-5.

¹⁴ Rodrigues C, Machado E, Ramos H, Peixe L, Novais Â. Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK). *Int J Med Microbiol*. 2014;304:1100-8.

antybiotyków β -laktamowych, aminoglikozydowych i fluorochinolonów w lecznictwie zamkniętym.

3. Ze względu na zdolność ciprofloksacyny do indukcji u bakterii odpowiedzi SOS ¹⁵, koincydencja PMQR z innymi determinantami oporności, często z udziałem wielu plazmidów o różnej wielkości, może sugerować znaczący udział fluorochinolonów stosowanych w terapii w nabywaniu fenotypu MDR przez kliniczne szczepy *Enterobacteriaceae*.

Temat badawczy 3 – Oporność na aminoglikozydy związana z wytwarzaniem 16S rRNA metylaz

Zacharczuk K., **Piekarska K.**, Szych J., Sulik M., Roszko E., Łata J., Jagielski M., Gierczyński R. Oporność pałeczek *Enterobacteriaceae* wyizolowanych w szpitalu położniczo-ginekologicznym na wybrane antybiotyki aminoglikozydowe ze szczególnym uwzględnieniem zdolności do wytwarzania 16S rRNA metylaz ArmA, RmtB i RmtC. *Med Dośw Mikrobiol.* 2010; 62:97-107.

Piekarska K., Zacharczuk K., Bareja E., Olak M., Szych J., Jagielski M., Wardak S., Gierczyński R. Występowanie w jednym z warszawskich szpitali pałeczek *Enterobacteriaceae* wytwarzających 16S rRNA metylazę ArmA. *Med Dośw Mikrobiol.* 2010; 62: 201-209.

Zacharczuk K., **Piekarska K.**, Szych J., Jagielski M., Hidalgo L., Millán Á.S., Gutiérrez B., Rastawicki W., Gonzáles - Zorn B., Gierczyński R. Plazmid-borne 16S rRNA methylase ArmA in aminoglycoside - resistant *Klebsiella pneumoniae* in Poland. *J. Med. Microbiol.* 2011; 60: 1306-11.

Zacharczuk K., **Piekarska K.**, Szych J., Zawadzka E., Sulikowska A., Wardak S., Jagielski M., Gierczyński R. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase ArmA in Poland. *Antimicrob Agents Chemoth.* 2011; 55: 443 – 446.

Piekarska K., Zacharczuk K., Wołkowicz T., Rzeczkowska M., Olak M., Gierczyński R. Distribution of 16S rRNA methylase among different species of aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* in tertiary care hospital in Poland. *Adv Clin Exp Med.* 2016; 25: 539-44.

Zespół badawczy, w skład którego wchodziłam prowadził pionierskie w Polsce badania w zakresie oporności na antybiotyki aminoglikozydowe, związanej z wytwarzaniem 16S rRNA metylaz wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* izolowanych od ludzi. Ta grupa antybiotyków stanowi ważną grupę leków przeciwbakteryjnych stosowanych głównie w terapii skojarzonej w zagrażających życiu zakażeniach. Oporność na antybiotyki aminoglikozydowe zazwyczaj związana jest z obecnością enzymów degradujących antybiotyk poprzez modyfikację jego struktury. W 2003 roku ¹⁶, po raz pierwszy został opisany nowy mechanizm, przyczyniający się do oporności na wysokie stężenia aminoglikozydów, związany z wytwarzaniem enzymu ArmA należącego do grupy

¹⁵ Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK: SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 2004; 427: 72-4.

¹⁶ Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2565-71.

metylotransferaz. Enzym ten zdolny jest do postranskrypcyjnej modyfikacji cząsteczek 16S rRNA, czyniąc ją niewrażliwą na działanie wszystkich aminoglikozydów stosowanych parenteralnie w leczeniu zamkniętym. Co więcej, gen *armA* warunkujący ten mechanizm oporności przenoszony jest na plazmidach, stanowiąc obecnie problem zdrowia publicznego w skali globalnej.

Przedstawione trzy pierwsze prace, są pierwszymi publikacjami poświęconymi zagadnieniu występowania mechanizmu ArmA w Polsce. Początkowe badania przeprowadzono wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* izolowanych od pacjentek szpitala położniczo-ginekologicznego i od noworodków. Oporność na jeden lub więcej antybiotyków aminoglikozydowych (gentamicyna, amikacyna, netylmycyna, tobramycyna i neomycyna) stwierdzono u 45 (1,9%) izolatów spośród 2359 przebadanych, wyosobnionych w okresie od 15 marca do 31 grudnia 2009 roku w jednym z ginekologiczno-położniczych szpitali w Warszawie. Tylko w przypadku 7 izolatów określono wysokie wartości MIC aminoglikozydów, zakres od 256 do 1024 µg/ml, charakterystyczne dla obecności metylaz. Jednak u tych izolatów nie stwierdzono obecności żadnej spośród poszukiwanych 16S rRNA metylaz, tj. ArmA, RmtB lub RmtC. W świetle uzyskanych wyników i na podstawie analizy piśmiennictwa założyliśmy, że w Polsce problem wytwarzania 16S rRNA metylaz ograniczony może być do populacji pałeczek *Enterobacteriaceae* izolowanych od pacjentów poddawanych długotrwałej hospitalizacji. Dlatego też, w kolejnej pracy materiał do badań stanowiło 270 izolatów wyosobnionych w okresie miesiąca (19.04. – 19.05.2010 r.) od pacjentów jednego z dużych szpitali w Warszawie. W przypadku 19 izolatów (7%) stwierdzono oporność przynajmniej na dwa spośród testowanych aminoglikozydów (gentamicyna, amikacyna, kanamycyna). U tych izolatów, testem PCR poszukiwano genów związanych z wytwarzaniem 16S rRNA metylaz – ArmA, RmtB i RmtC. W przypadku 6 (2,2%) izolatów należących do trzech gatunków: *E. cloacae* (n=4), *K. pneumoniae* (n=1) i *P. mirabilis* (n=1) testem PCR wykryto obecność genu *armA*. Izolaty te charakteryzowały się wysokimi wartościami MIC, w zakresie 128 – 1024 µg/ml, wszystkich badanych antybiotyków aminoglikozydowych. Była to pierwsza próba oszacowania częstości występowania szczepów *Enterobacteriaceae* wytwarzających 16S rRNA metylazy w dużym, wieloprofilowym szpitalu zaś przeprowadzone badania miały charakter pilotażowy.

Kodujący metylazę ArmA gen *armA* wykryty był wewnątrz transpozonu Tn1548 w dużym (ok. 90 kb), koniugacyjnym plazmidzie¹⁷. W czasie, gdy prowadziliśmy badania znanych było sześć 16S rRNA metylaz (ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD i NpmA), przy czym ArmA okazała się tą najczęściej występującą metylazą w Europie, występując w najwyższym odsetku (1,8%) wśród

¹⁷ Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2949-53.

szczepów izolowanych w Bułgarii. W związku z powyższym, w trzeciej pracy przedstawionej w tym temacie badawczym zidentyfikowaliśmy plazmid, w którym przenoszony jest gen *armA*, określiliśmy jego środowisko genetyczne oraz określiliśmy zróżnicowanie genetyczne *K. pneumoniae* wytwarzających ArmA. Do badań wybrano 34 izolaty odporne na przynajmniej dwa aminoglikozydy spośród blisko 300 izolatów skolekcjonowanych w okresie od kwietnia 2000 do maja 2010 roku. Metodą podwójnych rozcieńczeń antybiotyku w podłożu stałym określono najmniejsze stężenie hamujące gentamicyny, amikacyny, kanamycyny, neomycyny i streptomycyny w zakresie 256 – 1024 mg/l. Fragmentów genów: *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* i *npmA* poszukiwano stosując reakcję PCR. U 17 izolatów opornych na amikacynę i kanamycynę wykryto gen *armA*, jako jedyny kodujący metylazy. Analiza sekwencji nukleotydowej produktów PCR wykazała 100% zgodność z sekwencją referencyjną genu *armA* zdeponowaną w GenBank (accession no. AY22055). Co więcej, przeprowadzona analiza pozwoliła stwierdzić iż gen ten jest elementem składowym plazmidu pCTX- M-3 (GenBank, accession no. AF550415), którego obecność stwierdzono w wyizolowanym w Polsce szczepie *C. freundii*. W przeprowadzonych badaniach własnych, u wszystkich 17 izolatów wytwarzających ArmA poszukiwano również genów kodujących β -laktamazy ESBL z rodzin TEM, SHV i CTX-M. Stwierdzono, że wszystkie one wytwarzały ESBL typu CTX-M-3, zaś 11 izolatów wytwarzało także ESBL typu SHV. W przypadku wszystkich izolatów wytwarzających ArmA, z wyjątkiem jednego, obecny był plazmid należący do grupy niezgodności IncL/M. Choć profil plazmidowy badanych izolatów był różny (od 2 do 6 plazmidów o wielkości od ok. 3 do ok. 140 kb), to cechą charakterystyczną 15 izolatów było występowanie dużego plazmidu ok. 90 kb (o wielkości zbliżonej do pCTX- M-3). U dwóch pozostałych stwierdzono plazmid o wielkości ok. 130 kb. Z plazmidami tymi hybrydyzowała specyficzna sonda genu *armA*. Mapowanie genu *armA* wszystkich izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających metylazę ArmA wykazało, że jest on flankowany przez te same elementy, które wcześniej opisano w transpozonie Tn1548 wykrytym u *K. pneumoniae* ¹⁷. Różnicowanie genetyczne wykazało, że większość izolatów wytwarzających ArmA prezentowała niepowtarzalne profile PFGE.

Rezultatem prowadzonych przez nas badań w zakresie wytwarzania 16S rRNA metylaz było wykrycie i opisanie w 2011 roku, pierwszego w Europie szczepu należącego do gatunku *Klebsiella pneumoniae*, który wytwarzał jednocześnie metylazę ArmA i KPC (czwarta z kolei praca w prezentowanym cyklu badawczym). Badaniom poddano 5 niespokrewnionych, klinicznych izolatów *K. pneumoniae*. Izolaty te charakteryzowały się opornością na wiele antybiotyków, w tym na ertapenem i meropenem – co sugerowało wytwarzanie karbapenemazy, a 4 z nich dodatkowo posiadało wysoką wartość MIC aminoglikozydów (1024 μ g/ml) – co sugerowało zaś wytwarzanie

16S rRNA metylazy. W przypadku tych izolatów, stosując technikę PCR wykryto obecność genów *bla_{KPC}* i *armA*. Geny te były przenoszone na dwóch różnych plazmidach o wielkości odpowiednio ok. 50 kb. i ok. 90 kb. Ponadto, te 4 izolaty z genem *bla_{KPC}* i *armA* posiadały także gen kodujący ESBL typu CTX-M. Ustalono również obecność wariantu KPC-2, którego występowanie wcześniej opisano w Polsce wśród *K. pneumoniae* ST258¹⁸. Przeprowadzona przez nas analiza MLST wykazała także przynależność badanego izolatu do ST258. Genotypowanie przeprowadzone metodą PFGE pozwoliło wyodrębnić cztery genotypy o bardzo wysokim stopniu podobieństwa (93,5%), co sugerowało klonalność badanych izolatów. Opisane współwystępowanie KPC i ArmA wskazuje na wysokie ryzyko wyselekcjonowania takich szczepów w wyniku zastosowania skojarzonej antybiotykoterapii z użyciem karbapenemów i aminoglikozydów. Świadczyć może też o znacznym potencjale dostosowawczym szczepów szpitalnych w celu utrzymania się w środowisku, w którym prowadzona jest terapia skojarzona.

W świetle powyższego oraz w związku ze stwierdzonym w badaniu pilotażowym (Piekarska K. i wsp. Występowanie w jednym z warszawskich szpitali pałeczek *Enterobacteriaceae* wytwarzających 16S rRNA metylazę ArmA. *Med Dośw Mikrobiol.* 2010; 62: 201-209.) ponad 2% odsetku szczepów *Enterobacteriaceae* wytwarzających 16S rRNA metylazy, jak również braku wiedzy w zakresie częstości występowania metylaz w Polsce uznałam, że problem ten wymaga kontynuacji badań. Tak więc, w kolejnej pracy podjęłam próbę oszacowania częstości występowania izolatów wytwarzających 16S rRNA metylazy (ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, NpmA) wśród szpitalnych izolatów *Enterobacteriaceae* opornych na aminoglikozydy. W badaniach prospektywnych prowadzonych w wieloprofilowym szpitalu w okresie od 19 kwietnia do 19 września 2010 roku, spośród ogólnej liczby 1770 *Enterobacteriaceae* wytypowano 113 izolatów opornych na dwa aminoglikozydy. Dla tych szczepów określono najmniejsze stężenia gentamicyny, kanamycyny, amikacyny i neomycyny hamujące wzrost bakterii stosując metodę podwójnego rozcieńczenia antybiotyku w podłożu stałym. Wysokie wartości MIC (MIC ≥ 128 mg/l) gentamicyny, kanamycyny i amikacyny stwierdzono w przypadku 20 izolatów, takich gatunków jak: *E. cloacae* (n=15), *K. pneumoniae* (n=3), *C. freundii* (n=1) i *P. mirabilis* (n=1). Wszystkie te izolaty, z wyjątkiem jednego, charakteryzowała niska wartość MIC neomycyny (w zakresie 1 – 8 mg/l). Natomiast wysoka wartość MIC neomycyny w przypadku wspomnianego izolatu sugerowała potencjalną obecność rzadko spotykanej 16S rRNA metylazy – NpmA. Jednak w przypadku badanych izolatów stwierdzono wyłącznie obecność genu *armA* kodującego metylazę ArmA. Nie wykryto genów kodujących inne

¹⁸ Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fiett J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Kern-Zdanowicz I, Filczak K, Łopaciuk U. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:4565-7.

metylazy (NpmA, RmtA, RmtB i RmtC). W związku z powyższym, oporność na neomycynę mogła być spowodowana obecnością innego enzymu, np. modyfikującego aminoglikozydy, który był wytwarzany wraz z ArmA. Uzyskane wyniki potwierdziły obserwacje innych badaczy, iż w Europie ArmA jest najczęściej występującą metylazą. Genotypowanie 17 izolatów wytwarzających ArmA przeprowadzone metodą PFGE, pozwoliło stwierdzić ich znaczne zróżnicowanie genetyczne, co świadczyć może o horyzontalnym rozprzestrzenianiu się mechanizmu ArmA.

W przeprowadzonych badaniach częstość występowania 16S rRNA metylazy ArmA określono na poziomie 1,2%, w tym w poszczególnych gatunkach odpowiednio: u *K. pneumoniae* – 0,4%, *P. mirabilis* – 0,8% i *E. cloacae* – 5,9%. Uzyskany odsetek (1,2%) świadczy o tym, że w Polsce częstość występowania ArmA jest wyższa niż w innych krajach europejskich (Grecja – 0,3%, Belgia – 0,12%), jednak pozostaje niższa niż w Korei – 2,8% czy Chinach – 3,8%. Ponadto stwierdzono również, że wykryty odsetek izolatów *E. cloacae* wytwarzających ArmA był wyższy niż odnotowany w Korei Południowej – 3,9% i niższy niż w Chinach – 10%.

Przedstawione badania były pierwszymi w Polsce badaniami prospektywnymi w zakresie częstości występowania tego istotnego mechanizmu oporności. Co więcej, tego typu prospektywne badania poświęcone ocenie częstości występowania *Enterobacteriaceae* wytwarzających 16S rRNA metylazy są także rzadkie w Europie.

Wnioski

1. Wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* izolowanych od pacjentek szpitala położniczo-ginekologicznego i od noworodków występuje nieznaczny odsetek szczepów opornych na aminoglikozydy, co świadczy o znikomej możliwości rozprzestrzeniania się drobnoustrojów wytwarzających 16S rRNA metylazy w populacji osób zdrowych.
2. W badaniu pilotażowym przeprowadzonym w szerokoprofilowym szpitalu, w którym przebywali pacjenci poddawani długotrwałej antybiotykoterapii stwierdzono występowanie pałeczek *Enterobacteriaceae* wytwarzających 16S rRNA metylazę ArmA.
3. Gen *armA* przenoszony jest zwykle w dużym koniugacyjnym plazmidzie (ok. 90 kb) i jest horyzontalnie przekazywany pomiędzy szczepami należącymi do różnych gatunków *Enterobacteriaceae*.

4. W Polsce, stwierdzono występowanie szczepów *K. pneumoniae* kumulujących dwa mechanizmy o szerokim spektrum oporności, tj. karbapenemazę KPC i 16S rRNA metylazę ArmA.
5. 16S rRNA metylaza ArmA występuje u różnych gatunków *Enterobacteriaceae*.

Temat badawczy 4 – Oporność na karbapenemy

Piekarska K., Zacharczuk K., Szych J., Zawidzka E., Wilk E., Wardak S., Jagielski M., Gierczyński R. Występowanie w jednym z warszawskich szpitali pałeczek *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających karbapenemazę typu KPC. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 2010, 62: 9-20.

Piekarska K., Zacharczuk K., Rzeczkowska M., Wołkowicz T., Januszkiewicz A., Podsiadły E., Demkow U., Gierczyński R. Probable interspecies transfer of the *bla_{VIM-4}* gene between *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* in single infant patent. *Pol. J. Microbiol.* 2015; 64: 387-9.

Antybiotyki z grupy karbapenemów postrzegane są jako leki ostatniej szansy w terapii ciężkich, zagrażających życiu zakażeń. Rezultatem nadmiernego stosowania tej grupy antybiotyków w terapii zakażeń wywołanych przez pałeczki *Enterobacteriaceae*, szczególnie w odniesieniu do szczepów wytwarzających ESBL, było pojawienie się mechanizmów oporności na tę grupę leków. Mechanizmy te to grupa β -laktamaz (karbapenemaz), która w wyniku zmian strukturalnych prowadzących do poszerzenia spektrum substratowego nabyła zdolność do hydrolizy pierścienia β -laktamowego w cząsteczkach karbapenemów. Z epidemiologicznego punktu widzenia oraz z uwagi na tempo rozpowszechnienia, do grupy enzymów o szczególnym znaczeniu należą: KPC, NDM, OXA-48 i VIM.

Karbapenemazę KPC, której pierwotne występowanie ograniczone było do pałeczek z gatunku *K. pneumoniae* (stąd nazwa KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), po raz pierwszy opisano w 2001 roku w USA¹⁹. Od tego momentu na całym świecie, także w Polsce¹⁸, obserwowane jest zjawisko intensywnego narastania oporności różnych gatunków Gram-ujemnych pałeczek na karbapenemy, m. in. w wyniku nabywania karbapenemazy typu KPC. Wytwarzanie tej karbapenemazy warunkowane jest obecnością genu *bla_{KPC}*, występującego na ruchomych elementach genetycznych, co sprzyja ich szybkiemu rozprzestrzenianiu wśród szczepów szpitalnych należących do różnych gatunków, przyczyniając się do występowania ognisk szpitalnych. Ze względu na istotę problemu, w pierwszej pracy przedstawionej w tym temacie badawczym, podjęłam próbę

¹⁹ Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1151-61.

scharakteryzowania pałeczek *K. pneumoniae*, wytwarzających karbapenemazę KPC, wyizolowanych w jednym z warszawskich szpitali. Badaniom poddano 11 izolatów wyosobnionych w ciągu 5 miesięcy, u których w ramach rutynowo prowadzonej diagnostyki stwierdzono oporność na ertapenem. Stanowiło to podstawę podejrzenia, że są one potencjalnymi producentami karbapenemazy typu KPC. Lekowrażliwość na 15 wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków określono stosując metodę dyfuzyjno-krażkową. Profil lekowrażliwości wyraźnie wskazywał, że szczepy te charakteryzują się opornością na antybiotyki reprezentujące różne grupy strukturalne i funkcjonalne, czyli posiadają fenotyp MDR, co było zgodne z obserwacjami innych autorów. Opisanym przez Doi i wsp.²⁰ testem fenotypowym z zastosowaniem kwasu boronowego jako inhibitora, potwierdzono zdolność wytwarzania karbapenemazy KPC. Obecność genu *bla_{KPC}* potwierdzono w reakcji PCR stosując startery opracowane we własnym zakresie komplementarne do wysoce konserwatywnych fragmentów genu *bla_{KPC-2}*, zaś haplotyp genu określono przeprowadzając analizę sekwencji nukleotydów i wykazując 100% homologię 811 nukleotydów badanego szczepu z referencyjną sekwencją odniesienia znajdującą się w GenBank (accession no. AY034847). Analiza potwierdziła wytwarzanie wariantu 2 karbapenemazy KPC (KPC-2) a prezentowana praca była drugim w Polsce doniesieniem o występowaniu pałeczek *K. pneumoniae* wytwarzających KPC-2. W przedstawionej pracy, podobieństwo genetyczne izolatów określono stosując technikę PFGE, która jest uznawana za standard w genotypowaniu *Enterobacteriaceae* i była stosowana przez wielu autorów prac badawczych w zakresie szerzenia zakażeń wywołanych szczepami wytwarzającymi KPC. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na epidemiczne szerzenie się wśród pacjentów szpitala pałeczek *K. pneumoniae* wytwarzających KPC należących do tego samego szczepu *sensu stricto*. Niezmiernie istotne jest by w sytuacji, gdy na terenie szpitala w dość krótkim czasie dochodzi do wzrostu odsetka szczepów wytwarzających KPC, wprowadzić odpowiednie działania mające na celu zidentyfikowanie osób zakażonych i ewentualnych nosicieli, celem ich odizolowania oraz by zapobiec w ten sposób dalszemu rozprzestrzenianiu się tego zagrożenia. Dlatego też w prezentowanej pracy posłużono się najbardziej dostępnymi metodami badawczymi w tym celu, by podobne badania mogły być prowadzone w jak najliczniejszej liczbie laboratoriów w kraju, co umożliwiło by szybkie i bezpośrednie uzyskanie informacji niezbędnych dla kontroli i ograniczenia szerzenia się szczepów wytwarzających KPC.

²⁰ Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. J Clin Microbiol. 2008;46:4083-6.

Aktualnie na całym świecie bakterie wytwarzające karbapenemazy stały się dominującym problemem zdrowia publicznego. Metallo- β -laktamazy, które do niedawna wykrywane były u Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących w ostatnich latach zaczęły także pojawiać się wśród pałeczek *Enterobacteriaceae*. Spośród metallo- β -laktamaz oprócz NDM (New Delhi MBL), to właśnie enzymy VIM (Verona integron-encoded MBL), ze względu na swe możliwości do rozpowszechniania i znaczenie kliniczne, odgrywają istotną rolę w oporności na karbapenemy. W 2001 roku po raz pierwszy stwierdzono wytwarzanie plazmidowo kodowanego enzymu wariant VIM-4 u *Pseudomonas aeruginosa* wyizolowanego w Grecji ²¹. Wkrótce w tym gatunku wariant VIM-2 i VIM-4 zaczęto odnotowywać także w innych krajach europejskich, w tym także i w Polsce ^{22, 23}. Jednak, pierwsze doniesienie dotyczące pojawienia się w naszym kraju szczepu *K. pneumoniae* wytwarzającego MBL typu VIM pochodzi z 2010 roku ²⁴. W przedstawionej, drugiej w tym temacie badawczej pracy, zaprezentowałam dwa gatunki *Enterobacteriaceae*, tj. *E. cloacae* i *K. pneumoniae*, wytwarzające VIM-4 wyizolowane w Polsce w 2010 roku od 1-miesięcznego dziecka oraz przedstawiłam dowody świadczące o międzygatunkowej transmisji koniugacyjnego plazmidu przenoszącego gen *bla*_{VIM-4} stanowiącego element integronu należącego do klasy 1. Dziecko z niską wagą urodzeniową i martwiczym zapaleniem jelit było poddawane leczeniu antybiotykami o szerokim spektrum, w tym meropenemem. Wkrótce, od dziecka wyizolowano szczepy *E. cloacae* (16.07.2010) i *K. pneumoniae* (21.07.2010) o obniżonej wrażliwości na ertapenem (wartość MIC 0,75 mg/l). Dla izolatów tych określono wrażliwość na antybiotyki stosując paski z gradientem stężeń. W przypadku obu izolatów stwierdzono podwyższone wartości MIC imipenemu (*E. cloacae* - 0,5 mg/l i *K. pneumoniae* - 0,75 mg/l) oraz meropenemu (odpowiednio, 0,19 mg/l i 0,38 mg/l). W związku z tym, że wytwarzanie MBL nie zawsze powoduje ujawnienie się oporności *in vitro*, obydwa izolaty poddano badaniom testem fenotypowym i stwierdzono u nich zdolność wytwarzania karbapenemazy typu MBL. Obecność genu VIM stwierdzono za pomocą reakcji PCR. Stosując analizę sekwencji nukleotydów określono wariant 4 enzymu VIM

²¹ Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouveleakis LS, Maniatis AN. Novel variant (*bla*(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene *bla*(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:4026-8.

²² Fiett J, Baraniak A, Mrówka A, Fleischer M, Drulis-Kawa Z, Naumiuk Ł, Samet A, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Molecular epidemiology of acquired-metallo-beta-lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:880-6.

²³ Patzer JA, Walsh TR, Weeks J, Dzierzanowska D, Toleman MA. Emergence and persistence of integron structures harbouring VIM genes in the Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, 1998-2006. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:269-73.

²⁴ Sękowska A, Gospodarek E, Kruszyńska E, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Duljasz W, Kusza K, Wawrzyniak K. First isolation of metallo-beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* strain in Poland. *Anestezjol Intens Ter.* 2010;42:27-30.

i scharakteryzowano środowisko genetyczne genu *bla_{VIM}*. Na podstawie przeprowadzonej hybrydyzacji DNA/DNA Southern-blot z sondą VIM stwierdzono, że gen *bla_{VIM}* zlokalizowany jest w dużym plazmidzie. W przeprowadzonej elektroporacji obydwie geny zostały przeniesione do *Escherichia coli* DH5α (szczep biorca wrażliwy na antybiotyki). Najmniejsze stężenia hamujące (MIC) dla szczepu *E. coli* DH5α i uzyskanych transformantów zaprezentowane w tabeli, wskazują na podwyższenie wartości MIC karbapenemów w szczepie biorcy. Wykazano również, że gen *bla_{VIM-4}* zlokalizowany jest w integronie wbudowanym w plazmid o wielkości ok. 90 kb. Ta lokalizacja genu w mobilnym środowisku przyczynia się do efektywnego, horyzontalnego – zarówno wewnątrz- jak i międzygatunkowego – szerzenia się zdolności do wytwarzania MBL wśród Gram-ujemnych pałeczek. Co więcej, analiza sekwencji przy użyciu blast-n (NCBI) wykazała, że wykryty integron wykazuje 100% homologię z integronem znalezionym w szczepie *P. aeruginosa* wyizolowanym na Węgrzech (accession no. GU181265) oraz wykazała bliskie pokrewieństwo z integronem stwierdzonym w szczepie *P. aeruginosa* wyizolowanym w Polsce (accession no. AJ585042). Integrony te różniły się tylko dwiema mutacjami punktowymi (T1670G i C1671T). Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują na transfer genu *bla_{VIM-4}* pomiędzy dwoma gatunkami należącymi do rodziny *Enterobacteriaceae* tj. *E. cloacae* i *K. pneumoniae* u tego samego pacjenta. Podobny fenomen przeniesienia VIM-4 pomiędzy gatunkami *E. cloacae* i *K. pneumoniae* inni autorzy opisali u 72- letniego pacjenta otrzymującego czterotygodniową terapię imipenemem²⁵. Co więcej, wyniki zaprezentowane w tej pracy, wskazują *P. aeruginosa* jako potencjalne źródło VIM-4 stwierdzone u *Enterobacteriaceae*.

Wnioski

1. Szczepy wytwarzające KPC stanowią poważny problem epidemiologiczny i terapeutyczny, co ściśle związane jest z faktem, że są one często wielolekooporne i zdolne do szybkiego rozprzestrzeniania genów warunkujących mechanizmy oporności wśród flory bakteryjnej pacjentów w szpitalu leczonych antybiotykami.
2. Stosowanie karbapenemów doprowadza do selekcji szczepów niewrażliwych, poprzez nabycie genów znajdujących się na ruchomych elementach genetycznych zarówno między gatunkami tej samej rodziny, jak i gatunkami należącymi do różnych rodzin.

²⁵ Luzzaro F., Docquier J-D, Colinon C, Endmimiani G, Lombardi G, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo-β-lactamase encoded by conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 648-650.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Przedstawiony powyżej cykl publikacji dotyczący występujących u *Enterobacteriaceae* wybranych mechanizmów oporności kodowanych plazmidowo jest ściśle związany z tematyką lekooporności drobnoustrojów, którą zajmowałam się od chwili rozpoczęcia pracy zawodowej w NIZP-PZH w 2000 roku. Z tą tematyką związane były też projekty badawcze KBN i NCN realizowane z moim udziałem, początkowo jako wykonawca - 2006 r., a w 2011 r. jako kierownik projektu (Załącznik 4). Problematyki lekooporności dotyczyła również moja rozprawa doktorska, zatytułowana „Genetyczne uwarunkowania mechanizmów oporności na fluorochinolony szczepów *Enterococcus faecalis* izolowanych z materiału klinicznego”, w której przy użyciu testów fenotypowych i technik biologii molekularnej przedstawiłam charakterystykę mechanizmów oporności występujących u cechujących się zróżnicowanym stopniem wrażliwości na fluorochinolony szczepów *E. faecalis* ²⁶, ²⁷, ²⁸. Ponadto, wśród badanych szczepów *E. faecalis* scharakteryzowałam również potencjał chorobotwórczy poprzez określenie występowania wybranych genów związanych z wirulencją i ustalenie czy istnieje związek pomiędzy wirulotypem a opornością na fluorochinolony ²⁹.

Po obronie pracy doktorskiej, w ramach realizacji zadań badawczych wykonywanych w Pracowni Bakteryjnych Zakażeń Układu Oddechowego Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH, zakres prowadzonych przeze mnie badań rozszerzyłam o tematykę dotyczącą zakażeń dróg oddechowych wywołanych przez drobnoustroje, takie jak *Mycoplasma*, *Legionella* i *Bordetella*. Moje zainteresowania diagnostyką tych istotnych drobnoustrojów znalazły odzwierciedlenie w publikacjach i doniesieniach zjazdowych. Szczegółowy wykaz pozostałych opublikowanych prac wraz z moim wkładem oraz wykaz doniesień zjazdowych został zawarty w Załączniku 4 do niniejszego autoreferatu.

Mycoplasma pneumoniae, ze względu na brak ściany komórkowej i swą niewrażliwość na antybiotyki β -laktamowe zaliczana do grupy drobnoustrojów atypowych, uważana jest za jeden z najpowszechniejszych bakteryjnych czynników pozaszpitalnych zapaleń płuc (CAP, community-

²⁶ Piekarska K., Gierczyński R., Ławrynówicz-Paciorek M., Kochman M., Jagielski M. 2008. Novel gyrase mutations and characterization of ciprofloxacin-resistant clinical strains of *Enterococcus faecalis* isolated in Poland. Pol. J. Microbiol. 57: 121-124.

²⁷ Piekarska K., Jagielski M. 2007. Genetyczne uwarunkowania mechanizmów oporności na fluorochinolony szczepów *Enterococcus faecalis* izolowanych z materiału klinicznego. Część I. Charakterystyka badanych szczepów. Med. Dośw. Mikrobiol. 59: 317-28.

²⁸ Piekarska K., Jagielski M. 2007. Genetyczne uwarunkowania mechanizmów oporności na fluorochinolony szczepów *Enterococcus faecalis* izolowanych z materiału klinicznego. Część II. Mutacje w QRDR genów *gyrA*, *gyrB*, *parC* i *parE*. Med. Dośw. Mikrobiol. 59: 329-41.

²⁹ Piekarska K., Jagielski M. 2007. Występowanie genetycznych markerów wirulencji w genomowym DNA szczepów *Enterococcus faecalis* izolowanych z materiału klinicznego od osób chorych i zdrowych. Med. Dośw. Mikrobiol. 59: 207-16.

acquired pneumonia). Ponieważ w przebiegu zakażenia tym drobnoustrojem brak jest swoistych objawów klinicznych jedynie właściwie przeprowadzona diagnostyka laboratoryjna umożliwia szybką identyfikację patogenu i zastosowanie odpowiedniego leczenia. Na przykładzie konkretnego przypadku chorobowego (pacjentki z objawami zapalenia płuc) omówiłam wady i zalety poszczególnych metod diagnostycznych stosowanych w rozpoznaniu zakażenia wywołanego przez *M. pneumoniae* ³⁰.

Pałeczki *Legionella*, które zasiedlają naturalne i sztuczne zbiorniki wodne, sieć wody ciepłej i zimnej oraz różnego rodzaju urządzenia wytwarzające aerozole coraz częściej stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka będąc przyczyną zapalenia płuc o ciężkim przebiegu tzw. choroby legionistów, legionelozy. Do zakażenia najczęściej dochodzi u osób wrażliwych na skutek inhalacji zakażonego aerozolu. Rozpoznanie legionelozy wymaga potwierdzenia laboratoryjnego. Opóźnienie w rozpoczęciu leczenia znacznie zwiększa ryzyko zgonu. Wyniki badań dotyczące wykrywania pałeczek *Legionella* w materiale klinicznym zaprezentowałam również w formie doniesienia zjazdowego podczas XXVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Lublinie ³¹.

Moje zainteresowanie pałeczkami *Legionella* sprawiło, że swoje badania poszerzyłam także w zakresie molekularnego typowania szczepów *Legionella pneumophila* techniką SBT (Sequence-Based Typing). Metoda SBT umożliwia porównanie izolatów pochodzących zarówno z próbek klinicznych, jak i środowiskowych a uzyskane dane są pomocne przy ustalaniu źródła infekcji i epidemiologicznych powiązań. Wdrożona przeze mnie metoda, została sprawdzona w ramach międzynarodowego sprawdzianu External Quality Assessment mającego na celu udoskonalenie technik badawczych stosowanych w wysokospecjalistycznych laboratoriach zajmujących się diagnostyką pałeczek *Legionella* a uzyskane wyniki zostały opisane w polskojęzycznej publikacji celem rozpropagowania wśród pracowników laboratoriów mikrobiologicznych ³².

Zgodnie z profilem prowadzonej przeze mnie Pracowni Diagnostyki Bakteriologicznej aktywnie współpracuję z trzema sieciami badawczymi koordynowanymi przez Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC), pełniąc w nich rolę Operational Contact Point for Microbiology, tj. ELDSNet (European Legionnaires` Disease Surveillance Network), EUPert-LabNet

³⁰ Piekarska K., Rastawicki W., Michalak A., Rzeczowska M., Kamińska T., Wojtas G., Paradowska-Stankiewicz I. 2015. Wady i zalety mikrobiologicznych metod diagnostycznych stosowanych w rozpoznaniu zakażenia wywołanego przez *Mycoplasma pneumoniae* na przykładzie wybranej sytuacji klinicznej. Med. Dośw. Mikrobiol. 67: 39-46.

³¹ Rzeczowska M., Piekarska K., Misiurewicz-Stypułkowska H. 2012. Wykrywanie pałeczek *Legionella* w ramach międzynarodowego sprawdzianu ELDSNet. XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Drobnoustroje bez granic”, Lublin. Sesja X, P-X-427.

³² Piekarska K., Rzeczowska M., Stypułkowska-Misiurewicz H. 2013. Sequence-based typing – molekularne typowanie szczepów *Legionella pneumophila* w ramach międzynarodowego sprawdzianu External Quality Assessment. Med. Dośw. Mikrobiol. 65: 103-10.

(European Pertussis Laboratory Network) oraz FWD-Net (European Food- and Waterborne Diseases and Zoonoses Network).

Współpracę z europejską siecią badawczą ELDSNet rozpoczęłam w 2011 roku. Głównym celem tej sieci jest wzmocnienie i poprawa nadzoru, wykrywania i kontrolowania legionelozy oraz zapobieganie jej występowaniu w Europie. Efektem współpracy było udoskonalenie metod badawczych stosowanych w Laboratorium Bakteriologii NIZP-PZH w diagnostyce pałeczek *Legionella*. Podjęta współpraca umożliwiła mi również przeprowadzenie kontroli stosowanych przeze mnie metod poprzez udział w porównaniach międzylaboratoryjnych organizowanych w ramach zadań wyznaczonych przez ELDSNet. Rezultatem współpracy było również powstanie wielośrodkowej publikacji naukowej z moim współudziałem, w której dokonano oceny zmieniającej się sytuacji epidemiologicznej legionelozy w Europie w okresie ostatnich 5 lat ³³.

Od 2013r. współpracuję również z europejską siecią badawczą EUPert-LabNet, której celem jest poprawa nadzoru nad krztuścem w Europie oraz prowadzenie działań ukierunkowanych na właściwe rozpoznanie sytuacji epidemiologicznej krztuśca, wdrożenie i stosowanie odpowiednich metod diagnostycznych oraz ich porównanie, genotypowanie szczepów krążących i wyszczepialność w krajach EU. Wyniki prowadzonych badań w tym zakresie przedstawiłam w formie 2 posterów na Międzynarodowej Konferencji Naukowej Europejskiej Grupy Ekspertów EU-Pertgenomics/EU-Pertstrain odbywającej się 6-7.06.2013 r. w Warszawie ^{34, 35}.

Ponadto, wykonując rutynowo diagnostykę pałeczek *Bordetella*, opisałam również przydatność laboratoryjnych metod diagnostycznych w rozpoznaniu krztuśca na przykładzie osoby dorosłej z suchym, napadowym i przewlekłym kaszlem ³⁶. Krztusiec jest ostrą, wysoce zaraźliwą chorobą układu oddechowego o charakterystycznych objawach wywołaną przez pałeczkę *Bordetella pertussis*. Właściwa i wczesna diagnostyka umożliwia prawidłowe rozpoznanie choroby, pozwala na szybkie wdrożenie odpowiedniego leczenia i zastosowanie procedur zapobiegających szerzeniu się zakażenia. Wykrycie zakażenia pałeczkami krztuśca w przypadku osób dorosłych jest niezwykle

³³ Beauté J, The European Legionnaires' Disease Surveillance Network(w tym K. Piekarska). Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. Euro Surveill. 2017 Jul 6;22(27).

³⁴ Mosiej E., Polak M., Piekarska K., Rzeczkowska M., Jagielski M., Krysztopa-Grzybowska K., Zawadka M., Augustynowicz E., Lutyńska A. 2013. Pulsed-field electrophoresis analysis and antibiotic susceptibility of *Bordetella parapertussis* in Poland. EU-Pertgenomics/EU-Pertstrain meeting, Warsaw, Poland.

³⁵ Piekarska K., Rzeczkowska M., Dąbrowska-Iwanicka A., Rastawicki W., Paradowska-Stankiewicz I. 2013. Case report of confirmed pertussis in adult patient from Poland. EU-Pertgenomics/EU-Pertstrain meeting, Warsaw, Poland.

³⁶ Piekarska K., Rzeczkowska M., Rastawicki W., Dąbrowska-Iwanicka A., Paradowska-Stankiewicz I. 2014. Usefulness of laboratory methods in diagnosis of pertussis in adult with paroxysmal cough./Przydatność diagnostyki mikrobiologicznej w rozpoznaniu krztuśca u osoby dorosłej z napadowym kaszlem. *Przeg. Epidemiol.* 68: 633-636 (Pol. 735-738).

istotne ze względu na to, że przebieg choroby jest u nich nietypowy, a mogą oni stanowić potencjalne źródło zakażenia dla niemowląt, u których krztusiec może stanowić zagrożenie dla życia. Co więcej, zakres prowadzonych badań umożliwił mi w latach 2014-2015 podjęcie współpracy z Kliniką Oddziałem Pediatrycznym Szpitala Bielańskiego im. Ks. J. Popiełuszki w Warszawie. Założeniem przewodnim badań realizowanych w ramach współpracy była optymalizacja laboratoryjnej diagnostyki krztuśca w powiązaniu z realną oceną krążących szczepów *Bordetella* sp. w Polsce. Wdrożenie w Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH metod molekularnych oraz zastosowanie zwłaszcza metody real-time PCR umożliwiło pokonanie ograniczeń polegających na skróceniu czasu oczekiwania na wynik i postawienia właściwej diagnozy. Dało również możliwość zastosowania czulej metody u najmłodszych dzieci, u których z różnych względów nie można zastosować alternatywnych metod diagnostycznych (np. hodowli lub oznaczenia poziomu przeciwciał w surowicy). Oprócz tego, zastosowanie metody PCR lub real-time PCR z rekomendowanym przez ECDC wykorzystaniem dwóch markerów genetycznych charakterystycznych dla pałeczek krztuśca, tj. sekwencji insercyjnej – *IS481* i promotora toksyny krztuścowej – *ptxA-Pr* pozwoliło znacznie zwiększyć czułość metody. Część wyników przedstawiłam w postaci posteru podczas XXVIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Bydgoszczy³⁷. Uczestniczyłam również w opisanych w publikacji naukowej³⁸ badaniach dotyczących molekularnej charakterystyki izolatów *B. pertussis* krążących w Polsce w okresie od 1959 do 2013 r. w odniesieniu do szczepów stosowanych w szczepionkach obecnie i w przeszłości. Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić unikatową, genetyczną strukturę krążącej w Polsce populacji szczepów *B. pertussis* wskazując na ich specyficzną dla naszego kraju adaptację, co mogło być związane ze zmianami w składzie szczepionki pełnokomórkowej (WCV). W ramach zgłębiania ww. tematyki badawczej jako współautor uczestniczyłam również w przygotowaniu artykułu naukowego pt. „Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in Poland - the country with whole-cell primary vaccination” (praca w trakcie recenzji).

Ponadto, moje zainteresowania związane z tematyką oporności pałeczek *Enterobacteriaceae* na fluorochinolony zaowocowało w latach 2015-2017 podjęciem współpracy z Kliniką Urologii CMKP, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny im. W. Orłowskiego w Warszawie. Współpraca

³⁷ Piekarska K., Rzeczkowska M., Wolaniuk N., Polak M., Gierczyński R. 2016. Optymalizacja i ocena metody real-time PCR z wykorzystaniem sond hybrydacyjnych do wykrywania DNA pałeczek *Bordetella pertussis* w wymazach z jamy nosowo-gardłowej. XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Mikrobiologia – nowe wyzwania, nowe możliwości”, Bydgoszcz. Sesja IX. Biologia molekularna w mikrobiologii. P-284.

³⁸ Mosiej E., Zawadka M., Krysztopa-Grzybowska K., Polak M., Augustynowicz E., Piekarska K., Lutyńska A. 2015. Sequence variation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from Poland in the period 1959 – 2013. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 34: 147-52.

dotyczyła określenia udziału szczepów opornych na fluorochinolony wyhodowanych z wymazu z odbytu od mężczyzn poddawanych biopsji stercza (badanie pilotażowe). Czynnikiem najczęściej odpowiedzialnym za wystąpienie powikłań związanych z biopsją, pomimo zastosowanej profilaktyki (głównie fluorochinolonu) są należące do rodziny *Enterobacteriaceae* szczepy oporne na ciprofloksacynę. Ponadto, moim udziałem była także molekularna charakterystyka mechanizmów oporności na fluorochinolony występujących wśród badanych szczepów. Następnym etapem przeprowadzenia badania pilotażowego było zorganizowanie wieloośrodkowego badania, w które zaangażowanych zostało 12 klinik urologicznych wykonujących biopsję stercza w Polsce. Rezultatem przeprowadzonych badań było stwierdzenie relatywnie wysokiego (16%) udziału pałeczek *Enterobacteriaceae* niewrażliwych na fluorochinolony, które posiadały zróżnicowane mechanizmy oporności i szeroki zakres MIC ciprofloksacyny, co potencjalnie może wskazywać na podwyższone ryzyko wystąpienia powikłań w przypadku stosowania fluorochinolonów w profilaktyce zabiegów urologicznych (publikacja w przygotowaniu). Badanie przeprowadzono w ramach kierowanych przeze mnie zadań badawczych finansowanych ze środków statutowych NIZP-PZH w latach 2016- 2017 i zostało opisane w formie sprawozdań z działalności naukowej NIZP-PZH ^{39, 40}. Ponadto, rezultatem uzyskanych w ramach współpracy wyników były 3 doniesienia zaprezentowane na zjazdach Towarzystw Urologicznych ^{41, 42, 43} i 1 doniesienie zaprezentowane na XXVIII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Bydgoszczy ⁴⁴.

Do innych moich aktywności związanych z upowszechnianiem wiedzy o chorobach zakaźnych należało napisanie poświęconego zakażeniom gronkowcowym, ich epidemiologii i profilaktyce

³⁹ NIZP-PZH. Sprawozdanie z działalności naukowej NIZP-PZH w roku 2016. Warszawa 2017

⁴⁰ NIZP-PZH. Sprawozdanie z działalności naukowej NIZP-PZH w roku 2017. Warszawa 2018

⁴¹ Mokrzyś M., Szempliński S., Skrzypczyk M., Rosińska M., Piekarska K., Parda N., Gierczyński R., Lewicki A., Bełch Ł., Białek W., Bromiński G., Krajewski W., Purpurowicz Ł., Rogowski G., Sobkowiak J., Stamirowski R., Syryło T., Szymański I., Tworkiewicz J., Woroniecki M., Dobruch J. 2017. The impact of fluoroquinolone-resistant rectal flora on infectious complications and hospital admission rates following transrectal prostate biopsy – PROBIS study. 9th European Multidisciplinary Meeting on Urological Cancers. Barcelona, Spain. EUR Urol Supl; 16(10);e2657. P021.

⁴² Mokrzyś M., Szempliński S., Skrzypczyk M., Lewicki A., Rosińska M., Piekarska K., Parda N., Gierczyński R., Bełch Ł., Białek W., Bromiński G., Krajewski W., Purpurowicz Ł., Rogowski G., Sobkowiak J., Stamirowski R., Syryło T., Szymański I., Tworkiewicz J., Woroniecki M., Dobruch J. 2018. Prostate biopsy in Poland regarding European Association of Urology Guidelines on prostate cancer – PROBIS study. The 48th Scientific Congress of the Polish Urological Association, PTU18, Katowice, Poland. A Book of Abstracts: 2nd Poster Session: Optimizing the technique of prostate biopsy: 36

⁴³ Mokrzyś M., Szempliński S., Skrzypczyk M., Lewicki A., Rosińska M., Piekarska K., Parda N., Gierczyński R., Bełch Ł., Białek W., Bromiński G., Krajewski W., Purpurowicz Ł., Rogowski G., Sobkowiak J., Stamirowski R., Syryło T., Szymański I., Tworkiewicz J., Woroniecki M., Dobruch J. 2018. The impact of fluoroquinolone-resistant rectal flora on infectious complications and hospital admission rates following transrectal prostate biopsy in Poland – PROBIS study. The 48th Scientific Congress of the Polish Urological Association, PTU18, Katowice, Poland. A Book of Abstracts: 2nd Poster Session: Optimizing the technique of prostate biopsy: 35

⁴⁴ Piekarska K., Mokrzyś M., Wolaniuk N., Szempliński S., Dobruch J., Gierczyński R. 2016. Wysoki odsetek pałeczek *Enterobacteriaceae* opornych na ciprofloksacynę izolowanych od mężczyzn poddawanych biopsji stercza – badanie pilotażowe. XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Mikrobiologia – nowe wyzwania, nowe możliwości”, Bydgoszcz. Sesja III. Lekowrażliwość i mechanizmy oporności. P-132.

rozdziału w monografii, dedykowanej osobom zainteresowanym problematyką chorób zakaźnych w tym lekarzom, pielęgniarkom, pracownikom Inspekcji Sanitarnej oraz studentom kierunków medycznych.

Z racji zatrudnienia w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego- Państwowym Zakładzie Higieny, który nie prowadzi działalności dydaktycznej moja aktywność w tym zakresie ograniczyła się do wygłoszenia 2 referatów na krajowych konferencjach tematycznych.

1. Piekarska K. *Legionella pneumophila*: bieżące trendy w diagnostyce i epidemiologii. II Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka” 20-21.05.2016 r., Bydgoszcz.
2. Piekarska K. Oporność na fluorochinolony – niedoceniany problem zdrowia publicznego. Światowy Tydzień Wiedzy o Antybiotykach 20.11.2015 r., Warszawa.

Pozostała moja aktywność związana z działalnością dydaktyczną związana była z pełnieniem roli promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim oraz opiekuna naukowego studenckiej praktyki zawodowej i została szczegółowo opisana w odrębnym wykazie stanowiącym Załącznik 4 do niniejszego autoreferatu.

Do innych moich aktywności zaliczyć należy:

Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych

- **ELDSNet** – członek, role of Operational Contact Point (OCP) for Microbiology for legionellosis
- **EUPert-LabNet** – członek, role of Operational Contact Point (OCP) for Microbiology for pertussis
- **European Food- and Waterborne Diseases and Zoonoses Network (FWD-Net)** – członek, role of Operational Contact Point (OCP) for Microbiology for cholerae and shigellosis
- **Od 2013 do 2016 roku** – członek of Baltic Antibiotic Resistance collaborative Network (BARN)
- **Polskie Towarzystwo Mikrobiologów** - członek od 2000 roku. Od 2016 roku Członek Zarządu Oddziału Warszawskiego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego
- **Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych**

Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich

1. Uppsala University Hospital, Uppsalla, Sweden, maj 2016 – szkolenie w zakresie: „Infection prevention and control & AMR containment in everyday practice”.
2. Heath Protection Agency Centre for Infections, London, Wielka Brytania, marzec 2011 - szkolenie z zakresu wykrywania, identyfikacji i genotypowania pałeczek *Legionella*.

Udział w zespołach eksperckich

1. **Polski Komitet Normalizacyjny** Komitet Techniczny nr 300 ds. Medycznych Badań Laboratoryjnych In Vitro – od lipca 2015, Z-ca Przewodniczącego

Warszawa, 14.12.2018v

Katarzyna Pielarska

