

mgr Paweł Urbanowicz

**Mechanizmy szerzenia się enzymatycznej oporności na
karbapenemy wśród pałeczek *Pseudomonas aeruginosa*
wywołujących zakażenia szpitalne w Polsce -
badania molekularne i genomiczne**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Marek Gniadkowski

Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2022 r.

M. Gniadkowski

Słowa kluczowe

Pseudomonas aeruginosa, metallo- β -laktamazy, epidemiologia molekularna, wielolekooporność, zakażenia szpitalne, klony wysokiego ryzyka, genomika

Keywords

Pseudomonas aeruginosa, metallo- β -lactamases, molecular epidemiology, multidrug resistance, hospital-acquired infections, high-risk clones, genomics

Badania zawarte w niniejszej pracy były finansowane z grantu nr 2016/21/B/NZ7/02075, pt. “Wielolekooporne szczepy *Pseudomonas aeruginosa* wytwarzające metalo- β -laktamazy w Polsce; rozwój sytuacji epidemiologicznej na przestrzeni ponad 10 lat (2005-2015)”, przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS; Specjalnego Urządzenia Badawczego (SPUB) MIKROBANK 2 przyznanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego; Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków przyznanego przez Ministerstwo Zdrowia. Badania wykonane w Czechach były sfinansowane z grantów 17-29239A i NU20J-05-00033, przyznanych przez czeską Agencję Badań Zdrowia, a także Research and Training Grant (nr FEMS-GO-2018-126), otrzymanego od Federacji Europejskich Stowarzyszeń Mikrobiologicznych.

The research included in the dissertation was financed by the grant No. 2016/21/B/NZ7/02075, entitled: “Epidemiology of metallo- β -lactamase-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Poland over the last decade, 2005-2015”, awarded by the Polish National Science Centre as part of the OPUS competition; SPUB MIKROBANK 2 from the Polish Ministry of Science and Higher Education; Narodowy Program Ochrony Antybiotyków from the Polish Ministry of Health. Investigation done in the Czech Republic was financed by grants 17-29239A and NU20J-05-00033 from the Czech Health Research Council and Research and Training Grant (No FEMS-GO-2018-126) from the Federation of European Microbiological Societies.

moim Nauczycielom

Table of contents

1. List of publications included in the dissertation	6
2. List of abbreviations	7
3. Streszczenie	9
4. Summary	12
5. Introduction	14
5.1 Clinical significance of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
5.2 General remarks on antimicrobial resistance in <i>P. aeruginosa</i> . Acquired β -lactamases - activity and epidemiology	15
5.3 Mobile genetic elements associated with MBL genes	18
5.4 Population structure and clonality of <i>P. aeruginosa</i>	20
5.5 Molecular epidemiology of MPPA in Poland.....	23
6. Objectives of the study	29
7. Publications included in the dissertation	30
7.1 Molecular and genomic epidemiology of VIM/IMP-like metallo- β -lactamase-producing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> genotypes in Poland.	30
7.2 Epidemic territorial spread of IncP-2-type VIM-2 carbapenemase-encoding megaplasmids in nosocomial <i>Pseudomonas aeruginosa</i> populations.	62
7.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands.	84
7.4 "Ciężkozbrojny" <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : mechanizmy lekooporności i ich tło genetyczne.....	91
8. Discussion	110
9. Conclusions	120
10. References	121
11. Statements of co-authors of joint publications	143

1. List of publications included in the dissertation

1. **Urbanowicz P**, Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D, Hryniewicz W, Gniadkowski M. (2021) Molecular and genomic epidemiology of VIM/IMP-like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in Poland. *J Antimicrob Chemother.* 76 (9):2273-2284. DOI: 10.1093/jac/dkab188.
2. **Urbanowicz P**, Bitar I, Izdebski R, Baraniak A, Literacka E, Hrabák J, Gniadkowski M. (2021) Epidemic territorial spread of IncP-2-type VIM-2 carbapenemase-encoding megaplasmids in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Antimicrob Agents Chemother.* 65(4):e02122-20. DOI: 10.1128/AAC.02122-20.
3. **Urbanowicz P**, Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D, Ziółkowski G, Hryniewicz W, Gniadkowski M. (2019) *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands. *J Antimicrob Chemother.* 74(10):3117-3119. DOI: 10.1093/jac/dkz262.
4. **Urbanowicz P**, Gniadkowski M. (2017) "Ciężkozbrojny" *Pseudomonas aeruginosa*: mechanizmy lekooporności i ich tło genetyczne. *Kosmos* 66(1): 11-29.

2. List of abbreviations

AME - Aminoglycoside-Modifying Enzyme

AMR - Antimicrobial Resistance

BSI - Bloodstream Infection

CR - Carbapenem Resistance, Carbapenem-Resistant

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control

ESBL - Extended-Spectrum β -Lactamase

ES-OXA - Extended-Spectrum Oxacillinase

ICE - Integrative and Conjugative Element

ICU - Intensive Care Unit

IME - Integrative and Mobilizable Element

INICC - International Nosocomial Infection Control Consortium

MBL - Metallo- β -Lactamase

MDR - Multidrug Resistance, Multidrug-Resistant

MLST - Multilocus Sequence Typing

MPPA - MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa*

NRCST - National Reference Centre for Susceptibility Testing

PAGI - *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Island

PDR - Pan-Drug-Resistant

PFGE - Pulsed-Field Gel Electrophoresis

PPS - Point-Prevalence Survey

RND - Resistance-Nodulation-Division

RTI - Respiratory Tract Infection

SNP - Single Nucleotide Polymorphism

SSI - Surgical Site Infection

SSTI - Skin and Soft Tissue Infection

ST - Sequence Type

UTI - Urinary Tract Infection

VAP - Ventilator-Associated Pneumonia

WGS - Whole Genome Sequencing

WHO - World Health Organization

XDR - Extensively Drug-Resistant

3. Streszczenie

Szerząca się oporność na antybiotyki bakterii chorobotwórczych jest obecnie jednym z największych wyzwań stojących przed medycyną zakażeń. Szczególne zagrożenie stanowią Gram-ujemne patogeny oportunistyczne, takie jak *Pseudomonas aeruginosa*, które znakomicie przystosowują się do środowiska szpitalnego, m.in. łatwo pozyskując determinanty lekooporności, w tym geny metalo- β -laktamaz (MBL). Wytwarzanie MBL jest jednym z kluczowych mechanizmów oporności ze względu na zdolność tych enzymów do hydrolizy wszystkich stosowanych powszechnie penicylin, cefalosporyn i karbapenemów oraz ich niepodatność na działanie będących w użyciu inhibitorów β -laktamaz. Aktywność MBL jest najgroźniejszym z klinicznego i epidemiologicznego punktu widzenia źródłem oporności *P. aeruginosa* na karbapenemy, do niedawna jedyne leki „ostatniej szansy” w leczeniu zakażeń szpitalnych wywoływanych przez wielooporne drobnoustroje Gram-ujemne. Pierwsze badania rozprzestrzenienia wytwarzających MBL szczepów *P. aeruginosa* (MPPA) w Polsce, obejmujące 53 izolaty z 16 ośrodków z lat 1998-2004, wykazały regionalną dystrybucję ok. 10. ich odrębnych genotypów w siedmiu województwach. Po 2004r. odnotowano gwałtowny wzrost występowania MPPA w Polsce - w latach 2005-2015 potwierdzono 1314 przypadków w 258. szpitalach na terenie całego kraju.

Celem niniejszej pracy było wyjaśnienie podłoża intensywnego wzrostu liczby przypadków MPPA w okresie 2005-2015, z uwzględnieniem zjawisk dostrzeżonych już we wczesnej fazie badań (2000-2004). Na podstawie molekularnej i genomowej analizy kolekcji 454. izolatów klinicznych z całej Polski, planowano zbadać strukturę klonalną tej populacji oraz wskazać najczęstsze genotypy epidemiczne, odpowiedzialne za gros przypadków zakażeń. Charakterystyka genów MBL i zawierających je elementów genetycznych miała z kolei na celu ocenę roli horyzontalnego transferu genów w epidemiologii MPPA, ze szczególnym naciskiem na wielkocząsteczkowe, koniugacyjne plazmidy z genami MBL, zaobserwowane na początku lat 2000.

Uzyskane wyniki wykazały silne zróżnicowanie i znaczny stopień specyficzności polskiej populacji MPPA, zarówno pod względem struktury klonalnej, jak i genetycznych determinant MBL (genów MBL i zawierających je integronów klasy 1). Badanie pokrewieństwa wykazało, że ok. 75% badanych izolatów skupionych było w czterech typach sekwencyjnych: pandemicznych klonach ST235 i ST111 oraz sporadycznie do tej pory odnotowywanych ST273 i ST654. Populacje ST235 i ST111

obejmowały liczne genotypy, a analiza filogenetyczna całych genomów wykazała, że populacje te powstały w drodze międzynarodowego krążenia szczepów oraz intensywnego różnicowania się ich w kraju. W obrębie czterech dominujących klonów wyróżniono 10 głównych genotypów (kombinacji ST, pulsotypu i integronu MBL) o określonych zasięgach występowania geograficznego i czasowego, odpowiadających za ok. 55% wszystkich przypadków zakażeń MPPA. Analiza porównawcza z wybranymi szczepami z lat 2000-2004 wykazała, że dwa genotypy obecne były w niektórych szpitalach już od wczesnych lat 2000. Polskie szczepy MPPA w zdecydowanej większości wytwarzały MBL z rodziny VIM, z których VIM-2 był dominującym wariantem. Wszystkie geny MBL znajdowały się w integronach klasy 1, których liczba oraz zróżnicowanie strukturalne były wyjątkowo wysokie. Zidentyfikowano 46 tych elementów (w tym 29 nowych), stanowiących istotny czynnik specyficzności, albowiem 40 z nich występowało głównie lub tylko w Polsce. Równoległe do regionalnych lub międzyregionalnych epidemii klonalnych MPPA, już od roku 2000 zachodziło horyzontalne rozprzestrzenianie się megaplazmidów z grupy IncP-2, zawierających charakterystyczny integron In461 z genem *bla_{VIM-2}*. Wykazano, że ponad 15% wszystkich izolatów o dużym stopniu różnorodności genetycznej posiadało te plazmidy, dokumentując największą „epidemię plazmidu” opisaną dotąd u *P. aeruginosa*. Analiza genomowa pozwoliła określić miejsce plazmidów z serii pPUV w ewolucji cząsteczek typu IncP-2 na świecie oraz dokonać nowych spostrzeżeń na temat ich struktury i znaczenia poszczególnych regionów. W trakcie prac zidentyfikowano również odrębny genetycznie izolat *P. aeruginosa*, posiadający niezwykle szeroki zestaw 25. nabytych genów oporności, na czele z rzadkimi u tego gatunku wariantami MBL DIM-1 i NDM-1, kodowanymi w obrębie dwóch nieznanych dotąd wysp genomowych. Jako jedyny w kolekcji szczep ten należał do klonu ST234, analiza filogenetyczna zaś wskazała na jego najbliższe pokrewieństwo ze szczepami z zachodniej Afryki.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na przeważająco klonalny charakter ekspansji MPPA w Polsce. Trwająca od wczesnych lat 2000. wielotorowa ewolucja tych drobnoustrojów w środowiskach szpitalnych, z udziałem zdarzeń „importu” szczepów z innych krajów, doprowadziła do wyodrębnienia 10. genotypów o prawdopodobnie podwyższonym potencjale epidemicznym, rozprzestrzeniających się stopniowo w poszczególnych częściach kraju. Równoległe istotną rolę we wzroście występowania MPPA odgrywała epidemia megaplazmidów kodujących MBL. W niniejszej pracy przedstawiono unikatowy obraz sytuacji epidemiologicznej

występowania wybitnie niebezpiecznego patogenu w skali kraju na przestrzeni kilkunastu lat, uzyskany dzięki wnikliwej analizie molekularno-genomicznej obszernej, reprezentatywnej kolekcji szczepów.

4. Summary

The growing antimicrobial resistance (AMR) is one of the greatest challenges that infection medicine faces today. Opportunistic Gram-negative pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa*, pose a particular risk because these perfectly adapt to hospital environments, easily acquiring AMR determinants, including metallo- β -lactamase (MBL) genes. MBL production is one of the most dangerous AMR mechanisms due to the ability of the enzymes to hydrolyse all of the commonly used penicillins, cephalosporins and carbapenems, and their resistance to all β -lactamase inhibitors of currently clinical use. MBLs are the most clinically and epidemiologically relevant source of *P. aeruginosa* resistance to carbapenems, until recently the only last-resort drugs in the treatment of nosocomial infections caused by multidrug-resistant Gram-negative pathogens. The first studies on the spread of MBL-producing *P. aeruginosa* (MPPA) in Poland, including 53 isolates from 1998-2004 from 16 hospitals, showed regional epidemiology of around 10 individual MPPA genotypes in seven main administrative areas. After 2004 there has been observed a dramatic increase in the MPPA incidence in Poland: from 2005 to 2015 1,314 cases in 258 hospitals throughout the country were confirmed.

The aim of this study was to explain the basis of this extensive growth of the MPPA cases in 2005-15, with respect to the phenomena observed already in the early phase of the dissemination (2000-2004). By the molecular and genomic analysis of the MPPA strain collection (n=454) from the whole country, it was planned to reveal the clonal structure of the population, and indicate the crucial epidemic genotypes largely responsible for the MPPA spread overall. Characterization of the MBL genes and their genetic platforms was aimed at assessing the role of the horizontal gene transfer in the MPPA epidemiology, with a specific focus on large, conjugative MBL-encoding plasmids, originally observed in the early 2000s.

The analysis showed high diversity and remarkable specificity of the Polish MPPA population in terms of the clonal structure and MBL genetic determinants (class 1 integrons with MBL genes). Around 75% of the isolates were classified into four sequence types (STs): the pandemic clones ST235 and ST111, and ST273 and ST654 scarcely reported so far. The ST235 and ST111 subpopulations were internally diverse themselves, and arose from the international circulation of several genotypes and from their intense differentiation in the country. Among the ST235, ST111, ST273 and

ST654 isolates overall, 10 major genotypes (ST-pulsotype-MBL integron combinations) were distinguished, each characterised by different spatiotemporal distribution, accounting for approximately 55% of all MPPA cases. The comparative analysis of representative isolates from the early period (2000-2004) showed that two of these emerged in individual hospitals in the early 2000s. The vast majority of the Polish MPPA strains produced VIM-type MBLs, with VIM-2 being the predominant variant. All of the MBL genes were located within class 1 integrons, the number and structural diversity of which were very high. Forty-six such elements were identified altogether, including 29 new ones, greatly contributing to the overall specificity of the Polish MPPA, given that 40 integrons occurred mainly or only in the country. Along with regional and/or interregional clonal outbreaks of the individual genotypes, the extensive horizontal spread of IncP-2-type conjugative megaplasms with a specific VIM-2-encoding integron In461 was observed. More than 15% of all MPPA isolates carried these plasmids (pPUVs), thus documenting possibly the largest ‘plasmid epidemics’ ever reported in *P. aeruginosa*. The genomic analysis allowed positioning the pPUV lineage as a distinct branch in the phylogenetic tree of the IncP-2-like plasmids, and gaining insights into their structure and function of particular regions. Finally a single *P. aeruginosa* strain with a large set of 25 acquired AMR genes was identified during the study, including those of DIM-1 and NDM-1 MBLs observed rarely in the species. As the only one in the collection, the isolate belonged to the ST234 clone, and according to the phylogenetic analysis results, it was closest related to *P. aeruginosa* isolates from West Africa.

The results clearly indicated the largely clonal nature of the MPPA expansion in Poland. The multidirectional evolution of *P. aeruginosa* populations and MBL determinants in Polish hospitals, commenced in the early 2000s and replenished by the international exchange of strains, produced 10 major genotypes with possibly enhanced epidemic potential. Another significant factor was the spread of a specific lineage of IncP-2-type conjugative megaplasms. The entire study, carried out on a large representative collection of MPPA isolates, has provided a unique picture of epidemiology of these alarming pathogens on a country scale over more than decade.

Title: Spread of enzymatic resistance to carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa* causing nosocomial infections in Poland - molecular and genomic analyses.

5. Introduction

5.1 Clinical significance of *Pseudomonas aeruginosa*

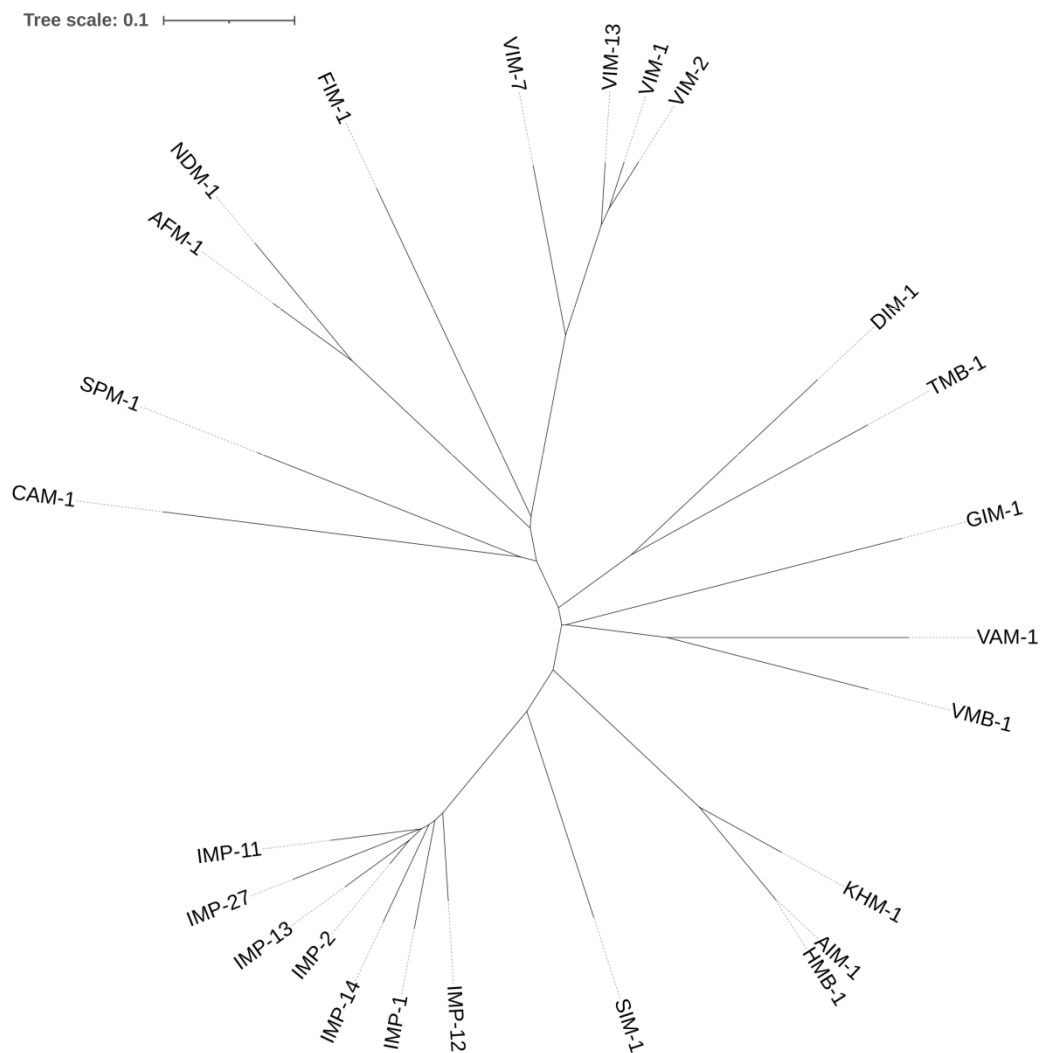
Pseudomonas is one of the most diversified and abundant genera in the whole bacteria kingdom, with 270 species discerned so far (<https://lpsn.dsmz.de/genus/pseudomonas>; as of 6th December, 2021). Of these, only a small portion is regarded to be human opportunistic pathogens, with the predominant position of *Pseudomonas aeruginosa*.(1, 2) This organism is associated with a wide variety of infections, acute or chronic, acquired mostly in hospital settings.(3) It has been identified especially as a prevalent etiological factor of RTIs, especially VAP, catheter-associated UTIs, SSTIs (including burn infections) and SSIs.(1) *P. aeruginosa* is a common factor of RTIs associated with late stages of the chronic obstructive pulmonary disease, and is responsible for around 70% of RTIs in patients with cystic fibrosis.(4) It is also frequently recognised as a pathogen causing life-threatening BSIs.(1) As the US National Healthcare Safety Network indicated, *P. aeruginosa* was the 4th most common species implicated in all adults' hospital-acquired infections in the USA, ranking 2nd among the factors of VAP and 3rd in catheter-related UTIs.(5) In Poland, the aggregated data from PPS studies conducted in ICUs during two periods, 2012-14 and 2017-18, placed *P. aeruginosa* among the top three etiological factors of BSIs, RTIs and SSIs reported.(6, 7) Mortality due to *P. aeruginosa* infection is relatively high, reaching about 20% of all cases, and increasing when associated with VAP to >30%, and close to 50% in severe BSIs.(8, 9) According to the latest INICC Consortium report, based on the data from 45 countries, hospital-acquired infections caused by *P. aeruginosa* have become a serious public health problem, especially when combined with its broad drug resistance.(10) This corresponds well with the classification of the organism into the group of pathogens responsible for most of the AMR-related threats, the so-called ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* species.(11, 12) Recently WHO urged the need of research and development of new antiinfectives specifically against carbapenem-resistant *P. aeruginosa*, which fell into the 'critical priority' category.(13)

5.2 General remarks on antimicrobial resistance in *P. aeruginosa*. Acquired β -lactamases - activity and epidemiology

P. aeruginosa is naturally resistant to numerous and diverse drugs (e.g. aminopenicillins, narrow-spectrum cephalosporins, cephamycins, cefuroxime, tetracyclines, trimethoprim); moreover, wild-type *P. aeruginosa* strains are less susceptible to even active antibiotics when compared to e.g. representatives of the *Enterobacteriales* order. All this phenomenon is referred to as 'intrinsic resistance' and it is due to the decreased outer membrane permeability (1/100 of that of the *Escherichia coli* outer membrane), relatively high overall activity of multiple RND-family efflux pumps, and the presence of chromosome-encoded drug-modifying/inactivating enzymes, especially the inducible class C β -lactamase (cephalosporinase) AmpC.(14-16) The natural mechanisms themselves, when modified and/or overexpressed owing to various AMR-associated structural or regulatory mutations, often lead to MDR phenotypes, making *P. aeruginosa* a pathogen especially difficult to combat.(17, 18) Moreover, this 'mutational resistome' is a highly favorable background for AMR mechanisms based on acquired genes, such as those encoding aminoglycoside resistance AME-type enzymes or β -lactamases. β -Lactamase-producing Gram-negative bacteria, including *P. aeruginosa*, started to be of high concern since the 1960s, when these enzymes commenced emerging and spreading one by one, and providing resistance to early penicillins and cephalosporins.(19, 20) In the 1st half of the 1980s the first ESBLs of the structural class A of β -lactamases were identified in enterobacteria, conferring resistance to modern antibiotics of that time, the expanded-spectrum (3rd-generation) cephalosporins and aztreonam.(21, 22) Short after, in 1991 the first ESBL-producing *P. aeruginosa* was recovered, expressing a unique enzyme PER-1.(23) Subsequently several other ESBL types were found originally or early, and some even preferentially in *P. aeruginosa*, like VEB, GES, BEL and PME β -lactamases.(24, 25) However, the major ESBL families CTX-M, SHV and TEM, common in *Enterobacteriales*, have been rare in *P. aeruginosa*.(24) and in general ESBLs remain not to be a highly relevant AMR mechanism in this organism.(26, 27) The same opinion may refer also to class D β -lactamases of similar activity, the ES-OXA enzymes, identified first in *P. aeruginosa* in 1991 too, that seem to be more specific for this species than ESBLs.(25, 28, 29)

Among all acquired β -lactamases, the most important role in *P. aeruginosa* is played by MBLs, belonging to class B. These constitute an outlier branch of the evolutionary tree of β -lactamases, characterised by a specific structure and mechanism

of catalysis, requiring Zn^{2+} ions as cofactors.(19, 30) Of three subclasses described so far, B1 is predominant, containing the majority of clinically relevant acquired MBLs, found not only in *P. aeruginosa*, but also in *Enterobacterales* and other Gram-negatives.(30-32) Mutual relationships between types of acquired MBLs is presented in Figure 1.



F

Fig. 1. Unrooted phylogenetic tree based on global alignment of acquired MBL nucleotide sequences. Representatives of selected IMP and VIM phylogroups were chosen for the analysis. The tree was inferred by the Neighbour Joining method using the Tamura-Nei model.

MBLs have a very broad substrate spectrum, hydrolysing all commonly used penicillins, cephalosporins and carbapenems, excluding monobactams, and being resistant to all β -lactamase inhibitors of currently clinical use.(30, 33) Particularly worrying is their high activity against carbapenems (carbapenemase activity), until recently defined as the only last-resort drugs in the treatment of infections due to MDR

Gram-negative bacteria.(30, 33-35) Despite the activity spectrum, the mere MBL expression at a typical level does not determine high-level resistance, which requires then *e.g.* mutations elevating the intrinsic resistance by the reduction of cell penetration by drugs.(34) The first acquired MBL, IMP-1, was identified in 1988 in *P. aeruginosa* from a Japanese hospital, and soon after the MPPA strains have spread over this country and more into the Far East.(36, 37) At the same time, the interspecies transfer of MBLs to *Enterobacterales* and *Acinetobacter* species was observed.(37, 38) In Europe, the first MPPA with VIM-1 or VIM-2 enzymes were isolated in the mid-1990s in Italy and France, respectively (39, 40), and almost immediately after in a dozen of other countries,(41) including Poland.(41-43). So far, MBLs have remained to be the most prevalent type of carbapenemases produced by *P. aeruginosa* clinical isolates;(32, 44) those of classes A (KPC, GES) or D (OXA) have been identified much less frequently.(3, 44, 45) Importantly, MBLs are among the most common acquired β -lactamases in *P. aeruginosa* in general,(46) with rates in some countries reaching even ~15% or ~30% clinical isolates.(47, 48) Of a number of MBL families identified so far, including those found only in *P. aeruginosa*, VIMs and IMPs prevail in this species, as demonstrated by surveillance studies and specific reports.(31, 32, 44, 46, 49) The VIM family consists of four main phylogroups, of which the biggest ones have been founded by the enzymes VIM-1/-4 and VIM-2.(39, 40, 50) Of all 74 variants identified so far (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene>, as of 6th December, 2021), the most prevalent is VIM-2, hydrolysing carbapenems more efficiently than VIM-1.(51) VIM-producing *P. aeruginosa* isolates have been reported globally, almost everywhere the surveillance data has been reported.(44, 46, 47, 52-64) IMPs are the second most common MBL/carbapenemase types produced by *P. aeruginosa*, observed also world-wide but more regularly in Asia.(25) Currently, 86 IMP variants have been identified (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene>, as of 6th December, 2021), with a dominant position of IMP-1, and a number of regionally-endemic enzymes, such as IMP-6 in Korea and China, IMP-7 in Czechia or IMP-13 in Italy.(25, 65-68)

The NDM-type MBLs differ substantially from VIMs and IMPs in epidemiological terms, mainly because in clinical settings these are associated largely with *Enterobacterales*.(32, 69) However, starting with the original identification in Serbia in 2010, NDM-producing *P. aeruginosa* isolates of different genotypes have been recorded in many countries, including those in North America, Europe, Africa and Asia.(62, 70-79) Other MBLs, often associated with *P. aeruginosa*, yet have been rarer

in general, and may have regionally endemic character. Of these, the most spread is the SPM type, identified first and then found to be the predominant MBL in *P. aeruginosa* in Brazil, with individual reports also from Switzerland, United Kingdom, China or Uganda.(18, 80-85) DIM- and SIM-producing *Pseudomonas* clinical strains have disseminated almost exclusively in Asia,(77, 86-89) with single case observed in Europe or Africa.(90, 91) The GIM and HMB types seem to be specific for Germany,(53, 92, 93) while the FIM and AIM enzymes have been unique for Italy and Australia, respectively, so far.(94, 95) Recently, *P. aeruginosa* isolates producing the CAM-1 MBL were identified in North America that has remained the first and the only place of their recovery to date.(96)

5.3 Mobile genetic elements associated with MBL genes

Multiple AMR-associated enzymes are encoded by specific mobile genetic elements, the integronic gene cassettes, and these include several MBL types (*e.g.* VIM, IMP, DIM, GIM), β -lactamases of other classes (*e.g.* VEB, GES, BEL, OXA-1/-2/-10 types), AMEs or dihydrofolate reductases conferring resistance to trimethoprim.(3, 29, 97-99) A large variety of other elements carry genes coding for the remaining MBLs (*e.g.* transposon Tn125 and its derivatives with NDM genes), other β -lactamases or AMR determinants in general.(3) The integronic gene cassettes consist of protein-coding regions (without promoters) and *attC* recombination sites, necessary for their recruitment via site-specific recombination into integrons, structures containing integrase IntI genes (*intI*) and *attI* recombination sites, and promoters driving expression of the incorporated cassettes. In the most common class 1 integrons the *intI1* gene, *attI* and the promoter form together the so-called 5' conserved segment (5'CS), whereas on the opposite side these usually contain the 3'CS with truncated *qacE* (*qacEAI*) and *sulI* cassettes (Figure 2), causing resistance to quaternary ammonium compounds and sulphonamides, respectively.(100) Integrons capture one or several cassettes in various combinations, and since these mainly code for AMR, single integrons with multiple genes may provide MDR phenotypes. Although relatively unstable due to *e.g.* cassette insertions, excisions or recombination, the gene cassette arrays are useful molecular markers in epidemiological studies of MBL-producing Gram-negative bacilli; a list of over 1,400 different class 1 integrons is available in the INTEGRALL database (<http://integrall.bio.ua.pt/>; as of 6th December, 2021).(102-104)

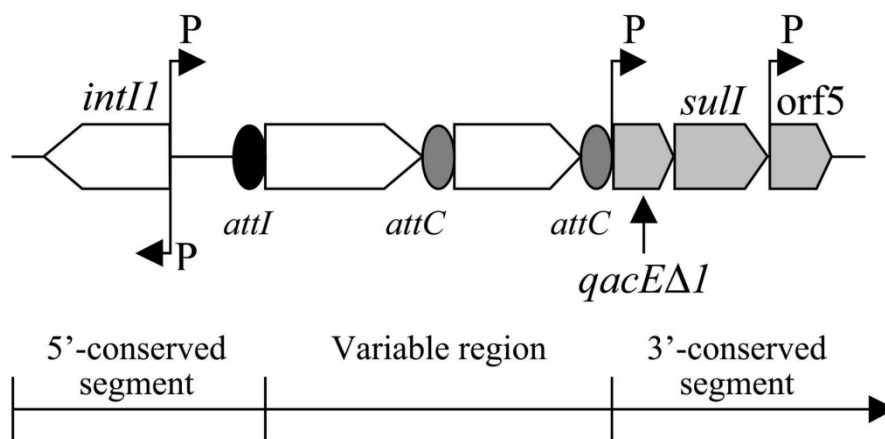


Fig. 2. Schematic structure of class 1 integrons. The *attI* and *attC* sites are shown by ovals while promoters are denoted by P; adapted from (101).

Class 1 integrons are derivatives of the Tn402 transposon, the mobility of which depends on the *tniCQBA* module; however, most of the integrons have this module truncated behind *qacEΔ1* and *sull*, and are defective in the transposition function. Therefore, these may move between *e.g.* the chromosome and plasmids only when mobilised *in trans* by functional Tn3 family transposons or when located within other transposable elements.(3, 102, 105)

Plasmids are autonomous self-replicating molecules spreading in bacterial populations vertically, but many plasmids transmit also horizontally between cells via conjugation.(30, 99) Transmissible plasmids (self-transferable or mobilizable) are common platforms for AMR genes, and their role in disseminating AMR in Gram-negative pathogens has been huge.(30, 99, 106) This refers also to *P. aeruginosa* and carbapenemase genes: plasmids carrying *e.g.* VIM/IMP-encoding integrons have been increasingly found in nosocomial isolates of this species.(107-117) Plasmids observed in *Pseudomonas* spp. have been classified into 14 incompatibility groups (IncP-1 - 14), some of which, like IncP-2, IncP-5, or IncP-7 types are of narrow host range and cannot be transferred to enterobacteria. Others, such as IncP-1 (IncP), IncP-3 (IncA/C) or IncP-4 (IncQ) cross the genus border, and are widely found in both pseudomonads and *Enterobacteriales*.(3, 99) The recent progress in WGS technologies allowed for comprehensive studies and highlighting the role of IncP-2-like plasmids in the AMR spread in *Pseudomonas* spp. populations. Originally observed in the 1970s, and associated with metabolic flexibility, AMR and environmental stress tolerance (118-121), these large molecules, sizing from ~300 to ~550 kb, are now increasingly observed not only with MDR determinants (MBL, AME, ArmA, QnrVC genes), but

also virulence factor genes (*pilT*, *pilG*, *pilB*, *che* operon). With high genetic plasticity and conjugative potential, IncP-2-type plasmids easily and efficiently diffuse across diverse *Pseudomonas* populations, becoming a serious epidemiological threat.(109, 110, 122-127)

Owing to the broad implementation of WGS, a growing attention has been also paid to other large genetic structures, the so-called genomic islands, which seem to be a vital part of bacterial genetics. A broad definition of GIs includes genomic elements with mobility functions, such as ICEs and IMEs, the latter requiring helper functions to conjugate. These may greatly contribute to diversification and environmental adaptation, carrying metabolic, virulence and/or AMR determinants.(99, 128, 129) ICEs contain self-conjugative transfer and integration modules, being hybrids of transposons/phages and plasmids, locating mostly in specific chromosome sites, such as tRNA gene loci.(3, 128) As Guglielmini et al. showed, these mobile elements are abundant in practically all prokaryotic clades, though are associated mostly with large genomes, such as in pseudomonads.(130) Of 28 ICE families described so far (<https://db-mml.sjtu.edu.cn/ICEberg2/>; as of 6th December, 2021), three were found in *P. aeruginosa* genomes: pKLC102, Tn₄₃₇₁ and *clc*. They differ mainly by the chromosomal integration site, integrase type and structural features.(3, 129) Since their first discoveries, the GIs (comprising PAGIs) have been increasingly associated with the AMR genes' dissemination and evolution, recently including also carbapenemase genes (*bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{SPM}*, *bla_{DIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*).(32, 131-133)

5.4 Population structure and clonality of *P. aeruginosa*

Recent genomic studies on large datasets have revealed the basic phylogenetic structure of the *P. aeruginosa* global population. Depending on the methodology adopted, 4-5 phylogroups were distinguished, with predominant groups 1 (or A) and 2 (B), differing in the content of specific resistance and virulence genes (Figure 3).(134, 135) These genetically isolated clusters have high intra-group (but not inter-group) recombination rate, which gives rise to multiple different genotypes, thus creating a dispersed population structure within the phylogroups and overall.(135, 136) Nevertheless, a limited number of apparently stable or 'successful' clones have been observed too, often being organisms specifically adopted to peculiar habitats or physiological niches, like the hospital environment and/or human infection. However, some successful clones, e.g. ST17, may be of broad environmental tolerance, exhibiting

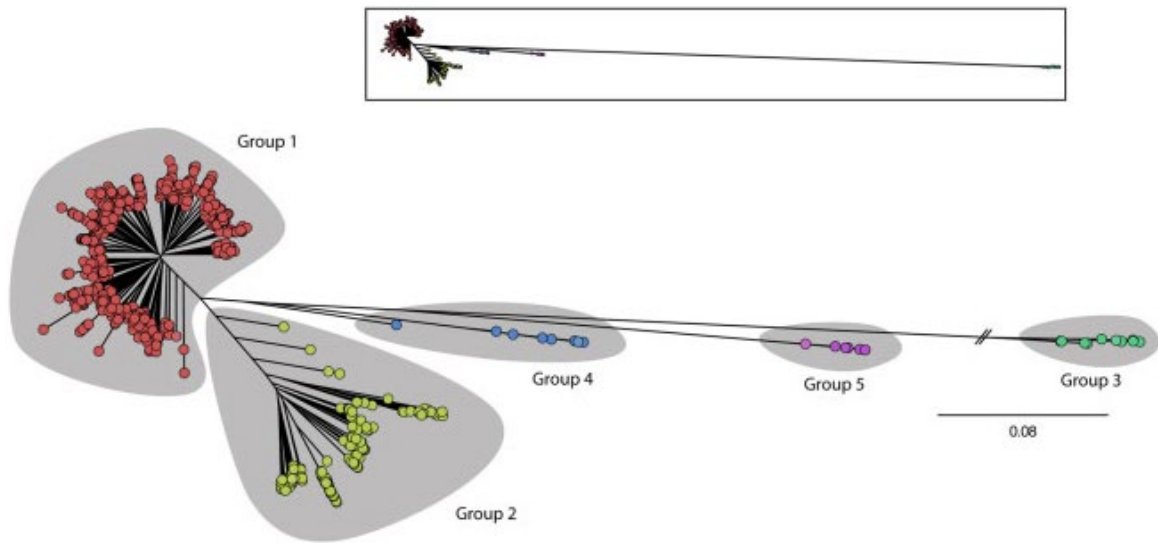


Fig. 3. SNP-based phylogenetic tree of 1311 *P. aeruginosa* isolates. The different clusters of isolates are marked with gray areas. Isolates belonging to each group are identified by a different color. The small tree above shows the real genetic distance between group 3 and the others; adapted from (134).

the ‘generalist’ character.(137) The intensively developing genomics allowed for identification of molecular markers characteristic for individual clones and larger phylogenetic lineages or clades, including virulence and AMR determinants, especially the latter correlating with the clones associated with nosocomial infections.(137)

Numerous molecular epidemiology studies showed a remarkable accumulation of acquired AMR, relying both on mutations and foreign genes, in a relatively small number of *P. aeruginosa* clones which are spread geographically. The link between these MDR ‘high-risk’ or international clones and acquired AMR mechanisms is strong, and e.g. most of mobile AMR genes, including those of MBLs and ESBLs/ES-OXAs occur in several genotypes, mainly the most frequent, pandemic ST235 and ST111, but also ST17, ST175, ST244 or ST253.(3, 45, 138) This may be partially explained by the ‘genetic capitalism’ theory, stating that broadly disseminated STs have higher chance of acquiring new AMR genes, being then further selected and amplified due to the high antibiotic pressure in hospital settings.(139) In the pandemic ST235, all known *P. aeruginosa* acquired AMR genes, including 60 different β -lactamase genes, present in over 100 genetic elements, have been found (Figure 4).(138) ST235 has been the most widespread and prevalent MDR *P. aeruginosa* clone: its prominent position has been reported in almost each international or national molecular survey of MDR

P. aeruginosa clinical isolates, including MPPA.(34, 138, 140-144) The impressive example of its epidemic potential was a huge country-wide expansion of a VIM-2 MBL-producing ST235 genotype in Russia in 2002-2010.(47)

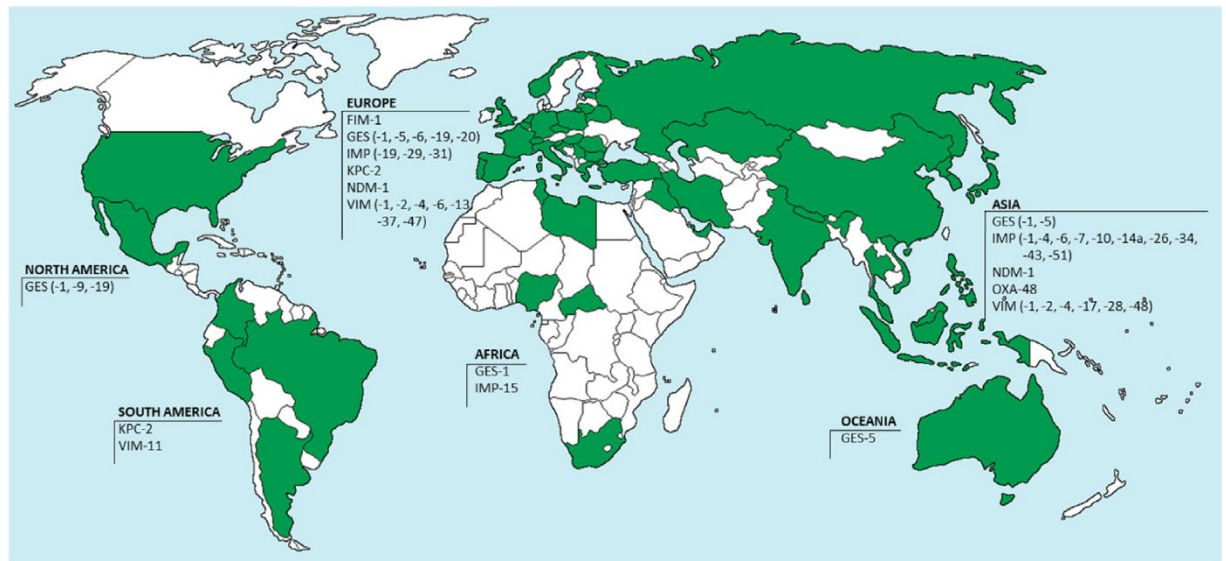


Fig. 4. Distribution of ST235 *P. aeruginosa* clone with its reported carbapenemases; adapted from (45).

ST111 is the second most disseminated high-risk clone after ST235. It is also strongly associated with MDR phenotypes, and multiple acquired β -lactamases from classes A, B and D have been detected within this ST (Figure 5). VIM-2-producing ST111 has been detected in several countries in Europe, with the spectacular spread e.g. in the UK and The Netherlands, and together with several other STs in Asia and America.(45, 62, 138, 145)

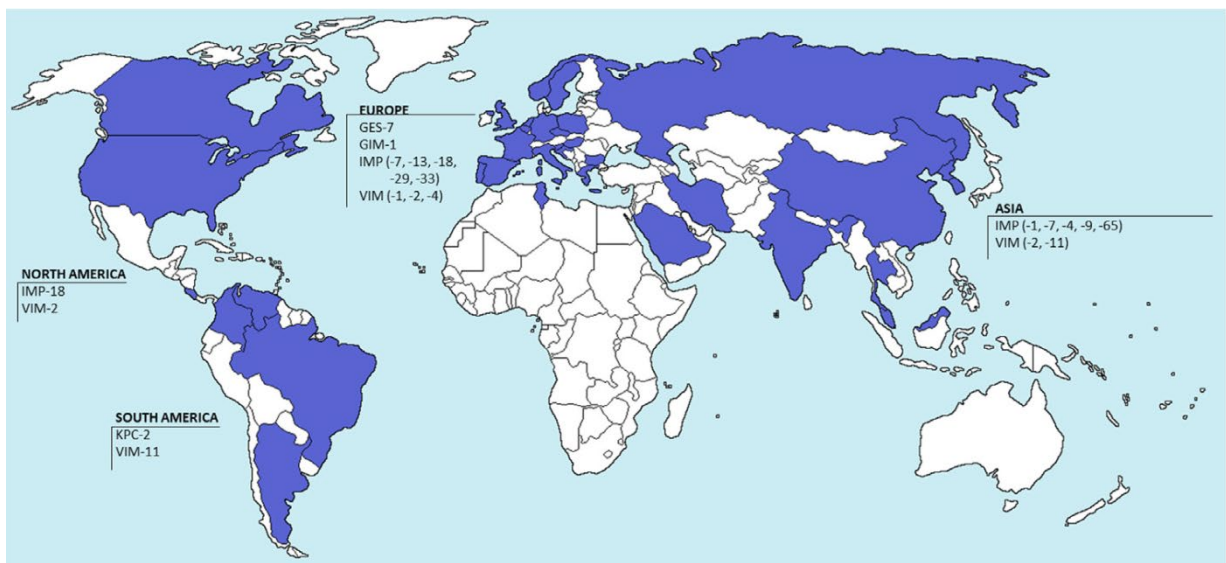


Fig. 5. Distribution of ST111 *P. aeruginosa* clone with its reported carbapenemases; adapted from (45).

The growing surveillance data indicates that more and more *P. aeruginosa* clones are being identified as emerging expansive organisms, namely ST233, ST253, ST277, ST298, ST308, ST357, ST395 or ST654. These, reported increasingly with MDR phenotypes, together with ST235 and ST111 pose a serious threat to modern infectiology.(45, 146)

5.5 Molecular epidemiology of MPPA in Poland

Early studies on AMR in *P. aeruginosa* clinical isolates in Poland, conducted in the 1980-1990s, revealed relatively low rates of resistance to 3rd-generation cephalosporins (ceftazidime) and carbapenems.(147-149) Nevertheless, the growing use of carbapenems in following years resulted in a stable rise of resistance to these drugs in *P. aeruginosa*.(150) Repeated multi-centre surveys showed that within the seven-year period 1996-2003, the non-susceptibility rates for imipenem and meropenem increased from 11.6% and 8.6% to 15.5% and 12.9%, respectively.(147, 151). The first report on an MPPA isolate in Poland was published in 2003, being at that moment one of the earliest cases in Europe. The isolate, recovered in 2001 in Zabrze, carried the *bla*_{VIM-2} gene in a unique class 1 integron, In1008.(43, 55) However, a following retrospective study by Patzer et al. demonstrated that the index MPPA isolate in Poland actually appeared in Warsaw in 1998, having *bla*_{VIM-4} within another original integron, In238.(42) Soon after, the NRCST started recording growing numbers of MPPA isolates, recovered in various regions of the country. These were included in the first country-wide molecular epidemiology analysis done by Fiett et al., based on all MBL-producing Gram-negative non-fermenting pathogens reported by the NRCST till end of 2004.(55) The collection consisted mainly of MPPA isolates (n=38) from 15 hospitals located in 11 cities of 7/16 major administrative regions. The strains were classified into eight distinct pulsotypes and produced VIM-2 or VIM-4, encoded by eight, mostly novel class 1 integrons (including In1008). These were located usually in chromosomal DNA, and three pulsotypes with such integrons were spread regionally, one with In1008 in the region Śląskie, one with In249 in Dolnośląskie and Wielkopolskie, and one with In337, In342 or In492 in Pomorskie and Kujawsko-Pomorskie. However, one integron, In461, resided on large conjugative molecules, observed among several non-related isolates from Mazowieckie. The variety of combinations of *P. aeruginosa* pulsotypes and integron variants suggested several independent selections of distinct genotypes at the origin of the MPPA epidemiology in

Poland, followed by the regional clonal spread of some of these, and horizontal dissemination of a specific integron with possibly plasmids.(55) Studies carried out by another group of researchers documented longer-term persistence and gradual spread of a yet another MPPA genotype with the integron In238 in a large tertiary pediatric medical centre in Warsaw.(42, 152)

After that time, the situation has dramatically worsened. In 2005-2010 and 2011-2015 the NRCST reported 410 and 904 MPPA infection and/or colonization cases, respectively. The patients were diagnosed in 258 hospitals and 37 outpatient clinics, in all 16 administrative regions of Poland. These 1,314 isolates in total, reported as all non-duplicate MPPA cases from all the country confirmed by the NRCST over 10 years, constituted the basis for this study collection. The selection of representative isolates was made in order to include at least one isolate per clinical site per year, with proportionally bigger contribution of the sites with higher MPPA rates, likely resulting from outbreaks. This rule allowed collecting isolates from all years, regions and hospital types, including all of the more affected centres. Finally, the 454 confirmed MPPA strains, recovered in 212 hospitals from 127 towns of all regions, were chosen for the study. These were mainly isolated in ICUs (n=184; 45%), internal medicine (n=92; 23%) or surgical (n=77; 19%) wards, and in majority were recovered from RTIs (n=151; 33%), UTIs (n=114; 25%), SSTIs (n=86; 19%) and BSIs (n=70; 15%).

The results of the entire study, which constitute this doctoral dissertation, have been published in the form of three original articles, to which one review has been added. The first of the original papers, presents the whole study collection of MPPA isolates with basic epidemiological data, and general characterization of all the isolates, comprising typing, MBL gene and integron analysis, and identification of the chromosomal or plasmidic location of the integrons. These are then followed by the WGS-based detailed clonality and phylogenetic analyses of the major MPPA clones and their individual genotypes that is the key component of the 1st part of the Ph. D. study. Molecular typing of all of the MPPA isolates, carried out by the PFGE and MLST approaches, revealed high genetic diversity of the isolates, comprising 120 pulsotypes classified into 52 STs. Four clones, ST235 (n=142), ST111 (n=76), ST273 (n=74) and ST654 (n=39) dominated, accounting together for 73% of the study population. VIM-like enzymes were the prevailing MBL types (n=443; 97.5% isolates), and especially the VIM-2 variant (n=305; 67%), followed by VIM-4 (n=115; 25%). All MBLs genes were located in 46 different class 1 integrons, of which 29 were new.

These acted as strong markers of the MPPA diversity and specificity, because 40 elements were observed originally and only or mainly in Poland. Linking the integrons to the STs and pulsotypes allowed distinguishing a total of 10 ST/pulsotype-integron genotypic combinations of a remarkable epidemic character, grouping ~55% of the all MPPA isolates. All these belonged to the four predominant STs, and spread interregionally in specific areas. The comparative analysis of representatives of the early isolates from 2000-2004 revealed that two of the epidemic genotypes have emerged already during that period. The majority of the strains tested had MBL-encoding integrons located on the chromosome; the two significant exceptions were one of the major ST235 epidemic genotypes with the plasmidic integron In1656, and the integron In461 that was identified on megaplasmids in multiple and clonally diverse isolates.

In order to address in details the clonal aspect of the MPPA epidemiology in Poland, the WGS analysis of 163 isolates was performed, especially focusing on representatives of the ST235, ST111, ST273 and ST654 clones, including all of their main 10 epidemic genotypes. The SNP-based in-sample clonality analysis has confirmed the PFGE results in general, separating clusters of epidemic strains from sporadic pulsotypes, but it has also allowed evaluating genetic distances between them. The SNP-based phylogenetic analysis of the isolates was carried out against all genomes of the same STs available in international WGS databases. It has revealed that the ST235 and ST111 populations were heterogeneous, involving strains of different evolutionary clades, separated by and/or shared with isolates from other countries. However, many Polish ST235 and ST111 strains produced their own branches within the phylotrees, comprising closely related isolates of the epidemic genotypes or apparently related sporadic genotypes. These observations indicated the ‘dual’ character of the Polish ST235 and ST111 populations, resulting from the international circulation of several genotypes, and from the on-site differentiation of some of these. Otherwise, the ST273 and ST654 populations represented a clearly more homogeneous and specific character. In both cases, the Polish strains were separated from all of the foreign isolates available (much fewer than for ST235 and ST111, though), suggesting their entire populations to have arisen by the on-site evolution. In summary, the 1st part of the Ph. D. study showed the general view of the entire MPPA population from the early phase by 2015, visualising a number of common and specific characteristics of these. It has defined clonal spread to be the main factor of the extensive MPPA expansion, and

identified 10 major epidemic organisms, providing clues for understanding their origins. Especially noteworthy was the role of ST273 with integron In249, which was the most expansive epidemic MPPA genotype (~15% all isolates) and likely represented a country-specific clone, evidencing intensive MPPA evolution in Polish hospitals. The study has also significantly contributed to the general knowledge on the clonality and phylogeny of the two pandemic *P. aeruginosa* clones, ST235 and ST111.

The second original work was inspired by the analysis of MBL-encoding integrons and their location in the whole MPPA collection. It turned out that the most prevalent integron type was In461 (~18% isolates), originally identified in the study of the early isolates from 2000-2004, and assigned then to large conjugative plasmids.(55) In the current study this integron was found in 80 isolates of 35 STs and 55 pulsotypes, recovered in 49 hospitals in 33 cities of 11 regions. The comprehensive plasmid analysis, including conjugational transfer, and S1/PFGE and hybridization assays, showed that the vast majority of these strains (~85%) possessed In461-encoding megaplasmids (~350-550 kb), most of which efficiently conjugated (10^{-1} to 10^{-2} per donor). In order to obtain complete characteristics of these molecules, 19 isolates carrying In461-megaplasmids were sequenced, including one 'archival' isolate from 2001.(55) This was carried out in cooperation with the Czech team of Prof. J. Hrabák in the Biomedical Center in Plzen, and the FEMS Research and Training Grant. The SNP-based phylogenetic analysis demonstrated that the In461-carrying plasmids (named pPUVs) formed a tight cluster of closely related molecules, forming a specific branch in the phylotree with 22 available sequences of IncP-2-like megaplasmids. Those plasmids were from *Pseudomonas* spp. strains from all over the world, and specified broad resistance or tolerance to various environmental stress factors, including antibiotics. The detailed structural analysis of pPUVs against the other plasmids allowed confirming the recent identification of the actual IncP-2-specific replicon (*repA*) (110) or revealing three additional genes in the basal conjugative transfer region (*traC*, *traK*, *traU*). The precise comparison of the individual pPUV variants with each other made it also possible to define the various genetic phenomena that have occurred in the course of their rapid evolution, namely the acquisition or loss of additional phage-, ICE/plasmid- or transposon-related fragments, and rearrangements of the AMR region, including In461 duplications and acquisition of new AMR genes. This part of the entire Ph. D. study has documented that along with the polyclonal spread, plasmid dissemination played a remarkable role in the MPPA epidemiology in Poland, and to our knowledge,

it documented the largest ‘plasmid outbreak’ in *P. aeruginosa* ever reported in the defined spatiotemporal frame. It has also significantly contributed to the knowledge on the IncP-2-type plasmids, which has been rapidly growing in recent years due to broader and broader implementation of WGS.

The material for the third original work was identified in the course of the PCR screening for individual types of MBL genes in the whole collection of MPPA isolates. One strain was found not to have *bla*_{VIM}- nor *bla*_{IMP}-like genes, but *bla*_{NDM-1} and *bla*_{DIM-1}, which have been rarely reported in *P. aeruginosa* so far. Moreover, the isolate from a hospital in the southern region of Poland was the first NDM- and/or DIM-producing *P. aeruginosa* in the country. The microorganism turned out to be resistant to almost all antipseudomonadal drugs, except colistin only. As the genomic analysis showed, its resistome was one of the most complex ever recorded in this species, containing 25 acquired AMR genes. All these genes were chromosomal and most of them were located within two new GIs, named ICE6660 and PAGI-18, structures of which were fully elucidated. *bla*_{NDM-1} was located together with a rare ESBL gene *bla*_{PME-1} and the *rmtD3* gene, conferring resistance to all aminoglycosides, in a single cargo region of ICE6660, whereas *bla*_{DIM-1} plus *qnrVC1* were parts of PAGI-18. The isolate was the only member of a sporadic clone ST234 in the entire collection of Polish MPPA. The inferred SNP-based phylogeny of all ST234 genomes (n=17) available in the international databases revealed two major clades among these, and the Polish strain belonged to the lineage together with isolates from the UK and Ghana, showing the closest relatedness with the Ghanaian strains.(90) The epidemiological investigation using the hospital and patient data has not revealed any indication for a possible origin of the isolate. Like numerous recent papers from different countries, this work has documented the emergence of extreme MDR genotypes/phenotypes among clinically relevant Gram-negative pathogens that circulate globally, often unnoticed for given periods. It has been also an example of a study in which the use of WGS reveals a striking combination of AMR traits in a single isolate that have been interpreted to be rare or unique so far but might have been only missed by the standard diagnostic and study approaches.

The last of the papers included is a review article for the Polish readership, providing general information on antibiotics and AMR, history of the *P. aeruginosa* discovery and its basic microbiological features, clinical relevance, genome characteristics, virulence factors and their expression, all types of AMR, clonal

structure, and new therapeutic perspectives. Published in 2017, it was a comprehensive compendium of our best knowledge at that time about one of the most relevant and difficult to treat human bacterial pathogens.

6. Objectives of the study

The general objective of the Ph. D. thesis was to explain the character and mechanisms of the extensive increase in MBL-producing *P. aeruginosa* (MPPA) infections in Polish hospitals over the 11-year period, 2005-2015, by addressing the role of the clonal spread of epidemic genotypes, horizontal dissemination of MBL genes and selection *de novo*/imports of specific organisms. This goal was to be achieved by the comprehensive molecular and genomic characterization of the MPPA isolates, including representatives of those from the early phase of the MPPA dissemination in Poland, 2000-2004. For this purpose, three detailed aims were proposed:

- a) to reveal the clonal structure of the MPPA population, identify epidemic genotypes with their temporal and geographic distribution, and analyze their possible origins by the phylogenetic analysis against international *P. aeruginosa* strains;
- b) to characterize MBL-encoding integrons in the MPPA, identify the elements spread across the population, especially when carried by large conjugative plasmids observed from the early 2000s, and perform the structural and phylogenetic analysis of the plasmids;
- c) to identify MPPA isolates of unique genotypes that might have arrived in the country by recent importation, and perform their detailed characterization assessing the epidemiological threat caused by their possible spread in the country.

7. Publications included in the dissertation

7.1 Molecular and genomic epidemiology of VIM/IMP-like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in Poland.

J Antimicrob Chemother 2021; **76**: 2273–2284
doi:10.1093/jac/dkab188 Advance Access publication 28 June 2021

Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy

Molecular and genomic epidemiology of VIM/IMP-like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in Poland

P. Urbanowicz¹, R. Izdebski¹, A. Baraniak¹, D. Żabicka², W. Hryniewicz² and M. Gniadkowski^{1*}

¹Department of Molecular Microbiology, National Medicines Institute, 00-725, Warsaw, Poland; ²Department of Epidemiology and Clinical Microbiology, The National Reference Centre for Susceptibility Testing, National Medicines Institute, 00-725, Warsaw, Poland

*Corresponding author. E-mail: m.gniadkowski@nil.gov.pl

Received 24 February 2021; accepted 6 May 2021

Objectives: To identify key factors of the expansion of metallo- β -lactamase (MBL)-producing *Pseudomonas aeruginosa* (MPPA) in Poland, focusing on the role of clonal epidemic(s).

Methods: MPPA isolates were typed by PFGE, followed by MLST. *bla*_{VIM/IMP} MBL genes were amplified and sequenced within class 1 integrons. Their location was assessed by S1 nuclease-hybridization assays. Short-read WGS was performed, and genomes were subjected to SNP-based phylogenetic and resistome analyses.

Results: Of 1314 MPPA isolates collected in 2005–15 from 212 hospitals, 454 representatives were selected. The isolates belonged to 120 pulsotypes and 52 STs, of which ST235 (~31%), ST111 (~17%), ST273 (~16%) and ST654 (~9%) prevailed, followed by ST244, ST17, ST395, ST175 and ST1567. The isolates produced seven VIM variants (97.5%) and four IMPs encoded by 46 integrons, most of which were observed only or mainly in Poland. Around 60% of the isolates resulted from (inter)regional clonal outbreaks of 10 individual ST235, ST111, ST273 and ST654 genotypes. The phylogenetic analysis of 163 genomes revealed heterogeneity of ST235 and ST111 populations, arising from transnational circulation and on-site differentiation of several clades/branches. Contrarily, ST273 and ST654 formed relatively homogeneous and apparently Poland-specific lineages, and a unique ST273 genotype with integron In249 was the most expansive organism.

Conclusions: Together with a previous report on self-transmissible In461-carrying IncP-2-type plasmids, this study revealed the molecular/genomic background of the rapid MPPA increase in Poland in 2001–15, evidencing multi-clonal spread as its leading factor. Numerous novel/specific MPPA characteristics were identified.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is one of major opportunistic pathogens, combining substantial virulence with broad antimicrobial resistance (AMR). It causes severe infections, mainly of the respiratory tract (RTIs), skin and soft tissue (SSTIs), urinary tract (UTIs) or bloodstream (BSIs).^{1,2} In the USA, *P. aeruginosa* is the fifth agent of hospital infections,¹ and in Polish ICUs belongs to the first 2–5 pathogens of each of the diseases listed above.³ AMR in *P. aeruginosa* depends on intrinsic and acquired factors,^{4,5} the latter based on chromosomal mutations^{4–7} but also foreign genes transmitted by plasmids or integrative and conjugative elements (ICEs).^{8–11} These genes may stay on autonomous plasmids;^{9,10,12–14} however, they often integrate into the chromosome within ICEs/plasmids or other structures, all named *P. aeruginosa* genomic islands (PAGIs).^{8,9,15–18} The essential AMR genes encode metallo- β -lactamases (MBLs)

hydrolysing most β -lactams, including carbapenems.¹⁹ Of numerous MBL types, VIMs and IMPs prevail in *P. aeruginosa*, usually specified by gene cassettes of class 1 integrons. MBL-producing *P. aeruginosa* (MPPA) isolates are always MDR.^{4,5,8,19}

Recent studies revealed *P. aeruginosa* to have evolved into four to five phylogroups, two of which, 1/A and 2/B, dominate.^{11,20} High recombination rate,¹⁷ observed mainly inside the phylogroups,²⁰ generates multiple genotypes, forming a dispersed population structure.^{5,17,21} However, certain clones/clonal complexes were discerned, adopted to various or specific habitats and prevailing in individual niches, like hospital infections.¹⁷ Such clones, e.g. ST235, ST111, ST17, ST175, ST244 or ST395,^{4,5,8,22} accumulate AMR and predominate among MDR isolates, though in varying sets in different countries.^{4,6,23–29} The vast majority of AMR genes/integrons have been found in the ST235 and ST111 lineages.³⁰

The early MPPA phase in Poland, 1998–2004 (~50 cases reported), relied largely on several non-related organisms

with new chromosomal VIM integrons, three of which spread regionally.^{31–34} In 2005–15, the National Reference Centre for Susceptibility Testing (NRCST) observed rapid MPPA expansion, confirming ~1300 cases from the entire country. Detailed studies on that have been conducted; this report is aimed at general characteristics of the MPPA, with focus on the epidemic MDR genotypes.

Methods

Bacterial isolates

The NRCST has been monitoring MPPA since 2000, collecting isolates from microbiology laboratories with basic epidemiological data. In 2005–15, all pseudomonadal isolates sent as putative MBL producers were probed by the EDTA double-disc test³⁵ and PCRs for *bla*_{VIM/IMP}-like genes,³¹ and from 2012 also *bla*_{NDMS} and other types.³⁶ A total of 1314 MPPA non-duplicate isolates were confirmed, from which 454 representatives were selected, being at least one organism per clinical site and year, proportionally to numbers of isolates per site/year. The 454 isolates were recovered in 212 hospitals in 127 towns of all 16 major regions (Table S1, available as [Supplementary data](#) at JAC Online). Most of them were from infections ($n=434$; 96%), mainly RTIs ($n=151$; 33%), UTIs ($n=114$; 25%), SSTIs ($n=86$; 19%) and BSIs ($n=70$; 15%). Of patients with hospital ward data ($n=406$), the majority were in ICUs ($n=184$; 45%) or internal medicine ($n=92$; 23%) or surgical ($n=77$; 19%) wards. Eighty isolates of 35 STs with integron In461 were reported in part, focusing on In461-carrying plasmids,¹⁴ and eight others were included in an international analysis.³⁷ A single NDM-1 + DIM-1-producing isolate was described separately.¹⁸ Four archival MPPA isolates from 2000–04, of one unique and the three epidemic pulsotypes of that period³¹ were added for PFGE, MLST and WGS.

Typing

The isolates were typed by PFGE as described,³⁸ pulsotypes were discerned visually according to Tenover et al.,³⁹ and verified with BioNumerics Version 7.6.3 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). MLST was performed as proposed originally,⁴⁰ and STs were assigned using the database at <http://pubmlst.org>.

PCR–RFLP and sequencing of *bla*_{VIM/IMP} integrons

Gene cassette arrays of class 1 integrons with *bla*_{VIM/IMP} genes were analysed by PCR–RFLP and sequenced as previously described.³¹ ISs were identified inside integrons by ISFinder⁴¹ and BLASTn. New integrons were submitted to the INTEGRALL database for assigning numbers (integrall.bio.ua.pt).⁴²

Plasmid profiling

Plasmid profiling was done by the S1 nuclease (TaKaRa, Otsu, Japan) analysis.⁴³ *bla*_{VIM}-carrying plasmids were identified by hybridization, as reported,³¹ using the ECL Random-Prime Labelling and Detection system (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

WGS and bioinformatic analysis

Short-read WGS was performed using HiSeq or MiSeq platforms (Illumina, San Diego, CA, USA). Reads were trimmed by Cutadapt 1.16 (<https://cuta.dapt.readthedocs.io/en/stable/>) and assembled by SPAdes 3.13.2.⁴⁴ The in-sample SNP-based clonal analysis was performed in the ST groups of complete genomes, using BioNumerics Version 7.6.3, and the oldest Polish MPPA isolates as references. All *P. aeruginosa* genomic sequences in

GenBank ($n=5290$ as of 9 September 2020) were downloaded by the NCBI Genome Downloading Scripts (<https://github.com/kblin/ncbi-genome-download>), and genomes of selected STs were extracted using mlst (<https://github.com/tseemann/mlst>). The SNP-based phylogenetic analysis of the study and international complete genomes was carried out for individual STs with HarvestTools v. 1.2,⁴⁵ using the reference isolates as above. Phylogenetic trees were visualized by iTOL.⁴⁶ Resistomes of the sequenced isolates were determined with Abricate (<https://github.com/tseemann/abricate>), using the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/AMRFinder/>).

Nucleotide sequence accession numbers

Sequences of new integrons have the following GenBank accession numbers: In1640–In1658, MW595314–MW595332; In1667, MW595333; In1668, MW595334; In1894, MW595335; In1966, MW595336; In1977, MW595337; In1978, MW595338; In2015–In2017, MW595339–MW595341; In2021, MW595342. The WGS files and raw reads are under the GenBank BioProject PRJNA645026 (JAFFTM000000000–JAFFZB000000000).

Results and discussion

General clonal analysis of the MPPA isolates

The clonality analysis of the entire MPPA collection was based on PFGE, performed for all 454 isolates, and MLST, done for 179 representatives of all pulsotypes. The analysis discerned 120 pulsotypes, classified into 52 STs (Table 1 and Table S2). The ST distribution was highly uneven, with four STs grouping 331 isolates (72.9%), namely ST235 ($n=142$; 31.3%), ST111 ($n=76$; 16.7%), ST273 ($n=74$; 16.3%) and ST654 ($n=39$; 8.6%). Five other STs, ST244, ST17, ST395, ST175 and ST1567, clustered more than five isolates each, while 36 STs had only 1–2 isolates each. Numerous STs were differentiated into distinct pulsotypes, e.g. ST235, ST111, ST273 and ST654 comprised 27, 16, 4 and 2 pulsotypes, respectively. Their distribution within the STs was non-uniform, with four pulsotypes in ST235 (A, J, O, AO), two in ST111 (K, L), and one in each ST273 (AE) and ST654 (Q) prevailing; altogether these grouped 261 (57.5%) isolates. The STs/pulsotypes with multiple isolates varied in geographic occurrence, both in scale and specific areas of dissemination (Table 1 and Figures S1 and S2). The archival isolates from 2000–04 represented ST235 ($n=2$), ST111 and ST273, but only one ST235 and ST273 were of the pulsotypes spreading later (see below). The clonal MPPA structure had common and specific features, the common being the predominance of a few clones and position of ST235 and ST111. ST235 has been the most frequent MDR *P. aeruginosa* clone globally,^{4,5,47} prevailing in, e.g. Japan,^{25,37} Thailand⁴⁸ Croatia²⁴ or Czechia.²⁶ It is associated with VIM/IMP-like MBLs,⁵ e.g. having caused a huge epidemic in Russia in 2002–10.²³ In some countries the major MDR/MPPA clone has been ST111, like the UK,^{29,49} the Netherlands⁵⁰ or Greece.⁵¹ The prevalence of ST273 was specific for Poland, as so far it has been only incidentally reported in China,⁵² Thailand,⁴⁸ Myanmar,⁵³ France⁵⁴ or Germany.⁵⁵ The ST654 high position was surprising too; however, it has been recently spreading, e.g. in Gulf countries^{56–58} or Russia in 2012–17.⁵⁹ The PFGE data showed that Polish populations of the major STs arose largely from the expansion of several individual genotypes (detailed below), two of which emerged already in 2000–04.

Table 1. More prevalent STs discerned among the MPPA study isolates: their pulsotypes, MBL types and integrons, and basic epidemiological data^a

ST	ST/pulsotype-integron genotype ^a	Pulsotype	MBL variant	Integron variant (type) ^b	Number of isolates (WGS) ^c	Number of centres	Number of cities/regions	Main region(s) of occurrence ^d	First year of isolation		
ST235, n = 142	ST235/A-In2016	A ^e	VIM-4	In2016	31 (7)	17	11/1	Śląskie	2006		
	ST235/A-In1978	A ^e	VIM-4	In1978 types (In593, In1652, In1978)	9 (5)	5	5/3	Śląskie	2004 ^f		
	ST235/J-In238	J ^e	VIM-4	In238	32 (10)	21	13/6	Mazowieckie-WUA ^g ; Dolnośląskie	2005		
	ST235/O-In1656	O	VIM-2	In1656	20 (7)	14	12/5	Kujawsko-pomorskie	2009		
		O	IMP-13	In1977	1 (1)	1	1/1		2013		
	ST235/AO-In1451	AO	VIM-37	In1451 (In238 type)	10 (3)	8	7/2	Mazowieckie	2007		
		DE	VIM-2	In2017	4 (2)	4	3/2		2013		
	DE	VIM-2	In56		1	1	1/1		2014		
	AS	VIM-2	In1008		4 (1)	3	3/1		2005		
	AU	VIM-2	In342		3 (2)	3	3/2		2007		
AU	VIM-2	In56		1 (1)	1	1/1		2010			
BQ	VIM-2	In1008		3 (1)	2	2/1		2012			
W ^e	VIM-2	In1649		2 (1)	1	1/1		2006			
AV	VIM-4	In238		2 (1)	1	1/1		2013			
DM	VIM-4	In238		2 (1)	1	1/1		2009			
EE	VIM-2	In1008		1 (1)	1	1/1		2012			
EE	VIM-54	In2015 (In238 type)		1	1	1/1		2015			
ST111, n = 76	ST111/K-In59	K	VIM-2	In59	42 (12)	29	23/6	Wielkopolskie; Lubuskie	2010		
			VIM-2	In461 ⁱ	1	1	1/1		2015		
			VIM-2	In1008	8 (2)	2	2/2	Lubuskie	2005		
			VIM-2	In1656	3 (2)	3	3/2		2011		
			VIM-2	In461 ⁱ	2	1	1/1		2009		
			VIM-2	In56	1 (1)	1	1/1		2015		
			VIM-2	In461 ⁱ	1 (1)	1	1/1		2009		
			VIM-2	In461 ⁱ	4 (1)	4	4/1		2011		
			VIM-2	In461 ⁱ	1	1	1/1		2011		
			VIM-2	In1008	1 (1)	1	1/1		2012		
ST273, n = 74	ST273/AE-In249	AE	VIM-2	In59	2 (1)	2	2/2		2015		
			VIM-2	In461 ⁱ	2	1	1/1		2012		
			VIM-2/-4/-4	In59, In461 ⁱ , In492, In1008, In1655, In1966	9 (7)						
			VIM-2	In249	70 (23)	50	30/15	multiple regions	2000 ^f		
			VIM-2	In249	2 (1)	2	2/1		2009		
			H	various ^{e,h}	VIM-2	In249	2 (1)	2	2/1		2015
					VIM-2	In249	2	1	1/1		2012
					VIM-2	In249	9 (7)				
					VIM-2	In249	2 (1)	2	2/2		2015
					VIM-2	In249	2	1	1/1		2012

Continued

Table 1. Continued

ST	ST/pulsotype-integron genotype ^a	Pulsotype	MBL variant	Integron variant (type) ^b	Number of isolates (WGS) ^c	Number of centres	Number of cities/regions	Main region(s) of occurrence ^d	First year of isolation
ST654, n = 39	ST654/Q-In1008	various ^h Q	VIM-2 VIM-2/-24	In249; In1008 In1008 types (In1008 mainly, In2021)	2 (2) 24 (8)	18	14/3	Matopolskie; Śląskie	2011
	ST654/Q-In1653	Q	VIM-4	In1653	8 (3)	6	4/2	Śląskie	2011
		Q	VIM-4	In1667	3 (2)	2	2/1		2009
		Q	VIM-2	In56	2 (1)	1	1/1		2012
		X	IMP-22	In1644 types (In1644, In1645)	2 (1)	1	1/1		2011
ST244, n = 13	ST244/BH-In461	BH	VIM-2	In461 ⁱ	7 (1)	4	4/2	Mazowieckie-WUA ^g	2006
		BO	VIM-2	In461 ⁱ	3	1	1/1		2006
		various ^h	VIM-2/-4	In461 ⁱ , In238					
ST17, n = 11		M	VIM-2	In1657 (In1656 type)	4 (2)	2	2/2		2012
		M	VIM-2	In461 ⁱ	1 (1)	1	1/1		2012
		CR	VIM-2	In461 ⁱ	3 (1)	3	1/1		2014
		DH	VIM-4	In238	2 (1)	2	2/1		2014
		EQ	VIM-4	In238	1 (1)	1	1/1		2012
ST395, n = 9	ST395/AF-In238	AF	VIM-4	In238	7 (5)	5	5/5	multiple regions	2010
		various ^h	VIM-2	In249, In461 ⁱ					
ST175, n = 8	ST175/AC-In110	AC ^e	VIM-1	In110	8 (4)	5	3/2	Warmińsko-Mazurskie	2006
ST1567, n = 7	ST1567/AB-In1658	AB	VIM-4	In1658	6 (3)	4	3/1	Lubuskie	2010
		AB	VIM-4	In1654	1	1	1/1		2011

^aSTs included in this table are those with more than five MPPA isolates identified; similarly, the specific names refer only to the ST/pulsotype-integron combined genotypes, which grouped more than five isolates.

^bTypes of integrons were arbitrarily assigned to sets of elements that might have directly evolved one from another by point mutations or various recombination events (see also Table 2).

^cNumbers of isolates classified into the combined ST/pulsotype-integron genotypes; in parentheses are numbers of isolates subjected to WGS.

^dRegions of higher prevalence refer only to the ST/pulsotype-integron combined genotypes with more than five isolates.

^eSingle isolates of these genotypes (n = 8) were included in the previous international comparative study.³⁷

^fThe oldest isolates of these genotypes belonged to the archival collection of 2000–04,³¹ and were used in this study for the comparison (not included in this table).

^gWUA, Warsaw urban area.

^h“various” stands for a number of different pulsotypes with a single isolate each; no epidemiological data on these isolates are shown.

ⁱPart of the data concerning the MPPA isolates with the In461 integron was shown also in the previous report.¹⁴

MBL types and VIM/IMP-encoding integrons—structural analysis

Of the 454 MPPA isolates, 443 isolates (97.5%) produced VIM-like MBLs of the VIM-2 type ($n=307$) or VIM-1 type ($n=136$), and 10 isolates (2.2%) produced IMPs (one isolate had NDM-1 and DIM-1¹⁸). Individual enzymes were identified during the integron analysis and WGS (reported below), yielding 258 representative sequences. Based on these, VIM-2 dominated among its types ($n=305$; 67.2% of all MBLs) and single isolates had VIM-24 or -62. Of VIM-1 types, VIM-4 prevailed ($n=115$; 25.3%), followed by VIM-37, -1 and -54. Four IMPs included IMP-1, -7, -13 and -22. The PCR-RFLP analysis of VIM/IMP integrons revealed ~40 fingerprints. Their 258 sequences, determined conventionally for all ST/pulsotype-RFLP combinations or by WGS, represented 46 class 1 integrons, including eight identified first in the early Polish MPPA,^{31,32} one in Polish enterobacteria,⁶⁰ five in pseudomonads from other countries^{27,61–65} and 32 new elements (Table 2). Two types of bla_{VIM-1} -like cassettes were observed, the standard ones and those having a 169 bp direct repeat of the 3' end (bla_{VIMrpt}), first identified in the integron In238 in Polish index MPPA,³² and then in various species in Poland and elsewhere.^{33,60,66,67} Other unusual bla_{VIM} cassettes were bla_{VIM-2S} in In1656/In1657 and In2017 fused with *aadA6* or *aacA4* cassettes, respectively. Two integron sets differed only by single mutations in bla_{VIMs} , namely In1008 types (In1008, In2021 and In1651 with bla_{VIM-2} , -24 and -62, respectively), and In238 types (In238, In1451 and In2015 with $bla_{VIM-4rpt}$, -37rpt and -54rpt, respectively). In238 and In461 had derivatives with *ISP_{sme1}* and *ISP_{a47}* inserts, respectively, while others differed from each other by 1–2 cassettes only, like In1978 types (In1652, In593, In1978) or In1644 types (In1644, In1645). Overall, the integron diversity was in part due to multiple emergence of non-related elements by in-country evolution or imports, including in early years.^{31–34} The other factor was their extensive differentiation by mutations, IS insertions and/or cassette integrations, deletions or fusions.

VIM/IMP integrons versus MPPA clones—epidemiological analysis

Several integrons/integron types were prevalent, namely In461 types ($n=80$), In249 ($n=76$), In238 types ($n=63$), In1008 types ($n=52$), In59 ($n=46$), In2016 ($n=31$) and In1656 types ($n=27$) (Table 2). The In461 types occurred in diverse isolates (35 STs/55 pulsotypes; Table 1 and Table S2), with stronger link only to ST244, and their plasmid dissemination was reported previously.¹⁴ Relationships between other integrons and clones were complex; almost all frequent STs (and some pulsotypes) hosted various integrons (e.g. ST235, 22 integrons; ST111, 8 integrons; Table 1). Similarly, the prevalent integrons/integron types usually occurred in multiple organisms (e.g. In1008 types, 10 STs/18 pulsotypes; In238 types, 7 STs/12 pulsotypes; Table 2). Therefore, basically the main clones and integrons have circulated separately, locally producing various combined genotypes. Subsequently, some of these combinations extensively spread, contributing to the overall MPPA expansion (Table 1). The spectacular case was ST273 and its predominant pulsotype correlating with In249 (AE-In249; $n=70/74$). In238 was the most numerous integron in ST235 ($n=36/142$) and characterized entirely one of its four major pulsotypes (J-In238;

$n=32$). Of the others, one was associated with the In238-type In1451 (AO-In1451; $n=10$), one was the main host of In1656 (O-In1656; $n=20/21$) and one consisted of two groups, carrying either In2016 or In1978 types (A-In2016; $n=31$, and A-In1978; $n=9$). In59 prevailed in ST111 (46/76), including most isolates of its major pulsotype (K-In59; $n=42/43$). In1008 types occurred in several STs, including another significant ST111 pulsotype (L-In1008; $n=8$). However, these were often present in ST654 (24/39) and its main pulsotype (Q-In1008; $n=23/37$), which also contained a cluster with In1653 (Q-In1653; $n=8$). Considering that the integrons mentioned above (except In59) have been found originally and only/mainly in Poland, most of the epidemic ST/pulsotype-integron combinations likely evolved on site.

General analysis of the VIM/IMP integrons' location

The location of the VIM/IMP integrons was assessed by standard methodology, starting with 250 isolates of all ST/pulsotype-integron genotypes. The data for 63 isolates with In461-carrying plasmids were published separately.¹⁴ The majority of the other isolates ($n=132/187$), including major genotypes ST235/J-In238, ST235/AO-In1451, ST235/A-In2016/In1978 and ST111/K-In59, had no bands in their S1 profiles (results not shown). Individual isolates of ST111/L-In1008, ST273/AE-In249 and ST654/Q-In1008/In1653 had diverse, though bla_{VIM} -non-hybridizing plasmids. Only ST235/O-In1656 was characterized by single bla_{VIM} -positive plasmids of <50 kb. Among 36 remaining isolates of high clonal, integron and plasmid profile variety, 10 isolates had bla_{VIM} -hybridizing plasmids (results not shown). This data indicated that with the spectacular exception of In461,¹⁴ MBL integrons were mainly chromosome located, including all but one of the epidemic ST/pulsotype-integron genotypes.

Genomic analysis of the MPPA isolates

In order to characterize the MPPA genotypes further, 152 isolates plus four archival strains³¹ were short-read sequenced; these were supplemented by seven isolates sequenced previously,³⁷ resulting in 163 representative genomes (Table 1 and Table S2). The report below is focused on the main ST235, ST111, ST273 and ST654 pulsotype-integron combinations; selected data on the others are in the [Supplementary data](#). Sequences of 15 isolates with In461 were used previously for the IncP-2 plasmid detection.¹⁴

Clonality and phylogeny of the ST235 MPPA isolates

The analysis comprised 57 ST235 isolates of 26 pulsotypes plus two archival ones (reference: 1258/02 and 2611/04).³¹ The major genotypes A-In2016/In1978, J-In238, O-In1656 and AO-In1451 were represented by multiple isolates. The results of the in-sample comparison were congruent with PFGE, segregating isolates of the major pulsotypes into clusters and separating these from sporadic pulsotypes (Figure S3). The total number of polymorphic positions was 761, and SNP numbers between any and the reference isolates ranged within 77–141 (Table S3). SNP numbers in pairs of closest-related isolates were 0–99 in the whole sample, and 0–11, 1–9, 1–25 and 9–10 within the A-In2016/In1978, J-In238, O-In1656 and AO-In1451 genotypes, respectively. Subsequently, the isolates were compared with 238 international ST235 genomes, inferring the SNP-based phylogeny on ~2.9 Mb (42%) of the

Table 2. VIM/IMP-like MBL-encoding class 1 integrons identified in the MPPA study isolates

Integron variant ^a (integron type) ^b	Number of isolates	Number of STs	Number of pulsotypes	Gene cassette array	GenBank entry	Country, year and species of the first identification ^c	References
Integrons with bla_{VIM-2}-like genes							
In56	5	3	4	5'CS - bla _{VIM-2} - 3'CS	AF191564	France, 1996 (<i>Pae</i>); Poland, 2003 (<i>Pae</i>)	31,64
In59	46	1	4	5'CS - aacA29a - bla _{VIM-2} - aacA29b - 3'CS	AF263519	France, 1997 (<i>Pae</i>); Poland, 2014 (<i>Pae</i>)	63, this work
In249	76	4	6	5'CS - aacA4 - bla _{VIM-2} - 3'CS	AM087404	Poland, 2000 (<i>Pae</i>)	31
In341-like ^d	1	1	1	5'CS - bla _{VIM-2} - aadB - ISPa21-like - 3'CS	FN397628	Sweden, 2007 (<i>Pae</i>); Poland, 2009 (<i>Pae</i>)	65, this work
In342	4	1	2	5'CS - bla _{VIM-2} - aphA15 - 3'CS	AM087406	Poland, 2001 (<i>Pae</i>)	31
In461 ^e (In461)	79	34	54	5'CS - aadB - bla _{VIM-2} - aadA6 - 3'CS	AM087405	Poland, 2003 (<i>Pae</i>)	31
In461-like ^{d,e} (In461)	1	1	1	5'CS - aadB - bla _{VIM-2} - aadA6 - ISPa47 - 3'CS	NA ^f	Poland, 2010 (<i>Pae</i>)	14, this work
In492	1	1	1	5'CS - bla _{VIM-2} - aacC1 - aphA15 - 3'CS	AM087409	Poland, 2001 (<i>Pae</i>)	31
In1008 (In1008)	50	10	16	5'CS - bla _{VIM-2} - aacA4 - 3'CS	AM087408	Poland, 2001 (<i>Pae</i>)	31,34
In1651 (In1008)	1	1	1	5'CS - bla _{VIM-62} - aacA4 - 3'CS	MW595325	Poland, 2010 (<i>Pae</i>)	this work
In2021 (In1008)	1	1	1	5'CS - bla _{VIM-24} - aacA4 - 3'CS	MW595342	Poland, 2012 (<i>Pae</i>)	this work
In1640	1	1	1	5'CS - gcu190 - gcu191 - bla _{VIM-2} - aadB - aadA6 - 3'CS	MW595314	Poland, 2014 (<i>Pae</i>)	this work
In1641	2	1	1	5'CS - gcu192 - aacA29a - bla _{VIM-2} - 3'CS	MW595315	Poland, 2009 (<i>Pae</i>)	this work
In1642	1	1	1	5'CS - aacA4 - bla _{VIM-2} - gcu9 - tmC ⁹	MW595316	Poland, 2010 (<i>Pae</i>)	this work
In1646	1	1	1	5'CS - bla _{VIM-2} - aacA4 - gcuP/ISPge1 - 3'CS	MW595320	Poland, 2010 (<i>Pae</i>)	this work
In1647	1	1	1	5'CS - bla _{VIM-2} - aacA8 - aadA6 - gcuDA - 3'CS	MW595321	Poland, 2008 (<i>Pae</i>)	this work
In1648	1	1	1	5'CS - bla _{VIM-2} - aacC2/ISSko1-like/ bla _{OXA-21} - 3'CS	MW595322	Poland, 2015 (<i>Pae</i>)	this work
In1649	3	1	2	5'CS - bla _{VIM-2} - aacC1 - 3'CS	MW595323	Poland, 2006 (<i>Pae</i>)	this work
In1650	1	1	1	5'CS - bla _{VIM-2} - aadA6 - 3'CS	MW595324	Poland, 2006 (<i>Pae</i>)	this work
In1656 (In1656)	23	2	2	5'CS - gcu193 - bla _{OXA-10} / aacA4 - bla _{VIM-2} / aadA6 - 3'CS	MW595330	Poland, 2009 (<i>Pae</i>)	this work
In1657 (In1656)	4	1	1	5'CS - gcu193.2 - bla _{OXA-10} / aacA4 - bla _{VIM-2} / aadA6 - 3'CS	MW595331	Poland, 2012 (<i>Pae</i>)	this work
In1894 ^h	1	1	1	5'CS - aadA6 - aacA4 - smr2 - aadA7 - bla _{VIM-2} - 3'CS	MW595335	Poland, 2006 (<i>Pae</i>)	this work
In2017	4	1	2	5'CS - bla _{VIM-2} / aacA4 - aadB - aadA13 - aadB / aadA1 - 3'CS	MW595341	Poland, 2013 (<i>Pae</i>)	this work
Integrons with bla_{VIM-1}-like genes							
In110	9	2	2	5'CS - bla _{VIM-1} - aacA4 - aadA1 - 3'CS	AJ439689	Italy, 1999 (<i>Ppu</i>); Poland, 2006 (<i>Pae</i>)	62, this work
In238 (In238)	45	4	6	5'CS - aacA4 - bla _{VIM-4} - rpt ⁻ - 3'CS	AY702100 ⁱ	Poland, 1998 (<i>Pae</i>); Hungary, 2003 (<i>Pae</i>)	32,66
In238-like ^d (In238)	6	2	3	5'CS - aacA4 - bla _{VIM-4} - rpt ⁻ - ISPrsme1 - 3'CS	NA ^f	Poland, 2005 (<i>Pae</i>)	this work
In1451 (In238)	11	2	2	5'CS - aacA4 - bla _{VIM-3} - rpt ⁻ - 3'CS	MF975540	Poland, 2007 (<i>Sma</i> , <i>Pae</i>)	60, this work

In2015 (In238)	1	1	1	5'CS- <i>aacA4</i> - <i>bla</i> _{VIM-54} <i>pt</i> -3'CS	MW595339	Poland, 2015 (<i>Pae</i>)	this work
In337	1	1	1	5'CS- <i>bla</i> _{VIM-4} - <i>aacA4</i> -3'CS	AM087410	Poland, 2001 (<i>Pae</i>)	³¹
In593 (In1978)	5	1	1	5'CS- <i>bla</i> _{VIM-4} - <i>aacA7</i> - <i>aadA6</i> - <i>gcuDA</i> -3'CS	AM087411	Poland, 2011 (<i>Pae</i>)	³¹
In1652 (In1978)	1	1	1	5'CS- <i>bla</i> _{VIM-4} - <i>aacA7</i> - <i>gcuDA</i> -3'CS	MW595326	Poland, 2013 (<i>Pae</i>)	this work
In1978 (In1978)	3	1	1	5'CS- <i>bla</i> _{VIM-4} - <i>aacA7</i> - <i>aacA8</i> - <i>aacA7</i> - <i>aadA6</i> - <i>gcuDA</i> -3'CS	MW595338	Poland, 2004 (<i>Pae</i>)	this work
In1643	2	2	2	5'CS- <i>aacA7</i> - <i>bla</i> _{VIM-4} - <i>aacA7</i> - <i>aacA27A3</i> -3'CS	MW595317	Poland, 2010 (<i>Pae</i>)	this work
In1653	8	1	1	5'CS- <i>bla</i> _{VIM-4} - <i>aadB</i> -3'CS	MW595327	Poland, 2011 (<i>Pae</i>)	this work
In1654	2	2	2	5'CS- <i>bla</i> _{VIM-4} <i>pt</i> -3'CS	MW595328	Poland, 2010 (<i>Pae</i>)	this work
In1655	1	1	1	5'CS- <i>bla</i> _{VIM-4} <i>pt</i> - <i>gcuD</i> - <i>bla</i> _{OXA-10} -3'CS	MW595329	Poland, 2006 (<i>Pae</i>)	this work
In1658	6	1	1	5'CS- <i>aacA7</i> - <i>bla</i> _{VIM-4} <i>pt</i> -3'CS	MW595332	Poland, 2010 (<i>Pae</i>)	this work
In1667	3	1	1	5'CS- <i>bla</i> _{VIM-4} <i>pt</i> - <i>aacA4</i> -3'CS	MW595333	Poland, 2009 (<i>Pae</i>)	this work
In1966	1	1	1	5'CS- <i>bla</i> _{VIM-4} - <i>gcu9</i> - <i>tniC</i> ⁹	MW595336	Poland, 2013 (<i>Pae</i>)	this work
In2016	31	1	1	5'CS- <i>bla</i> _{VIM-4} - <i>bla</i> _{OXA-10} - <i>aphA6</i> .. ΔIn167/-3'CS	MW595340	Poland, 2006 (<i>Pae</i>)	this work
Integrons with <i>bla</i> _{IMP} -like genes							
In31	2	1	1	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-1} - <i>aacA4</i> - <i>catB6</i> - <i>gcuN</i> - <i>qacE2</i> -3'CS	AJ232604	Japan, 1998 (<i>Pae</i>); Poland, 2012 (<i>Pae</i>)	⁶¹ , this work
In1458	4	1	1	5'CS- <i>aacA4</i> - <i>bla</i> _{IMP-7} - <i>aacA4</i> - <i>bla</i> _{OXA-2} - <i>gcuE5</i> -3'CS	KY860567	Czechia, 2015 (<i>Pae</i>); Poland, 2009 (<i>Pae</i>)	²⁷ , this work
In1644 (In1644)	1	1	1	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-22} - <i>aadA1</i> - <i>ISPa21</i> -3'CS	MW595318	Poland, 2011 (<i>Pae</i>)	this work
In1645 (In1644)	1	1	1	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-22} - <i>aadA1</i> - <i>aadB</i> - <i>ISPa21</i> -3'CS	MW595319	Poland, 2013 (<i>Pae</i>)	this work
In1668	1	1	1	5'CS- <i>aacA4</i> - <i>bla</i> _{IMP-1} - <i>aadA6</i> -3'CS	MW595334	Poland, 2008 (<i>Pae</i>)	this work
In1977	1	1	1	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-13} - <i>gcu234</i> - <i>bla</i> _{OXA-10} / <i>aacA4</i> - <i>bla</i> _{OXA-10} / <i>aacA4</i> -3'CS	MW595337	Poland, 2013 (<i>Pae</i>)	this work

^aIntegrons in the table are ordered first according to MBL types, namely VIM-2 variants, VIM-1 variants and IMPs; then integrons within these groups are ordered according to their numbers, unless they form types of apparently related elements (named in parentheses; see footnote b); new integrons are indicated in bold.

^bIntegron types were arbitrarily assigned to groups of elements identified in the study isolates that might directly evolve one from another by point mutations or various recombination events.

^cWhen an integron was identified first in another country or species, the original organism is then followed by the first Polish MPPA isolate with this element reported previously or in this work (its isolation date may be earlier than that of the original one). *Pae*, *P. aeruginosa*; *Ppu*, *Pseudomonas putida*; *Sma*, *Serratia marcescens*.

^dThese elements differed from validly numbered integrons only by IS insertions that did not disrupt their gene cassettes; in contrast to In461 and In238, the intact In341 has not been identified in this study.

^eData concerning the In461-type integrons were shown also in the previous report.¹⁴

^fNA, not assigned.

^gThese integrons are of the Tn402 type, lacking the 3'CS and with gene cassettes followed directly by the *tniCQBA* transposition module.

^hIn1894 occurred together with In461 in a single ST235 isolate of a unique pulsotype (Table S4).

ⁱThe original GenBank entry AJ585042 with In238 of a Polish *P. aeruginosa* isolate³² seems to contain a 2 nt error in the *bla*_{VIM-4} coding sequence; therefore, the number used in the table refers to the consecutive *P. aeruginosa* In238 entry from Hungary.⁶⁶

^jIn2016 contains an *aphA6* gene and a truncated integron In167 (with a *bla*_{CARB-2} cassette) between *bla*_{OXA-10} and 3'CS.

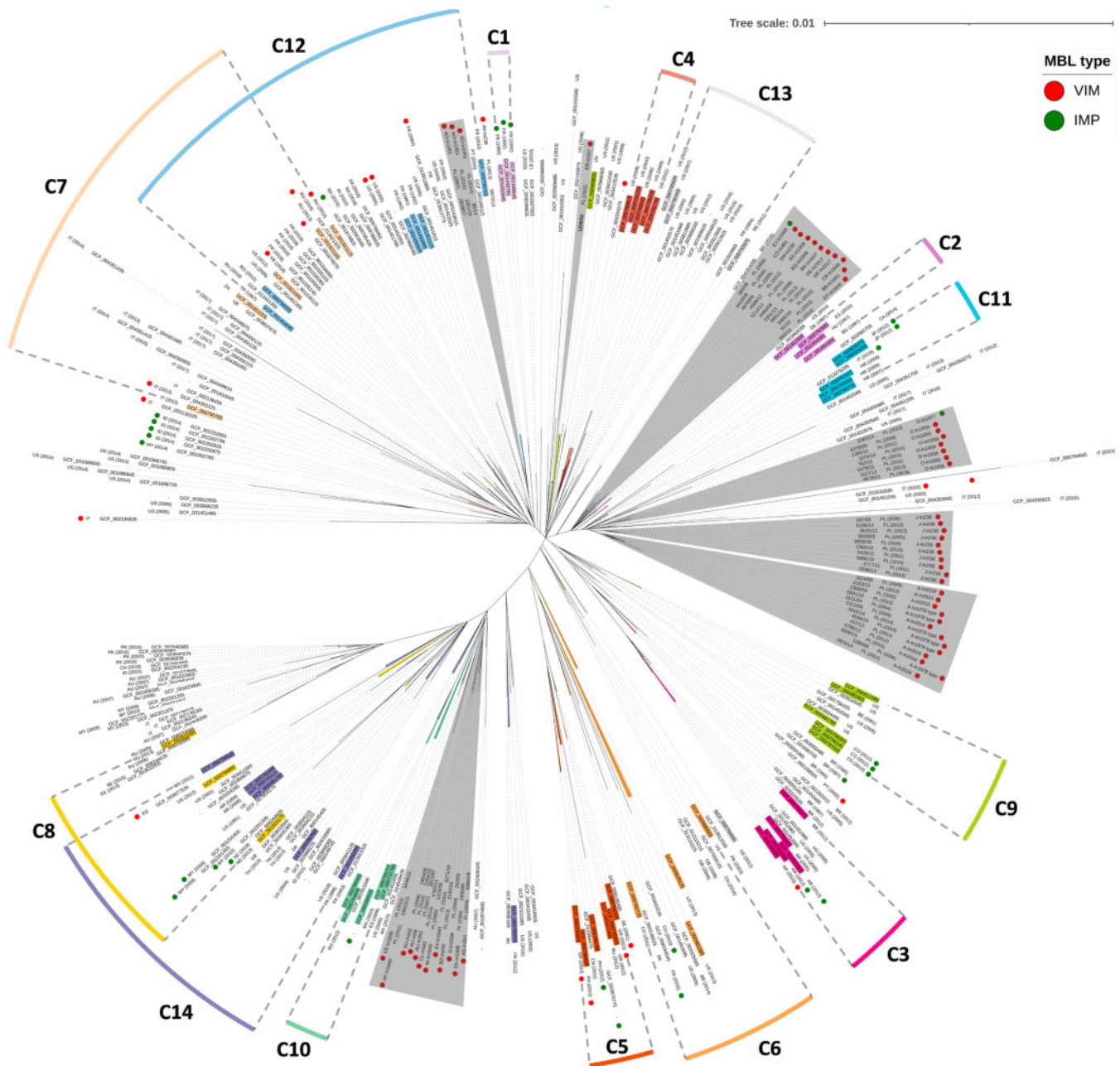


Figure 1. SNP-based phylogenetic tree of 59 sequenced MPPA ST235 Polish isolates compared with the international ST235 genomes available in GenBank. Numbers correspond to original numbers of the study isolates or GenBank assembly numbers. The reference strain 1258/02³¹ number is in bold. The country and year of isolation is specified at each strain/GenBank assembly number. The presence of VIM- or IMP-type MBL genes is indicated by red or green circles, respectively. Polish isolates are within grey fields, with genotypes defined by pulsotypes and integrons. Isolates studied previously by Treepong et al.⁴⁷ are assigned to original clades (C1–C14) and indicated in colours according to that report. The tree was constructed using Parsnp v. 1.5.3⁴⁵ and visualized with iTOL.⁴⁶ The names of countries were coded with ISO3166-1 alpha-2 standard. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

reference (Figure 1). The analysis corresponded well to that by Treepong et al.⁴⁷ who had compared 79 ST235 genomes (October 2016), distinguishing two main lineages (Groups I and II), split into 14 clades (C1–C14). Our study on more genomes suggested possible unity of some of the clades, and, similar to other larger country collections, distributed Polish isolates between several

clades (of Group I mainly). The genotypes A-In2016/In1978, J-In238 and O-In1656 were located close to clade C11 (Group I) isolates from, e.g. Italy and Croatia, with A-In2016/In1978 and J-In238 producing a common branch together. The remaining AO-In1451 was different, co-locating with clade C12 (Group I) isolates from France or Portugal. Most of the sporadic genotypes

were not scattered across the tree but formed two branches within clade C2 (Group I) and clade C10 (Group II). Of the archival isolates,³⁷ the reference was an 'orphan' related only to some US isolates, whereas 2611/04 was the index of A-In1978. In summary, the Polish ST235 population revealed its heterogeneous phylogeny, reflected by several distinct clades/branches, interspersed by and/or shared with isolates from other countries. Otherwise, the common branches of two major genotypes and two sets of sporadic ones indicated these to have differentiated in Poland (including acquisitions of various VIM integrons). The analysis has definitely confirmed the epidemic character of the major ST235 genotypes, spreading in southern, south-western and central regions (Figure S2).

Clonality and phylogeny of the ST111 MPPA isolates

Twenty-nine ST111 isolates of 14 pulsotypes were analysed, including one archival isolate (reference: 1956/01).³⁷ Twelve isolates represented the major genotype K-In59, and two were of the L-In1008. Like for ST235, the PFGE data were confirmed, except one sporadic pulsotype grouping with K-In59 (Figure S4). The number of polymorphic positions within the sample was 727, and SNP numbers between any of the isolates and the reference were 0–249 (Table S3). Pairs of closest relatives differed by 0–230 SNPs in the whole sample, and 2–10 and 3 SNPs within the K-In59 and L-In1008 epidemic clusters, respectively. The phylogenetic analysis, based on ~3.7 Mb (54%) of the reference genome, initially comprised 244 ST111 isolates from GenBank; however, 33 international isolates forming an outlier lineage were excluded. The remaining genomes were split into three groups (Figure S5). One of these (largely with VIM producers) contained the K-In59 cluster within a clade with UK isolates, and two minor types, related to isolates from the USA or Italy and Spain. More genotypes, including L-In1008, were in another lineage, related to isolates from the USA or several European countries. Among these were seven sporadic pulsotypes (including the reference) making a specific branch, likely due to evolution in the country. In summary, like ST235, the ST111 MPPA isolates in Poland were phylogenetically heterogeneous, owing to trans-border circulation of different lineages, and their on-site diversification along with regional spread, mainly in the western part of the country (Figure S2). Similar data on ST111 MPPA were described in the UK.⁴⁹

Clonality and phylogeny of the ST273 MPPA isolates

The analysis comprised 27 isolates of four ST273 pulsotypes (Table 1), 23 of which, including the archival isolate from 2000 (reference: 188/03),³¹ represented AE-In249. The number of polymorphic sites was 761, and the isolates differed from the reference by 25–294 SNPs (Table S3). The analysis grouped AE-In249 together with two minor pulsotypes, and pairs of closest relatives varied by 4–61 SNPs, indicating more microdiversity than in other epidemic organisms (Figure S6). The only outlier pulsotype (294 SNPs from the reference) differed also by the integron (In1008). The isolates were compared with only two sequenced ST273 organisms available, using ~5.5 Mb (79%) of the reference genome. The analysis separated the two foreign isolates (Figure S7), which with the scarcity of reports from elsewhere^{48,52–55} suggested that the entire Polish

ST273 population emerged and differentiated on site, gradually expanding into multiple regions (Figure S2).

Clonality and phylogeny of the ST654 MPPA isolates

Fifteen ST654 isolates of two pulsotypes, largely the predominant Q, were included in the analysis (Table 1), using the oldest isolate as a reference (4502/09). The genotypes Q-In1008/In1653 had eight and three isolates, respectively. The in-sample analysis revealed 129 polymorphic sites, with 4–39 SNPs between the reference and any other isolate (Table S3). Pairs of closest-related isolates differed by 1–39 SNPs in general and 1–28 SNPs within the pulsotype Q only, and the SNP distribution correlated well with the integron content (Figure S8). The sample was compared with 11 international ST654 genomes available, based on ~5.5 Mb (83%) of the reference sequence. All Polish ST654 isolates were separated into a single clade, regardless the pulsotype and integron (Figure S9), and ST654 was more homogeneous than the other STs, possibly owing to its emerging character. Like ST273 and specific ST235 and ST111 clusters/groups, its structure resulted from the in-country diversification (including the integron variation) during spread, ongoing mainly in southern regions (Figure S2).

Resistomes

All of the 163 sequenced genomes were subjected to the resistome analysis. A high variety of acquired AMR gene patterns were revealed, generated largely by genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes and, less so, β -lactamases (Table S4). Multiple isolates of specific ST/pulsotype-integron genotypes basically retained identical patterns. Individual resistomes contained 3–14 genes, and an average isolate had ~6.3 genes. ST235 had the highest mean number of AMR genes per isolate (~7.6), followed by ST111 (~5.4), ST273 (~5.1) and ST654 (~4.8), and of the major epidemic genotypes, ST235/A-In2016, ST235/O-In1656 and ST111/L-In1008 had broadest resistomes (~9.5, 8.4 and 10.5 genes, respectively). The ST273 and ST654 epidemic genotypes had less AMR genes in average (~4.3–6.0).

Conclusions

Regular surveillance run in Poland from 2000 showed a rapid MPPA spread in 2005–15, as compared with the period 1998–2004 with 53 infection/colonization cases in 16 hospitals.^{31–34} With 1314 cases confirmed in 212 centres across the country, MPPA became a serious public health threat. The aims of this and the previous reports,¹⁴ being together one of the largest molecular/genomic MPPA analyses conducted, was to reveal key factors of this increase. The overall diversity of the isolates, illustrated by 52 STs and 46 MBL integrons, was likely the highest ever observed at the country level. The presence of high-risk MDR *P. aeruginosa* clones and the ~73% predominance of four STs was not surprising, so was the position of the ST235 and ST111 pandemic lineages. Their Polish populations were heterogeneous owing to international circulation and in-country differentiation of organisms of multiple phylogenetic clades/branches. Contrarily, ST273 and ST654 formed more compact populations, apparently separate from those in other countries. Given the integron variety in the major lineages, these have disseminated basically by themselves, acquiring different integron-carrying platforms in individual locales. The

following (inter)regional spread of 10 major ST/pulsotype-integron genotypes was essential for the overall MPPA increase (~60% of the sample). Of note was expansion of ST273-In249, commenced around 2000 in the south-western area³¹ that yielded ~15% of all MPPA from many regions. Considering sporadic ST273 isolations in general,^{48,52–55} its relative success in Poland requires specific analysis. Another characteristic was the extreme variety of the MBL integrons, largely recorded only in Poland so far, being due to multiple emergence cases but also gradual differentiation of the elements by various mechanisms. The occurrence of identical integrons in different STs indicated their probable transmissions with plasmids/ICEs, with the spectacular example of In461, having spread on IncP-2-type plasmids into 35 STs (~18% of the isolates) over several regions.¹⁴ The other platforms, mainly chromosome-integrated ICEs/PAGIs, have been under a follow-up analysis (P. Urbanowicz and M. Gniadkowski, unpublished data).

Acknowledgements

Parts of the data described in the paper were presented at the Twenty-Eighth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Madrid, Spain, 2018 (oral presentation O0132), at the Twenty-Seventh ECCMID, Vienna, Austria, 2017 (ePoster EV0457) and at the Sixteenth International Conference on Pseudomonas, Liverpool, UK, 2017 (Poster P12).

We are very grateful to Thomas Jové for his most generous and competent consultations regarding integrons. We also thank Małgorzata Herda, Elżbieta Literacka and Wojciech Duljasz for their excellent support, and all clinical microbiologists who contributed to the study collection of MPPA isolates.

Funding

The study was financed by the grant 2016/21/B/NZ7/02075 from the Polish National Science Centre and SPUB MIKROBANK 2 from the Polish Ministry of Science and Higher Education.

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Tables S1 to S4 and Figures S1 to S9 are available as [Supplementary data](#) at JAC Online

References

- D'Agata E. *Pseudomonas aeruginosa* and other *Pseudomonas* species. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2015; 2518–31.
- Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet* 2003; **361**: 2068–77.
- Deptula A, Trejnowska E, Dubiel G et al. Prevalence of healthcare-associated infections in Polish adult intensive care units: summary data from the ECDC European Point Prevalence Survey of Hospital-associated Infections and Antimicrobial Use in Poland 2012–2014. *J Hosp Infect* 2017; **96**: 145–50.
- Horcajada JP, Montero M, Oliver A et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev* 2019; **32**: e00031–19.
- Oliver A, Mulet X, Lopez-Causape C et al. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 2015; **21–22**: 41–59.
- Cholley P, Thouverez M, Hocquet D et al. Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 2578–83.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**: 582–610.
- Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat* 2019; **44**: 100640.
- Botelho J, Grosso F, Quinteira S et al. The complete nucleotide sequence of an IncP-2 megaplasmid unveils a mosaic architecture comprising a putative novel *bla*_{VIM-2}-harbouring transposon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 2225–9.
- Cazares A, Moore MP, Hall JPJ et al. A megaplasmid family driving dissemination of multidrug resistance in *Pseudomonas*. *Nat Commun* 2020; **11**: 1370.
- Freschi L, Vincent AT, Jeukens J et al. The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity. *Genome Biol Evol* 2019; **11**: 109–20.
- Garza-Ramos U, Morfin-Otero R, Sader HS et al. Metallo-β-lactamase gene *bla*_{IMP-15} in a class 1 integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2943–6.
- Poirel L, Weldhagen GF, Naas T et al. GES-2, a class A β-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2598–603.
- Urbanowicz P, Bitar I, Izdebski R et al. Epidemic territorial spread of IncP-2-type VIM-2 carbapenemase-encoding megaplasmids in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Antimicrob Agents Chemother* 2021; **65**: e02122–20.
- Fonseca EL, Marin MA, Encinas F et al. Full characterization of the integrative and conjugative element carrying the metallo-β-lactamase *bla*_{SPM-1} and bicyclomycin *bcr1* resistance genes found in the pandemic *Pseudomonas aeruginosa* clone SP/ST277. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2547–50.
- Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L et al. *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front Microbiol* 2011; **2**: 150.
- Lee C, Klockgether J, Fischer S et al. Why? - Successful *Pseudomonas aeruginosa* clones with a focus on clone C. *FEMS Microbiol Rev* 2020; **44**: 740–62.
- Urbanowicz P, Izdebski R, Baraniak A et al. *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β-lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands. *J Antimicrob Chemother* 2019; **74**: 3117–9.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L et al. Metallo-β-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; **18**: 306–25.
- Ozer EA, Nnah E, Didelot X et al. The population structure of *Pseudomonas aeruginosa* is characterized by genetic isolation of *exoU*⁺ and *exoS*⁺ lineages. *Genome Biol Evol* 2019; **11**: 1780–96.
- Pirnay JP, Bilocq F, Pot B et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One* 2009; **4**: e7740.
- Cabrolie N, Sauget M, Bertrand X et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *J Clin Microbiol* 2015; **53**: 1395–8.
- Edelstein MV, Skleenova EN, Shevchenko OV et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**: 867–76.

- 24 Guzvinec M, Izdebski R, Butic I *et al.* Sequence types 235, 111, and 132 predominate among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Croatia. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 6277–83.
- 25 Kitao T, Tada T, Tanaka M *et al.* Emergence of a novel multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain producing IMP-type metallo- β -lactamases and AAC(6')-Iae in Japan. *Int J Antimicrob Agents* 2012; **39**: 518–21.
- 26 Nemeš A, Krizova L, Maixnerova M *et al.* Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Res Microbiol* 2010; **161**: 234–42.
- 27 Papagiannitsis CC, Medvecký M, Chudejová K *et al.* Molecular characterization of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of Czech origin and evidence for clonal spread of extensively resistant sequence type 357 expressing IMP-7 metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: e01811-17.
- 28 Perez-Vazquez M, Sola-Campoy PJ, Zurita AM *et al.* Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Spain: interregional dissemination of the high-risk clones ST175 and ST244 carrying *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-8}, *bla*_{VIM-20} and *bla*_{KPC-2}. *Int J Antimicrob Agents* 2020; **56**: 106026.
- 29 Wright LL, Turton JF, Livermore DM *et al.* Dominance of international 'high-risk clones' among metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 103–10.
- 30 Kos VN, Deraspe M, McLaughlin RE *et al.* The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 427–36.
- 31 Fielt J, Baraniak A, Mrowka A *et al.* Molecular epidemiology of acquired-metallo- β -lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 880–6.
- 32 Patzer J, Toleman MA, Deshpande LM *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *bla*_{VIM-4} gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998–2001). *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**: 451–6.
- 33 Patzer JA, Walsh TR, Weeks J *et al.* 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.
- 34 Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W *et al.* Evolution of an integron carrying *bla*_{VIM-2} in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**: 116–9.
- 35 Lee K, Lim YS, Yong D *et al.* Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 4623–9.
- 36 Poirer L, Walsh TR, Cuvillier V *et al.* Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; **70**: 119–23.
- 37 Miyoshi-Akiyama T, Tada T, Ohmagari N *et al.* Emergence and Spread of Epidemic Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Biol Evol* 2017; **9**: 3238–45.
- 38 Seifert H, Dolzani L, Bressan R *et al.* Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4328–35.
- 39 Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 2233–9.
- 40 Curran B, Jonas D, Grundmann H *et al.* Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 5644–9.
- 41 Siguier P, Perochon J, Lestrade L *et al.* ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: D32–6.
- 42 Moura A, Soares M, Pereira C *et al.* INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics* 2009; **25**: 1096–8.
- 43 Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 1995; **226**: 235–40.
- 44 Bankevich A, Nurk S, Antipov D *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012; **19**: 455–77.
- 45 Treangen TJ, Ondov BD, Koren S *et al.* The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol* 2014; **15**: 524.
- 46 Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 2019; **47**: W256–9.
- 47 Treepong P, Kos VN, Guyeux C *et al.* Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin Microbiol Infect* 2018; **24**: 258–66.
- 48 Khuntayaporn P, Yamprayooswat W, Yasawong M *et al.* Dissemination of carbapenem-resistance among multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo- β -lactamase genes, including the novel *bla*_{IMP-65} gene in Thailand. *Infect Chemother* 2019; **51**: 107–18.
- 49 Turton JF, Wright L, Underwood A *et al.* High-resolution analysis by whole-genome sequencing of an international lineage (sequence type 111) of *Pseudomonas aeruginosa* associated with metallo-carbapenemases in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2015; **53**: 2622–31.
- 50 Croughs PD, Klaassen CHW, van Rosmalen J *et al.* Unexpected mechanisms of resistance in Dutch *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected during 14 years of surveillance. *Int J Antimicrob Agents* 2018; **52**: 407–10.
- 51 Liakopoulos A, Mavroidi A, Katsifas EA *et al.* Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 505.
- 52 Liu H, Kong W, Yang W *et al.* Multilocus sequence typing and variations in the *oprD* gene of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a hospital in China. *Infect Drug Resist* 2018; **11**: 45–54.
- 53 Tada T, Hishinuma T, Watanabe S *et al.* Molecular characterization of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; **63**: e02397–18.
- 54 Slekovec C, Plantin J, Cholley P *et al.* Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. *PLoS One* 2012; **7**: e49300.
- 55 Schaumburg F, Bletz S, Mellmann A *et al.* Comparison of methods to analyse susceptibility of German MDR/XDR *Pseudomonas aeruginosa* to ceftazidime/avibactam. *Int J Antimicrob Agents* 2019; **54**: 255–60.
- 56 Al-Zahrani IA, Al-Ahmadi BM. Dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* associated with high-risk clone ST654 in a tertiary and quaternary hospital in Makkah, Saudi Arabia. *J Chemother* 2021; **33**: 12–20.
- 57 van Burgh S, Maghdi DM, Ganjo AR *et al.* PME and other ESBL-positive multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in the region of Kurdistan, Iraq. *Microb Drug Resist* 2019; **25**: 32–8.
- 58 Zowawi HM, Syrmis MW, Kidd TJ *et al.* Identification of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in selected hospitals of the Gulf Cooperation Council States: dominance of high-risk clones in the region. *J Med Microbiol* 2018; **67**: 846–53.
- 59 Bocharova Y, Savinova T, Lazareva A *et al.* Genotypes, carbapenemase carriage, integron diversity and *oprD* alterations among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Russia. *Int J Antimicrob Agents* 2020; **55**: 105899.
- 60 Izdebski R, Baraniak A, Zabicka D *et al.* VIM/IMP carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Poland: epidemic *Enterobacter hormaechei* and *Klebsiella oxytoca* lineages. *J Antimicrob Chemother* 2018; **73**: 2675–81.
- 61 Laraki N, Galleni M, Thamm I *et al.* Structure of In31, a *bla*_{IMP}-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phylogenetically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 890–901.

- 62** Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD et al. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- β -lactamase. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 4051–5.
- 63** Poirel L, Lambert T, Turkoglu S et al. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*_{VIM-2} carbapenem-hydrolyzing β -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 546–52.
- 64** Poirel L, Naas T, Nicolas D et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 891–7.
- 65** Samuelsen O, Toleman MA, Sundsfjord A et al. Molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 346–52.
- 66** Libisch B, Gacs M, Csiszar K et al. Isolation of an integron-borne *bla*_{VIM-4} type metallo- β -lactamase gene from a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Hungary. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 3576–8.
- 67** Scoulica EV, Neonakis IK, Gikas AI et al. Spread of *bla*_{VIM-1}-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the *bla*_{VIM-1} metallo- β -lactamase gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; **48**: 167–72.

Table S1. Centres, regions and years of isolation of the MPPA study isolates^a

Administrative region	n isolates	n centres	n cities	Years ^b
Mazowieckie	105	42	18	2005-15 ^c
<i>Warsaw urban area</i>	77	28	5	2005-15 ^c
Śląskie	73	35	22	2005-15 ^c
Wielkopolskie	48	21	13	2005-07; 2010-15 ^c
Lubuskie	35	13	11	2005-15
Dolnośląskie	33	14	7	2007; 2009-15 ^c
Kujawsko-pomorskie	33	14	9	2006; 2009-15 ^c
Małopolskie	22	13	6	2006; 2009-15 ^c
Łódzkie	21	12	8	2005; 2008-15
Opolskie	18	7	5	2008-15
Podkarpackie	14	9	6	2006; 2009-15
Warmińsko-mazurskie	12	7	4	2006; 2010-15
Pomorskie	10	7	4	2006; 2009-15 ^c
Lubelskie	10	5 ^d	2	2005; 2007-12
Zachodniopomorskie	9	5	4	2008; 2011-15
Podlaskie	6	5	4	2013-15
Świętokrzyskie	5	4	4	2011-15
Total	454	213 ^d	127	

^a – This table includes 80 *P. aeruginosa* isolates with integron In461, characterized also in the previous study,¹⁴ eight isolates included in an international comparative analysis,³⁷ and a single NDM-1+DIM-1-producing isolate reported separately.¹⁸

^b – In some regions the year of the first MPPA identification was separated in time from the period of regular reporting, and in one region two such periods were distinguished.

^c – These regions recorded MPPA isolates already in 1998-2004.^{31,32,34}

^d – One medical centre was an outpatient clinic; the others were hospitals.

Table S2. STs observed sporadically among the MPPA study isolates: their pulsotypes, MBL types and integrons, and basic epidemiological data^a

ST	pulsotype	MBL variant(s)	integron (type)	n isolates (WGS) ^b	n hospitals	n cities/ regions
ST27	B	VIM-2	In461	2 (1)	2	2/2
	BM	VIM-2	In461	1	1	1/1
	CI	VIM-2	In461	1	1	1/1
	F	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST697	AM	VIM-2	In461	1	1	1/1
	BP	VIM-2	In461	1	1	1/1
	AN	VIM-2	In1641	2 (1)	1	1/1
	EI	VIM-2	In1008	1	1	1/1
ST233	BY	VIM-4	In238	3	3	3/2
	N	VIM-2	In1650	1	1	1/1
ST253	BZ	VIM-2	In461	2	1	1/1
	CS	VIM-2	In461	1	1	1/1
	DX	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST357	CZ	IMP-7	In1458	4 (3)	3	3/2
ST1020	CN	VIM-2	In461	4	4	4/2
ST381	DK	VIM-2	In461	2 (1)	2	2/2
	DK	VIM-37	In1451 (In238 type)	1	1	1/1
ST108	BJ	VIM-2	In461	1	1	1/1
	DR	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST155	AL	VIM-2	In461	1	1	1/1
	BK	VIM-2	In1008	1	1	1/1
ST164	Y	VIM-2	In461	2	1	1/1
ST313	AZ	VIM-4	In238	1	1	1/1
	DJ	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST390	AI	VIM-2	In461	1 (1)	1	1/1
	DL	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST500	AK	VIM-2	In461	2	2	2/2
ST664	CY	VIM-1	In110	1	1	1/1
	ED	VIM-2	In1008	1	1	1/1
ST694	DN	VIM-2	In461	2	2	2/2
ST1197	P	VIM-2	In461	2 (1)	2	2/2
ST2553	DA	IMP-1	In31	2	2	2/2
ST41	DW	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST198	CG	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST207	R	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST234 ^c	CX	NDM-1+DIM-1 ^c	NA ^c	1 (1)	1	1/1
ST245	DY	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST260	BF	VIM-2	In1008	1	1	1/1
ST274	BG	VIM-4	In1654	1	1	1/1
ST308	DO	VIM-2	In1642	1	1	1/1
ST319	BX	VIM-2	In1648	1 (1)	1	1/1
ST348	BL	VIM-2	In1008	1	1	1/1
ST360	DQ	VIM-2	In461	1 (1)	1	1/1
ST446	CM	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST589	CH	VIM-2	In461	1 (1)	1	1/1
ST611	- ^d	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST655	AW	VIM-4	In1643	1 (1)	1	1/1
ST696	BU	VIM-2	In1008	1	1	1/1
ST792	DF	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST794	DG	VIM-2	In461	1 (1)	1	1/1
ST815	DS	VIM-2	In461-like	1	1	1/1
ST931	EN	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST1028	CQ	VIM-2	In461	1	1	1/1

ST1978	EC	VIM-2	In249	1 (1)	1	1/1
ST2238	DT	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST3212	CK	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST3213	CT	VIM-2	In461	1	1	1/1
ST3214	DU	VIM-2	In461	1	1	1/1

^a – Part of the data concerning the MPPA isolates with the In461 integron were shown also in the previous report.¹⁴

^b – Numbers in parentheses indicate numbers of isolates subjected to WGS.

^c – Most of the data for this NDM-1+DIM-1-producing isolate were published separately¹⁸; NA, non-applicable because this isolate did not produce VIM- or IMP-like MBLs.

^d – ‘-’, not classified by PFGE due to DNA degradation.

Table S3. Numbers of SNPs between the study MPPA ST235, ST111, ST273 and ST654 isolates and the corresponding reference isolates (1258/02, 1956/01, 188/03 and 4502/09, respectively)

ST235

Isolate ^a	ST/pulsotype-integron genotype ^b	pulsotype	integron	SNPs
1258/02 (ref) ^c		ER	In337	0
2611/04 ^b	ST235/A-In1978	A	In1978	80
1186/06 ^d	ST235/A-In1978	A	In1978	78
5891/10	ST235/A-In1978	A	In1978	80
2616/14	ST235/A-In1978	A	In593	90
437/13	ST235/A-In1978	A	In1652	90
4548/15	ST235/A-In1978	A	In1978	93
2360/09	ST235/A-In2016	A	In2016	82
2312/06 ^d	ST235/A-In2016	A	In2016	83
3153/13	ST235/A-In2016	A	In2016	84
1814/09	ST235/A-In2016	A	In2016	85
3556/15	ST235/A-In2016	A	In2016	85
6796/12	ST235/A-In2016	A	In2016	88
2823/14	ST235/A-In2016	A	In2016	89
2658/07	ST235/AO-In1451	AO	In1451	80
1051/15	ST235/AO-In1451	AO	In1451	85
88/14	ST235/AO-In1451	AO	In1451	86
3816/05 ^d	ST235/J-In238	J	In238	77
3859/09	ST235/J-In238	J	In238	78
1308/10	ST235/J-In238	J	In238	79
5426/11	ST235/J-In238	J	In238	80
5886/10	ST235/J-In238	J	In238	80
187/08	ST235/J-In238	J	In238	80
5195/13	ST235/J-In238	J	In238	81
5525/12	ST235/J-In238	J	In238	84
2836/13	ST235/J-In238	J	In238	84
4717/11	ST235/J-In238	J	In238	87
6378/09	ST235/O-In1656	O	In1656	85
1385/11	ST235/O-In1656	O	In1656	86
1076/14	ST235/O-In1656	O	In1656	88
1117/13	ST235/O-In1656	O	In1656	88
4678/15	ST235/O-In1656	O	In1656	89
5478/11	ST235/O-In1656	O	In1656	92
762/15	ST235/O-In1656	O	In1656	94
342/09		G	In1008	113
1597/13		O	In1977	92
1025/06 ^d		W	In1649	124
6896/09		AG	In341	141
10633/11		AP	In1649	140
4589/12		AS	In1008	84
1964/08		AU	In342	115

2913/07	AU	In342	116
2264/10	AU	In56	115
5973/13	AV	In238	87
9271/10	AX	In1643	109
4486/08	BA	In1647	86
91/10	BB	In1651	95
2145/13	BD	In249	110
5212/12	BQ	In1008	80
5965/10	CB	In1646	93
4700/14	CL	In342	123
2418/06	CO	In461	83
2351/13	DE	In2017	92
3991/14	DE	In2017	92
4878/09	DM	In238	89
5446/12	EE	In1008	126
384/08	EJ	In1668	85
1900/06	EK	In1008	115
950/14	EP	In1640	83
Total polymorphic positions			761

ST111

Isolate ^a	ST/pulsotype-integron genotype ^b	pulsotype	integron	SNPs
1956/01 (ref) ^c		DB	In1008	0
5500/10	ST111/K-In59	K	In59	73
1066/13	ST111/K-In59	K	In59	76
1546/14	ST111/K-In59	K	In59	75
2138/15	ST111/K-In59	K	In59	80
2488/15	ST111/K-In59	K	In59	78
3025/13	ST111/K-In59	K	In59	75
3073/15	ST111/K-In59	K	In59	83
319/15	ST111/K-In59	K	In59	78
4179/15	ST111/K-In59	K	In59	80
433/12	ST111/K-In59	K	In59	76
4374/14	ST111/K-In59	K	In59	74
4740/14	ST111/K-In59	K	In59	79
1821/05	ST111/L-In1008	L	In1008	67
2409/06 ^d	ST111/L-In1008	L	In1008	68
4135/15		D	In59	78
6062/12		AA	In1008	77
1010/06 ^d		AD	In1655	102
705/15		AJ	In59	60
3231/13		AY	In461	65
1897/13		BV	In461	60
8843/11		CE	In1656	100
3557/15		CE	In1656	104
185/15		CE	In56	92
17/09		CF	In461	41

5309/14	DB	In1008	0
2634/13	DZ	In1966	79
883/15	EG	In492	249
4430/15	EM	In59	82
Total polymorphic positions			727

ST273

Isolate ^a	ST/pulsotype-integron genotype ^b	pulsotype	integron	SNPs
188/03 (ref) ^c	ST273/AE-In249	AE	In249	0
272/14	ST273/AE-In249	AE	In249	45
538/09	ST273/AE-In249	AE	In249	27
692/12	ST273/AE-In249	AE	In249	29
1589/10	ST273/AE-In249	AE	In249	50
1805/09	ST273/AE-In249	AE	In249	25
1986/15	ST273/AE-In249	AE	In249	69
2165/06	ST273/AE-In249	AE	In249	48
2260/13	ST273/AE-In249	AE	In249	38
2779/15	ST273/AE-In249	AE	In249	37
3654/07	ST273/AE-In249	AE	In249	38
3856/10	ST273/AE-In249	AE	In249	49
3960/13	ST273/AE-In249	AE	In249	34
4392/05	ST273/AE-In249	AE	In249	78
4645/15	ST273/AE-In249	AE	In249	41
4752/09	ST273/AE-In249	AE	In249	28
4977/11	ST273/AE-In249	AE	In249	41
5091/15	ST273/AE-In249	AE	In249	52
5176/13	ST273/AE-In249	AE	In249	44
5876/12	ST273/AE-In249	AE	In249	80
6123/12	ST273/AE-In249	AE	In249	47
6705/12	ST273/AE-In249	AE	In249	39
8706/11	ST273/AE-In249	AE	In249	42
9154/11	ST273/AE-In249	AE	In249	34
4785/09		H	In249	81
1935/10		BT	In1008	294
4542/14		EO	In249	66
Total polymorphic positions				761

ST654

Isolate ^a	ST/pulsotype-integron genotype ^b	pulsotype	integron	SNPs
4502/09 (ref)		Q	In1667	0
250/14	ST654/Q-In1008	Q	In1008	24
308/11	ST654/Q-In1008	Q	In1008	13
497/13	ST654/Q-In1008	Q	In1008	20
1530/13	ST654/Q-In1008	Q	In1008	17

3706/12	ST654/Q-In1008	Q	In1008	26
4116/13	ST654/Q-In1008	Q	In1008	23
4723/14	ST654/Q-In1008	Q	In1008	21
8828/11	ST654/Q-In1008	Q	In1008	19
2183/15	ST654/Q-In1653	Q	In1653	28
5107/15	ST654/Q-In1653	Q	In1653	31
8866/11	ST654/Q-In1653	Q	In1653	17
2142/13		Q	In1667	4
3373/12		Q	In56	29
684/11		X	In1644	39
Total polymorphic positions				129

^a – Isolates of the epidemic ST/pulsotype-integron genotypes are presented first, followed by representatives of minor pulsotypes, ordered alphabetically.

^b – The specific names refer only to the ST/pulsotype-integron combined genotypes which grouped more than five isolates.

^c – Archival isolates recovered in 2000-04³¹ and used in this study for comparison and reference purposes.

^d – Sequences of these isolates had been obtained in the previous international study.³⁷

Table S4. Resistomes of the 163 MPPA isolates subjected to the short-read WGS analysis

ST	pulso type	integron	ST-pulsotype-integron combination ^a	n isolates ^b	acquired AMR genes ^c			n AMR genes/ isolate ^e
					resistance to β -lactams	resistance to aminoglycosides	resistance to other groups ^d	
ST235								7.6
	A	In2016	ST235-A-In2016	7	<i>bla</i> _{VIM-4} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{CARB-2}	<i>aacA7</i> , <i>aacA8</i> , <i>aadA6</i> , <i>aphA6</i>	<i>sul1</i> , (<i>crpP</i>)	9.5
	A	In1978 types ^f	ST235-A-In1978	6 ^g	<i>bla</i> _{VIM-4}	<i>aacA7</i> , <i>aadA6</i> , (<i>aacA7</i>), (<i>aacA8</i>)	<i>sul1</i>	5.5
	J	In238	ST235-J-In238	10	<i>bla</i> _{VIM-4rpt} , (<i>bla</i> _{TEM-116})	<i>aacA4</i> , <i>aacA7</i> , <i>aadA6</i>	<i>sul1</i> , <i>cmx</i> , (<i>crpP</i>)	6.6
	O	In1656	ST235-O-In1656	7	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-10}	<i>aacA4</i> , <i>aacA7</i> , <i>aacA8</i> , <i>aadA6</i>	<i>sul1</i> , (<i>crpP</i>)	8.4
	O	In1977		1	<i>bla</i> _{IMP-13} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{OXA-10}	<i>aacA4</i> , <i>aacA4</i> , <i>aacA7</i> , <i>aacA7</i> , <i>aacCA3</i> , <i>aadA2</i> , <i>aadA6</i> , <i>aphA6</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	<i>sul1</i>	
	AO	In1451	ST235-AO-In1451	3	<i>bla</i> _{VIM-37rpt}	<i>aacA4</i> , <i>aadA11</i> , <i>aadB</i> , (<i>aphA7</i>)	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i>	6.7
	DE	In2017		2	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4</i> , <i>aacA7</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA6</i> , <i>aadA13</i> , <i>aadB</i> , <i>aadB</i>	<i>sul1</i>	
	AS	In1008		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-2}	<i>aacA4</i> , <i>aacA7</i> , <i>aacA7</i> , <i>aacA8</i> , <i>aadA6</i>	<i>sul1</i>	
	AU	In342		2	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4</i> , <i>aphA15</i>	<i>sul1</i> , <i>crpP</i>	
	AU	In56		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4</i>	<i>sul1</i> , <i>crpP</i>	
	BQ	In1008		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-2}	<i>aacA4</i> , <i>aacA7</i> , <i>aacA8</i> , <i>aadA6</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	<i>sul1</i>	
	W	In1649		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4</i> , <i>aacC1</i>	<i>sul1</i> , <i>crpP</i>	
	AV	In238		1	<i>bla</i> _{VIM-4rpt}	<i>aacA4</i> , <i>aadA11</i> , <i>aadB</i> , <i>aphA7</i>	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i>	
	DM	In238		1	<i>bla</i> _{VIM-4rpt} , <i>bla</i> _{OXA-2} ,	<i>aacA4</i> , <i>aacA7</i> , <i>aacA8</i> , <i>aadA6</i> , <i>aphA6</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>strB</i>	<i>sul1</i> , <i>catA1</i> , <i>tet(A)</i>	
	EE	In1008		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{CARB-2}	<i>aacA4</i> , <i>aadA6</i> , <i>aphA6</i>	<i>sul1</i>	
	BD	In249		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA6</i> , <i>aphA6</i>	<i>sul1</i> , <i>crpP</i>	
	ER	In337		1 ^g	<i>bla</i> _{VIM-4} , <i>bla</i> _{SHV-5}	<i>aacA4</i> , <i>aacC1</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA6</i>	<i>dfrA1</i> , <i>sul1</i> , <i>crpP</i>	
	AG	In341-like		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-10}	<i>aacA4</i> , <i>aadB</i>	<i>sul1</i>	
	CL	In342		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4</i> , <i>aphA15</i>	<i>sul1</i> , <i>crpP</i>	
	CO	In461+In1894		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-2}	<i>aacA4</i> , <i>aacA8</i> , <i>aadA6</i> , <i>aadA6</i> , <i>aadA7</i> , <i>aadB</i>	<i>sul1</i> , <i>crpP</i>	
	EK	In1008		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-2}	<i>aacA4</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadB</i> , <i>aadB</i>	<i>sul1</i> , <i>crpP</i>	
	G	In1008		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-415}	<i>aacA4</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadB</i> , <i>aadB</i>	<i>sul1</i> , <i>crpP</i>	
	EP	In1640		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-210}	<i>aacA7</i> , <i>aacA7</i> , <i>aac8</i> , <i>aadA6</i> , <i>aadB</i> , <i>aphA6</i>	<i>sul1</i>	
	AX	In1643		1	<i>bla</i> _{VIM-4}	<i>aacA4</i> , <i>aacA7</i> , <i>aacA7</i> , <i>aacA27</i> , <i>aadA6</i>	<i>sul1</i> , <i>crpP</i>	
	CB	In1646		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{CARB-2}	<i>aacA4</i> , <i>aacA7</i> , <i>aacA8</i> , <i>aadA6</i> ,	<i>sul1</i> , <i>floR</i> , <i>tet(G)</i>	

BA	In1647		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4, aacA7, aacA8, aadA2, aadA6</i>	<i>sul1</i>	
AP	In1649		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4, aacC1, aadA6, aadB, aphA6</i>	<i>catB7, crpP</i>	
BB	In1651		1	<i>bla</i> _{VIM-62} , <i>bla</i> _{OXA-2}	<i>aacA4, aacA7, aacA8, aphA6, aadA6</i>	<i>sul1</i>	
EJ	In1668		1	<i>bla</i> _{IMP-1}	<i>aacA4, aacA7, aadA6</i>	<i>sul1, cmx, crpP</i>	
<hr/>							
ST111							5.4
K	In59	ST111-K-In59	12	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA29a, aacA29b, (aacA4), (aphA6)</i>	<i>sul1, crpP</i>	5.2
L	In1008	ST111-L-In1008	2	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{CARB-2} , <i>bla</i> _{OXA-4}	<i>aacA4, aadA2, aphA6, aphA-like, (aadB)</i>	<i>sul1, cmlB, crpP</i>	10.5
CE	In1656		2	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{CARB-2} , <i>bla</i> _{OXA-10}	<i>aacA4, aadA2, aadA6</i>	<i>sul1, crpP</i>	
CE	In56		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4</i>	<i>sul1, crpP</i>	
CF	In461		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{CARB-2}	<i>aadB, aadA6, aacA4, aadA2, aac(6')-Ib'</i>	<i>sul1, crpP</i>	
BV	In461		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{CARB-2} , <i>bla</i> _{OXA-2}	<i>aadB, aadA6, aacA4, aadA2, ant(4')-Iib</i>	<i>sul1, crpP</i>	
AA	In1008		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4</i>	<i>sul1</i>	
AJ	In59		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA29a, aacA29b</i>	<i>sul1, crpP</i>	
D	In59		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA29a, aacA29b</i>	<i>sul1, crpP</i>	
EM	In59		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA29a, aacA29b</i>	<i>sul1, crpP</i>	
AY	In461		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aadA6, aadB,</i>	<i>sul1, crpP</i>	
EG	In492		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{CARB-2}	<i>aacA4, aacC1, aadA2, aphA6, aphA7, aphA15</i>	<i>sul1, crpP, tet(C)</i>	
DB	In1008		2 ^s	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4</i>	<i>sul1, crpP</i>	
AD	In1655		1	<i>bla</i> _{VIM-4rpt} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM-116}	<i>aacA4, aadA2, aphA6, strA, strB</i>	<i>sul1, crpP</i>	
DZ	In1966		1	<i>bla</i> _{VIM-4} , <i>bla</i> _{VIM-4} , <i>bla</i> _{CARB-2}	<i>aacA4</i>	<i>sul1, crpP</i>	
<hr/>							
ST273							5.1
AE	In249	ST273-AE-In249	24 ^s	<i>bla</i> _{VIM-2} , (<i>bla</i> _{OXA-10})	<i>aacA4, aacC1, aphA6,</i>	<i>sul1, (crpP)</i>	6.0
H	In249		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-10}	<i>aacA4, aacC1, aphA6,</i>	<i>sul1, crpP</i>	
EO	In249		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4, aphA6,</i>	<i>sul1, crpP</i>	
BT	In1008		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>aacA4, aadA6, aphA6</i>	<i>sul1, crpP</i>	
<hr/>							
ST654							4.8
Q	In1008	ST654-Q-In1008	8	<i>bla</i> _{VIM-2} , (<i>bla</i> _{CARB-2})	<i>aacA4, aphA6,</i>	<i>sul1</i>	4.9
Q	In1653	ST654-Q-In1653	3	<i>bla</i> _{VIM-4} , (<i>bla</i> _{CARB-2})	<i>aadB, (aphA6)</i>	<i>sul1</i>	4.3
Q	In1667		2	<i>bla</i> _{VIM-4rpt} , <i>bla</i> _{CARB-2}	<i>aacA4, aadB, aphA6</i>	<i>sul1</i>	
Q	In56		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aphA6</i>	<i>sul1</i>	
X	In1644		1	<i>bla</i> _{IMP-22}	<i>aadA2-like, aadB, aphA6,</i>	<i>sul1</i>	
<hr/>							
ST244	BH	In461	ST244/BH-In461	1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aadA6, aadB</i>	<i>sul1, crpP</i>
<hr/>							
ST17	M	In1657		2	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-10}	<i>aadA6, aacA4</i>	<i>sul1, crpP</i>
	M	In461		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aadA6, aadB</i>	<i>sul1, crpP</i>
	CR	In461		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aadA6, aadB</i>	<i>sul1, crpP</i>
	DH	In238		1	<i>bla</i> _{VIM-4rpt}	<i>aacA4</i>	<i>sul1, cmx, crpP</i>

	EQ	In238		1	<i>bla</i> _{VIM-4rpt}	<i>aacA4</i>	<i>sul1, cmx, crpP</i>
ST395	AF	In238	ST395/AF-In238	5	<i>bla</i> _{VIM-4rpt}	<i>aacA4</i>	<i>sul1, cmx, crpP</i>
ST175	AC	In110	ST175/AC-In110	4	<i>bla</i> _{VIM-1}	<i>aacA4, aadA1, aadA13</i>	<i>sul1, crpP, (crpP)</i>
ST1567	AB	In1658	ST1567/AB-In1658	3	<i>bla</i> _{VIM-4rpt}	<i>aacA7</i>	<i>sul1, crpP</i>
ST27	CI	In461		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-2}	<i>aadA6, aadB</i>	<i>sul1, crpP</i>
ST697	AN	In1641		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA29a</i>	<i>sul1, cmx, crpP</i>
	CZ	In1458		3	<i>bla</i> _{IMP-7} , <i>bla</i> _{OXA-2}	<i>aacA4, aacA4, strA, strB</i>	<i>sul1, (cmx), crpP,</i>
ST381	DK	In461		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aadA6, aadB, ant(4')-IIb</i>	<i>sul1, crpP</i>
ST390	AI	In461		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-2}	<i>aadA6, aadB, ant(4')-IIb</i>	<i>sul1, crpP</i>
ST1197	P	In461		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-2}	<i>aadA6, aadB, ant(4')-IIb</i>	<i>sul1, crpP, crpP</i>
ST319	BX	In1648		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-21}	<i>accCA2</i>	<i>sul1, tet(A)</i>
ST360	DQ	In461		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aadA6, aadB</i>	<i>sul1</i>
ST589	CH	In461		1	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-2}	<i>aadA6, aadB, ant(4')-IIb</i>	<i>sul1, crpP</i>
ST655	AW	In1643		1	<i>bla</i> _{VIM-4}	<i>aacA7, aacA7, aacA27, aphA6, aadB</i>	<i>sul1, cmlB</i>
ST794	DG	In461		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aadA6, aadB, ant(4')-IIb</i>	<i>sul1</i>
ST1978	EC	In249		1	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>aacA4</i>	<i>sul1, crpP, crpP</i>

^a – Only the ST/pulsotype-integron combined genotypes with more than five isolates are named with specific symbols

^b – Numbers in the column refer to the sequenced isolates of the corresponding genotypes

^c – Symbols in parentheses refer to the genes that occurred not in all isolates of the corresponding genotypes

^d – “other groups” comprise trimethoprim, sulphonamides, phenicols, ciprofloxacin and tetracycline

^e – Mean numbers of AMR genes per isolate are shown only for the entire ST235, ST111, ST273 and ST654, and for their epidemic ST/pulsotype-integron genotypes

^f – In1978 types include In1652, In593 and In1978, and isolates with all these were represented in the WGS analysis

^g – These genotypes contained the four archival isolates from 2000-04.³¹

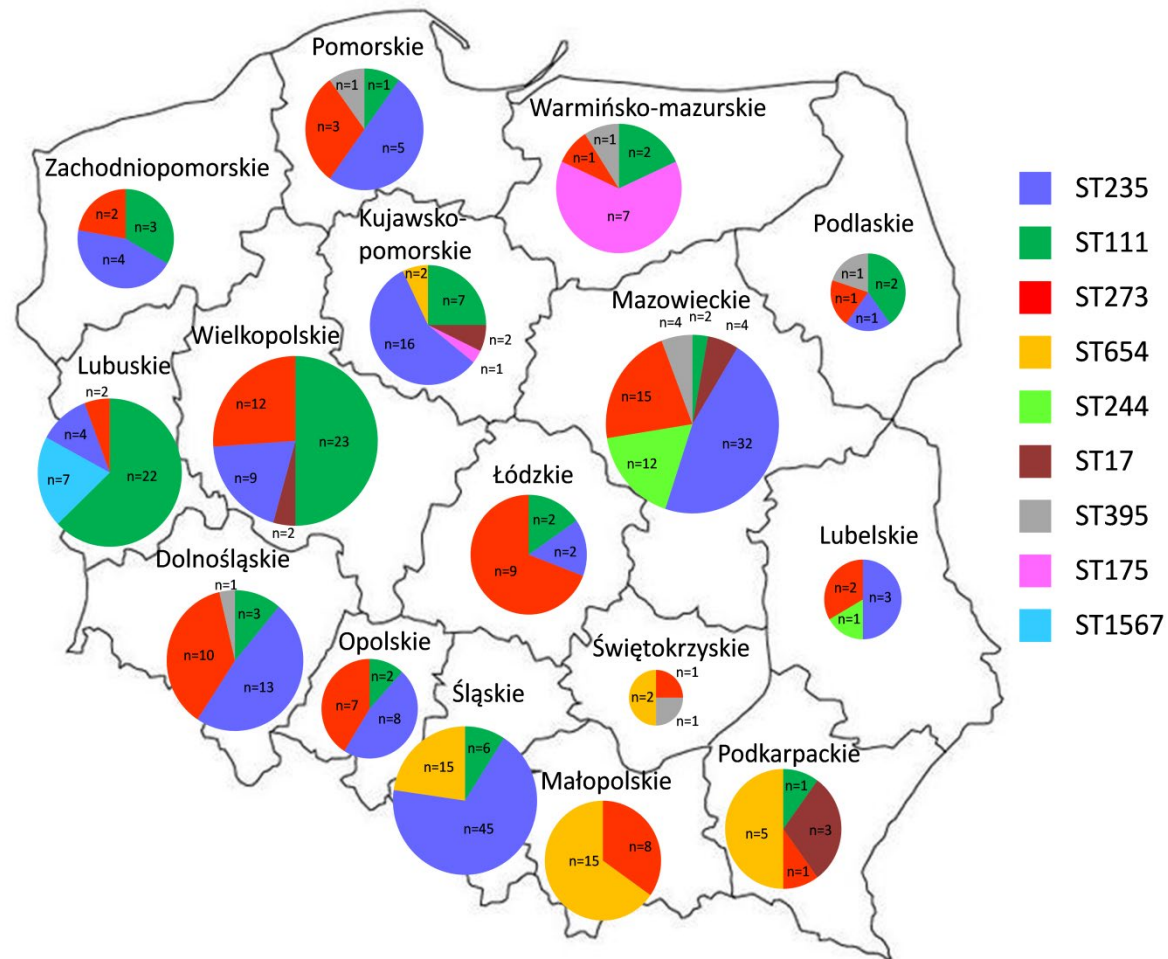
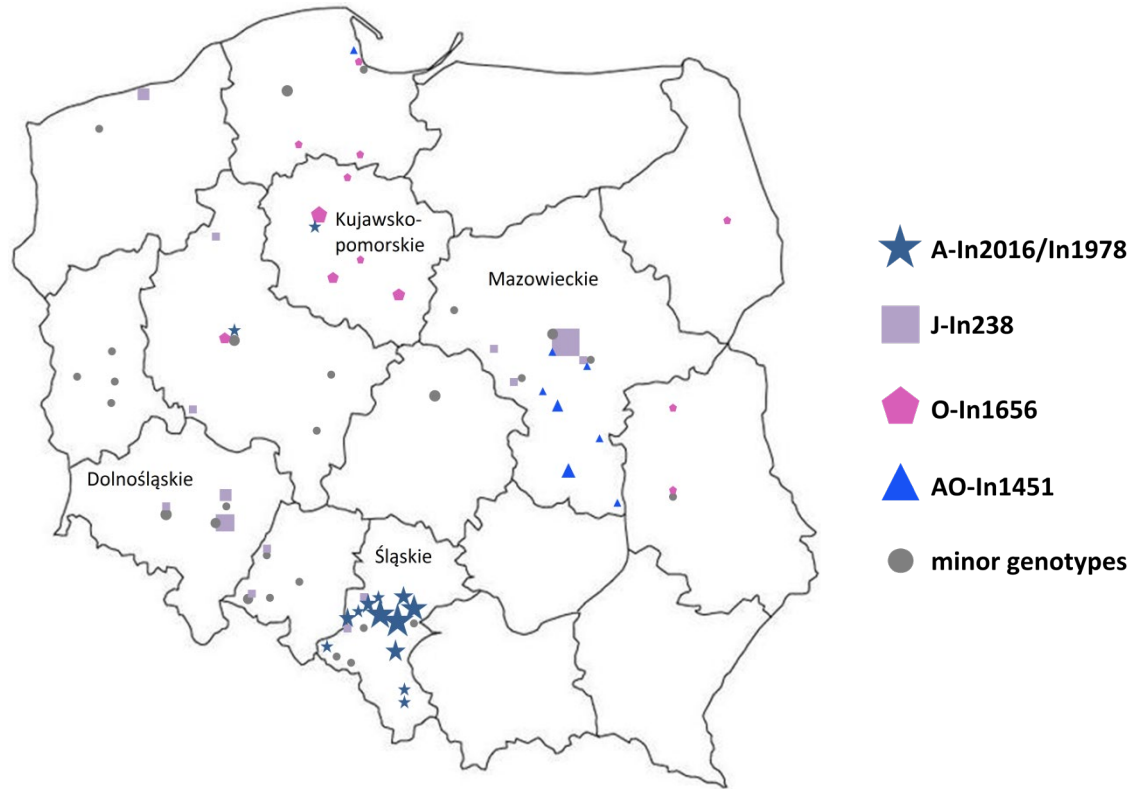
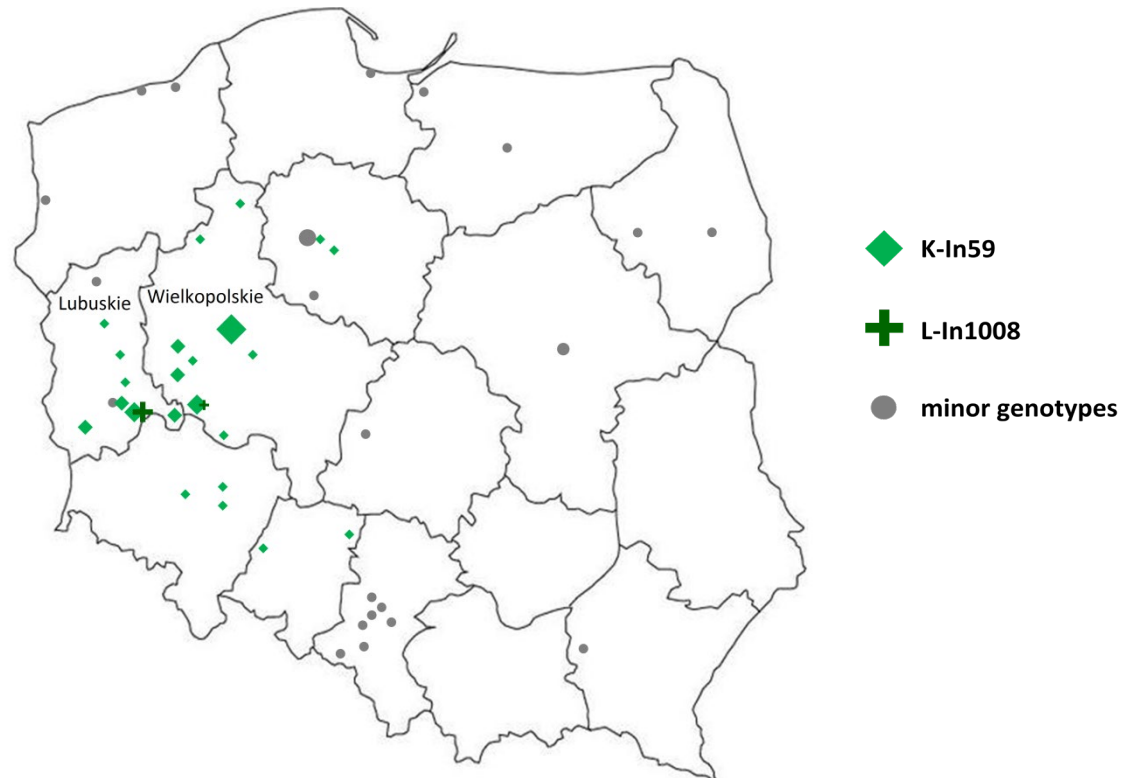


Figure S1. Regional distribution of the more prevalent STs identified in the MPPA isolates in Poland in 2005-15. The pie charts represent the STs' distribution in each region, with numbers of isolates of individual STs indicated.

A



B



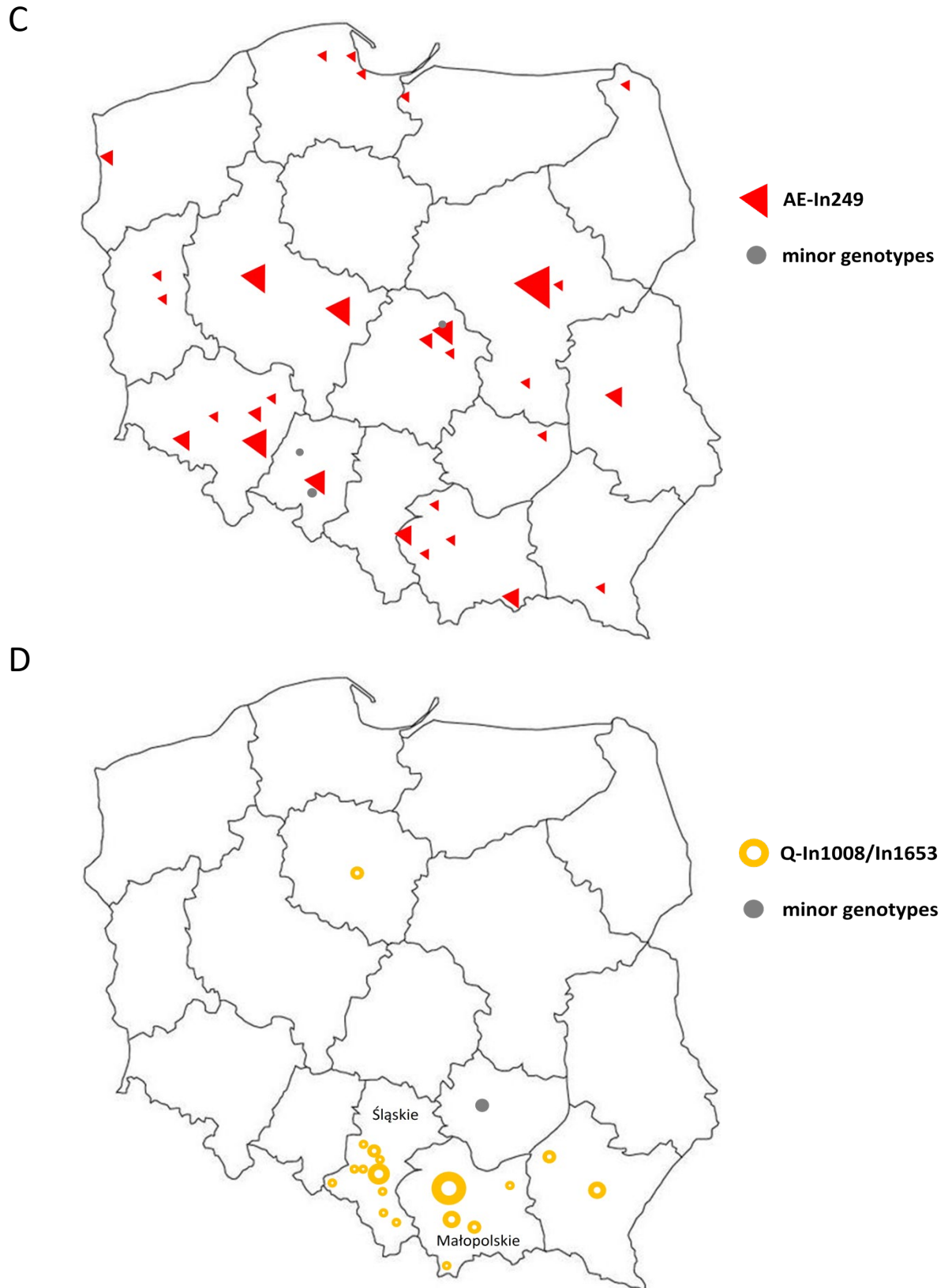


Figure S2. Geographic distribution of the MPPA isolates of: A) ST235, B) ST111, C) ST273, and D) ST654 in Poland, 2005-15. The major epidemic ST/pulsotype-integron genotypes are indicated by specific symbols and colours, as shown in legends next to the individual figures. Sizes of the symbols are roughly proportional to numbers of isolates in a given locale. Grey dots represent sporadic genotypes of the STs included.

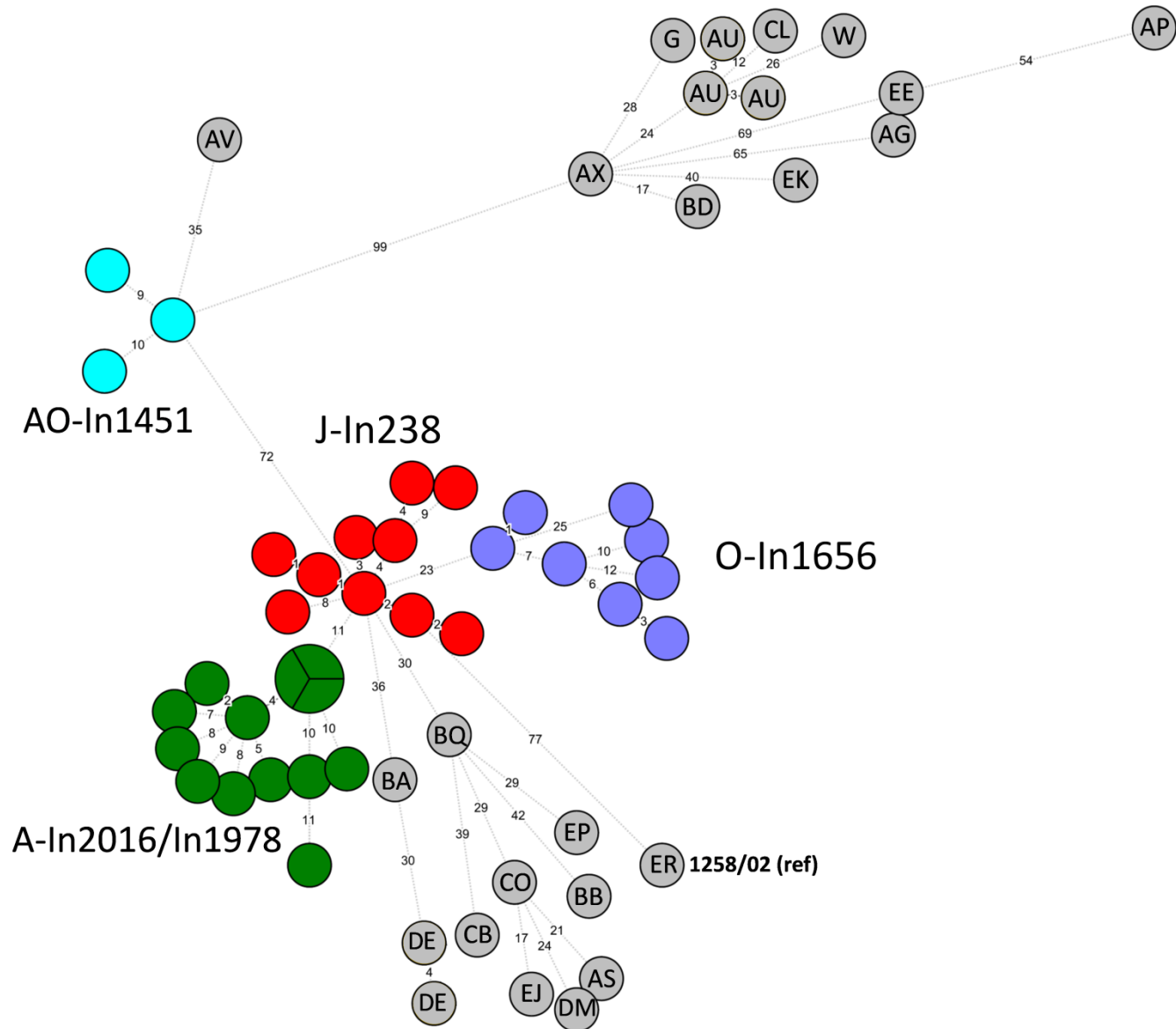


Figure S3. SNP-based minimum spanning tree of 59 sequenced Polish MPPA ST235 isolates, constructed using BioNumerics 7.6.3 (Applied Maths). The epidemic genotypes are defined by pulsotypes and integrons, and are distinguished with specific colours, while the minor/individual ones are defined by pulsotypes only and shown in grey. The reference isolate 1258/02³¹ is bolded. Lengths of branches are proportional to numbers of SNPs in pairs of closest-related isolates (as shown on the branches).

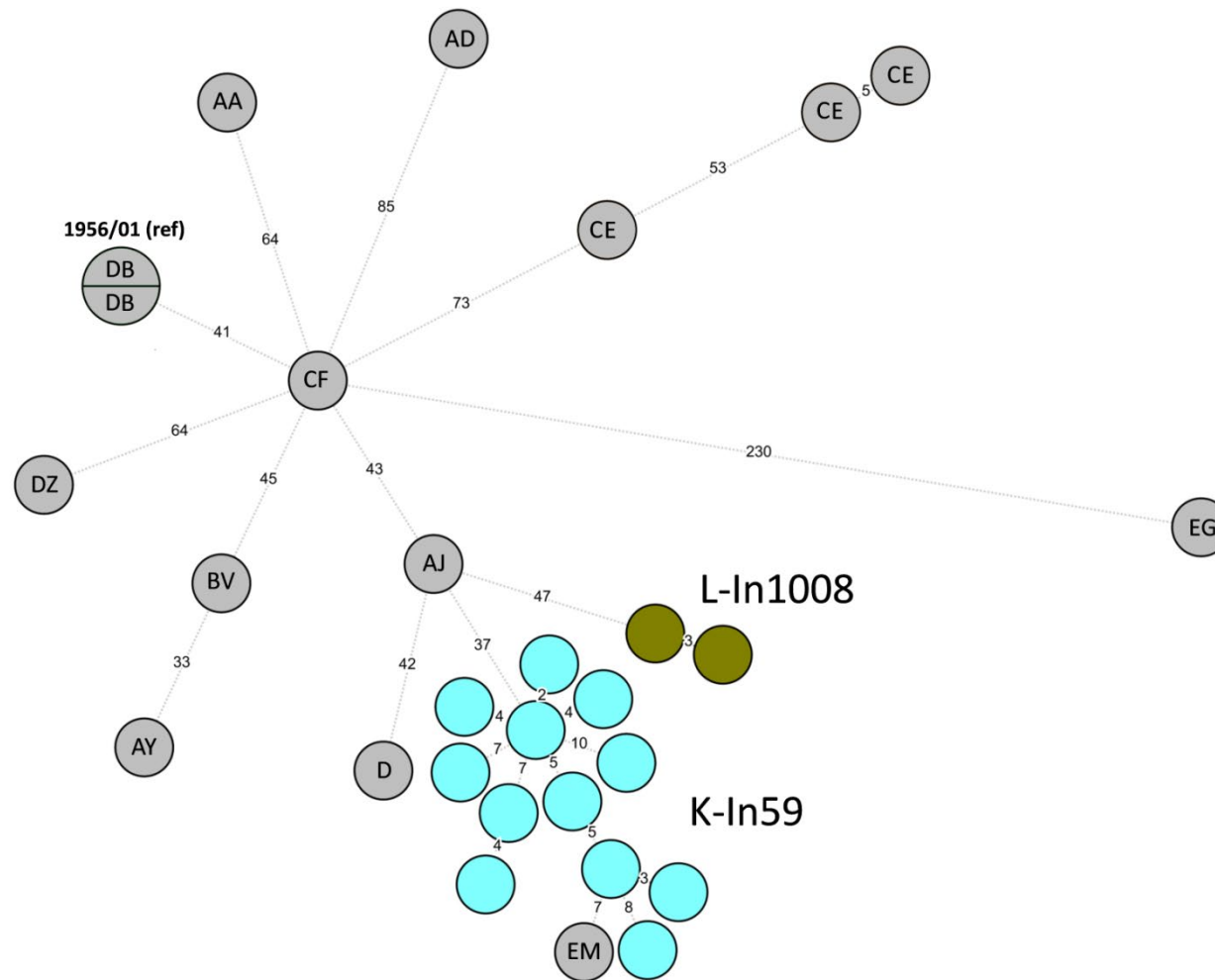


Figure S4. SNP-based minimum spanning tree of 29 sequenced Polish MPPA ST111 isolates, constructed using BioNumerics (Applied Maths). The epidemic genotypes are defined by pulsotypes and integrons, and are distinguished with specific colours, while the minor/individual ones are defined by pulsotypes only and shown in grey. The reference isolate 1956/01³¹ is bolded. Lengths of branches are proportional to numbers of SNPs in pairs of closest-related isolates (as shown on the branches).

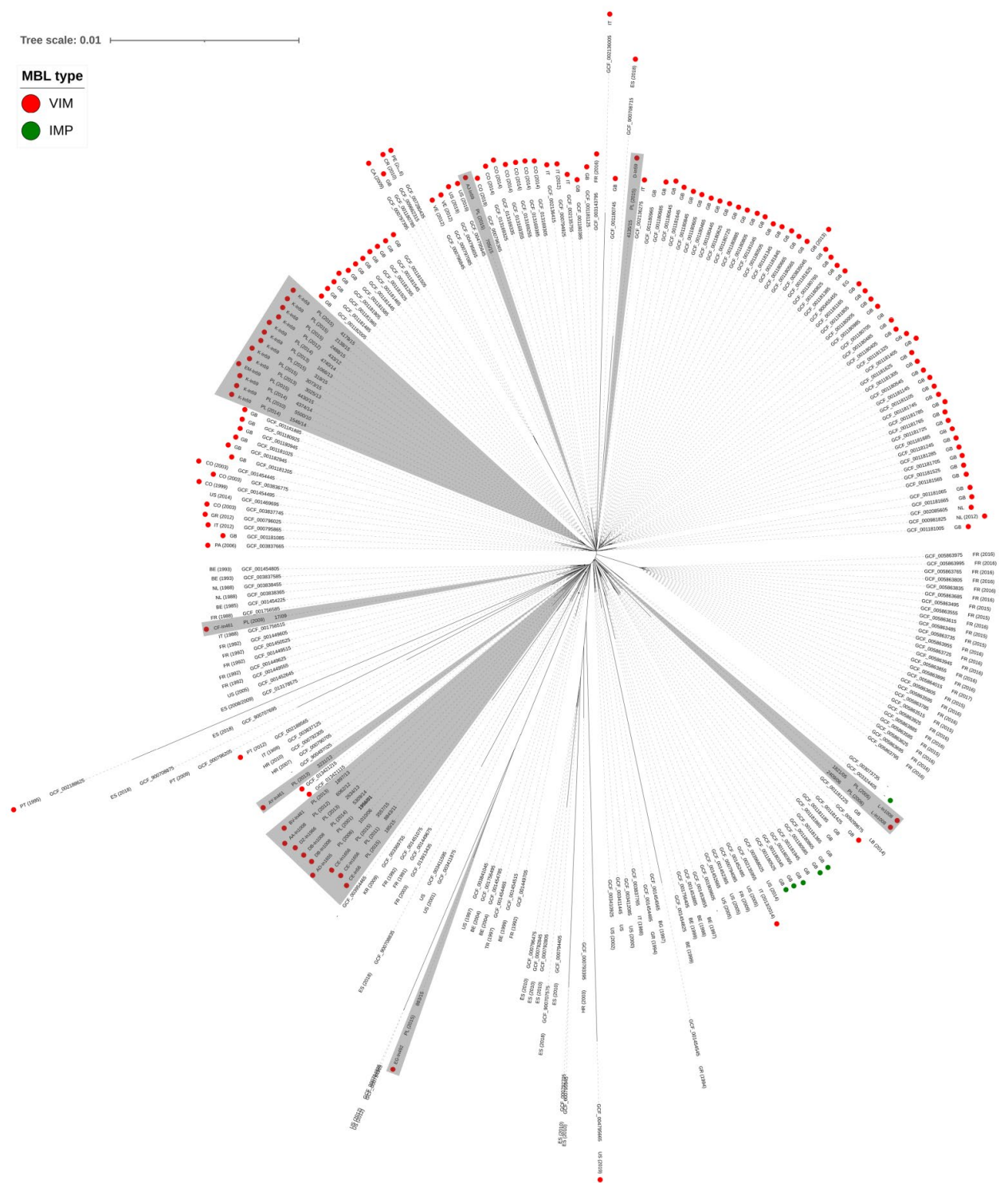


Figure S5. SNP-based phylogenetic tree of 29 sequenced MPPA Polish ST111 isolates compared with the international *P.aeruginosa* ST111 genomes available in GenBank. Numbers correspond to original numbers of the study isolates or GenBank assembly numbers. The reference strain 1956/01³¹ number is bolded. The country and year of isolation, when available, is specified at the strain/GenBank assembly number. The presence of VIM- or IMP-type MBL genes is indicated by red or green circles, respectively. Polish isolates are within grey fields, with genotypes defined by pulsotypes and integrons. The tree was constructed using Parsnp v. 1.5.3⁴⁵ and visualized with iTOL.⁴⁶ Countries' names were coded with ISO3166-1 alpha-2 standard.

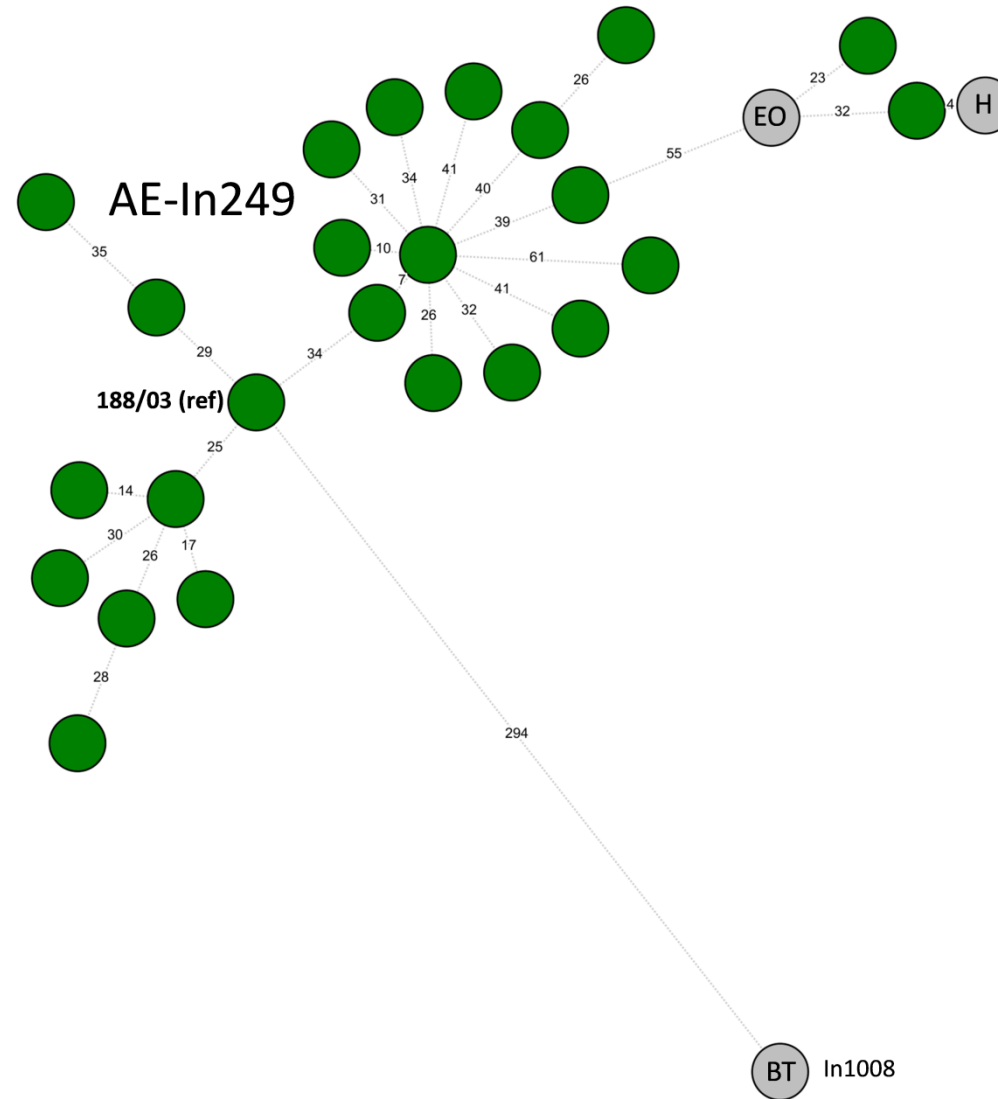


Figure S6. SNP-based minimum spanning tree of 27 sequenced Polish MPPA ST273 isolates, constructed using BioNumerics (Applied Maths). The major epidemic genotype ST273/AE-In249 is distinguished by green colour, while the minor/individual ones are defined by pulsotypes (BT also by the integron) and shown in grey. The reference isolate 188/03³¹ is bolded. Lengths of branches are proportional to numbers of SNPs in pairs of closest-related isolates (as shown on the branches).

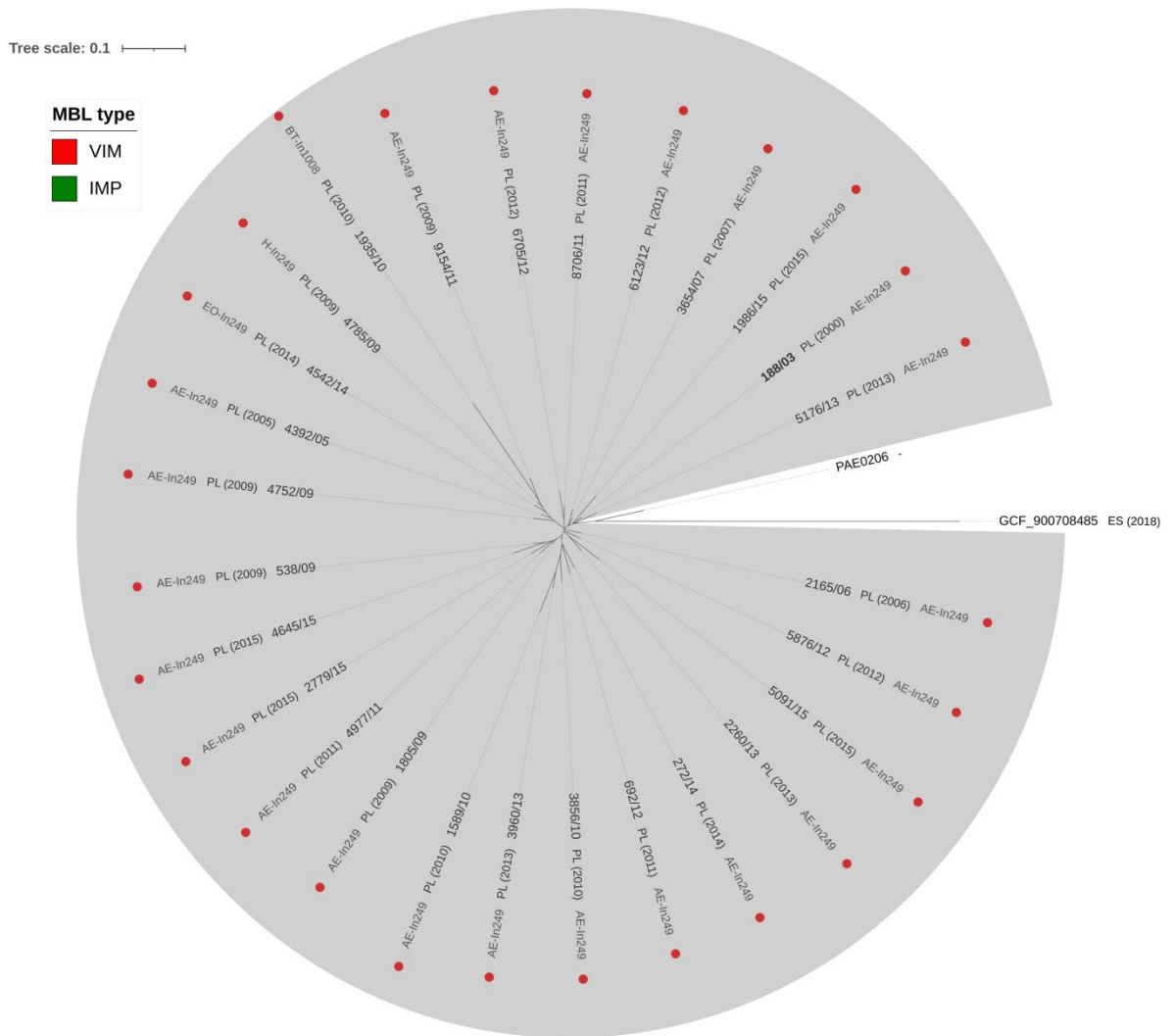


Figure S7. SNP-based phylogenetic tree of 27 sequenced MPPA Polish ST273 isolates compared with the international *P.aeruginosa* ST273 genomes available in GenBank. Numbers correspond to original numbers of the study isolates or GenBank assembly numbers. The reference strain 188/03³¹ number is bolded. The country and year of isolation, when available, is specified at the strain/GenBank assembly number. The presence of VIM- or IMP-type MBL genes is indicated by red or green circles, respectively. Polish isolates are within the grey field, with genotypes defined by pulsotypes and integrons. The tree was constructed using Parsnp v. 1.5.3⁴⁵ and visualized with iTOL⁴⁶. Countries names were coded with ISO3166-1 alpha-2 standard.

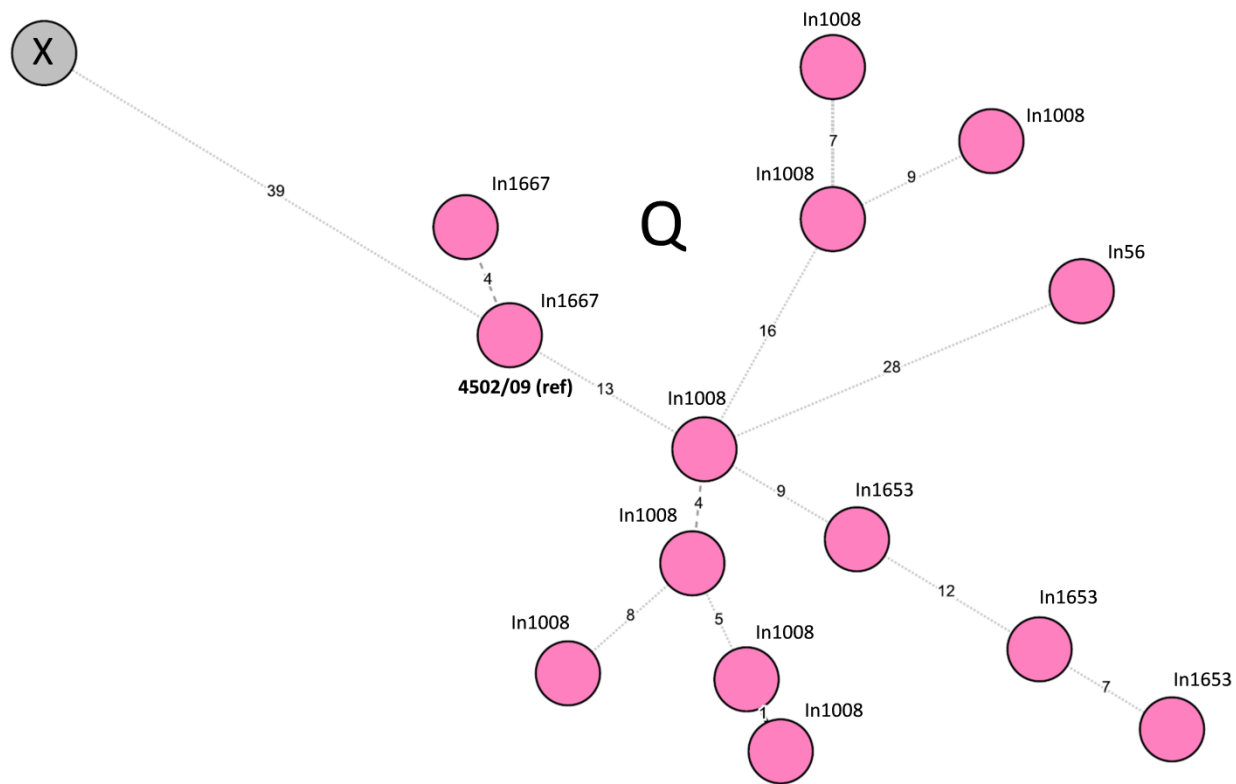


Figure S8. SNP-based minimum spanning tree of 15 sequenced Polish MPPA ST654 isolates, constructed using BioNumerics (Applied Maths). The major epidemic pulsotype Q isolates are distinguished by pink colour, and their integrons are indicated; the minor pulsotype X isolate is in grey. The reference isolate 4502/09 is bolded. Lengths of branches are proportional to numbers of SNPs in pairs of closest-related isolates (as shown on the branches).

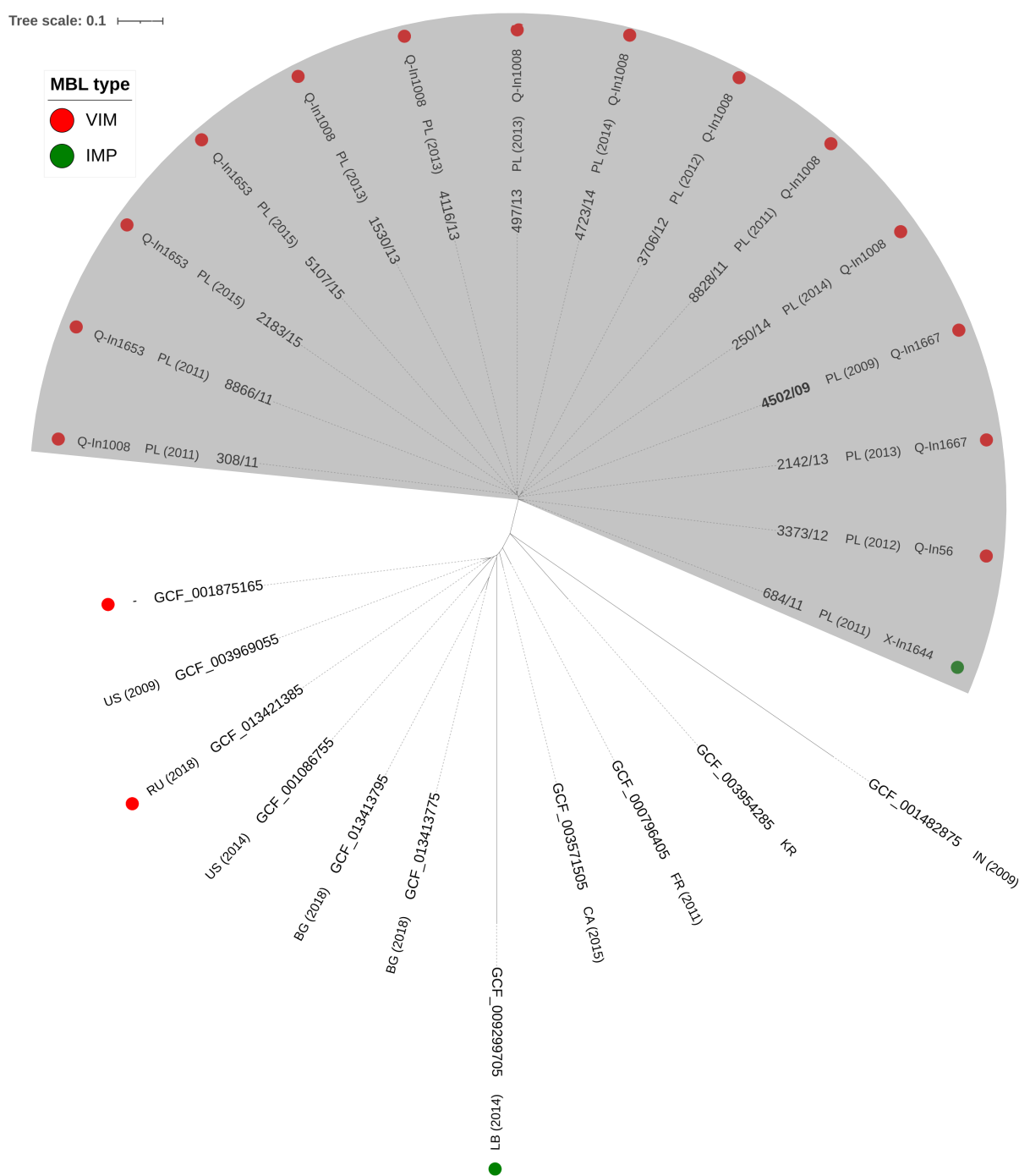


Figure S9. SNP-based phylogenetic tree of 15 sequenced Polish MPPA ST654 isolates compared with the international *P.aeruginosa* ST654 genomes available in GenBank. Numbers correspond to original numbers of the study isolates or GenBank assembly numbers. The reference strain 4502/09 number is bolded. The country and year of isolation, when available, is specified at the strain/GenBank assembly number. The presence of VIM- or IMP-type MBL genes is indicated by red or green circles, respectively. Polish isolates are within the grey field, with genotypes defined by pulsotypes and integrons. The tree was constructed using Parsnp v. 1.5.3⁴⁵ and visualized with iTOL⁴⁶. Countries names were coded with ISO3166-1 alpha-2 standard.

7.2 Epidemic territorial spread of IncP-2-type VIM-2 carbapenemase-encoding megaplasms in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* populations.



Epidemic Territorial Spread of IncP-2-Type VIM-2 Carbapenemase-Encoding Megaplasms in Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* Populations

✉ Paweł Urbanowicz,^a Ibrahim Bitar,^b ✉ Radosław Izdebski,^a Anna Baraniak,^a Elżbieta Literacka,^c Jaroslav Hrabák,^b Marek Gniadkowski^a

^aDepartment of Molecular Microbiology, National Medicines Institute, Warsaw, Poland

^bBiomedical Center, Faculty of Medicine in Plzeň, Charles University, Plzeň, Czech Republic

^cDepartment of Epidemiology and Clinical Microbiology, The National Reference Centre for Susceptibility Testing, National Medicines Institute, Warsaw, Poland

ABSTRACT In 2003 to 2004, the first five VIM-2 metallo- β -lactamase (MBL)-producing *Pseudomonas aeruginosa* (MPPA) isolates with an In4-like integron, In461 (*aadB-bla_{VIM-2}-aadA6*), on conjugative plasmids were identified in three hospitals in Poland. In 2005 to 2015, MPPA expanded much in the country, and as many as 80 isolates in a collection of 454 MPPA (~18%) had In461, one of the two most common MBL-encoding integrons. The organisms occurred in 49 hospitals in 33 cities of 11/16 main administrative regions. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) classified them into 55 pulsotypes and 35 sequence types (STs), respectively, revealing their remarkable genetic diversity overall, with only a few small clonal clusters. S1 nuclease/hybridization assays and mating of 63 representative isolates showed that ~85% of these had large In461-carrying plasmids, ~350 to 550 kb, usually self-transmitting with high efficiency (~10⁻¹ to 10⁻² per donor cell). The plasmids from 19 isolates were sequenced and subjected to structural and single-nucleotide-polymorphism (SNP)-based phylogenetic analysis. These formed a subgroup within a family of IncP-2-type megaplasms, observed worldwide in pseudomonads from various environments and conferring resistance/tolerance to multiple stress factors, including antibiotics. Their microdiversity in Poland arose mainly from acquisition of different accessory fragments, as well as new resistance genes and multiplication of these. Short-read sequence and/or PCR mapping confirmed the In461-carrying plasmids in the remaining isolates to be the IncP-2 types. The study demonstrated a large-scale epidemic spread of multidrug resistance plasmids in *P. aeruginosa* populations, creating an epidemiological threat. It contributes to the knowledge on IncP-2 types, which are interesting research objects in resistance epidemiology, environmental microbiology, and biotechnology.

KEYWORDS IncP-2, MBL, *Pseudomonas aeruginosa*, VIM, carbapenemase, megaplasmid, metallo- β -lactamase, plasmid

Pseudomonas aeruginosa is a frequent cause of nosocomial infections, affecting mainly the respiratory tract, skin and soft tissue, urinary tract, and bloodstream (1, 2). Their treatment is difficult owing to common multidrug resistance (MDR) of the pathogen, combining intrinsic and acquired antimicrobial resistance (AMR) mechanisms (3, 4). Among the latter, metallo- β -lactamases (MBLs) are especially relevant, hydrolyzing all penicillins, cephalosporins, and carbapenems and not being inhibited by any β -lactamase inhibitor of clinical use (5, 6). *P. aeruginosa* has been the main host of the “older” worldwide-spread MBL types, IMPs and VIMs, encoded by gene cassettes in highly diverse, usually class 1 integrons (3, 4, 6). Acquired AMR determinants,

Citation Urbanowicz P, Bitar I, Izdebski R, Baraniak A, Literacka E, Hrabák J, Gniadkowski M. 2021. Epidemic territorial spread of IncP-2-type VIM-2 carbapenemase-encoding megaplasms in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Antimicrob Agents Chemother* 65:e02122-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.02122-20>.

Copyright © 2021 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Marek Gniadkowski, m.gniadkowski@nil.gov.pl.

Received 5 October 2020

Returned for modification 13 November 2020

Accepted 25 January 2021

Accepted manuscript posted online 1 February 2021

Published 18 March 2021

TABLE 1 Geographic regions and years of isolation of the MPPA isolates with In461

Administrative region	No. of isolates	No. of centers	No. of cities	Yr(s) ^a
Mazowieckie	46	23	11	2003 ^b –2015
Warsaw urban area	32	16	4	2003 ^b –2015
Śląskie	9	8	8	2007, 2011–2014
Łódzkie	8	5	4	2008–2015
Kujawsko-Pomorskie	5	2	2	2009–2013
Podkarpackie	4	4	1	2006, 2014–2015
Opolskie	2	2	2	2011, 2015
Podlaskie	2	1	1	2013–2014
Lubelskie	1	1	1	2007
Świętokrzyskie	1	1	1	2015
Warmińsko-Mazurskie	1	1	1	2014
Zachodniopomorskie	1	1	1	2008

^aYears or periods of isolation of the In461 MPPA isolates; in some regions the year of the 1st identification was separated from the period of regular isolation.

^bIn Mazowieckie and Warsaw, the first identifications of the In461 MPPA occurred in 2003 to 2004 and were reported previously (9).

including MBL integrons, circulate in *P. aeruginosa* populations with plasmids and other transmissible platforms, like integrative and conjugative elements (ICEs), and relatively often incorporate into the chromosome (3). Several pandemic clones, e.g., sequence type 235 (ST235) and ST111, have been largely accumulating these, and clonal spread of their lineages has been the main method of AMR dissemination in *P. aeruginosa* (3, 4).

MBL-producing *P. aeruginosa* (MPPA) emerged in Poland in the period from 1998 to 2000 (7, 8). Studies on all 53 MPPA isolates collected by 2005 unveiled parallel clonal outbreaks caused by different organisms with chromosomal new VIM-encoding integrons in several parts of the country (9, 10). The central region Mazowieckie, with Warsaw as its main city, was peculiar in that nonrelated *Pseudomonas* strains from different hospitals from 2003 to 2004 had a unique integron, In461 (*aadB-bla_{VIM-2}-aadA6*), on conjugative plasmids, indicating territorial horizontal MBL transmission (9). From 2005 to 2015, the National Reference Centre for Susceptibility Testing (NRCST) recorded 1,314 MPPA cases from all of Poland, recently subjected to comprehensive studies on major factors driving this spread (11). This analysis was aimed at the characterization of the In461-carrying plasmids and addressing their role in MPPA epidemiology.

(Parts of the data described here were presented orally at the 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases [ECCMID] Madrid, Spain, 2018 [11], and as a poster at the 29th ECCMID, Amsterdam, The Netherlands, 2019 [12].)

RESULTS AND DISCUSSION

MPPA with In461—basic epidemiological and microbiological data. Since 2000 the NRCST has been conducting MPPA surveillance in Poland. Of the all nonduplicate 1,314 MPPA isolates confirmed from 2005 to 2015, a collection of 454 isolates was selected, representing at least one organism per medical center and year of recovery (11). The isolates were first typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and then were screened for *bla_{VIM/IMP}* integron variants by PCR fingerprinting (9), followed by sequencing these for each pulsotype/integron fingerprint combination. In461 was found in 80 isolates (sequenced in 54), which constituted ~18% of the collection, indicating the element to be one of the two most common MBL integrons (11). The isolates were recovered in 49 hospitals in 33 cities of 11/16 major administrative regions (Table 1; see also Fig. S1 in the supplemental material). The most affected county was Mazowieckie, where In461 had occurred first in 2003 to 2004 (9) and where at least 46

isolates (56%) were recovered in 23 centers and 11 towns in 2005 to 2015 (mainly in the Warsaw urban area). Łódzkie and Śląskie were the two next regions with recurring isolations of In461-bearing MPPA in multiple hospitals and locales, since 2007 to 2008. Most of the isolates were from infections ($n = 75$), almost equally representing those of the urinary tract ($n = 21$), skin and soft tissue ($n = 20$), and bloodstream and the respiratory tract ($n = 17$ each). Eight genetically diverse isolates selected for susceptibility testing (criteria reported below) showed resistance to carbapenems and to penicillins and cephalosporins plus their β -lactam inhibitor combinations (Table S1). Resistance to aminoglycosides was common, though it varied for individual drugs. The isolates differed in resistance to fluoroquinolones but were susceptible to colistin. With some diversity in AMR patterns and levels, all of the isolates revealed the MDR phenotype.

Clonality of the In461-bearing MPPA. By PFGE the 80 In461 isolates were classified into 55 pulsotypes (Table S2), representatives of which were then subjected to multilocus sequence typing (MLST). Thirty-five STs were discerned, 27 of which grouped isolates with In461 only and 8 of which had isolates with various integrons in the collection (Table S2) (11). A large majority of the types, 29 STs and 49 pulsotypes, comprised 1 or 2 isolates each. Of the pandemic MDR clones (3, 4, 13), ST111 was represented by 13 In461 isolates, though split into eight pulsotypes, with just one arising from a limited clonal spread in Śląskie. Others, like ST235, ST253, and ST395, had a few isolates each. Noteworthy was ST244, identified originally in 2003 to 2004 in Warsaw with PER-1 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) (14) and then observed worldwide (https://pubmlst.org/bigsubdb?db=pubmlst_paeruginosa_isolates&page=profiles). It included 12 isolates with In461, mainly of two pulsotypes spreading in the Warsaw area. In summary, MPPA with In461 showed high diversity, typical for populations with the dynamic horizontal transmission of a key genotypic trait, and a reduced role of clonal dissemination. Numerous “minor” clones were observed plus a limited presence of globally or locally relevant lineages.

In461-carrying plasmid mating and profiling. Sixty-three In461 isolates representing all pulsotypes (and multiple subtypes) were used in conjugation tests; transconjugants were obtained for 46 isolates, usually with high efficiency ($\sim 10^{-1}$ to 10^{-2} per donor cell). The S1-PFGE profiling of the same 63 isolates revealed that 54 isolates, including all mating and eight nonmating ones, had plasmids of ~ 350 to 550 kb (Table 2). Hybridization of the S1 patterns, done for 20 selected isolates, assigned In461 to the large plasmids. The remaining nine nonmating isolates had either smaller, bla_{VIM-2} -nonhybridizing plasmids (~ 150 to 200 kb) or no visible plasmids at all. The analysis proved that like the In461 isolates from 2003 to 2004 (9), the vast majority of those from 2005 to 2015 ($\sim 85\%$) had this integron on large, usually transmissible plasmids. Therefore, plasmid diffusion has been the main factor in In461 MPPA expansion in Poland.

Sequencing of pPUV plasmids and their comparative analysis. Full sequences of In461-carrying plasmids varying in size and mating ability were obtained for 18 study isolates plus 1 early strain from 2003 (9). The isolates represented different years and sites (hospitals, cities, and regions) of identification and were clonally diverse. Seventeen sequences, named pPUV-1 to pPUV-17, were determined in a specific long-read whole-genome sequencing (WGS) analysis, and two remaining ones, pPUV-18 and -19, were obtained by short-read WGS during a pPUV plasmid screening experiment described below (Table 2). The 19 circular contigs (~ 400 to 490 kb) were compared in detail within the sample and against GenBank. They matched 27 sequenced IncP-2-type plasmids (as of 24 June 2020), of which 22 with the highest BLAST score were chosen for the analysis (Table S3). These megaplasmids (~ 370 to 580 kb) had been identified in clinical, environmental, or industrial pseudomonad strains identified worldwide, and conferred resistance/tolerance to various stress factors, like antibiotics, heavy metals, or organic solvents (15–27). Fifteen of these were analyzed recently by Cazares et al. as “pBT2436-like megaplasmids” (16). A noncontinuous core genome was discerned in these (~ 200 kb; 42 to 57% of a molecule), with genes/operons or regions providing plasmid backbone-associated functions (16), all of which were found also in pPUVs (described below).

TABLE 2 STs, pulsotypes, and plasmid content of the 63 In461 MPPA isolates selected for the detailed plasmid analysis

Isolate ^a	Yr of isolation	Region of isolation ^b	Source	MLST	PFGE ^c	Mating ^d	Plasmid S1 profile ^e	pPUV-like plasmid analysis
804/03	2003	Mazowieckie	Urine	ST244	ND	+	ND	pPUV-1 (489,508) ^f
17/09	2008	Zachodniopomorskie	Urine	ST111	CF	+	~440	+ ^h
6106/09	2009	Kujawsko-Pomorskie	Blood	ST111	CE1	+	~450, ~190	+ ^h
9152/11	2011	Śląskie	Urine	ST111	AA1	—	~150	— ^h
9794/11	2011	Śląskie	Bronchial exudate	ST111	BV4	+	~420	+ ^h
601/12	2012	Łódzkie	Urine	ST111	BW1	—	—	— ^h
1897/13	2013	Śląskie	Bronchoalveolar lavage	ST111	BV1	—	—	— ^g
3231/13	2013	Śląskie	Wound	ST111	AY	—	—	— ^g
700/14	2014	Podlaskie	Urine	ST111	C	+	~400	pPUV-16 (398,692) ^f
1814/15	2015	Opolskie	Urine	ST111	K8	—	—	— ^h
259/06	2006	Mazowieckie (WUA)	Nasal swab	ST244	BH3	+	~460	pPUV-2 (471,725) ^f
981/06	2006	Mazowieckie (WUA)	Urine	ST244	BH5	+	~450, <50	pPUV-3 (458,868) ^f
1466/06	2006	Mazowieckie	Bronchoalveolar lavage	ST244	BO1	+	~470, <50	+ ^h
2498/07	2007	Lubelskie	Urine	ST244	BH1	+	~460	+ ^h
408/12	2012	Mazowieckie (WUA)	Wound	ST244	CJ	+	~500	+ ^h
6124/12	2012	Mazowieckie	Wound	ST244	CA	—	~430	pPUV-14 (421,847) ^f
505/11	2011	Mazowieckie (WUA)	Wound	ST27	CI	+	~430	+ ^g
5418/12	2012	Łódzkie	Urine	ST27	BM	+	~450	+ ^h
3606/13	2013	Podlaskie	Blood	ST27	B1	+	~350	+ ^h
1483/14	2014	Śląskie	Wound	ST27	F	+	~430	+ ^h
2785/12	2012	Mazowieckie	Wound	ST17	M4	+	~420	pPUV-19 (425,512) ^g
4927/14	2014	Podkarpackie	Tracheostomy tube	ST17	CR2	—	—	— ^g
3989/15	2015	Podkarpackie	Urine	ST17	CR1	—	—	— ^h
1185/06	2006	Mazowieckie (WUA)	Nasal swab	ST253	DX	+	~440, ~280	pPUV-4 (433,698) ^f
2407/06	2006	Podkarpackie	Urine	ST253	CS	+	~480	+ ^h
162/10	2010	Mazowieckie	Tracheostomy tube	ST253	BZ1	+	~440, ~180	pPUV-11 (436,091) ^f
8635/11	2011	Łódzkie	Sputum	ST108	BJ	+	~440	pPUV-12 (440,659) ^f
239/15	2015	Mazowieckie (WUA)	Blood	ST108	DR	+	~430	+ ^h
2418/06	2006	Mazowieckie	Blood	ST235	CO	—	~440	pPUV-5 (435,868) ^f
3459/07	2007	Śląskie	Urine	ST235	E	+	~420	pPUV-7 (413,916) ^f
5751/12	2012	Kujawsko-Pomorskie	Blood	ST381	DK3	—	~200	— ^h
5352/14	2014	Mazowieckie (WUA)	Blood	ST381	DK1	—	~500, ~180, <50	+ ^g
333/14	2014	Mazowieckie (WUA)	Wound	ST390	AI	+	~450	+ ^g
521/15	2015	Mazowieckie (WUA)	Blood	ST390	DL	—	~470	+ ^h
202/07	2007	Mazowieckie (WUA)	Bronchial exudate	ST500	AK1	+	~460	+ ^h
2635/08	2008	Łódzkie	Sputum	ST500	AK2	+	~500	pPUV-8 (489,682) ^f
42/05	2005	Mazowieckie (WUA)	Urine	ST694	DN1	+	~450	+ ^h
3438/07	2007	Śląskie	Bronchoalveolar lavage	ST694	DN2	+	~500	pPUV-6 (489,681) ^f
84/11	2011	Mazowieckie (WUA)	Bronchial exudate	ST697	AM	+	~520	+ ^h
8769/11	2011	Opolskie	Tracheostomy tube	ST697	BP	+	~400, ~170	pPUV-13 (398,622) ^f
133/15	2015	Mazowieckie	Decubitus ulcer	ST1020	CN3	+	~400	pPUV-17 (398,641) ^f
4054/15	2015	Mazowieckie	Ulcer	ST1020	CN1	—	~400	+ ^h
3005/09	2009	Mazowieckie (WUA)	Tracheostomy tube	ST41	DW	+	~460	pPUV-10 (470,075) ^f
5557/09	2009	Mazowieckie (WUA)	Ulcer	ST155	AL	+	~550	+ ^h
4793/14	2014	Mazowieckie	Urine	ST164	Y2	+	~450	+ ^h
1412/07	2007	Mazowieckie (WUA)	Blood	ST198	CG	+	~430	+ ^h
724/13	2013	Kujawsko-Pomorskie	Urine	ST207	R	+	~450	+ ^h
347/11	2011	Kujawsko-Pomorskie	Wound	ST245	DY	—	~450, ~160	+ ^h
30/15	2015	Mazowieckie (WUA)	Blood	ST313	DJ	+	~460	+ ^h
5912/09	2009	Mazowieckie (WUA)	Wound	ST360	DQ	—	~430	pPUV-18 (426,903) ^g
2098/13	2013	Mazowieckie (WUA)	Rectal swab	ST395	DP	+	~460	+ ^h
2541/15	2015	Mazowieckie (WUA)	Decubitus ulcer	ST446	CM1	+	~350	+ ^h
18/09	2008	Mazowieckie (WUA)	Blood	ST589	CH	+	~400	+ ^g
3364/08	2008	Mazowieckie (WUA)	Wound	ST611	—	+	~450	pPUV-9 (452,776) ^f
3872/10	2010	Mazowieckie	Urine	ST792	DF	+	~400	+ ^h
4157/10	2010	Mazowieckie (WUA)	Urine	ST794	DG	+	~450	+ ^g
3671/10	2010	Mazowieckie (WUA)	Urine	ST815	DS	+	~450	+ ^h
3209/12	2012	Mazowieckie (WUA)	Wound	ST931	EN	+	~430	+ ^h
236/11	2011	Łódzkie	Bronchial exudate	ST1028	CQ	—	—	— ^h
2529/15	2015	Łódzkie	Bronchoalveolar lavage	ST1197	P	—	~450	+ ^h

(Continued on next page)

TABLE 2 (Continued)

Isolate ^a	Yr of isolation	Region of isolation ^b	Source	MLST	PFGE ^c	Mating ^d	Plasmid S1 profile ^e	pPUV-like plasmid analysis
773/10	2010	Mazowieckie (WUA)	Wound	ST2238	DT	+	~460	+ ^h
5515/10	2010	Łódzkie	Bronchial exudate	ST3213	CT	+	~420	+ ^h
846/06	2006	Mazowieckie (WUA)	Blood	ST3214	DU	+	~430	+ ^h
1389/13	2013	Mazowieckie (WUA)	Wound	ST3212	CK	+	~ 450	pPUV-15 (433,807) ^f

^aIsolate 804/03, shown in the first position, is an archival strain from the previous report (9), included in this study only for the plasmid long-read sequencing; the following isolates are ordered according to representation of their STs; in case of equally represented STs these are shown in the ascending manner.

^bWUA, Warsaw urban area within the Mazowieckie region.

^cUppercase letters designate pulsotypes, followed by numbers symbolizing subtypes; designations are according to those assigned to the entire baseline MPPA collection ($n = 454$) (11), to which the In461 isolates belonged. —, not identified due to DNA degradation. ND, not determined in this study.

^d+ and —, positive and negative results of the conjugation test, respectively.

^eValues represent sizes of plasmids in kilobases, roughly calibrated on S1/PFGE gels. Underlined size values indicate 20 MPPA isolates selected for hybridization of their S1 plasmid profiles with the *bla*_{VIM-2} probe; values in bold refer to the plasmids that hybridized with the probe. ND, not determined because this archival isolate (9) was not included in the S1 analysis. —, no plasmids visible in the S1 analysis.

^fSeventeen pPUV plasmid variants sequenced by the PacBio long-read WGS technology (Pacific Biosciences); their sizes, in base pairs, are in parentheses.

^gTen isolates selected for the short-read WGS (MiSeq, Illumina) pPUV-like plasmid mapping. pPUV-18 and -19 variants with sizes, in base pairs, in parentheses are those for which full circular contigs were obtained with MiSeq. + and —, pPUV presence and absence, respectively.

^hThirty-seven isolates selected for the PCR pPUV-like plasmid mapping. + and —, pPUV presence and absence, respectively.

The single-nucleotide-polymorphism (SNP)-based phylogenetic analysis of the pBT2436-like plasmids, using the variant pPUV-2 (471,725 bp) as a reference, revealed pPUVs to form a tight cluster with 0 to 10 SNPs between each other (Fig. 1, Fig. S2, and Table S4). All but one of the other plasmids differed by 993 to 4,594 SNPs from pPUV-2; the exception was pJB37 from a Portuguese clinical *P. aeruginosa* isolate (15) which fell into the pPUV cluster (4 SNPs). The actual range of its colinearity with pPUVs extended beyond the core genome, up to ~80 to 90% of its sequence with 99.6 to 100% nucleotide identity (Fig. S3). This indicated that pJB37 and pPUVs shared also some accessory genome regions (addressed below), the variety of which, usually larger mosaic assemblies of genes and mobile elements, were identified in pBT2436-like molecules by Cazares et al. and others (16, 20, 23, 27). Interestingly, pJB37 was the only “non-Polish” pBT2436-like plasmid with the *bla*_{VIM-2} MBL gene (15); however, dissimilar integrons (In58 versus In461) and their mobile context (described below) proved separate recent evolution of these closely related molecules, comprising independent *bla*_{VIM-2} acquisitions.

Characterization of pPUV plasmids. The in-sample analysis of the 19 pPUV plasmids demonstrated these to share ~330 kb with each other (~67 to 82%) (Fig. 2). This common part comprised the pBT2436-like core genome with the IncP-2-specific determinants of replication (*repA*), partition (*parAB*), conjugation (*traGBV*, *dnaG*, and type IV pilus/type II secretion system genes), chemotaxis (*cheBARZWY*), and tellurite resistance (*terZABCDEF*), as reported by Cazares et al. (16). Our manual annotation allowed identification of three more putative core conjugation genes, *traK* and *traC*, in the *traGBV* region, and *traU*, between *repA* and *cheB*. The role of *traC* (*virB4* [16]) and *traU* was supported by two nonconjugative variants, pPUV-14 and pPUV-5, respectively, in which these genes are disrupted by an IS*Pa97*-like element (IS66 family) and IS*Ppu23*, respectively. The pPUV common part (and the pBT2436-like core genome) also contains the *slvAT* new toxin-antitoxin system genes, recently found in the pTTS12 plasmid from The Netherlands (Table S3), contributing to plasmid stability and organic solvent tolerance (28).

The comparison also revealed seven accessory regions (~23 to 50 kb), variably present in pPUVs (Table S5). A region of ~47 kb occurred in 14 variants and was found entirely also in pJB37 (15) and partially in pTTS12 (17, 29) and pOZ176 (21) from China (Table S3). The fragment contained additional, nonrelated replication (*repA*), partitioning (*parAB*), and conjugation (*trbK*, *traG*, and *trbBCDEJLFGI*) genes, together with the *acrAB* and *tolC* genes of the efflux system for small hydrophobic molecules, including acridine derivatives and various drugs (Fig. 2) (30). Possible insights into functionality of some of these were provided by variants pPUV-14 and pPUV-15, carrying the ~47-kb region. pPUV-14's inability to transmit, likely due to the core *traC/virB4/ISPa97*-like

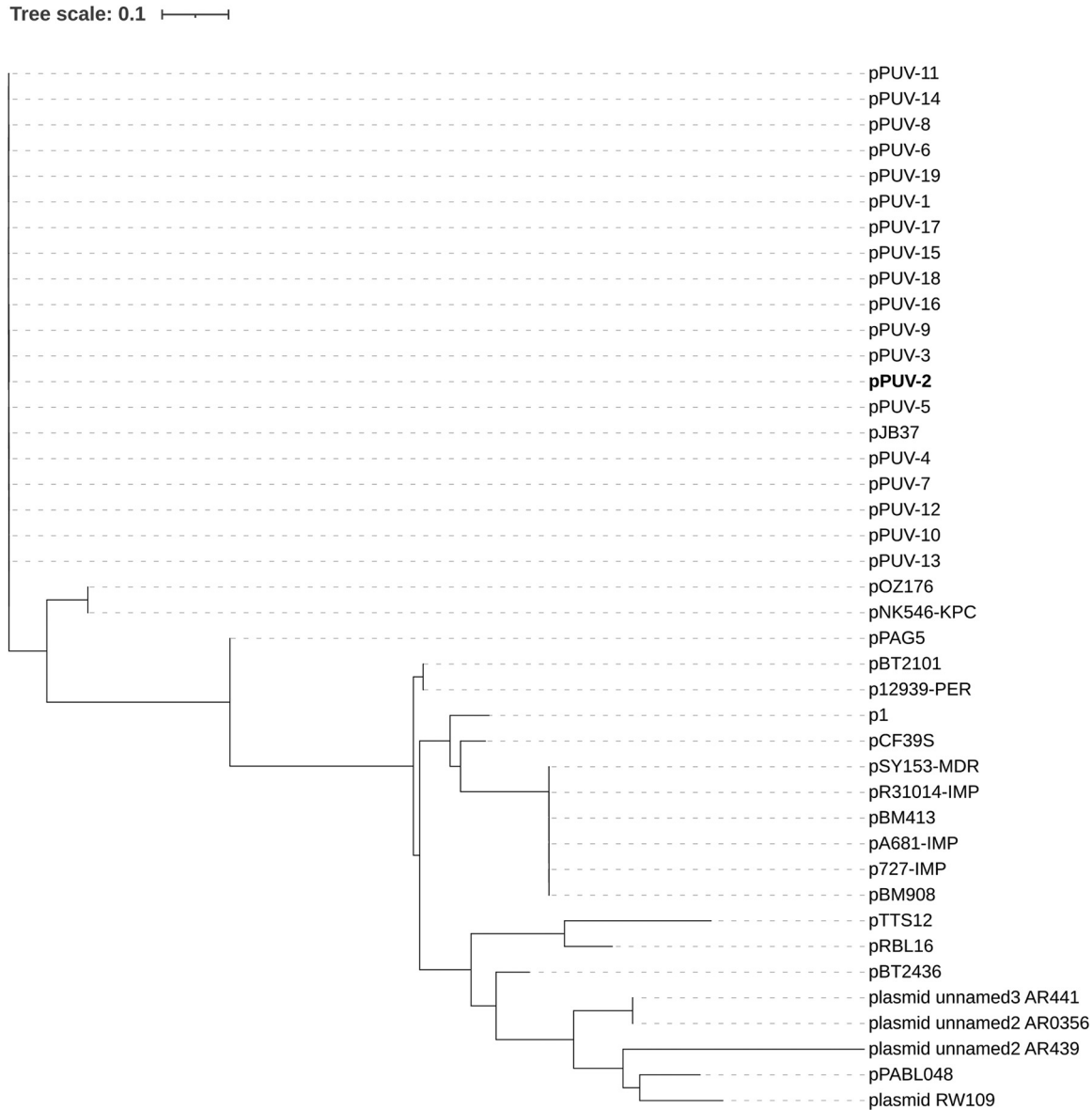


FIG 1 Phylogenetic tree of the common part of IncP-2 pBT2436-like plasmids, including the pPUV series, using the pPUV-2 variant as a reference, generated with iTOL (43). Detailed information on 19 pPUVs is in Table 2, and that on the 22 pBT2436-like plasmids identified in GenBank is in Table S2.

disruption (discussed above), suggested nonfunctionality of the extra conjugation locus, contrary to previous reports (15, 26, 29). Otherwise, pPUV-15 had the core *repA* interrupted by *IS_{Ppu18}*, implying that its role might have been taken by the additional *repA*. A GenBank search revealed 41 entries with the full ~47-kb fragment (>99% identity), being pseudomonad or enterobacterial whole-genomic, chromosomal, or plasmidic sequences. Recently, Jiang et al. interpreted the corresponding related regions of various sizes in pJB37, pTTS12, and pOZ176 to be likely ICEs (27). The remaining accessory regions in pPUVs were specific for this cluster (Table S5). Of these, an ~31-kb insert present in the “oldest” plasmid, pPUV-1 (2003) only, had the operon *tbtABM*, conferring resistance to tributyltin, a toxic component of marine antifouling paints (31). The acquisition of the accessory regions by individual pPUVs, including some with clear biological functions, has been one of the major aspects of their microevolution.

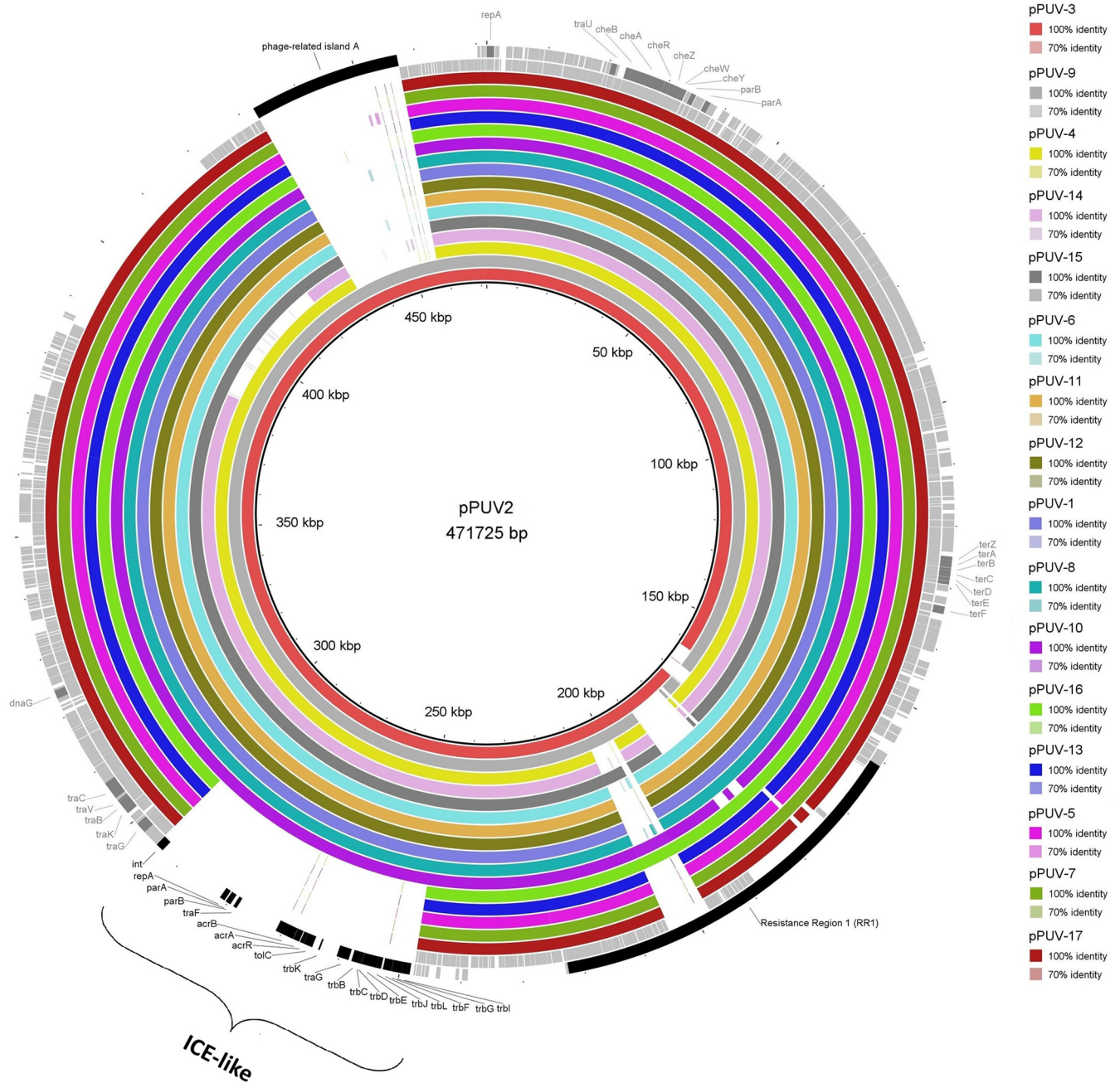


FIG 2 Comparison of the IncP-2 pPUV plasmids, using the pPUV-2 variant as a reference (thin, inner black circle). Only the variants pPUV-1 to -17 sequenced by the long-read PacBio technology (Pacific Biosciences) are shown. The plasmids compared are represented by various colors. Outer thick rings depict common parts of all molecules within the group, plus the annotation of the selected regions/genes. The first outer ring of dark gray and light gray fragments shows the pBT2436-like core genome discerned by Cazares et al. (16), and the second ring with light gray fragments shows only the core genome of pPUVs identified in this work. Black fragments in the first outer ring represent variable regions, identified both by Cazares et al. (16) and in this study. The percent sequence identity is reflected by color intensity. The figure was created using BRIG software (44).

AMR elements and loci in pPUVs. In461(*aadB-bla_{VIM-2}-aadA6*) formed the minimal common resistome of the 19 pPUVs; however, their majority carried also the *ant(4′)-IIB* gene and/or integron In1893 (*bla_{OXA-2}-aadA6*), and four variants had *tet(C)*. Both In461 and In1893 were of the In4 type (32), and their distal *aadA6* cassettes were fused with 3′CS (33). The 5′CS segments of In461 and In1893 were truncated by IS26 and an ISCR16-like element, respectively. All AMR determinants resided in the same location, defined by Cazares et al. as resistance region 1 (RR1) between pBT2436 loci 00202 and 00267, the family’s major segment with AMR genes and mobile elements (16). Its

Downloaded from <http://aac.asm.org/> on March 18, 2021 at Narodowy Instytut Lekow

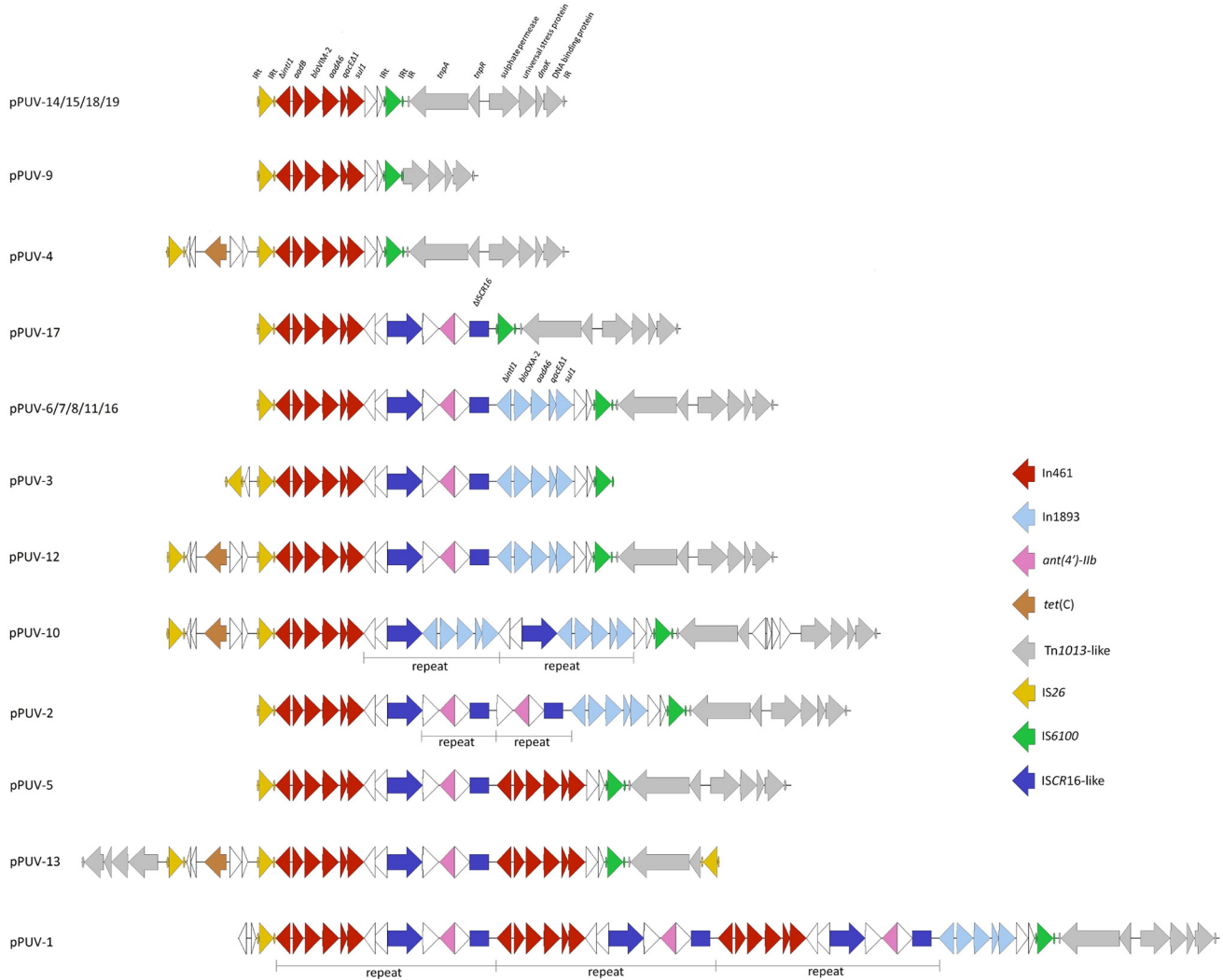


FIG 3 Graphical representation of AMR genes in the resistance region 1 (RR1) in the pPUV plasmids, generated with Easyfig v. 2.2.5 (45). Arrows indicate all genes/coding DNA sequence (CDSs) and mobile elements identified, proportionally to their sizes and orientation, and the key genes/elements are marked with colors and/or names. White arrows represent genes or gene fragments not related to AMR. Multiplications of elements are indicated as repeats in representative structures. Plasmid variants pPUV-1 to -17 and pPUV-18 and -19 were sequenced by the PacBio long-read and MiSeq short-read technologies, respectively.

structure much varied in size, content, and composition. pPUVs again formed a cluster, with all but one [*tet(C)*] AMR gene surrounded by *IS26* on one side and *IS6100* plus a *Tn1013*-like transposon on the other (Fig. 3; part of the *Tn1013*-like element is present also in pJB37 [15]). In six pPUV variants *In461* was alone in this site. In all others it was followed by the *ISCR16*-like element, and this module then made various configurations with *ant(4')-IIB* plus truncated *ISCR16*-like sequence and *In1893* (sometimes also with the *ISCR16*-like element). The most frequent arrangement, *In461*–*ISCR16*-like–*ant(4')-IIB*– Δ *ISCR16*-like–*In1893*, was in seven plasmids. In several variants the individual elements, including *In461*, were multiplied 2 or 3 times in different combinations, with copies retaining or not the *ISCR16*-like elements. The *tet(C)* gene was always upstream of *IS26*, flanked further by another, directly oriented *IS26*. The analysis has confirmed RR1 as a major locus for AMR genes and its high structural dynamics (16). The results coevidenced pPUVs as a specific sublineage of the family, evolving also by acquisition and multiple rearrangements of AMR genes. The origin and mechanism of the *In461* recruitment remain unclear; however, the role of *ISCR16*-like elements in shaping the

Downloaded from <http://aac.asm.org/> on March 18, 2021 at Narodowy Instytut Lekow

region seems to be probable. Cazares et al. observed duplications of AMR genes and ISCR-like elements in RR1 of other pBT2436-like plasmids as well (16).

Eight isolates representing each variant of the pPUV RR1 structure with respect to In461, In1893, and the *ant(4')-IIb* gene plus their transconjugants were tested for the gene dosage/content effect on AMR (Table S1). The organisms with the In461 multiplied (in pPUV-1 and pPUV-13) had higher MICs of β -lactams, including carbapenems, whereas the presence of *ant4'-IIb* correlated with high-level resistance to amikacin and tobramycin.

Screening for pPUVs in the study isolates. A two-step approach was used to detect pPUVs in 47/63 In461 isolates selected for detailed analysis. The first step was short-read WGS of 10 isolates and mapping reads to pPUV-2 as a reference, followed by screening contigs for IncP-2-specific core genes *repA*, *parA*, and *virB4/traC* and chromosomal sequences. Seven isolates were pPUV positive, including two for which the MiSeq data assembly yielded single circular contigs, as mentioned above (pPUV-18 and -19) (Table 2). In461-carrying contigs of three remaining isolates encompassed also chromosome fragments and did not contain the IncP-2-specific genes, and their reads mapped similar to those of a *Pseudomonas* sp. isolate with chromosomally located In461 (Fig. S4); all these results indicated a chromosomal In461 location. The subsequent PCR mapping of the *repA*, *parA*, and *virB4/traC* genes (16) increased the total numbers of pPUV-positive and -negative isolates to 38 and 9, respectively, among the 47 isolates that were not analyzed by long-read WGS (Table 2). The analysis has definitely confirmed pPUVs as predominant platforms of In461 and vehicles of its spread in *P. aeruginosa*.

Conclusions. MPPA dissemination has been one of major AMR-related threats in Poland in last decades, prompting us to study its key factors with reference to the starting period, 1998 to 2004 (9, 10). In 2003 to 2004, several isolates with the specific integron In461 on conjugative plasmids were identified in Warsaw county, and these were found to spread efficiently and interregionally in following years, accounting for a remarkable fraction of all-country MPPA (11). The plasmids represented the IncP-2 type, discerned in the early 1970s and soon identified broadly in pseudomonads from various environments (34, 35). However, it was only recently that their whole sequences started to be analyzed (15–27), including the first comparative study on 15 molecules, verifying and revealing basic aspects of their biology and evolution (16). Despite several works highlighting the IncP-2 plasmids as AMR/MDR platforms (15, 16, 18, 21, 22, 25–27), to our knowledge, this study is the first to practically demonstrate that on a defined time and geographic scale and the first larger analysis of an AMR plasmid epidemic in *P. aeruginosa*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates, preliminary typing, and susceptibility testing. According to the NRCST MPPA surveillance procedure, from 2005 to 2015, each *Pseudomonas* species isolate sent by a diagnostic microbiology laboratory as a suspected MBL producer was examined by the EDTA double-disk synergy test (36), followed by PCRs for *bla*_{IMP/VIM}-like genes (9). PFGE typing was performed according to the method of Seifert et al. (37), with visual interpretation of results (38). Class 1 *bla*_{VIM/IMP} integron variants were analyzed by PCR fingerprinting and sequencing as described previously (9). Briefly, variable regions of the integrons were amplified in two parts, from the region 5'CS to a *bla*_{VIM/IMP}-like gene, and from the gene to the region 3'CS. Amplicons were cut with the MboI enzyme for fingerprinting and/or sequenced by the Sanger approach. MICs of 14 antipseudomonal antimicrobials (Table S1) were evaluated by broth microdilution, according to EUCAST recommendations (<https://eucast.org>).

MLST. MLST was performed according to the method of Curran et al. (39); the database available at <http://pubmlst.org> was used for assigning STs.

Mating and plasmid profiling. Conjugation tests were performed by filter-mating (40), with *P. aeruginosa* PAO1161 resistant to rifampin (41) as a recipient; transconjugants were selected with imipenem (4 μ g/ml) and rifampin (50 μ g/ml). Transfer frequencies were calculated in reference to numbers of donor cells. Plasmid profiling and identification of In461-carrying plasmids were done by S1 nuclease (New England Biolabs, Beverly, MA) analysis, followed by hybridization with a *bla*_{VIM-2} probe (9), using the ECL random-prime labeling and detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, United Kingdom).

Long-read whole-genome sequencing and bioinformatic analysis of IncP-2 plasmids. Long-read WGS was carried out on the PacBio Sequel platform (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA). Plasmid contigs were assembled with HGAP4 (Pacific Biosciences), followed by manual annotation based on BLASTp searches against the RefSeq and Conserved Domain NCBI databases. Plasmid sequences were compared

with those deposited in GenBank by BLASTn. SNP-based phylogenetic analysis of plasmids was done with Harvest Tools v.1.2 (42), using a pPUV-2 variant as a reference, and trees were plotted utilizing iTOL (43). BRIG 0.95 was applied for circular alignments (44). Plasmid resistomes were determined with ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>), using the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/AMRFinder/>). Resistance regions were visualized by Easyfig v. 2.2.5 (45). Mobile elements were identified with ISFinder (ISs) (46) and BLASTn searches of sequences deposited in GenBank. Putative phage-related regions were indicated by PHASTER (47).

Short-read WGS and IncP-2 plasmid sequence and PCR mapping. Short-read WGS was performed using MiSeq (Illumina, San Diego, CA). Reads were trimmed by Cutadapt 1.16 (<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>) and assembled by SPAdes 3.13.2 (48). The trimmed reads were mapped to the reference pPUV-2 plasmid sequence as described by Cazares et al. (16), utilizing BWA-MEM v.0.7.17-r1188 plus SAMtools v.1.10 (49, 50). Illumina reads of pPUV-1-carrying isolate 804/03 and an IncP-2 plasmid-negative *Pseudomonas* sp. isolate with a chromosomally located In461 (P. Urbanowicz, M. Gniadkowski, and R. Izdebski, unpublished results) were used for comparison. Additionally, contigs of the isolates were screened by BLASTn for the IncP-2 plasmid-specific genes *repA*, *parA*, and *virB4/traC* and chromosomal sequences. A multiplex PCR mapping assay, targeting the IncP-2 plasmid genes listed just above, was carried out as proposed previously (16).

Accession number(s). Plasmid nucleotide sequences pPUV-1 to pPUV-19 were assigned GenBank accession numbers [MT732179](#) to [MT732197](#), respectively. The Illumina assembly files and raw sequencing reads were submitted under the GenBank BioProject [PRJNA645026](#) (accession numbers [JACCIK000000000](#) to [JACCIT000000000](#)).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.8 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank W. Duljasz, M. Herda, and K. Chudějová for their excellent support and all clinical microbiologists who contributed to the study collection of MPPA isolates.

This study was financed by the grant UMO-2016/21/B/NZ7/02075 from the Polish National Science Centre, SPUB MIKROBANK 2 from the Polish Ministry of Science and Higher Education, and grants 17-29239A and NU20J-05-00033 from the Czech Health Research Council. P.U. received a Research and Training Grant from the Federation of European Microbiological Societies, FEMS-GO-2018-126.

REFERENCES

- D'Agata E. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* and other *Pseudomonas* species, p 2518–2531. In Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (ed), Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, vol 2. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA.
- Vincent JL. 2003. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet* 361:2068–2077. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13644-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13644-6).
- Botelho J, Grosso F, Peixe L. 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*—mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat* 44:100640. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.07.002>.
- Oliver A, Mulet X, Lopez-Causape C, Juan C. 2015. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 21:22:41–59. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>.
- Nordmann P, Poirel L. 2014. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 20:821–830. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. 2005. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 18:306–325. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>.
- Patzer J, Toleman MA, Deshpande LM, Kamińska W, Dzierzanowska D, Bennett PM, Jones RN, Walsh TR. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *bla*_{VIM-4} gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998–2001). *J Antimicrob Chemother* 53:451–456. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh095>.
- Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. 2003. Evolution of an integron carrying *bla*_{VIM-2} in Eastern Europe: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Antimicrob Chemother* 52:116–119. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg299>.
- Fiett J, Baraniak A, Mrowka A, Fleischer M, Drulis-Kawa Z, Naumiuk L, Samet A, Hryniewicz W, Gniadkowski M. 2006. Molecular epidemiology of acquired-metallo- β -lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 50:880–886. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.3.880-886.2006>.
- Patzer JA, Walsh TR, Weeks J, Dzierzanowska D, Toleman MA. 2009. Emergence and persistence of integron structures harbouring VIM genes in the Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, 1998–2006. *J Antimicrob Chemother* 63:269–273. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn512>.
- Urbanowicz P, Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D, Machulska M, Bojarska K, Literacka E, Herda M, Hryniewicz W, Gniadkowski M. 2018. Molecular characteristics of VIM-type MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Poland from over a 10-year period (2005–2015), abstr O0132. 28th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Madrid, Spain.
- Urbanowicz P, Bitar I, Izdebski R, Baraniak A, Literacka E, Hrabák J, Gniadkowski M. 2019. Poster P1613, 28th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Amsterdam, The Netherlands.
- Cabrolier N, Sauguet M, Bertrand X, Hocquet D. 2015. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *J Clin Microbiol* 53:1395–1398. <https://doi.org/10.1128/JCM.00210-15>.
- Empel J, Filczak K, Mrowka A, Hryniewicz W, Livermore DM, Gniadkowski M. 2007. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum β -lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol* 45:2829–2834. <https://doi.org/10.1128/JCM.00997-07>.
- Botelho J, Grosso F, Quinteira S, Mabrouk A, Peixe L. 2017. The complete nucleotide sequence of an IncP-2 megaplasmid unveils a mosaic architecture comprising a putative novel *bla*_{VIM-2}-harbouring transposon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 72:2225–2229. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx143>.
- Cazares A, Moore MP, Hall J, Wright LL, Grimes M, Emond-Rheault JG, Pongchaikul P, Santanirand P, Levesque RC, Fothergill JL, Winstanley C.

2020. A megaplasmid family driving dissemination of multidrug resistance in *Pseudomonas*. *Nat Commun* 11:1370. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15081-7>.
17. Kuepper J, Ruijsenaars HJ, Blank LM, de Winde JH, Wierckx N. 2015. Complete genome sequence of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 including megaplasmid pTTS12. *J Biotechnol* 200:17–18. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.027>.
 18. Liu J, Yang L, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, Shirliff ME. 2018. Complete sequence of pBM413, a novel multidrug resistance megaplasmid carrying *qnrVC6* and *bla*_{IMP-45} from *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 51:145–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.008>.
 19. Schmid M, Frei D, Patrignani A, Schlapbach R, Frey JE, Remus-Emsermann MNP, Ahrens CH. 2018. Pushing the limits of de novo genome assembly for complex prokaryotic genomes harboring very long, near identical repeats. *Nucleic Acids Res* 46:8953–8965. <https://doi.org/10.1093/nar/gky726>.
 20. Weiser R, Green AE, Bull MJ, Cunningham-Oakes E, Jolley KA, Maiden MCJ, Hall AJ, Winstanley C, Weightman AJ, Donoghue D, Amezcua A, Connor TR, Mahenthalingam E. 2019. Not all *Pseudomonas aeruginosa* are equal: strains from industrial sources possess uniquely large multireplicon genomes. *Microb Genom* 5:e000276. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000276>.
 21. Xiong J, Alexander DC, Ma JH, Deraspe M, Low DE, Jamieson FB, Roy PH. 2013. Complete sequence of pOZ176, a 500-kilobase IncP-2 plasmid encoding IMP-9-mediated carbapenem resistance, from outbreak isolate *Pseudomonas aeruginosa* 96. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3775–3782. <https://doi.org/10.1128/AAC.00423-13>.
 22. Yuan M, Chen H, Zhu X, Feng J, Zhan Z, Zhang D, Chen X, Zhao X, Lu J, Xu J, Zhou D, Li J. 2017. pSY153-MDR, a p12969-DIM-related mega plasmid carrying *bla*_{IMP-45} and *armA*, from clinical *Pseudomonas putida*. *Oncotarget* 8:68439–68447. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19496>.
 23. Zhang Y, Meng L, Guan C, Zhou Y, Peng J, Liang H. 2020. Genomic characterisation of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolate PAG5 with a multidrug-resistant megaplasmid from China. *J Glob Antimicrob Resist* 21:130–131. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.03.012>.
 24. Zheng D, Wang X, Wang P, Peng W, Ji N, Liang H. 2016. Genome sequence of *Pseudomonas citronellolis* SJTE-3, an estrogen- and polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium. *Genome Announc* 4:e01373-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01373-16>.
 25. Pincus NB, Bachtta KER, Ozer EA, Allen JP, Pura ON, Qi C, Rhodes NJ, Marty FM, Pandit A, Mekalanos JJ, Oliver A, Hauser AR. 2020. Long-term persistence of an extensively drug resistant subclone of globally distributed *Pseudomonas aeruginosa* clonal complex 446 in an academic medical center. *Clin Infect Dis* 71:1524–1531. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz973>.
 26. Li Z, Cai Z, Cai Z, Zhang Y, Fu T, Jin Y, Cheng Z, Jin S, Wu W, Yang L, Bai F. 2020. Molecular genetic analysis of an XDR *Pseudomonas aeruginosa* ST664 clone carrying multiple conjugal plasmids. *J Antimicrob Chemother* 75:1443–1452. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa063>.
 27. Jiang X, Yin Z, Yuan M, Cheng Q, Hu L, Xu Y, Yang W, Yang H, Zhao Y, Zhao X, Gao B, Dai E, Song Y, Zhou D. 2020. Plasmids of novel incompatibility group Inc_{pRBL16} from *Pseudomonas* species. *J Antimicrob Chemother* 75:2093–2100. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa143>.
 28. Kusumawardhani H, van Dijk D, Hosseini R, de Winde JH. 2020. Novel toxin-antitoxin module SlvT-SlvA regulates megaplasmid stability and incites solvent tolerance in *Pseudomonas putida* S12. *Appl Environ Microbiol* 86:e00686-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00686-20>.
 29. Kusumawardhani H, Hosseini R, de Winde JH. 2020. Comparative analysis reveals the modular functional build-up of megaplasmid pTTS12 of *Pseudomonas putida* S12: a paradigm for transferable traits, plasmid stability and inheritance? <https://doi.org/10.1101/2020.06.19.162511>.
 30. Li XZ, Plesiat P, Nikaido H. 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 28:337–418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>.
 31. Jude F, Arpin C, Brachet-Castang C, Capdepu M, Caumette P, Quentin C. 2004. TbtABM, a multidrug efflux pump associated with tributyltin resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *FEMS Microbiol Lett* 232:7–14. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00012-6).
 32. Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW, Hall RM. 2001. Family of class 1 integrons related to In4 from Tn1696. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3014–3020. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.11.3014-3020.2001>.
 33. Partridge SR, Collis CM, Hall RM. 2002. Class 1 integron containing a new gene cassette, *aadA10*, associated with Tn1404 from R151. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2400–2408. <https://doi.org/10.1128/aac.46.8.2400-2408.2002>.
 34. Bryan LE, Semaka SD, Van den Elzen HM, Kinnear JE, Whitehouse RL. 1973. Characteristics of R931 and other *Pseudomonas aeruginosa* R factors. *Antimicrob Agents Chemother* 3:625–637. <https://doi.org/10.1128/aac.3.5.625>.
 35. Sagai H, Hasuda K, Lyobe S, Bryan LE, Holloway BW, Mitsuhashi S. 1976. Classification of R plasmids by incompatibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 10:573–578. <https://doi.org/10.1128/aac.10.4.573>.
 36. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. 2003. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 41:4623–4629. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.10.4623-4629.2003>.
 37. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, Heersma H, Dijkshoorn L. 2005. Standardization and inter-laboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 43:4328–4335. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4328-4335.2005>.
 38. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233–2239. <https://doi.org/10.1128/JCM.33.9.2233-2239.1995>.
 39. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 42:5644–5649. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>.
 40. Stuart-Keil KG, Hohnstock AM, Drees KP, Herrick JB, Madsen EL. 1998. Plasmids responsible for horizontal transfer of naphthalene catabolism genes between bacteria at a coal tar-contaminated site are homologous to pDTG1 from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4. *Appl Environ Microbiol* 64:3633–3640. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.3633-3640.1998>.
 41. Bartosik AA, Lasocki K, Mierzejewska J, Thomas CM, Jagura-Burdzy G. 2004. ParB of *Pseudomonas aeruginosa*: interactions with its partner ParA and its target parS and specific effects on bacterial growth. *J Bacteriol* 186:6983–6998. <https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6983-6998.2004>.
 42. Treangen TJ, Ondov BD, Koren S, Phillippy AM. 2014. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol* 15:524. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0524-x>.
 43. Letunic I, Bork P. 2019. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 47:W256–W259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.
 44. Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. 2011. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 12:402. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-402>.
 45. Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. 2011. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* 27:1009–1010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr039>.
 46. Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* 34:D32–D36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>.
 47. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS. 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 44:W16–W21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>.
 48. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
 49. Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
 50. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.

TABLE S1. Antimicrobial susceptibility patterns of the eight representative MPPA isolates carrying different pPUV plasmids and their transconjugants^a

Isolate ^b	Resistance determinants ^c								MICs µg/mL ^{d,e}								
	In461	In1893	<i>ant4'-IIb</i>	PIP	TZP	CAZ	FEP	C/T	ATM	IPM	MEM	GEN	AMK	TOB	CIP	LVX	CST
NMI804/03 (pPUV-1)	3	1	3	>512	>512	>128	128	>8	64	>128	>128	>64	>256	>128	>8	>8	≤1
NMI259/06(pPUV-2)	1	1	2	>512	128	64	32	>8	32	32	32	>64	>256	>128	>8	>8	≤1
NMI1185/06 (pPUV-4)	1	0	0	>512	256	32	16	>8	8	16	16	>64	2	32	0.25	0.5	≤1
NMI3438/07 (pPUV-6)	1	1	1	>512	512	64	32	>8	8	64	16	>64	>256	>128	>8	>8	≤1
NMI3005/09 (pPUV-10)	1	2	0	>512	256	64	32	>8	32	>128	128	>64	4	64	4	>8	≤1
NMI8635/11 (pPUV-12)	1	1	1	>512	512	32	32	>8	8	16	8	>64	>256	>128	0.5	1	≤1
NMI8769/11 (pPUV-13)	2	0	1	>512	512	64	64	>8	16	>128	128	>64	>256	>128	>8	>8	≤1
NMI1389/13 (pPUV-15)	1	0	0	128	128	32	16	>8	8	16	8	>64	2	64	0.25	0.5	≤1
R ⁺ [NMI804/03] (pPUV-1)	3	1	3	>512	512	64	32	>8	8	64	64	>64	>256	>128	0.25	0.5	≤1
R ⁺ [NMI259/06] (pPUV-2)	1	1	2	>512	128	32	16	>8	4	32	32	>64	>256	>128	0.25	0.5	≤1
R ⁺ [NMI1185/06] (pPUV-4)	1	0	0	256	128	16	16	>8	4	32	32	>64	2	32	0.25	0.5	≤1
R ⁺ [NMI3438/07] (pPUV-6)	1	1	1	>512	256	32	16	>8	4	32	32	>64	256	>128	0.25	0.5	≤1
R ⁺ [NMI3005/09] (pPUV-10)	1	2	0	256	64	32	16	>8	4	32	16	>64	2	32	0.125	0.5	≤1
R ⁺ [NMI8635/11] (pPUV-12)	1	1	1	>512	>512	32	16	>8	4	32	16	>64	256	>128	0.25	0.5	≤1
R ⁺ [NMI8769/11] (pPUV-13)	2	0	1	>512	>512	64	16	>8	8	64	64	>64	256	>128	0.25	0.5	≤1
R ⁺ [NMI1389/13] (pPUV-15)	1	0	0	128	128	16	16	>8	8	32	16	>64	2	32	0.25	0.5	≤1
<i>P. aeruginosa</i> PAO1161 <i>Rif</i> ^R	0	0	0	8	16	2	2	≤1	4	1	1	1	4	0.5	0.25	0.5	≤1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	0	0	0	8	8	1	2	≤1	4	2	0.25	1	2	0.25	0.5	1	≤1

^a – Isolates represented each variant of the pPUV RR1 structure with respect to the presence and copy number of In461, In1893 and the *ant(4')-IIb* gene.

^b – Isolates are represented by their collection numbers; transconjugants' names include "R⁺" and numbers of the corresponding isolates in brackets; names of isolates and transconjugants are followed by symbols of their plasmids.

^c – Numbers in columns represent copy numbers of the individual AMR elements or genes present in the corresponding pPUV plasmids.

^d – Abbreviations: AMK, amikacin; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; CST, colistin; C/T, ceftolozane/tazobactam; FEP, cefepime; GEN, gentamicin; IPM, imipenem; LVX, levofloxacin; MEM, meropenem; PIP, piperacillin; TOB, tobramycin; TZP, piperacillin-tazobactam.

^e – Bold format of MICs indicates resistance.

TABLE S2. Clonal identity of the MPPA isolates with the In461 integron

ST ^a	Clonal status ^b	n isolates ^c	n pulsotypes	n hospitals	n regions
ST111	CG111	13 (76)	8	11	6
ST244	CC244	12 (13)	4	7	2
ST27	CG27	5	4	5	4
ST17	CG17	4 (11)	2	4	2
ST253	CG253	4	3	3	2
ST1020	slv ST1761	4	1	4	2
ST108	CC108	2	2	2	2
ST164	CG164	2	1	1	1
ST235	CC235	2 (142)	2	2	2
ST381	CC381	2 (3)	1	2	2
ST390	CC390	2	2	2	1
ST500	singleton	2	1	2	2
ST694	slv ST1197	2	1	2	2
ST697	singleton	2 (5)	2	2	2
ST1197	slv ST694	2	1	2	2
ST41	slv ST153	1	1	1	1
ST155	CC155	1 (2)	1	1	1
ST198	CG198	1	1	1	1
ST207	CC207	1	1	1	1
ST245	CG245	1	1	1	1
ST313	CC313	1 (2)	1	1	1
ST360	CC360	1	1	1	1
ST395	CC395	1 (9)	1	1	1
ST446	CG446	1	1	1	1
ST589	CG649	1	1	1	1
ST611	slv ST767	1	1	1	1
ST792	slv ST1340	1	1	1	1
ST794	slv ST3389	1	1	1	1
ST815	singleton	1	1	1	1
ST931	slv ST881	1	1	1	1
ST1028	slv ST1047	1	1	1	1
ST2238	slv ST1641	1	1	1	1
ST3212	slv ST1250	1	1	1	1
ST3213	singleton	1	1	1	1
ST3214	singleton	1	1	1	1

^a – Bold format symbolizes new *P. aeruginosa* STs identified in this study.

^b – CC, clonal complex; CG, clonal group; slv, single-locus variant.

^c – Several STs grouped isolates with various MBL-encoding integrons in the baseline collection (n=454) (2); for these, numbers of isolates with In461 are followed by total numbers of isolates shown in brackets; numbers of pulsotypes, hospitals and regions refer only to the In461 isolates.

TABLE S3. IncP-2 pBT2436-like plasmids used for comparative analyses with the pPUV series

Plasmid name	Size (bp)	Species	Strain	Country ^a	Source ^a	GenBank acc. No.	Reference(s)
pBT2436	422,811	<i>P. aeruginosa</i>	2436	Thailand	respiratory infection	CP039989	(4)
pBT2101	439,744	<i>P. aeruginosa</i>	2101	Thailand	respiratory infection	CP039991	(4)
unnamed2	438,531	<i>P. aeruginosa</i>	AR_0356	NA	NA	CP027170	
unnamed2	437,392	<i>P. aeruginosa</i>	AR439	NA	NA	CP029096	
unnamed3	438,529	<i>P. aeruginosa</i>	AR441	NA	NA	CP029094	
pJB37	464,804	<i>P. aeruginosa</i>	FFUP_PS_37	Portugal	respiratory infection	KY494864	(5)
pBM413	423,017	<i>P. aeruginosa</i>	PA121617	China	respiratory infection	CP016215	(7)
pOZ176	500,839	<i>P. aeruginosa</i>	PA96	China	respiratory infection	KC543497	(8)
p12939-PER	496,436	<i>P. aeruginosa</i>	NA	China	NA	MF344569	(9)
p727-IMP	430,173	<i>P. aeruginosa</i>	NA	China	NA	MF344568	(9)
pA681-IMP	397,519	<i>P. aeruginosa</i>	NA	China	NA	MF344570	(9)
pR31014-IMP	374,000	<i>P. aeruginosa</i>	NA	China	NA	MF344571	(9)
pRBL16	370,338	<i>P. citronellosis</i>	SJTE-3	China	wastewatersludge	CP015879	(10)
p1	467,568	<i>P. koreensis</i>	P19E3	Switzerland	<i>Origanummajorana</i>	CP027478	(11)
pSY153-MDR	468,170	<i>P. putida</i>	SY153	China	urinarytractinfection	KY883660	(12)
pPAG-5	513,322	<i>P. aeruginosa</i>	PAG-5	China	urinarytractinfection	CP045003	(13)
pNK546-KPC	475,027	<i>P. aeruginosa</i>	PAB546	China	burnwoundinfection	MN433457	(14)
RW109 plasmid 1	555,265	<i>P. aeruginosa</i>	RW109	UK	personalcareproduct	LT969519	(15)
pPABL048	414,954	<i>P. aeruginosa</i>	PABL048	USA	bloodstreaminfection	CP039294	(16)
pTTS12	583,900	<i>P. putida</i>	S12	The Netherlands	soil	CP009975	(17-19)
pCF39S	468,631	<i>P. aeruginosa</i>	CF39S	USA	respiratory infection	CP045917	
pBM908	395,774	<i>P. aeruginosa</i>	PA298	China	feces	CP040126	

^a – NA, not assigned.

TABLE S4. Numbers of SNPs between pPUV-2 and the other IncP-2 pBT2436-like plasmids^{a,b,c}

Plasmidname	n SNPs
pPUV-11	8
pPUV-14	7
pPUV-8	8
pPUV-6	8
pPUV-19	7
pPUV-1	7
pPUV-17	9
pPUV-15	10
pPUV-18	7
pPUV-16	3
pPUV-9	0
pPUV-3	0
pPUV-5	3
pJB37	4
pPUV-4	3
pPUV-7	5
pPUV-12	8
pPUV-10	5
pPUV-13	7
pOZ176	933
pNK546-KPC	933
pPAG5	2,209
pBT2101	3,734
p12939-PER	3,734
p1	4,166
pCF39S	4,223
pSY153-MDR	3,560
pR31014-IMP	3,559
pBM413	3,557
pA681-IMP	3,558
p727-IMP	3,559
pBM908	3,558
pTTS12	2,980
pRBL16	2,415
pBT2436	3,704
plasmid unnamed2 AR0356	4,170
plasmid unnamed3 AR441	4,171
plasmid unnamed2 AR439	4,594
pPABL048	4,050
plasmid RW109	2,758

^a – SNPs were identified in a common part of all of the plasmids with pPUV-2 as a reference, distinguished by Parsnp within HarvestTools v.1.2.(20).

^b – Order of the plasmids in the table is like in the phylogenetic tree (Figure 1).

^c – GenBank accession numbers and references to the non-pPUV plasmids are in Table S3.

TABLE S5. Accessory regions of the variable presence in pPUV-like plasmids^{a,b}

pPUVvariant ^c	Tributyltin resistance	ICE-like region	Phage-related region A	Δ Tn5563a region	Phage-related region B	Transposonic region	Mosaic region
pPUV-1	396,462..427,465	259,274..306,250	-	-	-	-	-
pPUV-2	-	247,802..294,777	432,446..457,130	-	-	-	-
pPUV-3	-	234,945-281,920	419,589..444,273	-	-	-	-
pPUV-4	-	234,468..281,442	-	-	-	-	-
pPUV-5	-	-	-	-	228,606..254,467	-	-
pPUV-6	-	289,253..336,229	-	213,334..265,719	-	-	-
pPUV-7	336,470..351,866 ^d	-	-	-	213,500..222,878 ^d	-	-
pPUV-8	-	289,254..336,230	-	213,335..265,720	-	-	-
pPUV-9	-	228,853..275,828	413,497..438,181	-	-	-	-
pPUV-10	-	248,046..317,819 ^e	-	-	-	288,642..311,435	-
pPUV-11	-	236,862..283,838	-	-	-	-	-
pPUV-12	-	241,427..288,403	-	-	-	-	-
pPUV-13	-	-	-	-	-	-	-
pPUV-14	-	226,280..273,256	-	-	-	-	366,976..395,139
pPUV-15	-	233,122..280,087	-	-	-	-	-
pPUV-16	-	-	-	-	-	-	-
pPUV-17	-	-	-	-	-	-	-
pPUV-18	-	227,670..274,646	-	-	-	-	-
pPUV-19	-	228,304..275,279	412,948..437,632	-	-	-	-

^a – Presence of an accessory region in a pPUV variant is indicated by its nucleotide position coordinates, according to the annotation in the corresponding GenBank entry.

^b – Names of the regions are arbitrary and refer to their distinctive marker, hypothetical origin or general apparent structural characteristics; the ICE-like region has been named according to the proposal of Jiang *et al.*(9).

^c – Plasmid variants pPUV-1-17 and pPUV-18-19 were sequenced by the PacBio long-read or MiSeq short-read technologies, respectively.

^d – In pPUV-7 the accessory regions were truncated.

^e – In pPUV-10 the ICE-like region was disrupted by the Transposonic region.

2003-04



2005-15



FIGURE S1. Geographic distribution of the In461 MPPA cases in Poland in 2003-15, illustrating the territorial dissemination of the IncP-2 pBT2436-like pPUV megaplasmids. A) First cases identified in 2003-04, reported previously (1); B) cases from 2005-15 analyzed in this study. Cities are represented by black dots, except for Warsaw marked in grey in order not to mask other locales in its urban area and the Mazowieckie region. Sizes of the dots are not strictly proportional to numbers of cases. Only the three regions mentioned in the text, Mazowieckie, Łódzkie and Śląskie, are named on the map.

Tree scale: 0.01

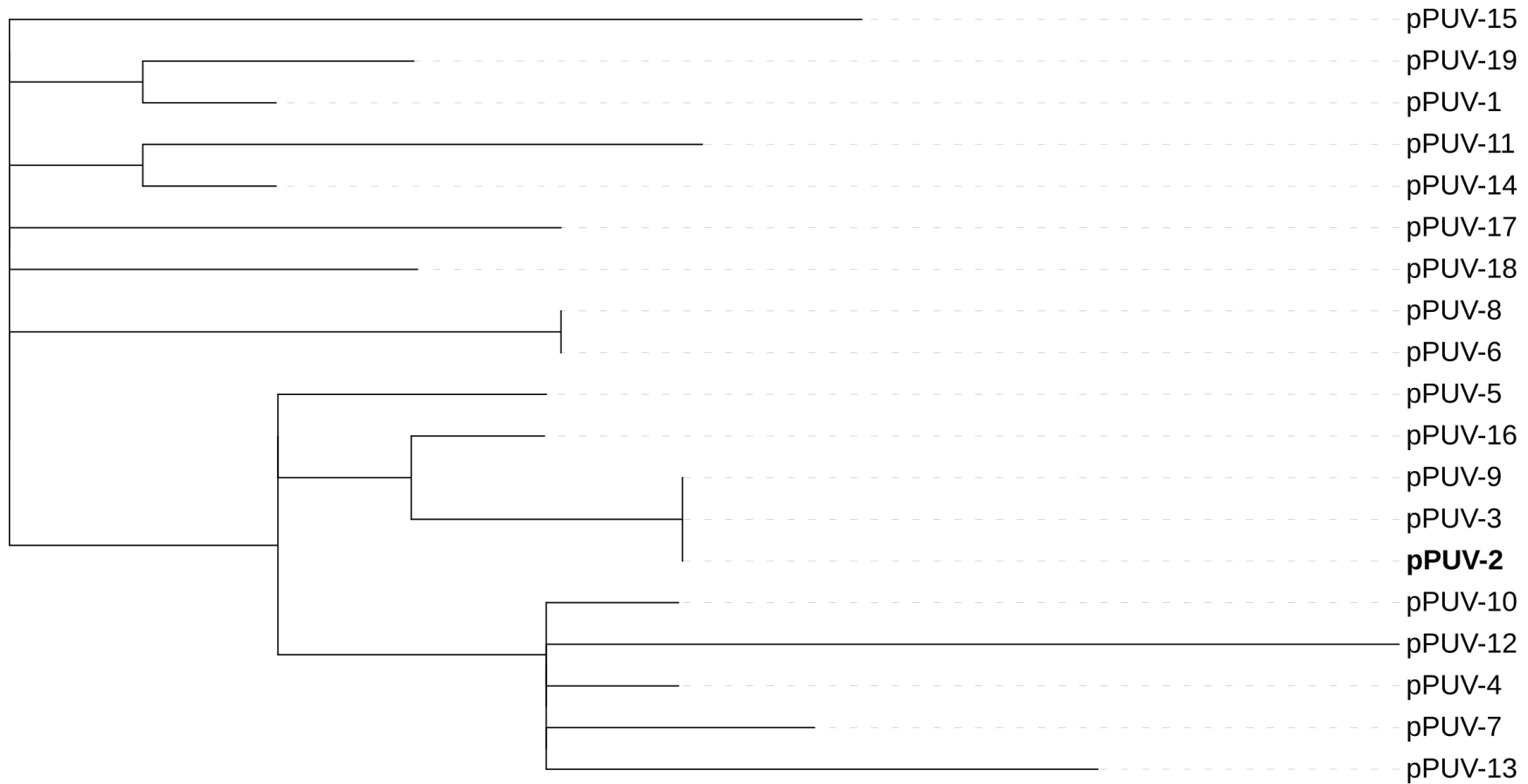


FIGURE S2. Phylogenetic tree of the common part of the pPUV series plasmids, using pPUV-2 as a reference, devoid of the context of other IncP-2 pBT2346-like plasmids (Figure 1). The tree was generated with iTOL(3). Detailed information on the 19 pPUVs is in Table 2.

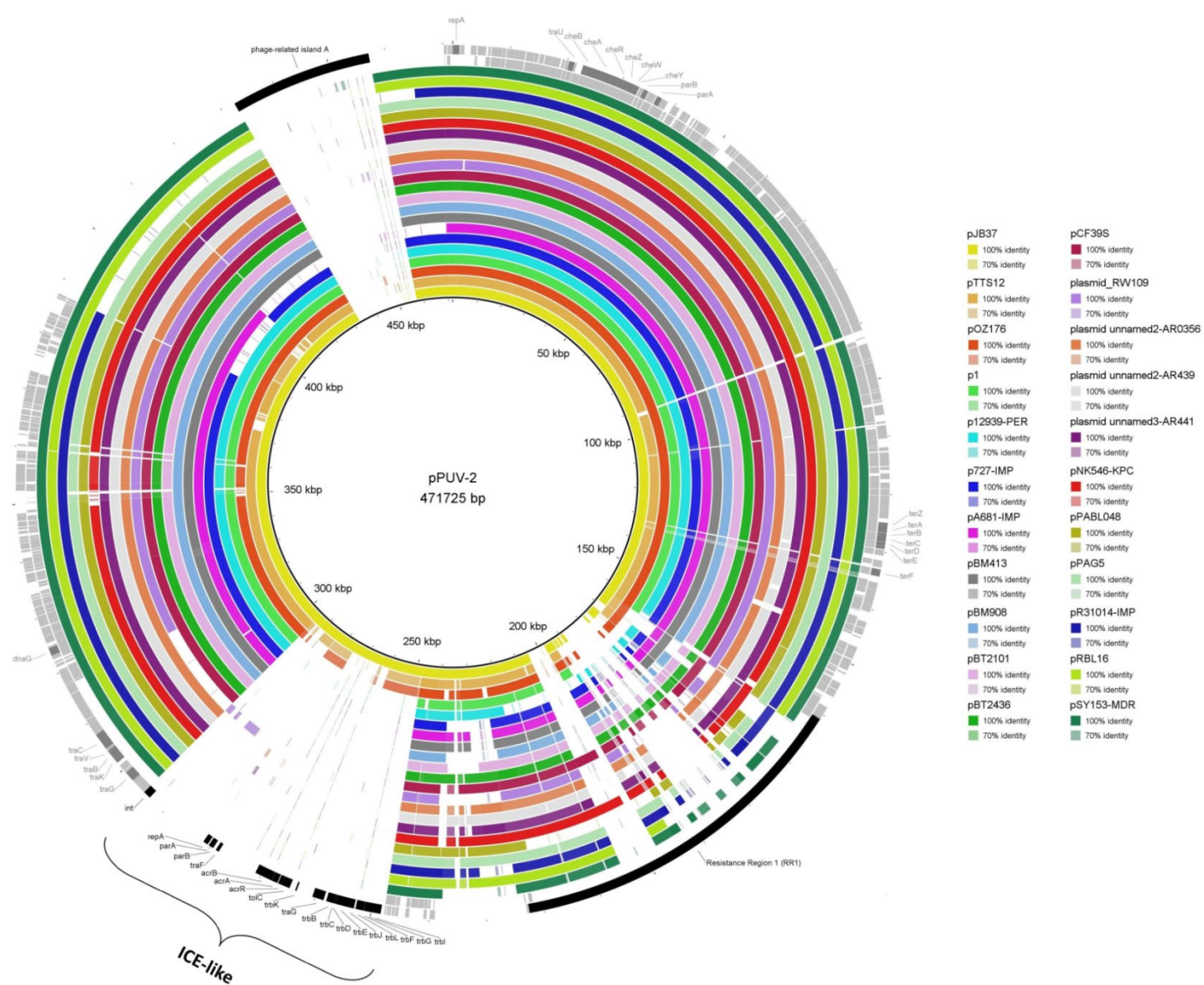


FIGURE S3. Comparison of the IncP-2 pBT2436-like plasmids with the pPUV-2 plasmid used as a reference (thin, inner black circle) identified in GenBank (Table S3). The plasmids are represented by various colours. Outer thick rings depict common parts of all plasmids, plus the annotation of the selected regions/genes. The first outer ring of dark gray and light gray fragments shows the pBT2436-like core genome discerned by Cazares *et al.* (4), and the second ring with light gray fragments only shows the core genome identified in this work in the context of pPUV-2. Black fragments in the first outer ring represent variable regions, identified both by Cazares *et al.* (4), and in this study. The percentage of sequence identity is reflected by color intensity. The picture was created using the BRIG software (6).

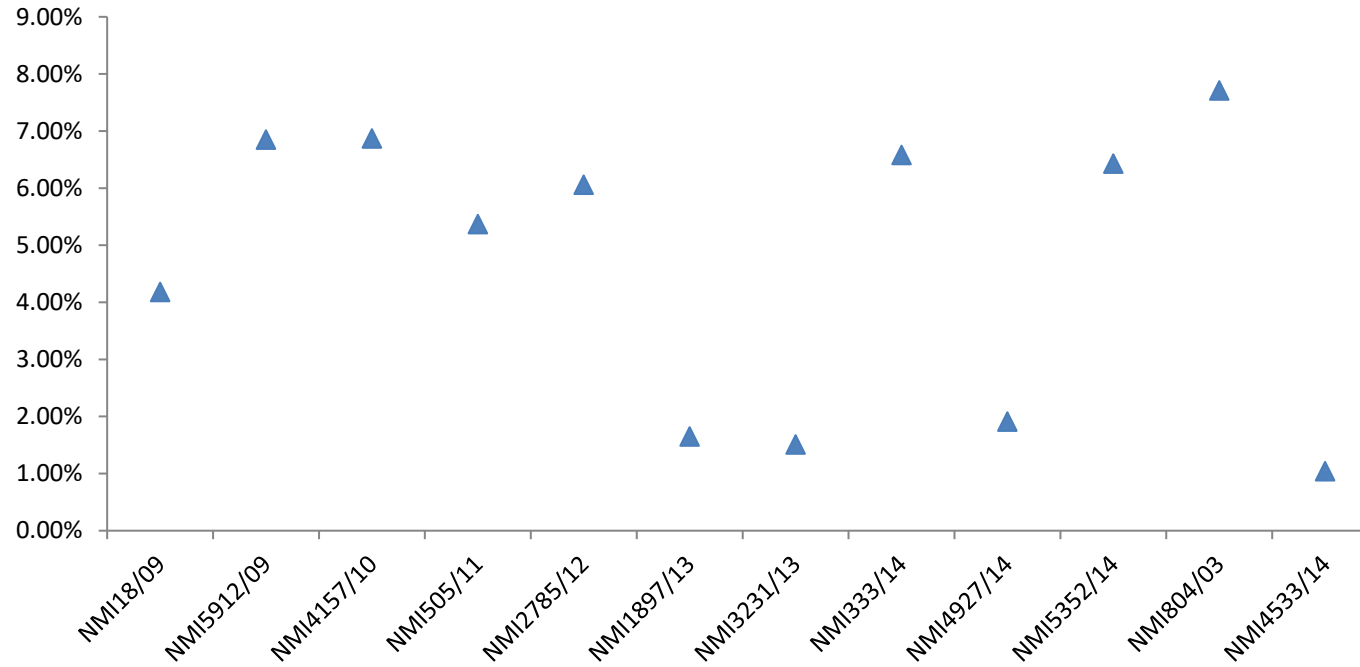


FIGURE S4. Plot of percentages of genomic MiSeq trimmed reads of 10 selected In461 MPPA isolates mapped to the pPUV-2 PacBio sequence (blue triangles). Genome of the pPUV-1-carrying isolate 804/03, sequenced by MiSeq, and genome of a *Pseudomonas* sp. isolate 4533/14 with chromosomal In461 (P. Urbanowicz, M. Gniadkowski, R. Izdebski; unpublished data) were used for a comparison (on the right).

REFERENCES

1. Fielt J, Baraniak A, Mrowka A, Fleischer M, Drulis-Kawa Z, Naumiuk L, Samet A, Hryniewicz W, Gniadkowski M.2006. Molecular epidemiology of acquired-metallo- β -lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 50:880-6.
2. Urbanowicz P, Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D, Machulska M, Bojarska K, Literacka E, Herda M, Hryniewicz W, Gniadkowski M. 2018. Molecular characteristics of VIM-type MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Poland from over a 10-year period (2005-2015) abstr O0132 28th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Madrid, Spain.
3. Letunic I, Bork P.2019. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 47:W256-W259.
4. Cazares A, Moore MP, Hall JPJ, Wright LL, Grimes M, Emond-Rheault JG, Pongchaikul P, Santanirand P, Levesque RC, Fothergill JL, Winstanley C.2020. A megaplasmid family driving dissemination of multidrug resistance in *Pseudomonas*. *Nat Commun* 11:1370.
5. Botelho J, Grosso F, Quinteira S, Mabrouk A, Peixe L.2017. The complete nucleotide sequence of an IncP-2 megaplasmid unveils a mosaic architecture comprising a putative novel *bla*_{VIM-2}-harbouring transposon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 72:2225-2229.
6. Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA.2011. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 12:402.
7. Liu J, Yang L, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, Shirtliff ME.2018. Complete sequence of pBM413, a novel multidrug resistance megaplasmid carrying *qnrVC6* and *bla*_{IMP-45} from *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 51:145-150.
8. Xiong J, Alexander DC, Ma JH, Deraspe M, Low DE, Jamieson FB, Roy PH.2013. Complete sequence of pOZ176, a 500-kilobase IncP-2 plasmid encoding IMP-9-mediated carbapenem resistance, from outbreak isolate *Pseudomonas aeruginosa* 96. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3775-82.
9. Jiang X, Yin Z, Yuan M, Cheng Q, Hu L, Xu Y, Yang W, Yang H, Zhao Y, Zhao X, Gao B, Dai E, Song Y, Zhou D.2020. Plasmids of novel incompatibility group Inc_{pRBL16} from *Pseudomonas* species. *J Antimicrob Chemother* 75:2093-2100.
10. Zheng D, Wang X, Wang P, Peng W, Ji N, Liang R.2016. Genome sequence of *Pseudomonas citronellolis* SJTE-3, an estrogen- and polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium. *Genome Announc* 4:e01373-16.
11. Schmid M, Frei D, Patrignani A, Schlapbach R, Frey JE, Remus-Emsermann MNP, Ahrens CH.2018. Pushing the limits of de novo genome assembly for complex prokaryotic genomes harboring very long, near identical repeats. *Nucleic Acids Res* 46:8953-8965.
12. Yuan M, Chen H, Zhu X, Feng J, Zhan Z, Zhang D, Chen X, Zhao X, Lu J, Xu J, Zhou D, Li J.2017. pSY153-MDR, a p12969-DIM-related mega plasmid carrying *bla*_{IMP-45} and *armA*, from clinical *Pseudomonas putida*. *Oncotarget* 8:68439-68447.
13. Zhang Y, Meng L, Guan C, Zhou Y, Peng J, Liang H.2020. Genomic characterisation of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolate PAG5 with a

- multidrug-resistant megaplasmid from China. *J Glob Antimicrob Resist* 21:130-131.
14. Li Z, Cai Z, Cai Z, Zhang Y, Fu T, Jin Y, Cheng Z, Jin S, Wu W, Yang L, Bai F.2020. Molecular genetic analysis of an XDR *Pseudomonas aeruginosa* ST664 clone carrying multiple conjugal plasmids. *J Antimicrob Chemother* 75:1443-1452.
 15. Weiser R, Green AE, Bull MJ, Cunningham-Oakes E, Jolley KA, Maiden MCJ, Hall AJ, Winstanley C, Weightman AJ, Donoghue D, Amezcua A, Connor TR, Mahenthalingam E.2019. Not all *Pseudomonas aeruginosa* are equal: strains from industrial sources possess uniquely large multireplicon genomes. *Microb Genom* 5:e000276.
 16. Pincus NB, Bachta KER, Ozer EA, Allen JP, Pura ON, Qi C, Rhodes NJ, Marty FM, Pandit A, Mekalanos JJ, Oliver A, Hauser AR.2019. Long-term persistence of an extensively drug resistant subclade of globally distributed *Pseudomonas aeruginosa* clonal complex 446 in an academic medical center. *Clin Infect Dis* 71:1524-1531.
 17. Kuepper J, Ruijsenaars HJ, Blank LM, de Winde JH, Wierckx N.2015. Complete genome sequence of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 including megaplasmid pTTS12. *J Biotechnol* 200:17-8.
 18. Kusumawardhani H, Hosseini R, de Winde JH.2020. Comparative analysis reveals the modular functional build-up of megaplasmid pTTS12 of *Pseudomonas putida* S12: a paradigm for transferable traits, plasmid stability and inheritance? *bioRxiv* doi:10.1101/2020.06.19.162511.
 19. Kusumawardhani H, van Dijk D, Hosseini R, de Winde JH.2020. Novel toxin-antitoxin module SlvT-SlvA regulates megaplasmid stability and incites solvent tolerance in *Pseudomonas putida* S12. *Appl Environ Microbiol* 86:e00686-20.
 20. Treangen TJ, Ondov BD, Koren S, Phillippy AM.2014. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol* 15:524.

7.3 *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands.

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkz262

***Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands**

P. Urbanowicz¹*, R. Izdebski¹, A. Baraniak¹, D. Żabicka², G. Ziótkowski³, W. Hryniewicz² and M. Gniadkowski¹

¹Department of Molecular Microbiology, National Medicines Institute, 00-725 Warsaw, Poland; ²Department of Epidemiology and Clinical Microbiology, The National Reference Centre for Susceptibility Testing, National Medicines Institute, 00-725 Warsaw, Poland; ³Department of Microbiology, Specialist Hospital No. 6, 41-200 Sosnowiec, Poland

*Corresponding author. National Medicines Institute, ul. Chelmska 30/34, 00-725 Warsaw, Poland. Fax: +48 22 841 29 49; E-mail: p.urbanowicz@nil.gov.pl

Sir,
Pseudomonas aeruginosa is an important, notoriously MDR pathogen. It is the main host of VIM- or IMP-type MBLs, and has been repeatedly identified with others, such as NDMs or DIMs;¹⁻⁷ ESBLs and 16S rRNA methylases occur more sparsely but with original types or variants.^{1,3,4,8,9} Foreign genes often reside in chromosomal mosaic regions, *P. aeruginosa* genomic islands (PAGIs), which comprise integrative and conjugative elements (ICEs) with variable cargo regions, carrying IS- or transposon-associated resistance genes.¹⁰ Here we present a nearly pan-resistant *P. aeruginosa* isolate with new ICE/PAGIs.

P. aeruginosa 1334/14 was recovered from the conjunctiva of an 82-year-old patient (no travel history) with endophthalmitis in a Polish hospital in 2014. Tested by broth microdilution (<http://eucast.org>), it was susceptible only to colistin (Table S1, available as [Supplementary data](#) at JAC Online). The MBL PCR sequencing revealed *bla*_{NDM-1} and *bla*_{DIM-1} genes. The whole genome was sequenced by MiSeq (Illumina, San Diego, USA) and MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). A single contig, assembled with MaSuRCA v.3.2.6 (<https://github.com/alekseyzimin/masurca>), contained a full chromosome of 6902135 bp, with 6646 putative genes [6567 coding sequences (CDSs)] (GenBank entry CP035739). *P. aeruginosa* 1334/14 was classified as ST234 (<http://pubmlst.org>). A search in the literature, PubMLST database and GenBank (described below) yielded only 26 ST234 isolates identified in several European and African countries and Australia (<http://pubmlst.org>).^{10,11} Some had MBLs, such as VIM-2 in Russia¹¹ and IMP-34 plus DIM-1 in Ghana.¹⁰

For the phylogenetic analysis, all 17 other available ST234 genomes were used, identified in PubMLST or extracted from all GenBank *P. aeruginosa* genomes ($n=3254$ as of 6 December 2018). Core ST234 genomes were aligned against *P. aeruginosa* PAO1 as a reference, inferring SNP-based phylogeny with Parsnp v.1.2.¹² Two major lineages were discerned, one with isolates from Russia, Germany and Estonia, and the other with 1334/14 and isolates from Ghana and the UK (Figure S1). The IMP-34 + DIM-1-producing Ghanaian isolates¹⁰ were the closest relatives of *P. aeruginosa* 1334/14, confirmed by proteome comparison with bidirectional BLASTp, revealing 100% protein identity within ~5700 CDSs in these isolates.

The isolate's resistome, shown by ResFinder 3.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), represented a new peculiar combination of 25 acquired genes (Table S2), including *bla*_{NDM-1}, *bla*_{DIM-1} and the ESBL gene *bla*_{PME-1}. Multiple aminoglycoside-modifying enzyme genes co-occurred with the 16S rRNA methylase gene *rmtD3*. Since the first report in Serbia in 2010,² *P. aeruginosa* NDM has been reported broadly, and repeatedly in India.³⁻⁵ DIM-producing pseudomonads were described in the Netherlands in 2010⁷ and only recently in, for example, India⁶ or Myanmar (ST234-non-related *P. aeruginosa* with DIM-1 + NDM-1).⁵ *P. aeruginosa* PME-1 was found in Gulf countries,⁸ and then in Denmark (from India; with NDM-1 and VIMs).³ RmtD3 was reported in *P. aeruginosa* in 2018 in Myanmar.⁹

IslandViewer 4 (<http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/>) and ICEFinder 2.0 (<http://db-mml.sjtu.edu.cn/ICEberg/>) were used to identify PAGIs and ICEs. When compared with *P. aeruginosa* PAO1, 1334/14 contains 12 mosaic regions. *bla*_{NDM-1}, *bla*_{PME-1} and *rmtD3* are in a 112205 bp-long structure inserted into a tRNA^{Gly} gene (PAO1 locus PA2583; Figure 1a). Its ~50 kb fragment resembles (87%) the ICE_{clc}(B13) backbone (GenBank AJ617740); therefore, the structure was classified into the ICE family *clc*,¹⁰ and named ICE6660 (GenBank MK497171). It has two variable regions: cargo1 (~25 kb), between the P4 integrase and relaxase genes, and cargo2 (~30 kb) within the DNA methyltransferase gene. Related elements (93% coverage, 99.8% identity) were found in several GenBank entries, e.g. in *P. aeruginosa* PA83 from Germany (GenBank CP017293). However, none of these has *bla*_{NDM-1}, *bla*_{PME-1} or *rmtD3*, which in ICE6660 are in cargo2 with five ISCR-like elements. The *rmtD3* locus with ISCR3 and ISCR14/24 matches well (100% coverage, 98% identity) the structure in *P. aeruginosa* MyNCGM481 from Myanmar.⁹ Downstream is the *bla*_{PME-1} locus with two ISCR14/24s, like in *P. aeruginosa* GB771 from the United Arab Emirates (100% coverage, 95% identity),⁸ followed by a *bla*_{NDM-1}-carrying Tn125 remnant, truncated by a partial ISCR14/24. *bla*_{DIM-1} is in another region of 84126 bp, named PAGI-18 (GenBank MK450539), residing at an RNA helicase *hrpB* gene (PAO1 locus PA3961; Figure 1B). Its distal ~21 kb-long segment has 26 putative CDSs, found also in 12 other *P. aeruginosa* genomes, including the ST234 isolates from Ghana. The remaining PAGI-18-specific part has a patchwork-like structure with numerous resistance genes and mobile elements. *bla*_{DIM-1} is in the integrase In1592, identified first in the Ghanaian ST234 isolate 97

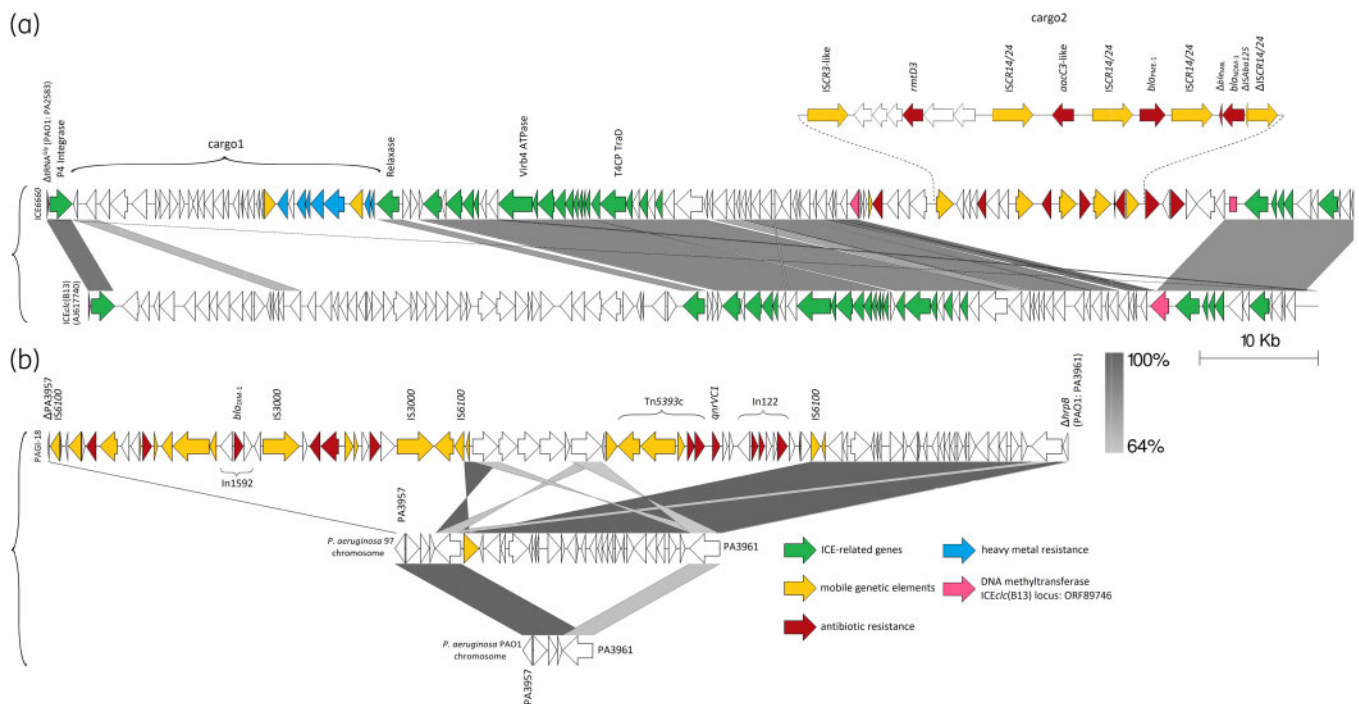


Figure 1. Graphical representation of ICE6660 (GenBank MK497171) compared with ICEclc(B13) (GenBank AJ617740) (a), and PGI-18 (GenBank MK450539) compared with the corresponding chromosomal loci of the Ghanaian *P. aeruginosa* strain 97 (GenBank CP031449) and *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank NC_002516.2) (b), generated with Easyfig v. 2.2.4 (<https://github.com/mjsull/Easyfig/wiki>). Arrows indicate all genes/CDSs, proportionally to their sizes and orientation; only selected specific genes/elements are marked with colours and/or names. The shaded grey areas between linear structures indicate homologous regions and the level of their sequence identity. The ICE6660 cargo2 subregion with *rmtD3*, *bla_{NDM-1}* and *bla_{PME-1}* genes is enlarged above the ICE6660 structure using dotted lines. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

(GenBank CP031449) but located far from the ~21 kb segment. PGI-18 likely arose by several rearrangements mediated by mobile elements, such as IS6100, flanking the patchwork subregion, and In1592 might have been recruited from its original locus, retained in the Ghanaian isolates, into the vicinity of the ~21 kb segment.

A new, almost pan-resistant *P. aeruginosa* genotype is described. The clone and major resistance genes have been occasionally reported in the species, usually separately or in other combinations, and over large distances in Asia, Africa and Europe. The Polish strain might have evolved in another continent; however, despite its relatedness to some African isolates, the place and time of its importation remain unknown.

Acknowledgements

We thank Thomas Jové for his very helpful consultation in the integron analysis, and Mikhail Edelstein and Carolyne Horner for kindly providing information about origins of some of the *P. aeruginosa* ST234 isolates in the phylogenetic analysis. This work was presented during the 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 13–16 April 2019, Amsterdam, The Netherlands (poster P0900) and (in Polish) at the scientific conference ‘90 lat Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów: PTM wczoraj - dziś - jutro’, 22–23 September 2017, Kraków, Poland (poster V-71) and the XXII Scientific Symposium ‘Postępy w Medycynie Zakażeń’, 7–8 December 2018, Warsaw, Poland (poster no. 20).

Funding

The study was partially financed by the grant UMO-2016/21/B/NZ7/02075 from the Polish National Science Centre, Narodowy Program Ochrony Antybiotyków from the Polish Ministry of Health and Specjalne Urządzenie Badawcze (SPUB) MIKROBANK 2 from the Polish Ministry of Science and Higher Education.

Transparency declarations

Nothing to declare.

Supplementary data

Tables S1 and S2 and Figure S1 are available as [Supplementary data](#) at JAC Online.

References

- Oliver A, Mulet X, Lopez-Causape C et al. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 2015; **21–22**: 41–59.
- Jovcic B, Lepsanovic Z, Begovic J et al. The clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa* MMA83 carries two copies of the *bla_{NDM-1}* gene in a novel genetic context. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 3405–7.
- Wang M, Borris L, Aarestrup FM et al. Identification of a *Pseudomonas aeruginosa* co-producing NDM-1, VIM-5 and VIM-6 metallo-β-lactamases in

- Denmark using whole-genome sequencing. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **45**: 324–5.
- 4** Rahman M, Prasad KN, Pathak A *et al*. RmtC and RmtF 16S rRNA methyltransferase in NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Emerg Infect Dis* 2015; **21**: 2059–62.
- 5** Tada T, Hishinuma T, Watanabe S *et al*. Molecular characterization of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; **63**: pii=e02397-18.
- 6** Deshpande LM, Jones RN, Woosley LN *et al*. Retrospective molecular analysis of DIM-1 metallo- β -lactamase discovered in *Pseudomonas stutzeri* from India in 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 596–8.
- 7** Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Al Naiemi N *et al*. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 2420–4.
- 8** Tian GB, Adams-Haduch JM, Bogdanovich T *et al*. PME-1, an extended-spectrum β -lactamase identified in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 2710–13.
- 9** Tada T, Shimada K, Mya S *et al*. A new variant of 16S rRNA methylase, RmtD3, in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62**: pii=e01806-17.
- 10** Botelho J, Roberts AP, Leon-Sampedro R *et al*. Carbapenemases on the move: it's good to be on ICEs. *Mob DNA* 2018; **9**: 37.
- 11** Edelstein MV, Skleenova EN, Shevchenko OV *et al*. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**: 867–76.
- 12** Treangen TJ, Ondov BD, Koren S *et al*. The harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol* 2014; **15**: 524.

Table S1. Antimicrobial susceptibility of the *P. aeruginosa* 1334/14 isolate.

Isolate	MICs (mg/L) ^a															
	TIM	PIP	TZP	CAZ	FEP	C/T	ATM	IPM	MEM	DOR	GEN	AMK	TOB	CIP	LVX	CST
<i>P. aeruginosa</i> 1334/14	>256	>256	>256	>256	>256	>256	128	>64	>64	>64	>256	>256	>256	>64	>64	1

^a – abbreviations: AMK, amikacin; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; CST, colistin; C/T, ceftolozane-tazobactam; DOR, doripenem; FEP, cefepime; GEN, gentamicin; LVX, levofloxacin; IPM, imipenem; MEM, meropenem; PIP, piperacillin; TIM, ticarcillin-clavulanate; TOB, tobramycin; TZP, piperacillin-tazobactam.

Table S2. Acquired AMR genes in *P. aeruginosa* 1334/14 and their genomic positions^a

Protein function	Gene name	Genetic background	Position in the chromosome ^b
<i>Resistance to β-lactams</i>			
metallo- β -lactamase (MBL)	<i>bla</i> _{NDM-1}	ICE6660 (cargo2; Δ Tn125, ISCR14/24-associated)	1,279,629..1,280,441
extended-spectrum β -lactamase (ESBL)	<i>bla</i> _{PME-1}	ICE6660 (cargo2; ISCR14/24-associated)	1,282,517..1,283,446
metallo- β -lactamase (MBL)	<i>bla</i> _{DIM-1}	PAGI-18 (In1592)	2,909,551..2,910,306
broad-spectrum β -lactamase (oxacillinase)	<i>bla</i> _{OXA-10}	uncharacterised GI (In1664)	5,670,589..5,671,389
<i>Resistance to aminoglycosides</i>			
16S rRNA methylase	<i>rmtD3</i>	ICE6660 (cargo2; ISCR3& ISCR14/24-associated)	1,291,364..1,292,107
aminoglycoside <i>O</i> -phosphotransferase	<i>aph(3')-Ib</i> -like	PAGI-18	2,897,353..2,898,168
aminoglycoside <i>O</i> -phosphotransferase	<i>aph(3')-VI</i>	PAGI-18	2,901,994..2,902,773
aminoglycoside <i>O</i> -phosphotransferase	<i>strA</i>	PAGI-18 (Tn5393c)	2,946,695..2,947,498
aminoglycoside <i>O</i> -phosphotransferase	<i>strB</i>	PAGI-18 (Tn5393c)	2,947,498..2,948,334
aminoglycoside <i>O</i> -phosphotransferase	<i>aph(3')-IIb</i> -like	PAGI-18	3,145,858..3,146,664
aminoglycoside <i>O</i> -nucleotidyltransferase	<i>aadB</i>	PAGI-18 (In122)	2,952,187..2,952,720
aminoglycoside <i>O</i> -nucleotidyltransferase	<i>aadA1</i> -like	uncharacterised GI (In1664)	5,669,781..5,670,572
aminoglycoside <i>N</i> -acetyltransferase	<i>aacC3</i> -like	ICE6660 (cargo2; ISCR14/24-associated)	1,285,854..1,286,648
<i>Resistance to quinolones</i>			
quinolone target enzymes protection	<i>qnrVC1</i>	PAGI-18	2,948,955..2,949,611
ciprofloxacin phosphotransferase	<i>crpP</i> -like	pKLC102-like GI	5,470,914..5,471,111
<i>Resistance to rifampicin</i>			
ADP-ribosylating transferase	<i>arr-2</i>	uncharacterised GI (In1664)	5,673,660..5,674,112
<i>Resistance to trimethoprim</i>			
dihydrofolate reductase	<i>dhfrA1</i>	PAGI-18 (In122)	2,952,789..2,953,262
<i>Resistance to sulphonamides</i>			

dihydropteroate synthase	<i>sulI</i> (3 copies)	ICE6660 (cargo2);	1,300,121..1,300,960
		PAGI-18 (In122);	2,954,307..2,955,146
		uncharacterised GI (In1664)	5,668,444..5,669,310
<i>Resistance to phenicols</i>			
MFS efflux pump	<i>cmlA1</i> -like	uncharacterised GI (In1664)	5,671,654..5,672,913
<i>Resistance to tetracyclines</i>			
MFS efflux pump	<i>tetG</i>	ICE6660 (cargo2)	1,274,563..1,275,738
<i>Resistance to macrolides</i>			
macrolide phosphotransferase	<i>mphE</i>	PAGI-18	2,915,747..2,916,631
macrolide phosphotransferase	<i>mphF</i>	PAGI-18	2,920,710..2,921,609
ABC-F type ribosomal protection protein	<i>msrE</i>	PAGI-18	2,916,687..2,918,162

^a – AMR genes detected with ResFinder 3.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), except for the *aacC3*-like gene, identified manually

^b – positions are according to the annotation of the *P. aeruginosa* 1334/14 genome (GenBank acc. No. CP035739)

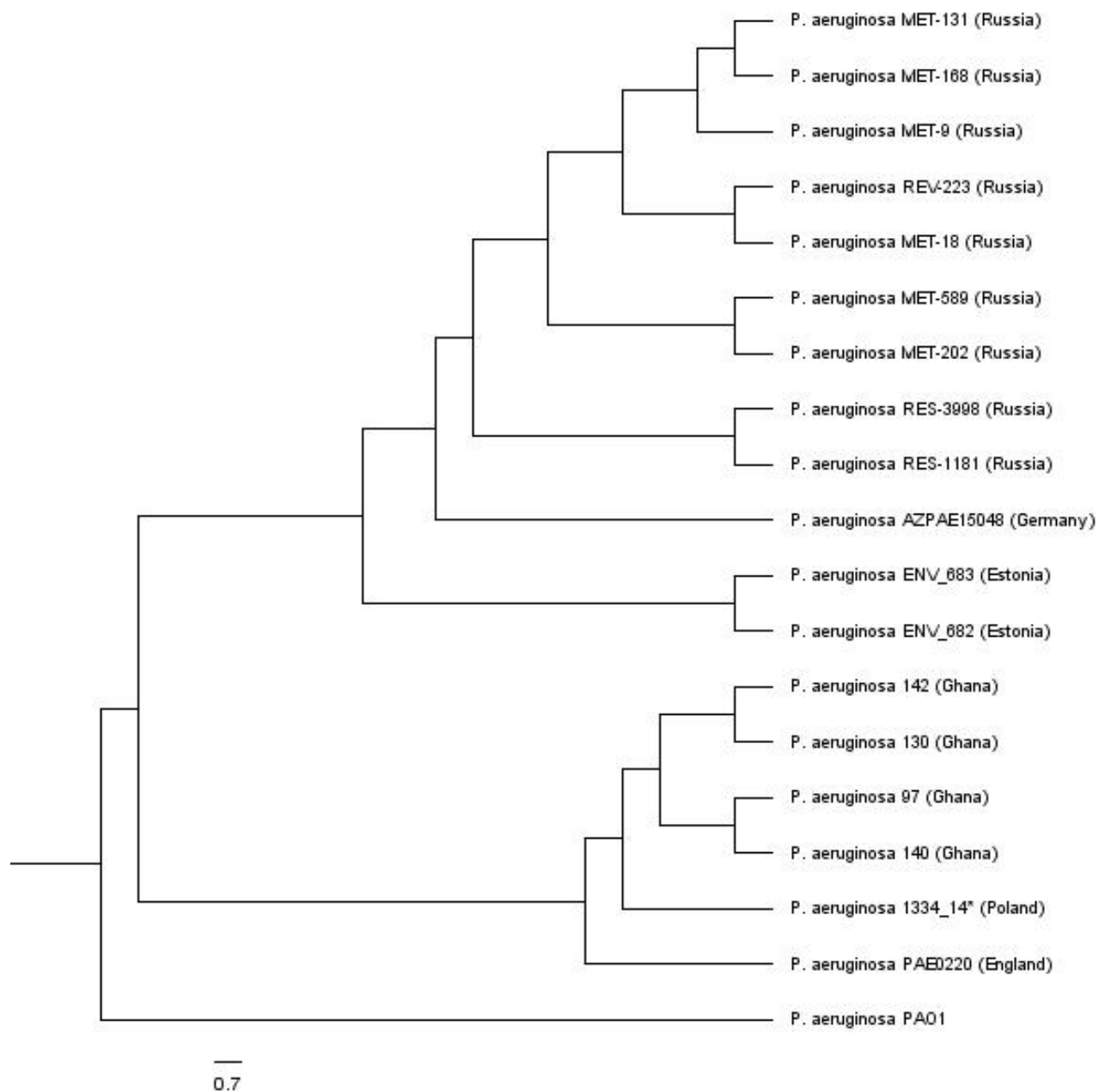


Figure S1. Phylogenetic tree of *P. aeruginosa* 1334/14 and 17 other ST234 core genomes, using *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank acc. No. NC_002516.2) as a reference, generated with the FigTree v. 1.4.4 viewer (<https://github.com/rambaut/figtree/releases>). The 1334/14 genome is marked with an asterisk. The nodes were ordered increasingly, with branches transformed proportionally. Genomes of the isolates from Russia and the UK have the following European Nucleotide Archive (ENA) numbers: MET-131, ERR364111; MET-168, ERR364112; MET-9, ERR364125; REV-223, ERR370065; MET-18, ERR364164; MET-589, ERR364066; MET-202, ERR364033; RES-3998, ERR364155; RES-1181, ERR364058; PAE0220, ERR363825. Genomes of the isolates Germany, Estonia and Ghana are under the following NCBI BioProject numbers: AZPAE15048, PRJNA264310; ENV_683 and ENV682, PRJNA244279; and 142, 130, 97 and 140, PRJNA411997.

7.4 "Ciężkoobrojni" *Pseudomonas aeruginosa*: mechanizmy lekooporności i ich tło genetyczne.

KOSMOS

PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 66 **2017**
Numer 1 **(314)**
Strony **11-29**

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

PAWEŁ URBANOWICZ, MAREK GNIADKOWSKI

Zakład Mikrobiologii Molekularnej
Narodowy Instytut Leków
Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa
E-mail: purbanowicz@cls.edu.pl
gniadkow@cls.edu.pl

„CIEŻKOZBROJNY” *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*: MECHANIZMY LEKOOPORNOŚCI I ICH TŁO GENETYCZNE

WSTĘP

Stosowanie każdej substancji terapeutycznej jest obarczone ryzykiem powstania tolerancji lub oporności na jej działanie i zjawisko to jest charakterystyczne także dla leków stosowanych w terapii zakażeń bakteryjnych, wirusowych czy pasożytniczych (DAVIES i DAVIES 2010). Powstała tolerancja lub oporność przyczynia się do wydłużenia czasu trwania leczenia, podniesienia jego kosztów i co najważniejsze, zwiększenia ryzyka niepowodzenia lub powikłań. Proces rozwijania oporności jest wieloaspektowy, zaś mechanizmy lub sposoby, dzięki którym komórka staje się niepodatna na działanie leku są bardzo zróżnicowane i mogą mieć podłoże genetyczne, biochemiczne lub fizjologiczne (COHEN 1992). Zjawisko lekooporności o wielkiej skali dotyczy zakażeń i chorób zakaźnych wywoływanych przez bakterie, będąc jednym z zasadniczych problemów, z jakimi boryka się współczesna medycyna. W ostatnim czasie jego znaczenie osiągnęło też wymiar społeczny, ekonomiczny i nawet polityczny.

ANTYBIOTYKI I ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ – RYS HISTORYCZNY I PODSTAWY

Mianem pierwszego antybiotyku (zgodnie z terminem uktym przez Selamana Waksmana, produkt metabolizmu wtórnego drobnoustrojów o działaniu bakteriostatycznym lub bakteriobójczym) określa się penicylinę. Protoplastę dzisiejszych leków

przeciwbakteryjnych może jednak stanowić środek z końca lat 90. XIX w. o nazwie Pilocyanaza (ang. Pyocyanase), za odkryciem którego stali Rudolf Emmerich i Oscar Löw. W skład owego leku wchodził ekstrakt z hodowli bakterii *Bacillus pyocyaneus* (*Pseudomonas aeruginosa*). Już w 1899 r. niemieccy badacze wykazali, że substancja ta posiada właściwości przeciwbakteryjne, skierowane wobec gatunków odpowiedzialnych za rozwój cholery, tyfusu, błonicy czy węgliku. Pilocyanazę wprowadzono do leczenia szpitalnego, ale jej zróżnicowana skuteczność w zależności od pacjenta, a także preparatyka, której poszczególne etapy były toksyczne, doprowadziły do porzucenia leku (AMINOV 2010). Za właściwe wejście rodzaju ludzkiego w „erę antybiotykową” odpowiedzialne są trzy nazwiska: Paul Ehrlich, Gerhard Domagk i przede wszystkim, Alexander Fleming.

Paul Ehrlich, wraz z bakteriologiem Sahachiro Hato i chemikiem Alfredem Bertheidem, wynaleźli w 1909 r. arsfenaminy, pierwszy chemioterapeutyk (lek przeciwdrobnoustrojowy syntetyzowany chemicznie, niemający odpowiednika w przyrodzie), znany szerzej jako Salvarsan. Ten arsenoorganiczny związek pozwolił na walkę z kiłą, chorobą uznawaną jeszcze do początku XX w. za nieuleczalną (stosowane wówczas sole rtęci odznaczały się wysoką toksycznością i niską efektywnością terapeutyczną) (AMINOV 2010). Z kolei Gerhard Domagk uważany jest za twórcę całej klasy chemioterapeutyków, sulfonamidów. Prowadził on badania nad aktywnością bakteriostatyczną i bakteriobójczą różnych barwników chemicznych. Jednym z

Słowa kluczowe: antybiotyki β-laktamowe, antybiotykooporność, metalo-β-laktamazy, oporność nabyta, *Pseudomonas aeruginosa*

nich był odkryty w 1932 r. Prontosil. Związek ten nie wykazywał jednak aktywności bakteriobójczej *in vitro*; ujawniała się ona dopiero po podaniu domięśniowym zwierzętom. Okazało się, że Prontosil stanowi prekursor aktywnej formy leku – sulfanilamid. Był on tani i prosty w masowej produkcji, a dzięki wprowadzanym modyfikacjom chemicznym otrzymano wiele jego pochodnych. Dzięki temu sulfonamidy stały się w niedługim czasie najbardziej rozpowszechnionymi lekami wykorzystywanymi w medycynie zakażeń, zaś Domagk w 1939 r. został za to odkrycie uhonorowany Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny (AMINOV 2010).

Kwestia odkrycia penicyliny wydaje się rozstrzygnięta. Nastąpiło to w 1928 r. wskutek rzekomego niedbalstwa Alexandra Fleminga. Faktem mało znanym, a wartym zapamiętania jest praca eksperymentalna pochodząca z 1896 r., autorstwa Ernesta Duchesnego. Podczas badań prowadzonych *in vitro*, obserwował on powstające zjawisko antybiozy pomiędzy zmieszanyimi hodowlami bakterii *Escherichia coli* lub *Salmonella enterica* i grzyba *Penicillium glaucum*. Prowadził także badania na świnkach morskich, podając im kultury wymienionych bakterii chorobotwórczych i pleśni. Zebrane dane pozwoliły młodemu badaczowi sformułować hipotezę mówiącą, że za ograniczenie lub brak wzrostu bakterii odpowiada „toksyna” produkowana przez strzępki *P. glaucum*. Nie zidentyfikował jednak konkretnego związku, który mógł być za to zjawisko odpowiedzialny. Praca Duchesnego pozostała w świecie naukowym niezauważona, zaś sam badacz zmarł na gruźlicę w 1912 r. (SCHAEFER 2014). Epizod ten rzucić może nowe światło na odkrycie penicyliny przez Fleminga. Niemniej, droga dzieląca pierwsze obserwacje i uzyskanie tego antybiotyku w formie czystej chemicznie i efektywnej terapeutycznie, była długa. Fleming, w obliczu komplikacji związanych z oczyszczeniem i stabilnością penicyliny, zaniechał dalszych badań nad nią w 1940 r. Szczęśliwie jednak, zespół pod kierownictwem Howarda Floreya i Ernesta Chaina w tym samym czasie podjął się opracowania metody, dzięki której skutecznie pozyskiwano i oczyszczano penicylinę z hodowli pleśni. Szacuje się, że produkowana na większą skalę, obok sulfonamidów, okazała się bezcenna w uratowaniu życia i zdrowia ponad 100 milionów ludzi, przez co zapewniła Flemingowi, Chainowi i Floreyowi miejsce w gronie noblistów (SCHAEFER 2014). Co ciekawe, Alexander Fleming był jednym z pierwszych, którzy ostrzegali przed opornością bakterii na nowo odkryty

antybiotyk, wynikającą z jego nieprawidłowego dawkowania (FLEMING 1999).

Przedstawione prace nad trzema pierwszymi lekami przeciwbakteryjnymi (Salvarsanem, Prontosilem oraz penicyliną) są niejako wstępem do okresu opisywanego jako „złota era antybiotyków”. Przez ponad 20 lat, począwszy od lat 50. XX w., trwał szybki rozwój na tym polu; powstała wówczas większość głównych klas leków, z których duża część jest stosowana do dziś.

Wdrożenie antybiotyków, obejmujących swoim działaniem liczne, ówczesnie znane bakterie chorobotwórcze, było krokiem milowym w medycynie zakażeń. Wyrażano przekonanie, że trapiące ludzi i zwierzęta choroby bakteryjne wkrótce należąć będą do przeszłości (COHEN 2000). Niestety, wraz z intensywnym rozwojem antybiotykoterapii, dynamicznie rozwijało się również zjawisko antybiotykooporności, przed czym ostrzegał już Fleming wraz z nielicznym gronem bakteriologów. Pierwsze doniesienia na temat pojawiających się opornych szczepów bakterii patogennych traktowano z niedowierzaniem. Do problemu podchodzono raczej jak do ciekawostki z zakresu genetyki, wartej ewentualnego opisanie, a nie narastającego zagrożenia klinicznego. Co więcej, uważano, że problem antybiotykooporności ma małe prawdopodobieństwo zaistnienia podczas leczenia (DAVIES 1995). A jednak, już w 1942 r., niedługo po wprowadzeniu penicyliny do leczenia szpitalnego, wyizolowano pierwszy penicyliooporny szczep *Staphylococcus aureus*. Wraz z upływem czasu proporcja zakażeń tym opornym patogenem drastycznie rosła i zaczął odpowiadać on nie tylko za zakażenia w środowisku szpitalnym, ale również poza jego obrębem. Już na początku lat 50. ubiegłego wieku penicyliooporne szczepy *S. aureus* zyskały charakter pandemicznych, stanowiąc aż ok. 80% izolatów szpitalnych tego gatunku (MEDEIROS 1997, CHAMBERS i DELEO 2009). Co więcej, równoległe w czasie doszło do epidemii dysenterii wywołanej przez *Shigella dysenteriae* w Japonii, co dodatkowo podkreśliło realne zagrożenie antybiotykoopornością, bowiem w jej trakcie obserwowano spadek efektywności leczenia szeroko dostępnymi sulfonamidami. Pod koniec 1952 r. ponad 80% izolatów *S. dysenteriae* było opornych na działanie tych chemioterapeutyków. Podejmowane leczenie chloramfenikolem, tetracykliną czy streptomycyną było skuteczne tylko chwilowo, okazywało się bowiem, że bakterie stawały się odporne i na te leki (DAVIES 1995). Zaczęto zwracać uwagę, że cechy oporności na antybiotyki mogą być przekazywane między komórkami (NAKAYA i współaut. 1960, DATTS 1962, LEBEK 1963). Stałe rosła liczba do-

niesień z całego świata o opornych (w tym wieloopornych) szczepach różnych gatunków bakterii (DAVIES 1995). Zaczęto się skupiać na wyjaśnieniu problemu, w jaki sposób geny warunkujące antybiotykooporność są „zorganizowane” w genomie bakteryjnym i dzięki jakim mechanizmom komórki są w stanie je nabywać. Opracowanie epidemii *S. dysenteriae* w Japonii pozwoliło określić, że to plazmidy (określane jako „czynniki R”) były odpowiedzialne za lekooporność bakterii (WATANABE i FUKUSAWA 1960). W dodatku, w 1973 r. Robert Hedges i Alan Jacob zidentyfikowali transpozon niosący w obrębie swojej sekwencji gen oporności na ampicylinę (HEDGES i JACOB 1974). Ponad dekadę później, w 1989 r., Harold Stokes i Ruth Hall wykryli integrony, struktury genetyczne zdolne do wymiany i ekspresji tzw. kaset genowych, którymi często są geny oporności na antybiotyki (STOKES i HALL 1989). Dzięki takim doniesieniom coraz lepiej rozumiano mechanizmy nabywania oporności i zaczęto się przekonywać, jak bardzo dynamiczne, a w efekcie niebezpieczne jest to zjawisko.

Jak wspomniano wyżej, zagadnienie lekooporności bakterii jest złożone. Mogą ją warunkować pojedyncze geny lub ich zespoły, które oprócz samej oporności kodują też funkcje regulacyjne i jako takie, mogą być niekiedy częścią skomplikowanych sieci regulacyjnych w komórce. Ekspresja genu oporności może zachodzić w sposób ciągły na tym samym poziomie (ekspresja konstytutywna) lub tymczasowo, wskutek indukcji specyficznym czynnikiem, np. samym antybiotykiem (ekspresja regulowana lub indukowana). Mechanizmy antybiotykooporności reprezentują kilka zasadniczych strategii, z których najbardziej rozpowszechniona jest enzymatyczna inaktywacja leku poprzez jego chemiczną modyfikację lub hydrolizę. Wyróżnia się także ochronę miejsca docelowego działania antybiotyku lub, częściej, jego zmianę strukturalną, wywołaną np. mutacją (zmiana sekwencji białka lub RNA) lub chemiczną modyfikacją. Jeżeli antybiotyk znajduje się wewnątrz komórki bakteryjnej, to wyspecjalizowane pompy mogą go aktywnie usunąć. Bakteria może też hamować proces wnikania leku do wnętrza komórki poprzez zmniejszanie przepuszczalności otaczających ją osłon. Wreszcie, blokowany przez antybiotyk szlak metaboliczny może być zmodyfikowany lub zastąpiony szlakiem alternatywnym (BLAIR i współaut. 2015).

Warto pamiętać, że niektóre gatunki bakterii mogą być naturalnie odporne na działanie określonych antybiotyków lub ich całych klas. Zjawisko to wynika najczęściej z braku obecności miejsca docelowego dla ich działania, słabej przepuszczalności lub aktywności

chromosomowo kodowanych mechanizmów oporności. Definiowana w ten sposób oporność naturalna podlega pozytywnej selekcji podczas ekspozycji na antybiotyki, przez co niektóre gatunki mogą zyskiwać sprzyjające warunki do rozwoju w środowisku szpitalnym (MARKIEWICZ i KWIATKOWSKI 2012). Głównym problemem pozostaje jednak oporność nabyta, mająca dwa główne źródła. Jednym z nich są mutacje lub zjawiska rekombinacji w obrębie chromosomowego DNA, które mogą odpowiadać np. za zmiany strukturalne miejsc docelowych antybiotyków, wzrost ekspresji naturalnie występujących enzymów inaktywujących leki lub pomp, wreszcie hamować ekspresję lub zmieniać strukturę (aż do całkowitej utraty) kanałów porynowych, przez które antybiotyki przedostają się do komórki (DAVIES i DAVIES 2010, BLAIR i współaut. 2015). Drugim źródłem o ogromnym znaczeniu jest zdolność nabywania obcego DNA przez komórkę bakterii poprzez horyzontalny transfer genów (ang. horizontal gene transfer, HGT). Otrzymane w ten sposób fragmenty DNA mogą zawierać sekwencje homologiczne do genów kodujących cele działania antybiotyków i ich rekombinacja w *locus* może powodować zmiany strukturalne tych celów. Mogą one też zawierać nowe geny antybiotykooporności, które są włączane do chromosomu lub pozostają na autonomicznie replikujących się plazmidach. Co ważne, tak nabyte geny oporności podlegają kolejnym mutacjom, prowadzącym np. do podwyższenia poziomu ich ekspresji lub modyfikacji struktury i funkcji ich produktów (FROST i współaut. 2005). Przenoszone geny oporności pochodzą z różnych gatunków bakterii, u których mogą warunkować oporność wrodzoną. Za początek „krażenia” tych genów w populacjach drobnoustrojów uznaje się proces ich mobilizacji, tzn. pojawienia się w ich pobliżu ruchomych elementów genetycznych (np. sekwencji insercyjnych, IS), zdolnych do przeniesienia sąsiednich regionów DNA w inne miejsce genomu, w tym na obecny w komórce plazmid (STOKES i GILLINGS 2011).

Pozyскиwanie cech lekooporności w drodze mutacji chromosomalnych lub HGT, jak również rozprzestrzenianie się klonalne szczepów z nowo nabytymi cechami są, podobnie jak oporność naturalna, silnie faworyzowane przez istniejącą presję antybiotykową (LEVY i MARSHALL 2004). Sprzyja ona również akumulacji w pojedynczych szczepach różnych determinant oporności, dotyczących tych samych lub różnych grup leków i w zależności od stopnia ich nagromadzenia wyróżnia się szczepy typu MDR (ang. multi-drug-resistance), XDR (ang. extensive-drug-resistance) oraz PDR (ang. pan-drug-

-resistance), z których te ostatnie wykazują oporność na wszystkie dostępne antybiotyki (MAGIORAKOS i współaut. 2012). Ze względu na znaczenie kliniczne gatunków oraz ich zdolność do akumulacji cech lekooporności, stworzono listę głównych patogenów szpitalnych, tzw. ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.). Wraz z *Clostridium difficile*, a także pozaszpitalnymi drobnoustrojami *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* i *Mycobacterium tuberculosis*, ESKAPE stanowią problem kliniczny o niezwyklej wadze (BOUCHER i współaut. 2009, FAIR i YITZHAK 2014). Spośród Gram-ujemnych bakterii, szczególne znaczenie w grupie ESKAPE ma pałeczka ropy błękitnej, *P. aeruginosa*. Użyte w tytule niniejszego artykułu określenie „ciężkozbrojny”, trafnie odzwierciedla właściwości tego niezwyklego mikroorganizmu. Podobnie jak dobrze uzbrojona i opancerzona piechota pól bitewnych średniowiecza zdolna jest rozbić szeregi słabszego przeciwnika, tak *P. aeruginosa* jest w stanie dokonać spustoszenia w zakażonym organizmie. Rozmaitość kodowanych czynników zjadliwości, a także wiele skutecznych, naturalnych i nabytych mechanizmów oporności na antybiotyki i dezynfektanty, każą traktować ten oportunistyczny patogen jako jedno z poważniejszych zagrożeń klinicznych.

HISTORIA ODKRYCIA PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Zakażenia bakterią *P. aeruginosa* po raz pierwszy były odnotowywane w XIX w., kiedy opisywano charakterystyczne, niebiesko-zielone zabarwienie i osobliwy zapach bandaży, którymi opatrywano niektórych rannych i chorych. W 1850 r. francuski badacz Charles Sédillot zwrócił uwagę, że zabarwienie to jest w stanie przenosić się pomiędzy pacjentami. Był to na tyle ciekawy temat, że dekadę później Fordos wyekstrahował ów barwnik, piocyjaninę, wciąż jednak nie znano czynnika, który go wytwarzał. W 1862 r. Lucke zaobserwował mikroorganizmy o podłużnym kształcie w preparacie z charakterystycznie zabarwionej ropy, pochodzącej z zakażonej rany. Dopiero w 1882 r. drobnoustrój ten został wyizolowany przez Carla Gessarda i nazwany początkowo *Bacillus pyocyaneus* (zmiana na *Pseudomonas aeruginosa* nastąpiła w 1894 r.) (VILLAVICENCIO 1998, D'AGATA 2015). Początkowo nie traktowano jednak *B. pyocyaneus* jako organizmu patogennego, dopiero rosnąca liczba doniesień o „zielono-niebieskich zakażeniach”, a także publikacja Williama z 1894 r., która

pierwsza zawierała szczegółowe opisy infekcji *B. pyocyaneus*, pozwoliła zidentyfikować tę bakterię jako czynnik etiologiczny zakażeń. W latach 40. XX w., William Haynes nakreślił dokładną charakterystykę mikrobiologiczną gatunku *P. aeruginosa* i zaproponował sposób odróżnienia go od pokrewnego *P. fluorescens* (D'AGATA 2015). Przez następne 50 lat pałeczka ropy błękitnej stała się jednym z najintensywniej badanych drobnoustrojów.

MIKROBIOLOGIA

Pseudomonas aeruginosa jest bakterią wszechobecną; występuje powszechnie w glebie, zbiornikach wodnych, rzekach, stanowi część mikroflory roślin i zwierząt. Co ciekawe jednak, jest rzadkim składnikiem mikrobiomu człowieka. Bakteria ta jest ruchliwa, oksydazo-dodatnia, tlenową pałeczką niefermentującą laktozy. Ze względu na niewielkie wymagania pokarmowe jest w stanie rosnąć na wielu podłożach laboratoryjnych. Optymalna temperatura dla tej bakterii to 37°C, choć jest też w stanie rosnąć w 42°C, co wyróżnia ją na tle reszty gatunków swojego rodzaju. Dzięki różnorodnym pigmentom hodowle *P. aeruginosa* charakteryzuje się specyficznym kolorem, poczynając od zielono-niebieskiego (piocyjanina), zielonego, zdolnego do fluorescencji (piowerdyna), przez czerwony (piorubina) po brązowo-czarny (piomelanina). Ponadto, kultury pałeczki ropy błękitnej mają charakterystyczny zapach przypominający jaśmin. Niektóre szczepy *P. aeruginosa* są w stanie wytwarzać pozakomórkowy polisacharyd, alginian. Nadprodukcja tej substancji powoduje, że tworzone kolonie stają się śluzowate i lejące. Tego typu forma kolonii jest właściwa dla izolatów otrzymywanych od chorych na mukowiscydozę lub inne choroby, którym towarzyszą przewlekłe zakażenia *P. aeruginosa* (D'AGATA 2015).

ZNACZENIE KLINICZNE

Pseudomonas aeruginosa jest szczególnie niebezpieczny w środowisku szpitalnym, gdzie jego rezerwuarem może być skażony sprzęt diagnostyczny, elementy aparatury do sztucznego oddychania lub resuscytacji, urządzenia i instalacje sanitarne, sprzęt czyszczący, a nawet wazony na kwiaty czy kostkarki do lodu (D'AGATA 2015). Zakażenia pałeczką ropy błękitnej są groźne zwłaszcza dla pacjentów z osłabioną odpornością, np. po przeszczepach i poddawanych chemioterapii. Ryzyko dotyczy również osób starszych, szczególnie wielokrotnie lub długo hospitalizowanych, pacjentów po zabiegach in-

wazyjnych, z ranami oparzeniowymi i przebywających na oddziałach intensywnej terapii (OIT). Charakterystyczną grupę stanowią chorzy na mukowiscydozę, zasadniczo przebywający poza szpitalami, jednak często do nich trafiający z powodu choroby podstawowej i zakażeń (ALHAZMI 2015). *Pseudomonas aeruginosa* jest czynnikiem etiologicznym wielu typów zakażeń, zarówno ostrych, jak i przewlekłych, do których należą zakażenia dróg oddechowych (ang. respiratory tract infection, RTI), skóry i tkanek miękkich (ang. skin and soft tissue infection, SSTI), dróg moczowych (ang. urinary tract infection, UTI) i najgroźniejszych – łożyska krwi (ang. bloodstream infection, BSI). Wśród SSTI bardzo duże znaczenie mają zakażenia miejsca operowanego, ran oparzeniowych, a także odleżyn. W USA *P. aeruginosa* należy do pierwszej piątki bakterii wywołujących zakażenia szpitalne, w tym plasuje się na drugim miejscu wśród czynników respiratorowego zapalenia płuc i odcewnikowych zakażeń dróg moczowych (VINCENT 2003). Zebrane dane z OIT polskich szpitali także wymieniają *P. aeruginosa* jako jeden z pięciu najważniejszych czynników etiologicznych SSTI, RTI, BSI oraz UTI (Deptuła i Hryniewicz, dane niepublikowane). Śmiertelność wśród pacjentów zakażonych *P. aeruginosa* jest wysoka i sięga ogólnie około 20% przypadków, przy czym w wyniku respiratorowego zapalenia płuc jest wyższa (ponad 30%), w zakażeniu krwi zaś wynosi blisko 50% (LAUTENBACH i współaut. 2010, CENICEROS i współaut. 2016). *Pseudomonas aeruginosa* jest częstym czynnikiem RTI towarzyszących późnym stadiom przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP), a co więcej, odpowiada on też za 70% występujących RTI u pacjentów chorujących na mukowiscydozę (SORDE i współaut. 2011). Biorąc pod uwagę zagrożenia jakie stanowi *P. aeruginosa*, kluczowe okazują się mechanizmy, które je warunkują: wielki i plastyczny genom, pokaźna liczba czynników wirulencji, szeroka naturalna antybiotykooporność, rozbudowana sieć regulatorowa i łatwość pozyskiwania oporności nabytej.

CECHY OGÓLNE GENOMU

Rozmiar genomu *P. aeruginosa* waha się między 5,5 a 7 milionami par zasad (Mpz), co czyni go jednym z największych wśród bakterii (KLOCKGETHER i współaut. 2011). Co ciekawe, nie posiada on wielu powtórzeń poszczególnych genów, a ich liczne rozbudowane rodziny o zaznaczonej odrębności. Fakt ten może tłumaczyć silne zróżnicowanie genetyczne i funkcjonalne tego patogenu (D'AGATA 2015). Duży rozrzut (~1,5 Mpz) w podawanej wielkości genomu wynika z cech

tw. genomu dodatkowego (ang. accessory genome), którego rozmiar może się znacząco różnić (6,9–18,0% całości). W jego skład wchodzić mogą plazmidy oraz sekwencje znajdujące się w obrębie chromosomu, np. ICE (ang. integrative and conjugative elements; głównie z grupy pKLC102/PAGI-2), sekwencje insercyjne, transpozony (najczęściej z rodziny Tn3), integrony czy profagi, nabyte na drodze HGT. Poszczególne elementy dodatkowe mogą być obecne w pojedynczych szczepach lub też charakteryzować linie filogenetyczne, kłady lub grupy klonalne *P. aeruginosa*, determinując tym samym duże zróżnicowanie wewnątrz- i międzypopulacyjne. Zawarta w genomie dodatkowym informacja genetyczna warunkuje tolerancję lub oporność na liczne antybiotyki i metale ciężkie, koduje dodatkowe czynniki wirulencji (np. egzotoksyny ExoS oraz ExoU) i zawiera elementy regulatorowe (KUNG i współaut. 2010). Ciekawe cechy wnoszą niektóre profagi, których DNA włączany jest w genom *P. aeruginosa*. Przykładowo, fag ϕ CTX jest w stanie podnieść zjadliwość bakterii dzięki genowi *ctx*, kodującemu toksynę typu PFT (ang. pore-forming toxin), zdolną przerwać ciągłość błony atakowanej komórki. W efekcie infekcji innym fagiem, D3 z rodziny Siphoviridae, dochodzi do modyfikacji w strukturze LPS (lipopolisacharyd; endotoksyna). Zjawisko to, określane jako serokonwersja, przyczyniać się może do efektywniejszej adhezji bakterii do powierzchni komórek gospodarza. Co więcej, infekcja *P. aeruginosa* fagiem FIZ15, podobnym do D3, warunkuje większą odporność patogenu na fagocytozę (CEYSSENS i LAVIGNE, 2010, KUNG i współaut. 2010).

Warto pamiętać, że schemat lokalizacji opisywanych elementów w obrębie genomu dodatkowego nie jest dziełem przypadku. Miejsca o zwiększonej podatności na modyfikacje genetyczne, nazywane regionami plastyczności genomu (ang. region of genome plasticity, RGP), znajdują się najczęściej na końcach 3' genów tRNA. Regiony te mogą być zarówno punktami insercji tzw. wysp genomowych lub profagów, jak i ich późniejszych modyfikacji (MATHEE i współaut. 2008). Do tej pory poznano ponad 80 RGP w obrębie kilku genomów *P. aeruginosa* (KLOCKGETHER i współaut. 2011). Do tej pory funkcje biologiczne przypisano stosunkowo niewielkiej części genów obserwowanych w genomie dodatkowym; udało się to zaledwie w przypadku ok. 30% tych genów (w porównaniu z ponad 60% genów genomu podstawowego), podczas gdy pozostała część jest słabo lub w ogóle niescharakteryzowana (OZER i współaut. 2014). W przeciwieństwie do genomu dodatkowego, zmienność

sekwencji genomu podstawowego (ang. core genome) jest niewielka i wynosi około 0,5-0,7%. W efekcie częstych rearanżacji genetycznych w obrębie pangenu, genom podstawowy jest opisywany jako mozaikowy (KLOCKGETHER i współaut. 2011, BEZUIDT i współaut. 2013).

CZYNNIKI WIRULENCJI – ROLA W PATOGENEZIE, REGULACJA WYTWARZANIA

Gama wytwarzanych przez *P. aeruginosa* czynników wirulencji jest niepospolicie szeroka i są one kodowane zarówno przez genom podstawowy, jak i dodatkowy, często w obrębie tzw. wysp genomowych lub wysp patogenności (ang. *P. aeruginosa* genomic island, PAGI; *P. aeruginosa* pathogenicity island, PAPI). Ze względu na ich lokalizację dzieli się je na związane z komórką, tj. LPS, pile czy rzeska, oraz na wydzielane pozakomórkowo, w tym: piocyjanina i inne barwniki, polisacharydy zewnątrzkomórkowe czy różnorodne enzymy i toksyny, wydzielane przez specyficzne systemy sekrecyjne. Umożliwiają one inwazję organizmu gospodarza przez *P. aeruginosa*, wywołanie ostrego zakażenia oraz jego przejście w stan przewlekły, w co zaangażowane są lub czemu towarzyszą takie aktywności, właściwości, procesy i zjawiska, jak ruchliwość, adhezja, cytotoksyczność, niszczenie tkanek, stan zapalny, chelatacja jonów żelaza, unikanie odpowiedzi immunologicznej czy tworzenie biofilmu (SCHUREK i współaut. 2012). Pomimo że mechanizmy działania większości czynników (lub efektorów) zjadliwości *P. aeruginosa* już poznano w szczegółach, to trzeba mieć na uwadze fakt, iż zostały one zidentyfikowane głównie podczas badań na zwierzętach lub liniach komórkowych. Ich dokładna rola w patogenie u ludzi często nie jest do końca ustalona (D'AGATA 2015).

Wśród dobrze poznanych czynników wirulencji *P. aeruginosa* są cytotoksyny (egzotoksyny), do których należą, m. in. (i) ExoA, odpowiedzialna za miejscowe uszkodzenie tkanek oraz udział w hamowaniu syntezy białek w komórkach gospodarza; (ii) ExoS i ExoT, których działanie polega na spowalnianiu procesu fagocytozy, (iii) ExoU, która wywołuje efekt cytotoksyczny względem komórek nabłonkowych i makrofagów oraz (iv) ExoY uczestnicząca w reorganizacji cytoszkieletu komórki eukariotycznej (ALHAZMI 2015). Oprócz egzotoksyn, *P. aeruginosa* wytwarza zewnątrzkomórkowe proteazy, takie jak alkaliczna proteaza, czy proteazy LasA i LasB, które podobnie jak niektóre egzotoksyny uszkodzają komórki i tkanki organizmu gospodarza (ALHAZMI 2015). Szczegółne

znaczenie ma elastaza, która rozkłada białka strukturalne, jak lamininy i kolageny, bierze udział w degradacji połączeń między komórkami nabłonkowymi oraz inaktywuje ludzki inhibitor proteinaz α -1 i immunoglobuliny IgG oraz IgA (GALLOWAY 1991). Egzotoksyny i proteazy należą do grupy efektorów procesu patogeny *P. aeruginosa*. Warto jednak pamiętać, że w obrębie czynników wirulencji klasyfikuje się także systemy sekrecyjne, odpowiedzialne za wydzielanie określonych białek efektorowych, w tym także bezpośrednio do wnętrza komórek eukariotycznych lub do przestrzeni międzykomórkowych. Należy tutaj wymienić układy sekrecyjne, takie jak T1SS, T2SS, T3SS, czy T6SS (ang. type... secretion system, TSS). Wydzielają one wymienione wyżej egzotoksyny i proteazy, np. T1SS alkaliczną proteazę, T2SS egzotoksynę ExoA i elastazę, a T3SS egzotoksyny ExoS, T, U i Y (ALHAZMI 2015). Ciekawą rolę w procesie patogeny pełni ostatni z wymienionych systemów sekrecji, T6SS. Nie uczestniczy on (w przeciwieństwie do pozostałych TSS) w kontakcie z komórkami eukariotycznymi, ale z innymi komórkami bakteryjnymi. Transportowane przez T6SS do ich wnętrza różne białka efektorowe (fosfolipazy, amidazy, muramidazy, nukleazy) powodują uszkodzenie, a w konsekwencji obumieranie innych komórek bakteryjnych. Jak się okazuje, usprawnia to proces kolonizacji tkanek przez patogen ze względu na osłabianą w ten sposób naturalną florę bakteryjną gospodarza (RUSSELL i współaut. 2014). Na uwagę zasługują również czynniki wirulencji związane z komórką *P. aeruginosa*, tj. pile typu IV (PT4) i lipopolisacharyd (LPS). Pile typu IV biorą udział w adhezji do komórek gospodarza, a także odpowiadają za proces wyboru atakowanej tkanki przez bakterię (tropizm tkankowy) (JAGUSZTYN-KRYNICKA 2012, ALHAZMI 2015). Z kolei LPS uczestniczy w wywoływaniu wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej oraz stanowi czynnik etiologiczny stanów zapalnych (ALHAZMI 2015). W posiadanym przez *P. aeruginosa* arsenale znajduje się również kilka barwników, w tym piowerdyna i piocyjanina. Piowerdyna jest sideroforem, który bierze udział w chelatacji jonów żelaza (WOLSKA i współaut. 2010). Z kolei piocyjanina, nadająca charakterystyczny zielono-niebieski kolor koloniom *P. aeruginosa*, wywołuje produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) w komórce gospodarza. Duże stężenie RFT w komórce może wywołać apoptozę niektórych typów komórek układu odpornościowego, np. neutrofilów, co skutkuje hamowaniem odpowiedzi immunologicznej (WOLSKA i współaut. 2010). Nie bez znaczenia w procesie patogeny pozostaje wydzielany zewnątrzkomórkowo polisacharyd alginian. Stano-

wi on jeden z głównych składników struktury biofilmów. Pełni bardzo istotną rolę w adhezji do komórek gospodarza. Dzięki jego obfitemu wydzielaniu do przestrzeni międzykomórkowej *P. aeruginosa* podwyższa odporność na fagocytozę i zwiększa oporność na antybiotyki; zjawisko to jest szczególnie charakterystyczne dla szczepów izolowanych od pacjentów z mukowiscydozą (SCHUREK i współaut. 2012, ALHAZMI 2015).

Zagadnieniem równie interesującym, jak same czynniki wirulencji, jest regulacja ich wytwarzania. Produkcja wielu determinant zjadliwości przez *P. aeruginosa* zależna jest od mechanizmu „wyczuwania obecności” (ang. quorum sensing, QS), pełniącego rolę nadrzędną w kontroli ekspresji wielu genów. Wyczuwanie obecności innych bakterii odbywa się za pomocą wydzielanych do środowiska tzw. autoinduktorów (typu AHL lub AQ). Zależnie od ich stężenia w otoczeniu, komórka bakteryjna niejako monitoruje liczebność populacji. Jeżeli dojdzie do zmiany ilości AHL/AQ wskutek działania określonego czynnika środowiskowego, bakteria poprzez wyrażanie konkretnych genów dostosowuje się do zmieniających warunków (JAGUSZTYN-KRYNICKA 2012). QS jest kluczowe w procesie patogenezy *P. aeruginosa*, reguluje bowiem ekspresję zewnątrzkomórkowych proteaz, pomp wyrzutowych (ang. efflux), chelatorów jonów, a ponadto wpływa na ruchliwość i unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Ze względu na rolę jaką QS pełni u wielu bakterii patogennych, oprócz *P. aeruginosa*, także m.in. *S. aureus*, *S. enterica* czy *E. coli*, proces ten może stanowić atrakcyjny cel dla potencjalnych, nowych leków przeciwbakteryjnych (BALASUBRAMANIAN i współaut. 2013). W regulację ekspresji genów wirulencji *P. aeruginosa* zaangażowane są również inne mechanizmy, tworzące tzw. systemy dwuskładnikowe (ang. two-component system, TCS). W klasycznym wariantcie, pierwszym składnikiem takiego systemu jest związana z błoną komórkową kinaza histydynowa (ang. histidine kinase, HK), która odbiera określony sygnał ze środowiska zewnętrznego, drugim zaś regulator odpowiedzi (ang. response regulator, RR), zlokalizowany w cytoplazmie. Odebranie sygnału przez HK implikuje fosforylację RR, co z kolei powoduje zmianę jego konformacji i wiązanie się z odpowiednim regionem DNA (wówczas działa jako regulator procesu transkrypcji, zapobiegając lub umożliwiając przyłączenie się polimerazie RNA do DNA) lub konkretnym białkiem. Umożliwia to regulację ekspresji wybranych genów, a także zmianę aktywności enzymatycznej części białek, również tych współodpowiedzialnych za zjadliwość bakterii czy antybiotyko-

oporność (GOODERHAMAND i HANCOCK 2009). Jak już wspomniano, sieć regulatorowa *P. aeruginosa* jest bardzo rozbudowana; kodowana jest przez ok. 8% wszystkich genów. Dobrze obrazuje to też liczba TCS. Szczep laboratoryjny *P. aeruginosa* PAO1 może ich mieć nawet 127, podczas gdy *B. subtilis* ok. 70, a *E. coli* ok. 60. Ogółem *P. aeruginosa* posiada ponad 400 czynników transkrypcyjnych, 24 podjednostki σ polimerazy RNA i 34 sRNA (ang. small RNA; cząsteczki RNA o funkcjach regulatorowych), których dokładna rola wciąż wymaga analizy doświadczalnej. Wszystkie te elementy tworzą niezwykle gęstą i zawiłą sieć powiązań funkcjonalnych (BALASUBRAMANIAN i współaut. 2013).

Omawiając tematykę wirulencji *P. aeruginosa*, trudno nie wspomnieć o wybitnej zdolności tego drobnoustroju do tworzenia biofilmu. Strukturę tę definiuje się jako osiadłe zbiorowisko komórek trwale związane z podłożem, otoczone matriks zewnątrzkomórkową (MARKIEWICZ 2012). Biofilmy ograniczają dostęp cząsteczek antybiotyków do komórek bakterii, przez co mogą być one nawet 1000 razy bardziej odporne na działanie antybiotyków niż formy planktonowe (SCHUREK i współaut. 2012). Ponadto, biofilm chroni je też przed działaniem dezynfektantów i odpowiedzią immunologiczną. Proces tworzenia biofilmu jest wieloetapowy i skomplikowany pod względem regulacji i uczestniczą w nim liczne efekторы zjadliwości, włączając w to egzopolisacharydy (Pel, Psl, alginian), piowerdynę, biosurfaktant - ramnolipid, pozakomórkowy DNA (eDNA) czy pile typu IV (PT4), rzęskę, i fimbrie typu Cup (WEI i MA 2013). Podczas formowania biofilmu dochodzi do różnicowania profilu ekspresji różnych genów (SAUER i współaut. 2002), a ponadto, istnieje zależność składu proteomu komórek znajdujących się w obrębie biofilmu od rodzaju podłoża, na którym on powstaje (MARKIEWICZ 2012). Obecność biofilmów jest szczególnie niebezpieczna na powierzchni przyrządów medycznych, takich jak cewniki, rurki intubacyjne i tracheostomijne, wenflony, rozruszniki lub endoprotezy. *P. aeruginosa* jest w stanie rosnąć w formie biofilmu również bezpośrednio na powierzchni ran oparzeniowych i uważa się, że właśnie *P. aeruginosa* tworzący biofilm jest odpowiedzialny za zakażenia u pacjentów z mukowiscydozą. Biofilm jest więc jedną z cech zakażenia przewlekłego (SCHUREK i współaut. 2012).

OPORNOŚĆ NATURALNA I MUTACYJNA

Palczki *P. aeruginosa* są naturalnie odporne na wiele zróżnicowanych strukturalnie antybiotyków. Dotyczy to części

β -laktamów (benzylpenicyliny, penicyliny izoksazolilowe, aminopenicyliny i ich połączenia z inhibitorami β -laktamaz, cefalosporyny I i II generacji), tetracyklin i tygecykliny, chloramfenikolu oraz trimetoprimu. Co więcej, w porównaniu z przedstawicielami rodziny Enterobacteriaceae, dzikie (ang. wild-type) szczepy *P. aeruginosa* odznaczają się mniejszą wrażliwością na antybiotyki, które są wobec nich aktywne. Zjawisko określa się mianem oporności naturalnej lub własnej (ang. intrinsic resistance) *P. aeruginosa*. Wynika ono ze stosunkowo niskiej przepuszczalności błony zewnętrznej (ponad dwunastokrotnie mniejszej niż u *E. coli*), konstytutywnej ekspresji licznych pomp typu *efflux* i obecności chromosomowo kodowanych enzymów inaktywujących leki (STRATEVA i YORDANOV 2009, LISTER i współaut. 2009). W leczeniu zakażeń *P. aeruginosa* najczęściej stosuje się karboksypenicyliny (np. tikarcyлина) i ureidopenicyliny (np. piperacylina) oraz ich połączenia z inhibitorami β -laktamaz, niektóre cefalosporyny III i IV generacji (np. ceftazydym, cefepim), aztreonam, karbapenemy (np. imipenem, meropenem), a także fluorochinolony (ciprofloksacyna, lewofloksacyna), aminoglikozydy (amikacyna, gentamicyna, tobramycyna) oraz polimyksyny (np. kolistyna) (STRATEVA i YORDANOV 2009).

Jak wspomniano wyżej, w chromosomie *P. aeruginosa* kodowanych jest kilka enzymów zdolnych inaktywować antybiotyki. Najistotniejszym klinicznie jest β -laktamaza klasy C, tzw. cefalosporynaza AmpC, mająca odpowiedniki m. in. u różnych przedstawicieli Enterobacteriaceae (BREIDENSTEIN i współaut. 2011). Podobieństwa zasadzają się w strukturze i właściwościach tych enzymów oraz regulacji ich ekspresji. Spektrum substratowe AmpC obejmuje zdecydowaną większość β -laktamów, w tym wszystkie penicyliny, niemal wszystkie cefalosporyny i monobaktamy (aztreonam), a więc liczne antybiotyki stosowane w terapii zakażeń *P. aeruginosa*. Jedynie cefalosporyny IV generacji (np. cefepim) i karbapenemy (z wyjątkiem ertapenemu) praktycznie nie są rozkładane przez AmpC. Ponadto, enzymy te są w nikłym stopniu hamowane przez inhibitory β -laktamaz (zwłaszcza kwas klawulanowy). Dzikie szczepy *P. aeruginosa* wytwarzają AmpC w sposób kontrolowany, tzn. wyłącznie w obecności związku zdolnego indukować ekspresję genu *ampC*, kodującego enzym. Ilości AmpC, powstające w czasie indukcji są bardzo duże, przy czym jest to zjawisko odwracalne i poza stanem indukcji ekspresja cefalosporynazy zachodzi na bardzo niskim, śladowym poziomie. Z punktu widzenia fenotypu lekooporności, krytyczną kwestią pozostaje, które β -laktamy są dobry-

mi induktorami AmpC i jak się ma ta aktywność w stosunku do ich podatności na hydrolizę enzymatyczną. Większość znanych induktorów stanowią związki będące jednocześnie doskonałymi lub dobrymi substratami AmpC, czyli aminopenicyliny (np. ampicylina), cefalosporyny I generacji (np. cefalotylna) i cefalosporyny II generacji (np. cefoksytyna i cefuroksym). Przez to *P. aeruginosa* wykazuje naturalną oporność na te antybiotyki i jednocześnie ich połączenia z inhibitorami β -laktamaz (np. amoksycylinę z klawulanianem). Pozostałe β -laktamy, aktywne wobec *P. aeruginosa*, różnią się między sobą „zachowaniem” wobec cefalosporynazy AmpC i jej systemu regulacyjnego: karboksy- i ureidopenicyliny, cefalosporyny III generacji i aztreonam są substratami, ale już nie induktorami jej ekspresji, cefalosporyny IV generacji nie są ani induktorami, ani substratami, natomiast karbapenemy są induktorami, ale nie substratami (z wyjątkiem ertapenemu). W związku z tym, naturalna aktywność każdej z tych grup leków wobec *P. aeruginosa* wynika niejako z innych przyczyn (LISTER i współaut. 2009, BREIDENSTEIN i współaut. 2011). Do zaniku regulacji i konstytutywnego wytwarzania ponadnormalnych ilości AmpC dojść może wskutek mutacji w obrębie genów, których produkty uczestniczą w systemie regulacji ekspresji tej cefalosporynazy (geny *ampR*, *ampD*) (LISTER i współaut. 2009). Zjawisko to określa się mianem „derepresji” i w odróżnieniu od pałeczek Enterobacteriaceae, u *P. aeruginosa* może ono zachodzić trzystopniowo, z dwoma pierwszymi stadiami, przy których podstawowy poziom ekspresji AmpC jest coraz bardziej podwyższony w stosunku do układu dzikiego, ale który nadal jest indukowalny do poziomu maksymalnego (derepresja częściowa). Dopiero ostatnie stadium oznacza w pełni konstytutywną ekspresję, na poziomie wyższym nawet niż w stanie indukcji (derepresja całkowita) (CAMPBELL i współaut. 1997). Zjawisko to zostało wyjaśnione obecnością w genomie *P. aeruginosa* trzech genów *ampD*, kodujących amidazę związaną z metabolizmem peptydoglikanu, której mutacyjna utrata jest najczęstszą przyczyną derepresji AmpC (JUAN i współaut. 2006). W stanie całkowitej derepresji w pełni ujawnia się fenotypowo omówione wyżej spektrum substratowe AmpC, będące jednym z najszerszych wśród β -laktamaz, a wytwarzana w tak dużej ilości cefalosporynaza jest w stanie nadać szczepowi wysoką oporność nawet na antybiotyków stanowiący dla niej niedoskonały substrat (np. ceftazydym lub aztreonam). Co więcej, w sytuacji derepresji AmpC i jednoczesnego obniżenia przepuszczalności błony zewnętrznej, oporność ta

może dotyczyć nawet tych związków, które praktycznie nie są zaliczane do substratów AmpC (cefepim, imipenem, meropenem) i szczep może się okazać oporny na wszystkie leki β -laktamowe. Derepresja AmpC jest często spotykanym mechanizmem oporności wśród izolatów klinicznych *P. aeruginosa* (ok. 20%) (OLIVER i współaut. 2015). Wartym uwagi jest też fakt identyfikacji najpierw u *E. coli*, a potem u *P. aeruginosa*, wariantów AmpC o rozszerzonym spektrum substratowym (ang. extended-spectrum AmpC, ESAC). Enzymy te, zawierające substytucje aminokwasową w określonej pozycji (T105A), posiadają podwyższoną zdolność hydrolizy cefalosporyn (ceftazydymu, cefepimu) oraz karbapenemów (imipenemu, meropenemu) i powodują obniżenie wrażliwości na te leki, zwłaszcza w stanie całkowitej derepresji. Stanowią też doskonale tło do dalszego rozwoju oporności, w miarę nabywania innych mechanizmów (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ i współaut. 2009). W ostatnim czasie opisano inne warianty sekwencyjne AmpC, których ekspresja obniża wrażliwość na najnowszą cefalosporynę skierowaną przeciw *P. aeruginosa*, zaliczany do tzw. V generacji ceftolozan (BERRAZEG i współaut. 2015). Do tej pory jednak, szczepom wytwarzającym ESAC nie przypisuje się istotnej roli epidemiologicznej i klinicznej.

AmpC nie jest jedynym chromosomalnie kodowanym, naturalnym enzymem *P. aeruginosa* zdolnym do hydrolizy β -laktamów, bowiem geny dwóch innych, PoxB (OXA-50) oraz PIB-1, zidentyfikowano w obrębie sekwencji genomowych tego gatunku. Żaden z nich zdaje się nie pełnić istotnej roli w oporności *P. aeruginosa* na antybiotyki. PIB-1 jest cynko-zależnym enzymem, którego nie da się zakwalifikować do żadnej z czterech znanych obecnie klas strukturalnych β -laktamaz. Wykazano że, PIB-1 posiada aktywność względem imipenemu, a delecja jego genu podwyższa wrażliwość badanego szczepu *P. aeruginosa* na karbapenemy (imipenem i meropenem) (FAJARDO i współaut. 2014). Druga z wymienionych β -laktamaz, PoxB, jest produkowana na bardzo niskim poziomie, prawdopodobnie nie warunkując oporności na żaden β -laktam. Jak inne enzymy klasy D (oksacylinazy), hydrolizuje penicyliny, a niektóre doświadczenia zasugerowały też jej niewielką aktywność w stosunku do karbapenemów; niemniej, pełna specyficzność substratowa PoxB (OXA-50) pozostaje niecałkowicie sprecyzowana (ZINCKE i współaut. 2016).

Wraz z transportem aminokwasów, peptydów lub cukrów do komórki bakterii Gram-ujemnej mogą wnikać antybiotyki, np. fluorochinolony czy β -laktamy. Utrata, zmia-

na struktury lub obniżenie ekspresji konkretnego kanału porynowego (poryny), przez który dany lek dostaje się do wnętrza komórki jest przewidywalnym mechanizmem oporności. Nie inaczej jest w przypadku poryny OprD *P. aeruginosa*, przez którą transportowane są karbapenemy. Brak funkcjonalnych kanałów OprD lub ich zredukowana liczba nadaje oporność lub obniżoną wrażliwość na imipenem i w mniejszym stopniu meropenem. Zmniejszona ekspresja lub utrata w wyniku mutacji kanałów OprD była pierwszym rozpoznanym mechanizmem oporności na karbapenemy. Co więcej, to właśnie tego rodzaju mechanizmy selekcjonowane są najczęściej podczas leczenia tą klasą β -laktamów. Warto pamiętać, że mechanizmy związane z OprD samodzielnie nadają oporność na niskim poziomie i dopiero kombinacja z innymi wyraża się w oporności wysokiego stopnia i jednocześnie szeroko spektralnej (LI i współaut. 2012). O ile utrata OprD wskutek mutacji typu *non-sense* w genie *oprD*, jego delecji lub dysrupcji przez element transpozycyjny jest kwestią wyjaśnioną, o tyle konsekwencje licznych innych polimorfizmów w jego strukturze już nie i wymagają one szczegółowych badań. Podobnie jest z regulacją ekspresji OprD. Wiadomo na przykład, że nadprodukcja systemu pompowo-porynowego MexEF-OprN powoduje jednocześnie obniżenie lub zatrzymanie ekspresji genu *oprD*. Odpowiedzialne są za to, pośrednio lub bezpośrednio, czynniki regulatorowe: MexT, MexS oraz MvaT, jednak ich wzajemne oddziaływanie z MexEF-OprN i OprD jest niejasne, doświadczenia zaś z mutantami w poszczególnych genach nie dostarczyły jednoznacznych odpowiedzi (LISTER i współaut. 2009).

Redukcja stężenia antybiotyku w komórce może być także zasługą aktywności transbłonowych pomp, które aktywnie wyrzucają lek z wnętrza bakterii. Pompy typu *efflux* podzielono na pięć kategorii, różniących się strukturą, rodzajem zużywanej energii do transportu i typem przenoszonych substratów. Dane pochodzące z sekwencjonowania genomowego *P. aeruginosa* wykazują, że najbardziej rozpowszechnioną grupą są transportery (systemy pompowo-porynowe) RND (ang. resistance, nodulation, division), obejmująca 12 systemów, z których co najmniej cztery uczestniczą w antybiotykooporności (LISTER i współaut. 2009). Wszystkie one posiadają szerokie spektrum substratowe, stanowiące m. in. źródło naturalnej oporności *P. aeruginosa* na tetracykliny, trimetoprim, chloramfenikol, nowobiocynę, czy sulfonamidy. Spektrum to obejmuje jednak też antybiotyki skuteczne wobec *P. aeruginosa*, w tym β -laktamy, aminogli-

kozydy i fluorochinolony. Warto pamiętać, że zakresy usuwanych przez poszczególne pompy substratów zachodzą na siebie. Najistotniejszy system, MexAB-OprM, jest aktywny zarówno wobec różnorodnych antybiotyków β -laktamowych (w tym meropenemu i inhibitorów β -laktamaz), fluorochinolonów, a także dezynfektantów i detergentów. Pompa ta w dużej mierze przyczynia się do całokształtu fenotypu oporności własnej *P. aeruginosa*. Pozostałe transportery leków: MexCD-OprJ, MexEF-OprN i MexXY-OprM, oprócz wyrzucania fluorochinolonów mogą też usuwać cefepim (MexCD-OprJ) lub aminoglikozydy (MexXY-OprM) (LISTER i współaut. 2009, POOLE 2011). Wskutek mutacji (delecje, insercje) zachodzących w obrębie genów regulujących ekspresję wymienionych pomp RND, ich aktywność może zostać znacząco zwiększona. Tak dzieje się w przypadku np. mutantów delecyjnych Δ nalB, Δ nalC i Δ nalD, u których stwierdzono nadekspresję MexAB-OprM. Ten profil oporności mutacyjnej, obejmujący obniżoną wrażliwość na różne β -laktamy, w tym meropenem, oraz fluorochinolony, występuje najczęściej, bo u 10-30% szczepów klinicznych *P. aeruginosa*. Stosunkowo często identyfikuje się też podwyższenie ekspresji pompy MexXY-OprM, wynikające z mutacyjnej inaktywacji represora MexZ i warunkujące tzw. nieenzymatyczną oporność na aminoglikozydy. Obecność szczepów *P. aeruginosa* nadprodukcujących MexXY-OprM jest charakterystyczna u pacjentów z mukowiscydozą (LISTER i współaut. 2009). Dużo mniejszy udział w oporności typu *efflux* u *P. aeruginosa* ma nadekspresja pozostałych pomp: MexCD-OprJ (mutanty Δ nfxB; niewrażliwość na cefepim i fluorochinolony) i MexEF-OprN (Δ mexT; niewrażliwość na fluorochinolony) (POOLE 2011). Warto nadmienić, że poziomy nabytej oporności, wynikającej z mutacyjnego podwyższenia aktywności pomp RND są stosunkowo niskie i z reguły nie pozwalają zakwalifikować szczepu jako opornego w sensie klinicznym. Jednak różne mutacje regulatorowe ulegają akumulacji i często towarzyszą innym mechanizmom oporności, takim jak utrata OprD, derepresja AmpC lub wytwarzanie enzymów kodowanych przez geny nabyte z zewnątrz. Wówczas w istotny sposób „dokładają” się one do ewidentnej oporności szczepu na różnorodne leki przeciwbakteryjne.

OPORNOŚĆ KODOWANA PRZEZ GENY NABYTE

Same już naturalne mechanizmy wraz z towarzyszącymi im mutacjami czynią *P. aeruginosa* trudnym do zwalczania patogenem i

w przeważającej mierze to one decydują o zjawisku jego wielooporności. Jednakże, jak wspomniano wcześniej, tak kodowana oporność stanowi też doskonale tło dla nabywanych z zewnątrz, kolejnych mechanizmów; „współpraca” obu tych źródeł poszerza profile i wydatnie podwyższa poziomy oporności. Za nabywanie nowych cech, głównie w postaci enzymów inaktywujących aminoglikozydy i β -laktamy odpowiedzialny jest HGT (FROST i współaut. 2005), zachodzący przede wszystkim za pomocą plazmidów. Wskazują na to liczne obserwacje obecności u *P. aeruginosa* różnych determinant oporności na plazmidach (POIREL i współaut. 2000, 2001; AUBERT i współaut. 2001; GIRLICH i współaut. 2002; FIETT i współaut. 2006; GARZA-RAMOS i współaut. 2008), przy czym bardzo częstym zjawiskiem jest również ich lokalizacja chromosomalna (NORDMANN i współaut. 1993, PHILIPPON i współaut. 1997, DUBOIS i współaut. 2002, GIRLICH i współaut. 2002, FIETT i współaut. 2006, JOVČIĆ i współaut. 2013), do której zapewne dochodzi w drodze rekombinacji, transpozycji lub integracji plazmidów (CHIU i THOMAS 2004). Niestety, sam proces transferu, jak i zaangażowane weń elementy genetyczne u *Pseudomonas* spp. nie są tak dobrze poznane jak u *Enterobacteriaceae*. Ten niejasny aspekt genetyki *P. aeruginosa* ulega jednak stopniowemu wyjaśnianiu w związku z rozwojem technik sekwencjonowania genomowego i zwiększaniem się liczby znanych sekwencji chromosomowych i plazmidowych tego gatunku (BORONIN 1992, HAINES i współaut. 2007, SEVASTSYANOVICH i współaut. 2008, BONNIN i współaut. 2013, XIONG i współaut. 2013, MARCHIARO i współaut. 2014, VILACOBIA i współaut. 2014).

Tak nabytą oporność *P. aeruginosa* na β -laktamy warunkują β -laktamazy. Już pod koniec lat 60. ubiegłego wieku zaczęto identyfikować te enzymy i przypisywać im rolę w procesie szerzącej się oporności na stosowane ówczesnie penicyliny oraz cefalosporyny (LIVERMORE 1998). Należy tutaj wymienić takie β -laktamazy jak np.: PSE-1/CARB-2, PSE-4/CARB-1, CARB-3 czy CARB-4 (ang. *Pseudomonas*-specific enzyme lub carbencillinase; cyfra określa wariant enzymu), początkowo uznawane za typowe dla *P. aeruginosa*, które rozkładają karboksypenicyliny i ureidopenicyliny (BUSH i współaut. 1995). Enzymy te, obecnie określane jako karbenicylinazy, należą do klasy A β -laktamaz i wrażliwe są na działanie inhibitorów, np. kwas klawulanowy lub tazobaktam (BUSH i JACOBY 2010). Ponadto, już we wczesnej fazie prac identyfikowano też u *P. aeruginosa* inne nabyte β -laktamazy o aktywności skierowanej głównie przeciw penicylinom. Należą

do nich tzw. β -laktamazy o szerokim spektrum substratowym (ang. broad-spectrum β -lactamases) klasy A TEM-1 i TEM-2, obserwowane przede wszystkim u Enterobacteriaceae, oraz oksacylinazy (ang. oxacillinases) klasy D: OXA-2, OXA-5 lub OXA-10 (BUSH i JACOBY 2010, POIREL i współaut. 2010).

W 1983 r. świat obiegła wiadomość o identyfikacji pierwszego enzymu z nowej grupy, tzw. β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ang. extended-spectrum β -lactamases, ESBL), zidentyfikowanego u Enterobacteriaceae. Należą one do klasy A i stanowią dominujący czynnik oporności na oksymino- β -laktamy (cefalosporyny III i IV generacji, aztreonam) u pałeczek jelitowych (GNIADKOWSKI 2001). Obecnie wyróżnia się 12 rodzin nabytych ESBL, z czego przedstawiciele aż ośmiu typów zdołano już odnaleźć w izolatach klinicznych *P. aeruginosa*. Pierwszym i jak dotąd najpowszechniej występującym u tego gatunku enzymem typu ESBL jest PER-1, opisany pierwszy raz w 1993 r. (NORDMANN i współaut. 1993). Szczepy wytwarzające PER-1 zidentyfikowano początkowo w Turcji, później również stwierdzano ich obecność w szpitalach w Europie, Azji i północnej Afryce. *Pseudomonas aeruginosa* wraz z *Acinetobacter baumannii* pozostają do dziś głównymi producentami PER-1 (POTRON i współaut. 2015). Inną grupą ESBL występującą stosunkowo często u *P. aeruginosa* są enzymy VEB, zidentyfikowane w 1998 r., najpierw w Azji południowo-wschodniej, potem również w Europie (POTRON i współaut. 2015). Kolejnymi ESBL zaobserwowanymi wcześniej u *P. aeruginosa* są β -laktamazy typu GES/IBC, występujące głównie w Europie i Ameryce Łacińskiej, także u Enterobacteriaceae (POTRON i współaut. 2015). Wreszcie, odnalezione w Belgii po raz pierwszy enzymy typu BEL i PME-1 pochodzenia azjatyckiego, jak do tej pory zidentyfikowano niemal wyłącznie u *P. aeruginosa* (POTRON i współaut. 2015). Co ciekawe, inne, dominujące u Enterobacteriaceae rodziny ESBL, tj. CTX-M, SHV i TEM, są rzadkie u *P. aeruginosa*. Geny kodujące ESBL częściej obserwowane u *P. aeruginosa* lokują się w obrębie transpozonów (bla_{PER-1} w Tn1213) lub integronów klasy 1 o różnorodnej strukturze (bla_{GES} , bla_{VEB} , bla_{BEL}). Wymienione elementy genetyczne znajdują się zarówno na plazmidach, jak i w chromosomie, a czasem w obu miejscach jednocześnie (POTRON i współaut. 2015). Inną grupą enzymów zdolnych do rozkładu oksymino- β -laktamów są oksacylinazy (OXA) o rozszerzonym spektrum substratowym klasy D, ES-OXA (ang. extended-spectrum oxacillinases). W odróżnieniu do ESBL, aktywność większości ES-OXA jest słabo hamowana

przez kwas klawulanowy. Co ciekawe, ES-OXA są charakterystyczne niemal wyłącznie dla *P. aeruginosa*, a pierwsze enzymy tego typu, OXA-14 i OXA-15, zidentyfikowano na początku lat 90. (DANEL i współaut. 1995, 1997). W sensie strukturalnym, niemal wszystkie ES-OXA można zaklasyfikować do trzech linii ewolucyjnych, wywodzących się od zwykłych oksacylinaz OXA-1, OXA-2 i OXA-10, i kodowane są one przez kasety integronów klasy 1 (POIREL i współaut. 2010). Uważa się, że u *P. aeruginosa* jest to częściej występujący mechanizm oporności od ESBL, niemniej, brakuje wiarygodnych danych w tym zakresie, pochodzących z większej liczby krajów. Powodem są trudności diagnostyczne; zarówno ESBL, jak i ES-OXA mogą być skutecznie maskowane przez nadprodukowaną cefalosporynazę AmpC. Ponadto, dla ES-OXA nie istnieje żaden specyficzny test fenotypowy i jedyną metodą wiarygodnego wykrycia takiego enzymu jest amplifikacja i zsekwencjonowanie jego genu (LIVERMORE 1998, POTRON i współaut. 2015).

Spośród wszystkich nabytych β -laktamaz, najistotniejszą rolę w zjawisku antybiotykooporności *P. aeruginosa* pełnią metallo- β -laktamazy klasy B (ang. metallo- β -lactamases, MBL). Stanowią one odrębną i odległą od pozostałych gałąź drzewa ewolucyjnego β -laktamaz, charakteryzując się specyficzną strukturą i mechanizmem działania katalitycznego. Jako jedyne β -laktamazy, wymagają one obecności kofaktora w postaci jonów Zn^{2+} . Podobnie jak AmpC, ESBL i ES-OXA, MBL cechuje bardzo szerokie spektrum substratowe, obejmujące wszystkie penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy, a ponadto enzymy te są całkowicie niewrażliwe na dostępne, możliwe do stosowania klinicznego inhibitory. Spośród wszystkich antybiotyków β -laktamowych tylko aztreonam nie jest hydrolizowany przez MBL. Szczególnie niepokojąca jest wysoka aktywność tych β -laktamaz względem karbapenemów, określanych jako leki ostatniej szansy w leczeniu zakażeń wywołanych przez wielooporne szczepy pałeczek Gram-ujemnych (POTRON i współaut. 2015). W badaniach laboratoryjnych wykazano, że mimo tej aktywności, sama ekspresja MBL na typowym poziomie nie warunkuje jeszcze oporności wysokiego stopnia i do tego potrzebne jest „wsparcie” dodatkowych mechanizmów. Ponieważ jednak, jak wspomniano wyżej, u *P. aeruginosa* często dochodzi do różnych mutacji powodujących ograniczenie przepuszczalności osłon komórkowych lub podwyższenie aktywności pomp typu *efflux*, szczepy kliniczne tego gatunku posiadające MBL z reguły są wysoce odporne na stosowane kli-

nicznie karbapenemy (imipenem, meropenem i doripenem). Po raz pierwszy szczepy MPPA (ang. MBL-producing *P. aeruginosa*) zidentyfikowano w 1988 r. w jednym z japońskich szpitali, po czym w ciągu kilku lat zdołały się one rozprzestrzenić, najpierw w Japonii, a następnie w innych krajach Dalekiego Wschodu. Równocześnie następował międzygatunkowy transfer tego typu oporności i np. od 1993 r. obserwowano tam już także pałeczki Enterobacteriaceae wytwarzające MBL. W Europie pierwsze szczepy *P. aeruginosa* MBL(+) izolowano w latach 1996-1997 we Francji i Włoszech, i niemal natychmiast potem w kilkunastu innych krajach (WALSH i współaut. 2005). Do tej pory zidentyfikowano 13 rodzin nabytych MBL, niektóre posiadające nawet po kilkadziesiąt wariantów. Są to enzymy: IMP (n=56), VIM (n=47), NDM (n=16), SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, DIM, TMB, SMB, FIM, LMB. U *P. aeruginosa* stwierdzono obecność większości z nich, a niektóre występują wyłącznie u tego gatunku jak do tej pory. Najstarszymi, najbardziej wewnętrznie zróżnicowanymi i najczęściej identyfikowanymi typami MBL są enzymy VIM i IMP. Ich producentów obserwuje się na całym świecie, przy czym IMP są bardziej rozprzestrzenione i typowe dla Azji, podczas gdy VIM dominują na pozostałych kontynentach, w tym w Europie (POTRON i współaut. 2015). Pomimo skutecznej „penetracji” populacji pałeczek Enterobacteriaceae przez determinanty genetyczne IMP i VIM, *P. aeruginosa* pozostaje najważniejszym ich producentem, co ostatnio ponownie wykazały badania typu *surveillance*, wykonane na dużej próbie szpitalnych szczepów bakterii Gram-ujemnych z 40 krajów. Okazało się, że *P. aeruginosa* stanowił 68% wszystkich poddanych analizie szczepów MBL(+) (głównie z enzymami IMP i VIM) (KAZMIERCZAK i współaut. 2015). Szerzące się w szybkim tempie wśród Enterobacteriaceae MBL z rodziny NDM odnotowywane są w szczepach *P. aeruginosa* w niektórych krajach, niemniej na nieporównanie mniejszą skalę niż u pałeczek jelitowych. Ich częstość u *P. aeruginosa* jest jak na razie niewielka, zwłaszcza w porównaniu z IMP i VIM (JOVČIĆ i współaut. 2013, POTRON i współaut. 2015).

Częstość występowania MBL w populacjach szpitalnych *P. aeruginosa* wykazuje wielkie różnice między krajami, od wartości bliskich zera w krajach skandynawskich, do ok. 3% w Hiszpanii i aż ok. 30% w Rosji i Korei. Podobnie waha się udział MBL w całkowitej oporności na karbapenemy u *P. aeruginosa*, z wartościami takimi jak ok. 7% w Hiszpanii i ok. 40% w Rosji i Korei (RIERA i współaut. 2011, EDELSTEIN i współaut. 2013, BAE i współaut. 2014, HONG i

współaut. 2015). Zasadniczo można przyjąć, że MBL należą do najczęstszych nabytych β -laktamaz u *P. aeruginosa*, prawdopodobnie przewyższając pod tym względem ESBL i ES-OXA w różnych krajach. Analiza genetycznego kontekstu występowania genów MBL wykazuje, że w większości rodzin, w tym IMP i VIM, są to integrony, najczęściej klasy 1, o wielkiej różnorodności strukturalnej. Spośród enzymów bardziej typowych dla *P. aeruginosa* wyjątek stanowi gen *bla*_{SPM-1}, zlokalizowany w module transpozycyjnym z sekwencją *ISCR4* i wraz z nim w elemencie typu ICE (FONSECA i współaut. 2015). Podobnie jak w przypadku innych nabytych genów oporności *P. aeruginosa*, geny MBL mogą lokować się w plazmidowym lub chromosomalnym DNA (WALSH i współaut. 2005, POTRON i współaut. 2015). Szczepy MPPA powszechnie uważane są za jedne z najgroźniejszych obecnie patogenów szpitalnych (ang. alert pathogens). Inne nabyte karbapenemazy, takie jak enzymy KPC klasy A (ang. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) i oksacylinazy CHDL klasy D (ang. carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases), które wraz z MBL są obecnie jednymi z najważniejszych mechanizmów oporności bakterii chorobotwórczych, u *P. aeruginosa* występują rzadko lub wręcz sporadycznie i jak dotąd w określonych regionach świata (POTRON i współaut. 2015).

Oprócz β -laktamaz, *P. aeruginosa* bardzo często nabywa geny enzymów modyfikujących inną klasę antybiotyków, aminoglikozydy (ang. aminoglycoside-modifying enzymes, AME). AME tworzą niezwykle zróżnicowaną grupę o różnych mechanizmach działania. Ze względu na sposób inaktywacji aminoglikozydu, enzymy te dzieli się na trzy podgrupy: acetylotransferazy (AAC), nukleotydylotransferazy (ANT) oraz fosfotransferazy (APH). Wśród nich wyróżnia się jeszcze wiele podrodziny, w każdej z nich zaś znaleźć można po kilka odmiennych wariantów. U *P. aeruginosa* najczęściej występują podrodziny AAC(3), AAC(6') oraz ANT(2''), o zróżnicowanej aktywności wobec gentamycyny, tobramycyny i amikacyny (POOLE 2005). Geny AME występują w formie kaset integronowych i bardzo często lokują się wraz z genami określonych β -laktamaz w obrębie tych samych integronów, przez co elementy te są jednym z głównych źródeł zjawiska wielooporności *P. aeruginosa*. Dodatkowym mechanizmem oporności na aminoglikozydy są niedawno odkryte, w tym u *P. aeruginosa*, metylazy 16S rRNA. Z rosnącej ich listy, enzymy ArmA, RmtA, RmtC, RmtD i RmtF zidentyfikowano już u tego gatunku w kilku krajach świata (POTRON i współaut. 2015, RAHMAN i współaut. 2015). Metylazy 16S

rRNA modyfikują cel działania aminoglikozydów, jakim jest podjednostka 30S rybosomu (KOS i współaut. 2015).

Oporność na fluorochinolony, wynikająca z obecności dodatkowych genów, występuje bardzo rzadko u *P. aeruginosa* w porównaniu z Enterobacteriaceae. Do tej pory zidentyfikowano zaledwie kilka przypadków obecności enzymu AAC(6⁷)-Ib-cr, będącego wariantem AME i zdolnego oprócz aminoglikozydów inaktywować również niektóre fluorochinolony (KOS i współaut. 2015). Ponadto, niedawno odkryto u *P. aeruginosa* nowy enzym nadający oporność na te chemioterapeutyki, QnrVC-1. Wykazał on homologie sekwencji z chromosomowo kodowanym genem oporności na fluorochinolony znalezionym u przedstawicieli rodziny Vibrionaceae (BELOTTI i współaut. 2015).

STRUKTURA POPULACJI *P. AERUGINOSA*

Globalna populacja *P. aeruginosa*, w tym szczepy odpowiedzialne za zakażenia w środowisku szpitalnym, określana jest jako zasadniczo nieklonalna, czyli składająca się z wielkiej liczby odrębnych, niespokrewnionych ze sobą bliżej genotypów. Ta duża zmienność genetyczna w obrębie populacji przypisywana jest głównie wysokiej częstotliwości zjawisk rekombinacji u *P. aeruginosa*. Niemniej, zwłaszcza wśród szczepów szpitalnych, można wyróżnić stosunkowo niewielką grupę rozprzestrzeniających się epidemicznie lub wręcz pandemicznie klonów, które stopniowo różnicując się w drodze mutacji tworzą grupy lub kompleksy klonalne blisko spokrewnionych genotypów. Rozwijająca się intensywnie genomika pozwala identyfikować stopniowo markery charakterystyczne dla poszczególnych kładów i są wśród nich zarówno geny pewnych czynników zjadliwości, jak i, przede wszystkim, geny oporności. Zwłaszcza te ostatnie muszą znacznie wpływać na szczególną zdolność adaptacji tych klonów do środowiska szpitalnego. Dane z zakresu epidemiologii molekularnej donoszą o niezwykle wprost stopniu akumulacji oporności nabytej w niewielkiej liczbie klonów *P. aeruginosa*, które obserwowane są na całym lub niemal całym świecie jako czynniki zakażeń szpitalnych. Dotyczy to głównie klonów ST235 i ST111 (ang. sequence type; typ sekwencyjny) oraz ich kompleksów lub grup klonalnych. Posiadają one niezwykle zdolność do gromadzenia oporności, zarówno mutacyjnej, jak i wynikającej z nabywania genów, przez co należące do nich szczepy z reguły wykazują fenotypy MDR, XDR, a nawet PDR. Klon ST235 został najpierw zidentyfikowany w Rosji, na Węgrzech

i w Polsce, gdzie też po raz pierwszy został opisany, i szybko utożsamiony z obserwowanym wcześniej w Europie tzw. wieloopornym serotypem *P. aeruginosa* O11 (EMPEL i współaut. 2007, OLIVER i współaut. 2015). ST235 potrafi dominować wśród szczepów klinicznych o fenotypach MDR-XDR-PDR w skali całego kraju, np. w Japonii (58,5%) (KITAO i współaut. 2012), Chorwacji (40,8%) (GUZVINEC i współaut. 2014) lub Czechach (18%) (NEMEC i współaut. 2010). U przedstawicieli tego typu sekwencyjnego odnaleziono wszystkie znane do tej pory geny nabytej oporności *P. aeruginosa*, obecne w ponad 100 elementach genetycznych, w tym 39 różnych β -laktamaz (OLIVER i współaut. 2015). ST235 jest głównym producentem ESBL PER-1 w skali międzynarodowej (EMPEL i współaut. 2007, LIBISCH i współaut. 2008) oraz MBL z rodzin IMP i VIM, kodowanych przez ponad 50 różnych integronów (OLIVER i współaut. 2015). W latach 2002-2010 w Rosji doszło do niezwykle spektakularnego rozprzestrzenienia się ST235 z enzymem VIM-2 na terenie całego kraju. O ile na początku tego okresu stanowił on ok. 7,5% szczepów opornych na karbapenemy, to pod koniec było to już ok. 38,0%. Warto nadmienić, że Rosja jest jednym z krajów o najwyższej częstotliwości (75,3% w 2010 r.) opornych na karbapenemy *P. aeruginosa* (EDELSTEIN i współaut. 2013). Dane te doskonale ilustrują potencjał epidemiczny ST235; wraz z ST111, przeważającym wśród szczepów MDR-XDR-PDR w innych krajach, są one dzisiaj obiektami zakrojonych na szeroką skalę badań genomicznych, mających na celu pełne zrozumienie źródeł ich globalnego „sukcesu” ekologiczno-epidemiologicznego.

TERAPIA ZAKAŻEŃ *P. AERUGINOSA* – NOWE NADZIEJE

W związku z rosnącą antybiotykoopornością w skali globalnej i cieniem, jaki rzuca to zjawisko na współczesną medycynę zakażeń, mnożą się wysiłki w celu opracowania nowych, skutecznych form zwalczania wieloopornych szczepów bakterii. Pole walki z najtrudniejszymi z punktu widzenia terapeutycznego zakażeniami *P. aeruginosa* typu MDR-XDR-PDR jest duże. Odpowiednio podjęta strategia wdrażania i stosowania nowych terapeutyków i nowatorskie wykorzystanie starszych pozwalają wierzyć, że pojedynk z tym ciężkozbrojnym przeciwnikiem okaże się na pewien czas zwycięski.

Można wyróżnić dwa główne założenia przy tworzeniu nowych leków i terapii przeciwko opornym szczepom *P. aeruginosa*. Pierwszym jest wyszukiwanie nowych antybiotyków, które mogłyby z powodzeniem

zastąpić te, które obecnie okazują się już nieskuteczne. W ostatnich latach kilka nowych leków przeciwbakteryjnych zostało lub niedługo zostanie wprowadzonych na rynek, aktywnych również wobec *P. aeruginosa*. Nowe wynalazki pojawiły się w grupie chinolonów (nemonoksacyna), cefalosporyn (cefzololan, ceftobiprol) oraz karbapenemów (tomopenem). Co więcej, wynaleziono nowe inhibitory β -laktamaz (awibaktam), które mogą zwiększyć skuteczność terapeutyczną dotychczas stosowanych β -laktamów (BASSETTI i współaut. 2011, 2013). Druga koncepcja zakłada opracowywanie związków, których celem są systemy regulacji ekspresji czynników wirulencji (tzw. leki przeciwpatogenne). Ich działanie może powodować obniżenie zjadliwości szczepu, co w konsekwencji może też zadecydować o spadku jego oporności na podawane antybiotyki (ALLEN i współaut. 2014). Dodatkowo, do leczenia wdraża się klasę adiuwantów, związków pomocniczych w terapii (WAGNER i współaut. 2016).

Wśród obiecujących cząsteczek o charakterze przeciwbakteryjnym znajduje się związek CHIR-090 oraz jego pochodne. Są to inhibitory deacetylazy N-acetyloglukozaminy (LpxC), enzymu zaangażowanego w syntezę lipidu A, krytycznego elementu błony zewnętrznej większości Gram-ujemnych bakterii. Testowana aktywność *in vitro* i *in vivo* przy zastosowaniu różnych modeli infekcji u zwierząt wskazuje, że pochodna CHIR-090 o nazwie LpxC-4 wykazuje dobre właściwości antybiotyczne. Osiągnięty wynik może kwalifikować ten inhibitor do badań przedklinicznych (TOMARAS i współaut. 2014). Ze względu na barierę, jaką stanowi mało przepuszczalna błona zewnętrzna *P. aeruginosa*, kluczowym zagadnieniem jest sposób dostarczenia antybiotyku do wnętrza komórki bakteryjnej. Innowacyjnym pomysłem jest zastosowanie strategii „molekularnych koni trojańskich”, jakimi mogą być naturalne lub syntetyczne siderofory. Wydzielane na zewnątrz, wychwytyują jony żelaza obecne w środowisku, wiążą je w kompleksy i wracają do komórki w drodze transportu aktywnego. Tę ostatnią właściwość postanowiono wykorzystać w celu dostarczenia leków przeciwbakteryjnych, tworząc koniugaty siderofor-antybiotyku. Po wejściu do komórki ulegają one dysocjacji, uwalniając lek (MISLIN i SCHALK 2014). Przykładem może być związek monosulfaktamu i meropenemu, znajdujący się w fazie I testów klinicznych. Do dalszej, II fazy badań klinicznych, kwalifikuje się cefalosporyna o właściwościach chelatujących S-649266 (www.clinicaltrials.gov; identyfikator: NCT02321800) (WAGNER i współaut. 2016). Ponadto, wykazano, że S-649266 jest mało podatna na działanie niektórych

β -laktamaz należących do klasy A oraz B (NDM-1, VIM-2, IMP-1, KPC-3) (ITO-HORIYAMA i współaut. 2016). Duże nadzieje wiąże się też ze związkami galu (Ga). Pierwiastek ten jest dobrze znany dzięki zdolności naśladowania żelaza w układach żywych, nie pełniąc jednak tych samych funkcji. Zastępując jon żelaza w strukturze niektórych enzymów, gal jest w stanie zatrzymywać istotne dla komórki reakcje typu redoks, wpływać na konformację białek, a w efekcie na żywotność komórki. Wymienione właściwości galu mogą okazać się szczególnie przydatne dla intensywnie dzielących się, aktywnych metabolicznie komórek, takich jak komórki nowotworowe czy bakteryjne (BERNSTEIN 1998). Rola galu doceniono w leczeniu hiperkalcemii pojawiającej się w trakcie choroby nowotworowej (preparat Ganite®). W testach aktywności przeciwbakteryjnej substancja czynna Ganite®, $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ okazała się wysoce efektywna w stosunku do *P. aeruginosa*, włączając w to szczepy typu mukoidalnego (typowe dla pacjentów z mukowiscydozą) oraz szczepy wielolekooporne. Ponadto, u myszy chorych na mukowiscydozę podawany $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ skutecznie zredukował wywołane zakażeniem uszkodzenia płuc (KANEKO i współaut. 2007). Aktualnie podejmowana jest II faza badań klinicznych preparatu Ganite® u osób chorych na mukowiscydozę, którym towarzyszą przewlekłe zakażenia *P. aeruginosa* (www.clinicaltrials.gov; identyfikator NCT02354859). Niestety, stosowanie galu wzmaga wytwarzanie czynników zjadliwości u *P. aeruginosa*, co może zaostrzyć przebieg zakażenia. Chcąc zachować dobre efekty terapeutyczne należałoby skoniugować je z lekami przeciwpatogennymi (GARCÍA-CONTRERAS i współaut. 2014). W latach 70. ubiegłego wieku stosowano powszechnie w wielu krajach aminoglikozyd arbekacynę, jednakże po 20 latach zaniechano jej używania. Oprócz potwierdzonej aktywności wobec bakterii Gram-dodatnich (np. MRSA) posiada ona także dobrą skuteczność w leczeniu zakażeń bakteriami Gram-ujemnymi, szczególnie *A. baumannii* czy *P. aeruginosa*. Co ważne, arbekacyna jest odporna na działanie wielu klas AME, dzięki czemu może być z powodzeniem stosowana wobec szczepów aminoglikozydoopornych. Analiza aktywności *in vitro* arbekacyny w połączeniu z axtreonamem pokazała, że kombinacja tych dwóch leków jest efektywna wobec szczepów MDR *P. aeruginosa* (MATSUMOTO 2014). Obecnie arbekacyna przechodzi I fazę testów klinicznych (www.clinicaltrials.gov; identyfikator: NCT02459158). Innym rozbudzającym nadzieję lekiem jest antybiotyk POL7080, należący do grupy peptydomimetyków. Lek ten przeszedł już II fazę badań klinicz-

nych (www.clinicaltrials.gov; identyfikator: NCT02096328). Mechanizm jego działania zasada się na modyfikacji procesu składania LPS i mógłby być stosowany szczególnie w leczeniu respiratorowego zapalenia płuc wywołanego przez *P. aeruginosa* (RAMIREZ-ESTRADA i współaut. 2016). Obecnie rozwijany jest projekt, którego celem jest opracowanie szczepionki przeciwko *P. aeruginosa*. Zespół austriacki pod kierownictwem Berndta Jilma niedawno dowiódł, że tworzona szczepionka, IC43 jest bezpieczna, przechodzi I fazę badań klinicznych (WESTRITSCHNIG i współaut. 2014), a obecnie trwają przygotowania do fazy II/III (www.clinicaltrials.gov; identyfikator: NCT01563263). Sukces tych prac umożliwiłby zwalczanie zakażeń przewlekłych, jednocześnie omijając ryzyko rozwijającej się antybiotykooporności u wywołujących je szczepów *P. aeruginosa*.

Lista innych potencjalnych leków, które w przyszłości mogą być stosowane w terapii *P. aeruginosa* MDR jest długa. Czytelnicy zaciekawieni tą materią zapoznać się mogą z pracami przeglądowymi, które ukazały się niedawno (BASSETTI i współaut. 2013, PAGE i BUSH 2014, CHENG i współaut. 2016, TANEJA i KAUR 2016, WAGNER i współaut. 2016). Pomimo, że duża część tych związków nie jest jeszcze wprowadzona do leczenia, nadzieję budzi dynamika, z jaką podejmowane są kolejne próby ich efektywności w terapii. Wydawać się więc może, że zagrożenie, jakie stanowi oporny patogen *P. aeruginosa*, może być już niedługo zażegnane. Niestety, samo wprowadzanie coraz nowszych leków nie wystarczy. Osiągnięcie sukcesu w walce ze szczepami opornymi jest możliwe tylko dzięki ciągle udoskonalanym systemom kontroli zakażeń, racjonalnej antybiotykoterapii, a także dokładnemu monitorowaniu zjawiska lekooporności. Bardzo ważna jest jej społeczna świadomość. Rozumiejąc wagę zagrożenia, jakie niesie ze sobą globalne zjawisko antybiotykkooporności, znając mechanizmy jej rozprzestrzeniania i zapobiegania, a wreszcie racjonalnie stosując nowoczesne leki przeciwbakteryjne nie musimy być skazani na powrót do ery przed-antybiotykowej.

Streszczenie

Występujące powszechnie i narastające zjawisko oporności na antybiotyki wśród bakterii chorobotwórczych jest jednym z największych wyzwań dzisiejszej medycyny zakażeń. Szczególnie zagrożenie stanowią zakażenia szpitalne wywoływane przez wielooporne szczepy określonych gatunków, np. *Pseudomonas aeruginosa*. Jest to patogen oportunistyczny, odznaczający się opornością naturalną na kilka klas stosowanych antybiotyków. Dzięki wysokiej plastyczności genomu, obejmującej różnorodne mutacje funkcjonalne (strukturalne i regulacyjne) oraz pozyskiwanie obcego DNA, jest w stanie szybko adaptować się do niesprzyjających warunków środowiska. Szczególnie niepokoi zdolność nabywania

przez *P. aeruginosa* dodatkowych cech oporności, co w połączeniu z naturalnymi mechanizmami czyni ten patogen wybitnie trudnym do zwalczania. Bakteria ta jest w stanie wywoływać m. in. ostre zapalenie płuc, zakażenia łożyska krwi, skóry i tkanek miękkich (w tym ran operacyjnych i oparzeniowych). Jest również czynnikiem etiologicznym zakażeń przewlekłych, towarzyszących np. mukowiscydozie. Antybiotykami stosowanymi obecnie przeciwko zakażeniom *P. aeruginosa* są najczęściej cefalosporyny III i IV generacji, karbapenemy, fluorochinolony i aminoglikozydy. W związku z malejącą liczbą dostępnych, skutecznych opcji terapeutycznych pracuje się nad nowymi terapeutykami lub nowatorskim wykorzystywaniem dotąd już poznanych.

LITERATURA

- ALHAZMI A., 2015. *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic mechanisms. Int. J. Biol. 7, 44-67.
- ALLEN R. C., POPAT R., DIGGLE S. P., BROWN S. P., 2014. Targeting virulence: can we make evolutionproof drugs? Nat. Rev. Microbiol. 12, 300-308.
- AMINOV R. I., 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. Front. Microbiol. 1, 1-7.
- AUBERT D., POIREL L., BEN ALI A., GOLDSTEIN F.W., NORDMANN P., 2001. OXA-35 is an OXA-10-related β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 48, 717-721.
- BAE I. K., SUH B., JEONG S. H., WANG K. K., KIM Y. R., YONG D., LEE K., 2014. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Korea producing β -lactamases with extended-spectrum activity. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 79, 373-377.
- BALASUBRAMANIAN D., SCHNEPER L., KUMARI H., MATHEE K., 2013. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Nucleic Acid Res. 41, 1-20.
- BASSETTI M., GINOCCHIO F., MIKULSKA M., 2011. New treatment options against Gram-negative organisms. Crit. Care 15, 1-9.
- BASSETTI M., MERELLI M., TEMPERONI C., ASTILEAN A., 2013. New antibiotics for bad bugs: where are we? Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 12, 22.
- BELOTTI P. T., THABET L., LAFFARGUE A., ANDRE C., COULANGE-MAYONNOVE L., ARPIN C., MES-SADI A., M'ZALI F., QUENTIN C., DUBOIS V., 2015. Description of an integron encompassing blaVIM-2, qnrVC1 and genes encoding bacterial group II intron proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 70, 2237-2240.
- BERNSTEIN L. R., 1998. Mechanisms of therapeutic activity for gallium. Pharmacol. Rev. 50, 665-682.
- BERRAZEG M., JEANNOT K., NTSOGO ENGUENÉ V. Y., BROUTIN I., LOEFFERT S., FOURNIER D., PLESIA P., 2015. Mutations in β -Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 6248-6255.
- BEZUIDT O. K. I., KLOCKGETHER J., ELSSEN S., ATTREE I., DAVENPORT C., TÜMMLER B., 2013. Intraclonal genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* clones CHA and TB. BMC Genomics 14, 416.

- BLAIR J., WEBBER M. A., BAYLAY A. J., OGBOLU D. O., PIDDOCK L. J. V., 2015. *Molecular mechanisms of antibiotic resistance*. Nat. Rev. Microbiol. 13, 42-51.
- BONNIN R., POIREL L., NORDMANN P., EIKMEYER F.G., WIBBERG D., PUHLER A., SCHLUTER A., 2013. *Complete sequence of broad-host-range plasmid pNOR-2000 harbouring the metallo- β -lactamase gene bla_{VIM-2} from Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 68, 1060-1065.
- BORONIN A. M., 1992. *Diversity of Pseudomonas plasmids: to what extent?* FEMS Microbiol. Lett. 100, 461-467.
- BOUCHER H. W., TALBOT G. H., BRADLEY J. S., EDWARDS J. E., GILBERT D., RICE L. B., SCHELD M., SPELBERG B., BARTLETT J., 2009. *Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America*. Clin. Infect. Dis. 48, 1-12.
- BREIDENSTEIN E. B. M., DE LA FUENTE-NUNEZ C., HANCOCK R. E., 2011. *Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance*. Trends Microbiol. 19, 419-426.
- BUSH K., JACOBY G. A., 2010. *Updated functional classification of β -lactamases*. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 969-976.
- BUSH K., JACOBY G. A., MEDEIROS A. A., 1995. *A Functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure*. Antimicrob. Agents. Chemother. 39, 1211-1233.
- CAMPBELL J. I. A., CIOUFU O., HOIBY N., 1997. *Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis have different beta-lactamase expression phenotypes but are homogenous in the ampC-ampR genetic region*. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 1380-1384.
- CENICEROS A., PERTEGA S., GALEIRAS R., MOURELO M., LÓPEZ E., BROULLÓN J., SOUSA D., FREIRE D., 2016. *Predicting mortality in burn patients with bacteraemia*. Infection 44, 215-222.
- CEYSSENS P. J., LAVIGNE R., 2010. *Bacteriophages of Pseudomonas*. Future Microbiol. 5, 1041-1055.
- CHAMBERS H. F., DELEO F. R., 2009. *Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era*. Nat. Rev. Microbiol. 2009, 7629-7641.
- CHENG G., DAI M., AHMED S., HAO H., WANG X., YUAN Z., 2016. *Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance*. Front. Microbiol. 7, 470.
- CHIU C. M., THOMAS C. M., 2004. *Evidence for past integration of IncP-1 plasmids into bacterial chromosomes*. FEMS Microbiol. Lett. 241, 163-169.
- COHEN M. L., 1992. *Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era*. Science 257, 1050-1055.
- COHEN M. L., 2000. *Changing patterns of infectious disease*. Nature 406, 762-767.
- D'AGATA E., 2015. *Pseudomonas aeruginosa and other Pseudomonas species* [W:] *Principles and Practice of Infectious Diseases*. BENNET J. E., DOLIN R., BLASER M. (red.). Elsevier-Saunders, Philadelphia, 2518-2532.
- DANEL F., HALL L. M., GUR D., LIVERMORE D. M., 1995. *OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1881-1884.
- DANEL F., HALL L. M., GUR D., LIVERMORE D. M., 1997. *OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase, isolated from a Pseudomonas aeruginosa strain*. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 785-790.
- DATTS N., 1962. *Transmissible drug resistance in an epidemic strain of Salmonella typhimurium*. J. Hygiene 60, 301-310.
- DAVIES J., 1995. *Vicious circles: looking back on resistance plasmids*. Genetics 139, 1465-1468.
- DAVIES J., DAVIES D., 2010. *Origin and evolution of antibiotic resistance*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74, 417-433.
- DUBOIS V., ARPIN C., NOURY P., QUENTIN C., 2002. *Clinical strain of Pseudomonas aeruginosa carrying a bla_{TEM21} gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon*. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 3624-3626.
- FAJARDO A., AMADO-HERNANDO S., OLIVER A., BALL G., FILLOUX A., MARTINEZ L. J., 2014. *Characterization of a novel Zn²⁺-dependent intrinsic imipenemase from Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 69, 2972-2978.
- EDELSTEIN M. V., SKLEENOVA E. N., SHEVCHENKO O. V., D'SOUZA J. W., TAPALSKI D. V., AZIZOV I. S., SUKHORUKOVA M. V., PAVLUKOV R. A., KOZLOV R. S., TOLEMAN M. A., WALSH T. R., 2013. *Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 Pseudomonas aeruginosa in Belarus, Kazakhstan and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study*. Lancet Infect. Dis. 13, 867-876.
- EMPEL J., FILCZAK K., MRÓWKA A., HRYNIEWICZ W., LIVERMORE D. M., GNIADKOWSKI M., 2007. *Outbreak of Pseudomonas aeruginosa infections with PER-1 extended-spectrum β -lactamase in Warsaw, Poland: Further evidence for an international clonal complex*. J. Clin. Microbiol. 45, 2829-2834.
- FAIR R. J., YITZHAK T., 2014. *Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century*. Perspect. Medicin. Chem. 6, 25-64.
- FIETT J., BARANIAK A., MRÓWKA A., FLEISCHER M., DRULIS-KAWA Z., NAUMIUK Ł., SAMET A., HRYNIEWICZ W., GNIADKOWSKI M., 2006. *Molecular Epidemiology of Acquired-Metallo- β -Lactamase-Producing Bacteria in Poland*. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 880-886.
- FLEMING A., 1999. *Penicillin, Nobel lecture 1945*. [W:] *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942-1962*. STRANDELL B. (red.). World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 83-93.
- FONSECA E. L., MARIN M. A., ENCINAS F., VICENTE A. C., 2015. *Full characterization of the integrative and conjugative element carrying the metallo- β -lactamase bla_{SPM-1} and bicyclomycin bcr1 resistance genes found in the pandemic Pseudomonas aeruginosa clone SP/ST277*. J. Antimicrob. Chemother. 70, 2547-2550.
- FROST L. S., LEPLAE R., SUMMERS A. O., TOUSSAINT A., 2005. *Mobile genetic elements: the agents of open source evolution*. Nat. Rev. Microbiol. 3, 722-32.
- GALLOWAY D. R., 1991. *Pseudomonas aeruginosa elastase and elastolysis revisited: recent developments*. Mol. Microbiol. 10, 2315-2321.
- GARCÍA-CONTRERAS R., PÉREZ-ERETZA B., LIRA-SILVA E., JASSO-CHÁVEZ R., CORIA-JIMÉNEZ R., RANGEL-VEGA A., MAEDA T., WOOD T. K., 2014. *Gallium induces the production of virulence factors in Pseudomonas aeruginosa*. Pathog. Dis. 70, 95-98.
- GARZA-RAMOS U., MORFIN-OTERO R., SADER H. S., JONES R. N., HERNÁNDEZ E., RODRIGUEZ-NORIEGA E., SANCHEZ A., CARRILLO B., ESPARZA-AHUMADA S., SILVA-SANCHEZ J., 2008. *Metallo- β -lactamase gene bla_{IMP-15} in a class 1 integron, In95, from Pseudomonas aeruginosa*

- clinical isolates from a hospital in Mexico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2943-2946.
- GIRLICH D., NAAS T., LEELAPORN A., POIREL L., FENNEWALD M., NORDMANN P., 2002. Nosocomial spread of the integron-located *veb-1-like* cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clin. Infect. Dis.* 34, 603-611.
- GNIADKOWSKI M., 2001. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 597-608.
- GOODERHAMAND W. J., HANCOCK R. E., 2009. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 279-294.
- GUZVINEC M., IZDEBSKI R., BUTIC I., JELIC M., ABRAM M., KOSCAK I., BARANIAK A., HRYNIEWICZ W., GNIADKOWSKI M., TAMBIC ANDRASEVIC A., 2014. Sequence types 235, 111 and 132 predominate among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Croatia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 6277-6283.
- HAINES A. S., JONES K., BATT S. M., KOSHELEVA I. A., THOMAS C. M., 2007. Sequence of plasmid pBS228 and reconstruction of the IncP-1 alpha phylogeny. *Plasmid* 58, 76-83.
- HEDGES R. W., JACOB A., 1974. Transposition of ampicillin resistance from RF⁴ to other replicons. *Mol. Gen. Genet.* 132, 31-40.
- HONG D. J., BAE, I. K., JANG I.-H., JEONG S. H., KANG H. K., LEE K., 2015. Epidemiology and characteristics of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Chemother.* 47, 81-97.
- ITO-HORIYAMA T., ISHII Y., ITO A., SATO T., NAKAMURA R., FUKUHARA N., TSUJI M., YAMANO Y., YAMAGUCHI K., TATEDA K., 2016. Stability of novel siderophore cephalosporin s-649266 against clinically relevant carbapenemases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 4384-4386.
- JAGUSZTYN-KRYNICKA E. K., 2012. Molekularne podstawy bakteryjnej patogenezy [W:] *Biologia molekularna bakterii*. Markiewicz Z., Baj J. (red.) PWN, Warszawa, 510-605.
- JOVČIĆ B., LEPSANOVIĆ Z., BEGOVIĆ J., RAKONJAC B., PEROVANOVIĆ J., TOPISIROVIĆ L., KOJIĆ M., 2013. The clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa* MMA83 carries two copies of the *bla*_{NDM-1} gene in a novel genetic context. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3405-3407.
- JUAN C. B., MOYA J. L., PEREZ O. A., 2006. Step-wise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1780-1787.
- KANEKO Y., THOENDEL M., OLAKANMI O., BRITIGAN B. E., SINGH P. K., 2007. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. *J. Clin. Invest.* 117, 877-888.
- KAZMIERCZAK K. M., RABINE S., HACKEL M., MC-LAUGHLIN R. E., BIEDENBACH D. J., BOUCHILLION S. K., SAHM D. F., BRADFORD P. A., 2015. Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo-β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 1067-1078.
- KITAO T., TADA T., TANAKA M., NARAHARA K., SHIMOJIMA M., SHIMADA K., MIYOSHI-AKIYAMA T., KIRIKAE T., 2012. Emergence of a novel multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain producing IMP-type metallo-β-lactamases and AAC(6⁷)-Iae in Japan. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 39, 518-521.
- KLOCKGETHER J., CRAMER N., WIEHLMANN L., DAVENPORT C. F., TÜMMLER, B., 2011. *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front. Microbiol.* 2, 150.
- KOS V. N., DERASPE M., MCCLAUGHLIN R. E., WHITEAKER J. D., ROY P. H., ALM R. A., CORBEIL J., GARDNER H., 2015. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 427-436.
- KUNG V. L., OZER E. A., HAUSER A. R., 2010. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 621-641.
- LAUTENBACH E., SYNNESTVEDT M., WEINER M. G., BILKER W. B., VO L., SCHEIN J., KIM W., 2010. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: emergence, epidemiology, and impact on clinical and economic outcomes. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 31, 47-53.
- LEBEK G., 1963. Über die Entstehung mehrfachresistanter Salmonellen. Ein experimenteller Beitrag. *Zbl. Bakt., Abt. I, Orig.* 188, 494-499.
- LEVY S. B., MARSHALL B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10, 122-129.
- LI H., LUO Y. F., WILLIAMS B. J., BLACKWELL T. S., XIE C. M., 2012. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to a novel therapies. *Int. J. Med. Microbiol.* 302, 63-68.
- LIBISCH B., POIREL L., LEPSANOVIĆ Z., MIROVIĆ V., BALOGH B., PASZTI J., HUNYADI Z., DOBAK A., FUZI M., NORDMANN P., 2008. Identification of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 54, 330-338.
- LISTER P. D., WOLTER D. J., HANSON N. D., 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 582-610.
- LIVERMORE D. M., 1995. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 557-584.
- LIVERMORE D. M., 1998. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J. Antimicrob. Chemother.* 41, 24-41.
- MAGIORAKOS A. P., SRINIVASAN A., CAREY R. B., CARMELI Y., FALAGAS M. E., GISKE C. G., HARBATH S., KAHLMETER G., OLSSON-LILJEQUIST B., PATERSON D. L., RICE L. B., STELLING J., STRUELENS M. J., VATOPOULOS A., WEBER J. T., MONNET D. L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268-281.
- MARCHIARO P. M., BRAMBILLA L., MORAN-BARRIO J., REVALE S., PASTERAN F., VILA A. J., VIALE A. M., LIMANSKY A. S., 2014. The complete nucleotide sequence of the carbapenem resistance-conferring conjugative plasmid pLD209 from a *Pseudomonas putida* clinical strain reveals a chimeric design formed by modules derived from both environmental and clinical bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 1816-1821.
- MARKIEWICZ Z., 2012. Budowa i funkcje komórki bakteryjnej [W:] *Biologia molekularna bakterii*.

- Markiewicz Z., Baj J. (red.). PWN, Warszawa, 26-131.
- MARKIEWICZ Z., KWIATKOWSKI Z. A., 2012. *Bakterie, antybiotyki, lekooporność*. PWN, Warszawa.
- MATHEE K., NARASIMHAN G., VALDES C., QIU X., MATEWISH J. M., KOEHRSEN M., ROKAS A., YANDAVA C. N., ENGELS R., ZENG E., OLAVARIETTA R., DOUD M., SMITH R.S., MONTGOMERY P., WHITE J. R., GODFREY P. A., KODIRA C., BIRREN B., GALAGAN J. E., LORY S., 2008. *Dynamics of Pseudomonas aeruginosa genome evolution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 3100-3105.
- MATSUMOTO T., 2014. *Arbekacin: another novel agent for treating infections due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus and multi-drug-resistant Gram-negative pathogens*. Clin. Pharmacol. 6, 139-148.
- MEDEIROS A. A., 1997. *Evolution and Dissemination of β -lactamases Accelerated by Generations of β -lactam Antibiotics*. Clin. Infect. Dis. 24, 19-45.
- MISLIN G. L. A., SCHALK I. J., 2014. *Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic trojan horse strategies against Pseudomonas aeruginosa*. Metallomics 6, 408-420.
- NAKAYA R., NAKAMURA A., MURATA Y., 1960. *Resistance transfer agents in Shigella*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 654-659.
- NEMEC A., KRIZOVA L., MAIXNEROVA M., MUSILEK M., 2010. *Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of Pseudomonas aeruginosa in the Czech Republic*. Res. Microbiol. 161, 234-242.
- NORDMANN P., RONCO E., NAAS T., DUPORT C., MICHEL-BRIAND Y., LABIA R., 1993. *Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 37, 962-969.
- OLIVER A., MULET X., LOPEZ-CAUSAPE C., JUAN C., 2015. *The increasing threat of Pseudomonas aeruginosa high-risk clones*. Drug Resist. Updat. 21-22, 41-59.
- OZER E. A., ALLEN J., HAUSER A. R., 2014. *Characterization of the core and accessory genomes of Pseudomonas aeruginosa using bioinformatic tools Spine and AGEnt*. BMC Genomics 15, 737.
- PAGE M. G. P., BUSH K., 2014. *Discovery and development of new antibacterial agents targeting Gram-negative bacteria in the era of pan-drug resistance: is the future promising?* Curr. Opin. Pharmacol. 18, 91-97.
- PHILIPPON L. N., NAAS T., BOUTHORS A. T., BARAKETT V., NORDMANN P., 1997. *OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 2188-2195.
- POIREL L., NAAS T., NICOLAS D., COLLET L., BELLAIS S., CAVALLO J. D., NORDMANN P., 2000. *Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate in France*. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 891-897.
- POIREL L., GIRLICH D., NAAS T., NORDMANN P., 2001. *OXA-28, an Extended-Spectrum Variant of OXA-10 β -Lactamase from Pseudomonas aeruginosa and its plasmid- and integron-located gene*. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 447-453.
- POIREL L., NAAS T., NORDMANN P., 2010. *Diversity, epidemiology, and genetics of class d β -lactamases*. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 24-38.
- POOLE K., 2005. *Aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 479-487.
- POOLE K., 2011. *Pseudomonas aeruginosa – resistance to the max*. Front. Microbiol. 65, 1-13.
- POTRON A., POIREL L., NORDMANN P., 2015. *Emerging broad-spectrum resistance in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: Mechanisms and epidemiology*. Int. J. Antimicrob. Agents 45, 568-585.
- RAMIREZ-ESTRADA S., BORGATTA B., RELLO J., 2016. *Pseudomonas aeruginosa ventilator-associated pneumonia management*. Infect. Drug Resist. 9, 7-18.
- RAHMAN M., PRASAD K. N., PATHAK A., PATI B. K., SINGH A., OVEJERO C. M., AHMAD S., GONZALEZ-ZORN B., 2015. *RmtC and RmtF 16S rRNA methyltransferase in NDM-1-producing Pseudomonas aeruginosa*. Emerg. Infect. Dis. 21, 2059-2062.
- RIERA E., CABOT G., MULET X., GARCIA-CASTILLO M., DEL CAMPO R., JUAN C., CANTON R., OLIVER A., 2011. *Pseudomonas aeruginosa carbapenems resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem*. J. Antimicrob. Chemother. 66, 2022-2027.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ J. M., POIREL L., NORDMANN P., 2009. *Extended-spectrum cephalosporinases in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 1766-1771.
- RUSSELL A. B., PETERSON S. B., MOUGOUS J. D., 2014. *Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose*. Nat. Rev. Microbiol. 12, 137-148.
- SAUER K., CAMPER A. K., EHRLICH G. D., COSTERTON J. W., DAVIES D. G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm*. J. Bacteriol. 184, 1140-1154.
- SCHUREK K. N., BREIDENSTEIN E. B. M., HANCOCK R. E. W., 2012. *Pseudomonas aeruginosa: A persistent pathogen in cystic fibrosis and hospital-associated infections*. [W:] *Antibiotic Discovery and Development*. DOUGHERTY T. J., PUCCI M. J. (red.). Springer, 679-715.
- SCHAEFER B., 2014. *Natural Products in Chemical Industry*. Springer, Berlin Heidelberg.
- SORDÉ R., PAHISSA A., RELLO J., 2011. *Management of refractory Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis*. Infect. Drug Resist. 4, 31-41.
- SEVASTSYANOVICH Y. R., KRASOWIAK R., BINGLE L. E. H., HAINES A. S., SOKOLOV S. L., KOSHELEVA I. A., LEUCHUK A. A., TITOK M. A., SMALLA K., THOMAS C. M., 2008. *Diversity of IncP-9 plasmids of Pseudomonas*. Microbiology 154, 2929-2941.
- STOKES H. W., HALL R. M., 1989. *A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons*. Mol. Microbiol. 12, 1669-1683.
- STOKES H. W., GILLINGS M. R., 2011. *Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistant genes into Gram-negative pathogens*. FEMS Microbiol. Rev. 35, 790-819.
- STRATEVA T., YORDANOV D., 2009. *Pseudomonas aeruginosa – a phenomenon of bacterial resistance*. J. Med. Microbiol. 58, 1133-1148.
- TANEJA N., KAUR H., 2016. *Insights into Newer Antimicrobial Agents Against Gram-negative Bacteria*. Microbiol. Insights 20, 9-19.

- TOMARAS A. P., MCPHERSON T. C. J., KUHN M., CARIFA A., MULLINS L., GEORGE D., DESBONNET C., EIDEM T. M., MONTGOMERY J. I., BROWN M. F., REILLY U., MILLER A. A., O'DONNELL J. P., 2014. *LpxC inhibitors as new antibacterial agents and tools for studying regulation of lipid a biosynthesis in Gram-negative pathogens*. mBio 5, e01551-14.
- VILACOBA E., QUIROGA C., PISTORIO M., FAMIGLIETTI A., RODRÍGUEZ H., KOVENSKY J., DERASPE M., RAYMOND F., ROY P. H., CENTRÓN D., 2014. *A bla_{VIM-2} plasmid disseminating in extensively drug-resistant clinical Pseudomonas aeruginosa and Serratia marcescens isolates*. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 7017-7018.
- VILLAVICENCIO R. T., 1998. *The history of blue pus*. J. Coll. Surg. 187, 212-216.
- VINCENT J. L., 2003. *Nosocomial infections in adult intensive-care units*. Lancet 361, 2068-77.
- WAGNER S., SOMMER R., HINSBERGER S., LU C., HARTMANN R. W., EMPTING M., TITZ A., 2016. *Novel strategies for the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections*. J. Med. Chem. <http://pubs.acs.org/doi/ipdf/10.1021/acs.jmedchem.5b01698>.
- WALSH T. R., TOLEMAN M. A., POIREL L., NORDMANN P., 2005. *Metallo-β-lactamases: the quiet before the storm?* Clin. Microbiol. Rev. 18, 306-325.
- WATANABE T. T., FUKUSAWA T., 1960. *„Resistance transfer factor” on episome in Enterobacteriaceae*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 3, 87-115.
- WEI Q., MA L. Z., 2013. *Biofilm matrix and its regulation in Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Mol. Sci. 14, 20983-21005.
- WESTRITSCHNIG K., HOCHREITER R., WALLNER G., FIRBAS C., SCHWAMEIS M., JILMA B., 2014. *A randomized, placebo-controlled phase I study assessing the safety and immunogenicity of a Pseudomonas aeruginosa hybrid outer membrane protein OprF/I vaccine (IC43) in healthy volunteers*. Hum. Vaccin. Immunother. 10, 170-183.
- WOLSKA I. K., GRUDNIAK M. A., KRACZKIEWICZ-DOWJAT A., KUREK A., 2010. *Różnorodne funkcje wybranych pigmentów bakteryjnych*. Post. Mikrobiol. 40, 105-114.
- XIONG J., ALEXANDER D. C., MA J. H., DÉRASPE M., LOW D. E., JAMIESON F. B., ROY P. H., 2013. *Complete sequence of pOZ176, a 500-kilobase IncP-2 plasmid encoding IMP-9-mediated carbapenem resistance, from outbreak isolate Pseudomonas aeruginosa 96*. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 3775-3782.
- ZINCKE D., BALASUBRAMANIAN D., SILVER L. L., MATHEE K., 2016. *Characterization of a carbapenem-hydrolyzing enzyme, PoxB, in Pseudomonas aeruginosa PAO1*. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 936-945.

KOSMOS Vol. 66, 1, 11-29, 2017

PAWEŁ URBANOWICZ, MAREK GNIADKOWSKI

Department of Molecular Microbiology, National Medicines Institute, Chelmska 30/34, 00-725 Warszawa,

E-mail: purbanowicz@cls.edu.pl, gniadkow@cls.edu.pl

“HEAVILY ARMED” PSEUDOMONAS AERUGINOSA: MECHANISMS AND GENETIC BACKGROUND OF DRUG RESISTANCE

Summary

The rapid spread of antibiotic resistance (AMR) in pathogenic bacteria is one of the greatest challenges of modern infectiology. In particular, the most threatening are nosocomial infections caused by multi-drug-resistant strains of several major species, such as *Pseudomonas aeruginosa*. This opportunistic pathogen exhibits a broad-spectrum of natural resistance. Due to its high genome plasticity, comprising functional mutations and acquisition of foreign DNA, *P. aeruginosa* can easily adapt and persist in harsh environmental niches. The critical issue is its outstanding ability to acquire diverse AMR mechanisms, including those encoded by mobile genetic determinants. In addition to the intrinsic resistance, *P. aeruginosa* can be highly resistant to all of the currently available antipseudomonadal antimicrobials. *P. aeruginosa* is the etiological agent of a variety of infections, including acute pneumonia, bloodstream infections or skin and soft tissue infections (e. g. postoperative or burn wounds). It is responsible also for chronic infections, like those in cystic fibrosis (CF) patients. The major antimicrobials used in *P. aeruginosa* infections are newer-generation cephalosporins, carbapenems, fluoroquinolones or aminoglycosides. Owing to limitations of the effective therapeutic options against *P. aeruginosa*, new antimicrobials and novel indications and thus applications for older drugs are being developed.

8. Discussion

β -Lactam compounds are the oldest, the largest, the most diverse and the safest group of antibiotics, effective against a broad spectrum of infections, caused by most of clinically relevant bacterial pathogens. However, shortly after the large-scale application of penicillin in the early 1940s, the first resistant, β -lactamase-producing staphylococcal strains emerged. With this and several following examples, bacteria showed their potential of developing resistance to every new anti-infective agent soon after its introduction, commencing a specific race between medicine, academia and pharmaceutical industry on one side, and pathogens on the other. During several decades microorganisms have acquired a large number and variety of AMR mechanisms, segregating lineages steadily accumulating more and more effective ones, and so adapting better to hospital environments.(153) *P. aeruginosa* has peculiar AMR capacity based on multiplicity of intrinsic and acquired mechanisms which together are able to confer resistance to all currently used drugs, including β -lactams and their specific class, the carbapenems. Considered until recently as the ‘last-line’ drugs, carbapenems possess extensive activity spectrum and remarkable potency against Gram-positive and Gram-negative bacteria, being resistant to hydrolysis by numerous β -lactamases.(154) Because of their high potential in combating widely disseminated ESBL-producing enterobacteria and other Gram-negatives resistant to expanded-spectrum cephalosporins, soon after their clinical implementation carbapenems started to be used in large amounts, which resulted in the selection of resistant strains.(155) The first ones, often being *P. aeruginosa*, emerged just after the approval of imipenem in 1985,(36, 154) and in the following years carbapenem resistance (CR) has been increasingly observed worldwide in *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and then *Enterobacterales*, with significant acceleration in the 2000s.(153, 154)

CR rates in *P. aeruginosa* in individual countries vary broadly, from <10% to >60% of clinical isolates (Figure 6).(156, 157) Based on the data from specific AMR studies and ECDC reports, the frequency of isolates resistant to imipenem and/or meropenem in Poland doubled from 1996 to 2005, and has remained at the ~25% rate until 2019. This value much exceeded the European mean of 16.5%, making the country one of the more affected by CR in Europe,(55, 147, 158) and in 2020 the rate increased to 28.5%(<https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>). Besides Europe, CR rates have been also monitored in other continents/regions, and based on the susceptibility data for

8,572 *P. aeruginosa* clinical isolates from 54 countries, in 2019 the lowest CR rate (~4.5%) was in Oceania (Australia and New Zealand), while the highest one was observed in South America (25.9%). Asia had the incidence of 20.3%, but when split into the Far and Middle East, it revealed a remarkable difference, with 16% and 27.6%, respectively.(157)

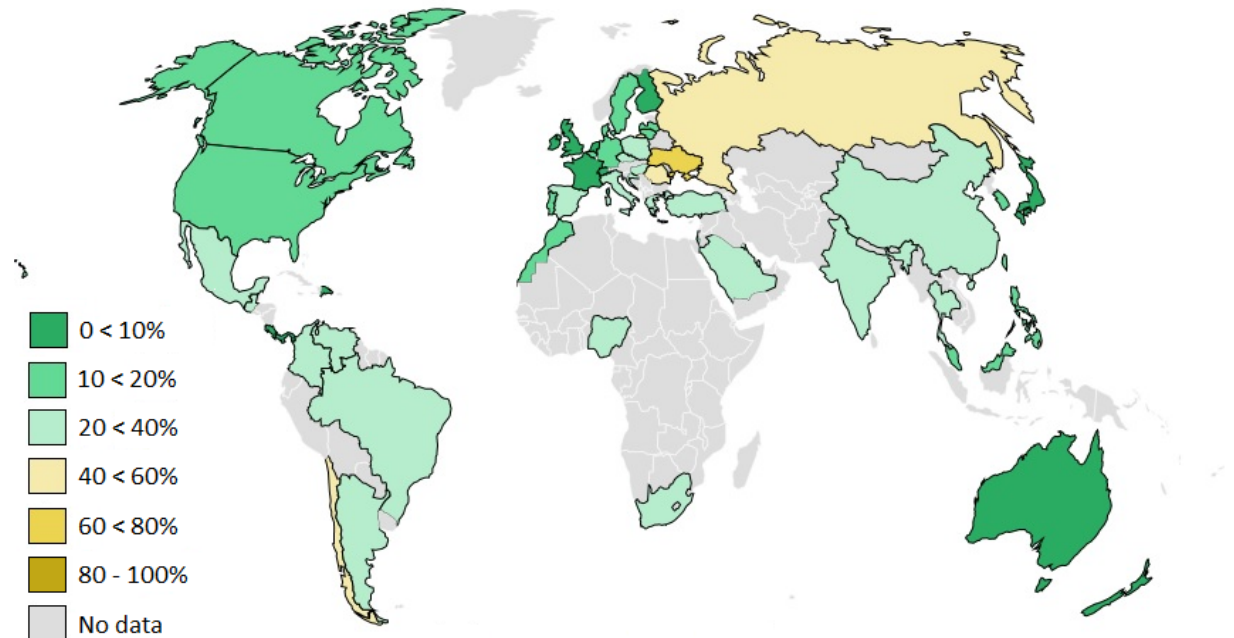


Fig. 6. Rates of carbapenem resistance in *P. aeruginosa* worldwide in 2019. All the data were extracted from the Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance run by Pfizer (data last updated on 30th June, 2021).(157)

CR in *P. aeruginosa* and other Gram-negatives, especially when associated with the carbapenemase production, is notoriously an element of MDR, with possible transition to even the PDR phenotype.(159) Moreover, nosocomial pathogens with CR at lower levels tend to elevate it by accumulating various non-enzymatic or enzymatic mechanisms, including combinations of different carbapenemases.(160) Recently the co-production of carbapenemases has been recorded more and more frequently also in Poland, both in pseudomonads and enterobacteria, with the prevailing position of MBLs in such combinations.(161-163) The worldwide continuous diffusion of MBLs in *P. aeruginosa* populations has been observed from the 2nd half of the 1990s, so that some national or international surveillance networks have started to monitor this growing threat at that time.(33, 41, 155) Despite numerous reports, the overall estimation of the prevalence of MPPA is difficult. This is largely due to differences in the individual study design, including either all *P. aeruginosa* clinical isolates, isolates from specific infection types, MDR isolates (with varying definitions),

ceftazidime-resistant isolates or CR isolates as the study material. The early surveys on MPPA prevalence in entire nosocomial *P. aeruginosa* populations were conducted e.g. in Greece in 2001, recording the rate of 1.3%, the same as in Italy in 2004.(164, 165) A study in Korea in 2000-01 evaluated the MPPA rate to be 11.4% (166), while Japan showed an increase from 0.4% to ~2.0% in 1992-2002, and then stabilization at ~2.0% to 2006.(167, 168) Till 2005, probably the highest incidence was observed in Brazil; almost 20% of tested isolates produced MBLs.(41) With time the situation has been changing in different countries, e.g. Greece recorded 14.1% in 2011(48), whereas Korea had noted first a rapid growth to 30.2% MPPA in 2008, and then a decrease to 6.4% six years later.(26, 169) In Spain the MPPA incidence has been rather stable, in 2008-09 and 2017 the prevalence of 2.7% and 2.2%, respectively, was observed.(49, 170) In Russia, the all-country surveillance system monitored a drastic change of the MPPA rate, from 4.5% in 2002-04, via 28.7% in 2008-10, to 30.8% in 2015-16.(47, 171) In Poland, one of the first countries reporting the MPPA prevalence, in 2003 the rate was 0.5%(55) but after 15 years, it has elevated to 15%.(172)

In the 1st half of the 1990s, researchers began using molecular biology techniques to investigate the dynamics and mechanisms of the pathogens' spread within their population structures. It was of critical importance to possess precise, reliable and discriminatory tools for the effective identification of specific genotypes which due to peculiar epidemicity, virulence and/or AMR constituted growing clinical and public health threat. The introduction of molecular approaches, with the recent broad implementation of WGS, has responded perfect to these needs, giving rise to the so-called 'molecular epidemiology', which allowed understanding better the clonal variation of pathogens, and identifying their reservoirs and transmission patterns.(173) Most of the early molecular epidemiological reports on CR *P. aeruginosa* and/or MPPA were from Japan and other Far East countries; in Europe only a few countries conducted such research by the mid-2000s.(37, 55, 61, 164, 174, 175) Then the situation has improved, among others due to the introduction of the MLST scheme for *P. aeruginosa*,(176) the fully universal, standardised and inter-laboratory reproducible method, which revolutionised microbial typing on the threshold of the 2000s.(177) MLST has been especially useful in characterization of the clonal status of bacterial isolates and the clonal structure of their populations, and being of limited discriminatory power, it performed well in large-scale and long-term evolutionary-epidemiological analyses.(138, 178) The recent application of the WGS-based approaches has opened

new perspectives for the epidemiological investigations at all levels, and allowed addressing all of the issues mentioned above with unprecedented comprehensiveness, precision and reliability. Interestingly, the broader and broader implementation of WGS has not undermined the scientific relevance and utility of sequence types (STs), the specific ‘labels’ of clonal identity introduced in the standard 7-loci MLST schemes. The use of STs remarkably facilitates bioinformatic analyses of huge amounts of data generated by the enormously progressive WGS.(179-181)

Molecular epidemiology surveys of *P. aeruginosa* nosocomial or environmental isolates revealed their extensive clonal diversity, with high contribution of multiple sporadic genotypes. Moreover, despite the large and growing number of STs identified so far (>3800 as of 6th December 2021), the detection of new variants is still frequent, however, not for the MDR/XDR strains. The presence of some epidemic genotypes had been postulated a long time ago, including the so-called international MDR serotypes O11 and O12, later classified as ST235 and ST111, respectively.(138) As it was mentioned already, many nationwide surveys have documented their status of the global or pandemic MDR *P. aeruginosa* clones, often associated with VIM/IMP-like MBLs.(3, 138) Recent advances in genomics allowed to explain possible factors underlying the ST235 epidemic ‘success’; the clone possesses higher mutation rate (hypermutator phenotype), additional set of genes implicated in DNA processing and transformation, and no functional CRISPR/Cas interference.(144, 182) Together, these genetic traits likely increase the ability to acquire and maintain exogenous DNA, as well as enhance the intraspecies competitiveness of the clone. Moreover, since the majority of currently used antibacterials were discovered and implemented to clinical use in the 2nd half of the 20th century, the AMR acquisition, either by mutation or horizontal gene transfer, may be the major driving force of the persistence and spread of ST235 in nosocomial environments over the last decades. The huge selection pressure of various antibiotics in hospital settings provides exceptional conditions for the expansion of such genotypes.(182)

As the first work of this dissertation shows, Polish hospitals may be an apt example of this phenomenon because almost half of the studied MPPA strains were assigned to ST235 and ST111. The ST235’s peculiar genetic capacity discussed just above was reflected in the study by the number of acquired AMR genes, including those of the MBL variants and their class 1 integrons identified in this clone. ST235 had the highest mean of ~7.6 mobile AMR genes per isolate, with seven variants of VIM/IMPs

encoded by 22 different class 1 integrons, 14 of which were new. ST111 possessed ~5.4 acquired AMR genes per average isolate, with VIM-2/-4 in eight various integrons, including three new ones. As the genomic phylogenetic analyses demonstrated, their populations arose by the international circulation of several representatives of pre-differentiated clades or lineages, some of which persisted then in hospital settings and further diversified into locally-specific genotypes. This is probably well-portrayed by the ST235/A, ST235/J and ST235/O epidemic genotypes, identified first as MBL producers in the region Śląskie in 2004,(55) in Warsaw in 2005, and in Kujawsko-Pomorskie in 2009, respectively. All these genotypes belonged to the phylogenetic Group I and likely clade C11 of ST235 (144), and apparently formed a related subgroup, though ST235/O was related even more to some MBL-negative strains from Italy and the US (first paper; Figure 1). C11 seems to be one of the more expansive ST235 lineages, recorded without or with MBLs in Japan, the US, and in southern Europe – Croatia and mainly Italy. It is possible that C11 members arrived/emerged in Poland as MBL-negative organisms at least twice, once giving rise to ST235/A and ST235/J by the subsequent on-site clonal differentiation, and then to ST235/O. Their diversification comprised also acquisition of five different, Poland-specific MBL integrons, In1978 type or In2016 by ST235A, In238 by ST235/J, and In1656 or In1977 by ST235/O, and four of the resulting combined genotypes disseminated interregionally. Considering also the variation of the In1978-type integrons (In1978, In593, In1652), deriving from gene cassette insertions/excisions, the C11 ST235 organisms themselves showed the complexity of the MPPA epidemiology and evolution. The last of the ST235 epidemic genotypes, ST235/AO-In1451, was relatively distant to those discussed above; although located in Group I too, it represented another highly ‘cosmopolitan’ clade C12, with closest relatives in MBL-negative isolates from France and Portugal. This genotype, encountered first in 2007, unambiguously arose by a separate individual emergence of *P. aeruginosa* ST235 in Poland.

A similar situation was observed for the two epidemic ST111 genotypes, ST111/K-In59 and ST111/L-In1008, which fell into two different major phylogroups of the clone (first paper; Figure S5). Contrarily to ST235, the largest group of ST111 consisted entirely of MBL (VIM)-producing isolates from Europe and the Americas, and this contained ST111/K with In59, the integron identified originally in ST111 in France in 1997, and then in Sweden, the UK and other countries.(61, 62, 113, 183, 184) This might suggest arrival of the genotype into Poland already as the international MBL

producer, with the 1st isolate recorded in 2010. Both ST111/K-In59 and the distant ST111/L-In1008 had closest relatives in isolates from the UK; however, it should be underlined that the majority of the ST111 genomic sequences available were from a WGS-based epidemiological study in that country.(62) An interesting observation concerned a number of minor ST235 and ST111 genotypes, varying by pulsotypes and MBL integrons, which in the phylogenetic analysis formed three common branches, one together with the ST235 Group I clade C2, one with the ST235 Group II clade C10 and one within the group 3 ST111 isolates, respectively. The closest relatives of all these three sets of isolates were from different countries/continents. It might be proposed that their progenitors spread broadly and emerged in Poland as MBL negatives a relatively long time ago, having then enough time to differentiate on site into multiple distinct pulsotypes and acquire diverse MBL integrons.

The two remaining of the predominant clones, ST273 and ST654, represented a remarkably distinct evolutionary-epidemiological case. Almost as numerous as ST111, ST273 had much more clonally homogeneous population, with 95% isolates belonging to one pulsotype, and 99% isolates carrying the same integron; therefore, ST273/AE-In249 was the most successful individual epidemic genotype in entire MPPA population. Considering that this was one of only two epidemic organisms that commenced spreading in the early period, around 2000 in the region Dolnośląskie,(55) its relatively high internal microdiversity at the SNP level has not been surprising. At the same time, there were only few reports on single ST273 isolates available from the Far East and Western Europe,(77, 141, 185-187) and only two phylogenetically separate ST273 genomes were present in the databases (first paper; Figure S7), all which have strongly supported the hypothesis that the entire Polish ST273 population differentiated on site, gradually expanding into multiple regions. However, the lack of any MBL-negative ST273 isolates from Poland, especially from before 2000, and their general scarcity from elsewhere, make it difficult to address the issue of the deeper origin of the ST273/AE-In249 genotype. It is also a matter of question what factor(s) has been responsible for its enhanced epidemicity, and why this has been observed only in Poland so far; a study addressing specific characteristics of the organism has started.

ST654, the fourth abundant Polish clone, identified also in other countries with various carbapenemases, has been recently attracting wider attention because of its apparently growing prevalence *e.g.* in the Middle East and Russia.(188-193) Of all Polish major STs, ST654 emerged as the last one in 2009, and similar to ST273, its

population was clonally ‘compact’, with 95% isolates representing a single pulsotype. However, it was remarkably diversified by the presence of five integrons, and so, only two combined genotypes, ST654/Q-In1008 and ST654/Q-In1653, might be indicated as epidemic organisms. Interestingly, when compared to the limited worldwide genome collection, all Polish ST654 isolates formed a separate cluster, regardless their pulsotype and integron content (first paper; Figure S9). All these indicated that ST654 has emerged and spread as a basically MBL-negative organism in Poland, mainly in the southern regions Małopolskie and Śląskie, acquiring then various integron-carrying structures in individual settings. Like with ST273, the issue of its deeper origin is open.

Of the all remaining *P. aeruginosa* clones and specific MPPA genotypes, two more deserve for some attention. ST175 with all eight isolates grouping in a homogeneous genotype ST175/AC-In110, belonged to more prevalent organisms, having caused a limited outbreak in the region Warmińsko-Mazurskie (first paper; Table 1). Both the ST and the integron have been identified broadly, especially in Spain, Italy or France.(45, 138) The phylogenetic analysis of four sequenced Polish isolates has evidenced their closest relatedness to a sample of isolates with In110 from Italy, the country where the integron had been originally described in 1999.(194) Similar to the case of ST111/L-In59 discussed above, the ST175/AC-In110 isolates identified in Poland probably originated from import of an MPPA genotype to the country, followed by its spread on site. Another situation was shown by one of the sporadic genotypes, ST357/CZ-In1458, characteristic for four isolates from Dolnośląskie mainly (first paper; Table S2). The original isolate of this type was identified in Wrocław in 2006, as the 1st Polish MPPA with an IMP-like MBL, IMP-7, and in 2008 indistinguishable isolates occurred in the north of the Czech Republic.(195) As shown in this study, the genotype has not proliferated much in Poland in the following years, however, it has done so in Czechia, becoming the predominant MPPA organism in there.(68) Therefore, in contrast to ST175/AC-In110, this might exemplify export of MPPA from Poland to another country.

The number of different horizontally-acquired AMR elements, mostly class 1 integrons, detected in *P. aeruginosa* high-risk clones is overwhelming. Despite the large documentation of their presence, the information on the location, broader genetic environment and mechanisms of transfer are still restrained. However, many studies, including the genomic ones, have tracked these often to the chromosome and PAGs/ICEs, making clonal spread (mainly) and the conjugative transfer of ICEs the

preferential manners of AMR dissemination and accumulation in *P. aeruginosa* populations.(3, 138) Until recently, little was known about MBL-encoding plasmids in pseudomonads, their diversity and role in disseminating AMR determinants. Yet, a growing number of WGS studies, especially those utilizing long-read technology, allowed for identification of new AMR plasmids lineages, such as pMOS94. These nontypeable molecules, sizing from ~24 to ~100 kb, have disseminated through various *Pseudomonas* spp. populations in Europe and Brazil since 1994, carrying miscellaneous VIM/IMP integrons.(196)

Another, ‘older’ and more abundant group of plasmids are the IncP-2-type molecules, identified and characterised originally in the 1970s-80s,(118, 119), but difficult to study because of their large sizes of ~300 - ~550 kb (‘megaplasmids’). Recently Cazares et al. indicated that a subfamily of these plasmids, grouping also the Polish lineage of pPUVs, characterised in the second paper of this dissertation, are widely distributed geographically and have been isolated from environmental and clinical specimens. Moreover, the genomic analysis of isolates from 1970-1986, has gained insights into the evolution of this subgroup. It was suggested that these structures were originally assembled in non-aeruginosa pseudomonads without AMR genes, and during the evolutionary process acquired various AMR determinants, either before or after the transfer to *P. aeruginosa*, followed by positive selection of the MDR-associated ones.(110) Except for a limited ‘outbreak’ of IMP-45-encoding megaplasmids in three hospitals in China between 2015-2018, these structures were usually recorded in single *Pseudomonas* spp. strains, occasionally with MBL genes.(109, 110, 115, 123-127) Therefore, this study, demonstrating the presence of the VIM-2-encoding pPUVs in ~15% of all MPPA isolates, has documented probably the largest recorded spatiotemporal in-country spread of MBL-encoding plasmids in *P. aeruginosa*, or even the largest AMR plasmid ‘epidemic’ reported in this organism ever. The pPUVs’ self-transmission caused that the associated In461 was the most prevalent element among all 46 MBL integrons in Polish MPPA, and remarkably contributed to the overall MPPA spread. The comparative genomics showed that, although sharing many features with the entire IncP-2 group, the pPUVs were closely related only to the VIM-2-encoding plasmid pJB37 from Portugal;(109) however, pJB37 had a different integron located in another genetic context, indicating separate recent evolution. The in-sample analysis of the pPUV series allowed confirming the accuracy of the new IncP-2 replicon identification;(110) it has also verified the views on

structure and functionality of two distinct sets of DNA transfer genes, *trb* and *tra*, the former classified lately as a part of a putative ICE.(110, 122, 127)

While the first two original articles detailed the clonal and horizontal aspects of the MPPA spread in Poland till end of 2015, the third paper is a case report microbiological study, carried out by the fully genomic approach. This work showed a remarkable accumulation of 25 various AMR genes in a *P. aeruginosa* ST234 strain, including those coding for NDM-1 and DIM-1 MBLs, and the PME-1 ESBL, conferring nearly pan-resistance. Although another ST234 MPPA isolate had been observed already in southern Poland in 2013(197), both the clone and the major AMR genes have been rather uncommon, reported though over huge distances, including Asian and African countries. The SNP-based phylogeny on all publicly available ST234 genomes suggested that the Polish strain might have evolved in another continent; however, both the origin and the time of its import are unknown. A notable relatedness to several Ghanaian IMP-34- and DIM-1-producing ST234 isolates was observed; these belonged to the same evolutionary lineage, and differed by ~1500 SNPs from the Polish isolate.(90) The recruitment of the same DIM-1-encoding integron, In1592, was another possible evidence for the evolution of the Polish and Ghanaian isolates from a common ancestor. However, this structure was embedded in distinct PAGIs, indicating it had been acquired from an unknown donor and then underwent different variations.(90) The origin of ICE6660 remains puzzling since none of the aforementioned ST234 isolates possessed *bla*_{NDM-1}. (90) A possible clue might be provided by a recent meta-analysis, showing that in 2012-2014 there were two NDM-producing *P. aeruginosa* strains in Ghana, thus suggesting a possible source of *bla*_{NDM} for the Polish isolate.(198)

All the presented works together have demonstrated a comprehensive analysis of a unique collection of clinical MPPA strains, using microbiological and molecular/genomic state-of-the-art approaches, which in combination with the basic epidemiological data have allowed to explain in details the background, mechanisms and course of the extensive spread of MPPA in Polish hospitals in 2005-2015. When compared to those described in other countries, the MPPA population in Poland revealed a number of common and specific characteristics. The common ones included: i) the key role of the clonal spread in the MPPA increase, ii) the predominance of a few clones, iii) the remarkable contribution of the pandemic clones ST235 and ST111, iv) the heterogeneous phylogeny of the ST235 and ST111 subpopulations. The specific elements comprised: i) the remarkable role of the plasmid horizontal transfer on a

territorial scale, ii) the specificity of multiple ST235 and ST111 genotypes due to in-country differentiation, iii) the high contribution of ST273 and ST654 in the overall MPPA population structure, iv) the number, diversity and specificity of MBL integrons, v) the specificity of the pPUV lineage of the IncP-2-type plasmids.

The presented work provided new information on the *P. aeruginosa* population genetics and epidemiology, as well as the structure, function and evolution of various genetic elements in this species, such as MBL integrons, plasmids, and genomic islands. The so far aggregated knowledge on MPPA in Poland, starting from the first studies,(42, 43, 55, 150) together with the results presented within this doctoral dissertation, place Poland among the countries with the best recognised epidemiology of this pathogen.

Despite the best efforts, this work has also some limitations, concerning mainly the representativeness and the age of the studied isolates. The introduced principle of the collection composition, which assumed one strain per one centre per year, has partially lowered the real contribution of hospital outbreaks in the MPPA spread. It could not allow for a fully accurate presentation of prolonged or recurrent epidemics, thus affecting the actual proportion between outbreak and non-outbreak isolates. On the other hand, it prevented overgrowing the size of the study population, making its analysis affordable and cost-effective. Along with that, the study collection (2005-2015) has not comprised MPPA isolates from the very recent years, and so the results have not necessarily reflected the current epidemiology of this pathogen. However, it should be noted that the work presented was retrospective and it directly continued the early study of MPPA from 2000-2004.(55) Moreover, the size of the collection and the range of the methodology used required remarkable time to perform a comprehensive and conclusive analysis.

9. Conclusions

The overall aim of the project was to identify the factors and mechanisms of the alarming increase in MPPA infections in Poland in 2005-2015, by revealing the comprehensive view of the epidemiological situation in the spatiotemporal aspect. It was possible by conducting a detailed microbiological, molecular and genomic characterization of the study collection of isolates, including representatives of the early stage of the MPPA spread in Poland (2000-2004), and the available WGS data from other countries for the comparative phylogenetic analysis. The main conclusions of this work are as follows:

1. the rapid increase in the incidence of MPPA in Polish hospitals since 2005 was based largely on the clonal spread, mainly the interregional expansion of 10 epidemic genotypes of the four major STs (~55% of the MPPA cases);
2. the horizontal dissemination of a specific MBL integron by an IncP-2-type megaplasmid lineage accounted for at least 15% of the MPPA cases, being the largest recorded, interregional MBL ‘plasmid epidemic’ in *P. aeruginosa*;
3. the remaining fraction of the MPPA cases might be assigned to smaller local clonal outbreaks, limited horizontal transmissions of MBL-encoding plasmids/ICEs, and sporadic *de novo* selections/imports, all associated with a variety of *P. aeruginosa* genotypes;
4. the Polish MPPA population had one of the highest genetic diversity levels of those recorded so far at the country level, both in terms of the clonal structure and the key AMR determinants, the MBL-encoding integrons;
5. the clonal structure of the Polish MPPA population was remarkably specific, including high prevalence of local variants of the pandemic clones ST235 and ST111, and of the internationally rare clones ST273 and ST654;
6. the other major factor of the Polish MPPA diversity were class 1 integrons carrying the VIM/IMP MBL genes, most of which have evolved in the country;
7. the almost pan-drug-resistant NDM- and DIM-producing *P. aeruginosa* strain has emerged in Poland, most probably by the unnoticed importation event, demonstrating the risk of spread of organisms with ultimate AMR phenotypes.

10. References

1. D'Agata E. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* and other *Pseudomonas* species, p 2518-2531. In Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (ed), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, vol 2. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA.
2. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, Jackson RW. 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. FEMS Microbiol Rev 35:652-80.
3. Botelho J, Grosso F, Peixe L. 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - mechanisms, epidemiology and evolution. Drug Resist Updat 44:100640.
4. Sorde R, Pahissa A, Rello J. 2011. Management of refractory *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Infect Drug Resist 4:31-41.
5. Weiner-Lastinger LM, Abner S, Edwards JR, Kallen AJ, Karlsson M, Magill SS, Pollock D, See I, Soe MM, Walters MS, Dudeck MA. 2020. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. Infect Control Hosp Epidemiol 41:1-18.
6. Deptuła A, Trejnowska E, Dubiel G, Zukowski M, Misiewska-Kaczur A, Ozorowski T, Hryniewicz W. 2017. Prevalence of healthcare-associated infections in Polish adult intensive care units: summary data from the ECDC European Point Prevalence Survey of Hospital-associated Infections and Antimicrobial Use in Poland 2012-2014. J Hosp Infect 96:145-150.
7. Dubiel G, Kozłowski B, Deptuła A, Hryniewicz W. 2018. Raport NPOA z programu czynnego monitorowania zakażeń w oddziałach anestezjologii i intensywnej terapii w 2018 roku w Polsce. Narodowy Program Ochrony Antybiotyków, Ministerstwo Zdrowia.
8. Ceniceros A, Pertega S, Galeiras R, Mourelo M, Lopez E, Broullon J, Sousa D, Freire D. 2016. Predicting mortality in burn patients with bacteraemia. Infection 44:215-22.
9. Lautenbach E, Synnestvedt M, Weiner MG, Bilker WB, Vo L, Schein J, Kim M. 2010. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: emergence, epidemiology, and impact on clinical and economic outcomes. Infect Control Hosp Epidemiol 31:47-53.

10. Rosenthal VD, Al-Abdely HM, El-Kholy AA, AlKhawaja SAA, Leblebicioglu H, Mehta Y, Rai V, Hung NV, Kanj SS, Salama MF, Salgado-Yepez E, Elahi N, Morfin Otero R, Apisarnthanarak A, De Carvalho BM, Ider BE, Fisher D, Buenaflor M, Petrov MM, Quesada-Mora AM, Zand F, Gurskis V, Anguseva T, Ikram A, Aguilar de Moros D, Duszynska W, Mejia N, Horhat FG, Belskiy V, Mioljevic V, Di Silvestre G, Furova K, Ramos-Ortiz GY, Gamar Elanbya MO, Satari HI, Gupta U, Dendane T, Raka L, Guanche-Garcell H, Hu B, Padgett D, Jayatilleke K, Ben Jaballah N, Apostolopoulou E, Prudencio Leon WE, Sepulveda-Chavez A, Telechea HM, Trotter A, Alvarez-Moreno C, Kushner-Davalos L, et al. 2016. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module. *Am J Infect Control* 44:1495-1504.
11. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48:1-12.
12. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11:297-308.
13. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N, Group WHOPPLW. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18:318-327.
14. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22:582-610.
15. Livermore DM. 1984. Penicillin-binding proteins, porins and outer-membrane permeability of carbenicillin-resistant and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 18:261-70.
16. Poole K. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol* 2:65.
17. Dantas RCC, Silva RTE, Ferreira ML, Goncalves IR, Araujo BF, Campos PA, Royer S, Batistao D, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. 2017. Molecular epidemiological survey of bacteremia by multidrug resistant *Pseudomonas*

- aeruginosa*: the relevance of intrinsic resistance mechanisms. PLoS One 12:e0176774.
18. de Oliveira Santos IC, Pereira de Andrade NF, da Conceicao Neto OC, da Costa BS, de Andrade Marques E, Rocha-de-Souza CM, Asensi MD, D'Alincourt Carvalho-Assef AP. 2019. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995-2015). *Infect Genet Evol* 73:411-415.
 19. Bush K. 2018. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
 20. Livermore DM. 1995. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8:557-84.
 21. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11:315-7.
 22. Sirot D. 1995. Extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 36 Suppl A:19-34.
 23. Nordmann P, Naas T. 1994. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 38:104-14.
 24. Laudy AE, Rog P, Smolinska-Krol K, Cmiel M, Sloczynska A, Patzer J, Dzierzanowska D, Wolinowska R, Starosciak B, Tyski S. 2017. Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods. *PLoS One* 12:e0180121.
 25. Potron A, Poirel L, Nordmann P. 2015. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 45:568-85.
 26. Bae IK, Suh B, Jeong SH, Wang KK, Kim YR, Yong D, Lee K. 2014. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Korea producing β -lactamases with extended-spectrum activity. *Diagn Microbiol Infect Dis* 79:373-7.
 27. Glupczynski Y, Bogaerts P, Deplano A, Berhin C, Huang TD, Van Eldere J, Rodriguez-Villalobos H. 2010. Detection and characterization of class A

- extended-spectrum- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 65:866-71.
28. Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. 1995. OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1881-4.
 29. Poirel L, Naas T, Nordmann P. 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54:24-38.
 30. Bush K, Bradford PA. 2020. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. *Clin Microbiol Rev* 33.
 31. Somboro AM, Osei Sekyere J, Amoako DG, Essack SY, Bester LA. 2018. Diversity and proliferation of metallo- β -lactamases: a clarion call for clinically effective metallo- β -lactamase inhibitors. *Appl Environ Microbiol* 84.
 32. Yoon EJ, Jeong SH. 2021. Mobile carbapenemase genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 12:614058.
 33. Boyd SE, Livermore DM, Hooper DC, Hope WW. 2020. Metallo- β -lactamases: structure, function, epidemiology, treatment options, and the development pipeline. *Antimicrob Agents Chemother* 64.
 34. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorli L, Luque S, Gomez-Zorrilla S, Benito N, Grau S. 2019. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev* 32.
 35. Walsh TR. 2010. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 36 Suppl 3:S8-14.
 36. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 35:147-51.
 37. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K, Kato N, Ohta M. 1996. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. *J Clin Microbiol* 34:2909-13.
 38. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N. 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 38:71-8.

39. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. 1999. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1584-90.
40. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 44:891-7.
41. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. 2005. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 18:306-25.
42. Patzer J, Toleman MA, Deshpande LM, Kaminska W, Dzierzanowska D, Bennett PM, Jones RN, Walsh TR. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *bla*_{VIM-4} gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001). *J Antimicrob Chemother* 53:451-6.
43. Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. 2003. Evolution of an integron carrying *bla*_{VIM-2} in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 52:116-9.
44. Kazmierczak KM, Rabine S, Hackel M, McLaughlin RE, Biedenbach DJ, Bouchillon SK, Sahm DF, Bradford PA. 2016. Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:1067-78.
45. Del Barrio-Tofino E, Lopez-Causape C, Oliver A. 2020. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update. *Int J Antimicrob Agents* 56:106196.
46. Kos VN, Deraspe M, McLaughlin RE, Whiteaker JD, Roy PH, Alm RA, Corbeil J, Gardner H. 2015. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 59:427-36.
47. Edelstein MV, Skleenova EN, Shevchenko OV, D'Souza J W, Tapalski DV, Azizov IS, Sukhorukova MV, Pavlukov RA, Kozlov RS, Toleman MA, Walsh TR. 2013. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* 13:867-76.

48. Liakopoulos A, Mavroidi A, Katsifas EA, Theodosiou A, Karagouni AD, Miriagou V, Petinaki E. 2013. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. *BMC Infect Dis* 13:505.
49. Del Barrio-Tofino E, Zamorano L, Cortes-Lara S, Lopez-Causape C, Sanchez-Diener I, Cabot G, Bou G, Martinez-Martinez L, Oliver A, Group G-SRPs. 2019. Spanish nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. *J Antimicrob Chemother* 74:1825-1835.
50. Martinez-Garcia L, Gonzalez-Alba JM, Baquero F, Canton R, Galan JC. 2018. Ceftazidime is the key diversification and selection driver of VIM-type carbapenemases. *mBio* 9.
51. Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galleni M, Amicosante G, Frere JM, Rossolini GM. 2003. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 51:257-66.
52. Botelho J, Grosso F, Quinteira S, Brilhante M, Ramos H, Peixe L. 2018. Two decades of *bla*_{VIM-2}-producing *Pseudomonas aeruginosa* dissemination: an interplay between mobile genetic elements and successful clones. *J Antimicrob Chemother* 73:873-882.
53. Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN. 2014. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother* 69:1804-14.
54. Dortet L, Flonta M, Boudehen YM, Creton E, Bernabeu S, Vogel A, Naas T. 2015. Dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* in Romania. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7100-3.
55. Fiett J, Baraniak A, Mrowka A, Fleischer M, Drulis-Kawa Z, Naumiuk L, Samet A, Hryniewicz W, Gniadkowski M. 2006. Molecular epidemiology of acquired-metallo- β -lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 50:880-6.
56. Ghasemian A, Salimian Rizi K, Rajabi Vardanjani H, Nojoomi F. 2018. Prevalence of clinically isolated metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*, coding genes, and possible risk factors in Iran. *Iran J Pathol* 13:1-9.

57. Giani T, Arena F, Pollini S, Di Pilato V, D'Andrea MM, Henrici De Angelis L, Bassetti M, Rossolini GM, *Pseudomonas aeruginosa* Working G. 2018. Italian nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* from invasive infections: activity of ceftolozane/tazobactam and comparators, and molecular epidemiology of carbapenemase producers. *J Antimicrob Chemother* 73:664-671.
58. Libisch B, Muzslay M, Gacs M, Minarovits J, Knausz M, Watine J, Ternak G, Kenez E, Kustos I, Rokusz L, Szeles K, Balogh B, Fuzi M. 2006. Molecular epidemiology of VIM-4 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* sp. isolates in Hungary. *Antimicrob Agents Chemother* 50:4220-3.
59. Moyo S, Haldorsen B, Aboud S, Blomberg B, Maselle SY, Sundsfjord A, Langeland N, Samuelsen O. 2015. Identification of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* from Tanzania is associated with sequence types 244 and 640 and the location of *bla*_{VIM-2} in a TniC integron. *Antimicrob Agents Chemother* 59:682-5.
60. Pitout JD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL. 2007. Molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. *J Clin Microbiol* 45:294-8.
61. Samuelsen O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M, Lia A, Ranheim TE, Rajendra Y, Hermansen NO, Walsh TR, Giske CG. 2010. Molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. *Antimicrob Agents Chemother* 54:346-52.
62. Turton JF, Wright L, Underwood A, Witney AA, Chan YT, Al-Shahib A, Arnold C, Doumith M, Patel B, Planche TD, Green J, Holliman R, Woodford N. 2015. High-resolution analysis by whole-genome sequencing of an international lineage (sequence type 111) of *Pseudomonas aeruginosa* associated with metallo-carbapenemases in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 53:2622-31.
63. Viedma E, Juan C, Villa J, Barrado L, Orellana MA, Sanz F, Otero JR, Oliver A, Chaves F. 2012. VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. *Emerg Infect Dis* 18:1235-41.

64. Yu YS, Qu TT, Zhou JY, Wang J, Li HY, Walsh TR. 2006. Integrons containing the VIM-2 metallo- β -lactamase gene among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from different Chinese hospitals. *J Clin Microbiol* 44:4242-5.
65. Chen Y, Sun M, Wang M, Lu Y, Yan Z. 2014. Dissemination of IMP-6-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST244 in multiple cities in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33:1181-7.
66. Hong JS, Yoon EJ, Lee H, Jeong SH, Lee K. 2016. Clonal dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 isolates carrying *bla*_{IMP-6} and emergence of *bla*_{GES-24} and *bla*_{IMP-10} on novel genomic islands PGI-15 and -16 in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 60:7216-7223.
67. Pagani L, Colinon C, Migliavacca R, Labonia M, Docquier JD, Nucleo E, Spalla M, Li Bergoli M, Rossolini GM. 2005. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo- β -lactamase. *J Clin Microbiol* 43:3824-8.
68. Papagiannitsis CC, Medvecky M, Chudejova K, Skalova A, Rotova V, Spanelova P, Jakubu V, Zemlickova H, Hrabak J, Czech Participants of the European Antimicrobial Resistance Surveillance N. 2017. Molecular characterization of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of Czech origin and evidence for clonal spread of extensively resistant sequence type 357 expressing IMP-7 metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
69. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. 2019. NDM metallo- β -lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clin Microbiol Rev* 32.
70. Carattoli A, Fortini D, Galetti R, Garcia-Fernandez A, Nardi G, Orazi D, Capone A, Majolino I, Proia A, Mariani B, Parisi G, Morrone A, Petrosillo N. 2013. Isolation of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type ST235 from a stem cell transplant patient in Italy, May 2013. *Euro Surveill* 18.
71. Janvier F, Jeannot K, Tesse S, Robert-Nicoud M, Delacour H, Rapp C, Merens A. 2013. Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in a sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3408-11.
72. Jovicic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, Kojic M. 2011. Emergence of NDM-1 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas*

- aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother* 55:3929-31.
73. Kulkova N, Babalova M, Sokolova J, Krcmery V. 2015. First report of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing strains in Slovakia. *Microb Drug Resist* 21:117-20.
 74. Mataseje LF, Peirano G, Church DL, Conly J, Mulvey M, Pitout JD. 2016. Colistin-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 654 with *bla*_{NDM-1} arrives in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 60:1794-800.
 75. Paul D, Garg A, Bhattacharjee A. 2017. Occurrence of *bla*_{NDM-1} and *bla*_{NDM-5} in a tertiary referral hospital of North India. *Microb Drug Resist* 23:815-821.
 76. Rahman M, Prasad KN, Pathak A, Pati BK, Singh A, Ovejero CM, Ahmad S, Gonzalez-Zorn B. 2015. RmtC and RmtF 16S rRNA methyltransferase in NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Emerg Infect Dis* 21:2059-62.
 77. Tada T, Hishinuma T, Watanabe S, Uchida H, Tohya M, Kuwahara-Arai K, Mya S, Zan KN, Kirikae T, Tin HH. 2019. Molecular characterization of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother* 63.
 78. Teo JW, La MV, Jureen R, Lin RT. 2015. Emergence of a New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore. *Emerg Microbes Infect* 4:e72.
 79. Zafer MM, Amin M, El Mahallawy H, Ashour MS, Al Agamy M. 2014. First report of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Egypt. *Int J Infect Dis* 29:80-1.
 80. Cai S, Chen Y, Song D, Kong J, Wu Y, Lu H. 2016. Study on the resistance mechanism via outer membrane protein OprD2 and metal β -lactamase expression in the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa*. *Exp Ther Med* 12:2869-2872.
 81. Hopkins KL, Meunier D, Findlay J, Mustafa N, Parsons H, Pike R, Wright L, Woodford N. 2016. SPM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK. *J Med Microbiol* 65:696-697.
 82. Kateete DP, Nakanjako R, Namugenyi J, Erume J, Joloba ML, Najjuka CF. 2016. Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* at Mulago Hospital in Kampala, Uganda (2007-2009). *Springerplus* 5:1308.

83. Picao RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. 2009. Diversity of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3908-13.
84. Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. 2010. First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 54:582.
85. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 50:673-9.
86. Deshpande LM, Jones RN, Woosley LN, Castanheira M. 2014. Retrospective molecular analysis of DIM-1 metallo- β -lactamase discovered in *Pseudomonas stutzeri* from India in 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 58:596-8.
87. Sun F, Zhou D, Wang Q, Feng J, Feng W, Luo W, Liu Y, Qiu X, Yin Z, Xia P. 2016. Genetic characterization of a novel *bla*_{DIM-2}-carrying megaplasmid p12969-DIM from clinical *Pseudomonas putida*. *J Antimicrob Chemother* 71:909-12.
88. Sun F, Zhou D, Wang Q, Feng J, Feng W, Luo W, Zhang D, Liu Y, Qiu X, Yin Z, Chen W, Xia P. 2016. The first report of detecting the *bla*_{SIM-2} gene and determining the complete sequence of the SIM-encoding plasmid. *Clin Microbiol Infect* 22:347-351.
89. Tada T, Shimada K, Satou K, Hirano T, Pokhrel BM, Sherchand JB, Kirikae T. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Nepal coproducing metallo- β -lactamases and 16S rRNA methyltransferases. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
90. Janice J, Agyepong N, Owusu-Ofori A, Govinden U, Essack SY, Samuelson O, Sundsfjord A, Pedersen T. 2021. Carbapenem-resistance determinants acquired through novel chromosomal integrations in XDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* doi:10.1128/AAC.00289-21.
91. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P. 2010. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2420-4.

92. Pfennigwerth N, Lange F, Belmar Campos C, Hentschke M, Gatermann SG, Kaase M. 2017. Genetic and biochemical characterization of HMB-1, a novel subclass B1 metallo- β -lactamase found in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother* 72:1068-1073.
93. Wendel AF, Brodner AH, Wydra S, Ressina S, Henrich B, Pfeffer K, Toleman MA, Mackenzie CR. 2013. Genetic characterization and emergence of the metallo- β -lactamase GIM-1 in *Pseudomonas* spp. and *Enterobacteriaceae* during a long-term outbreak. *Antimicrob Agents Chemother* 57:5162-5.
94. Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD, Rossolini GM. 2013. FIM-1, a new acquired metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 57:410-6.
95. Yong D, Toleman MA, Bell J, Ritchie B, Pratt R, Ryley H, Walsh TR. 2012. Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo- β -lactamase gene, *bla*_{AIM-1}, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 56:6154-9.
96. Boyd DA, Lisboa LF, Rennie R, Zhanel GG, Dingle TC, Mulvey MR. 2019. Identification of a novel metallo- β -lactamase, CAM-1, in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Canada. *J Antimicrob Chemother* 74:1563-1567.
97. Alonso H, Gready JE. 2006. Integron-sequestered dihydrofolate reductase: a recently redeployed enzyme. *Trends Microbiol* 14:236-42.
98. Naas T, Poirel L, Nordmann P. 2008. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 1:42-52.
99. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 31.
100. Hall RM. 2012. Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. *Ann N Y Acad Sci* 1267:71-8.
101. Drouin F, Melancon J, Roy PH. 2002. The *IntI*-like tyrosine recombinase of *Shewanella oneidensis* is active as an integron integrase. *J Bacteriol* 184:1811-5.
102. Domingues S, da Silva GJ, Nielsen KM. 2012. Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mob Genet Elements* 2:211-223.
103. Moura A, Soares M, Pereira C, Leitao N, Henriques I, Correia A. 2009. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics* 25:1096-8.

104. Severino P, Magalhaes VD. 2004. Integrons as tools for epidemiological studies. *Clin Microbiol Infect* 10:156-62.
105. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev* 70:296-316.
106. Carattoli A. 2013. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* 303:298-304.
107. Bonnin RA, Poirel L, Nordmann P, Eikmeyer FG, Wibberg D, Puhler A, Schluter A. 2013. Complete sequence of broad-host-range plasmid pNOR-2000 harbouring the metallo- β -lactamase gene *bla*_{VIM-2} from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 68:1060-5.
108. Botelho J, Grosso F, Peixe L. 2017. Characterization of the pJB12 plasmid from *Pseudomonas aeruginosa* reveals Tn6352, a novel putative transposon associated with mobilization of the *bla*_{VIM-2}-harboring In58 integron. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
109. Botelho J, Grosso F, Quinteira S, Mabrouk A, Peixe L. 2017. The complete nucleotide sequence of an IncP-2 megaplasmid unveils a mosaic architecture comprising a putative novel *bla*_{VIM-2}-harbouring transposon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 72:2225-2229.
110. Cazares A, Moore MP, Hall JPJ, Wright LL, Grimes M, Emond-Rheault JG, Pongchaikul P, Santanirand P, Levesque RC, Fothergill JL, Winstanley C. 2020. A megaplasmid family driving dissemination of multidrug resistance in *Pseudomonas*. *Nat Commun* 11:1370.
111. Feng W, Zhou D, Wang Q, Luo W, Zhang D, Sun Q, Tong Y, Chen W, Sun F, Xia P. 2016. Dissemination of IMP-4-encoding pIMP-HZ1-related plasmids among *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in a Chinese teaching hospital. *Sci Rep* 6:33419.
112. San Millan A, Toll-Riera M, Escudero JA, Canton R, Coque TM, MacLean RC. 2015. Sequencing of plasmids pAMBL1 and pAMBL2 from *Pseudomonas aeruginosa* reveals a *bla*_{VIM-1} amplification causing high-level carbapenem resistance. *J Antimicrob Chemother* 70:3000-3.
113. van der Zee A, Kraak WB, Burggraaf A, Goessens WHF, Pirovano W, Ossewaarde JM, Tommassen J. 2018. Spread of carbapenem resistance by transposition and conjugation among *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 9:2057.

114. Vilacoba E, Quiroga C, Pistorio M, Famiglietti A, Rodriguez H, Kovensky J, Deraspe M, Raymond F, Roy PH, Centron D. 2014. A *bla*_{VIM-2} plasmid disseminating in extensively drug-resistant clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 58:7017-8.
115. Xiong J, Alexander DC, Ma JH, Deraspe M, Low DE, Jamieson FB, Roy PH. 2013. Complete sequence of pOZ176, a 500-kilobase IncP-2 plasmid encoding IMP-9-mediated carbapenem resistance, from outbreak isolate *Pseudomonas aeruginosa* 96. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3775-82.
116. Zeng L, Zhan Z, Hu L, Jiang X, Zhang Y, Feng J, Gao B, Zhao Y, Yang W, Yang H, Yin Z, Zhou D. 2019. Genetic characterization of a *bla*_{VIM-24}-carrying IncP-7b plasmid p1160-VIM and a *bla*_{VIM-4}-harboring integrative and conjugative element Tn6413 from clinical *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 10:213.
117. Li H, Toleman MA, Bennett PM, Jones RN, Walsh TR. 2008. Complete Sequence of p07-406, a 24,179-base-pair plasmid harboring the *bla*_{VIM-7} metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3099-105.
118. Bryan LE, Semaka SD, Van den Elzen HM, Kinnear JE, Whitehouse RL. 1973. Characteristics of R931 and other *Pseudomonas aeruginosa* R factors. *Antimicrob Agents Chemother* 3:625-37.
119. Jacoby GA, Sutton L, Knobel L, Mammen P. 1983. Properties of IncP-2 plasmids of *Pseudomonas* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 24:168-75.
120. Kusumawardhani H, van Dijk D, Hosseini R, de Winde JH. 2020. Novel toxin-antitoxin module SlvT-SlvA regulates megaplasmid stability and incites solvent tolerance in *Pseudomonas putida* S12. *Appl Environ Microbiol* 86.
121. Weiser R, Green AE, Bull MJ, Cunningham-Oakes E, Jolley KA, Maiden MCJ, Hall AJ, Winstanley C, Weightman AJ, Donoghue D, Amezcua A, Connor TR, Mahenthiralingam E. 2019. Not all *Pseudomonas aeruginosa* are equal: strains from industrial sources possess uniquely large multireplicon genomes. *Microb Genom* 5.
122. Jiang X, Yin Z, Yuan M, Cheng Q, Hu L, Xu Y, Yang W, Yang H, Zhao Y, Zhao X, Gao B, Dai E, Song Y, Zhou D. 2020. Plasmids of novel incompatibility group Inc_{pRBL16} from *Pseudomonas* species. *J Antimicrob Chemother* 75:2093-2100.

123. Li Z, Cai Z, Cai Z, Zhang Y, Fu T, Jin Y, Cheng Z, Jin S, Wu W, Yang L, Bai F. 2020. Molecular genetic analysis of an XDR *Pseudomonas aeruginosa* ST664 clone carrying multiple conjugal plasmids. *J Antimicrob Chemother* 75:1443-1452.
124. Liu J, Yang L, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, Shirtliff ME. 2018. Complete sequence of pBM413, a novel multidrug resistance megaplasmid carrying *qnrVC6* and *bla_{IMP-45}* from *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 51:145-150.
125. Pincus NB, Bachta KER, Ozer EA, Allen JP, Pura ON, Qi C, Rhodes NJ, Marty FM, Pandit A, Mekalanos JJ, Oliver A, Hauser AR. 2019. Long-term persistence of an extensively drug resistant subclade of globally distributed *Pseudomonas aeruginosa* clonal complex 446 in an academic medical center. *Clin Infect Dis* doi:10.1093/cid/ciz973.
126. Yuan M, Chen H, Zhu X, Feng J, Zhan Z, Zhang D, Chen X, Zhao X, Lu J, Xu J, Zhou D, Li J. 2017. pSY153-MDR, a p12969-DIM-related mega plasmid carrying *bla_{IMP-45}* and *armA*, from clinical *Pseudomonas putida*. *Oncotarget* 8:68439-68447.
127. Zhang X, Wang L, Li D, Li P, Yuan L, Yang F, Guo Q, Wang M. 2021. An IncP-2 plasmid sublineage associated with dissemination of *bla_{IMP-45}* among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Emerg Microbes Infect* 10:442-449.
128. Delavat F, Miyazaki R, Carraro N, Pradervand N, van der Meer JR. 2017. The hidden life of integrative and conjugative elements. *FEMS Microbiol Rev* 41:512-537.
129. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. 2010. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:621-41.
130. Guglielmini J, Quintais L, Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F, Rocha EP. 2011. The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet* 7:e1002222.
131. Botelho J, Mourao J, Roberts AP, Peixe L. 2020. Comprehensive genome data analysis establishes a triple whammy of carbapenemases, ICEs and multiple clinically relevant bacteria. *Microb Genom* 6.
132. Botelho J, Roberts AP, Leon-Sampedro R, Grosso F, Peixe L. 2018. Carbapenemases on the move: it's good to be on ICEs. *Mob DNA* 9:37.

133. Botelho J, Schulenburg H. 2021. The role of integrative and conjugative elements in antibiotic resistance evolution. *Trends Microbiol* 29:8-18.
134. Freschi L, Vincent AT, Jeukens J, Emond-Rheault JG, Kukavica-Ibrulj I, Dupont MJ, Charette SJ, Boyle B, Levesque RC. 2019. The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity. *Genome Biol Evol* 11:109-120.
135. Ozer EA, Nnah E, Didelot X, Whitaker RJ, Hauser AR. 2019. The population structure of *Pseudomonas aeruginosa* is characterized by genetic isolation of *exoU*⁺ and *exoS*⁺ lineages. *Genome Biol Evol* 11:1780-1796.
136. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, Deschaght P, Vaneechoutte M, Jennes S, Pitt T, De Vos D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One* 4:e7740.
137. Lee C, Klockgether J, Fischer S, Treck J, Tummler B, Romling U. 2020. Why? - Successful *Pseudomonas aeruginosa* clones with a focus on clone C. *FEMS Microbiol Rev* 44:740-762.
138. Oliver A, Mulet X, Lopez-Causape C, Juan C. 2015. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 21-22:41-59.
139. Baquero F. 2004. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2:510-8.
140. Guzvinec M, Izdebski R, Butic I, Jelic M, Abram M, Koscak I, Baraniak A, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Tambic Andrasevic A. 2014. Sequence types 235, 111, and 132 predominate among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Croatia. *Antimicrob Agents Chemother* 58:6277-83.
141. Khuntayaporn P, Yamprayoonswat W, Yasawong M, Chomnawang MT. 2019. Dissemination of carbapenem-resistance among multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo- β -lactamase genes, including the novel *bla*_{IMP-65} gene in Thailand. *Infect Chemother* 51:107-118.
142. Kitao T, Tada T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Shimada K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. 2012. Emergence of a novel multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain producing IMP-type metallo- β -lactamases and AAC(6')-Iae in Japan. *Int J Antimicrob Agents* 39:518-21.

143. Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M, Musilek M. 2010. Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Res Microbiol* 161:234-42.
144. Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, Hocquet D. 2018. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin Microbiol Infect* 24:258-266.
145. Van der Bij AK, Van der Zwan D, Peirano G, Severin JA, Pitout JD, Van Westreenen M, Goessens WH, Group M-PSS. 2012. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Netherlands: the nationwide emergence of a single sequence type. *Clin Microbiol Infect* 18:E369-72.
146. Cabrolier N, Sauget M, Bertrand X, Hocquet D. 2015. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *J Clin Microbiol* 53:1395-8.
147. Gniadkowski M, Skoczyńska A, Fiett J, Trzciński K, Hryniewicz W. 1998. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital infections to antibiotics. *Pol Merkur Lekarski* 5:346-50.
148. Patzer J, Dzierzanowska D. 1991. The resistance patterns and serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from children. *J Antimicrob Chemother* 28:869-75.
149. Patzer J, Dzierzanowska D. 1994. The incidence of serotype O12 and multiresistance amongst *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 34:165-70.
150. Patzer JA, Dzierzanowska D. 2007. Increase of imipenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Polish paediatric hospital (1993-2002). *Int J Antimicrob Agents* 29:153-8.
151. Gniadkowski M, Mrówka A, Fiett J, Empel J, Hryniewicz W. 2004. Przeglądowe badanie wrażliwości na leki klinicznych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* w Polsce, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego.
152. Patzer JA, Walsh TR, Weeks J, Dzierzanowska D, Toleman MA. 2009. Emergence and persistence of integron structures harbouring VIM genes in the Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, 1998-2006. *J Antimicrob Chemother* 63:269-73.
153. Aminov RI. 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol* 1:134.

154. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. 2011. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4943-60.
155. Rasmussen BA, Bush K. 1997. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 41:223-32.
156. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. 2015. Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother* 47:81-97.
157. Pfizer. 2021. Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance. <https://atlas-surveillance.com>. Accessed 25.08.2021.
158. ECDC. 2020. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019.
159. Meletis G. 2016. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis* 3:15-21.
160. Meletis G, Vavatsi N, Exindari M, Protonotariou E, Sianou E, Haitoglou C, Sofianou D, Pournaras S, Diza E. 2014. Accumulation of carbapenem resistance mechanisms in VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* under selective pressure. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33:253-8.
161. Urbanowicz P, Izdebski R, Baraniak A, Zabicka D, Ziolkowski G, Hryniewicz W, Gniadkowski M. 2019. *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands. *J Antimicrob Chemother* 74:3117-3119.
162. Literacka E, Żabicka D, Izdebski R, Biedrzycka M, Urbanowicz P, Gniadkowski M. 2021. Enterobacteria co-producing various carbapenemases in Polish hospitals. National Medicines Institute.
163. Urbanowicz P, Izdebski R, Żabicka D, Gniadkowski M. 2021. Molecular epidemiology of MBL-producing *Pseudomonas putida* group in Poland, 2003-2016. National Medicines Institute.
164. Giakkoupi P, Petrikos G, Tzouveleki LS, Tsonas S, Legakis NJ, Vatopoulos AC, Group WGS. 2003. Spread of integron-associated VIM-type metallo- β -lactamase genes among imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol* 41:822-5.
165. Rossolini GM, Luzzaro F, Migliavacca R, Mugnaioli C, Pini B, De Luca F, Perilli M, Pollini S, Spalla M, Amicosante G, Toniolo A, Pagani L. 2008. First

- countrywide survey of acquired metallo- β -lactamases in gram-negative pathogens in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4023-9.
166. Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y, Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance G. 2003. VIM- and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis* 9:868-71.
 167. Kimura S, Alba J, Shiroto K, Sano R, Niki Y, Maesaki S, Akizawa K, Kaku M, Watanuki Y, Ishii Y, Yamaguchi K. 2005. Clonal diversity of metallo- β -lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. *J Clin Microbiol* 43:458-61.
 168. Mano Y, Saga T, Ishii Y, Yoshizumi A, Bonomo RA, Yamaguchi K, Tateda K. 2015. Molecular analysis of the integrons of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected by nationwide surveillance programs across Japan. *BMC Microbiol* 15:41.
 169. Hong JS, Kim JO, Lee H, Bae IK, Jeong SH, Lee K. 2015. Characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *Infect Chemother* 47:33-40.
 170. Riera E, Cabot G, Mulet X, Garcia-Castillo M, del Campo R, Juan C, Canton R, Oliver A. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother* 66:2022-7.
 171. Edelstein MV, Shek EA, Sukhorukova MV, Skleenova EY, Ivanchik NV, Shajdullina ER, Mikotina AV, Kuzmenkov AY, Dekhnich AV, Kozlov RS, Semyonova NV, Slepakova SA, Shepotajlova NV, Strebkova VV, Rybina NA, Yaranceva NZ, Perevalova EY, Rozanova SM, Nagovicina SG, Moldovanu MG, Nasybullova ZZ, Arkhipenko MV, Shakhmuradyan RM, Nizhegorodceva IA, Varibus EV, Aleksandrova IA, Lazareva AV, Kryzhanovskaya OA, Markelova NN, Chernyavskaya YL, Lebedeva EV, Kirillova GS, Bekker GG, Popova LD, Elokhina EV, Smol'kova YE, Zinov'ev DY, Ityaeva LN, Blinova GY, Zubareva NA, Vityazeva VP, Plaksina MG, Kucevalova OY, Panova NI, Suborova TN, Polukhina OV, Voroshilova TM, Churikova EM, Moskvitina EN, Krechikova OI, et al. 2019. Antimicrobial resistance, carbapenemase production, and genotypes of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Russia:

- results of multicenter epidemiological study "MARATHON 2015–2016". *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy* 21:160-170.
172. Żabicka D, Zieniuk B, Urbanowicz P, Wygoda W, Literacka E, Herda M, Malinowska K, Hryniewicz W. 2019. Analiza epidemiologiczna i lekowrażliwość *Pseudomonas aeruginosa* izolowanych z krwi w 2018 roku w Polsce, abstr. XXIII Sympozjum Naukowe "Postępy w Medycynie Zakażeń", Warsaw.
 173. Eybpoosh S, Haghdoost AA, Mostafavi E, Bahrampour A, Azadmanesh K, Zolala F. 2017. Molecular epidemiology of infectious diseases. *Electron Physician* 9:5149-5158.
 174. Deplano A, Denis O, Poirel L, Hocquet D, Nonhoff C, Byl B, Nordmann P, Vincent JL, Struelens MJ. 2005. Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 43:1198-204.
 175. Riccio ML, Pallecchi L, Docquier JD, Cresti S, Catania MR, Pagani L, Lagatolla C, Cornaglia G, Fontana R, Rossolini GM. 2005. Clonal relatedness and conserved integron structures in epidemiologically unrelated *Pseudomonas aeruginosa* strains producing the VIM-1 metallo- β -lactamase from different Italian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 49:104-10.
 176. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 42:5644-9.
 177. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3140-5.
 178. Maiden MC. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60:561-88.
 179. de Sales RO, Migliorini LB, Puga R, Kocsis B, Severino P. 2020. A core genome multilocus sequence typing scheme for *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 11:1049.
 180. Stanton RA, McAllister G, Daniels JB, Breaker E, Vlachos N, Gable P, Moulton-Meissner H, Halpin AL. 2020. Development and application of a core

- genome multilocus sequence typing scheme for the healthcare-associated pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 58.
181. Tonnies H, Prior K, Harmsen D, Mellmann A. 2021. Establishment and evaluation of a core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 59.
 182. Miyoshi-Akiyama T, Tada T, Ohmagari N, Viet Hung N, Tharavichitkul P, Pokhrel BM, Gniadkowski M, Shimojima M, Kirikae T. 2017. Emergence and spread of epidemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Genome Biol Evol 9:3238-3245.
 183. Molina-Mora JA, Chinchilla-Montero D, Garcia-Batan R, Garcia F. 2021. Genomic context of the two integrons of ST-111 *Pseudomonas aeruginosa* AG1: A VIM-2-carrying old-acquaintance and a novel IMP-18-carrying integron. Infect Genet Evol 89:104740.
 184. Poirel L, Lambert T, Turkoglu S, Ronco E, Gaillard J, Nordmann P. 2001. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*_{VIM-2} carbapenem-hydrolyzing β -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. Antimicrob Agents Chemother 45:546-52.
 185. Liu H, Kong W, Yang W, Chen G, Liang H, Zhang Y. 2018. Multilocus sequence typing and variations in the *oprD* gene of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a hospital in China. Infect Drug Resist 11:45-54.
 186. Schaumburg F, Bletz S, Mellmann A, Becker K, Idelevich EA. 2019. Comparison of methods to analyse susceptibility of German MDR/XDR *Pseudomonas aeruginosa* to ceftazidime/avibactam. Int J Antimicrob Agents 54:255-260.
 187. Slekovec C, Plantin J, Cholley P, Thouverez M, Talon D, Bertrand X, Hocquet D. 2012. Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. PLoS One 7:e49300.
 188. Bocharova Y, Savinova T, Lazareva A, Polikarpova S, Gordinskaya N, Mayanskiy N, Chebotar I. 2020. Genotypes, carbapenemase carriage, integron diversity and *oprD* alterations among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Russia. Int J Antimicrob Agents 55:105899.

189. Rojo-Bezares B, Cavalie L, Dubois D, Oswald E, Torres C, Saenz Y. 2016. Characterization of carbapenem resistance mechanisms and integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains from blood samples in a French hospital. *J Med Microbiol* 65:311-319.
190. Wright LL, Turton JF, Livermore DM, Hopkins KL, Woodford N. 2015. Dominance of international 'high-risk clones' among metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the UK. *J Antimicrob Chemother* 70:103-10.
191. Zowawi HM, Syrmis MW, Kidd TJ, Balkhy HH, Walsh TR, Al Johani SM, Al Jindan RY, Alfaresi M, Ibrahim E, Al-Jardani A, Al Salman J, Dashti AA, Sidjabat HE, Baz O, Trembizki E, Whiley DM, Paterson DL. 2018. Identification of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in selected hospitals of the Gulf Cooperation Council States: dominance of high-risk clones in the region. *J Med Microbiol* 67:846-853.
192. McAulay K, Schuetz AN, Fauntleroy K, Shen L, Merveille YM, Deroncelay A, Cole N, Fitzgerald DW, Ocheretina O. 2021. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in healthcare facilities in Port-au-Prince, Haiti. *J Glob Antimicrob Resist* 25:60-65.
193. Pasteran F, Faccone D, Gomez S, De Bunder S, Spinelli F, Rapoport M, Petroni A, Galas M, Corso A, *Pseudomonas aeruginosa* KPCG. 2012. Detection of an international multiresistant clone belonging to sequence type 654 involved in the dissemination of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Argentina. *J Antimicrob Chemother* 67:1291-3.
194. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD, Riccio ML, Perilli M, Coli A, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. 2002. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- β -lactamase. *J Clin Microbiol* 40:4051-5.
195. Hrabak J, Cervena D, Izdebski R, Duljasz W, Gniadkowski M, Fridrichova M, Urbaskova P, Zemlickova H. 2011. Regional spread of *Pseudomonas aeruginosa* ST357 producing IMP-7 metallo- β -lactamase in Central Europe. *J Clin Microbiol* 49:474-5.
196. Di Pilato V, Antonelli A, Giani T, Henrici De Angelis L, Rossolini GM, Pollini S. 2019. Identification of a novel plasmid lineage associated with the

- dissemination of metallo- β -lactamase genes among pseudomonads. *Front Microbiol* 10:1504.
197. Pobiega M, Maciag J, Chmielarczyk A, Romaniszyn D, Pomorska-Wesolowska M, Ziolkowski G, Heczko PB, Bulanda M, Wojkowska-Mach J. 2015. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with urinary tract infections in Southern Poland. *Diagn Microbiol Infect Dis* 83:295-7.
198. Kindu M, Derseh L, Gelaw B, Moges F. 2020. Carbapenemase-producing non-glucose-fermenting gram-negative bacilli in Africa, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. *Int J Microbiol* 2020:9461901.

11. Statements of co-authors of joint publications

Warszawa, 6.12.2021
.....
(miejsowość, data)

dr hab. Radosław Izdebski, prof. NIL
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Molecular and genomic epidemiology of VIM/IMP-like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in Poland, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: konsultacje merytoryczne odnośnie doboru narzędzi bioinformatycznych, część genomicznych analiz filogenetycznych.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **10 %**.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako **55 %**, obejmował

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu głównej części badań (przeprowadzenie analiz molekularnych oraz genomicznych, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz udział w tworzeniu finałowej wersji manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

.....


(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 6.12.2024
(miejsowość, data)

dr hab. Anna Baraniak, prof. NIL
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Molecular and genomic epidemiology of VIM/IMP-like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in Poland, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: pozyskanie danych epidemiologicznych.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako 55 %, obejmował

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu głównej części badań (przeprowadzenie analiz molekularnych oraz genomicznych, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz udział w tworzeniu finałowej wersji manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

A. Baraniak

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 6/12/2021
(miejsowość, data)

dr Dorota Żabicka
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Molecular and genomic epidemiology of VIM/IMP-like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in Poland, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: zbiórka oraz wstępne badania mikrobiologiczne izolatów.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako 55 %, obejmował

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu głównej części badań (przeprowadzenie analiz molekularnych oraz genomicznych, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz udział w tworzeniu finałowej wersji manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 7.12.2021r.
.....
(miejsowość, data)

prof. dr hab. Waleria Hryniewicz
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Molecular and genomic epidemiology of VIM/IMP-like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in Poland, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: omówienie i konsultacja wyników epidemiologicznych, wsparcie w interpretacji tychże.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako 55 %, obejmował

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu głównej części badań (przeprowadzenie analiz molekularnych oraz genomicznych, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz udział w tworzeniu finałowej wersji manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 12.12.2021
(miejsowość, data)

prof. dr hab. Marek Gniadkowski
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Molecular and genomic epidemiology of VIM/IMP-like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in Poland, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: udział w wyborze metodologii, analiza epidemiologiczna oraz interpretacja uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **20 %**.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako **55 %**, obejmował

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu głównej części badań (przeprowadzenie analiz molekularnych oraz genomicznych, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz udział w tworzeniu finałowej wersji manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

dr Ibrahim Bitar
(full name)


STATEMENT OF CO-AUTHORS OF JOINT PUBLICATION

As a co-author of the work entitled: Epidemic territorial spread of IncP-2-type VIM-2 carbapenemase-encoding megaplasms in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* populations, I hereby declare that my substantive contribution in the preparation of the published research is: whole-genome-sequencing of the study isolates.

I define my percentage share in the preparation of the publication as 10 %.

I describe the contribution of Paweł Urbanowicz to the creation of the publication as 50 %, and it included: conceptualization, defining the methodology and performing the main part of the research (microbiological, molecular and genomic analyses, and publication of nucleotide sequences in public databases), interpreting the obtained results and participating in the preparation of the manuscript final version.

At the same time, I consent to use the above-mentioned work as part of the doctoral dissertation of Paweł Urbanowicz.



.....
(signature)

Wojasz 6.12.2021 r.
(miejscowość, data)

dr hab. Radosław Izdebski, prof. NIL
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Epidemic territorial spread of IncP-2-type VIM-2 carbapenemase-encoding megaplasms in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* populations, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: konsultacje merytoryczne odnośnie doboru narzędzi bioinformatycznych.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako 50 %, obejmował

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu głównej części badań (przeprowadzenie analiz mikrobiologicznych, molekularnych oraz genomicznych, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz udział w tworzeniu finałowej wersji manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa 6.12.2021
(miejscowość, data)

dr hab. Anna Baraniak, prof. NIL
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Epidemic territorial spread of IncP-2-type VIM-2 carbapenemase-encoding megaplasmsids in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* populations, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: pozyskanie danych epidemiologicznych.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako 50 %, obejmował

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu głównej części badań (przeprowadzenie analiz mikrobiologicznych, molekularnych oraz genomicznych, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz udział w tworzeniu finałowej wersji manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 6.12.2021
(miejscowość, data)

dr Elżbieta Literacka
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Epidemic territorial spread of IncP-2-type VIM-2 carbapenemase-encoding megaplasms in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* populations, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: badanie lekowrażliwości oraz interpretacja wyników.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako 50 %, obejmował

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu głównej części badań (przeprowadzenie analiz mikrobiologicznych, molekularnych oraz genomicznych, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz udział w tworzeniu finałowej wersji manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Elżbieta Literacka

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

prof. Jaroslav Hrabák
(full name)

Pilsen, 6th December, 2021

STATEMENT OF CO-AUTHORS OF JOINT PUBLICATION

As a co-author of the work entitled: Epidemic territorial spread of IncP-2-type VIM-2 carbapenemase-encoding megaplasms in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* populations, I hereby declare that my substantive contribution in the preparation of the published research is: substantive supervision related to the whole-genome-sequencing.

I define my percentage share in the preparation of the publication as 5 %.

I describe the contribution of Paweł Urbanowicz to the creation of the publication as 50 %, and it included: conceptualization, defining the methodology and performing the main part of the research (microbiological, molecular and genomic analyses, and publication of nucleotide sequences in public databases), interpreting the obtained results and participating in the preparation of the manuscript final version.

At the same time, I consent to use the above-mentioned work as part of the doctoral dissertation of Paweł Urbanowicz.



.....
(signature)

Włocławek, 6.12.2021,
(miejsowość, data)

prof. dr hab. Marek Gniadkowski
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Epidemic territorial spread of IncP-2-type VIM-2 carbapenemase-encoding megaplasms in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* populations, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: udział w wyborze metodologii, analiza epidemiologiczna oraz interpretacja uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **20 %**.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako **50 %**, obejmował


(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu głównej części badań (przeprowadzenie analiz mikrobiologicznych, molekularnych oraz genomicznych, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz udział w tworzeniu finałowej wersji manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa 6.12.2019.
(miejsowość, data)

dr hab. Radosław Izdebski, prof. NIL
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: sekwencjonowanie genomowe izolatu oraz część analiz bioinformatycznych (potwierdzenie genotypu oraz konsultacja wyników analizy filogenetycznej)

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu badań (przeprowadzenie analiz molekularnych oraz genomicznych, a także badań lekowrażliwości, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz napisanie roboczej wersji tekstu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa 6.12.2021.
(miejsowość, data)

dr hab. Anna Baraniak, prof. NIL
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie części analiz molekularnych (wykrywanie polimorfizmu Tn125) oraz konsultowanie wyników badań lekowrażliwości izolatu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu badań (przeprowadzenie analiz molekularnych oraz genomicznych, a także badań lekowrażliwości, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz napisanie roboczej wersji tekstu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

A. Baraniak
.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Urbanowicz 6/12/2024
(miejscowość, data)

dr Dorota Żabicka
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: doboru antybiotyków do badania lekowrażliwości oraz konsultacji merytorycznej wyników.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował


(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu badań (przeprowadzenie analiz molekularnych oraz genomicznych, a także badań lekowrażliwości, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz napisanie roboczej wersji tekstu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

dr Grzegorz Ziółkowski


OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: wykrycie mechanizmu oporności oraz przesłanie izolatu do dalszych analiz, udzielanie dodatkowych informacji epidemiologicznych.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu badań (przeprowadzenie analiz molekularnych oraz genomicznych, a także badań lekowrażliwości, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz napisanie roboczej wersji tekstu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.


.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 2.12.2021
(miejsowość, data)

prof. dr hab. Waleria Hryniewicz
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: omówienie i konsultacja wyników, wsparcie w interpretacji tychże.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował


(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu badań (przeprowadzenie analiz molekularnych oraz genomicznych, a także badań lekowrażliwości, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz napisanie roboczej wersji tekstu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 6.12.2021.
(miejsowość, data)

prof. dr hab. Marek Gniadkowski
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: udział w konceptualizacji pracy oraz określeniu metodyki, konsultacja uzyskanych wyników oraz korekta manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 15 %.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował

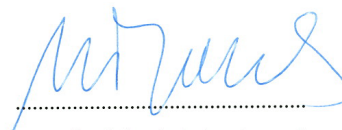
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, określeniu metodyki oraz wykonaniu badań (przeprowadzenie analiz molekularnych oraz genomicznych, a także badań lekowrażliwości, opublikowanie sekwencji nukleotydowych w publicznych bazach danych), interpretacji uzyskanych wyników oraz napisanie roboczej wersji tekstu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 6.12.2021.
(miejsowość, data)

prof. dr hab. Marek Gniadkowski
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Ciężkobrojni" *Pseudomonas aeruginosa*: mechanizmy lekooporności i ich tło genetyczne, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analiza oraz korekta przedstawionej koncepcji pracy oraz poprawienie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 30 %.

Wkład mgr Pawła Urbanowicza w powstawanie publikacji określam jako 70 %, obejmował

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

on: konceptualizację pracy, zebranie i wybór zagadnień oraz napisanie roboczej wersji tekstu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników