

## 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- $\beta$ -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  $\beta$ -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<sub>VIM-2</sub>*. 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.