

Dr n. biol. Agnieszka Chmielarczyk
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Lekarski
Katedra Mikrobiologii
Zakład Bakteriologii, Ekologii Drobnoustrojów i Parazytologii
Kierownik Katedry: Prof. dr hab. med. Małgorzata Bulanda

Autoreferat

/do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego -załącznik 2/

Opis dorobku i osiągnięć naukowych, zawodowych i dydaktycznych

Kraków, 2017

SPIS TREŚCI:

1. ŻYCIORYS NAUKOWY I PRZEBIEG KARIERY ZAWODOWEJ. -----	3
1.1. DANE OSOBOWE: -----	3
1.2. ŻYCIORYS -----	3
2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE: -----	10
3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:---	10
4. PRZEDSTAWIENIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO: -----	11
4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO: -----	11
4.2. CYKL PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO: -----	11
4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW-----	12
4.3.1. Wstęp: -----	12
4.3.2. Cel przeprowadzonych badań: -----	15
4.3.3. Szczegółowe omówienie osiągnięcia naukowego: -----	15
4.3.4. Podsumowanie -----	30
5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH. -----	30
5.1. BADANIA NAD BAKTERIAMI PROBIOTYCZNYMI Z RODZAJU LACTOBACILLUS - ROLĄ PROZDROWOTNĄ DLA CZŁOWIEKA, BEZPIECZEŃSTWEM STOSOWANIA, A TAKŻE METODAMI GENOTYPOWANIA SZCZEPÓW TYCH BAKTERII -----	31
5.2. MOLEKULARNA CHARAKTERYSTYKA PAŁECZEK Z RODZINY ENTEROBACTERIACEAE IZOLOWANYCH Z ZAKAŻEŃ INWAZYJNYCH OD NOWORODKÓW Z BARDZO MAŁĄ MASĄ URODZENIOWĄ, Z UWZGLĘDNIENIEM ICH LEKOOPORNOŚCI ORAZ CZYNNIKÓW WIRULENCJI.-----	32
5.3. BADANIA MAD WIRULENCJĄ I LEKOOPORNOŚCIĄ SZCZEPÓW STAPHYLOCOCCUS AUREUS IZOLOWANYCH Z PRZYPADKÓW ZAKAŻEŃ W RÓŻNYCH GRUPACH PACJENTÓW O SZCZEGÓLNYM NARAŻENIU -----	35
5.4. BADANIA NAD WŁAŚCIWOŚCIAMI PRZECIWDROBNOUSTROJOWYMI STOPÓW MIEDZI I MOŻLIWOŚCIAMI ICH ZASTOSOWANIA W POWIERZCHNIACH UŻYTKOWYCH W ZAKŁADACH OPIEKI ZDROWOTNEJ.-----	38
5.5. PRACE WYKRACZAJĄCE POZA OBSZAR GŁÓWNYCH TEMATYK BADAWCZYCH-----	40

1. Życiorys naukowy i przebieg kariery zawodowej

1.1 Dane osobowe

Imię i nazwisko: Agnieszka Chmielarczyk

Nazwisko rodowe : Kucharska

Data i miejsce urodzenia: 28 wrzesień 1974, Tarnobrzeg

e-mail: agnieszka.chmielarczyk@uj.edu.pl

1.2 Życiorys

Urodziłam się w 1974 r. w Tarnobrzegu, do roku 1993 mieszkałam w Sandomierzu gdzie ukończyłam szkołę podstawową oraz II Liceum Ogólnokształcące im. Tadeusza Kościuszki, klasę o profilu biologiczno-chemicznym. Egzamin dojrzałości zdałam w roku 1993 i wówczas rozpoczęłam studia magisterskie na kierunku Biologia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w Warszawie. Po dwóch latach studiów wybrałam specjalność „mikrobiologia” co ukształtowało moje dalsze zainteresowania. Studia ukończyłam w roku 1998 uzyskaniem stopnia magistra z wynikiem bardzo dobrym. Pracę magisterską wykonywałam w Zakładzie Genetyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, jej temat brzmiał „Klonowanie i charakterystyka genu kodującego syntazę homocysteinową u *Schizosaccharomyces pombe*”, a moim opiekunem naukowym był Profesor dr hab. Andrzej Paszewski. Wyniki mojej pracy magisterskiej zostały opublikowane w 1 pracy oryginalnej. Bezpośrednio po ukończeniu studiów rozpoczęłam pracę w Państwowym Zakładzie Higieny w Warszawie. Jednak po niecałych 9 miesiącach moje życiowe plany związałam Krakowem i zrezygnowałam z pracy w PZH. Po przeprowadzce do Krakowa początkowo krótko pracowałam w Pracowni Farmakologii Biochemicznej w Instytucie Farmakologii PAN na stanowisku inżynierjno-technicznym. W 2000 roku związałam się na dłużej (aż do chwili obecnej) z Katedrą Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. W kwietniu 2000 rozpoczęłam pracę na etacie naukowo-dydaktycznym na stanowisku asystenta w Zakładzie Bakteriologii.

Moje zainteresowania naukowe na początku współpracy z prof. dr. hab. Piotrem Heczko skupione były wokół bakterii probiotycznych. W Zakładzie Bakteriologii brałam udział w pracach badawczych dotyczących badania flory przewodu pokarmowego w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit oraz flory dróg rodnych w przebiegu bakteryjnej

waginozy prowadzonych pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Heczko oraz we współpracy z dr hab. Magdaleną Strus. Efektem tych badań było opublikowanie 2 prac oryginalnych w których jestem współautorem. W latach 2002-2004 uczestniczyłam w badaniach prowadzonych m.in. w ramach projektu badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt. „Badania nad mechanizmami ochronnego działania probiotyków z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* na przebieg ostrych biegunek u dzieci” (nr P05E 06822) co zaowocowało napisaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej. Pracę doktorską pt. „Badania nad mechanizmami ochronnego działania probiotyków z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* w ostrych biegunkach u dzieci” obroniłam w czerwcu 2007 roku. Opiekunem naukowym był Prof. Piotr Heczko. Na bazie tych badań powstały 3 prace oryginalne.

W okresie przygotowywania rozprawy doktorskiej zmianie uległo także moje życie prywatne- w 2006 roku na świat przyszły moje dwie córki: Lena i Klara.

1 października 2008 na drodze konkursu awansowałam na stanowisko adiunkta, nadal pozostając w Zakładzie Bakteriologii Katedry Mikrobiologii UJ CM i na tym stanowisku pracuję do chwili obecnej. Dodatkowo w maju 2012 roku rozpoczęłam pięcioletnią specjalizację z Mikrobiologii medycznej dla diagnostów laboratoryjnych. Od 10 czerwca 2005 roku należę do Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych i mam prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego.

Od początku pracy w Katedrze Mikrobiologii moje zainteresowania skupiały się na wykorzystaniu technik diagnostyki molekularnej w bakteriologii. Pracowałam i pracuję wykorzystując takie metody jak łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR), elektroforezę w zmiennym polu elektrycznym (PFGE), analizę sekwencji wielu loci (MLST). Szczególnie bliskim tematem była dla mnie kwestia typowania genetycznego szczepów dla celów epidemiologicznych. Typowanie z wykorzystaniem metody PFGE prowadziłam dla wielu gatunków bakterii m.in. *Lactobacillus rhamnosus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* czy *Acinetobacter baumannii*. Typowanie genetyczne prowadziłam najczęściej w ramach różnych projektów naukowych, ale również było ono prowadzone w ramach usług dla szpitali. W momencie gdy na oddziale szpitalnym prowadzone jest dochodzenie epidemiologiczne (istnieje podejrzenie ogniska epidemicznego) metody typowania są niezmiernie pomocne, pozwalają na porównanie wyizolowanych zarówno od pacjentów jak i personelu czy środowiska szpitalnego szczepów bakteryjnych i potwierdzeniu bądź zaprzeczeniu pochodzenia badanych szczepów ze wspólnego źródła czy ogniska zakażenia. Typowanie metodą PFGE wykonywałam m.in., dla Szpitala Miejskiego

Specjalistycznego im. Narutowicza w Krakowie, Szpitala ZOZ w Suchoj Beskidzkiej, Centrum Medycznego w Łąncucie czy Wojewódzkiego Szpitala Zespołonego w Kielcach.

Warsztat pracy w zakresie metod molekularnych poszerzałam na licznych kursach.

Kursy „Technika PCR” i „Genotypowanie” odbyłam w 2001 roku w Gdańsku, zostały one zorganizowane przez firmę DNA-Gdańsk. W 2003 roku ukończyłam kurs z Bioinformatyki na Wydziale Biotechnologii UJ, natomiast w 2005 roku odbyłam kurs „Sekwencjonowanie DNA i analiza wyników” w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

W ostatnich latach moje zainteresowania skupiły się w obszarze badań lekooporności i wirulencji drobnoustrojów. W projekcie badawczym dotyczącym molekularnej charakterystyki pałeczek Enterobacteriaceae izolowanych od noworodków z bardzo małą masą urodzeniową skupiałam się na badaniu genów lekooporności i wirulencji takich gatunków bakterii jak *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter cloacae*. Szczepy bakterii pochodziły od noworodków hospitalizowanych na oddziałach intensywnej terapii i były kolekcjonowane w ramach Polskiej Sieci Neonatologicznej. Program ten prowadzony był w latach 2008-2011 we współpracy z 6 ośrodkami w Polsce, a finansowany był przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr 669/E-215/BWSN-0180/2008), kierownikiem projektu była Prof. Ewa Helwich, natomiast ze strony Katedry Mikrobiologii był on koordynowany przez dr hab. Jadwigę Wójkowską-Mach. Efektem tych badań było powstanie 5 publikacji w indeksowanych czasopismach.

Badania nad lekoopornością, wirulencją i epidemiologią kontynuowałam następnie w ramach dwóch kolejnych projektów badawczych gdzie występowałam w charakterze wykonawcy. W pierwszym projekcie dotyczącym badań szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z przypadków zakażeń w różnych grupach pacjentów szczególną uwagę poświęciłam kilku metodom typowania szczepów MRSA m.in. typowaniu białka powierzchniowego A *spa*-typing, typowaniu kasety chromosomalnej *SCCmec* oraz metodzie PFGE. Efektem badań z tego projektu jest dotychczas 4 publikacje i kilka następnych w trakcie opracowywania.

W kolejnym projekcie dotyczącym charakterystyki molekularnej Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących izolowanych z zakażeń w różnych populacjach o szczególnym narażeniu, mój udział dotyczył przede wszystkim analizy molekularnej *Acinetobacter baumannii* ale także badań lekooporności i typowania *Pseudomonas aeruginosa* i *Stenotrophomonas maltophilia*. Szczegółowe rozwinięcie wyników i wniosków dotyczących tych badań zostanie omówione w dalszej części autoreferatu, publikacje będące efektem

badan z tego projektu wchodzą w skład mojego osiągnięcia naukowego przedstawionego w przewodzie habilitacyjnym.

W ramach pracy badawczej dotyczącej pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae współpracowałam z kolegami ze Szpitala Uniwersyteckiego w Reims we Francji czego efektem jest wspólna publikacja. W badaniach dotyczących gatunku *A.baumannii* współpracowałam i korzystałam z wieloletniego doświadczenia kolegów z Uniwersytetu w Kolonii w Niemczech czego efektem są dwie wspólne publikacje.

Analiza bibliometryczna sporządzona przez Bibliotekę Medyczną UJ CM (stan na dzień 25.09.2017) wskazuje że łączna punktacja wynosi odpowiednio: IF = 74,26 MNiSW = 781. Współczynnik Hirscha jest równy 10, natomiast liczba cytowań wg bazy Web of Science Core Collection wyniosła 311.

Mój dorobek naukowy obejmuje łącznie 48 publikacji na które składa się 40 publikacji oryginalnych (z czego 31 w czasopismach posiadających „Impact Factor” z listy JCR), 6 rozdziałów w książkach, 1 rozdział w skrypcie dla studentów i 1 praca popularno-naukowa. Dziesięć prac oryginalnych opublikowałam jako pierwszy autor, pozostałe jako współautor.

Jako autor i współautor brałam udział w licznych konferencjach i sympozjach naukowych, gdzie łącznie zaprezentowałam 39 doniesień na konferencjach międzynarodowych i 21 doniesienia na konferencjach krajowych. Najważniejsze cykliczne konferencje w jakich uczestniczyłam to: European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2011, 2013, 2014, 2016), European Meeting on Molecular Diagnostics (2009, 2015) oraz International Meeting of Microbial Epidemiological Markers (2000, 2003, 2008, 2013)

W roku 2005 i 2008 byłam członkiem komitetu organizacyjnego międzynarodowej konferencji na temat probiotyków i ich zastosowań EUPROBIO (European Conference of Probiotics and their applications w Krakowie.

Mój dotychczasowy dorobek naukowy jest rezultatem licznych projektów naukowych, w których byłam kierownikiem bądź członkiem zespołu.

Byłam kierownikiem 1 projektu własnego (SONATA) finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki nr 2011/01/D/NZ7/00104 pt. „Molekularna charakterystyka pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae izolowanych z zakażeń inwazyjnych od noworodków z

bardzo małą masą urodzeniową, z uwzględnieniem ich lekooporności oraz czynników wirulencji”. Był on realizowany w latach 2011-2014 i obejmował molekularną charakterystykę pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae oraz analizę epidemiologiczną grupy pacjentów jaką stanowiły noworodki o małej masie urodzeniowej.

Ponadto w latach 2009-2016 byłam kierownikiem 6 projektów realizowanych w ramach działalności statutowej UJ CM finansowanych ze środków Ministerstwa nauki i Szkolnictwa Wyższego. Były to następujące projekty: „Analiza szczepów *Escherichia coli* związanych z błoną śluzową jelita grubego pochodzącymi od dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit”, „Analiza szczepów *Escherichia coli* związanych z błoną śluzową jelita grubego pochodzącymi od dorosłych cierpiących na wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*colitis ulcerosa*)”, „Optymalizacja metody izolacji plazmidów oraz określenie profili plazmidowych u szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus*”, „Badanie lekooporności szczepów bakterii pochodzących z zakażeń urazowo-ortopedycznych na gentamycynę”, „Typowanie szczepów *Acinetobacter baumannii* metodą rep-PCR”, „Zakażenia dróg moczowo-płciowych wywoływane przez *Staphylococcus aureus*”.

Byłam także wykonawcą w 3 projektach finansowanych ze środków MNiSW oraz NCN: „Opracowanie skutecznych metod wykrywania bakterii i grzybów we krwi opartych o detekcję kwasów nukleinowych u chorych z sepsą”. (N N401 006739), „Badania nad wirulencją i lekoopornością szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z przypadków zakażeń w różnych grupach pacjentów o szczególnym narażeniu” (2011/03/B/NZ7/01911), „Epidemiologia występowania i charakterystyka molekularna Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących izolowanych z zakażeń w różnych populacjach o szczególnym narażeniu pacjenci oddziałów intensywnej terapii neonatologicznej i dorosłych, rezydenci opieki długoterminowej oraz inne (2012/05/B/NZ7/02880).

Od 2015 roku biorę udział w projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju : „Badania nad przeciwdrobnoustrojowymi właściwościami miedzi i jej stopów na wyroby o powierzchniach dotykowych do zastosowań w jednostkach opieki zdrowotnej” (numer PBS3/A9/32/2015). Projekt ten wykonywany jest w ramach konsorcjum w skład którego wchodzi Katedra Przeróbki Plastycznej i Metaloznawstwa Wydziału Metali Nieżelaznych z Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie, Katedra Mikrobiologii z Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum z Krakowa i Europejski Instytut Miedzi z Wrocławia.

Wyniki uzyskane w prowadzonych przeze mnie badaniach, wniosły wiele istotnych wartości do teorii i praktyki. Mogą być wykorzystane w wielu dziedzinach medycyny, przede wszystkim w epidemiologii chorób zakaźnych i mikrobiologii.

Przedstawianie wyników mojej pracy na międzynarodowych konferencjach było wspierane poprzez przyznawane mi trzykrotnie stypendia konferencyjne: w roku 2006 na konferencję 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease w Nicei, w roku 2008 na 8th International Meeting of Microbial Epidemiological markers w Zakopanem oraz w 2012 na konferencję organizowaną przez Translational Research on Combating Antimicrobial Resistance (TROCAR) w Barcelonie. Przedstawiane przeze mnie wyniki badań w postaci plakatów zostały zauważone i nagrodzone II nagrodą oraz wyróżnieniem na konferencji Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w 2016 roku. Byłam także zaproszona do wygłoszenia wykładów w trakcie Akademii Kontroli Zakażeń organizowanej przez PTZS w Krakowie oraz na Forum Medycyny Zakażeń e Elku.

Jestem członkiem towarzystw naukowych takich jak Europejskie Towarzystwo Mikrobiologii Klinicznej i Chorób Zakaźnych ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases), Polskie Towarzystwo Zakażeń Szpitalnych oraz Polskie Towarzystwo Probiotyczno-Prebiotyczne PTPP, którego byłam Członkiem Zarządu w latach 2013-2014.

Wykonywałam i wykonuję recenzje dla czasopism polskich i zagranicznych m.in. Microbial Drug Resistance, Clinical Medical Reviews and Case Reports, Journal of Applied Biomedicine, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, w zakresie tematyki badawczej, którą się zajmuję.

Poza działalnością badawczą od roku 2000 zajmuję się również działalnością dydaktyczną. Prowadzę zajęcia (wykłady, seminaria i ćwiczenia) na Wydziale Lekarskim UJ CM dla studentów kierunku lekarskiego (mikrobiologia z parazytologią i immunologią), dla kierunku stomatologia (mikrobiologia jamy ustnej z mykologią) dla kierunku dietetyka (mikrobiologia ogólna i żywności) oraz w Uniwersyteckim Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR dla studentów kierunku weterynaria z mikrobiologii weterynaryjnej.

Prowadzę także zajęcia dla studentów studiów podyplomowych kierunku Kontrola zakażeń w jednostkach opieki zdrowotnej z zakresu identyfikacji epidemii zakażeń. Dodatkowo biorę udział w przygotowaniu i prowadzeniu kursów dla lekarzy oraz diagnostów laboratoryjnych specjalizujących się w mikrobiologii medycznej oraz epidemiologii. Prowadziłam zajęcia w ramach kursów „Metody molekularne w diagnostyce

mikrobiologicznej” , „Epidemiologia zakażeń szpitalnych” oraz „Współczesna diagnostyka toksoplazmozy” „Nowe zastosowania epidemiologii (epidemiologia genetyczna i molekularna)”.

Jestem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim Pani mgr Doroty Romaniszyn z Wydziału Lekarskiego UJ otwartego w marcu 2016 roku. Jestem także promotorem dwóch prac magisterskich i jednej pracy inżynierskiej studentów z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego (wszystkie zostały obronione w 2017 roku).

Byłam opiekunem czterech praktyk wakacyjnych dla studentki z Wydziału Biotechnologii UJ, studenta Wydziału Biologii UJ oraz dwójki studentów z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego. W ramach mojej opieki nad pracownią genetyczną w Katedrze Mikrobiologii nadzoruję również badania przeprowadzane w tym zakresie przez studentów wykonujących prace magisterskie.

Warsztat dydaktyczny szkoliłam m.in. na kursie zaawansowanych technik edukacyjnych w naukach medycznych „Zaawansowane metody oceniania” Projekt Pro bono UJ CM.

W ramach popularyzowania nauki przeprowadziłam lekcję pt. „Bakterie dobre i złe” dla grupy przedszkolnej Przedszkola nr 10 oraz klasy II Szkoły Podstawowej nr 158 w Krakowie. Napisałam jeden artykuł popularnonaukowy dla Gazety Wyborczej, udzieliłam wywiadu dla portalu krakow.naszemiasto.pl

2. Wykształcenie, posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- **1.10.1993-30.06.1998**

studia magisterskie Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

- **5.06.1998** stopień magistra biologii, specjalność mikrobiologia

Tytuł pracy magisterskiej wykonanej w Zakładzie Genetyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie:

„Klonowanie i charakterystyka genu kodującego syntazę homocysteinową u *Schizosaccharomyces pombe*.”

Opiekun naukowy : Prof. dr hab. Andrzej Paszewski

- **28.09.2007** stopień doktora nauk biologicznych

Tytuł pracy doktorskiej wykonanej w Katedrze Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum:

„Badania nad mechanizmami ochronnego działania probiotyków z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* w ostrych biegunkach u dzieci.”

Opiekun naukowy: Prof. dr hab. Piotr B. Heczko

- **05.2012 – w toku** Specjalizacja z Mikrobiologii medycznej dla Diagnostów Laboratoryjnych (nr licencji diagnosty laboratoryjnego 12000)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- **15.10.1998-31.06.1999**

Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

stanowisko: biolog

- **1.10.1999-31.03.2000**

Instytut Farmakologii Państwowa Akademia Nauk w Krakowie.

stanowisko: pracownik inżynieryjno-techniczny

- **1.04.2000 – 30.09.2008**

Katedra Mikrobiologii Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie

stanowisko: asystent.

- **1.10.2008 – do chwili obecnej**

Katedra Mikrobiologii Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie

stanowisko: adiunkt.

4. Przedstawienie osiągnięcia naukowego:

Na podstawie art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Badania nad determinantami oporności oraz genotypowaniem epidemiologicznym Gram ujemnych pałeczek niefermentujących z gatunku *Acinetobacter baumannii*, izolowanych z zakażeń inwazyjnych od polskich pacjentów instytucji szpitalnych”

4.2. Cykl publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Agnieszka Chmielarczyk**, Paul G. Higgins, Jadwiga Wójkowska-Mach, Edyta Synowiec, Esther Zander, Dorota Romaniszyn, Tomasz Gosiewski, Harald Seifert, Piotr Heczko, Małgorzata Bulanda (2012). **Control of an outbreak of *Acinetobacter baumannii* infections using vaporized hydrogen peroxide**. Journal of Hospital Infection; 81 (4); 239-245 (IF=2,855, MNiSW=30)
2. Esther Zander, **Agnieszka Chmielarczyk**, Piotr Heczko, Harald Seifert, Paul G Higgins (2013). **Conversion of OXA-66 into OXA-82 in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates and association with altered carbapenem susceptibility**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 68(2):308-11. (IF=5,439, MNiSW=40)
3. **Agnieszka Chmielarczyk**, Magdalena Pilarczyk-Żurek, Wanda Kamińska, Monika Pobiega, Dorota Romaniszyn, Grzegorz Ziółkowski, Jadwiga Wójkowska-Mach, Małgorzata Bulanda (2016). **Molecular epidemiology and drug resistance of *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitals in southern Poland: ICU as a risk factor for XDR strains**. Microb Drug Resist; 22(4):328-35. (IF=2,306 MNiSW=25)
4. Paweł Krzyściak, **Agnieszka Chmielarczyk**, Monika Pobiega, Dorota Romaniszyn, Jadwiga Wójkowska-Mach (2017) ***Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired infection: biofilm production and drug susceptibility**. APMIS, 2017 Sep 15. article DOI: 10.1111/apm.12739 (IF=1,795 (z 2016) MNiSW=20)
5. **Agnieszka Chmielarczyk**, Monika Pobiega, Dorota Romaniszyn, Jadwiga Wójkowska-Mach (2017) **Multi-locus sequence typing (MLST) of non-fermentative Gram-negative bacilli isolated from bloodstream infections in southern Poland**. Folia Microbiologica, article DOI: 10.1007/s12223-017-0550-7 (IF=1,521 (z 2016) MNiSW=15)

Łączna wartość bibliometryczna publikacji wynosi: **IF = 13,916 MNiSW = 130**

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników.

4.3.1. Wstęp:

Zakażenia wywoływane przez Gram ujemne pałeczki niefermentujące (NFGNB, ang. Non-Fermentative Gram-Negative Bacilli) są coraz częściej diagnozowane u pacjentów polskich szpitali, zwłaszcza na oddziałach intensywnej terapii (OIT). Są to przede wszystkim zapalenia płuc, zakażenia krwi, zakażenia układu moczowego, zakażenia ran oparzeniowych oraz ran pooperacyjnych, a także zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Rezerwuarem NFGNB może być flora własna pacjenta lub nieożywione środowisko szpitalne. Zakażenia NFGNB rozpoznawane są u pacjentów długotrwale hospitalizowanych oraz poddawanych procedurom inwazyjnym, takim jak intubacja i wentylacja mechaniczna. Do istotnych czynników ryzyka tego typu zakażeń zalicza się również stosowanie cewników naczyniowych, cewników moczowych, przebyte zabiegi operacyjne, wcześniejszą antybiotykoterapię, rozległe urazy, przedłużony pobyt na OIT, poważną chorobę podstawową. Zdarza się, że NFGNB są przyczyną klonalnych epidemii szpitalnych. Największe znaczenie kliniczne mają gatunki takie jak *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*. Pozostałe rzadziej izolowane lecz także istotne gatunki to *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia* czy *Acinetobacter lwoffii*. (Enoch DA, Birkett CI, Ludlam HA. Non-fermentative Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents. 2007 May;29 Suppl 3:S33-41; Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 2008;21:538e582; Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect. 2005 Jul;11 Suppl 4:17-32)

Według danych Europejskiego Centrum Kontroli i Prewencji Chorób (ECDC) z 2012 roku *P. aeruginosa* jest czynnikiem zapaleń płuc w 19,2% przypadków na OIT, *A. baumannii* w 4,3% a *S. maltophilia* w 3,6%. W zakażeniach krwi *P. aeruginosa* znajdziemy w 9% przypadków, *S. maltophilia* 1,1%, a *A. baumannii* w 0,5%. W Polsce sytuacja przedstawia się nieco odmiennie, na pierwszym miejscu spośród izolowanych na OIT NFGNB jest *A. baumannii* – 15,6% w przypadku zakażeń krwi wg Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków (NPOA), 23,9% w przypadkach zapaleń płuc związanych z wentylacją mechaniczną. (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2012. Surveillance of healthcare-associated infections in Europe 2007; NPOA 2012 Sprawozdanie z realizacji Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków. Analiza danych ze szpitali pilotażowych. Monitorowanie zakażeń krwi (<http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/sprawozdanie-NPOA.pdf>).

Ogromny problem stanowi fakt, że w ostatnich latach obserwujemy zjawisko narastania oporności tych bakterii na antybiotyki o szerokim spektrum. Zarówno *A.baumannii* jak i *P.aeruginosa* wytwarzają mechanizmy oporności warunkujące oporność na jedną lub kilka klas antybiotyków. Szczepy klasyfikowane są do grup:

- (1) bakterie odporne na co najmniej jeden z 3 lub więcej klas antybiotyków – MDR (ang. multidrug-resistant)
- (2) bakterie odporne na co najmniej jeden antybiotyk ze wszystkich klas antybiotyków, z wyjątkiem dwóch lub mniej klas – XDR (ang. extensively-drug-resistant)
- (3) bakterie odporne na wszystkie antybiotyki wszystkich klas – PDR (ang. pandrug-resistant).

W/w podział został dokonany według: Magiorakos, A.P., A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.A. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, J.F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olssen-Liljequist, D.L. Paterson, L.B. Rice, J. Stelling, M.J. Struelens, A. Vatopoulos, J.T.Weber, and D.L. Monnet. 2012. Multi drug resistant, extensively drug resistant and pan-drug-resistance bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. 18:268–281)

Do patogenów alarmowych, które w świetle polskiego prawa muszą być rejestrowane i zgłaszane zalicza się izolaty *P. aeruginosa* oraz izolaty z rodzaju *Acinetobacter* spp. odporne na karbapenemy lub inne dwie grupy leków; albo odporne na polimyksyny. (Martin-Loeches I, Diaz E, Vallés J. Risks for multidrug-resistant pathogens In the ICU. Curr Opin Crit Care. 2014 Oct;20(5):516-24).

Do mechanizmów oporności wśród NFGNB możemy zaliczyć przede wszystkim produkcję enzymów rozkładających lub modyfikujących antybiotyki (zwłaszcza antybiotyki z grupy penicylin, cefalosporyn i karbapenemów), zmianę miejsca docelowego działania antybiotyku, aktywne wypompowywanie leku z komórki lub blokowanie wejścia leku do komórki. Pałeczki NFGNB charakteryzuje obecność licznych plazmidów i transpozonów które mogą przenosić geny oporności na antybiotyki. Infekcje wywoływane przez wielolekooporne pałeczki NFGNB mają z reguły cięższy przebieg, a lekarze mają ograniczone opcje terapeutyczne. (Poirel, L., T. Naas, and P. Nordmann. 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 54:24–38).

Środowisko szpitalne sprzyja rozprzestrzenianiu się szczepów opornych na antybiotyki poprzez transmisję horyzontalną oraz przez selekcję szczepów opornych jaka odbywa się przy stosowaniu nieracjonalnej polityki antybiotykowej. Aby ograniczyć liczbę zakażeń związanych z opornymi szczepami szpitale są zobowiązane do nadzoru nad zakażeniami czyli do oceny ryzyka zakażenia, zapobiegania zakażeniom przez podejmowanie restrykcyjnych działań związanych z profilaktyką (opracowywanie procedur i szkoleń, higiena rąk), rejestrowania zakażeń, wdrażania polityki ochrony antybiotyków oraz

właściwego leczenia Landelle C, Marimuthu K, Harbarth S. (Infection control measures to decrease the burden of antimicrobial resistance in the critical care setting. *Curr Opin Crit Care*. 2014 Oct;20(5):499-506).

W przypadku wystąpienia ogniska epidemicznego bądź epidemii szpitalnej Zespół Kontroli Zakażeń zobowiązany jest do przeprowadzania dochodzenia epidemiologicznego i poszukiwania źródła zakażenia. W tego typu dochodzeniach niezmiernie przydatne są metody genotypowania molekularnego takie jak np. elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (ang. pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), analiza sekwencji wielu loci (ang. multi-locus sequence typing, MLST), amplifikacja sekwencji repetytywnych (ang. repetitive polymerase chain reaction, rep-PCR). Dzięki tym technikom udaje się określić pokrewieństwo szczepów izolowanych od różnych pacjentów, drogę szerzenia się zakażenia pomiędzy pacjentami oraz źródło pochodzenia szczepu epidemicznego (Rafei R, Kempf M, Eveillard M, Dabboussi F, Hamze M, Joly-Guillou ML. Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiol*. 2014;9(10):1179-94).

Lokalne dane epidemiologiczne na temat lekowrażliwości szczepów i obecności szczepów opornych na antybiotyki na danym oddziale, a także obecności lub braku klonów epidemicznych pozwalają na realizację właściwej i skutecznej terapii empirycznej.

Bytujące w szpitalnych oddziałach pałeczki NFGNB preferują zwykle miejsca wilgotne: umywalki, zlewy, krany, nawilżacze powietrza, krany, dozowniki ze środkami do higieny rąk, respiratory, cewniki naczyniowe i moczowe, a także wyposażenie Sali szpitalnej takie jak łóżka, materace, klamki, klimatyzatory. Pałeczki niefermentujące szczególnie z rodzaju *Acinetobacter* mają niewielkie wymagania odżywcze, tolerują wahania temperatury, mogą przeżywać w środowisku szpitalnym nawet wiele miesięcy. Potrafią także tworzyć na powierzchniach nieożywionych bądź na żywych tkankach strukturę biofilmu, wykorzystując do tego między innymi fimbrie bądź otoczki ułatwiające komórkom adhezję. Biofilm, jako wspólnota komórek bakteryjnych w macierzy składającej się z licznych związków organicznych, pozwala bakteriom przetrwać w niekorzystnym środowisku. Wytwarzanie biofilmu obok zdolności do produkcji rozmaitych toksyn czy enzymów jest elementem wirulencji bakterii. Szczepy bakteryjne bytujące w postaci biofilmu na powierzchni np. cewników mogą wywoływać zakażenia u pacjentów. Aby zapobiegać zakażeniom powodowanym przez pałeczki NFGNB oraz aby przerwać transmisję horyzontalną szczepów należy zwracać uwagę na prawidłowe wykonywanie czynności pielęgnacyjnych, przestrzegać procedur higieny rąk, dezynfekcji powierzchni.

4.3.2. Cel przeprowadzonych badań

Celem badań których wyniki są podstawą osiągnięcia naukowego jest szczegółowa fenotypowa i molekularna analiza szczepów niefermentujących pałeczek Gram-ujemnych z gatunku *A.baumannii* pod kątem lekooporności, typowania molekularnego i wybranych cech wirulencji. Badane szczepy pochodziły z zakażeń inwazyjnych i były izolowane od pacjentów z oddziałów intensywnej terapii leczonych w szpitalach na terenie południowej Polski.

4.3.3. Szczegółowe omówienie osiągnięcia naukowego:

Publikacja nr 1

Agnieszka Chmielarczyk, Paul G. Higgins, Jadwiga Wójkowska-Mach, Edyta Synowiec, Esther Zander, Dorota Romaniszyn, Tomasz Gosiewski, Harald Seifert, Piotr Heczko, Małgorzata Bulanda (2012). **Control of an outbreak of *Acinetobacter baumannii* infections using vaporized hydrogen peroxide.** Journal of Hospital Infection; 81 (4); 239-245

(typowanie molekularne szczepów A.baumannii pochodzących z dwóch ognisk epidemicznych, badanie lekooporności szczepów, analiza epidemiologiczna, systemy dekontaminacji służące ograniczeniu epidemii)

Badania dotyczące szczepów pałeczek NFGNB rozpoczęłam w roku 2011 gdy w ramach współpracy ze Krakowskim Szpitalem Specjalistycznym im. Jana Pawła II w Krakowie podjęłam się analizy epidemii jaka została wykryta wśród pacjentów hospitalizowanych na oddziale intensywnego nadzoru kardiologicznego i oddziale torakochirurgii. W tych dwóch oddziałach było łącznie 85 łóżek, a średnia liczba pacjentów przyjmowana rocznie sięgała 3000. W szpitalu prowadzony był nadzór nad zakażeniami szpitalnymi prowadzony przez Zespół Kontroli Zakażeń. Z pierwszego ogniska epidemicznego wyizolowano 20 wielolekoopornych szczepów *A.baumannii*, z kolejnego ogniska jakie pojawiło się po około 9 miesiącach wyizolowano 8 wielolekoopornych szczepów. Szczepy izolowano z takich materiałów klinicznych od pacjentów z zakażeniami jak popłuczyny oskrzelowe, płyn otrzewnowy, krew, wymazy ran, moczu. Pobierano także próbki środowiskowe z powierzchni sprzętu medycznego i wyposażenia sal szpitalnych.

Analiza epidemiologiczna wykazała że pacjentem od który rozpoczęła się epidemia tzw. „index patient” był 67 letni mężczyzna z perforacją przełyku u którego rozwinęło się szpitalne zapalenie płuc gdzie czynnikiem etiologicznym był MRAB (ang. multidrug resistant *A.baumannii*). U pozostałych pacjentów zdiagnozowano zapalenia płuc (11), zakażenia miejsca operowanego (ZMO) (3), zakażenia krwi (3), zakażenie układu moczowego (ZUM)

(1). Dwa szczepy MRAB wyizolowano z cewników naczyniowych. Z próbek środowiskowych nie udało wyizolować się żadnego szczepu MRAB. Od personelu nie zostały pobrane próbki do badania. Następnie po około 9 miesiącach od wygaśnięcia pierwszego epizodu epidemii, od 6 pacjentów z zapaleniem płuc, 1 z ZUM i jednego z ZMO wyizolowano kolejne szczepy MRAB.

Całkowita zachorowalność na wszystkie typy infekcji wynosiła 6,5 na 1000 przyjęć, średnia długość pobytu na OIT wynosiła 2,7 dni. Zachorowalność na zapalenia płuc związane z MRAB w latach 2009-2010 wynosiła 3,6 na 1000 przyjęć w stosunku do wartości wyjściowej 1,3 (ryzyko względne: 2,8), zachorowalność na zakażenie krwi wywołane MRAB osiągnęła 0,6 na 1000 przyjęć, podczas gdy w roku poprzedzającym nie było w ogóle takich przypadków. W sumie w trakcie prowadzenia badania osiem osób zmarło, dając wskaźnik śmiertelności na poziomie 27,6% (światowe wyniki śmiertelności z powodu MRAB są na poziomie od 7.8% do 23%,). Średni wiek pacjentów z infekcją MRAB wynosił 66 lat i był równy medianie. Średnia liczba dni pomiędzy przyjęciem do OIOM i pierwszym wyhodowaniem izolatu MRAB wynosił 23 dni (średnio 18). Odsetek kobiet hospitalizowanych wynosił 25,8%

Szczepy *A.baumannii* zostały dokładnie scharakteryzowane zarówno fenotypowo jak i molekularnie. Badania lekooporności metodą E-test wykazały, że izolaty były wielolekooporne (najwyższa oporność była na ciprofloksacyne i gentamycynie-100% izolatów, wysoka na karbapenemy 75% ale wszystkie szczepy pozostawały wrażliwe na tygecyklinę.

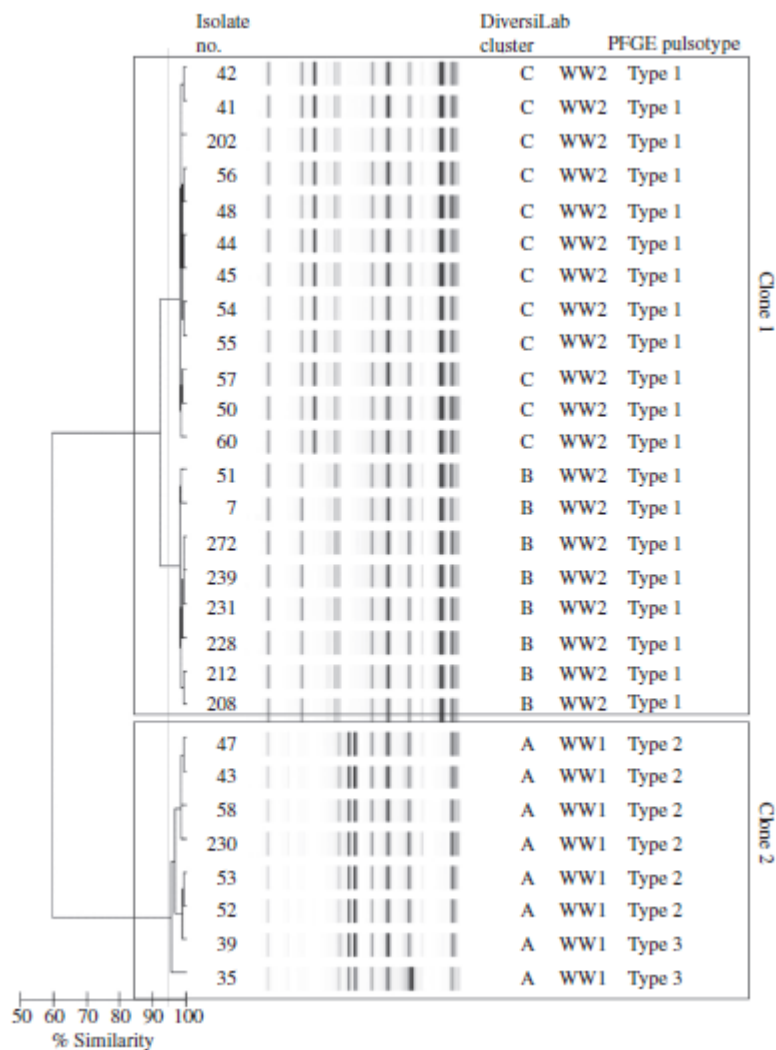
W badaniach molekularnych metodą PCR poszukiwano genów oporności (przede wszystkim genów enzymów z rodziny oksacylinaz klasy D) oraz ruchomych elementów inercyjnych położonych powyżej genów karbapenemaz. Wszystkie izolaty posiadały gen *bla*OXA-51-like kodujący wrodzoną karbapenemazę charakterystyczną dla gatunku *A.baumannii*, gen innej karbapenemazy *bla*OXA-23-like występował u wszystkich szczepów opornych na karbapenemy wspólnie z elementem inercyjny *ISAbal* powyżej genu *bla*OXA-23-like. Trzy izolaty niosły gen nabytej karbapenemazy *bla*OXA-58-like, a jeden izolat gen *bla*OXA-40-like. Spośród 8 izolatów które posiadały jedynie gen *bla*OXA-51-like tylko jeden był oporny na oba karbapenemy, pozostałe zachowało wrażliwość albo na imipenem albo na meropenem.

Do genotypowania molekularnego szczepów zastosowano dwie uzupełniające się metody stąd typowanie szczepów było bardzo precyzyjne. (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;43:4328-4335). Elektroforeza pulsacyjna (PFGE) polega na izolacji całego genomowego DNA bakterii w łagodnych warunkach zapobiegających mechanicznym uszkodzeniom DNA, następnie trawieniu go rzadkotnącym enzymem restrykcyjnym (w tym przypadku *ApaI*) i rozdzieleniu dużych fragmentów DNA w zmiennym polu elektrycznym. Jest to dobrze dyskryminująca metoda, mająca dużą siłę różnicowania szczepów, powtarzalna, uważana jest za złoty standard w typowaniu szczepów bakterii. Metoda rep-PCR z wykorzystaniem komercyjnego systemu DiversiLab polega na amplifikowaniu sekwencji repetytywnych obecnych w genomie bakterii i rozdzieleniu ich w niewielkiej objętości agarozы w systemie kapilarnym w specjalnym chipie. I w jednej i w drugiej metodzie wynik rozdzielania elektroforetycznego czyli układ prążków (bądź pików w przypadku rep-PCR) porównuje się pomiędzy poszczególnymi szczepami bakterii. Wykorzystany został w tym celu program bioinformatyczny Molecular Analyst firmy BioRad.

Efekt typowania w tym dochodzeniu epidemiologicznym było wykrycie trzech różnych pulsotypów metodą PFGE (1, 2 i 3) i trzech klonów metodą rep-PCR (klon A, B i C). Pulsotyp 1 odpowiadał klonowi B i C, natomiast pulsotyp 2 i 3 klonowi A. Typowanie szczepów MRAB wykazało, że była to epidemia wieloogniskowa ale z jednym dominującym, rozprzestrzeniającym się horyzontalnie klonem. Większość szczepów (21) należała do pulsotypu 1 i została zakwalifikowana do międzynarodowego epidemicznego klonu IC 2 (ang. international clone) rozpowszechnionego bardzo szeroko w Europie i na świecie (Rycina 1).

Analizując epidemię skupiono się nie tylko na szczegółowej charakterystyce szczepów i analizie epidemiologicznej, ale także na sposobie postępowania w przypadku wykrycia takiej epidemii na oddziale szpitalnym. Zakażenia szpitalne wywoływane przez szczepy MRAB wymagają wprowadzenia procedur (bądź zwiększenie nacisku na już wprowadzone) dotyczących higieny rąk i właściwej dekontaminacji sprzętu i środowiska szpitalnego. W tym przypadku bardzo pomogła zmiana rutynowo stosowanych środków do dezynfekcji powierzchni na technologię dekontaminacji systemem VHP wykorzystującym waporyzowany nadtlenek wodoru. Jest to system bezdotykowy, mobilny, pracujący w temperaturze 20-45°C. (Ray A, Perez F, Beltramini AM, et al. Use of vaporized hydrogen peroxide decontamination during an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection at a long-term acute care hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2010;31:1236-1241). Na obu oddziałach (po czasowym ich zamknięciu) zastosowano (skutecznie) po kilka cykli dekontaminacji systemem VHP.



Rycina 1. Rezultaty typowania izolatów *A. baumannii* metodą rep-PCR i metodą PFGE.

Przeprowadzone badanie pokazuje jak istotna jest w razie wystąpienia szpitalnych epidemii dobra współpraca w pomiędzy Zespołem Kontroli Zakażeń, lekarzami prowadzącymi i mikrobiologami. Zarówno praca na oddziale w zakresie sprawdzenia procedur postępowania i dekontaminacji środowiska jak i szczegółowe badania szczepów izolowanych z epidemii mają znaczący wpływ na ocenę lokalnej sytuacji epidemiologicznej szpitala i zapobieganie występowaniu podobnych epidemii w przyszłości.

Publikacja nr 2

Esther Zander, Agnieszka Chmielarczyk, Piotr Heczko, Harald Seifert, Paul G Higgins (2013). **Conversion of OXA-66 into OXA-82 in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates and association with altered carbapenem susceptibility.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 68(2):308-11

*(typowanie molekularne szczepów *A.baumannii*, badanie profilu białkowego poryn, szczegółowe badanie nabywania lekooporności na karbapenemy przez szczepy *A.baumannii*, analiza sekwencji genów *blaOXA* i *ISAbal*, klonowanie genu oporności do szczepu wrażliwego)*

Praca z opornymi na karbapenemy szczepami *A.baumannii* (AB) wyizolowanymi w czasie wyżej opisanej epidemii zachęciła mnie do szczegółowego przyjrzenia się genom oporności kodującym oksacylinazy klasy D i możliwościom ich mutowania bądź rozprzestrzeniania się pomiędzy szczepami. Badania były prowadzone przy współpracy i udziale kolegów dr Esther Zander, dr Paula Higginsa i prof. H. Seiferta ze znanego w Europie ośrodka referencyjnego dla zakażeń wywoływanych przez *A.baumannii*, a mianowicie Instytutu Mikrobiologii Medycznej, Immunologii i Higieny w Kolonii w Niemczech (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Uniklinik Köln). Wybrane do badań szczepy pochodziły od 3 różnych pacjentów (były to szczepy epidemiczne opisane w **publikacji nr 1**). Szczep A był wrażliwy na karbapenemy a szczepy B i C odporne zarówno na imipenem jak i meropenem.

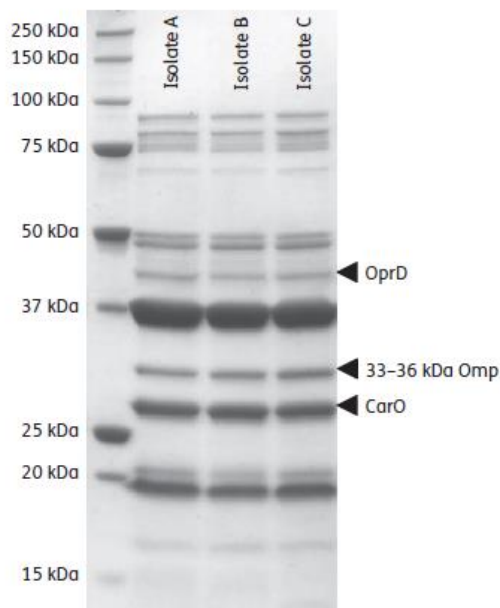
Hydroliza enzymatyczna jest głównym mechanizmem oporności u AB choć nie jedynym. Do oporności może też przyczyniać się nieprzepuszczalność błon spowodowana utrata kanałów porynowych, a także aktywny wyrzut antybiotyku z komórki. Istnieje dużo wariantów nabytych oksacylinaz z klasy D np. OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-40-like, OXA-58-like and OXA-143-like. Do ich nadekspresji przyczyniają się elementy insercyjne (IS) położone powyżej genów i działające jak silne promotory. Najbardziej znanym takim elementem jest *ISAbal* leżący powyżej chromosomalnie kodowanej OXA-51-like (Turton JF, Ward ME, Woodford N et al. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett 2006; 258: 72–7).

Pomiędzy trzema wybranymi izolatami zostało ocenione pokrewieństwo z wykorzystaniem metody DiversiLab – były one spokrewnione w 98,3% co zalicza je do jednego klonu. Sekwencjonowanie genu *blaOXA-51-like* pozwoliło zaliczyć wszystkie 3 izolaty do światowego klonu IC2. Żaden z izolatów nie posiadał nabytych enzymów OXA. PCR prowadzony ze starterami flankującymi obszar dla genu *blaOXA-51-like* potwierdził chromosomalne położenie tego genu. Sekwencja *ISAbal* została wykryta we wszystkich trzech izolatach, ale tylko w szczepach B i C była zlokalizowana powyżej *blaOXA-51-like*. Badania Adamsa (Adams MD, Chan ER, Molyneaux ND et al. Genome wide analysis of divergence of antibiotic

resistance determinants in closely related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3569–77) wykazały że kopie *ISAbal* mogą być różnie rozprzestrzenione w genomie.

Analiza sekwencji genu *bla*OXA-51-like pokazała, że izolat A ma wersję *bla*OXA-66 tego genu, a izolaty B i C *bla*OXA-82. Konwersja *bla*OXA-66 do *bla*OXA-82 może odbyć się przez punktową mutację prowadzącą do zmiany aminokwasu z leucyny na walinę. W eksperymencie wykonanym metodą real-time PCR (qRT-PCR) pokazano, że ekspresja *bla*OXA-82 w izolatach B i C była 40krotnie wyższa w porównaniu do ekspresji *bla*OXA-66 w izolacie A. Przepuszczalnie leczenie karbapenemami doprowadziło do selekcji izolatów opornych przez regulację ekspresji za pomocą genu *ISAbal*. Takie sytuacje były opisywane wcześniej (Mugnier PD, Poirel L, Nordmann P. Functional analysis of insertion sequence *ISAbal*, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 2009; 191: 2414–8)

Sprawdzano także czy z nabytą opornością izolatów B i C na karbapenemy mają związek poriny błonowe. Badano poziom ekspresji genów poryn *carO*, *oprD* oraz 33-36kDa *omp* metodą qRT-PCR. Nie wykazano różnic w ekspresji genów poryn pomiędzy izolatem wrażliwym (A) a opornymi (B i C). Te dane potwierdzono badaniem profilu białkowego OMP wykonanego metodą SDS-PAGE (Rycina 2).



Rycina 2. Profil białkowy białek porynowych błonowych w badanych izolatach A, B i C.

Uzyskane wyniki wskazują, że jedynym powodem nadekspresji *bla*OXA-82 było działanie elementu *ISAbal*. Żeby całkowicie potwierdzić tą hipotezę sklonowano element *ISAbal* i za pomocą wektora pWH1266 wprowadzono go do wzorcowego szczepu *A.baumannii* wrażliwego na karbapenemy (ATCC 17978). W uzyskanych transformantach

minimalne stężenie hamujące (MIC) dla imipenemu i meropenemu wzrosło z 0.25mg/L do >32mg/L.

Nie wiadomo co w naszych opornych izolatach było wcześniej: sekwencja *ISAbal* czy konwersja OXA. Badania pokazywały, że nadekspresja *bla*OXA-66 miała mały wpływ na zmniejszenie wrażliwości na karbapenemy (Figueiredo S, Poirel L, Croize J et al. In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to *ISAbal*-mediated overexpression of the natural *bla*OXA-66 oxacillinase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2657–9). W tych badaniach zaobserwowana nadekspresja *bla*OXA-82 mogła nie być kluczowa, wydaje się, że punktem krytycznym niezbędnym do osiągnięcia przez izolaty oporności na karbapenemy była konwersja *bla*OXA-66 na *bla*OXA-82, a element *ISAbal* dodatkowo wpłynął na oporność poprzez spowodowanie nadekspresji. Element *ISAbal* znaleziono też u innych gatunków *Acinetobacter* co ciekawe nie na chromosomie, a na plazmidach - może to świadczyć o dużym potencjale rozprzestrzeniania się oporności na karbapenemy w obrębie całego rodzaju *Acinetobacter*. Podsumowując, te badania pokazały jak u blisko spokrewnionych klonalnie izolatów w łatwy sposób może dojść do powstania mechanizmu oporności na karbapenemy dzięki konwersji genu *bla*OXA powiązanej z *ISAbal*.

Publikacja nr 3

Agnieszka Chmielarczyk, Magdalena Pilarczyk-Żurek, Wanda Kamińska, Monika Pobiega, Dorota Romaniszyn, Grzegorz Ziółkowski, Jadwiga Wójkowska-Mach, Małgorzata Bulanda (2016).

Molecular epidemiology and drug resistance of *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitals in southern Poland: ICU as a risk factor for XDR strains. *Microb Drug Resist*; 22(4):328-35

(typowanie molekularne szczepów A.baumannii pochodzących z OIT, sekwencjonowanie genu rpoB, badanie lekooporności szczepów, badanie genów oporności metodą PCR i qRT-PCR, analiza epidemiologiczna)

Kolejne badania nad szczepami *Acinetobacter* zostały przeprowadzone dzięki zgromadzeniu bardzo dużej kolekcji pałeczek Gram-ujemnych niefermentujących w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki 2012/05/B/NZ7/02880 „Epidemiologia występowania i charakterystyka molekularna Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących izolowanych z zakażeń w różnych populacjach o szczególnym narażeniu pacjenci oddziałów intensywnej terapii neonatologicznej i dorosłych, rezydenci opieki długoterminowej oraz inne”. Kierownikiem projektu była dr hab. Jadwiga Wójkowska-Mach, ja byłam w nim wykonawcą. Kolekcja szczepów została zgromadzona w Katedrze Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego przy współpracy dwóch laboratoriów mikrobiologicznych-KORLAB NZOZ z Rudy Śląskiej i Laboratorium Mikrobiologicznego ze Szpitala

Specjalistycznego nr 5 im. św. Barbary w Sosnowcu. Szczepy *A.baumannii* pochodziły zarówno z OIT jak i innych oddziałów (internistycznych czy pulmonologicznych) i zbierane były przez cały 2013 rok. W sumie zgromadzono 125 szczepów AB, z czego 99 z zapaleń płuc, 22 z zakażeń krwi i 4 z zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych.

Mediana wieku pacjentów wynosiła 61, 43% to były kobiety. Na oddziałach OIT hospitalizowanych było 79% pacjentów od których izolowano badane szczepy. Zakażenia krwi na OIT były diagnozowane częściej 19.2% vs 11.5% ale nie wykazano znamienności statystycznej.

Aby dokładnie potwierdzić przynależność wyizolowanych szczepów do gatunku *A.baumannii* wykonano najbardziej obecnie polecaną do tych celów metodę - sekwencjonowanie genu rpoB, kodującego podjednostkę B polimerazy RNA. Spośród 125 szczepów 115 posiadało allel nr 2 tego genu, trzy szczepy allel nr 5, trzy szczepy allel nr 1, trzy szczepy allel nr 52 i jeden szczep allel nr 4.

Badanie lekooporności wykonano z wykorzystaniem 17 antybiotyków z 9 różnych grup. Pozwoliło to na zakwalifikowanie szczepów opornych do grupy MDR (ang. multidrug resistant) lub XDR (ang. extensively drug resistant). 60% szczepów było opornych na wszystkie badane antybiotyki z wyjątkiem kolistyny. Najwyższa oporność dotyczyła cefalosporyn (93.6%), fluorochinolonów (92%) sulfametoksazolu z trimetoprimem (92%) i karbapenemów (imipenem 80,8%, meropenem 82,4%) Dla tych antybiotyków dla których lekooporność badano metodą E-test wyliczono MIC₅₀ i MIC₉₀: dla kolistyny wyniósł on odpowiednio 1 mg/L i 1.5 mg/L, dla polimyksyny B 0.25 mg/L i 1 mg/L, dla tygecykliny 4 mg/L i 12 mg/L.

Zaobserwowano wzrost oporności na karbapenemy w stosunku do badanych szczepów sprzed 2-3 lat (**publikacja nr 1 i 2**) jak i również znaczące zmniejszenie się liczby szczepów wrażliwych na tygecyklinę. Pozostaje wciąż wysoka wrażliwość na kolistynę. Szczepy przynależące do grupy XDR dominowały na OIT (93.9% vs. 30.8%; chi square test $p < 0.0001$; OR 34.9; 95% CI 10.79–112.67; $p < 0.0001$). Były także częściej izolowane z zakażeń krwi niż zapaleń płuc.

Za pomocą metody PCR poszukiwano genów metalo-beta laktamaz bla_{VIM} bla_{IMP} , bla_{GIM} , i bla_{SPM} . Tylko dwa izolaty posiadały gen bla_{VIM} , jest to zdecydowanie rzadziej spotykany mechanizm oporności u *A.baumannii*. Geny kodujące wrodzone enzymy z klasy OXA czyli $\text{bla}_{\text{OXA-51-like}}$ posiadały wszystkie izolaty, natomiast spośród nabytych oksacylinaz 80% posiadało $\text{bla}_{\text{OXA-24-like}}$, a 26% $\text{bla}_{\text{OXA-23-like}}$. Żaden z izolatów nie posiadał genu $\text{bla}_{\text{OXA-58-like}}$. Te enzymy oznaczano metodą multiplex qRT-PCR gdzie

każdy produkt amplifikacji znakowany był inną sondą fluorescencyjną. Znacząco więcej izolatów z OIT jak i izolatów charakteryzujących się modelem oporności XDR posiadało gen *bla*_{OXA-24-like} ($p = 0.0046$ i $p = 0.033$) (Tabela 1).

	Total	<i>ISaba1</i>	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>bla</i> _{OXA-23} and <i>bla</i> _{OXA-24}	No <i>bla</i> _{OXA-23} and no <i>bla</i> _{OXA-24}
ICU, no. (%)	99 (100)	10 (10.1)	99 (100)	26 (26.3)	80 (80.8)	0 (0)	20 (20.2)	13 (13.2)
Non-ICU, no. (%)	26 (100)	0 (0)	26 (100)	7 (26.9)	14 (53.8)	0 (0)	4 (15.4)	9 (34.6)
Meningoencephalitis, no. (%)	4 (100)	0 (0)	4 (100)	1 (25)	4 (100)	0 (0)	1 (25)	0 (0)
BSI, no. (%)	22 (100)	3 (13.7)	22 (100)	5 (22.7)	17 (77.3)	0 (0)	4 (18.2)	4 (18.2)
Pneumonia, no. (%)	99 (100)	7 (7)	99 (100)	27 (27.2)	73 (73.7)	0 (0)	19 (19.2)	18 (18.2)
XDR, no. (%)	101 (100)	10 (9.9)	101 (100)	29 (28.7)	80 (79.2)	0 (0)	21 (20.8)	13 (12.9)
MDR, no. (%)	17 (100)	0 (0)	17 (100)	3 (17.6)	11 (64.7)	0 (0)	3 (17.6)	6 (35.3)
Other, no. (%)	7 (100)	0 (0)	7 (100)	1 (14.3)	3 (42.8)	0 (0)	0 (0)	3 (42.8)
Clone 1, no. (%)	24 (100)	1 (4.2)	24 (100)	6 (25.0)	18 (75.0)	0 (0)	4 (16.7)	4 (16.7)
Clone 2, no. (%)	55 (100)	8 (14.5)	55 (100)	16 (29.0)	45 (81.8)	0 (0)	12 (21.8)	6 (10.9)
Other clones, no. (%)	20 (100)	1 (5.0)	20 (100)	4 (20.0)	17 (85.0)	0 (0)	4 (20.0)	3 (15.0)

Tabela 1. Rozkład poszczególnych genów OXA w zależności od typu oddziału, typu zakażenia, typu oporności oraz przynależności do danego klonu.

Typowanie epidemiologiczne przeprowadzono metodą rep-PCR w systemie DiversiLab. Zidentyfikowano 6 klonów oraz 12 unikalnych szczepów *A.baumannii*. Dominowały dwa klony do pierwszego zaliczono 24, a do drugiego 55 izolatów. Większość izolatów z dominujących klonów (66,7% z pierwszego i 85,5% z drugiego) należała do szczepów opornych na wszystkie antybiotyki z wyjątkiem kolistyny.

Nasze badanie dużej liczby izolatów AB pokazało że ich oporność na antybiotyki to bardzo wielki problem polskich oddziałów OIT. Ponad połowa izolatów była oporna na wszystkie antybiotyki z wyjątkiem kolistyny, a ten antybiotyk charakteryzuje się wysoką toksycznością. Infekcje wywołane przez takie szczepy leczy się głównie terapią skojarzoną, razem z kolistyną podawane są tygecyklina, ampicylina z sulbaktamem, karbapenemy czy rifampicyna. Jednakże nawet takie terapie często kończą się niepowodzeniem. Dodatkowo coraz częściej słyszymy o izolatach opornych na kolistynę (Qureshi, Z.A., L.E. Hittle, J.A. O'Hara, J.I. Rivera, A. Syed, R.K. Shields, A.W. Pasculle, R.K. Ernst, and Y. Doi. 2015. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. Clin. Infect. Dis. 60:1295–1303). Oporność ta jest skutkiem selekcji szczepów pod wpływem presji antybiotyku ale nie można wykluczyć że będzie również przenoszona horyzontalnie. Szczepy AB charakteryzują się wysoką klonalnością, w Europie dominuje klon IC2, co nasze badania także potwierdzają. Wśród nabytych genów OXA zauważyliśmy różnicę w stosunku do pierwszych badań gdzie dominował gen *bla*_{OXA-23-like}. Teraz znacząco więcej wykryto *bla*_{OXA-24-like}, było także 19% szczepów niosących oba geny jednocześnie. Stosunkowo mało szczepów miało elementy *ISaba1*.

Podsumowując, kontrola nad zakażeniami AB na OIT stanowi poważne wyzwanie, niezbędne jest połączenie programów edukacyjnych, promowanie higieny rąk, efektywny nadzór, rozwój nowych strategii terapeutycznych. Być może badania nad zastosowaniem nowych powierzchni antybakteryjnych na oddziałach szpitalnych także pomogą w przyszłości w walce z zakażeniami wywołanymi przez *A. baumannii*.

Publikacja nr 4

Paweł Krzyściak, **Agnieszka Chmielarczyk**, Monika Pobiega, Dorota Romaniszyn, Jadwiga Wójkowska-Mach (2017) *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired infection: biofilm production and drug susceptibility. APMIS, 2017 Sep 15.
article DOI: 10.1111/apm.12739

(badanie zdolności produkcji biofilmu, badanie lekowrażliwości, analiza produkcji biofilmu vs. pochodzenie szczepów, miejsce izolacji, oporność szczepów)

Publikacja nr 4 skupia się na kolejnym ważnym zagadnieniu (poza opornością i typowaniem genetycznym) dotyczącym *A.baumannii* czyli cechach wirulencji, a konkretnie jednej z najważniejszych cech wirulencji *A.baumannii* jaką jest produkcja biofilmu. Szczepy bakterii, które są zdolne wytworzyć biofilm i funkcjonować wewnątrz biofilmu są uznawane za bardziej wirulentne, mogą bowiem szybciej i skuteczniej kolonizować określone nisze ekologiczne w obrębie organizmu pacjenta. Szczepy te stosują także inne strategie radzenia sobie z antybiotykami. W przypadku *A.baumannii* izolowanych z oddziałów intensywnej terapii, gdzie u większości pacjentów stosowane są inwazyjne procedury i sprzęt medyczny podtrzymujący życie, dochodzi jeszcze możliwość kolonizacji przez biofilmtwórcze szczepy *A.baumannii* urządzeń medycznych takich jak cewniki naczyniowe czy sprzęt do mechanicznej wentylacji. Tworzenie biofilmu na powierzchniach abiotycznych pozwala też przetrwać szczepom *A.baumannii* trudniejsze warunki środowiskowe. Do bakterii funkcjonujących pod postacią biofilmu trudniej penetrują antybiotyki, z kolei transfer genów oporności wśród szczepów z biofilmu jest ułatwiony.

W niniejszej pracy produkcję biofilmu badano stosując do hodowli podłoże minimalne M-63 uzupełnione kazeiną, hodowlę szczepów prowadzono w 96-dołkowych płytkach titracyjnych do uzyskania fazy biofilmu. Następnie usuwano komórki planktoniczne, hodowlę przepłukiwano i inkubowano z odpowiednim roztworem fioletu krystalicznego. W końcowym etapie mierzono wartość absorbancji barwnika i odnoszono ją do szczepów kontrolnych-silnego producenta biofilmu i szczepu nie produkującego biofilmu. Uwzględniano także średnią i odchylenie standardowe. Podziału na kategorie dokonano za pomocą nieco

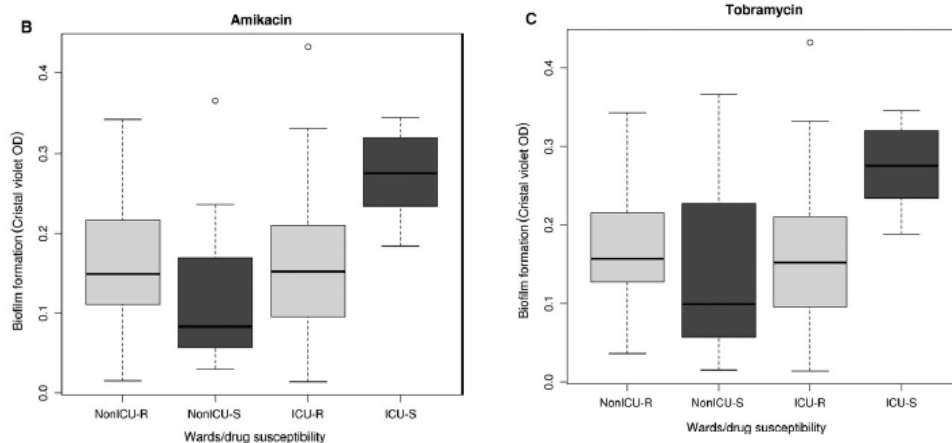
zmodyfikowanej metody zaproponowanej przez Stepanovica (Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilm In microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS 2007;115:891–9). Szczepy kategoryzowano jako 0- nie produkujące biofilmu, 1-szczepy o niskim potencjale produkcji biofilmu, 2- szczepy o średnim potencjale produkcji biofilmu i 3- szczepy mocno produkujące biofilm.

Przyjmując, że tylko szczepy zakwalifikowane do kategorii 0 nie produkują biofilmu wykazaliśmy, że zdolność do produkcji na poziomie 1, 2 lub 3 kategorii ma 81,9% szczepów *A.baumannii*. Te rezultaty są zgodne z obserwacją Sechi (Sechi LA, Karadenizli A, Deriu A, Zanetti S, Kolayli F, Balikci E, et al. PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. Med Sci Monit 2004;10:BR180–4), który wykazał to dla 80% swoich izolatów oraz nieco wyższe niż Rodriguez-Bano – 63% (Rodriguez-Bano J, Marti S, Soto S, Fernandez-Cuenca F, Cisneros JM, Pachon J, et al. Biofilm formation In *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. ClinMicrobiol Infect 2008;14:276–8).

Analizując wyniki autorzy odnosili zdolność produkcji biofilmu przede wszystkim do oporności na antybiotyki (badano 14 antybiotyków z 6 grup), do materiału z którego izolowano szczepy (izolaty z krwi bądź płuc), do miejsca izolacji (oddziały OIT lub inne). Wykazano, że nie było związku pomiędzy zdolnością produkcji biofilmu a pochodzeniem szczepów z oddziałów OIT, ale już biorąc pod uwagę oporność na antybiotyki szczepy z OIT wrażliwe na amikacynę i tobramycynę statystycznie częściej produkowały biofilm w wyższym stopniu niż szczepy odporne (Rycina 3). Badania Dahdouh oraz Nahar nad strukturą i kinetyką tworzenia biofilmu pokazały także że szybsze formowanie biofilmu było powiązane z wrażliwością na aminoglikozydy. (Dahdouh E, Orgaz B, Gomez-Gil R, Mingorance J, Daoud Z, Suarez M, et al. Patterns of biofilm structure and formation kinetics among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates with different antibiotic resistance profiles. Med Chem Commun 2016;7:157–63; Nahar A, Anwar S, Miah MRA. Association of biofilm formation with antimicrobial resistance among the *Acinetobacter* species in a tertiary care hospital In Bangladesh. J Med 2013;14:28–32.)

Odwrotnie było w przypadku ceftazydymu-szczepy wrażliwe słabiej produkowały biofilm. Zastosowany model regresji liniowej wykazał, że szczepy z OIT będące silnymi producentami biofilmu mają mniejszą szansę na to, że będą wrażliwe na ceftazydym.

Pomimo braku istotności statystycznej interesujący jest fakt, że silni producenci biofilmu zwiększają prawdopodobieństwo wrażliwości na aminoglikozydy, fluorochinolony, trimetoprim i sulfametoksazol oraz tetracykliny ale obniżają prawdopodobieństwo wrażliwości na cefalosporyny.



Rycina 3. Porównanie zdolności produkcji biofilmu wśród szczepów izolowanych z oddziałów OIT i nie-OIT wrażliwych i opornych na amikacynę i tobramycynę.

Z kolei związek pomiędzy tworzeniem biofilmu a opornością na karbapenemy jest niejasny i skomplikowany. Nasze badania wskazały, że oporne szczepy z oddziałów innych niż OIT oraz wrażliwe szczepy z oddziałów OIT tworzą biofilm silniej niż pozostałe.

Podsumowując, wykazano, że bakterie wzrastające w postaci biofilmu posiadają inną strategię oporności na antybiotyki spowodowaną m.in. trudnością w penetrowaniu biofilmu przez leki, bowiem poszczególne pojedyncze izolowane z biofilmu szczepy wykazują często wrażliwość na wybrane antybiotyki. Widać tutaj nieco inny rodzaj radzenia sobie ze stresującymi warunkami środowiska (dla bakterii jest to obecność w środowisku antybiotyków) przez szczepy produkujące biofilm oraz te występujące w postaci planktonicznej, szczególnie wśród szczepów z oddziałów OIT. Być może tworzenie biofilmu daje szansę na przetrwanie w szpitalach szczepom nie posiadającym mechanizmów oporności na antybiotyki, co sugeruje także w swoich najnowszych badaniach Qi (Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol* 2016;7:1–10.)

Publikacja nr 5

Agnieszka Chmielarczyk, Monika Pobiega, Dorota Romaniszyn, Jadwiga Wójkowska-Mach (2017) **Multi-locus sequence typing (MLST) of non-fermentative Gram-negative bacilli isolated from bloodstream infections in southern Poland**. *Folia Microbiologica*, article DOI: 10.1007/s12223-017-0550-7 (IF=1,521 (z 2016) MNiSW=15)

(typowanie molekularne szczepów izolowanych z zakażeń krwi metodą MLST oraz metodą PFGE)

Publikacja nr 5 została poświęcona szczepom pałeczek Gram ujemnych niefermentujących wyizolowanym z najcięższych zakażeń, a mianowicie zakażeń krwi. NFGNB nie są dominującą grupą bakterii izolowanych z tego typu zakażeń, ale zarówno wg

WHO jak i ECDC ich udział w zakażeniach krwi w ostatnich latach się zwiększa (w przypadku *P.aeruginosa* wynosi około 3.8%, dla *A.baumannii* 1.3%) (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data?s=bloodstream+infections>). Zakażenia krwi powodowane przez te gatunki charakteryzują się także wysoką śmiertelnością (w zależności od badań wynosi ona około 30-40%) (Pena C, Suarez C, Gozalo M, Murillas J, Almirante B, Pomar V, et al. (2012) Spanish Network for Research in Infectious Diseases REIPI. Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in Pseudomonas aeruginosa bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother 56:1265-1272). Duża śmiertelność dotyczy zwłaszcza zakażeń powodowanych przez szczepy wielolekooporne, a zwłaszcza szczepy odporne na karbapenemy. Gatunek *Stenotrophomonas maltophilia* (STM), który coraz częściej jest diagnozowany w zakażeniach krwi jest naturalnie odporny na wiele antybiotyków (w tym karbapenemy), a śmiertelność pacjentów z potwierdzonym zakażeniem STM sięga nawet 50% (Araoka H, Baba M, Yoneyama A (2010) Risk factors for mortality among patients with Stenotrophomonas maltophilia bacteremia in Tokyo, Japan, 1996–2009. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 29:605–8; Garazi M, Singer C, Tai J, Ginocchio CC (2012) Bloodstream infections caused by Stenotrophomonas maltophilia: a seven-year review. J Hosp Infect 12;81:114–8)

Do puli badanych w ramach tej publikacji szczepów zakwalifikowano 53 izolaty pałeczek NFGNB. Poza dominującymi gatunkami czyli *A.baumannii* (22 szczepy), *P.aeruginosa* (11 szczepów) i *S.maltophilia* (11 szczepów) zidentyfikowano takie gatunki jak *Achromobacter denitrificans*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter ursingii*, *Comamonas testosteroni*, *Ochrobactrum anthropi*.

Dla wszystkich badanych szczepów przeprowadzono testy lekowrażliwości – dla *A.baumannii* dla 15 antybiotyków, dla *P.aeruginosa* 13, dla STM i pozostałych 2 antybiotyki (według zaleceń EUCAST- <http://www.eucast.org/>). Dla trzech dominujących gatunków wykonano typowanie metodą analizy sekwencji wielu loci (ang. multi-locus sequence typing, MLST) – zsekwencjonowano w każdym gatunku po siedem genów housekeeping. Sekwencje zostały opracowane i złożone z wykorzystaniem programu Chromas Pro, a następnie na podstawie bazy MLST (<https://pubmlst.org/>) poszczególne szczepy zostały zakwalifikowane do określonych typów ST (ang. sequence type). Dodatkowo dla szczepów *P.aeruginosa* i *S.maltophilia* przeprowadzono porównawcze typowanie metodą elektroforezy pulsacyjnej (PFGE). Dla szczepów *A.baumannii* już wcześniej (publikacja nr 3) przeprowadzono porównawcze typowanie metodą rep-PCR.

Wyniki uzyskane w tym badaniu pokazały że 56.5% pacjentów z zakażeniami krwi pochodzi z oddziałów OIT, 26.5 % z oddziałów nefrologii i urologii i 17% z oddziałów

internistycznych. Od 5 pacjentów wyizolowano z jednej próbki krwi więcej niż jeden patogen.

Aż 86% wyizolowanych szczepów *A.baumannii* charakteryzowało się rozszerzoną opornością (XDR), a 63,6% było wrażliwych jedynie na kolistynę. Zupełnie inaczej przedstawiała się sytuacja wśród szczepów *P.aeruginosa* – tylko jeden był XDR i jeden MDR. Wszystkie szczepy *S.maltophilia* były wrażliwe na sulfametoksazol z trimetoprimem, a odporne na ceftazydym.

MLST potwierdziło (wykazaną wcześniej w typowaniu rep-PCR) wysoką klonalność szczepów *A.baumannii* – wszystkie zostały zaliczone do typu sekwencyjnego ST2. Wśród *P.aeruginosa* wykryto natomiast 10 różnych typów ST. Wśród szczepów *S.maltophilia* tylko 4 miały profil ST obecny w bazie (ST4, ST15, ST116, ST142), pozostałe 7 szczepów miało nowe typy ST, z czego 5 miało identyczny układ alleli (Tabela 2)

Species and strain number	Ward	Alleles							Sequence type (ST)
		<i>cpn60</i>	<i>fusA</i>	<i>gltA</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>	
<i>Acinetobacter baumannii</i>									
17 isolated strains	ICU1	2	2	2	2	2	2	2	2
2 isolated strains	ICU2	2	2	2	2	2	2	2	2
No. 53	Urology1	2	2	2	2	2	2	2	2
No. 480	Urology2	2	2	2	2	2	2	2	2
No. 835	Internal1	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
No. 17	Urology1	3	104	4	36	71	44	53	27
No. 253	Urology1	38	11	3	13	1	2	4	235
No. 408	ICU1	17	5	12	3	14	4	7	244
No. 429	ICU1	114	73	32	3	4	50	1	396
No. 520	Internal2	22	20	11	3	3	3	7	348
No. 725	ICU1	31	5	57	13	1	40	3	137
No. 764	ICU1	28	3	94	13	4	1	10	644
No. 779	ICU1	14	5	10	7	4	13	7	260
No. 783	ICU1	4	4	12	16	1	6	3	253
No. 786	ICU1	4	4	12	16	1	6	3	253
No. 892	ICU1	17	3	5	4	4	4	3	966
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>									
No. 3	Urology1	76	68	7	7	80	93	74	novel 1
No. 14	Internal3	76	68	7	7	80	93	74	
No. 19	Urology1	76	68	7	7	80	93	74	
No. 22	Urology1	76	68	7	7	80	93	74	
No. 25	ICU3	80	89	43	73	72	98	79	142
No. 129	Urology1	76	68	105	67	80	93	74	novel 2
No. 318	Urology1	3	1	84	58	25	82	6	116
No. 327	Urology1	76	68	7	7	80	93	74	novel 1
No. 435	ICU1	6	1	39	19	76	33	78	novel 3
No. 6840	ICU1	1	4	7	7	28	19	6	4
No. 11865	ICU1	10	29	21	21	32	32	10	15

Tabela 2. Allele i typy sekwencyjne (ST) szczepów NFGNB wyizolowanych z zakażeń krwi.

Elektroforeza pulsacyjna potwierdziła wysokie zróżnicowanie wśród szczepów *P.aeruginosa*, pulsotypy wykazywały podobieństwo na niskim poziomie – od 50 do 65%. Natomiast w

przypadku 5 szczepów *S.maltophilia* wykazujących identyczny profil alleli w metodzie MLST podobieństwo pulsotypów było na poziomie 90%. Dodatkowo cztery z nich pochodziły z jednego oddziału.

Porównując nasze wyniki do innych badań opisanych w literaturze potwierdzono rosnący udział pałeczek Gram ujemnych niefermentujących w zakażeniach krwi. Najczęstszymi izolowanymi gatunkami są *A. baumannii* i *P.aeruginosa* choć w Polsce dominuje *A. baumannii*, w Europie częściej izolowany jest *P.aeruginosa* (Livermore DM, Hope R, Brick G, Lillie M, Reynolds R (2008) BSAC Working Parties on Resistance Surveillance. Non-susceptibility trends among *Pseudomonas aeruginosa* and other non-fermentative Gram-negative bacteria from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *J Antimicrob Chemother.* 62 Suppl 2:ii55-63).

Zwiększa się też udział innych, rzadszych gatunków co może wynikać zarówno z polepszenia się technik identyfikacji, jak i zmian w lokalnej epidemiologii szpitali. W wielu innych badaniach także wykazano że szczepy *A.baumannii* rozprzestrzeniają się klonalnie, choć nie zawsze ma to związek z epidemiami. Nasz polski klon *A.baumannii* jest bardzo powszechny w Europie. Z racji wrażliwości szczepów *A.baumannii* jedynie na kolistynę poszukuje się innych możliwości terapeutycznych – połączenia kolistyny z innymi lekami w terapii skojarzonej, wprowadzenia do leczenia tygecykliny czy minocykliny (Martis N, Leroy S, Blanc V. (2014) Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections: a narrative review for the clinician. *J Infect* 69(1):1-12). Wśród *P. aeruginosa* tylko dwa szczepy należały do globalnie rozprzestrzenionego, wirulentnego klonu ST235, reszta szczepów była bardzo zróżnicowana i co najważniejsze wrażliwa na większość leków. Zaskoczył nas stosunkowo duży udział *S.maltophilia* – 20% wszystkich izolatów), a także *Achromobacter denitryficans* (9,4%). Kilku autorów we wcześniejszych badaniach także zwróciło uwagę na zwiększenie udziału *S.maltophilia* w zakażeniach krwi (Hotta G, Matsumura Y, Kato K, Nakano S, Yunoki T, Yamamoto M, et al. (2014) Risk factors and outcomes of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia: a comparison with bacteraemia caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *PLoS One* 9(11):e112208; Rattanaumpawan P, Ussavasodhi P, Kiratisin P, Aswapokee N (2013) Epidemiology of bacteremia caused by uncommon non-fermentative gram-negative bacteria. *BMC Infect Dis*13:167).

Do leczenia zakażeń wywołanych przez *S.maltophilia* stosuje się z reguły sulfametoksazol/trimetoprim, choć niektórzy zalecają także lewofloksacynę (Cho SY, Kang CI, Kim J, Ha YE, Chung DR, Lee NY, et al. (2014) Can levofloxacin be a useful alternative to trimethoprim-sulfamethoxazole for treating *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia? *Antimicrob Agents Chemother* 58(1):581-3).

4.3.4. Podsumowanie

Obecnie najważniejszą przyczyną chorób zakaźnych są zakażenia szpitalne występujące we wszystkich szpitalach świata. W przeciągu ostatnich lat w Europie zaobserwowano wzrost zakażeń wywołanych przez pałeczki Gram-ujemne (w tym Gram-ujemne niefermentujące) z 14% w 2004 roku do 19% w roku 2007 (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2012. Surveillance of healthcare-associated infections in Europe 2007). Ponadto w polskich szpitalach znacznie częściej niż w innych krajach świata dochodzi do zakażeń krwi o etiologii *Acinetobacter baumannii*. Zakażenia krwi i zapalenia płuc związane z mechaniczną wentylacją są dominującymi zakażeniami na oddziałach intensywnej terapii (OIT). Śmiertelność wśród zakażonych pacjentów na OIT sięga 35-50% (Russotto V., Cortegiani A., Graziano G., Saporito L., Raineri S. M., Mammina C., Giarratano A. 2015 Bloodstream infections in intensive care unit patients: distribution and antibiotic resistance of bacteria. Infect Drug Resist 8, 287-296). Zjawisko narastania oporności tych bakterii na antybiotyki o szerokim spektrum jest bardzo niepokojące. Zarówno wśród *A.baumannii* jak i *P.aeruginosa* coraz częściej większość izolowanych szczepów to szczepy XDR. W badaniu (i opanowaniu) epidemii powodowanych przez te szczepy pomagają nam coraz dokładniejsze molekularne metody typowania.

W przedstawionym osiągnięciu naukowym szczegółowo przeanalizowano zjawisko oporności wśród Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących ze szczególnym uwzględnieniem *A.baumannii* stosując zarówno metody fenotypowe jak i genetyczne oraz scharakteryzowano klonalne powiązania między szczepami z wykorzystaniem różnorodnych metod typowania epidemiologicznego. Scharakteryzowano także pod kątem epidemiologicznym populację pacjentów od których pochodziły badane szczepy, szczególnie pacjentów z OIT. Kolejne badania jakie są prowadzone przeze mnie obecnie (w różnym stopniu zaawansowania) dalej koncentrują się na wybranej grupie drobnoustrojów i dotyczą epidemiologii, oporności a także szczegółowej charakterystyki czynników wirulencji tych bakterii.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo –badawczych.

Poniżej przedstawiłam tematykę badawczą, która poza osiągnięciem naukowym stanowi istotną część mojej działalności naukowej.

5.1. Badania nad bakteriami probiotycznymi z rodzaju *Lactobacillus* - rolą prozdrowotną dla człowieka, bezpieczeństwem stosowania, a także metodami genotypowania szczepów tych bakterii.

Po obronie pracy doktorskiej zajmowałam się jeszcze przez pewien czas tematem bakterii probiotycznych przede wszystkim ich działaniem prozdrowotnym, wpływem na układ immunologiczny człowieka oraz bezpieczeństwem stosowania. Szczepy z rodzaju *Lactobacillus* mają udowodnione właściwości prozdrowotne wykazane w licznych randomizowanych badaniach prowadzonych zazwyczaj na dużej liczbie pacjentów. Mogą jednak w pewnych przypadkach stać się czynnikiem etiologicznym zakażeń np. bakteriemii. Dotyczy to głównie pacjentów z deficytami odporności, ciężkimi chorobami wrodzonymi bądź przewlekłymi. W publikacji Kochana i in. z 2011 roku w *Clinical Microbiology and Infection* opisano sepsę wywołaną przez *L.rhamnosus*, gdzie badania molekularne (a dokładniej typowanie metodą PFGE) potwierdziły że czynnikiem etiologicznym był szczep bakteryjny pochodzący z dostępnego bez recepty preparatu probiotycznego. Publikacja z 2012 roku (Strus i in.) przedstawia działanie prozdrowotne szczepów *Lactobacillus* u kobiet z bakteryjną waginozą a także zdolność szczepów probiotycznych podawanych doustnie do kolonizacji zarówno jelit jak i pochwy kobiet. Ta i kolejna publikacja (Gosiewski i In.) pokazuje także jakie metody genetyczne mogą być przydatne w ocenie kolonizacji różnych niszy ekologicznych w organizmie człowieka przez konkretne, wyselekcjonowane szczepy dostępne w komercyjnych preparatach probiotycznych. Aby wykazać czy szczepy są zdolne do kolonizacji a co za tym Idziego pozytywnego oddziaływania na ludzki organizm należy stosować metody pozwalające jednoznacznie odróżnić szczepy podawane od innych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* obecnych we florze fizjologicznej czy pożywieniu.

[1] Janusz Marcinkiewicz, Marta Ciszek, M Bobek, Magdalena Strus, Piotr B. Heczko, M Kurnyta, Rafał Biedroń, **Agnieszka Chmielarczyk** (2007) **Differential inflammatory mediator response in vitro from murine macrophages to lactobacilli and pathogenic intestinal bacteria**. *Int J Exp Pathol*. 88(3):155-64 (IF=2,460, MNiSW=20)

[2] Piotr Kochan, **Agnieszka Chmielarczyk**, Ludmiła Szymaniak, M Brykczynski, Katarzyna Galant, A Zych, Krystyna Pakosz, Stefania Giedrys-Kalemba, E Lenouvel, Piotr B. Heczko. (2011) ***Lactobacillus rhamnosus* administration causes sepsis in a cardiac surgical patient-is the time right to revise probiotic safety guidelines?** *Clin Microbiol Infect*;17(10):1589-92 (IF=4,540, MNiSW=35)

[3] Magdalena Strus, **Agnieszka Chmielarczyk**, Piotr Kochan, Piotr Adamski, Z Chełmicki, A Chełmicki, Andrzej Pałucha, Piotr B. Heczko. (2012) **Studies on the effects of probiotic *Lactobacillus* mixture given orally on vaginal and rectal colonization and on parameters of vaginal health in women with intermediate vaginal flora**. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*;163(2):210-215. (IF=1,843 MNiSW=20)

[4] Tomasz Gosiewski, Agnieszka Chmielarczyk, Magdalena Strus, Monika Brzychczy-Włoch, Piotr B. Heczko. (2012) **The application of genetics methods to differentiation of three *Lactobacillus* species of human origin.** Ann Microbiol;62(4):1437-1445. (IF=1,549, MNiSW=15)

5.2. Molekularna charakterystyka pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae izolowanych z zakażeń inwazyjnych od noworodków z bardzo małą masą urodzeniową, z uwzględnieniem ich lekooporności oraz czynników wirulencji.

W ramach tego tematu badań w latach 2010-2015 powstało 6 publikacji oryginalnych gdzie dokonano szczegółowej analizy epidemiologicznej zakażeń związanych z drobnoustrojami z rodziny Enterobacteriaceae. Na podstawie badań przeprowadzonych w ramach projektu SONATA powstała również praca doktorska Pani Moniki Pobiegi.

W badanej grupie znalazło się: 97 noworodków o masie <600g; 671 noworodków o masie 600-999g; 927 noworodków o masie >1000.

W wyniku prowadzonego nadzoru rozpoznano 125 zakażeń wczesnych i 287 zakażeń późnych o etiologii Enterobacteriaceae. Wśród zakażeń rozpoznano: 100 przypadków zakażeń krwi, zapadalność wynosiła 5,9/1000 osobo/dni pobytu, śmiertelność – 15% (zachowano 55 izolatów); 136 przypadków zapaleń płuc, zapadalność wynosiła 8,02/1000 osobo/dni pobytu (zachowano 85 izolatów); 10 zakażeń dróg moczowych, zapadalność wynosiła 0,6/1000 osobo/dni pobytu (zachowano 10 izolatów); 23 innych zakażeń (wśród nich martwicze zapalenie jelit, zapadalność wynosiła 1,36/1000 osobo/dni pobytu). Umieralność noworodków o masie urodzeniowej poniżej 600g wynosiła 53,6%,

Najwięcej zgromadzonych izolatów (n= 90) należało do gatunku *E.coli*: zapalenia płuc (n=50), zakażenia krwi (n=24), zakażenia dróg moczowych (n=8), inne zakażenia (n=8). Drugą dużą grupę stanowiły izolaty *Klebsiella pneumoniae* (n=60): zakażenia dróg oddechowych (n=40), zakażenia krwi – 18, zakażenia dróg moczowych – 2 izolaty.

Zidentyfikowano także 18 izolatów *K.oxytoca*: cztery izolaty pochodziły z zakażeń krwi, pozostałe 14 – z zapaleń płuc. Do rodzaju *Enterobacter sp.* należało 36 izolatów: 34 *Enterobacter cloacae* i 2 *Enterobacter sakazakii*. Z zakażeń dróg oddechowych pochodziło 23 izolaty, z zakażeń krwi – 6, z innych zakażeń 7 izolatów. Ostatni zidentyfikowany rodzaj to *Serratia sp* (n=11): izolaty *Serratia liquefaciens*, pochodziły z przypadków zapaleń płuc (n=2) i martwiczego zapalenia jelit (n=1), a osiem izolatów *Serratia marcescens*, pochodziło z zakażeń krwi (n=4), i z przypadków zapaleń płuc (n=4).

Przeprowadzono szczegółową fenotypową i genotypową analizę oporności izolatów *E.coli* i *K.pneumoniae*. Izolaty z gatunku *K.pneumoniae* charakteryzowały się wyższą opornością, więcej spośród nich wykazywało obecność mechanizmu oporności ESBL (68%), wśród nich wykazano także obecność klonów epidemicznych. Oporność w grupie szczepów *E.coli* ESBL-dodatnich była istotnie statystycznie wyższa niż w grupie szczepów ESBL-ujemnych ($p < 0,05$). Wszystkie szczepy *E.coli* ESBL dodatnie cechowały się obecnością genu $\text{bla}_{\text{CTX-M}}$: 60% z nich miało wariant CTX-M-15, zaś 40% wariant CTX-M-3. Izolaty *E.coli* były mocniej zróżnicowane genetycznie, posiadały liczne geny wirulencji, oporność typu ESBL kształtowała się na poziomie 27%.

Izolaty *K.pneumoniae* o fenotypie ESBL-dodatnim cechowały się wyższym stopniem oporności na wszystkie antybiotyki, z wyjątkiem karbapenemów i tygocykliny (wszystkie $p < 0,001$). Fenotypem ESBL-dodatnim cechowały się ogółem 34 szczepy *K.pneumoniae* (61,8%). U 31 z nich wykryto gen $\text{bla}_{\text{CTX-M-15}}$, u 1 - $\text{bla}_{\text{CTX-M-14}}$ i u 1 - $\text{bla}_{\text{CTX-M-3}}$. Geny z rodziny bla_{SHV} zidentyfikowano u 48 szczepów (87,3%). U 23 był to wariant SHV-11, u 14 – SHV-1, u 1 SHV-5 lub SHV-12, zaś u 9 nie określono wariantu SHV.

Typowanie metodą elektroforezy pulsacyjnej przeprowadzono dla największych grup szczepów czyli dla gatunku *E.coli*, *K.pneumoniae* i *E.cloacae*. W obrębie szczepów *E.coli* wykazano obecność 71 unikatowych pulsotypów, w większości o podobieństwie mniejszym niż 70%, co wskazuje na populację bardzo zróżnicowaną genetycznie. Analiza PFGE wykonana dla *K.pneumoniae* wykazała istnienie klonów epidemicznych wśród przebadanych izolatów. Klon A reprezentowany był przez 20 szczepów, wyizolowanych ze szpitala oznaczonego jako VI. Typowanie MLST wykazało, że w badanej populacji *E.coli* obecnych jest 10 różnych typów sekwencyjnych ST: 7 izolatów należy do wirulentnego klonu ST131. Różnice w obrębie tych dwóch populacji sprawiają, że rekomendowane jest zastosowanie zróżnicowanego leczenia empirycznego w zależności od dominacji konkretnego gatunku na danym oddziale. Dodatkowo wskazano, że każdy z tych patogenów wymaga innego typu nadzoru i innego typu kontroli zakażeń – zatem w zależności od dotychczasowych wyników badań mikrobiologicznych pochodzących z przypadków zakażeń należy wdrożyć/zastosować inny model profilaktyki i zapobiegania zakażeniom.

Wykazano, że pomimo, że fluorochinolony nie są lekami często stosowanymi na oddziałach noworodkowych, to jednak izolaty pochodzące od noworodków mogą cechować się obniżoną wrażliwością na te chemioterapeutyki, niosąc geny kodowane plazmidowo. Co za tym idzie,

mogą przyczyniać się do rozprzestrzeniania genów oporności i niepowodzeń terapeutycznych. Ponieważ izolaty niosące geny *qnr* nie mają jednakowego fenotypu oporności na fluorochinolony, ich częstość występowania może być znacznie wyższa, niż dotychczas sądzono na podstawie wyników MIC.

Przebadano koniugacyjną drogę przenoszenia się plazmidowych genów lekooporności wśród bakterii. Geny oporności często leżą w pobliżu ruchomych elementów genetycznych (sekwencji insercyjnych, transpozonów), a te z kolei w obrębie integronów co umożliwia łatwe ich przenoszenie pomiędzy różnymi replikonami DNA. Kolonizacja pacjentów oraz personelu medycznego przez szczepy wielolekooporne stanowi rezerwuar genów oporności, które mogą być przekazane innym drobnoustrojom.

Geny wirulencji zostały oznaczone w dwóch dominujących grupach szczepów: wśród *E.coli* i *K.pneumoniae*. Szczepy *E.coli* zostały najpierw podzielone na typy filogenetyczne: wykazano, że 62 szczepy należą do grupy B2, 16 do grupy D, 7 do grupy A, zaś 5 do grupy B1. Do grupy B2 i grupy D należą głównie szczepy *E.coli* wywołujące zakażenia pozajelitowe (czyli głównie zakażenia krwi, OUN i dróg oddechowych). Szczepy pochodzące z zakażeń krwi istotnie statystycznie częściej posiadały gen *ibeA*, niż szczepy pochodzące z zakażeń płuc czy dróg moczowych ($p=0,0109$). W izolatach pochodzących z moczu częściej wykrywano gen *iha* ($p=0,0023$), niż w izolatach z zakażeń krwi i płuc.

Wśród szczepów należących do grupy filogenetycznej B2 średnia liczba czynników wirulencji była wyższa, niż wśród izolatów z grup D i A ($p<0,001$).

[1] **Agnieszka Chmielarczyk**, Jadwiga Wójkowska-Mach, Alicja Grzesik, Dorota Romaniszyn, Monika Brzychczy-Włoch, Ewa Helwich, Piotr B. Heczko (2010) **Występowanie lekoopornych pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae u dzieci hospitalizowanych na oddziałach pediatrycznych szpitala wysokospecjalistycznego**. Przegląd Epidemiologiczny, 64:55-62, MNiSW=9

[2] Jadwiga Wójkowska-Mach, **Agnieszka Chmielarczyk**, Maria Borszewska-Kornacka, Joanna Domańska, Janusz Gadzinowski, Ewa Gulczyńska, Marek Nowiczewski, Ewa Helwich, Agnieszka Kordek, Dorota Pawlik, Joanna Jursa-Kulesza, Stefania Giedrys-Kalemba, Jerzy Szczapa, Piotr B. Heczko. (2013) **Enterobacteriaceae Infections of Very Low Birth Weight Infants in Polish Neonatal Intensive Care Units: Resistance and Cross-transmission**. *Pediatr Infect Dis J*;32(6):594-8. (IF=3,153 MNiSW=35)

[3] **Agnieszka Chmielarczyk**, Monika Pobiega, Jadwiga Wójkowska-Mach, Dorota Romaniszyn, Paweł Adamski, Piotr B. Heczko, Małgorzata Bulanda. (2013) **Molecular epidemiology, plasmid analysis, virulence, and resistance of Escherichia coli isolated from neonatal intensive care units in Poland**. *Diagn Microbiol Infect Dis*;76(4):542-5. (IF=2,568, MNiSW=20)

[4] **Agnieszka Chmielarczyk**, Jadwiga Wójkowska-Mach, Dorota Romaniszyn, Paweł Adamski, Ewa Helwich, Ryszard Lauterbach, Monika Pobiega, Maria Borszewska-Kornacka, Ewa Gulczyńska, Agnieszka Kordek, Piotr B. Heczko. (2014) **Mode of delivery and other risk factors for Escherichia coli infections in very low birth weight infants**. *BMC Pediatr*. 18;14:274. doi:10.1186/1471-2431-14-274. (IF=1,930, MNiSW=35)

[5] **Agnieszka Chmielarczyk**, Monika Pobiega, Jadwiga Wójkowska-Mach, Dorota Romaniszyn, Piotr B. Heczko, Małgorzata Bulanda. (2015) **Bloodstream infections due to Enterobacteriaceae among neonates in Poland- molecular analysis of the isolates**. Polish Journal of Microbiology; 64 (3) 215-223 (IF=0,750 MNiSW=15)

[6] **Agnieszka Chmielarczyk**, Monika Pobiega, Christophe de Champs, Jadwiga Wojkowska-Mach, Anna Rozanska, Piotr B. Heczko, Thomas Guillard, Małgorzata Bulanda. (2015) **The High Prevalence of Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance Among Very Low Birth-Weight Infants in Poland**. Microb Drug Resist. ;21(4):391-7. (IF=2,529 MNiSW=20)

5.3 Badania nad wirulencją i lekoopornością szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z przypadków zakażeń w różnych grupach pacjentów o szczególnym narażeniu.

Prowadzone badania umożliwiły opisanie szczegółowo epidemiologii zakażeń o etiologii *S.aureus* w Polsce południowej. Analizę epidemiologiczną przeprowadzono w różnych płaszczyznach jako: typ opieki nad pacjentem z zakażeniem SA (szpital vs. LTCF), typ pacjenta z zakażeniem SA (noworodki VLBW lub pacjenci geriatryczni), forma kliniczna zakażenia (stopa cukrzycowa oraz jeszcze nie opublikowane prace dotyczące zakażeń uogólnionych, zakażeń miejsca operowanego i ran). Szczegółowo scharakteryzowano wszystkie szczepy metycylinooporne *S.aureus*.

Wśród noworodków z bardzo małą masą urodzeniową *S. aureus* był czynnikiem etiologicznym 6,5% przypadków zakażeń (ogółem: wczesnych i późnych), najczęściej w zakażeniach krwi (55,2%) oraz zapaleniach płuc (39,7%). Fenotyp MRSA stwierdzono w 32,8%, nieistotnie częściej w zakażeniach krwi i nie miał związku ze stosowaniem linii naczyniowych, zarówno centralnych, jak i obwodowych. Fenotyp MRSA był istotnie związany z czasem, to znaczy był związany z zakażeniami wykrywanymi średnio w 14 dobie (vs. 23 doba dla MSSA, $p=0.0194$). Konsumpcja antybiotyków – wyrażona długością terapii (DOT) oraz definiowanymi dawkami dobowymi (DDD) – związana z leczeniem zakażeń SA nie była istotnie zależna od fenotypu. Dodatkowo przeanalizowano konsumpcję antybiotyków tylko w zakażeniach krwi, gdzie stwierdzono różnice w konsumpcji glikopeptydów w zakażeniach MSSA vs. MRSA wyrażona w DDD (udział w zastosowanych antybiotykach, odpowiednio wynosiła 29,6 oraz 50,6). Badane szczepy nie charakteryzowały się znacząco wysoką opornością (najwyższa na erytromycynę: 32,6% oraz klindamycynę: 24,5%) czy zjadliwością (najczęstsze czynniki zjadliwości to hemolizyna alfa: 93,9% oraz leukocydyna E: 38,8%) nie stwierdzono związku pomiędzy liczbą czynników zjadliwości, a opornością.

Ogółem MRSA był obecny (jako czynnik kolonizujący bądź etiologia zakażenia) u 17,6% rezydentów opieki długoterminowej. Ryzyko kolonizacji (obecność w ranie bądź przedsiönku nosa) było istotnie związane typem opieki (ZOL vs. DPS) oraz stanem ogólnym rezydenta: obecnością nietrzymania moczu bądź cewnika w pęcherzu moczowym, karmieniem przez zgłębnik, a szczególnie niską wartością skali Barthel oraz ograniczeniami w mobilności. Natomiast dla zakażenia o etiologii SA istotnie znaczenie miało oprócz podanych powyżej: wcześniejsza kolonizacja MRSA, oraz obecność ran przewlekłych, zwłaszcza owrzodzeń podudzi. Analiza wieloczynnikowa wskazała, że ryzyko MRSA było istotnie związane z: wiekiem, aktywnością fizyczną oraz ranami przewlekłymi. Rezydenci z MRSA byli istotnie częściej hospitalizowani w związku z rozwojem zakażeniami, niż ci z fenotypem MSSA. Szczepy SA izolowane z przypadków zakażeń były znacząco odporne na fluorochinolony (76.5%), tobramycynę oraz amikacynę (64.7%).

W badanej grupie pacjentów z ranami przewlekłymi stopy cukrzycowej znaczna część była leczona w warunkach szpitalnych: 70,1% w tym w oddziale chirurgii ogólnej (37,3%) i naczyń (9%), oraz w oddziale internistycznym (55,2%), pozostali w opiece domowej. Mediana wieku grupy badanej to 63 lata. Najwyższa oporność dotyczyła antybiotyków z grupy aminoglikozydów: amikacyna 33,8%, tobramycyna 41,2% i gentamycyna 29,4%. U 8 szczepów (8,8%) stwierdzono obecność genu *mup*, który odpowiada za mupirocynooporność. Badane szczepy nie cechowały się wysoką zjadliwością: 70,6% szczepów posiadało gen *lukE*, należący do leukocydyny E, 30,9% ma w swoim genomie geny kodujące enterotoksyny, a 11,8% szczepów było w posiadaniu genu warunkującego zdolność do wywołania wstrząsu toksycznego *tsst1*.

Łącznie z różnych form zakażeń wyizolowano 120 szczepów o fenotypie MRSA. Poddano je typowaniu genetycznemu za pomocą dwóch metod: metodą PFGE oraz *spa*-typing. Typowanie metodą elektroforezy pulsacyjnej wykazało, że większość szczepów charakteryzowała się unikalnymi pulsotypami. Kilka szczepów o identycznych lub bardzo podobnych (<90%) wzorach restrykcyjnych wykazano wśród izolatów z zakażeń inwazyjnych (izolowanych z zakażeń krwi i dolnych dróg oddechowych). Wyodrębniono klony do których zaliczono 4 szczepy i 3 szczepy, a także cztery identyczne pary szczepów. Szczepy o jednakowych pulsotypach pochodziły z tych samych szpitali. Nie wykryto jednakże żadnego dominującego klonu epidemicznego. W typowaniu metodą *spa*-typing zsekwencjonowano gen *spa* od wszystkich 120 szczepów.

Najczęściej pojawiający się typ *spa* to t003, występował u ponad połowy szczepów (51,5%).

U wszystkich izolatów MRSA określano także typ kasety chromosomalnej SCC mec w obrębie której kodowany jest gen *mecA* odpowiedzialny za fenotyp MRSA. Najczęściej wykrywany typ kasety chromosomalnej to SCC mec II (u 36% izolatów).

Porównując ze sobą wyniki otrzymane różnymi metodami genotypowania wykazano, że spośród przebadanych izolatów MRSA największą grupę stanowią izolaty posiadające typ *spa* t003 i jednocześnie SCC mec II (31,1%), następnie izolaty o typie *spa* t138 i SCC mec III (10%) i te o typie t003 i SCC mec IV (8,9%). Są to charakterystyczne typy szczepów raportowane dla terenu Polski, w rejonie Gdańska najczęściej wykrywane były szczepy z kasetą SCC mec II należące do typów *spa* t151 (51,4%) oraz t003 (34,3%), z kolei w rejonie Poznania dominował typ kasety SCC mec III.

[1] Dorota Romaniszyn, Monika Pobiega, Jadwiga Wójkowska-Mach, **Agnieszka Chmielarczyk**, Barbara Gryglewska, Paweł Adamski, Piotr B. Heczko, Dorota Ochońska, Małgorzata Bulanda. (2014) **The general status of patients and limited physical activity as risk factors of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus occurrence in long-term care facilities residents in Krakow, Poland.** BMC Infect Dis. 18;14:271. doi: 10.1186/1471-2334-14-271. (IF=2,613, MNiSW=25)

[2] Dorota Romaniszyn, Anna Róžańska, Jadwiga Wójkowska-Mach, **Agnieszka Chmielarczyk**, Monika Pobiega, Paweł Adamski, Ewa Helwich, Ryszard Lauterbach, Maria Borszewska-Kornacka, Ewa Gulczyńska, Agnieszka Kordek, Małgorzata Bulanda. (2015) **Epidemiology, antibiotic consumption and molecular characterisation of Staphylococcus aureus infections - data from the Polish Neonatology Surveillance Network, 2009-2012.** BMC Infect Dis. 1;15(1):169. doi:10.1186/s12879-015-0890-3. (IF=2,690, MNiSW=30)

[3] Monika Pobiega, Iwona Myjak, Monika Pomorska-Wesołowska, Dorota Romaniszyn, Grzegorz Ziółkowski, **Agnieszka Chmielarczyk**, Joanna Maciag, Anna Szczypta, Jadwiga Wójkowska-Mach. (2016) **Virulence Potential of Staphylococcus Aureus Strains Isolated From Diabetic Foot Ulcers Among Patients From Southern Poland.** Curr Vasc Pharmacol. 2016;14(6):547-551 (IF=2,374 (z 2015) MNiSW=25)

[4] **Agnieszka Chmielarczyk**, Monika Pomorska-Wesołowska, Anna Szczypta, Dorota Romaniszyn, Monika Pobiega, Jadwiga Wójkowska-Mach. (2016) **Molecular analysis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from different types of infections from patients hospitalized in 12 regional, non-teaching hospitals in southern Poland.** Journal of Hospital Infection 4 November 2016 doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2016.10.024 (IF=2,555 (z 2015) MNiSW=30)

[5] Monika Pomorska-Wesołowska, Anna Róžańska, Joanna Natkaniec, Barbara Gryglewska, Anna Szczypta, Mirosława Dzikowska, **Agnieszka Chmielarczyk**, Jadwiga Wójkowska-Mach. **Longevity and gender as the risk factors of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in southern Poland.** BMC Geriatr. 2017 Feb 10;17(1):51. (IF=2,611 (z 2016) MNiSW=30)

[6] Monika Pomorska-Wesołowska, **Agnieszka Chmielarczyk**, Monika Chlebowicz, Grzegorz Ziółkowski, Anna Szczypta, Joanna Natkaniec, Dorota Romaniszyn, Monika Pobiega, Mirosława Dzikowska, Lech Krawczyk, Joanna Koziół, Jadwiga Wójkowska-Mach. **Virulence and Antibiotic Resistance of Staphylococcus aureus Isolated from Bloodstream Infections and Pneumonia in Southern Poland.** J Glob Antimicrob Resist. 2017; S2213-7165 (17) 30137-6. doi:10.1016/j.jgar.2017.07.009. (IF= 1.276 (z 2016) MNiSW=15)

5.4. Badania nad właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi stopów miedzi i możliwościami ich zastosowania w powierzchniach użytkowych w zakładach opieki zdrowotnej.

Badania prowadzone w tej tematyce finansowane były ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, na podstawie grantu nr PBS3/AS/32/2015. Chociaż przeciwdrobnoustrojowe właściwości miedzi i efektywność elementów wyposażenia pomieszczeń szpitalnych potwierdzono już w badaniach klinicznych, ciągle niewiele szpitali czy innych jednostek ochrony zdrowia wprowadziło je do użycia. Wadą powierzchni dotykowych wykonanych z materiałów o przeciwdrobnoustrojowych właściwościach na bazie miedzi jest ich podatność na korozję wywołaną potem rąk ludzkich, która w miarę eksploatacji istotnie obniża walory estetyczne produktów. Badania przeciwdrobnoustrojowych właściwości miedzi i jej stopów wykonywane były dotychczas za pomocą różnych metod uwzględniających wiele kombinacji parametrów mających wpływ na uzyskane wyniki. Istotne tutaj są m.in. takie czynniki jak rodzaj badanego stopu, gatunek drobnoustroju, gęstość zawiesiny drobnoustrojów, czas ekspozycji, metoda odzysku naniesionych bakterii na badane stopy metali, dodatki organiczne do zawiesiny mające na celu symulowanie różnego rodzaju zanieczyszczenia środowiska itd. W ramach realizacji projektu przeprowadzono badania mające ocenić stopień i rodzaj kontaminacji powierzchni dotykowych polskich szpitali przez bakterie, opracowano autorską metodykę oceny przeciwdrobnoustrojowych właściwości miedzi (ze względu na brak krajowych wytycznych w tym zakresie) oraz wykonano badania laboratoryjne dla różnych materiałów i różnych szczepów bakteryjnych. Badania zaowocowały kilkoma publikacjami. Celem pierwszej publikacji było zidentyfikowanie potencjalnie patogennych gatunków bytujących na powierzchniach dotykowych stosowanych w różnych typach oddziałów szpitalnych. Analizowano przede wszystkim udział poszczególnych gatunków izolowanych z próbek środowiskowych z różnych miejsc typu: stoliki przyłóżkowe, stojaki kroplówek, włączniki świateł, klamki itp. z oddziałów intensywnej terapii, oddziałów chirurgicznych i oddziałów internistycznych trzech dużych szpitali południowej Polski. Do identyfikacji gatunkowej został wykorzystany nowoczesny system oparty na spektroskopii masowej- MALDI-TOF. Ogólnie około 20% wyizolowanych szczepów były to bakterie z 2 grupy ryzyka, mogące wywołać niebezpieczne zakażenia u ludzi. Najwięcej patogennych szczepów znaleziono na oddziałach intensywnej terapii. Obecność licznych genów oporności wykazano przede wszystkim u koagulazo-negatywnych gronkowców, mogą one stanowić rezerwuar genów oporności. W kolejnej pracy skupiono się właśnie na szczegółowym przebadaniu

najliczniejszej grupy drobnoustrojów środowiskowych czyli koagulazo-negatywnych gronkowców. Ponad 90 szczepów przeanalizowano pod kątem genów oporności, wirulencji, tworzenia biofilmu. Wybrane szczepy (wielolekooporny, wrażliwy, tworzący biofilm) poddano badaniu z wykorzystaniem różnych stopów miedzi oraz stali i oceniono stopień antybakteryjnego działania wybranych stopów. Szczegółowo oceniono skuteczność przeciwdrobnoustrojową takich stopów jak: mosiądz CuZn37 oraz CuZn15), brąz cynowy CuSn6, brąz aluminiowy CuAl10Ni5Fe4, miedzionikiel CuNi10Fe1Mn, nowe srebro CuNi12Zn20 oraz CuNi18Zn20, w porównaniu z miedzią ETP (99.9% Cu).

W ramach następnej publikacji głównym celem badawczym było wykorzystanie metody ekspozycji mokrej (zmodyfikowana metodyka normy japońskiej) w celu oceny przeciwdrobnoustrojowych właściwości wybranych stopów miedzi w odniesieniu do bakterii z gatunku *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli*. Wyboru metody dokonano mając na uwadze zarówno względy praktyczne, w tym możliwość odniesienia się do wyników innych autorów, którzy bardzo często prowadzili badania właśnie z wykorzystaniem mokrej ekspozycji, a także przesłanki merytoryczne, tj. możliwość zbadania dynamiki oddziaływania badanych materiałów na wykorzystane drobnoustroje w określonym okresie czasu w dwóch wariantach ekspozycji (zawiesina bakterii w NaCl vs. w bulionie TSB), co w ocenie autorów stanowiło podstawę do lepszego zrozumienia mechanizmu zjawiska. Wykazano przeciwdrobnoustrojową skuteczność miedzi i jej stopów w porównaniu ze stałą nierdzewną, ale skuteczność ta, tj. stopień redukcji liczby bakterii w zależności od czasu różnił się w zależności od gatunku bakterii, a także od rodzaju materiału, z jakiego wykonano powierzchnie badanych próbek. Obserwowana prawidłowość to: im wyższa zawartość miedzi, tym skuteczniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe.

[1] Anna Róžańska, Dorota Romaniszyn, **Agnieszka Chmielarczyk**, Małgorzata Bulanda (2017) **Bacteria contamination of touch surfaces in polish hospital wards**. *Medycyna Pracy* Jun 27;68(4):459-467 doi: <https://doi.org/10.13075/mp.5893.00575> (IF=0,416 (z 2016) MNiSW=15)

[2] Anna Róžańska, **Agnieszka Chmielarczyk**, Dorota Romaniszyn, Małgorzata Bulanda, Monika Walkowicz, Piotr Osuch, Tadeusz Knych (2017). **Antibiotic resistance, ability to form biofilm and susceptibility to copper alloys of selected staphylococcal strains isolated from touch surfaces in Polish hospital wards**. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017 Aug 14;6:80. doi: 10.1186/s13756-017-0240-x. (IF= 2.989 (z 2016) MNiSW=25)

[3] Anna Róžańska, **Agnieszka Chmielarczyk**, Dorota Romaniszyn, Agnieszka Sroka-Oleksiak, Małgorzata Bulanda, Monika Walkowicz, Piotr Osuch, Tadeusz Knych (2017). **Antimicrobial Properties of Selected Copper Alloys on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in Different Simulations of Environmental Conditions: with vs. without Organic Contamination**. *Int J Environ Res Public Health*. 14(7). E813. doi: 10.3390/ijerph14070813. (IF= 2.101 (z 2016) MNiSW=25)

5.5. Prace wykraczające poza obszar głównych tematów badawczych.

W czasie pracy w Katedrze angażowałam się także w projekty i badania będące poza głównym nurtem moich aktywności. Jeden z nich dotyczył dochodzenia epidemiologicznego prowadzonego w czasie epidemii wywołanej przez bardzo inwazyjny szczep *S.pyogenes* z grupy A w jednym z krakowskich szpitali. W dochodzeniu udało się zidentyfikować źródło epidemii – nosicielem szczepu była osoba z personelu medycznego. Wszystkie wyizolowane szczepy bardzo dokładnie przebadano metodami molekularnymi- porównano stosując technikę PFGE, określono typ genu kodującego białko powierzchniowe M (*emm*), opisano geny kodujące superantygeny. Spośród 19 wyizolowanych β -hemolitycznych szczepów 14 należało do jednego klonu, posiadało gen *emm28* oraz *speC*, natomiast nie miało *speA* i *ssa*. Wszyscy pacjenci zostali poddaniu odpowiedniej terapii antybiotykowej, wśród personelu przeprowadzono szereg szkoleń, zastosowano także profilaktykę antybiotykową, u nosiciela po leczeniu prowadzono kontrolę eradykacji *S.pyogenes* z gardła.

Druga praca w której brałam udział, dotyczyła zmian składu flory przewodu pokarmowego człowieka w przebiegu ulcerative colitis (UC). W pracy tej wykazano znaczący wzrost liczebności bakterii *E.coli* na błonie śluzowej jelita grubego u pacjentów z UC w porównaniu do grupy kontrolnej. Analiza PFGE nie wykazała aby w grupie badanej występowały specyficzne szczepy *E. coli*, jednak szczepy te posiadały znacznie częściej sekwencje genów *chuA* i *iutA*, które ułatwiają pozyskiwanie żelaza podczas przewlekłych procesów zapalnych jelit. W przebiegu UC występuje krwawienie ze śluzówki jelita, zatem dostarczane jest żelazo, które może stymulować zwiększanie się kolonizacji błony śluzowej okrężnicy przez *E. coli*.

[1] Magdalena Strus, Artur Drzewiecki, **Agnieszka Chmielarczyk**, Anna Tomusiak, P Romanek, K Kosowski, Piotr Kochan, Mark van der Linden, Rudolf Lütticken, Piotr B. Heczko (2010) **Microbiological investigation of a hospital outbreak of invasive group A streptococcal disease in Krakow, Poland**. Clin Microbiol Infect 16:1442-1447. (IF=4,784, MNiSW=32)

[2] Magdalena Pilarczyk-Zurek, **Agnieszka Chmielarczyk**, Tomasz Gosiewski, Anna Tomusiak, Paweł Adamski, Małgorzata Zwolinska-Wcislo, Tomasz Mach, Piotr B. Heczko, Magdalena Strus. (2013) **Possible role of Escherichia coli in propagation and perpetuation of chronic inflammation in ulcerative colitis**. BMC Gastroenterol 8;13:61.(IF=2,113, MNiSW=25)

Szczegółowy wykaz opublikowanych przeze mnie prac naukowych wraz z informacją o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki stanowi odrębny załącznik (nr 3) do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.


Dr n. biol. Agnieszka Chmielarczyk