



Imię i nazwisko autora rozprawy: Magdalena Wysocka
Dyscyplina naukowa: nauki chemiczne

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Charakterystyka genetyczna szczepów *Klebsiella pneumoniae* izolowanych od pacjentów po przeszczepieniu nerki oraz badanie wpływu leków immunosupresyjnych na ekspresję genów bakteryjnych

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Genetic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from renal transplant patients and the study of the effect of immunosuppressive drugs on the expression of bacterial genes

Promotor
<i>podpis</i>
dr hab. Beata Krawczyk, prof. uczelni
Promotor pomocniczy
<i>podpis</i>
dr hab. med. Justyna Gołębiewska



OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: Magdalena Wysocka

Ja, niżej podpisany(a), wyrażam zgodę/~~nie wyrażam zgody~~* na bezpłatne korzystanie z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej:

Charakterystyka genetyczna szczepów *Klebsiella pneumoniae* izolowanych od pacjentów po przeszczepieniu nerki oraz badanie wpływu leków immunosupresyjnych na ekspresję genów bakteryjnych do celów naukowych lub dydaktycznych.¹

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktoranta

Świadomy(a) odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. z 2006 r., nr 90, poz. 631) i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2012 r., poz. 572 z późn. zm.),² a także odpowiedzialności cywilno-prawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem dr hab. Beatą Krawczyk, prof. uczelni, ~~drugim promotorem~~ <drugi promotor>, promotorem pomocniczym dr hab. med. Justyną Gołębiowską, ~~kopromotorem~~ <kopromotor>*.

Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami zgodnie z art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych. Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktoranta

Ja, niżej podpisany(a), wyrażam zgodę/~~nie wyrażam zgody~~* na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej, Pomorskiej Bibliotece Cyfrowej oraz poddawania jej procesom weryfikacji i ochrony przed przywłaszczeniem jej autorstwa.

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktoranta

*) niepotrzebne skreślić

¹ Zarządzenie Rektora Politechniki Gdańskiej nr 34/2009 z 9 listopada 2009 r., załącznik nr 8 do instrukcji archiwalnej PG.

² Ustawa z dnia 27 lipca 2005 r. Prawo o szkolnictwie wyższym: Rozdział 7 Odpowiedzialność dyscyplinarna doktorantów, Art. 226.



OPIS ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Autor rozprawy doktorskiej: Magdalena Wysocka

Tytuł rozprawy doktorskiej w języku polskim: Charakterystyka genetyczna szczepów *Klebsiella pneumoniae* izolowanych od pacjentów po przeszczepieniu nerki oraz badanie wpływu leków immunosupresyjnych na ekspresję genów bakteryjnych

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Genetic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from renal transplant patients and the study of the effect of immunosuppressive drugs on the expression of bacterial genes

Język rozprawy doktorskiej: polski

Promotor rozprawy doktorskiej: dr hab. Beata Krawczyk, prof. uczelni

Promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej*: dr hab. med. Justyna Gołębiowska

Data obrony:

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku polskim: *Klebsiella pneumoniae*, ekspresja genu, przeszczep nerki, immunosupresja

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku angielskim: *Klebsiella pneumoniae*, gene expression, renal transplant, immunosuppression

Streszczenie rozprawy w języku polskim: Bakterie z gatunku *Klebsiella pneumoniae* należą do oportunistycznych patogenów odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne. Drobnoustroje te wykazują skłonność do oporności wielolekowej i wysokiej wirulencji, co stanowi poważne zagrożenie dla pacjentów nieimmunokompetentnych. Wśród pacjentów po transplantacji nerki zakażenia układu moczowego (ZUM) stanowią najczęstszą przyczynę powikłań infekcyjnych. Mechanizmy molekularne leżące u podstaw patogenezы *K. pneumoniae* nie są w pełni poznane. Celem pracy doktorskiej była charakterystyka genetyczna szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych od biorców nerki z ZUM lub bezobjawową bakteriurią. Zbadano wpływ leków immunosupresyjnych (tacrolimusu, cyklosporyny) na wzrost bakterii i ekspresję genów bakteryjnych istotnych w kolonizacji dróg moczowych w tej grupie chorych. Określono profile wirulencji i antybiotykooporności. Zidentyfikowano nietypowy dla ZUM fenotyp hipermukoidalny, oporność na antybiotyki β -laktamowe o rozszerzonym spektrum działania (ESBL) oraz



w przypadku niektórych szczepów produkcję metalo- β -laktamazy (typ NDM-1), nadającą oporność na karbapenemy. Poprzez sekwencjonowanie (WGS) wybranych genomów wykazano obecność ruchomych elementów genetycznych istotnych w horyzontalnym transferze genów i nadających nowe cechy bakterii. Drugim z aspektów naukowych pracy było zbadanie wpływu wybranych leków immunosupresyjnych na ekspresję fimbrii typu 1. Wykazano, że rodzaj zastosowanej terapii immunosupresyjnej może mieć wpływ na rozwój infekcji dróg moczowych.

Streszczenie rozprawy w języku angielskim: *Klebsiella pneumoniae* bacteria are opportunistic pathogens responsible for nosocomial infections. These microorganisms are prone to multi-drug resistance and high virulence, which poses a serious threat to non-immunocompetent patients. Among kidney transplant patients, urinary tract infections (UTIs) are the most common cause of infectious complications, however the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of *K. pneumoniae* are not fully understood. The aim of the doctoral dissertation was the genetic characterization of *K. pneumoniae* strains isolated from renal transplant recipients with UTI or asymptomatic bacteriuria. The influence of immunosuppressants (tacrolimus, cyclosporine) on the growth of bacteria and the expression of bacterial genes important in urinary tract colonization in this group of patients was investigated. Profiles of virulence and antibiotic resistance were determined. A hypermuroid phenotype atypical for UTIs, extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *K. pneumoniae* and, in some strains, production of metallo- β -lactamase (type NDM-1), conferring resistance to carbapenems were identified. By sequencing (WGS) selected genomes, the presence of mobile genetic elements essential in the horizontal gene transfer and giving new bacterial traits was demonstrated. The second scientific aspect of the study was to investigate the effect of selected immunosuppressive drugs on the expression of type 1 fimbriae. It was shown that the type of immunosuppressive therapy used may affect the development of urinary tract infections.

*) niepotrzebne skreślić.



Spis Treści

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ I SKRÓTÓW	8
1. Przeszczep nerki jako opcja terapeutyczna	9
1.1. Rejestr przeszczepień nerek w Polsce	9
2. Zakażenia układu moczowego u pacjentów po transplantacji nerki	11
2.1. Kliniczne definicje ZUM	11
2.2. Patogeneza ZUM	13
2.3. Epidemiologia ZUM	13
2.4. Czynniki ryzyka ZUM po przeszczepie nerki	15
2.5. Wpływ ZUM na funkcję nerki przeszczepionej	16
2.6. Czynniki etiologiczne ZUM	17
2.7. Leczenie immunosupresyjne po przeszczepieniu nerki	18
2.8. Podsumowanie	20
3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
3.1. Rezerwuary <i>K. pneumoniae</i> w warunkach szpitalnych	23
3.2. Właściwości genomu <i>K. pneumoniae</i>	23
3.3. Czynniki wirulencji <i>K. pneumoniae</i>	24
3.3.1. Adhezyny	25
3.3.2. Siderofory	28
3.3.3. Lipopolisacharyd (LPS) i polisacharyd otoczkowy	28
3.3.4. Fenotyp hipermukoidalny	29
3.4. Determinanty oporności	30
3.4.1. Mechanizmy wpływające na zmienne profile oporności na antybiotyki szczepów <i>K. pneumoniae</i> odpowiedzialnych za ZUM	31
3.4.2. Oporność na β -laktamy	32
3.5. Podsumowanie	33
4. Cel pracy	35
5. Materiały i Metody	36
5.1. Materiały	36
5.1.1. Grupy badawcze	36
5.1.2. Kolekcja szczepów wykorzystanych w pracy	37
5.1.3. Bufory	42
5.1.4. Enzymy	42
5.1.5. Oligonukleotydy	43
5.1.6. Markery wielkości fragmentów DNA	44
5.1.7. Podłoża i pożywki hodowlane	44
5.1.8. Pozostałe roztwory i odczynniki	44
5.1.9. Materiały podstawowe	45
5.1.10. Zestawy komercyjne	45
5.1.11. Aparatura i sprzęt laboratoryjny	45
5.1.12. Programy komputerowe	46
5.2. Metody	47
5.2.1. Ocena wrażliwości <i>K. pneumoniae</i> na antybiotyki	47
5.2.2. Określanie fenotypu hipermukoidalnego	47
5.2.3. Izolacja DNA	47

5.2.4.	Wykrywanie obecności genu <i>bla</i> _{NDM-1} związanego z opornością na karbapenemy	48
5.2.5.	Typowanie genetyczne szczepów z zastosowaniem metody PCR MP	48
5.2.6.	Wykrywanie obecności genów kodujących wybrane czynniki wirulencji <i>K. pneumoniae</i> metodą PCR	50
5.2.7.	Badanie wpływu leków immunosupresyjnych na szczepy <i>K. pneumoniae</i>	52
5.2.8.	Sekwencjonowanie całego genomu szczepów <i>K. pneumoniae</i> o największej wirulencji i szczepów <i>K. pneumoniae</i> New Delhi, z wykorzystaniem wielkoskalowego sekwencjonowania genomów	63
5.2.9.	Analiza statystyczna danych klinicznych w odniesieniu do charakterystyki genetycznej ..	64
5.2.10.	Analiza bioinformatyczna danych sekwencjonowania	64
5.2.11.	Podsumowujący schemat przeprowadzonych doświadczeń	67
6.	Rezultaty i dyskusja.....	68
6.1.	Analiza kliniczna ZUM u pacjentów po przeszczepie nerki.....	68
6.2.	Oporność <i>K. pneumoniae</i> na antybiotyki β -laktamowe o rozszerzonym spektrum substratowym	68
6.2.1.	DYSKUSJA	69
6.3.	Występowanie genów kodujących czynniki wirulencji u szczepów <i>K. pneumoniae</i> wyizolowanych od pacjentów z ZUM.....	69
6.3.1.	Porównanie występowania genów kodujących czynniki wirulencji między grupą badaną a grupą kontrolną	69
6.3.2.	Porównanie występowania genów kodujących czynniki wirulencji w zależności od rodzaju ZUM	75
6.3.3.	Porównanie występowania genów kodujących czynniki wirulencji w szczepach <i>K. pneumoniae</i> izolowanych od pacjentów z różnymi schematami immunosupresji	76
6.3.4.	DYSKUSJA	76
6.4.	Analiza pokrewieństwa genetycznego szczepów <i>K. pneumoniae</i> wyizolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki.....	79
6.4.1.	DYSKUSJA	84
6.5.	Analiza fenotypu hipermukoidalnego.....	85
6.5.1.	DYSKUSJA	89
6.6.	Analiza pokrewieństwa genetycznego i lekooporności szczepów <i>K. pneumoniae</i> produkujących karbapenemazy NDM-1	93
6.6.1.	Wykrywanie karbapenemaz.....	94
6.6.2.	Analiza lekooporności	95
6.6.3.	Analiza pokrewieństwa genetycznego badanych szczepów	97
6.6.4.	Cechy genomiczne izolatów <i>K. pneumoniae</i> NDM-1	98
6.6.5.	DYSKUSJA	108
6.7.	Badanie ekspresji genów	112
6.7.1.	Badanie ekspresji genów fimbrii typu 1 w różnych warunkach wzrostu <i>K. pneumoniae</i> z zastosowaniem metody PCR-RFLP	112
6.7.2.	Badanie heterogeniczności w ekspresji genów fimbrii typu 1 szczepów klinicznych <i>K. pneumoniae</i> z zastosowaniem metody PCR-RFLP	113
6.7.3.	Badanie ekspresji fimbrii typu 1 szczepów <i>K. pneumoniae</i> wobec ekspozycji na leki immunosupresyjne z zastosowaniem testu przełącznika fazowego	115
6.7.4.	DYSKUSJA	117
6.8.	Badanie wpływu leków immunosupresyjnych na wzrost bakterii <i>K. pneumoniae</i> i ekspresję genów z zastosowaniem techniki qRT-PCR.....	119
6.8.1.	Wrażliwość izolatów <i>K. pneumoniae</i> na leki immunosupresyjne	119
6.8.2.	Wyznaczenie krzywych wzrostu bakterii w obecności leków immunosupresyjnych	121
6.8.3.	DYSKUSJA	123
6.8.4.	Badanie poziomów ekspresji genów izolatów <i>K. pneumoniae</i> metodą porównawczą z zastosowaniem qRT-PCR	124
6.8.5.	Wpływ długotrwałej ekspozycji izolatów <i>K. pneumoniae</i> na działanie leków immunosupresyjnych	132
6.8.6.	DYSKUSJA	136

7. Podsumowanie i wnioski końcowe.....	140
8. Perspektywy.....	144
9. Bibliografia.....	145
10. Wykaz Rysunków.....	157
11. Wykaz Tabel.....	161
12. Wykaz dorobku naukowego	163
13. Materiały dodatkowe	167

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ I SKRÓTÓW

- ABU – bezobjawowa (asymptomatyczna) bakteriuria, ang. *asymptomatic bacteriuria*
- AGPN – odmiedniczkowe zapalenie nerki przeszczepionej, ang. *acute graft pyelonephritis*
- AMR – oporność na antybiotyki, ang. *antimicrobial resistance*
- CPE – bakterie z rodziny Enterobacteriaceae wytwarzające karbapenemazy, ang. *carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*
- CRE – bakterie z rodziny Enterobacteriaceae odporne na karbapenemy, ang. *carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*
- ESBL – β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania, ang. *extended spectrum beta-lactamase*
- ESRD – schyłkowa niewydolność nerek, ang. *end-stage renal disease*
- HGT – horyzontalny transfer genów, ang. *horizontal gene transfer*
- HM – hiper mukoidalność, ang. *hypermucoviscosity*
- IBC – wewnątrzkomórkowe społeczności bakteryjne, ang. *intracellular bacterial community*
- ICE – integracyjny element koniugacyjny, ang. *Integrative Conjugative Element*
- KPC – karbapenemaza *Klebsiella pneumoniae*, ang. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*
- NDM-1 – ang. *New Delhi metallo- β -lactamase-1*
- OD – gęstość optyczna, ang. *optical density*
- PChN – przewlekła choroba nerek, ang. *chronic kidney disease*
- PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy, ang. *Polymerase Chain Reaction*
- pz – par zasad
- RTx – pacjenci po transplantacji nerki, ang. *renal transplant recipients*
- qPCR – PCR w czasie rzeczywistym, ang. *real-time PCR*
- SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*
- ST – typ sekwencji, ang. *Sequence Type*
- UPEC – szczepy uropatogenne *Escherichia coli*, ang. *uropathogenic Escherichia coli*
- WGS – sekwencjonowanie całego genomu, ang. *Whole Genome Sequencing*
- ZUM – zakażenie układu moczowego

1. Przeszczep nerki jako opcja terapeutyczna

W latach 90. XX wieku uznano, że przeszczepienie nerki jest metodą leczenia schyłkowej niewydolności nerek, która znacznie poprawia jakość życia oraz wydłuża oczekiwany okres przeżycia w porównaniu do dializoterapii [1,2]. Przeżywalność biorców nerki jest jednak różna i zależy od stanu zdrowia dawcy i jakości przeszczepionego narządu. Przeszczep narządów od żywych dawców wiąże się z lepszym wskaźnikiem przeżycia niż przeszczep narządów od dawców zmarłych [3]. Po pierwszym roku przeżycie pacjentów wynosi ponad 95% w obu grupach, ale po dziesięciu latach 88% biorców nerki od żywego dawcy nadal żyje, podczas gdy przeżywa jedynie 71% pacjentów z narządem dawcy zmarłego [3]. Wykazano, że największe korzyści z przeszczepów odnoszą chorzy na cukrzycę, zwłaszcza osoby młode. Osoby w wieku od 20 do 39 lat po przeszczepieniu nerki żyją do 25 lat, natomiast pacjenci poddawani dializoterapii żyją do około 8 lat [1,4].

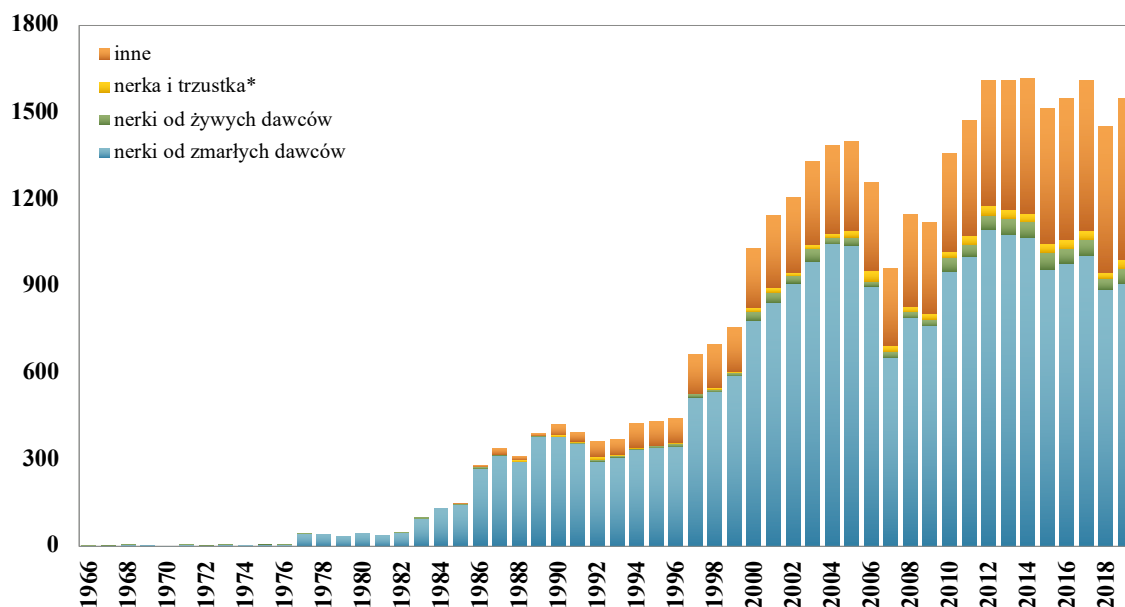
W Polsce żyje obecnie około 10469 pacjentów po przeszczepieniu nerki (stan na 2019 rok) [5]. Na jakość życia pacjenta po przeszczepie ma wpływ zabieg przeszczepienia narządu, a następnie długotrwałe, przewlekłe leczenie, w tym leczenie immunosupresyjne, niezbędne dla zachowania czynności przeszczepu, ale także leczenie chorób towarzyszących, które pojawiają się w ciągu życia chorego. Leki immunosupresyjne zapobiegają odrzuceniu przeszczepionej nerki, ale wykazują różnorodne działania niepożądane. Szczególne miejsce zajmują tutaj infekcje, które wymagają modyfikacji w leczeniu w stosunku do leczenia standardowego [6]. Patogeneza, przebieg kliniczny, leczenie a także ciężkość zakażeń są inne dla pacjentów stosujących leki immunosupresyjne niż dla ogółu populacji [7]. Dlatego po przeszczepie, pacjentów należy stale monitorować pod kątem nawrotów choroby, skutków ubocznych immunosupresji i zakażeń oportunistycznych.

W ciągu ostatnich 20 lat odnotowuje się ciągły wzrost liczby pacjentów kwalifikowanych do leczenia przeszczepieniem nerki z powodu rozwoju technik chirurgicznych i leczenia immunosupresyjnego. Zaobserwowano wydłużenie życia biorcy i przeszczepu, pojawiło się jednak wiele wyzwań. Zastosowanie silniejszej immunoterapii (zamiast jej zminimalizowania) doprowadza do częstszych infekcji bakteryjnych, grzybiczych czy wirusowych oraz zmusza do podjęcia kroków związanych z ich zapobieganiem i leczeniem. [6,8].

1.1. Rejestr przeszczepień nerek w Polsce

Pierwszą udaną transplantację nerki przeprowadzono w Polsce w 1966 roku. Do roku 2019 łącznie, wykonano 34394 przeszczepów narządów, z czego 75,6% stanowiły przeszczepienia nerki (Rysunek 1). Tylko w 2019 r. przeszczepiono 993 nerki (26,2 na 1 milion mieszkańców), z czego 941 nerek zostało pobranych od zmarłych dawców (24,8/1 mln; 907 przeszczepień pojedynczej nerki, 34 przeszczepienia nerki wraz z trzustką), a 52 nerki od żywych dawców (1,4/1 mln) [5].

Pierwszej transplantacji nerki w Gdańskim Ośrodku Transplantacyjnym (GOT) dokonano 31 marca 1980 roku [9]. Do końca 2019 roku w GOT przeprowadzono ponad 2 tys. przeszczepień nerek. Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w Gdańsku od lat przoduje w aktywności donacyjnej wśród ośrodków transplantacyjnych w Polsce. W 2018 r., zgodnie z ogólnopolską tendencją, odnotowano w GOT spadek całkowitej liczby przeszczepionych nerek do 95, czyli o 30 mniej niż w 2017 r. [5].



Rysunek 1. Przeszczepianie narządów w Polsce w latach 1966-2019. Opracowanie własne na podstawie [5]. *łącznie przeszczepienia: nerki - trzustki, trzustki i wysp trzustkowych

W ostatnich latach wzrósł wskaźnik przeżycia przeszczepów narządowych. Poprawa dotyczy głównie przeżycia w pierwszym roku po transplantacji [5,10]. Lepsze wskaźniki przeżycia notuje się w przypadku dawców żywych. Liczba przeszczepień nerek od żywych dawców różni się pomiędzy poszczególnymi krajami Europy. Najwyższy wskaźnik przeszczepień nerek od dawców żywych w skali roku odnotowano w Holandii (33 przeszczepienia na 1 mln mieszkańców) oraz Danii (19/1 mln). W Wielkiej Brytanii wskaźnik ten wynosi 16, zaś we Francji wykonuje się 9 przeszczepień rocznie w przeliczeniu na 1 mln mieszkańców. Polska należy do krajów, w których ten wskaźnik jest wyraźnie niższy i stanowi 1,3 przeszczepień na 1 mln mieszkańców na rok [11]. Niestety, pomimo postępu w leczeniu i diagnostyce powikłań potransplantacyjnych, nie udało się jak dotąd uzyskać poprawy odległego przeżycia przeszczepów i biorcy nerek pobranych od dawców zmarłych, co stanowi obecnie jeden z podstawowych problemów współczesnej transplantologii.

2. Zakażenia układu moczowego u pacjentów po transplantacji nerki

Przeszczep nerki jest najlepszą dostępną terapią nerkozastępczą dla pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek (ESRD, ang. *end-stage renal disease*). Chociaż wczesna czynność przeszczepu uległa ostatnio poprawie, efekt długoterminowy nie jest zadowalający, prawdopodobnie między innymi w wyniku powikłań związanych z zakażeniami układu moczowego (ZUM) [12]. Historyczne, jak i aktualne dane kliniczne sugerują, że częstość infekcji bakteryjnych po transplantacji nerki, jest znacznie wyższa niż w populacji ogólnej [13-16]. Szacowana częstość występowania ZUM u biorców przeszczepów nerki wynosi między 4% a 80% (Tabela S1) [17-59]. Ryzyko infekcji po przeszczepie nerki zależy ściśle od stanu immunosupresji biorcy, ekspozycji epidemiologicznej i powikłań po procedurach inwazyjnych.

Przebieg kliniczny ZUM zmienia się wraz z upływem czasu od przeszczepienia nerki. Powikłania po zabiegu można podzielić na wczesne - pojawiające się do 6 miesiąca po przeszczepieniu oraz późne - występujące po tym czasie. W pierwszym miesiącu po przeszczepie najczęściej występują zakażenia szpitalne (zapalenie płuc i ZUM, sepsa, zapalenie jelita grubego *Clostridium difficile*), zakażenia pooperacyjne (zakażenia ran) i zakażenia pochodzące od dawców. Profilaktyka antybiotykowa stosowana w tym okresie u biorcy może sprzyjać selekcji patogenów opornych na antybiotyki. Najczęstszą przyczyną zachorowalności, niewydolności przeszczepu i umieralności wśród pacjentów otrzymujących przewlekłą, podtrzymującą immunosupresję są ZUM [33,49,60]. Objawy kliniczne bardzo często mogą być maskowane, nawet w przypadku ciężkich infekcji. Infekcje występujące w ciągu kolejnych 5 miesięcy, wtórne w stosunku do patogenów oportunistycznych, wskazują na wpływ immunosupresji [55,60,61]. Chociaż śmiertelność związana z ZUM w pierwszym roku po przeszczepie została zmniejszona do mniej niż 5%, to powikłania te, nadal stanowią poważne zagrożenie dla biorców. Bez względu na czas wystąpienia, ZUM może prowadzić do zakażenia krwi, które prowadzi do pogorszenia czynności przeszczepu nerki i skraca czas przeżycia pacjenta [6,12-16].

2.1. Kliniczne definicje ZUM

Rozpoznanie ZUM wśród pacjentów po przeszczepieniu nerki jest przeprowadzane zgodnie z wytycznymi zaproponowanymi przez Infectious Diseases Society of America (IDSA) [62], następnie zmodyfikowanymi przez European Association of Urology (EAU) [63]. Ponieważ symptomy ZUM mogą być miernie wyrażone z powodu zastosowanej immunosupresji i chirurgicznej denerwacji przeszczepionych nerek i moczowodu [37,64], diagnoza nie powinna opierać się wyłącznie na klasycznych objawach podmiotowych i przedmiotowych ZUM, ponieważ cechy kliniczne nie są typowe w tej populacji. Pierwszym objawem ZUM u biorców przeszczepionej nerki może być nawet urosepsa. Zazwyczaj kluczowym objawem jest gorączka, która może być związana z ropomoczem i bakteriomoczem. Niektórzy autorzy opisali mikroskopowy krwimocz i dolegliwości brzuszne. W wielu przypadkach, gorączce towarzyszy podwyższony wskaźnik białka C-reaktywnego i białych krwinek (WBC) [63,65,66].

Pacjentów z dodatnim posiewem moczu powyżej 10^5 j.t.k./ml (jednostki tworzące kolonie na ml) przy braku jakichkolwiek objawów związanych z infekcją, definiuje się jako posiadających bezobjawowy bakteriomocz (ABU, ang. *asymptomatic bacteriuria*) (Tabela 1). Bezobjawowa bakteriiuria jest również

definiowana jako izolacja bakterii należącej do jednego gatunku na poziomie $< 10^5$ j.t.k./ml w trakcie antybiotykoterapii lub co najmniej 10^2 j.t.k./ml w pojedynczym posiewie moczu pobranym po zacewnikowaniu [62,65].

Tabela 1. Kryteria diagnostyczne dla ZUM u pacjentów po przeszczepie nerki [30,64-66]

Klasyfikacja ZUM	Cechy kliniczne	Badania laboratoryjne*
Bezobjawowa bakteriuria	Brak lokalnych lub ogólnoustrojowych objawów ZUM	>10 WBC/mm ³ $\geq 10^5$ j.t.k./ml w dwóch kolejnych próbach moczu w odstępie > 24 h u kobiet $\geq 10^5$ j.t.k./ml w pojedynczej próbie moczu u mężczyzn $< 10^5$ j.t.k./ml u chorych w trakcie antybiotykoterapii $\geq 10^2$ j.t.k./ml w pojedynczej próbie moczu uzyskanej po zacewnikowaniu
Niepowikłane ZUM	Dysuria, częstotliwość lub pilność. (Funkcjonalnie prawidłowe drogi moczowe)	$>10^5$ j.t.k./ml w pojedynczej próbie moczu
Powikłane ZUM	Gorączka, ból w okolicy nerki przeszczepionej, dreszcze, złe samopoczucie lub bakteriemia z tym samym drobnoustrojem w posiewie moczu i krwi. Zaburzenia czynności nerek.	>10 WBC/mm ³ $>10^5$ j.t.k./ml u kobiet $>10^4$ j.t.k./ml u mężczyzn, lub w pojedynczej próbie moczu uzyskanej po zacewnikowaniu u kobiet
Nawrotowe ZUM	Przynajmniej trzy epizody objawowego ZUM w przeciągu ostatnich 12 miesięcy lub przynajmniej dwa epizody w okresie 6 miesięcy; mogą obejmować epizody bez zmian strukturalnych/funkcjonalnych nerki.	$>10^3$ j.t.k./ml

* j.t.k./ml – jednostki tworzące kolonię na ml, WBC – krwinki białe (ang. white blood cells)

Z drugiej strony, ZUM definiuje się jako obecność bakteriurii z objawami podmiotowymi i przedmiotowymi infekcji, od łagodnego problemu z oddawaniem moczu do bakteriemii lub sepsy. ZUM może dotyczyć dolnych lub górnych dróg moczowych, i określane jest odpowiednio jako objawowe zapalenie pęcherza moczowego i odmiedniczkowe zapalenie nerek [65,66]. U pacjentów po przeszczepieniu nerki infekcję przeszczepionej nerki określa się jako odmiedniczkowe zapalenie nerki przeszczepionej (AGPN, ang. *acute graft pyelonephritis*) [30]. Nawrotowy ZUM jest definiowany jako szybki nawrót tego samego gatunku bakterii po zakończonym leczeniu antybiotykami. O nawracającym ZUM mówi się również, gdy u pacjenta stwierdza się trzy lub więcej epizodów objawowych zakażeń dróg moczowych w okresie 12 miesięcy lub dwa epizody w przeciągu ostatnich 6 miesięcy. Nawracające ZUM mogą obejmować też epizody bezobjawowe.

Niepowikłane ZUM występuje u osób zdrowych, bez zaburzeń neurologicznych, anatomicznych i fizjologicznych układu moczowo-płciowego, nie poddawanych wcześniej zabiegom chirurgicznym i/lub z występującymi łagodnymi objawami. Powikłane ZUM definiuje się jako infekcję związaną z nieprawidłowościami strukturalnymi lub funkcjonalnymi dróg moczowo-płciowych lub obecnością choroby podstawowej, która zwiększa ryzyko infekcji lub niepowodzenia terapii. Zgodnie z tą definicją, objawowe ZUM u każdego biorcy przeszczepu uważa się za powikłane, niezależnie od tego, czy dotyczy ono dolnych, czy górnych dróg moczowych, ponieważ status upośledzenia odporności może zwiększać ryzyko zakażenia i/lub niepowodzenia terapii [65,66].

2.2. Patogeneza ZUM

Patogeneza ZUM najczęściej ma związek z bakteriami uropatogennymi wstępującymi w jelicie, które dostają się do pęcherza moczowego przez cewkę moczową. W tym celu, bakterie wykorzystują adhezyny, które pomagają im przylegać do komórek nabłonka pęcherza moczowego [67]. W przypadku *Escherichia coli* udowodniono tropizm komórkowy, który polega na oddziaływaniu odpowiednich struktur adhezyjnych (adhezyny fimbrialne/afimbrialne, pile, struktury flagellarne) z odpowiednimi receptorami komórek nabłonka pęcherza moczowego [67]. Po dotarciu do pęcherza bakterie mogą namnażać się i powodować zapalenie pęcherza moczowego lub wędrować w górę moczowodu i wywoływać stan zapalny i AGPN.

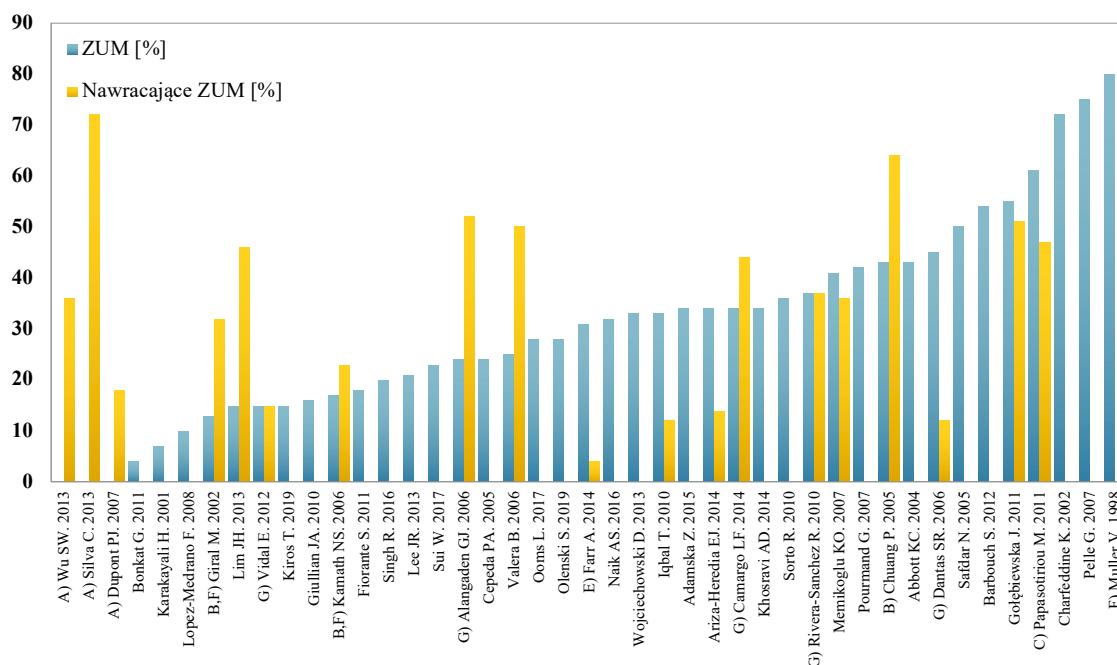
Nawracające ZUM może wystąpić jako niezależne zakażenie dróg moczowych lub trwałe kolonizowanie ciała obcego (tj. stentu lub drenażu) czy zakażenie narządu lub tkanki (tj. zapalenie gruczołu krokowego, odmiedniczkowe zapalenie nerek lub ropień). Jednak opisany powyżej model nie wyjaśnia w zadowalający sposób wielu nawracających epizodów ZUM, w których szczepy bakteryjne odpowiedzialne zarówno za początkową infekcję, jak i za nawrót są pod względem genetycznym identyczne. Przypuszcza się, że nawracające ZUM obejmuje tworzenie wewnątrzkomórkowych społeczności bakteryjnych (IBC, ang. *intracellular bacterial community*). Na przykład szczepy uropatogenne *E. coli* (UPEC, ang. *uropathogenic Escherichia coli*) i *K. pneumoniae*, mogą wchodzić do cytozolu komórek wyściełających powierzchnię pęcherza i szybko się namnażać, tworząc zespół podobny do biofilmu, znany jako IBC. Tworzenie się IBC może zwiększać zdolność tych bakterii do osiedlania się w drogach moczowych i unikania wypłukania ich przez strumień przepływającego moczu, napływu komórek zapalnych i kontaktu z antybiotykami. W komórkach pośrednich i podstawowych pęcherza moczowego bakterie mogą również wejść w stan uśpienia, stając się nieaktywnym/spoczynkowym wewnątrzkomórkowym rezerwuarem, który okresowo może uaktywniać się i powodować ZUM [68,69].

2.3. Epidemiologia ZUM

Częstość występowania ZUM wśród biorców nerek waha się znacznie od 4% do 80% (Rysunek 2, Tabela S1) [17-59]. Różnice w zgłaszanej częstości występowania ZUM prawdopodobnie wynikają z braku jednolitych kryteriów diagnostycznych, stosowania różnych schematów profilaktyki przeciwdrobnoustrojowej, nierównomiernego okresu obserwacji a także lokalizacji geograficznej ośrodka [33,58]. Pomimo tylu różnic przyczyniających się do zmienności w statystyce ZUM, zakażenie układu moczowego jest uważane za powszechne i ma bezdyskusyjny wpływ na wielu biorców przeszczepu nerki.

Chociaż ZUM może wystąpić w dowolnym momencie po przeszczepie, najwyższą częstość odnotowuje się w pierwszym roku po przeszczepieniu nerki, szczególnie w ciągu pierwszych 3–6 miesięcy [10,25]. W kohortowym badaniu ponad 2000 biorców przeszczepu nerki z co najmniej rocznym okresem obserwacji, 84% przypadków objawowego ZUM rozwinęło się w ciągu pierwszych 6 miesięcy po przeszczepie [25]. W innym badaniu, dla 28942 biorców przeszczepu nerki, skumulowana częstość występowania ZUM podczas pierwszych 6 miesięcy po przeszczepie wynosiła 17% zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet. Jednak do 3 lat po transplantacji częstość występowania była znacznie wyższa u kobiet (60%) niż u mężczyzn (47%, $p < 0,001$) [51]. W randomizowanym, wielośrodkowym, prospektywnym badaniu, w ciągu pierwszych 12 miesięcy po transplantacji zgłoszono występowanie 26% przypadków ZUM

u biorców nerek, którzy otrzymywali najczęściej stosowany schemat immunosupresji (tacrolimus, mykofenolan mofetylu i kortykosteroidy) [70]. W Gdańskim Ośrodku Transplantacyjnym, odnotowano częstość ZUM w pierwszym roku po przeszczepieniu wynoszącą 55%, z czego prawie połowa epizodów dotyczyła pierwszego miesiąca po zabiegu. Bezobjawowa bakteriuria stanowiła 65% infekcji, zakażenia dolnego odcinka dróg moczowych - 13%, zakażenia górnego odcinka dróg moczowych 22%. Spośród wszystkich rozpoznanych ZUM, urosepsa stanowiła około 3% przypadków [55].



Rysunek 2. Odsetek ZUM i nawracających ZUM w badaniach przeszczepu nerki. A) Badanie dotyczące wyłącznie nawracających ZUM. B) Nawracające ZUM zdefiniowano jako mające co najmniej jeden epizod ZUM. C) Dane dla nawracających ZUM dotyczą pacjentów z > 3 ZUM w okresie badania, który mógł wynosić > 1 rok. D) Odsetek pacjentów, u których rozwinęła się ZUM, które następnie rozwinęło nawracające ZUM. E) Nawracające infekcje zdefiniowano jako ZUM z dwoma lub więcej epizodami w okresie obserwacji trwającym 12 miesięcy. F) Badanie koncentrowało się wyłącznie na AGPN. G) Nie zdefiniowano kryteriów dla nawracającego ZUM. Opracowanie własne na podstawie [17-59]

Częstość występowania ZUM jest zdecydowanie wyższa w tych pracach, w których z analizy nie wykluczono przypadków bezobjawowej bakteriurii. W badaniu z udziałem 101 uczestników odnotowano, że bezobjawowa bakteriuria, nieskomplikowane ZUM, powikłane ZUM i nawracające ZUM wystąpiły odpowiednio u 44, 32, 23 i 14% [43].

Istnieje istotna różnica pomiędzy występowaniem ZUM wśród biorców nerki w porównaniu z biorcami pozostałych narządów. W jednym z kohortowych badań [25] obserwowano przez trzy lata 2405 biorców narządów stałych. Częstość występowania ZUM na 100 badanych w przeciągu roku była najwyższa dla biorców nerek (13,84), następnie wątroby (3,09), serca (2,41) i płuc (1,36). W przypadku retrospektywnej analizy występowania infekcji wśród chorych po transplantacji narządów unaczynionych, którzy zgłosili się na oddział ratunkowy, częstość przyjęć pacjentów po przeszczepieniu nerki była ponad 3-krotnie wyższa w porównaniu do pozostałych pacjentów. Najczęstszym powodem hospitalizacji było ZUM, które stanowiło 43% [71].

2.4. Czynniki ryzyka ZUM po przeszczepie nerki

W literaturze wyróżniono wiele czynników, które promują wystąpienie ZUM u biorcy przeszczepu nerki, a które oddziałują ze sobą. Wielu badaczy wskazuje na czynniki o znaczeniu statystycznym, wykazujące jednoznacznie wpływ na wzrost ryzyka wystąpienia ZUM, jak i na przypuszczalne czynniki ryzyka, wobec których istnieją rozbieżne opinie. Ze względów praktycznych, Liapis i Wang zaproponowali podział czynników ryzyka wystąpienia ZUM na przedtransplantacyjne (niewydolność nerek, cukrzyca oraz choroby autoimmunologiczne), okołotransplantacyjne (immunosupresja, antybiotykoterapia, kolonizacja przez bakterie odporne, długi czas operacji, reoperacja) oraz potransplantacyjne (choroby wirusowe, przedłużone cewnikowanie i epizody ostrego odrzucenia) (Tabela 2) [72]. Nadal trwają badania mające na celu podkreślenie roli, jaką odgrywają te czynniki oraz sposobów ich złagodzenia w celu ograniczenia występowania ZUM.

Tabela 2. Czynniki ryzyka ZUM u pacjentów po przeszczepie nerki. Opracowanie własne na podstawie [23,33,52,58,72-75]

Czynniki przedtransplantacyjne	Czynniki okołotransplantacyjne	Czynniki potransplantacyjne
Potwierdzone		
Wiek	Przeszczep od dawcy zmarłego [52]	Przeżyty epizod ostrego odrzucenia [58]
Płeć żeńska [23,58]	Zainfekowany narząd dawcy	Zaburzenia czynności przeszczepu
Długotrwała dializoterapia [74]	Długotrwałe zacewnikowanie	Infekcja wirusem cytomegalii w wywiadzie
Cukrzyca [75]	Dupleksowe moczowody	Instrumentacja dróg moczowych
Nieprawidłowości anatomiczne dróg moczowych		Stan po rekonstrukcji dolnego odcinka dróg moczowych
Choroba układowa leczona sterydami i lekami immunosupresyjnymi (np. toczeń rumieniowaty układowy, reumatoidalne zapalenie stawów)		Znaczący refluks pęcherzowo-moczowodowy lub zwężenie zespolenia pęcherzowo-moczowodowego
		Zakażenie natywnych dróg moczowych
Przypuszczalne (rozbieżne lub pojedyncze doniesienia w dostępnym piśmiennictwie)		
Kłebuszkowe zapalenie nerek własnych	Protokół immunosupresji z indukcją przeciwciałami poliklonalnymi lub monoklonalnymi	Trójlekowe protokoły immunosupresji zawierające leki z grupy antymetabolitów - azatioprynę bądź mykofenolan sodu/mofetylu
		Nadmierna immunosupresja
Ogólna kondycja chorego (m.in. liczba chorób towarzyszących, obecność zastoinowej niewydolności serca, stan odżywienia przed transplantacją)	Zastosowanie cewnika moczowodowego <i>double J</i>	W przypadku protokołu immunosupresji z inhibitorem kalcyneuryny ryzyko jest wyższe po zastosowaniu tacrolimusu w porównaniu z cyklosporyną A
		Kolejna transplantacja [33]

Jednym z powszechnie występujących czynników ryzyka ZUM jest stosowanie cewników moczowodowych oraz pęcherzowych podczas i po zabiegu przeszczepienia. Uważa się, że powodem, dla którego cewniki moczowodowe i pęcherzowe zwiększają ryzyko ZUM jest ich kolonizacja przez bakterie. Istnieją dowody na to, że stosowanie okołoperacyjnej profilaktyki antybiotykowej obejmującej podawanie trimetoprimu-sulfametoksazolu (TMP-SMX) wyrównuje ryzyko ZUM u pacjentów z założonym

cewnikiem moczowodowym w porównaniu do pacjentów, dla których nie zastosowano tego cewnika [76]. Kontrowersyjne jest nadal stosowanie cewnika moczowodowego *double J* [73,77]. W Gdańskim Ośrodku Transplantacyjnym nie wykazano, żeby zastosowanie cewnika moczowodowego *double J* stanowiło czynnik ryzyka ZUM [78]. Nie jest jednak wykluczone, że nie będzie on oddziaływał z innymi obecnymi u chorego po przeszczepieniu nerki czynnikami ryzyka, potęgując ryzyko wystąpienia ZUM.

Oprócz fizycznych czynników ryzyka, upośledzona odporność komórkowa i być może niższa tolerancja na immunosupresję oraz choroby współistniejące (np. cukrzyca), mogą przyczyniać się do znacznie wyższego odsetka zakażeń bakteryjnych u pacjentów po przeszczepie nerki. Leki immunosupresyjne, które pacjenci muszą przyjmować po przeszczepieniu nerki, w różnym stopniu wpływają na ryzyko wystąpienia infekcji, w tym ZUM. Wykazano, że dodanie tymoglobuliny do konwencjonalnego schematu immunosupresyjnego, terapia skojarzona z postacią mikroemulsji cyklosporyny A, prednizolonu i azatiopryny oraz leczenie oparte na mykofenolanie mofetylu (MMF) zwiększają ryzyko wystąpienia ZUM [28,50]. Również denosumab, przeciwciało monoklonalne, stosowane w leczeniu osteopenii powszechnej pacjentów po przeszczepach, zwiększa ryzyko ZUM [33]. W większości badań co najmniej bakteriuria była związana z wyższymi dawkami leków immunosupresyjnych.

Inne czynniki ryzyka ZUM u pacjentów po przeszczepieniu nerki obejmują płeć żeńską, starszy wiek, dłuższy czas utrzymywania cewnika, otrzymanie przeszczepu od zmarłego dawcy, historię przedoperacyjnego ZUM oraz występowanie ostrego odrzucenia [47,51,52,58]. Czynniki ryzyka ZUM bakteriami wytwarzającymi enzymy o rozszerzonym spektrum działania (ESBL, ang. *Extended spectrum beta-lactamase*) obejmują kolonizację bakteriami ESBL, opóźnioną funkcję przeszczepu, cukrzycę, wcześniejszą ekspozycję na antybiotyki oraz nawracające ZUM [50,52,75,79-81].

Czynniki predykcyjne nawracających ZUM obejmują zakażenia szpitalne i bakterie wielolekooporne (MDR, ang. *multidrug-resistant*), zwłaszcza *K. pneumoniae*. Powód, dla którego infekcje wywołane przez MDR są związane z nawracającymi ZUM, pozostaje nieznany. Jedną z możliwości jest to, że oporność na ESBL kolokalizuje się z innymi czynnikami związanymi ze zwiększoną inwazją komórek i ekspresją adhezyn fimbrialnych. Zdolność *K. pneumoniae* do tworzenia wewnątrzkomórkowych społeczności bakteryjnych podobnych do biofilmu w nabłonkowych komórkach pęcherza moczowego jest determinowana przez adhezyny fimbrialne, a większa ekspresja tego białka zwiększa zdolność *K. pneumoniae* do kolonizacji dróg moczowych oraz tworzenia wewnątrzkomórkowych społeczności bakteryjnych (IBC) i biofilmów [17,18,24,79-81].

2.5. Wpływ ZUM na funkcję nerki przeszczepionej

Zakażenia układu moczowego wśród pacjentów po przeszczepie nerki budzą obawy ze względu na potencjalne upośledzenie funkcji wydalniczej alloprzeszczepu, utratę przeszczepu i większe ryzyko śmierci biorcy. Doniesienia dotyczące wpływu przebytych ZUM na wyniki przeszczepu nie są całkowicie jednoznaczne. Tabela 3 podsumowuje niektóre kluczowe badania dotyczące związku między ZUM, śmiertelnością i utratą przeszczepu. Kilka, wielokrotnie cytowanych badań opublikowanych na początku 2000 roku wykazało, że ZUM wiąże się ze wzrostem śmiertelności biorców i zwiększa ryzyko utraty alloprzeszczepu [50,51]. Na poparcie tych doniesień, badanie przeprowadzone w latach 2000–2011

wykazało, że ZUM w pierwszym roku po przeszczepie wiązało się z 41% wzrostem ryzyka zgonu i 29% wzrostem ryzyka utraty przeszczepu [39]. Inne analizy długoterminowego wpływu ZUM wykazały mniej wyraźne powiązanie. Stwierdzono istotnie niekorzystne wyniki w zakresie przeżycia przeszczepu tylko wtedy, gdy ZUM wystąpiło w ciągu pierwszych trzech miesięcy od przeszczepu [23] lub kiedy AGPN było związane ze spadkiem czynności przeszczepu, mierzonym klirensem kreatyniny lub GFR [24,36,42,82], ale niekoniecznie wpływało na utratę nerki przeszczepionej [58]. Wraz z badaniami przeżywalności i funkcji przeszczepionej nerki, wykazano, że ZUM może powodować inne negatywne skutki zdrowotne, takie jak wydłużenie czasu pobytu w szpitalu po przeszczepie i ryzyko ponownej operacji [42]. Dane sugerują również, że ZUM występujące w ciągu pierwszych 3 miesięcy po przeszczepie, które nie jest leczone, może zwiększać ryzyko ostrego odrzucania komórkowego [31].

Tabela 3. Powiązania między ZUM, śmiertelnością i utratą przeszczepu

Okres badania [lata]	Liczba pacjentów	Śmiertelność (95% CI)	Utrata przeszczepu (95% CI)	Referencje
1996-2002	500	(OR) 3.5 (1.68-7.23)	NS	[50]
1996-2000	28942	(AHR) 2.93 (2.22-3.35)	(AHR) 1.85 (1.29-2.64)	[51]
2000-2011	60702	(AHR) 1.41 (1.25-1.56)	(AHR) 1.29 (1.16-1.48) ^a	[39]
1987-1999	1387	-	(RR) 3.6 (1.4-9.2) ^b	[23]

AHR - skorygowany iloraz ryzyka (ang. *adjusted hazard ratio*); CI - przedział ufności (ang. *Confidence Interval*); NS - niewyszczególniony (ang. *not specified*); OR - iloraz szans (ang. *odds ratio*); RR - ryzyko względne (ang. *relative risk*); ^a Samo ZUM, ryzyko w pierwszym roku (samo ZUM, ryzyko po 1 roku: AHR 1,16 [95% CI 1,11–1,21]); ^b Występowanie AGPN w ciągu pierwszych 3 miesięcy po przeszczepie.

Oprócz śmiertelności i negatywnego wpływu na funkcję przeszczepu, ZUM zwiększa także ryzyko innych powikłań. Jednym z powikłań jest bakteriemia wtórna spowodowana migracją bakterii z dróg moczowych do krwioobiegu [31,83]. Czynniki ryzyka bakteriemii po ZUM obejmują immunosupresję tacrolimusem i wyjściowy poziom kreatyniny w surowicy > 1,3 mg/dl przed pierwszym ZUM [17]. ZUM górnego odcinka dróg moczowych może również potencjalnie rozwinąć się w rzadki stan zwany ropowiczym AGPN [84]. Ropowicze AGPN jest zagrażającym życiu powikłaniem, które może prowadzić do utraty przeszczepu i charakteryzuje się martwiczym zakażeniem mięszu nerkowego i tkanki okołonerkowej, co powoduje obecność gazu w mięszu nerkowym, układzie gromadzącym lub tkance okołonaczyniowej [85]. Chociaż nadal dyskutuje się, w jakim stopniu ZUM może wpływać na zachorowalność i śmiertelność u pacjentów po przeszczepieniu nerki, większość badań wykazała negatywny wpływ ZUM na przeżycie pacjentów i przeszczepu.

2.6. Czynniki etiologiczne ZUM

Najczęstsze czynniki etiologiczne ZUM u pacjentów po przeszczepieniu nerki są podobne do tych stwierdzanych dla powikłanego ZUM w populacji ogólnej. Bakterie Gram ujemne odpowiedzialne są nawet za 90% ZUM po transplatacji nerki [6,10,80,81,86]. Najczęstszymi gatunkami bakterii wśród tej grupy chorych są *E. coli* i *Klebsiella* sp. Podczas gdy *E. coli* jest częstą przyczyną ZUM zarówno u biorców przeszczepu nerki, jak i u pacjentów bez przeszczepu, *Klebsiella* sp. odpowiada częściej za kolonizację pacjentów po przeszczepieniu nerki. Względna częstość występowania jednego gatunku bakterii w porównaniu do drugiego ma tendencję do zmiany w zależności od czasu wystąpienia ZUM po przeszczepie. Wśród bakterii Gram ujemnych powodujących ZUM u biorców nerki, można również wyróżnić *Pseudomonas aeruginosa* z częstością występowania 14,9% [58,86]. Podkreśla się również coraz

większą rolę bakterii Gram dodatnich, w szczególności *Enterococcus* sp. jako czynnika etiologicznego [44,81,86], który staje się dominującym patogenem w pierwszym miesiącu po przeszczepie. Najprawdopodobniej jest to spowodowane stosowaniem jako prewencji okołooperacyjnej antybiotykoterapii, obejmującej szerokie spektrum bakterii Gram ujemnych.

Wykazano, że *K. pneumoniae* jest najczęstszym czynnikiem etiologicznym w przypadku nawracających zakażeń układu moczowego u chorych w pierwszym roku po przeszczepieniu nerki. Linares i wsp. analizowali zakażenia o etiologii *K. pneumoniae* w grupie ponad 1000 biorców narządów unaczynionych [80]. Zakażenia o tej etiologii były najczęstsze wśród biorców nerki, a punktem wyjścia infekcji najczęściej był układ moczowy. 64% stwierdzonych zakażeń wśród biorców nerki była spowodowana przez szczepy odporne na antybiotyki β -laktamowe o szerokim spektrum działania (ESBL+), a prawie 30% towarzyszyła bakteriemia. Większość epizodów rozpoznawano w krótkim okresie po transplantacji.

Z uwagi na coraz częstsze i czasami niewłaściwe stosowanie antybiotyków, zwłaszcza w tej grupie chorych, wiele raportów podkreśla rosnącą częstość występowania szczepów wielolekoopornych, w szczególności z rodziny Enterobacteriaceae. Posiadają one zdolność do wytwarzania β -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania (ESBL) i odpowiadają za nawet 40% ZUM [79-81,86]. W przypadku nawracających ZUM prawdopodobieństwo, że czynnikiem etiologicznym będzie patogen ESBL+ rośnie z każdym kolejnym epizodem. W Gdańskim Ośrodku Transplantacyjnym wykazano, że ponad 70% zakażeń górnego odcinka układu moczowego o etiologii *K. pneumoniae* u biorców nerki było spowodowanych szczepami ESBL+. Częstość występowania szczepów wielolekoopornych *K. pneumoniae* zwiększyła się w okresie obserwacji z 40% w latach 2007-2010 do 75% w latach 2011-2013 [87]. Czynniki ryzyka dla ZUM o etiologii ESBL obejmują cukrzycę, poprzednią profilaktykę lub terapię antybiotykową, poprzednie ZUM, nawracające zakażenie oraz pacjentów z opóźnioną funkcją przeszczepu po przeszczepie.

Spośród wielolekoopornych bakteryjnych przyczyn ZUM, można również wyróżnić niedawno zidentyfikowane na całym świecie bakterie odporne na karbapenemy niosące gen *bla_{NDM-1}*, tzw. bakterie New Delhi z metalo-beta-laktamazą 1 (NDM-1) [88]. W literaturze opisano kilka przypadków pacjentów z ZUM wywołanym przez NDM-1, niektórzy z powodzeniem zakończyli leczenie, u innych doszło do grafektomii [89,90]. Czynniki ryzyka dla ZUM o etiologii CRE (ang. *carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*) nie zostały dobrze zbadane, ale z pewnością związane są ze stosowaniem antybiotyków karbapenemowych [88-90].

2.7. Leczenie immunosupresyjne po przeszczepieniu nerki

Udany przeszczep nerki wymaga starannego zrównoważonego podejścia do stopnia immunosupresji, aby zapobiec odrzuceniu przeszczepu, a jednocześnie zminimalizować ryzyko infekcji, nowotworów złośliwych i chorób układu krążenia. Wybór leku oraz schemat leczenia jest uzależniony od szeregu czynników, tj. czynniki rokownicze zależne od biorcy i dawcy narządu, interakcja wybranego leku immunosupresyjnego z innymi stosowanymi lekami, spodziewane narządowo swoiste działania niepożądane, a także koszt leczenia [61]. Ważne jest również wzięcie pod uwagę szczegółowej historii przyjmowania leków przez pacjentów, gdyż niektóre leki immunosupresyjne mogą wiązać się z wyższym ryzykiem ZUM.

Leczenie immunosupresyjne po przeszczepieniu nerki polega na równoczesnym stosowaniu kilku leków w określonych schematach. Dostępne preparaty farmakologiczne o działaniu immunosupresyjnym to: leki hamujące produkcję cytokin: inhibitory kalcyneuryny (cyklosporyna A, tacrolimus, tacrolimus o przedłużonym uwalnianiu, tacrolimus LCP) oraz glikokortykosteroidy; inhibitory sygnału proliferacji (mTOR) (syrolimus, ewerolimus); leki antyproliferacyjne (azatiopryna, mykofenolan mofetylu, sól sodowa kwasu mykofenolowego); inhibitor kostymulacji. Dodatkowo, można wyróżnić preparaty biologiczne, do których należą przeciwciała poliklonalne oraz monoklonalne [91].

Standardowo po transplantacji nerki stosuje się skojarzone leczenie kilkoma lekami, które charakteryzują się różnymi mechanizmami działania i podawane są w możliwie najniższych dawkach terapeutycznych. We wczesnym okresie po transplantacji stosuje się wyższe dawki leków, które stopniowo są obniżane, a u niektórych pacjentów zmniejszana jest również liczba stosowanych leków. Po 6 miesiącach po przeszczepieniu nerki, biorca otrzymuje leczenie podtrzymujące ze stabilnymi dawkami leku [60,91]. Podstawowym składnikiem schematów immunosupresji po przeszczepieniu nerki są inhibitory kalcyneuryny: tacrolimus i cyklosporyna, których mechanizm działania jest taki sam, pomimo różnic w budowie chemicznej i polega na hamowaniu enzymu fosfatazy serynowo-treoninowej, czyli kalcyneuryny [91-93].

Cyklosporyna jest cyklicznym polipeptydem wyizolowanym z *Tolypocladium inflatum* [92], natomiast tacrolimus jest makrocyclicznym laktonem wyizolowanym ze *Streptomyces tsukubaensis* [93]. Cyklosporyna nie rozpuszcza się w wodzie i jest dobrze rozpuszczalna w tłuszczach, a więc łatwo dyfunduje przez błonę komórkową, gdzie w cytoplazmie łączy się z białkiem nośnikowym cyklofiliną A - kompleks ten hamuje kalcyneurynę. Tacrolimus również jest lipofilny i wewnątrz komórki łączy się z białkiem nośnikowym immunofiliną FK-BP12 (*FK-binding protein*) - kompleks ten hamuje kalcyneurynę silniej niż cyklosporyna. Inhibitory kalcyneuryny metabolizowane są przez cytochrom P-450 3A: tacrolimus głównie przez izoformę CYP3A5, cyklosporyna - CYP3A4, które znajdują się w układach mikrosomalnych jelit i wątroby. Obydwa immunosupresanty są również substratami dla glikoproteiny-P. Metabolizm w jelitach, tak zwany metabolizm pierwszego przejścia, odbywa się za pomocą CYP3A oraz glikoproteiny-P i może stanowić nawet połowę przemian obydwu leków. Jednak za główne miejsce metabolizmu uważana jest wątroba. Eliminacja obydwu leków odbywa się głównie z żółcią do przewodu pokarmowego, a w niewielkim stopniu wydalane są z moczem (ok. 6%) [92-93].

Pomimo sukcesu w leczeniu immunosupresyjnym z zastosowaniem obu leków, leczenie jest nadal skomplikowane z powodu wąskich indeksów terapeutycznych oraz dużej zmienności w farmakokinetyce pomiędzy pacjentami i w odpowiedziach farmakodynamicznych [91-94]. Głównymi działaniami niepożądanymi związanymi z leczeniem tacrolimusem i cyklosporyną są: neurotoksyczność, nefrotoksyczność, nadciśnienie, hiperglikemia, zaburzenia żołądkowo-jelitowe, infekcje i nowotwory złośliwe. Chociaż odpowiednia ekspozycja jest niezbędna, aby zapobiec odrzuceniu, niedostateczna ekspozycja w ostrym okresie potransplantacyjnym zwiększa ryzyko odrzucenia, a nadmierna ekspozycja powoduje znaczną toksyczność, która zmniejsza tolerancję i wpływa na długoterminowe przeżycie przeszczepu oraz pacjenta [60,61,94]. Dlatego utrzymywanie optymalnego poziomu leku immunosupresyjnego we krwi w bezpiecznym oknie terapeutycznym jest kluczowe dla postępowania z przeszczepami narządów.

Wykazano, że w przypadku szczepów *Enterococcus faecalis* rodzaj inhibitora kalcyneuryny stosowany w terapii bezpośrednio wpływa na ekspresję bakteryjnego genu kodującego białko PBP5 (*penicillin binding protein 5*) [95]. Ekspresja genu kodującego białko PBP5 była wyższa w obecności cyklosporyny niż w obecności tacrolimusu. Ponadto, kiedy porównywano ekspresję tego genu dla szczepów pochodzących od biorców nerki i szczepów komensalnych grupy kontrolnej, to okazało się, że gen ten był silniej wyrażany, kiedy bakterie rosły w postaci biofilmu niż w formie planktonu. Na tej podstawie wnioskowano, że rodzaj inhibitora kalcyneuryny nie tylko wpływa na samą ekspresję genu bakteryjnego, ale też zmienia właściwości biofilmu, i sugerowano, że antybiotyki β -laktamowe mogą być bardziej skuteczne w przypadku zastosowania w schemacie immunosupresji tacrolimusu [95]. Jak dotąd nie wskazano żadnego ze stosowanych inhibitorów kalcyneuryny jako czynnika ryzyka występowania ZUM o etiologii *K. pneumoniae* u pacjentów po przeszczepieniu nerki.

2.8. Podsumowanie

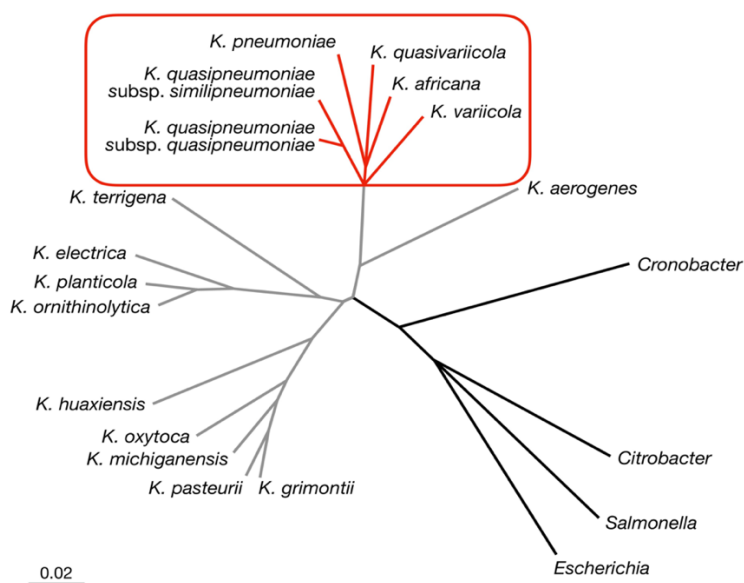
W ostatnich latach zaobserwowano istotną poprawę wskaźników przeżycia przeszczepów narządowych w pierwszym roku po transplantacji, które osiągają wartość 90%. Poprawa nie dotyczy jednak długotrwałego przeżycia przeszczepu. Ponieważ fizjologiczna i związana z upływem czasu stopniowa utrata funkcji nerki przeszczepionej jest nieunikniona, a nawrót wyjściowej choroby nerek jest trudny do wyeliminowania, sugeruje się modyfikację długotrwałej immunosupresji, jako rozwiązanie dla poprawy odległej czynności przeszczepu. Długotrwała immunosupresja wiąże się z wieloma skutkami ubocznymi, w szczególności ze wzrostem ryzyka infekcji, nowotworów złośliwych i chorób sercowo-naczyniowych [94]. ZUM są nadal zgłaszane jako druga najczęstsza przyczyna śmierci wśród pacjentów po przeszczepie nerki, zaraz po chorobach sercowo-naczyniowych [96].

W sytuacji zakażenia układu moczowego, zwłaszcza szczepami wieloopornymi w populacji pacjentów, u których wybór antybiotyku jest ograniczony upośledzoną funkcją nerek i możliwością wystąpienia interakcji z innymi lekami, ustalenie optymalnej profilaktyki jest bardzo trudne. Zwłaszcza, że wiele antybiotyków okazuje się nieskutecznych ze względu na brak punktu wychwytu w zmienionych zarówno strukturalnie, jak i funkcjonalnie komórkach. W świetle tych informacji, wartościową opcją terapeutyczną może okazać się modyfikacja leczenia immunosupresyjnego poprzez zamianę stosowanego inhibitora kalcyneuryny.

3. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae, po raz pierwszy wyizolowana pod koniec XIX wieku przez Carla Friedländer'a, jest Gram-ujemną pałeczką należącą do rodziny Enterobacteriaceae, z rzędu Enterobacteriales, i jest spokrewniona między innymi z rodzajami *Salmonella*, *Escherichia* i *Shigella* [97].

Rodzaj *Klebsiella* został pierwotnie podzielony na trzy gatunki, w oparciu o różnice w fenotypie klinicznym; *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella ozaenae* i *Klebsiella pneumoniae* [98,99]. Jednak po opracowaniu systemu klasyfikacji opartego o analizę 16S rDNA, zdefiniowano pięć klastrow z przypisanymi do nich gatunkami: [98,100] Klaster I z gatunkiem *Klebsiella oxytoca*; Klaster II z gatunkiem *Klebsiella terrigena*; Klaster III z dwoma gatunkami *Klebsiella ornitholytica* i *Klebsiella planticola*; Klaster IV z *Enterobacter aerogenes*; Klaster V z *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* spp. *rhinoscleromatis* i *Klebsiella pneumoniae* spp. *ozaenae*. Następnie, wykorzystując do analizy filogenetycznej sekwencję genów *gyrA* i *parC*, wprowadzono podział *K. pneumoniae* spp. *pneumoniae* na trzy odrębne grupy filogenetyczne; KpI, KpII (z podgrupami KpII-A i KpII-B) oraz KpIII [100-102]. Rozwój metod sekwencjonowania pozwolił na analizę całych genomów bakterii. Analiza WGS (ang. *Whole Genome Sequencing*) wśród rodzaju *Klebsiella* wyodrębniła osiem różnych gatunków. Ponadto, na poziomie gatunku i podgatunku wykryto pewne różnice, ale na obecną chwilę, nie wprowadzono nowej klasyfikacji [103-105]. Wspomniane grupy filogenetyczne KpI, KpII i KpIII, obecnie są znane odpowiednio jako *Klebsiella pneumoniae* sensu stricto (zwane dalej *K. pneumoniae*), *Klebsiella quasipneumoniae* (z podgatunkami *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* i *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*) oraz *Klebsiella variicola* (Rysunek 3) [103,106]. Te trzy gatunki, wraz z nowo zdefiniowaną *Klebsiella quasivariicola* [107] i inną nienazwaną grupą filogenetyczną, tworzą w ramach szerszej filogenezy kompleks *Klebsiella pneumoniae* (Rysunek 3).



Rysunek 3. Pozycja taksonomiczna *Klebsiella pneumoniae*. Drzewo oparte na całym genomie, wykazujące filogenetyczne relacje między *K. pneumoniae*, jego bliskimi krewnymi w kompleksie gatunków *K. pneumoniae* (czerwone gałęzie), innymi wybranymi członkami rodzaju *Klebsiella* (szare gałęzie) i wybranymi członkami rodziny Enterobacteriaceae (czarne gałęzie). Drzewo wyprowadzono z porównania profili k-mer obejmujących sekwencje całych genomów przy użyciu mashree. Pasek skali to szacowana średnia dywergencja nukleotydów. Opracowanie własne na podstawie sekwencji genomów zgromadzonych w materiałach dodatkowych przez Wyres i wsp. [106]

Bakteria *K. pneumoniae* powszechnie występuje w środowisku, zarówno w glebie i wodach powierzchniowych, jak i na sprzęcie medycznym [104]. *K. pneumoniae* z łatwością kolonizuje śluzówkę przewodu pokarmowego, drogi oddechowe i skórę a skutki kolonizacji wydają się być łagodne [98,106]. Z tych miejsc bakterie *K. pneumoniae* mogą migrować do innych tkanek i powodować ciężkie infekcje u ludzi np. ropnie wątroby, ZUM, bakteriemie a nawet sepsę, chociaż zazwyczaj obserwuje się to u osób z obniżoną odpornością, szczególnie u pacjentów hospitalizowanych [98,104,108]. Ponadto, patogenność bakterii *K. pneumoniae* wiąże się z jej defensywnym modelem działania przeciwko odpowiedzi immunologicznej gospodarza tj. unikaniem fagocytozy a nie atakiem na komórki układu immunologicznego. Tak więc bakteria *Klebsiella pneumoniae* stała się istotnym czynnikiem zakaźnym ze względu na wzrost liczby ciężkich infekcji i brak skutecznych metod ich leczenia. Pojawienie się szczepów *K. pneumoniae*, które nabyły dodatkowe cechy genetyczne i stały się albo hiperwirulentne (HV), albo odporne na antybiotyki, przyczyniło się do uznania bakterii *K. pneumoniae* za patogen oportunistyczny [98,104].

Niektóre szczepy *K. pneumoniae* w swoim materiale genetycznym noszą geny, które mogą ułatwiać przeżycie bakterii wewnątrz gospodarza. Geny te nazywane są „czynnikami wirulencji” ze względu na rolę, jaką odgrywają podczas infekcji [99,104]. Do szczególnie istotnych czynników wirulencji *K. pneumoniae* zalicza się adhezyny (fimbrie typu 1 i 3), siderofory (enterobaktyna, yersiniabaktyna, aerobaktyna, salmochelina), genotoksynę (kolibaktyna) oraz obecność śluzowej otoczki polisacharydowej [109-112]. Czasami również sama otoczka jest uważana za czynnik wirulencji niezależnie od śluzowatości, ponieważ chroni przed różnymi elementami odpowiedzi immunologicznej podczas infekcji (choć stopień, w jakim to dzieje się, różni się w zależności od rodzaju otoczki) [104,106,112]. Szczepy wykazujące obecność genów kodujących jeden lub więcej z tych czynników, są często uważane za zjadliwe (lub hiperwirulentne, chociaż termin ten jest najczęściej używany do opisywania izolatów hiper mukoidalnych) - i są częściej izolowane z infekcji pozaszpitalnych (CA, ang. *community-associated infections*). Czynniki zjadliwości nie tylko odgrywają istotną rolę w przeżyciu wewnątrz gospodarza i patogenezie, ale również przyczyniają się do przeżycia w środowisku poza gospodarzem [104].

Odnotowano, że *K. pneumoniae*, z naturalną opornością na ampicylinę, bardzo szybko nabywa dodatkowej oporności związanej z różnymi klasami środków przeciwdrobnoustrojowych. Obecnie istnieją szczepy *K. pneumoniae*, które wykazują oporność na wszystkie opcje leczenia przeciwdrobnoustrojowego [113-115]: penicyliny β-laktamowe inne niż ampicylina (często w połączeniu z inhibitorami β-laktamazy), nitrofurantoinę, inhibitory reduktazy dihydrofolianowej (z sulfonamidami lub bez), aminoglikozydy, fluorochinolony, cefalosporyny wszystkich generacji, karbapenemy i polimyksyny. Podsumowując, skłonność do szybkiego nabywania szeroko rozpowszechnionej oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe czyni *K. pneumoniae* poważnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego. Szczególnie w przypadku, gdy *K. pneumoniae* powoduje infekcje u gospodarzy z obniżoną odpornością, którzy są częściej poddawani leczeniu przeciwdrobnoustrojowemu.

3.1. Rezerwuary *K. pneumoniae* w warunkach szpitalnych

Chociaż *K. pneumoniae* jest dobrze znana jako częsta przyczyna zakażeń wśród pacjentów hospitalizowanych, źródła tych zakażeń nie są jeszcze dobrze poznane. Istnieje wiele możliwych potencjalnych rezerwuarów, z których może rozwinąć się infekcja: osoby pracujące, odwiedzające lub przyjmowane do szpitala; sprzęt wykorzystywany w procedurach. Odnotowano, że głównym rezerwuarem *K. pneumoniae* jest przewód pokarmowy pacjenta, a głównym wektorem przenoszenia w warunkach szpitalnych – ręce personelu szpitalnego [116-118]. Środowisko szpitalne może pełnić rolę rezerwuarów ułatwiających transmisję tych bakterii i prowadzić do infekcji. W badaniu epidemicznym przeprowadzonym od grudnia 2008 r. do sierpnia 2009 r. u 16 pacjentów, którzy przeszli tę samą procedurę chirurgiczną, wystąpiło zakażenie *K. pneumoniae*, które później powiązano z endoskopem zastosowanym w tej procedurze [118].

Na rozprzestrzenianie się szczepów wielolekoopornych w środowisku szpitalnym ma wpływ powszechnie stosowana antybiotykoterapia. Stosowanie amoksycyliny z kwasem klawulanowym, metronidazolu, klindamycyny, czy piperacyliny z tazobaktamem zwiększa intensywność kolonizacji przewodu pokarmowego przez *Klebsiella pneumoniae* ESBL+. Oddziały na których przebywają pacjenci z obniżoną odpornością lub poddawani immunosupresji – takie jak oddział transplantologii - charakteryzują się większym ryzykiem wybuchu ogniska epidemicznego *K. pneumoniae*. Drugim typem potencjalnych ognisk epidemicznych są oddziały internistyczne o profilu geriatrycznym. Podstawą postępowania w ogniskach epidemicznych jest edukacja i higiena personelu oraz badania przesiewowe i izolacja pacjentów z CPE (ang. *carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*) [79,101,104,115,119-121].

Możliwość bezobjawowego przenoszenia bakterii przez pacjentów i pracowników służby zdrowia budzi ogromne obawy. W Semarang w Indonezji w 2010 r. nosicielstwo nosowo-gardłowe *K. pneumoniae* stwierdzono u 7% zdrowych dzieci i 15% zdrowych dorosłych [122]. W ramach projektu „Human Microbiome Project”, bakterie *K. pneumoniae* wyizolowano z około 10% próbek pobranych z różnych miejsc ciała (usta, skóra) oraz z 3,8% próbek kału [123]. Stwierdzono, że kolonizacja różni się w zależności od miejsca kolonizacji u gospodarza, wieku gospodarza oraz ekspozycji na środowisko opieki zdrowotnej i leczenie przeciwdrobnoustrojowe [117,122-125]. Bezobjawowa kolonizacja lub nosicielstwo *K. pneumoniae* może stanowić rezerwuar tych bakterii, które mogą powodować infekcje endogenne lub zakażenia szpitalne u innych osób.

3.2. Właściwości genomu *K. pneumoniae*

Pierwsze kompletne sekwencje genomu *K. pneumoniae* (szczep *K. pneumoniae* 342, szczep *K. pneumoniae* MGH 78578 i szczep *K. pneumoniae* NTUH-K2044) zostały opublikowane na początku XXI wieku i ujawniły pojedynczy, kolisty chromosom o wielkości od 5,2 do 5,6 Mbp, kodujący około 4800 - 5600 genów [126-127].

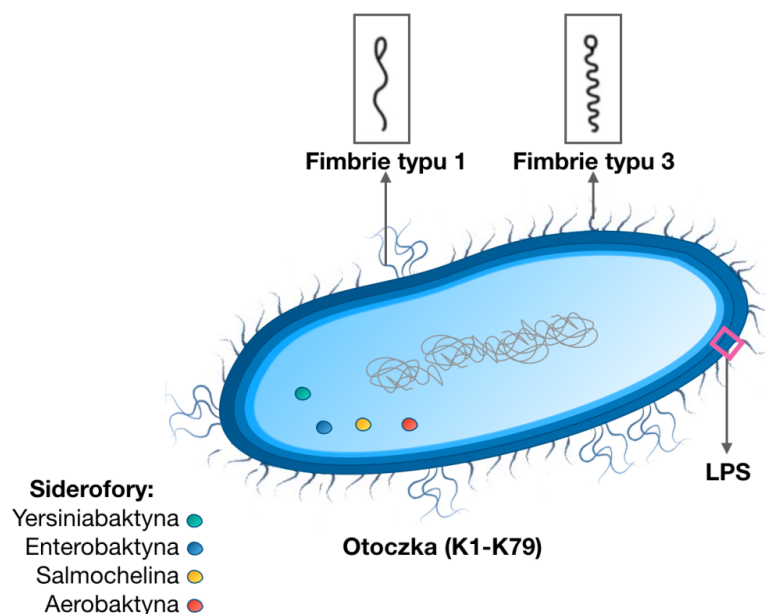
Pomimo podobieństwa pod względem długości chromosomu i liczby genów, zawartość genomu znacznie różni się pomiędzy szczepami. Poza niewielkim rdzeniem genomu, który jest silnie zakonserwowany ewolucyjnie i koduje podstawowe funkcje metaboliczne komórki, *K. pneumoniae* posiada dodatkowy zestaw genów, tzw. genom pomocniczy, który stanowi dodatkowy materiał genetyczny

i odpowiedzialny jest za plastyczność genomu. Ta rozbudowana pomocnicza część genomu odpowiedzialna jest za adaptację do niszy ekologicznej. Kombinacja genomu rdzeniowego oraz zestawu wszystkich znanych genów pomocniczych jest znana jako pan-genom, czyli cała pula genów danego gatunku [104,128]. Rozmiar rdzenia, genomu pomocniczego i pan-genomu zależy od badanego szczepu. W jednym badaniu opartym na zróżnicowanym zbiorze 328 zsekwencjonowanych izolatów (w tym *K. pneumoniae*, *K. variicola* i *K. quasipneumoniae*) oszacowano 1743 genów podstawowych (1,48 Mbp sekwencji) i aż 28143 genów pomocniczych [104].

W oparciu o WGS i analizy genomiczne można zidentyfikować mechanizmy genetyczne leżące u podstaw określonych cech fenotypowych będących przedmiotem zainteresowania mikrobiologów. Te fenotypowe cechy obejmują przede wszystkim wirulencję i oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe, ponieważ stanowią one wyjątkowe i poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Wiedza na temat obecności niektórych genów oporności lub wirulencji, kodujących odpowiednie fenotypy oraz sposobu, w jaki mogą się przemieszczać w populacji bakteryjnej, może pomóc w wyborze odpowiedniego leczenia i kontroli zagrożeń.

3.3. Czynniki wirulencji *K. pneumoniae*

K. pneumoniae wykazuje wiele różnych strategii adaptacji do niszy ekologicznej i ochrony przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza. Do istotnych czynników wirulencji ułatwiających bakterii przetrwanie i wywołanie choroby należą fimbrie typu 1 i 3, system pobierania żelaza (siderofory), lipopolisacharyd (LPS), otoczka polisacharydowa (Rysunek 4) [104,109,129-131]. Obecność niektórych z nich jest zachowana wśród większości szczepów *K. pneumoniae*, np. operon *mrk* kodujący fimbrie typu 3, otoczka polisacharydowa czy lipopolisacharyd (LPS) [104,109]. Regulacja ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji czy zmiany w strukturze genów mogą decydować o stopniu zjadliwości szczepów. I tak na przykład geny *rmpA* i *rmpA2* regulują pozytywnie ekspresję genów związanych z syntezą otoczki, co powoduje pojawienie się fenotypu hipermukoidalnego, który jest związany ze zwiększoną wirulencją [112,132-134]. Niektóre z czynników wirulencji, jak salmochelina, yersiniabaktyna czy aerobaktyna, wchodzą w skład genomu pomocniczego *K. pneumoniae*, stąd ich obecność może zwiększać zjadliwość szczepu [104,129].



Rysunek 4. Czynniki wirulencji szczepów *Klebsiella pneumoniae*. Istnieją cztery dobrze scharakteryzowane grupy czynników wirulencji patogennych szczepów *K. pneumoniae*: otoczki, lipopolisacharyd (LPS), fimbrie (typu 1 i typu 3) i siderofory. Otoczka jest pozakomórkowym polisacharydem, który otacza komórkę bakterii. Klasyczne szczepy *K. pneumoniae* wytwarzają otoczkę, jednego z serotypów od K1 do K79; serotypy K1 i K2 związane są ze zwiększoną patogennością. LPS to integralna część błony zewnętrznej komórki, która jest wytwarzana zarówno przez klasyczne szczepy *K. pneumoniae*, jak i hiperwirulentne, i może należeć do jednego z serotypów O-antygeny oznaczonego od 1 do 9. Szczepy *K. pneumoniae* tworzą związane z błoną struktury adhezyjne, fimbrie typu 1 i typu 3 oraz wydzielają siderofory wychytujące żelazo. Spośród sideroforów, enterobaktyna jest wytwarzana przez prawie wszystkie szczepy, a yersiniabaktyna jest wytwarzana przez około połowę klasycznych i prawie wszystkie szczepy hiperwirulentne. Salmochelina i aerobaktyna rzadko są wytwarzane przez klasyczne szczepy, zazwyczaj są wydzielane przez szczepy HV, przy czym poziom ekspresji aerobaktyny jest najsilniejszy spośród sideroforów. Opracowanie własne na podstawie [130]

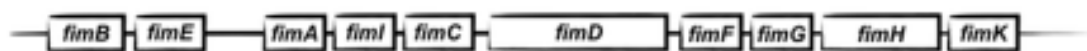
3.3.1. Adhezyny

Wiele gatunków bakterii z rodziny Enterobacteriaceae wykazuje obecność adhezyn, które warunkują przyleganie bakterii do komórek nabłonka dróg moczowych, umożliwiając tym samym kolonizację zajmowanej powierzchni i stanowią ochronę bakterii przed usunięciem podczas mikcji [130,135]. Najważniejszą grupą adhezyn są adhezyny fimbrialne - sztywne struktury białkowe, które umożliwiają pałeczkom *Klebsiella* przyczepność w obliczu naprężeń mechanicznych występujących pod wpływem nieregularnego przepływu moczu w cewce moczowej. Fimbrie są heterokompleksami, które składają się z białkowych podjednostek tworzących strukturę wypustki oraz monomerów mniejszych podjednostek odpowiedzialnych za ich wydłużanie, funkcje wiążące i stabilność. Na szczycie fimbrii znajduje się element, który rozpoznaje receptor na komórkach nabłonkowych. Największe znaczenie w patogenezie ZUM o etiologii *Klebsiella pneumoniae* mają fimbrie typu 1 oraz fimbrie typu 3 [130,136].

3.3.1.1. Fimbrie typu 1

Fimbrie typu 1 występują u większości pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae kolonizujących dolne odcinki układu moczowego. Fimbrie te są kodowane przez zestaw genów *fim*, zlokalizowanych na chromosomach bakteryjnych oraz plazmidach. Występujące u 90% szczepów *K. pneumoniae* włókna, mają długość 16 µm i szerokość 3 nm [130,137]. Biogeneza fimbrii podlega systemowi sekrecji typu "chaperone-usher" (CUP, ang. *chaperone-usher pathway*), gdyż do powstania funkcjonalnej fimbrii niezbędne są: periplazmatyczne białko opiekuńcze i zewnątrz błonowe białko kanałotwórcze. Wszystkie białka

strukturalne niezbędne do budowy fimbrii powstają w cytoplazmie i są transportowane do periplazmy z wykorzystaniem systemu sekrecji Sec-zależnej [137,138]. Białko właściwe fimbrii typu 1 składa się z 159 reszt aminokwasowych. Sekwencję aminokwasową białka poprzedza peptyd sygnałowy składający się z 23 reszt aminokwasowych. Do biosyntezy fimbrii typu 1 niezbędne jest 10 podjednostek, które wchodzi w skład operonu *fim* (Rysunek 5) [130,136-138].



Rysunek 5. Organizacja genetyczna klastra genów fimbrii typu 1 (*fim*). Na podstawie [137]

Adhezyną właściwą na powierzchni fimbrii jest białko FimH o masie 32 kDa. W drogach moczowych, białko to rozpoznaje i wiąże się z receptorami lub cząsteczkami zawierającymi reszty mannozowe, które są typowe dla komórek nabłonka pęcherza moczowego. Białko FimH warunkujące właściwości adhezyjne, występuje na szczycie fimbrii lub może być rozmieszczone na całej jej długości. Podjednostka FimH składa się z dwóch domen: receptorowej i linkerowej. Domena receptorowa, która wiąże mannozę ma kształt kieszonki, jest głęboka, mała i ujemnie naładowana. Domena pili łączy podjednostkę FimH z FimG, tworząc elastyczny linker złożony z dwóch aminokwasów, Gly159 i Gly160. Wiele wypustek fimbrialnych na powierzchni komórki bakteryjnej umożliwia jej przyleganie do komórek nabłonkowych gospodarza oraz erytrocytów, powodując hemaglutynację. Utrata zdolności wytwarzania fimbrii wiąże się z utratą zjadliwości. Do powstania fimbrii niezbędna jest produkcja wszystkich białek kompleksu. Gdy ekspresja genów *fim* jest włączona, komórki bakteryjne są silnie urzęsione, jeśli ekspresja jest wyłączona - fimbrie nie powstają [130,137].

Ekspresja operonu *fim* na poziomie transkrypcji jest regulowana przez odwracalny element DNA (przełącznik fazowy) zawarty w obrębie promotora głównego genu kodującego podjednostkę fimbrialną, *fimA*. Rejon ten jest otoczony odwróconymi powtórzeniami sekwencji 9 nukleotydów (IR, ang. *inverted repeats*). Odwrócenie orientacji przełącznika fazowego, a w następstwie wygaszenie transkrypcji jest kontrolowane przez białka regulatorowe HNS i IHF, należące do białek histonopodobnych, białko regulatorowe Lrp reagujące na leucynę, oraz białka FimE i FimB, które są homologiczne do λ – integraz z rodziny rekombinaz miejscowo – specyficznych. Rekombinazy FimE i FimB rozpoznają odwrócone powtórzenia sekwencji 9 nukleotydów, flankując sekwencje przełącznika fazowego. FimE może orientować przełącznik fazowy tylko z pozycji włączonej (ON) na wyłączoną (OFF), podczas gdy FimB promuje przełączanie w obu kierunkach. W pozycji ON promotor jest prawidłowo zorientowany na transkrypcję, z kolei w pozycji OFF dochodzi do zahamowania transkrypcji [137,139]. To, która rekombinaza dominuje jest zależne głównie od temperatury. FimE dominuje w temperaturze 37°C, zaś FimB w temperaturze 37–40°C. Ponadto środowisko błon śluzowych promuje białko FimB. W takich warunkach zwiększona ekspresja fimbrii typu 1 odpowiada za szybką kolonizację [139].

Ekspresja fimbrii typu 1 podlega opisanemu powyżej zjawisku zmienności fazy, polegającemu na włączeniu lub wyłączeniu stanu ufimbriowania przez poszczególne komórki. Do regulowania ekspresji fimbrii typu 1, *K. pneumoniae* wykorzystuje bodźce środowiskowe. Na przykład geny fimbrii typu 1 ulegają ekspresji w drogach moczowych, ale nie w przewodzie pokarmowym lub płucach [109,136,137]. Ta obserwacja jest zgodna z faktem, że fimbrie typu 1 przyczyniają się do ZUM [130,136]. Jak wykazano

na mysim układzie modelowym, fimbrie typu 1 w szczególności przyczyniają się do inwazji komórek pęcherza moczowego przez *K. pneumoniae* i tworzenia biofilmu w pęcherzu podczas ZUM, ale nie są potrzebne do wczesnej kolonizacji [137,140]. Wykazano, że podczas kolonizacji przewodu pokarmowego czy zapalenia płuc, bakterie *K. pneumoniae* nie wykazują ekspresji fimbrii typu 1, stąd przypuszczenie, że struktury te są zbędne lub nawet potencjalnie szkodliwe [136,137]. W oparciu o badania przeprowadzone z użyciem modelu infekcji płuc myszy zaobserwowano, że mutant *K. pneumoniae* pozbawiony genów *fim* był zdolny nie tylko do kolonizacji płuc, ale także do rozprzestrzeniania się do śledziony i wątroby [136]. Sugeruje to, że nawet niski poziom ekspresji fimbrii typu 1 *K. pneumoniae* może mieć wpływ na infekcje różnych narządów.

Poza podstawową funkcją fimbrii typu 1 jaką jest pośrednictwo w adhezji do komórek nabłonkowych gospodarza, fimbrie typu 1 odgrywają ważną rolę w inwazji komórek pęcherza moczowego oraz mogą brać udział w tworzeniu biofilmu w pęcherzu moczowym i na powierzchniach abiotycznych [109,140,141]. Znana jest również inna rola fimbrii typu 1 w patogenezie. Stwierdzono, że *in vivo* wzmacniają one lektinofagocytozę przez makrofagi i neutrofile. Ponadto, podjednostka FimH ułatwia wiązanie bakterii z komórkami odpornościowymi, takimi jak komórki tuczne, co prowadzi następnie do zwiększonej aktywacji komórek odpornościowych i rekrutacji neutrofile. Konsekwencją może być wzrost klirensu *K. pneumoniae* [130,142].

3.3.1.2. Fimbrie typu 3

Fimbrie typu 3 również powstają na drodze sekrecji typu „chaperone-usher” i są kodowane przez zestaw genów *mrk*, z których adhezyną właściwą jest *mrkD*, która wiąże się z receptorami lub peptydami dostępnymi w wyniku wcześniejszego uszkodzenia komórek. Kompleks genów *mrk* zlokalizowany jest na chromosomie bakteryjnym oraz może występować na plazmidach. Fimbrie typu 3 wytwarzane są przez około 80% wszystkich szczepów *K. pneumoniae*, a ich włókna są krótsze i cieńsze niż fimbrii typu 1, gdyż mają długość 2-4 μm i szerokość 2 nm, ale występują znacznie liczniej. W przeciwieństwie do fimbrii typu 1, fimbrie typu 3 są niewrażliwe na mannozę [143].

Fimbrie typu 3 to helisopodobne, związane z błoną, adhezyjne struktury na powierzchni *K. pneumoniae*. Składają się głównie z podjednostek MrkA, z podjednostką MrkD na szczycie. Stwierdzono, że fimbrie typu 3 są niezbędne do produkcji biofilmu *K. pneumoniae* i wiązania ze sprzętem medycznym. Chociaż specyficzny receptor powierzchniowy komórki nie został jeszcze zidentyfikowany dla fimbrii typu 3, wykazano, że podjednostka MrkD wiąże się z macierzą zewnątrzkomórkową żywej tkanki. Podczas gdy podjednostka MrkA wiąże się do powierzchni abiotycznych np. cewników, implantów, pokrytych tkanką gospodarza. Wykazano, że obecność u bakterii fimbrii typu 3 pobudza neutrofile do wytwarzania reaktywnych form tlenu (RSO), co może mieć negatywny wpływ na same komórki bakterii [136,141,143].

Fimbrie typu 3 odgrywają również ważną rolę w produkcji biofilmu [141,144]. Biofilm stanowi barierę, która chroni bakterie przed presją zewnętrznych czynników środowiska, w tym wysuszeniem, toksynami oraz środkami przeciwdrobnoustrojowymi. Biofilm to również zwarte środowisko, w którym między komórkami dochodzi do wymiany materiału genetycznego, np. genów oporności i genów wirulencji. Odpowiedzialne są za to ruchome elementy genetyczne [145]. Wszystkie te czynniki

przyczyniają się do utrzymywania się i przenoszenia *K. pneumoniae*, szczególnie w środowisku szpitalnym [136,141,144].

3.3.2.Siderofory

O zdolności przeżycia i namnażania się bakterii *Klebsiella pneumoniae* w tkankach i narządach, decyduje obecność odpowiednich jonów i substratów pokarmowych, z których niezbędnym do syntezy cytochromów, reduktazy rybonukleotydów i innych enzymów, jest żelazo. Dlatego w środowisku z minimalną ilością wolnego lub niezwiązanego żelaza, przeżycie *Klebsiella* zależy od sideroforów [146]. Siderofory są cząsteczkami wykazującymi wysokie powinowactwo do jonów żelaza Fe^{3+} . W moczu ilość wolnego żelaza jest duża (1-3 μg w warunkach fizjologicznych) [147]. Z kolei w tkankach, żelazo w postaci jonów Fe^{2+} występuje zazwyczaj w formie związanej w makrocząsteczkach takich jak laktoferyna i transferyna. Sprawia to, że większość bakterii nie jest zdolna do jego wykorzystania. Do prawidłowego wzrostu i aktywności metabolicznej bakterie wymagają stężenia żelaza na poziomie około $10^{-6}M$ [146-148].

Pod względem struktury siderofory można podzielić na trzy główne rodziny: katecholany (np. enterobaktyna i salmochelina), hydroksaminiany (np. desferrioxamine B) i karboksylany (np. stafyloferyna A). Można również wyróżnić siderofory „typu mieszanego” (yersiniabaktyna, pyochelina, aerobaktyna), które uważa się za mające elementy dwóch lub więcej rodzin sideroforów. Ich działanie polega na uwalnianiu żelaza z kompleksów białkowych gospodarza i przenoszeniu go do cytozolu komórki bakteryjnej za pośrednictwem białkowych receptorów i przerośników błonowych. Wytwarzanie enterobaktyny jest powszechne dla wszystkich *Klebsiella* sp. Gen syntezy enterobaktyny - *ent* jest składnikiem genomu podstawowego. Kilka innych nabytych loci związanych z syntezą sideroforów (aerobaktyna, salmochelina i yersiniabaktyna) jest rozpoznawanych jako powszechne geny pomocnicze. Bakteria może nabyć je w drodze horyzontalnego transferu genów [104,130,134].

Najczęściej spotykanym nabytym sideroforem jest yersiniabaktyna, która kodowana jest przez locus *ybt* i znajduje się na integracyjnym elemencie koniugacyjnym [104,146,149]. Yersiniabaktyna obecna jest u około 30% izolatów *K. pneumoniae* odpowiadających za infekcję ZUM [104,149]. Aerobaktyna i salmochelina występują znacznie rzadziej (dla < 5% izolatów), odpowiednio kodowane są przez loci *iuc* i *iro*, i zazwyczaj przenoszone są na plazmidzie wirulencji [150-152]. Plazmid ten niesie również geny niezbędne do kodowania fenotypu hiper mukoidalnego (*rmpA/rmpA2*) [152]. Czasami jednak można znaleźć salmochelinę zakodowaną na tym samym integracyjnym elemencie koniugacyjnym co yersiniabaktyna, wraz z genotoksyną kolibaktyny [151]. Wszystkie te nabyte siderofory związane są z wirulencją i chorobami inwazyjnymi, często o śmiertelnym przebiegu [104,129,146].

3.3.3.Lipopolisacharyd (LPS) i polisacharyd otoczkowy

Cząsteczka LPS, często uważana za kluczowy czynnik wirulencji, składa się z kilku składników: lipidu A, polisacharydu rdzeniowego i powtarzającego się polisacharydu znanego jako antygen O [153,154]. U ludzkich gospodarzy, LPS pomaga przetrwać *K. pneumoniae* hamując działanie układu dopełniacza, a wysoki poziom LPS jest zaangażowany w wyzwalanie nadmiernej reakcji przez układ odpornościowy (tzw. wstrząs endotoksyczny), powodując poważne uszkodzenie organizmu gospodarza. W przypadku szczepów *K. pneumoniae*, antygen O występuje w 9 typach serologicznych i w więcej niż 5 podtypach.

Antygen O jest kodowany przez co najmniej tyle samo różnych loci [153-156]. Serotypowanie antygeny O nie jest powszechne w laboratoriach klinicznych, ale wraz z pojawieniem się i upowszechnieniem sekwencjonowania WGS, locus O można łatwo wyodrębnić z danych genomu i wykorzystać do przewidywania serotypu [154,157].

Prawie wszystkie bakterie z rodzaju *Klebsiella* wykazują obecność otoczki polisacharydowej, która jest niezbędna do przeżycia bakterii u ludzkich gospodarzy, a jej utrata wiąże się z całkowitą utratą zjadliwości. Powtarzalne podjednostki otoczkowe, składające się z czterech do sześciu cukrów i bardzo często kwasów uronowych (jako składników naładowanych ujemnie), kodowane są przez loci genów syntezy polisacharydów otoczkowych (*cps* lub K), i można podzielić je na 79 typów otoczkowych (typy K) [158]. Typy otoczek K1 i K2 powiązane z chorobą inwazyjną i zwiększoną patogennością w mysich modelach [98] i wykazano, że są wysoko zakonserwowane ewolucyjnie w hiperwirulentnych klonach (K1 w CG23 i K2 w innych) [150,159]. Otoczka typu K5 jest również związana z ropniem wątroby [160], a K3 jest ograniczona do rzadkiej linii *Klebsiella pneumoniae* spp. *rhinoscleromatis* (ST67) [99]. Niewiele wiadomo o względnej zjadliwości innych typów otoczek, a większość niehiperwirulentnych klonów, w tym globalne klony MDR, wykazują znaczną różnorodność K-locus [150]. Wiele szczepów *K. pneumoniae* w badaniach serologicznych jest oznaczonych jako „nietypowe”. Powodem tego może być brak syntezy otoczki, brak wiązania przeciwciał podczas serotypowania lub niespecyficznosc reakcji objawiająca się wiązaniem wielu różnych przeciwciał. Również i w tym przypadku opracowano schemat typowania oparty o sekwencję, i wykazano, że istnieje ponad 138 różnych rodzajów loci otoczek (tzw. typy KL) [154]. Analiza genomowa wykazała, że serologicznie odrębne typy otoczek są kodowane przez różne loci regionu *cps*, [153,154]. Serotyp otoczki najlepiej jest oznaczyć na podstawie sekwencjonowania genomu [154].

Proces rekombinacji genetycznej skupiony wokół genów syntezy polisacharydu otoczkowego oraz w mniejszym stopniu antygen-O LPS może wpływać na szybką dywersyfikację typów otoczek i antygeny O w populacji bakteryjnej, a nawet w obrębie linii filogenetycznej. Może to również mieć wpływ na unikanie odpowiedzi ze strony układu immunologicznego. Niektóre typy otoczek są związane ze szczególną zjadliwością bakterii i decydują o ciężkości przebiegu choroby pacjenta [154,161].

Oprócz zmienności w typie otoczki, *K. pneumoniae* może także zawierać dodatkowe geny *rmpA* i *rmpA2* w swoim genomie, które decydują o pozytywnej regulacji i nadekspresji otoczki, co skutkuje pojawieniem się tzw. fenotypu hipermukoidalnego (HM, ang. *hypermucoviscosity*). Początkowo fenotyp HM był związany z kilkoma specyficznymi typami otoczek. Obecnie wiadomo, że fenotyp HM jest związany z genami *rmpA* i *rmpA2*, i nie ma związku z typem otoczki [112,132,159].

3.3.4. Fenotyp hipermukoidalny

Hipermukoidalność jest prawdopodobnie najbardziej znanym czynnikiem wirulencji *K. pneumoniae*, ale jej podstawa genetyczna i udział w chorobie nie są do końca jasne (Tabela 4). Fenotyp jest powszechnie związany z nadprodukcją otoczki z powodu obecności jednego lub obu dodatkowych genów regulatorowych *rmpA* lub *rmpA2* (które mają > 80% homologii) [112,132,159]. Chociaż w ostatnich latach wykazano, że fenotyp ten może również wystąpić bez nadprodukcji otoczki [132]. Geny *rmpA* i *rmpA2* są zazwyczaj umieszczone odpowiednio w pobliżu genów *iro* i *iuc* na plazmidach wirulencji

KpVP-1 i KpVP-2. Geny *rmpA* i *iro* mogą również współwystępować na ruchomym integracyjnym elemencie koniugacyjnym ICEKp1 (ICE, ang. *integrative conjugative element*), a *rmpA2* i *iuc* na niekanonicznych plazmidach wirulencji [151,162].

Badania genomiczne pokazują, jak różnorodna jest populacja *Klebsiella pneumoniae* i ujawniają pozorne powiązania między proponowanymi genami wirulencji a fenotypem hiperwirulencji, co prowadzi do nieporozumień w oznaczaniu „markerów hiperwirulencji” (Tabela 4) [150].

Tabela 4. Domniemane determinanty hiperwirulencji. W oparciu o [150]

Geny specyficzne dla otoczek
Otoczki K1 i K2 są wysoce zakonserwowane ewolucyjnie w obrębie poszczególnych klonów hiperwirulentnych i w wielu klonach o niższej wirulencji.
Obecnie zaproponowane są dwa markery hiperwirulencji związane z loci otoczek: gen <i>magA</i> (koduje polimerazę CPS typu Wzy) i gen <i>wag</i> (składnik locus K 1 (K11), oraz K16, K116, K154, K158, K163 i K1113).
Markery specyficzne dla klonu
<i>kfu</i> (pośredniczy w przyswajaniu żelaza (III)) i <i>allS</i> (metabolizm alantoiny) są zachowane w grupie klonalnej 23 (CG23), ale nie w innych hiperwirulentnych klonach.
<i>kvgAS</i> jest zakonserwowany w CG86, CG65 i CG25, ale nie występuje w CG23.
Geny hipermukoidii i <i>rmpA</i>
Hiperbukoidalność nie ogranicza się wyłącznie do hiperwirulentnych szczepów i nie wszystkie hiperwirulentne szczepy są hiperbukoidalne w teście ciągłości. Zgodność między testem ciągłości a hiperwirulencją w ocenie klinicznej lub na modelu zwierzęcym jest różna (51–98%).
Połowa zarejestrowanych alleli <i>rmpA</i> lub <i>rmpA2</i> zawiera mutacje oparte na przesunięciu ramki odczytu powstałe z indeli w sekwencji poli (G), powodując utratę funkcji i brak hiperbukoidalności.
Receptory sideroforów
Wśród genów rdzeniowych genomu <i>K. pneumoniae</i> znajduje się receptor zależny od TonB, który ma około 71% homologii z receptorem aerobaktyni <i>iutA</i> . Wykrywanie tego genu za pomocą PCR lub sekwencjonowania jest czasem mylone z obecnością aerobaktyni, pomimo braku genów syntezy aerobaktyni <i>iucABCD</i> .

3.4. Determinanty oporności

W zakażeniach układu moczowego bardzo ważne jest szybkie wdrożenie leczenia przeciwbakteryjnego, które oprócz usunięcia stanu zapalnego i wyjałowienia układu moczowego, ma za zadanie zminimalizować ryzyko następstw zakażenia, takich jak powstanie blizn w nerkach, rozwoju przewlekłej choroby nerek, nadciśnienia tętniczego, czy urosepsy. Lekami, które są stosowane w pierwszym etapie leczenia ZUM są fluorochinolony, trimetoprim z sulfometoksazolem i nitrofurantoina [163]. Profilaktyczne stosowanie antybiotyków wywołuje rosnący odsetek oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Leczenie staje się coraz trudniejsze, a w niektórych przypadkach wręcz niemożliwe. Występujące u bakterii mechanizmy oporności na antybiotyki mogą prowadzić do selekcji i rozprzestrzeniania się szczepów opornych na wiele klas antybiotyków a niewłaściwa antybiotykoterapia do kolejnych ZUM szczepami egzogennymi o obniżonej wrażliwości na antybiotyki [164]. W czasie terapii, bakterie poddawane są działaniu antybiotyku o stężeniu podprogowym, co wywołuje zmiany w strukturach powierzchniowych i morfologii komórek, a także hamuje wytwarzanie toksyn. Stężenie podprogowe przyczynia się jednak do selekcji szczepów opornych, a pojawienie się zmienionych strukturalnie i morfologicznie komórek bakteryjnych utrudnia ich rozpoznanie.

Zrozumienie spektrum oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe i leżących u jego podstaw mechanizmów jest integralną częścią podejmowania świadomych decyzji dotyczących leczenia. Wiedza na temat jakie oporności są kodowane, sposobu ich kodowania oraz sposobu ich rozprzestrzeniania się lub zaostrzenia, może pomóc ustalić, które środki przeciwdrobnoustrojowe byłyby odpowiednie i najskuteczniejsze w leczeniu. Narastająca liczba przypadków ZUM o etiologii *K. pneumoniae*, które często

wykazują wielolekooporność [79-81,104,116,164], uzasadnia konieczność prowadzenia badań mających na celu określenie czynników zjadliwości i mechanizmów oporności na antybiotyki stosowane w leczeniu ZUM.

Biorąc pod uwagę zróżnicowany zakres lekooporności, wprowadzono podział szczepów bakteryjnych na wielolekooporne (MDR, ang. *multidrug-resistant*), o rozszerzonej oporności (XDR, ang. *extensively drug-resistant*) i o całkowitej oporności na antybiotyki (PDR, ang. *pandrug resistant*) [165]. Narastającym problemem w transplantologii jest coraz powszechniejsze występowanie bakterii *K. pneumoniae* MDR, które wykazują oporność na trzy lub więcej klas leków, nie uwzględniając naturalnej oporności na ampicylinę [166]. W tego typu zakażeniach (zwłaszcza bakteriami opornymi na karbapenemy) próbuje się stosować leczenie skojarzone kilkoma antybiotykami w dużych dawkach [60,61,91,94]. Pomimo wcześniej wdrożonego, prawidłowego leczenia, zakażenia te stanowią zagrożenie dla życia pacjenta oraz czynności graftu. Częstotliwość i rozpowszechnienie oporności bakterii oraz obawy związane z pojawieniem się szczepów XDR stają się powszechne, dlatego zrozumienie mechanizmów genetycznych odpowiedzialnych za nabywanie oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki ma ogromne znaczenie.

3.4.1. Mechanizmy wpływające na zmienne profile oporności na antybiotyki szczepów *K. pneumoniae* odpowiedzialnych za ZUM

Zasadniczo istnieją dwa typy zmienności genetycznej, które mogą nadawać oporność na antybiotyki (AMR, ang. *antimicrobial resistance*). Pierwszym z nich jest przeniesienie mechanizmów oporności w wyniku horyzontalnego transferu genów (HGT, ang. *horizontal gene transfer*) z udziałem ruchomych elementów genetycznych [167]. Sekwencje insercyjne, transpozony, integrony i kasety genowe, plazmidy i fagi mogą przenosić geny kodujące oporność między komórkami bakteryjnymi [168-170]. Drugi to akumulacja mutacji w istniejących genach rdzeniowych, które powodują zmianę ich funkcjonalności nadając im oporność (na przykład mutacje w genie kodującym gyrazę (*gyrB*), co prowadzi do powstania oporności na chinolony) [167].

Chociaż istnieją dwa szeroko rozpowszechnione typy zmienności genetycznej prowadzącej do nabywania oporności, oporność bakterii może być uwarunkowana różnorodnymi mechanizmami obejmującymi: modyfikację miejsca docelowego działania substancji przeciwbakteryjnej; zmniejszenie przepuszczalności osłon komórkowych; enzymatyczną degradację lub zmianę struktury środka przeciwdrobnoustrojowego; czynne usunięcie środka przeciwdrobnoustrojowego z komórki bakteryjnej za pomocą kanałów porynowych (ang. *efflux pump*). Nadprodukcja systemów wypompowujących cząsteczki z komórki, a także ich synergistyczne działanie z innymi wymienionymi mechanizmami, może wpływać na obniżenie wrażliwości na różne klasy substancji przeciwbakteryjnych [167,171]. Niektóre klasy AMR są szczególnie niepokojące w przypadku szczepów *K. pneumoniae* izolowanych z moczu pacjentów ze szpitalnym ZUM. Klasy oporności u *K. pneumoniae* i znane determinanty genetyczne nadające oporność zostały przedstawione w tabeli 5.

Tabela 5. Genetyczne determinanty oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe w genomach *K. pneumoniae*. W oparciu o [172]

β-laktamazy	bla Geny nadające oporność (* naturalną)	
Klasa A	CARB-3, PSE-1, SCO-1, SHV-1*, TEM-1	
ESBL	CTX-M, SHV-5, TEM-10, VEB	
Karbapenemazy	KPC, GES-5	
Klasa B (Metallo- β -laktamazy)	CphA, IMP, NDM, SIM, VIM	
Klasa C (Cefalosporynazy)	AmpC, CMY, DHA, FOX, MIR	
Klasa D	OXA-1, OXA-2, OXA-7, OXA-9, OXA-10, OXA-12	
ESBL	OXA-11, OXA-15	
Karbapenemazy	OXA-48, OXA-51, OXA-181, OXA-237	
Inne AMR	Geny nadające oporność (* naturalną)	Mutacje
Aminoglikozydy	<i>aac, aadA, aadB, aph, armA, rmt, strA, strB</i>	-
Karbapenemy	(patrz geny karbapenemazy <i>bla</i> , klasa A i D powyżej)	Mutacje w <i>ompK35, ompK36</i>
Kolistyna	<i>mcr-1, mcr1.2</i>	Dezaktywacja <i>pmrB, mgrB</i> ; mutacje w <i>crrB</i>
Fluorochinolony	<i>qepA, qnrA, qnrB, qnrD, qnrS</i>	SNPs w <i>gvrA, parC</i> ; pozytywna regulacja <i>acrAB</i> lub <i>oqxAB</i>
Makrolidy	<i>ereA, ereB, ermB, mef, mph, msrE</i>	-
Fenikole	<i>catA, catB, cml, floR</i>	-
Ryfampicyna	<i>arr</i>	-
Sulfonamidy	<i>folP, sul1, sul2, sul3</i>	-
Tetracyklina	<i>tet</i> geny	-
Tygecyklina	-	pozytywna regulacja <i>acrAB</i> lub <i>oqxAB</i> ; mutacje w <i>rpsJ</i>
Trimetoprim	<i>dfr</i> geny	-

3.4.2. Oporność na β-laktamy

W ciągu ostatnich dziesięcioleci, zarówno w Polsce, jak i na świecie, obserwuje się stały wzrost oporności bakterii *K. pneumoniae* na największą i najbardziej różnorodną grupę antybiotyków - na antybiotyki β-laktamowe. Najbardziej rozpowszechnionym mechanizmem oporności na β-laktamy jest enzymatyczna inaktywacja substancji przeciwbakteryjnej. W tym celu *K. pneumoniae* wytwarza β-laktamazy stanowiące bardzo zróżnicowaną grupę enzymów, które hydrolizują penicyliny, monobaktamy i cefalosporyny (z wyjątkiem cefamycyny). Działanie β-laktamaz jest hamowane przez inhibitory β-laktamaz: kwas klawulanowy, tazobactam, sulbactam. Wrażliwość szczepów na penicyliny może być również osiągnięta poprzez połączenie antybiotyków β-laktamowych z inhibitorami β-laktamaz [173]. Enzymami najbardziej rozpowszechnionymi w tej grupie są enzymy o rozszerzonym spektrum działania (ESBL, ang. *Extended Spectrum β-Lactamase*), które po raz pierwszy zostały wyizolowane ze szczepu *K. pneumoniae* w 1983 roku w Niemczech [174]. Lekami z wyboru stosowanymi w leczeniu zakażeń powodowanych przez szczepy *K. pneumoniae* ESBL są karbapenemy.

Powszechne stosowanie szerokok zakresowych antybiotyków sprawiło, że szczepy *K. pneumoniae* wykształciły mechanizmy oporności na karbapenemy. Do najważniejszych zalicza się wytwarzanie karbapenemaz, czyli enzymów hydrolizujących karbapenemy oraz wszystkie pozostałe grupy antybiotyków β-laktamowych. Karbapenemazy zostały zaklasyfikowane do trzech klas strukturalnych β-laktamaz: A, B i D. Szeroko rozpowszechnione są karbapenemazy KPC (klasa A) (ang. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), które kodowane są przez geny *blaKPC* zlokalizowane na plazmidach. Enzym karbapenemaz typu KPC został po raz pierwszy zidentyfikowany w przypadku szczepu *K. pneumoniae*, a obecnie identyfikowany jest również w innych gatunkach rodziny Enterobacteriaceae [175]. W Polsce

szczep *K. pneumoniae* KPC został po raz pierwszy opisany w 2008 roku. Był to wielolekooporny szczep zakwalifikowany do hiperepidemicznego klonu ST258, wykrywanego wcześniej na świecie [176].

β -laktamazy klasy B to tzw. metalo- β -laktamazy (MBL, ang. *metallo- β -lactamases*), które posiadają w centrum aktywnym cynk, a nie jak pozostałe grupy β -laktamaz reszty serynowe. U Enterobacterales, geny kodujące enzymy klasy B przenoszone są na plazmidach. Pierwsze nabyte metalo- β -laktamazy opisano u pałeczki *Pseudomonas aeruginosa* w 1988 roku w Japonii [177]. W Polsce szczep *K. pneumoniae* MBL+ po raz pierwszy zidentyfikowano w 2008 roku [178]. Do najważniejszych rodzin nabytych MBL należą imipenemazy IMP, VIM (*Verona-integron-imipenemase*) oraz najnowszy, szybko rozprzestrzeniający się na świecie wariant metalo- β -laktamaz - NDM-1 (ang. *New Delhi metallo- β -lactamases-1*), który stanowi ogromne zagrożenie epidemiczne w środowisku szpitalnym. Pierwszy szczep wytwarzający enzym NDM-1 został zidentyfikowany w 2009 roku w Szwecji. Był to wielolekooporny szczep *Klebsiella pneumoniae* wyizolowany od pacjenta hospitalizowanego wcześniej w Indiach [179]. Kolejne ogniska epidemiczne wywołane tym szczepem odnotowano w 2010 roku w Belgii i Wielkiej Brytanii [180,181]. Od 2015 roku liczba raportowanych przypadków szczepów produkujących karbapenemazy NDM lawinowo wzrasta. Pojawienie się tych szczepów w krótkim czasie w wielu krajach na całym świecie jest związane z horyzontalnym rozprzestrzenianiem się karbapenemaz NDM, a zatem obecnością genu *bla_{NDM}* na plazmidzie, noszącym również geny kodujące β -laktamazę CMY-4, geny oporności na chloramfenikoll, cyprofloksacynę, ryfampicynę, oraz geny determinujące pompę typu efflux i promotor transkrypcji pompy protonowej [181-183]. Spośród 16 wariantów enzymu NDM, najbardziej rozpowszechnionym jest NDM-1. W Polsce pierwszym szczepem wytwarzającym metalo- β -laktamazę New Delhi-1 był szczep *Escherichia coli* wyizolowany w 2011 roku od pacjenta hospitalizowanego wcześniej w Kongo [184]. Jednak od 2012 roku notuje się stale rosnącą liczbę zakażeń wywołanych przez szczepy *K. pneumoniae* NDM-1. Wśród zgłoszonych w pierwszych trzech kwartałach 2017 roku patogenów wytwarzających karbapenemazy NDM-1, szczepy *K. pneumoniae* stanowiły 91.2% przypadków [185]. Obecnie obserwuje się rozprzestrzenianie się w Polsce pałeczek *K. pneumoniae* NDM (+), należących do pandemicznego klonu ST11 [186].

Enzymy klasy D, czyli enzymy CHDL (ang. *carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases*) powszechnie występują u pałeczek z rodzaju *Acinetobacter*. Nabyte CHDL wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* to enzymy oksacylinyazy OXA-48 po raz pierwszy opisane w Turcji w 2001 roku [187], następnie wywołujące epidemie szpitalne w krajach Europy [188,189]. W Polsce szczep *K. pneumoniae* wytwarzający karbapenemazę OXA-48 wyizolowano w 2013 roku od chorego hospitalizowanego w Poznaniu. Wyizolowany szczep został zakwalifikowany do klonu ST395, wykrywanego wcześniej we Francji i Węgrzech [190].

3.5. Podsumowanie

Mimo że wielolekooporne *K. pneumoniae* uważane są za jedne z najgroźniejszych oportunistycznych patogenów Gram-ujemnych, mechanizmy odpowiadające za przebieg kliniczny zakażenia są nadal słabo poznane. Zakres ocenianych czynników wirulencji w większości opublikowanych do tej pory badań był ograniczony. Szczególnie niewystarczająco określona jest charakterystyka molekularna szczepów *K. pneumoniae* wywołujących zakażenia u stale rosnącej grupy biorców nerki.

Wiadomo, że przebieg kliniczny zakażeń, w tym o etiologii *K. pneumoniae*, może być uzależniony od rodzaju i współwystępowania określonych czynników wirulencji. Jednak do tej pory nie ustalono, czy takie same czynniki decydują o ciężkości zakażeń u poddawanych immunosupresji biorców nerki.

Chociaż zidentyfikowano wiele genetycznych uwarunkowań AMR u *K. pneumoniae* i innych bakterii Gram-ujemnych, konieczne są dalsze prace w celu ustalenia czy fenotypy oporności można dokładnie przewidzieć na podstawie genotypów [191]. Błędy w dokładności predykcyjnej mogą skutkować drobnymi lub poważnymi błędami w leczeniu. Drobnym błędem występuje podczas leczenia pacjenta silniejszym środkiem przeciwdrobnoustrojowym niż jest to konieczne, jeśli wykryto genotyp oporności, ale nie stwierdzono jego poziomu ekspresji w postaci fenotypu. Większe obawy budzi brak wykrycia genotypu związanego z opornością na leki w sytuacji, gdy występuje fenotyp oporności, co prowadzi do niepowodzenia leczenia.

4. Cel pracy

Celem rozprawy doktorskiej są badania epidemiczne oraz charakterystyka genetyczna szczepów *Klebsiella pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów po przeszczepieniu nerki z zakażeniem układu moczowego lub bezobjawową bakteriurią, a także zbadanie wpływu leków immunosupresyjnych podawanych pacjentom po przeszczepieniu nerki na wzrost bakterii *K. pneumoniae* i ekspresję genów bakteryjnych istotnych w kolonizacji dróg moczowych pacjentów i ułatwiających przeżycie bakterii w organizmie gospodarza.

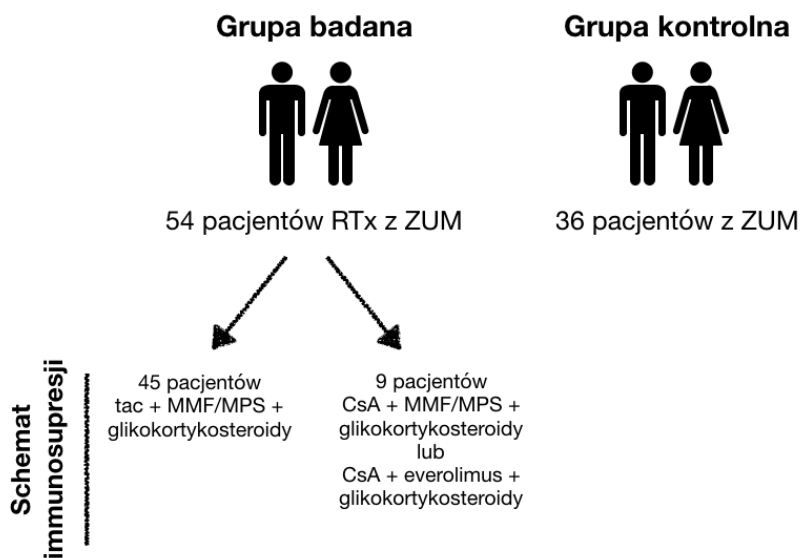
5. Materiały i Metody

5.1. Materiały

5.1.1. Grupy badawcze

Przy współpracy z Kliniką Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wybrano grupy chorych do badania. Grupę badawczą stanowiło 54 pacjentów po transplantacji nerki (RTx, ang. *renal transplant recipients*) z klinicznym rozpoznaniem zakażenia układu moczowego, potwierdzonym wynikiem badania mikrobiologicznego (Rysunek 6). Wszyscy chorzy byli poddawani leczeniu lekami immunosupresyjnymi i tak dla 45 pacjentów zastosowano schemat immunosupresji: tacrolimus (tac) + mykofenolan mofetylu (MMF) / sodu (MPS) + glikokortykosteroidy, zaś w 9 przypadkach: cyklosporyna (CsA) + mykofenolan mofetylu (MMF) / sodu (MPS) + glikokortykosteroidy lub CsA + everolimus + glikokortykosteroidy. U wszystkich pacjentów z grupy badanej w wyniku posiewu moczu wyizolowano bakterie *Klebsiella pneumoniae*. Analiza dokumentacji medycznej wykazała, że u niektórych pacjentów już przed przeszczepem dochodziło do występowania nawrotowych zakażeń układu moczowego o różnej etiologii.

Grupę kontrolną stanowił materiał pobrany od 36 chorych innych niż po transplantacji nerki hospitalizowanych w tej samej Klinice (Rysunek 6). ZUM było przyczyną przyjęcia pacjenta do szpitala lub stanowiło powikłanie wynikające z hospitalizacji. U wszystkich pacjentów z grupy kontrolnej wykonano posiew moczu. Badanie mikrobiologiczne potwierdziło występowanie zakażenia układu moczowego o etiologii *K. pneumoniae* u wszystkich pacjentów. W chwili pobierania materiału do badania chorzy nie byli leczeni lekami immunosupresyjnymi.



Rysunek 6. Grupy badawcze obejmujące chorych Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. RTx – pacjenci po przeszczepieniu nerki; Tac - tacrolimus; MMF - mykofenolan mofetylu; MPS - mykofenolan sodu; CsA - cyklosporyna; ZUM - zakażenie układu moczowego

5.1.1.1. Definicje ZUM przyjęte dla pacjentów

Wszystkie zakażenia układu moczowego (ZUM) sklasyfikowano do jednej z czterech następujących kategorii: (I) bezobjawowa (asymptomatyczna) bakteriuria (ABU, ang. *asymptomatic bacteriuria*), (II) zakażenia dolnego odcinka dróg moczowych (tzw. dolne ZUM), (III) zakażenia górnego odcinka dróg moczowych (tzw. górne ZUM) z ostrym odmiedniczkowym zapaleniem nerki przeszczepionej (AGPN, ang. *acute graft pyelonephritis*), (IV) urosepsa (Tabela 6). ZUM sklasyfikowano również jako nową infekcję, nawrót lub ponowną infekcję. Nawrót ZUM zdefiniowano jako izolację tego samego mikroorganizmu z moczu pacjenta, w czasie powyżej 2 tygodni od zakończenia poprzedniego leczenia. Ponowna infekcja została zdefiniowana jako nowy epizod ZUM z izolacją drobnoustroju innego niż ten izolowany w poprzednim ZUM. Pacjenci z bezobjawową bakteriurią byli również poddawani leczeniu, aż do momentu uzyskania ujemnego wyniku posiewu moczu. W objawowych ZUM dodatkowym kryterium było całkowite ustąpienie objawów klinicznych oraz ujemny wynik posiewu moczu [78,87].

Tabela 6. Klasyfikacja ZUM. Opracowanie na podstawie [78,87]

Rodzaj ZUM	Definicja
Bezobjawowa bakteriuria (ABU)	$\geq 10^5$ j.t.k/ml w czystej próbie moczu przy braku jakichkolwiek objawów dolnego lub górnego ZUM (w tym leukocyturii) (u kobiet, w dwóch kolejnych posiewach moczu w odstępie co najmniej 24 godzin) lub $< 10^5$ j.t.k/ml u pacjentów leczonych antybiotykami lub $\geq 10^2$ j.t.k/ml w pojedynczej cewnikowanej próbie moczu
ZUM dolnego odcinka	obecność bakterii i klinicznych objawów bolesnego oddawania moczu, częstość lub pilność w oddawaniu moczu oraz gorączka $< 38^\circ\text{C}$ przy braku spełnienia kryteriów AGPN
ZUM (AGPN) górnego odcinka	obecność znaczącej bakterii, gorączki $> 38^\circ\text{C}$ i/lub bólu w miejscu przeszczepionej nerki i/lub ostrego upośledzenia funkcji przeszczepu
Urosepsa	jednoczesne dodatnie posiewy krwi i moczu z izolacją tego samego szczepu bakterii

j.t.k - jednostka tworząca kolonię; AGPN, ang. *acute graft pyelonephritis* - ostre przeszczepowe odmiedniczkowe zapalenie nerek; ABU, ang. *asymptomatic bacteriuria* - bezobjawowa bakteriuria.

5.1.1.2. Procedura badań

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (zgoda nr NKBBN/510/2015 oraz zgoda nr NKBBN/120/2019). Wszyscy uczestnicy wyrazili dobrowolną pisemną zgodę na udział w badaniu. Pobranie materiału od osób chorych oraz osób z grupy kontrolnej odbywało się w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych GUM.

5.1.2. Kolekcja szczepów wykorzystanych w pracy

Badania zostały wykonane na szczepach *Klebsiella pneumoniae* wyizolowanych z rutynowo wykonywanych posiewów moczu w Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Identyfikacja gatunkowa została przeprowadzona za pomocą systemu Vitek2 (bioMérieux, Hazelwood, Mo., USA) dla wszystkich szczepów w Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej UCK w Gdańsku. W kolekcji zgromadzono 61 szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych z moczu pacjentów z grupy badanej (Tabela 7) oraz 36 szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych z moczu z grupy kontrolnej (Tabela 8).

Tabela 7. Kolekcja szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów z grupy badanej

Nr izolatu	Nr pacjenta	Nr dostępu w GenBank* (Nazwa szczepu/BioSample)	Rodzaj materiału	Data pobrania (msc/rok)	ESBL	Rodzaj ZUM**	Nawracające ZUM	Indukcja	CsA	Tac	ATG_ind	AZA	MMF	Encorton	Simulect	Syrolimus	EVR
1B	P1		mocz	03/2013	1	IV	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
2B	P2		mocz	04/2013	1	I	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
3B	P3		mocz	04/2013	0	II	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
4B	P4		mocz	05/2013	1	II	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
5B	P5		mocz	05/2013	1	I	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
6B	P6		mocz	06/2013	1	III	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
7B	P7		mocz	06/2013	1	II	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
8B	P8		mocz	06/2013	1	II	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1
9B	P9		mocz	07/2013	1	IV	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
10B	P3		mocz	07/2013	1	II	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
11B	P10		mocz	08/2013	1	I	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
12B	P11		mocz	08/2013	1	I	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
13B	P12		mocz	09/2013	1	III	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
14B	P13		mocz	09/2013	0	I	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
15B	P14		mocz	09/2013	0	I	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
16B	P15		mocz	10/2013	1	I	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
17B	P16		mocz	10/2013	1	I	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
18B	P16		mocz	10/2013	1	I	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
19B	P17		mocz	10/2013	1	I	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
20B	P18		mocz	11/2013	1	I	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
21B	P19		mocz	11/2013	1	II	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
22B	P20		mocz	11/2013	1	III	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
23B	P21		mocz	01/2014	1	II	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
24B	P22		mocz	01/2014	1	III	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
25B	P23		mocz	02/2014	1	III	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
26B	P5		mocz	02/2014	1	III	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0

Nr izolatu	Nr pacjenta	Nr dostępu w GenBank* (Nazwa szczepu/BioSample)	Rodzaj materiału	Data pobrania (msc/rok)	ESBL	Rodzaj ZUM**	Nawracające ZUM	Indukcja	CsA	Tac	ATG_ind	AZA	MMF	Encorton	Simulect	Syrolimus	EVR
27B	P24		mocz	02/2014	1	III	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
28B	P25		mocz	02/2014	1	III	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
29B	P26		mocz	02/2014	1	I	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
30B	P27		mocz	03/2014	0	II	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
31B	P28		mocz	05/2014	1	I	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
32B	P29		mocz	07/2014	1	I	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
33B	P30		mocz	08/2014	0	I	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
34B	P31		mocz	08/2014	1	I	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
35B	P32		mocz	09/2014	0	II	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
36B	P33		mocz	09/2014	1	III	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0
37B	P5		mocz	09/2014	1	IV	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1
38B	P34		mocz	12/2014	1	I	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
39B	P35		mocz	12/2014	0	III	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
40B	P36		mocz	12/2014	1	I	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
41B	P37		mocz	12/2014	1	I	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
42B	P38		mocz	11/2017	0	IV	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
43B	P39		mocz	12/2017	1	I	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
44B	P40		mocz	12/2017	1	IV	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
45B	P41		mocz	01/2018	1	III	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
46B	P42	ND24/SAMN17168601	mocz	01/2018	NDM	I	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
47B	P43		mocz	01/2018	0	I	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
48B	P44		mocz	01/2018	0	I	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
49B	P45	KP28873/SAMN14840029	mocz	02/2018	0	I	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
50B	P46	KP28872/SAMN14840028	mocz	03/2018	1	I	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
51B	P47		mocz	03/2018	1	I	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
52B	P47		mocz	03/2018	1	I	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
53B	P48	ND88/SAMN17168598	mocz	03/2018	NDM	I	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0

Nr izolatu	Nr pacjenta	Nr dostępu w GenBank* (Nazwa szczepu/BioSample)	Rodzaj materiału	Data pobrania (msc/rok)	ESBL	Rodzaj ZUM**	Nawracające ZUM	Indukcja	CsA	Tac	ATG_ind	AZA	MMF	Encorton	Simulect	Syrolimus	EVR
54B	P49		mocz	03/2018	1	I	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
55B	P50		mocz	04/2018	1	I	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
56B	P47		mocz	04/2018	0	III	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
57B	P51		mocz	07/2018	0	IV	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
58B	P23		mocz	07/2018	0	III	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
59B	P52		mocz	07/2018	1	I	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
60B	P53		mocz	07/2018	1	I	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
61B	P54		mocz	07/2018	1	II	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0

*Tylko dla zsekwenconowanych szczepów: **I – bezobjawowa bakterurgia (ABU), II – górne ZUM, III – dolne ZUM, IV – urosepsa; ESBL – szczepy *K. pneumoniae* zdolne do wytwarzania β -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania (1 – występowanie β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, 0 - brak); Inhibitory kalcyneury: CsA – cyklosporyna w schemacie immunosupresji, Tac – tacrolimus w schemacie immunosupresji; Przeciwciała poliklonalne: ATG – surowica antytymocytarna; Azatiopryna, MMF – mykofenolan mofetylu; Przeciwciała monoklonalne blokujące receptor dla interleukiny-2 (anty-IL-2R) – Simulect (bazyliksymab); Inhibitory sygnatu proliferacji: Syrolimus, EVR – Everolimus; ind – indukcja; 1 – obecność, 0 – brak.

Tabela 8. Kolekcja szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów z grupy kontrolnej

Nr izolatu	Nr pacjenta	Nr dostępu w GenBank* (Nazwa szczepu/BioSample)	Rodzaj materiału	Data pobrania (msc/rok)	ESBL
1K	P1		mocz	07/2013	0
2K	P2		mocz	08/2013	0
3K	P3		mocz	08/2013	1
4K	P4		mocz	09/2013	0
5K	P5		mocz	11/2013	1
6K	P6		mocz	12/2013	0
7K	P7		mocz	01/2014	1
8K	P8		mocz	02/2014	1
9K	P9		mocz	03/2014	1
10K	P10		mocz	07/2014	1
11K	P11		mocz	08/2014	0
12K	P12		mocz	09/2014	1
13K	P13		mocz	09/2014	1
14K	P14		mocz	01/2015	0
15K	P15		mocz	06/2015	1
16K	P16	ND32/SAMN17168599	mocz	05/2016	NDM
17K	P17		mocz	12/2017	0
18K	P18		mocz	12/2017	0
19K	P19		mocz	12/2017	1
20K	P20		mocz	01/2018	0
21K	P21		mocz	01/2018	0
22K	P22		mocz	01/2018	1
23K	P23		mocz	01/2018	1
24K	P24		mocz	02/2018	1
25K	P22		mocz	02/2018	1
26K	P25		mocz	03/2018	1
27K	P26		mocz	03/2018	1
28K	P27		mocz	03/2018	0
29K	P28		mocz	03/2018	0
30K	P29		mocz	03/2018	0
31K	P25		mocz	03/2018	1
32K	P30	ND96/SAMN17168597	mocz	04/2018	NDM
33K	P31	ND111/SAMN17168600	mocz	04/2018	NDM
34K	P32		mocz	04/2018	1
35K	P33		mocz	06/2018	0
36K	P34		mocz	07/2018	0

*Tylko dla zsekwencjonowanych szczepów; ESBL – szczepy *K. pneumoniae* zdolne do wytwarzania β -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania (1 – występowanie β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, 0 - brak)

W pracy wykorzystano również szczepy referencyjne pochodzące z kolekcji ATCC (ang. *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA), szczepy kliniczne wyizolowane z innego materiału niż mocz oraz szczep kliniczny wyizolowany z moczu pacjenta hospitalizowanego w innym szpitalu niż UCK, u którego zdiagnozowano ZUM (Tabela 9). Dodatkowo w pracy wykorzystano szczep referencyjny *Escherichia coli* 25922 z kolekcji ATCC zaliczany do szczepów uropatogennych.

Tabela 9. Szczepy referencyjne i dodatkowe szczepy kliniczne wykorzystane w pracy

Nr izolatu	Nr dostępu w GenBank* (Nazwa szczepu/BioSample)	Szczep	Kolekcja	Informacje dodatkowe
1R		<i>K. pneumoniae</i> 700603	ATCC	
2R		<i>K. pneumoniae</i> KPC	Gdański Uniwersytet Medyczny	
3R	ND33/SAMN17168602	<i>K. pneumoniae</i>	Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego	Wyizolowany z kału pacjenta z ZUM bez przeszczepu nerki, NDM (nr pacjenta P1R)

Nr izolatu	Nr dostępu w GenBank* (Nazwa szczepu/BioSample)	Szczep	Kolekcja	Informacje dodatkowe
4R	ND34/SAMN17168603	<i>K. pneumoniae</i>	Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego	Wyizolowany z kału pacjenta z ZUM po przeszczepie nerki z grupy badanej (nr pacjenta P48), NDM
5R	ND27/SAMN17168596	<i>K. pneumoniae</i> MBL	Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska	Wyizolowany z moczu pacjenta z ZUM, NDM (nr pacjenta P2R)
6R		<i>E. coli</i> 25922	ATCC	

*Tylko dla szczepów zsekwencjonowanych w ramach rozprawy; ATCC, ang. *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA; KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; MBL(NDM) - ang. *New Delhi metallo-β-lactamase*

5.1.3. Bufory

Bufory użyte w pracy oraz ich skład przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Bufory wykorzystane w pracy

Nazwa buforu	Skład
TE (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
TBE (pH 8,2) 1x stężony	89 mM Tris 89 mM kwas borowy 2 mM EDTA
Bufory stosowane do reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi	
R (Thermo Fisher Scientific) 10x stężony	10 mM Tris-HCl (pH 8,5) 10 mM MgCl ₂ 100 mM KCl 0,1 mg/ml BSA
Bufory stosowane do reakcji ligacji	
Bufor dla ligazy DNA faga T4 (Thermo Fisher Scientific) 10x stężony	400 mM Tris-HCl (pH 7,8) 100 mM MgCl ₂ 100 mM DTT 5 mM ATP
Bufory stosowane do reakcji PCR	
TaqNova H ₂ SO ₄ (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk, Polska) 10x stężony	100 mM Tris-HCl (pH 8,8) 500 mM H ₂ SO ₄ 0,8% (v/v) Nonidet P40
Shark (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk, Polska) 10x stężony	200 mM Tris-HCl 100 mM KCl 1% Triton X-100 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
MyTaq Reaction Buffer (Bioline Ltd.) 5x stężony	-
Bufor obciążający do nanoszenia próbek na żel	
6x GREEN (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk, Polska)	20 mM Tris-HCl (pH 7,6) 60 mM EDTA 0,15% orange G 0,03% cyjanol ksylenu FF 15% Ficoll 400

5.1.4. Enzymy

Enzymy użyte w pracy przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Enzymy wykorzystane w pracy

Nazwa enzymu	Stężenie	Optymalna temperatura [°C]	Bufor
Enzym do trawienia restrykcyjnego			
<i>Hind</i> III (Thermo Fisher Scientific)	10 U/μl	37	Bufor R 10x
<i>Hinf</i> I (Thermo Fisher Scientific)	10 U/μl	37	Bufor R 10x
Enzym do ligacji DNA			
Ligaza DNA bakteriofaga T4 (Thermo Fisher Scientific)	1 U/μl	18-22	Bufor dla ligazy DNA faga T4 10x

Nazwa enzymu	Stężenie	Optymalna temperatura [°C]	Bufor
Polimerazy DNA			
Polimeraza <i>Taq</i> (KBM i M, PG)	4 U/μl	72	Bufor <i>TaqNova</i> H ₂ SO ₄ 10x
Polimeraza <i>Pwo</i> (KBM i M, PG)	1 U/μl	72	Bufor <i>Shark</i> 10x
Polimeraza <i>Taq</i> (Bioline Ltd.)	5 U/μl	72	<i>MyTaq</i> Reaction Buffer 5x

5.1.5. Oligonukleotydy

Sekwencje oligonukleotydów wykorzystane w reakcji PCR przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Oligonukleotydy wykorzystane w pracy

Nazwa oligonukleotydu	Zastosowanie	Sekwencja oligonukleotydu (5'→3')	Stężenie wyjściowe [μM]	Referencje
Wykrywanie genu oporności <i>bla</i>_{NDM-1}				
<i>bla</i> _{NDM-1}	starter FORWARD	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	10	[192]
<i>bla</i> _{NDM-1}	starter REVERSE	CGGAATGGCTCATCACGATC	10	
Detekcja genów kodujących wybrane czynniki wirulencji				
<i>fimH-1 F</i>	starter FORWARD	CTGGTCGATGAACGCCTGGTC	10	[131]
<i>fimH-1 R</i>	starter REVERSE	GAGACATCGCAGCCGCCG	10	
<i>uge F</i>	starter FORWARD	TCTTCACGCCTTCCTCACT	10	[193]
<i>uge R</i>	starter REVERSE	CGGACTGGCAGATCCATATC	10	
<i>irp-2 F</i>	starter FORWARD	AAGGATTTCGCTGTTACCGGAC	10	[194]
<i>irp-2 R</i>	starter REVERSE	TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	10	
<i>kpn F</i>	starter FORWARD	GTATGACTCGGGGAAGATTA	10	[131]
<i>kpn R</i>	starter REVERSE	CAGAAGCAGCCACCACACG	10	
<i>mrkD F</i>	starter FORWARD	CCACCAACTATTCCCTCGAA	10	[195]
<i>mrkD R</i>	starter REVERSE	ATGGAACCCACATCGACATT	10	
<i>ycfM F</i>	starter FORWARD	ATCAGCAGTCGGGTCAGC	10	[131]
<i>ycfM R</i>	starter REVERSE	CTTCTCCAGCATTACGCG	10	
<i>entB F</i>	starter FORWARD	ATTTCCTCAACTCTGGGGC	10	[131]
<i>entB R</i>	starter REVERSE	AGCATCGGTGGCGGTGGTCA	10	
<i>iutA F</i>	starter FORWARD	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	10	[196]
<i>iutA R</i>	starter REVERSE	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	10	
<i>irp-1 F</i>	starter FORWARD	TGAATCGCGGTGTCTTATGC	10	[194]
<i>irp-1 R</i>	starter REVERSE	TCCCTCAATAAAGCCACGCT	10	
<i>fyuA F</i>	starter FORWARD	GCGACGGGAAGCGATGATTA	10	[194]
<i>fyuA R</i>	starter REVERSE	TAAATGCCAGGTCAGGTCACT	10	
<i>iroN F</i>	starter FORWARD	AAGTCAAAGCAGGGTTGCCCG	10	[196]
<i>iroN R</i>	starter REVERSE	GACGCCGACATTAAGACGCAG	10	
<i>rmpA F</i>	starter FORWARD	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	10	[197]
<i>rmpA R</i>	starter REVERSE	CTTGCATGAGCCATCTTTCA	10	
<i>magA F</i>	starter FORWARD	GGTGCTCTTTACATCATTGC	10	[197]
<i>magA R</i>	starter REVERSE	GCAATGGCCATTTGCGTTAG	10	
<i>hlyA F</i>	starter FORWARD	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	10	[196]
<i>hlyA R</i>	starter REVERSE	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	10	
<i>cnf-1 F</i>	starter FORWARD	AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG	10	[196]
<i>cnf-1 R</i>	starter REVERSE	CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT	10	
Test orientacji <i>fimbrii</i>				
<i>CAS168</i>	starter FORWARD	GGGACAGATACGCGTTTGAT	10	[137]
<i>CAS169</i>	starter REVERSE	GGCCTAACTGAACGGTTTGA	10	
Genotypowanie metodą PCR MP				
LigHind	oligonukleotyd ligowany adaptora	CTCACTCTACCAACGTCGAC	100	[198]
PomHind	oligonukleotyd pomocniczy adaptora	AGCTGTGACGTTGG	100	
stMPHind	starter	CTCACTCTACCAACGTCGACAGCTT	100	
qRT-PCR				
<i>fimA F</i>	starter FORWARD	GCACCGGATTGACAGC	10	
<i>fimA R</i>	starter REVERSE	CGAAGGTTGCGCCATCCAG	10	
<i>mrkA F</i>	starter FORWARD	CTGGCCGGCGCTACTGCTAAG	10	

Nazwa oligonukleotydu	Zastosowanie	Sekwencja oligonukleotydu (5'→3')	Stężenie wyjściowe [μM]	Referencje
<i>mrkA</i> R	starter REVERSE	CACCCGGGATGATTTTGTGG	10	
<i>entB</i> F	starter FORWARD	CGAGCGTTTAGCTCCATTC	10	[199]
<i>entB</i> R	starter REVERSE	CCTCTTTCATCGCCTGAGTC	10	
<i>iroB</i> F	starter FORWARD	TATACCGGTCGTGATGCAAA	10	[199]
<i>iroB</i> R	starter REVERSE	ATACTCGGCGGTGTTACGTC	10	
<i>irp2</i> F	starter FORWARD	TAAAACTGAAGCCGGGTCAC	10	[199]
<i>irp2</i> R	starter REVERSE	CCGTTGTGTCACCAGAAATG	10	
<i>iucA</i> F	starter FORWARD	GCATAGGCGGATACGAACAT	10	
<i>iucA</i> R	starter REVERSE	CACAGGGCAATTGCTTACCT	10	
<i>rpoB</i> F	starter FORWARD	TGATTAACCTCCCTGTCCGTGT	10	[200]
<i>rpoB</i> R	starter REVERSE	CGTAGTTGCCTTCTTCGATAGC	10	

5.1.6. Markery wielkości fragmentów DNA

Markery wielkości fragmentów DNA, które wykorzystano w pracy przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Markery wielkości DNA

Lp.	Rodzaj markera	Wielkości fragmentów [pz]
1	M 100-1000 (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk, Polska)	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000
2	M 50-500 (EUR _x Sp. z o.o., Gdańsk, Polska)	50, 100, 250, 400, 500
3	M 100-500 (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk, Polska)	100, 200, 300, 400, 500

5.1.7. Podłoża i pożywki hodowlane

- Mueller Hinton Agar (Sigma-Aldrich Sp. z o.o., Poznań, Polska)
- Mueller Hinton Broth (Sigma-Aldrich Sp. z o.o., Poznań, Polska)
- Mueller Hinton Broth II (Sigma-Aldrich Sp. z o.o., Poznań, Polska)
- Podłoże stałe LA (Sigma-Aldrich Sp. z o.o., Poznań, Polska)
- Pożywka płynna LB (Sigma-Aldrich Sp. z o.o., Poznań, Polska)

5.1.8. Pozostałe roztwory i odczynniki

- Agaroz (Sigma-Aldrich Sp. z o.o., Poznań, Polska)
- Agaroz HiRes Grade (Bioline Ltd.)
- Akryloamidy 30% (29 g akryloamidów, 1 g N,N'-metylenobisakryloamidów) (Sigma-Aldrich Sp. z o.o., Poznań, Polska)
- Nadsiarazan amonu – roztwór 10% (Sigma-Aldrich Sp. z o.o., Poznań, Polska)
- TEMED (N,N,N',N'-tetraetylenodiamina) (Sigma-Aldrich Sp. z o.o., Poznań, Polska)
- Bromek etydyny – roztwór 5 mg/ml (Sigma-Aldrich Sp. z o.o., Poznań, Polska)
- MgCl₂ – roztwór 50 mM (Bioline Ltd.)
- Trifosforany deoksyrybonukleozydów (dNTP) - roztwór 8 mM (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk, Polska)
- Woda jałowa (Polpharma S.A. Starogard Gdański, Polska)
- Etanol 96% (Sigma-Aldrich Sp. z o.o., Poznań, Polska)
- Rezasuryna (Sigma-Aldrich Sp. z o.o., Poznań, Polska)

5.1.9. Materiały podstawowe

- Probówki typu Eppendorf (0,5 ml i 1,5 ml)
- Probówki typu Eppendorf do reakcji PCR (0,2 ml)
- Końcówki do pipet automatycznych (10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l, 10 ml)
- Płytki titracyjne 96 dołkowe (MedLab-Products Sp. z o.o., Raszyn, Polska)
- Pokrywki do płytek titracyjnych (MedLab-Products Sp. z o.o., Raszyn, Polska)
- Jednorazowe płytki Petriego z agarem z krwią (VWR International Sp. z o.o., Gdańsk, Polska)
- Blok chłodzący
- Ezy jednorazowe
- Linijki jednorazowe
- Palnik Bunsena
- Cieplarka Nuve

5.1.10. Zestawy komercyjne

- Zestaw do izolacji genomowego DNA *Extractme Genomic DNA* (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk, Polska)
- Zestaw do izolacji plazmidów wysokokopijnych *Plasmid Mini* (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska, nr kat. 020-250)
- Zestaw do izolacji RNA *RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (RNAprotect Bacteria Reagent and RNeasy Mini Kit)* (Qiagen Polska Sp. z o.o., Wrocław, Polska, nr kat. 74524)
- Zestaw do usuwania resztek DNA *RNase-Free DNase Set* (Qiagen Polska Sp. z o.o., Wrocław, Polska, nr kat. 79254)
- Zestaw do syntezy pierwszej nici cDNA *TransScriba Kit* (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska, nr kat. 4000-100)
- Zestaw do przeprowadzenia reakcji real-time PCR *SsoAdvanced SYBR Green Supermix* (Bio-Rad Polska Sp. z o.o., Warszawa, Polska)

5.1.11. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- Pipety automatyczne (2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l, 1-5 ml) (Eppendorf Poland Sp. z o.o., Warszawa, Polska)
- Termoblok (Eppendorf Poland Sp. z o.o., Warszawa, Polska)
- Vortex WL-I
- Wirówka Sigma Typ 1-15 nr 86336
- Waga elektroniczna (AXIS Sp. z o.o. Gdańsk, Polska)
- Kuchenka mikrofalowa
- Termocykler gradientowy (Eppendorf Poland Sp. z o.o., Warszawa, Polska)
- Aparat do elektroforezy agarozowej (Delfin 1, DNA Gdańsk II S.C.)

- Aparat do elektroforezy poliakryloamidowej (Hoefer Scientific Instruments, SE400)
- NanoDrop100 ND-1000 (Thermo Fisher Scientific)
- Transiluminator (Spectraline Ultraviolet 312 nm UV)
- VersaDoc Imaging System Model 1000 (Bio-Rad)
- Zasilacz do elektroforezy (Electrophoresis Power Supply – EPS 601)
- Zasilacz do elektroforezy (Biometra Power Pack P25)
- Autoklaw (2100 Classis Prestige Medical)
- Komora laminarna - Thermoscientific MSC-ADVANTAGE

5.1.12. Programy komputerowe

- Quantity One wersja 4.3.1.
- FPQuest Software wersja 4.5 (BIO-RAD)
- Trimmomatic wersja 0.36
- SPAdes wersja 3.9.0
- Quast wersja 5.0.2
- RFplasmid
- Bazy danych dostępne na stronie “The Center for Genomic Epidemiology: ResFinder, VirulenceFinder, PlasmidFinder“ (<https://www.genomicepidemiology.org>)
- ABRicate
- Kaptive wersja 0.4.0
- Snp-dists wersja 0.6.3
- Snippy wersja 3.1
- SnpEff wersja 4.3t
- Prokka wersja 1.11
- Roary wersja 3.6.0
- Muscle wersja 3.8.31
- RAxML wersja 8.2.12
- ggtree R pakiet wersja 1.15.6
- rhierBAPS

5.2. Metody

5.2.1. Ocena wrażliwości *K. pneumoniae* na antybiotyki

Oznaczenie profilu antybiotykooporności zostało przeprowadzone za pomocą rutynowo stosowanej metody laboratoryjnej za pomocą systemu Vitek2 (bioMerieux, Hazelwood, Mo., USA) dla wszystkich zgromadzonych szczepów w Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Interpretację wyników badań lekooporności przeprowadzono zgodnie z aktualnymi zaleceniami CLSI 2019 (ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) oraz EUCAST v.10 2020 (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

Zdolność *K. pneumoniae* do wytwarzania β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym typu ESBL zostało przeprowadzone za pomocą E-testów (bioMerieux, Hazelwood, Mo., USA) dla wszystkich zgromadzonych szczepów w Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Wiarygodność otrzymanych wyników potwierdzono stosując szczep referencyjny *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 wytwarzający ESBL oraz szczep *Escherichia coli* ATCC 25922 nie wytwarzający enzymów typu ESBL. Wykrycie karbapenemazy potwierdzono metodą enzymatyczną - testem β CARBA (Bio-Rad Polska Sp. z o.o., Warszawa, Polska).

5.2.2. Określanie fenotypu hiper mukoidalnego

Badania w kierunku wykrycia szczepów *K. pneumoniae* posiadających zdolność do tworzenia fenotypu hiper mukoidalnego (HM, ang. *hypermucoviscosity*), które są zaliczane do wysoce zjadliwych, zostały wykonane za pomocą testu ciągliwości (ang. *String Test*). Pozytywny wynik testu ciągliwości zdefiniowany jest jako tworzenie lepkich łańcuchów o długości 5 mm lub więcej (rozciągnięcie kolonii na płycie agarowej).

Test ciągliwości wykonano według poniższych etapów dla wszystkich szczepów z kolekcji, zarówno z grupy badanej, jak i grupy kontrolnej:

- Bakterie hodowano na agarze z krwią (Bio-Rad Polska Sp. z o.o., Warszawa, Polska) w temperaturze 37°C z wytrząsaniem przez 18-20 godzin w warunkach tlenowych.
- Wyhodowano błyszczące, kremowo zabarwione kolonie *Klebsiella pneumoniae*.
- Za pomocą ezy pobierano kolonię i rozciągano.
- Obserwowano tworzenie się śluzowatego łańcucha, tzw. 'sznurka'.
- Mierzono długości łańcucha jednorazową linijką.

5.2.3. Izolacja DNA

Izolację genomowego DNA przeprowadzono za pomocą zestawu *Extractme Genomic DNA* (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk, Polska), zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. Elucję DNA przeprowadzono stosując 70 μ l buforu elucyjnego ogrzanego do temperatury 70°C. Plazmidowe DNA wyizolowano z użyciem zestawu *Plasmid Mini* (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Pomiary stężenia DNA w próbach wykonano za pomocą spektrofotometru NanoDrop100. Uzyskano stężenie DNA w zakresie od 10 do 100 ng/ μ l.

5.2.4. Wykrywanie obecności genu *bla*_{NDM-1} związanego z opornością na karbapenemy

Obecność genu *bla*_{NDM-1} została potwierdzona techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. *Polymerase Chain Reaction*) dla wszystkich szczepów klinicznych z grupy badanej i kontrolnej. Amplifikacja została przeprowadzona z wykorzystaniem par specyficznych starterów komplementarnych do fragmentów genu *bla*_{NDM-1}; spodziewana wielkość produktu to 621 par zasad. Sekwencje starterów oraz skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo-czasowy reakcji przedstawiono kolejno w tabeli 12 i 14.

Po zakończeniu reakcji polimeryzacji próbki poddano elektroforezie w żelu agarozowym 2,5% z dodatkiem bromku etydyny, w buforze 0,5xTBE w czasie 45 min przy napięciu 100 V w celu wykrycia produktu amplifikacji genu *bla*_{NDM-1}. Żel analizowano w świetle UV z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli VersaDoc Imaging System Model 1000 oraz oprogramowania Quantity One 4.3.1.

Tabela 14. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy w reakcji PCR wykrywania obecności genu *bla*_{NDM-1}

Skład mieszaniny reakcyjnej		Profil temperaturowo-czasowy			
Skład	Objętość [μl]	Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Woda jałowa	16,0	Wstępna denaturacja	94	60	1
Bufor <i>Taq</i> Nova H ₂ SO ₄ 10x	2,5	Denaturacja	94	30	30
MgCl ₂ [50 mM]	1,0	Przyłączenie starterów	51,5	30	
dNTPs [8 mM]	2,0	Elongacja	72	30-60	
Stater FORWARD [10 μM]	1,0	Wydłużanie końcowe	72	60	1
Starter REVERSE [10 μM]	1,0	Chłodzenie	10	∞	1
Polimeraza <i>Taq</i> 2 U/μl	0,5				
Matryca DNA	1,0				
Σ	25,0				

5.2.5. Typowanie genetyczne szczepów z zastosowaniem metody PCR MP

W celu ustalenia pokrewieństwa genetycznego szczepów klinicznych *K. pneumoniae* z grupy badanej, wykorzystano technikę typowania genetycznego PCR MP (ang. *Melting Profile PCR*). Te same profile genetyczne (wzory genotypowe *K. pneumoniae*) zostały dodatkowo potwierdzone w gradiencie temperatury denaturacji PCR MP. Z wykorzystaniem tej metody przeprowadzono również analizę klonalnego pokrewieństwa szczepów produkujących karbapenemazy typu NDM-1.

Metoda PCR MP należy do grupy technik LM PCR (ang. *Ligation Mediated PCR*) opartych o ligację adaptorów oligonukleotydowych [199]. Metoda ta składa się z trzech etapów: trawienia genomowego DNA enzymem restrykcyjnym, ligacji adaptoru oligonukleotydowego do powstałych końców fragmentów restrykcyjnych, pre-PCR i właściwej reakcji PCR.

Przygotowanie adaptoru do reakcji ligacji

Adaptor do reakcji ligacji otrzymano na drodze hybrydyzacji dwóch komplementarnych oligonukleotydów: ligowanego (*LigHind*) oraz pomocniczego (*PomHind*). Roztwory podstawowe o wyjściowym stężeniu 100 pmol/μl rozcieńczano w wodzie jałowej tak, aby uzyskać w mieszaninie reakcyjnej po 10 pM każdego z oligonukleotydów. Mieszaninę inkubowano w 70°C przez 2 minuty a następnie chłodzono w temperaturze pokojowej przez 10 min. W celu dalszych analiz adaptor przechowywano w temperaturze -20°C.

Trawienie enzymatyczne genomowego DNA

W 1,5 ml próbownicy typu Eppendorf przygotowano mieszaninę reakcyjną do reakcji trawienia restrykcyjnego (Tabela 15). Mieszaninę rozporcjowano po 15 µl do 0,5 ml próbowek typu Eppendorf i dodano do każdej próbówki po 10 µl genomowego DNA. Reakcja trawienia prowadzona była w termobloku w temperaturze 37°C przez 45 min. Inaktywacja enzymu została przeprowadzona poprzez podgrzanie próbki w 70°C przez 10 minut.

Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji trawienia restrykcyjnego w metodzie PCR MP

Skład	Objętość na 1 próbę [µl]
Woda jałowa	12,0
Bufor R 10x	2,5
HindIII 10 U/µl	0,5
Genomowe DNA	10,0
Σ	25,0

Reakcja ligacji adaptora

W 1,5 ml próbownicy typu Eppendorf przygotowano mieszaninę reakcyjną do reakcji ligacji (Tabela 16). Po dokładnym wymieszaniu, mieszaninę rozporcjowano po 5,5 µl do próbowek zawierających produkty trawienia enzymatycznego. Reakcja ligacji z fragmentami restrykcyjnymi prowadzona była w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Inaktywacja termiczna ligazy DNA prowadzona była w termobloku w temperaturze 75°C przez 10 min.

Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji ligacji w metodzie PCR MP

Skład	Objętość na 1 próbę [µl]
Bufor dla ligazy faga T4 z ATP 10x	3,0
Adaptor adMPHind	1,5
Ligaza DNA faga T4 2 U/µl	1,0
Σ	5,5

Reakcja PCR MP

W 1,5 ml próbownicy typu Eppendorf przygotowano mieszaninę reakcyjną do reakcji PCR zawierającą wszystkie składniki, za wyjątkiem mieszaniny poligacyjnej (Tabela 17). Po dokładnym wymieszaniu, mieszaninę rozporcjowano po 23 µl do próbowek typu Eppendorf do reakcji PCR (0,2 ml). Następnie do każdej próbówki dodano po 2 µl mieszaniny poligacyjnej. Reakcja amplifikacji prowadzona była w termocyklerze zgodnie z profilem temperaturowo-czasowym przedstawionym w tabeli 17. W celu ustalenia optymalnej temperatury denaturacji, zastosowano gradient temperatury denaturacji w reakcji PCR w zakresie temperatur 83,1-88,9°C (Tabela 18).

Tabela 17. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy w reakcji PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej		Profil temperaturowo-czasowy		
Skład	Objętość [µl]	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Woda jałowa	16,1			
Bufor <i>Taq</i> Nova H ₂ SO ₄ 10x	2,5	72	240	1
dNTPs [8 mM]	2,5	83,1-88,9*	60	1
MgCl ₂ [50 mM]	1,25	83,1-88,9*	30	22
Starter stMPHind [100 µM]	0,25	72	90	22
Polimeraza DNA <i>Taq</i> 2 U/µl	0,4	72	300	1
Mieszanina poligacyjna	2,0	4	∞	1
Σ	25,0			

* Patrz: Tabela 18. Gradient temperatury denaturacji w reakcji PCR

Tabela 18. Gradient temperatury denaturacji w reakcji PCR

Nr celki	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Temperatura [°C]	83,1	83,2	83,6	84,1	84,8	85,6	86,4	87,2	87,9	88,5	88,9

Rozdział elektroforetyczny DNA w żelu poliakryloamidowym i detekcja produktów PCR

Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR prowadzono w 6% żelu poliakryloamidowym w schłodzonym buforze 0,5xTBE przy napięciu ok. 12 V/cm długości żelu, w aparacie Hoeffer'a. Do studzienek nanoszono 8 µl mieszaniny poreakcyjnej wymieszanej z 2 µl buforu obciążającego DNA (Tabela 11). Po zakończeniu elektroforezy, żel wybarwiano przez 30 min w buforze z dodatkiem bromku etydyny i analizowano w świetle UV z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli VersaDoc Imaging System Model 1000 oraz oprogramowania Quantity One wersja 4.3.1.

Analiza porównawcza profili elektroforetycznych DNA

Porównanie profili elektroforetycznych zostało wykonane metodami statystycznymi zajmującymi się analizą skupień, które umożliwiają klasteryzację szczepów na podstawie zestawu cech (np. obecność/brak produktu PCR o danej długości w profilu elektroforetycznym). Zastosowano metodę UPGMA (ang. *unweighted pair-group method with arithmetic averages*) oraz oprogramowanie MVSP wersja 3.22 (KCS - Kovach Computing Services). Stopień podobieństwa genetycznego badanych szczepów przedstawiono w postaci dendrogramu, a za poziom identyczności (P_i) przyjęto 96% w przypadku analizy podobieństwa szczepów produkujących karbapenemazy typu NDM-1 oraz 98% w przypadku szczepów klinicznych *K. pneumoniae* z grupy badanej. Oznacza to, że szczepy, których profil elektroforetyczny jest odpowiednio w co najmniej 96% lub 98% identyczny można uznać za posiadające ten sam genotyp lub odpowiednio podgenotyp.

5.2.6. Wykrywanie obecności genów kodujących wybrane czynniki wirulencji *K. pneumoniae* metodą PCR

Badanie profilu wirulencji w oparciu o amplifikację genów kodujących potencjalne czynniki wirulencji: adhezyny (*fimH-1*, *mrkD*, *kpn*, *ycfM*), siderofory (*entB*: enterobaktyna, *iutA*: aerobaktyna, *irp-1*, *irp-2*, *ybtS*, *fyuA*: yersiniabaktyna, *iroN*: receptor katecholowy), protektyny/inwazyjny (*rmpA*, *magA*) i endotoksyny (*hlyA*, *cnf-1*) oraz gen *uge*, zostało wykonane techniką PCR dla wszystkich szczepów klinicznych z grupy badanej i kontrolnej. Amplifikacja została przeprowadzona z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji nukleotydowych genów zdeponowanych w bazach National Center for Biotechnology Information (NCBI) oraz starterów publikacyjnych (Tabela 12). Dwa układy złożonych reakcji PCR (multiplex PCR) zastosowano do wykrywania sześciu genów wirulencji: układ I dla genów: *uge*, *fimH-1*, *irp-2*; układ II dla genów: *kpn*, *mrkD*, *ycfM*. Pozostałe geny, tj. *entB*, *iutA*, *irp-1*, *ybtS*, *fyuA*, *iroN*, *rmpA*, *magA*, *hlyA*, *cnf-1* wykryto stosując prosty układ tzw. simplex PCR. Krótką charakterystykę czynników wirulencji zaprezentowano w tabeli 19.

Tabela 19. Charakterystyka wybranych czynników wirulencji i produktów PCR

Gen	Funkcja	Temperatura przyłączenia starterów [°C]	Wielkość produktu PCR [pz]
Multiplex I			
<i>fimH-1</i>	Gen kodujący podjednostkę adhezyny specyficznej dla mannozy fimbrii typu 1. Fimbrie typu 1, a w szczególności podjednostka adhezyjna FimH, odgrywają ważną rolę w ZUM wywołanym przez <i>K. pneumoniae</i> i biorą udział w tworzeniu biofilmu	61,4	688
<i>uge</i>	Gen kodujący 4-epimerazę difosforanu urydyny galakturonianu niezbędny do syntezy otoczek i lipopolisacharydu		534
<i>irp-2</i>	Siderofor - wspomaga tworzenie biofilmu w warunkach ubożonych w żelazo		287
Multiplex II			
<i>kpn</i>	FimH-like adhezyna	58,2	626
<i>mrkD</i>	Fimbrie typu 3 są odpowiedzialne za przyleganie do komórek nabłonkowych dróg moczowo-płciowych i odgrywają ważną rolę w pierwszym etapie tworzenia biofilmu		240
<i>ycfM</i>	Lipoproteina błony zewnętrznej		160
Simplex PCR			
<i>entB</i>	Gen biosyntezy enterobakteryjnego sideroforu (katecholanowego sideroforu); wspomaga rozwój i dojrzewanie biofilmu	57	371
<i>iutA</i>	Gen receptora dla aerobakteryjnego sideroforu	63	300
<i>irp-1</i>	Gen biosyntezy yersyniobakteryjnego sideroforu fenolanowego	57	238
<i>fyuA</i>	Gen receptora dla yersyniobakteryjnego sideroforu	56	547
<i>iroN</i>	Gen receptora dla salmocheliny	63	665
<i>rmpA</i>	Regulator fenotypu śluzowatego A	57	535
<i>magA</i>	Gen A związany z mukowiskowatością	59	1282
<i>hlyA</i>	α -hemolizyna, toksyna cytolityczna powodująca hemolizę krwi	63	1177
<i>cnf-1</i>	Cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący -1, powoduje konstytutywną aktywację GTPaz zmieniających cytoskielet aktywny komórki gospodarza i promuje inwazję bakterii	56	498

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej PCR

Amplifikacja fragmentów genów w układach simplex PCR

Celem dobrania optymalnej temperatury przyłączenia starterów w reakcji PCR, zastosowano gradient temperatury przyłączenia starterów dla wszystkich badanych genów. W 0,2 ml próbkach przygotowywano mieszaninę reakcyjną zawierającą składniki w objętościach podanych w tabeli 20. W zależności od amplifikowanej sekwencji dodawano odpowiednią parę starterów (Tabela 12). Każdorazowo przygotowywano również mieszaninę reakcyjną bez dodatku matrycy DNA, pełniącą rolę kontroli ujemnej. Następnie prowadzono reakcję PCR o profilu temperaturowo-czasowym przedstawionym w tabeli 20.

Tabela 20. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy w reakcji simplex PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej		Profil temperaturowo-czasowy			
Skład	Objętość [μ l]	Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Woda jałowa	16,0	Wstępna denaturacja	94	60	1
Bufor <i>Taq</i> Nova H ₂ SO ₄ 10x	2,5	Denaturacja	94	30	30
MgCl ₂ [50 mM]	1,0	Przyłączenie starterów	51,5-63*	30	
dNTPs [8 mM]	2,0	Elongacja	72	30-60	
Starter FORWARD [10 μ M]	1,0	Wydłużanie końcowe	72	60	1
Starter REVERSE [10 μ M]	1,0	Chłodzenie	10	∞	1
Polimeraza <i>Taq</i> 2 U/ μ l	0,5				
Matryca DNA	1,0				
Σ	25,0				

*-temperatura przyłączenia dla poszczególnych starterów została przedstawiona w tabeli 19

Amplifikacja fragmentów genów w układach multiplex PCR

Z zastosowaniem techniki multiplex PCR, amplifikacji poddano fragmenty wybranych sześciu genów: *uge*, *fimH-1*, *cnf-1*, *irp-2*, *kpn*, *ycfM* podzielonych na dwa układy po trzy czynniki wirulencji (Tabela 19). Wybór układów był podyktowany różnicą w długości produktów. W 0,2 ml probówkach przygotowywano mieszaninę reakcyjną zawierającą składniki w objętościach podanych w tabeli 21. W zależności od amplifikowanej sekwencji dodawano odpowiednią parę starterów (Tabela 12). Każdorazowo przygotowywano również mieszaninę reakcyjną bez dodatku matrycy DNA, pełniącą rolę kontroli ujemnej. Następnie prowadzono reakcję PCR o profilu temperaturowo-czasowym przedstawionym w tabeli 21.

Tabela 21. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy w reakcji multiplex PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej		Profil temperaturowo-czasowy			
Skład	Objętość [μl]	Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Woda jałowa	12,0	Wstępna denaturacja	94	60	1
Bufor TaqNova H ₂ SO ₄ 10x	2,5	Denaturacja	94	30	30
MgCl ₂ [50 mM]	1,0	Przyłączenie starterów	58,2-61,4*	30	
dNTPs [8 mM]	2,0	Elongacja	72	30-60	
Stater FORWARD [10 μM]	3,0	Wydłużanie końcowe	72	60	1
Starter REVERSE [10 μM]	3,0	Chłodzenie	10	∞	1
Polimeraza Taq 2 U/μl	0,5				
Matryca DNA	1,0				
Σ	25,0				

*-temperatura przyłączania dla poszczególnych starterów została przedstawiona w tabeli 19

Rozdział elektroforetyczny DNA w żelu agarozowym

5 μl mieszaniny poreakcyjnej zawierającej DNA wymieszanej z 2 μl buforu obciążającego rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny, w buforze 0,5xTBE w czasie 45 min przy napięciu 100 V. Rozdział produktów PCR przeprowadzano w 1-2,5% żelu agarozowym w zależności od wielkości oczekiwanych produktów. Żel analizowano w świetle UV z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli VersaDoc Imaging System Model 1000 oraz oprogramowania Quantity One wersja 4.3.1.

5.2.7. Badanie wpływu leków immunosupresyjnych na szczepy *K. pneumoniae*

5.2.7.1. Ocena wpływu leków immunosupresyjnych na wzrost komórek bakteryjnych

Badanie wpływu leków immunosupresyjnych na wzrost bakterii i ich przeżywalność przeprowadzono metodą mikrorozcieńczeń oznaczając wartość MIC dla wszystkich 36 klinicznych izolatów *K. pneumoniae* z grupy kontrolnej. Następnie dla pięciu wybranych izolatów oraz dla jednego szczepu referencyjnego *K. pneumoniae* ATCC 700603 prowadzone były hodowle bez i w obecności inhibitorów kalcyneuryny (cyklosporyna, tacrolimus) oraz wykreślono krzywe ich wzrostu. Sprawdzone zarówno krótkotrwałą, jak i długotrwałą ekspozycję na działanie immunosupresantów. Do badań wybrano zróżnicowaną grupę pięciu izolatów, które zostały przedstawione w tabeli 22. Izolaty zostały wybrane po uzyskaniu wyników lekowrażliwości, wykryciu ESBL oraz określeniu fenotypu hipermukoidalnego. Badania były prowadzone na szczepach z grupy kontrolnej, ponieważ nie były one poddane wcześniej żadnym manipulacjom, tj. były wyizolowane od pacjentów, którzy nie otrzymywali leków immunosupresyjnych.

Ocena wrażliwości izolatów *K. pneumoniae* na leki immunosupresyjne metodą mikrorozcieńczeń

Do badań wrażliwości wszystkich izolatów *K. pneumoniae* z grupy kontrolnej na leki immunosupresyjne zastosowano metodykę Europejskiego Komitetu do spraw Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST, ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) opisaną w dokumencie E. Dis 5.1 [201]. Jako referencji użyto szczepy *Escherichia coli* ATCC 25922 oraz *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700608, a także antybiotyki: kanamycyna (Sigma-Aldrich Sp. z o.o.), chloramfenikol (Sigma-Aldrich Sp. z o.o.) oraz tetracyklina (Sigma-Aldrich Sp. z o.o.).

Inokulum bakterii było przygotowywane zgodnie z procedurą opisaną w dokumencie E. Dis 5.1 EUCAST. W celkach 96 dołkowych płytek titracyjnych przygotowano serię dwukrotnych rozcieńczeń badanych leków immunosupresyjnych - za wyjątkiem celek dla kontroli ujemnej i kontroli dodatniej. Następnie do każdej z celek płytki titracyjnej, zawierającej malejące stężenia leków immunosupresyjnych przenoszono po 100 µl inokulum. W ten sposób stężenia leków immunosupresyjnych zostały rozcieńczone w stosunku 1:1 i uzyskano zakres badanych stężeń leków immunosupresyjnych w przygotowanych płytkach titracyjnych od 0,008 µg/ml do 16 µg/ml. Dla każdego izolatu oznaczenie zostało wykonane w trzech powtórzeniach.

Tak przygotowane płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 18-22 godziny. Odczyt wyników odbywał się wizualnie zgodnie z wytycznymi EUCAST oraz z wykorzystaniem czytnika mikropłytek przy długości fali 600 nm. Aktywność immunosupresantów wobec bakterii została przebadana również z użyciem rezazuryny jako indykatora wzrostu komórek. Po pierwszym odczycie absorbancji do wszystkich studzienek dodawano po 10 µl 0,01% roztworu wodnego rezazuryny. Próby inkubowano w ciemności w temperaturze 37°C przez 2 godziny i dokonywano kolejnego pomiaru absorbancji oraz oceny wizualnej powstałej barwy. Dla każdego izolatu oznaczenie lekowrażliwości określone było w trzech powtórzeniach.

Wyznaczanie krzywych wzrostu bakterii pod wpływem leków immunosupresyjnych

Ocena wpływu leków immunosupresyjnych (cyklosporyna/tacrolimus) na kinetykę wzrostu bakterii została przeprowadzona z wykorzystaniem metody makrorozcieńczeń. Na przygotowane podłoża LB zawierające stężenia terapeutyczne leków immunosupresyjnych, wynoszące 10 µg/l (0,01 µg/ml) oraz 200 µg/l (0,2 µg/ml), odpowiednio dla tacrolimusu i cyklosporyny, posiano wybrane izolaty *K. pneumoniae* (Tabela 22). Hodowle prowadzono przez 18-20 h w temperaturze 37°C. Następnie izolaty pasażowano na kolejne podłoża LB z odpowiednim stężeniem terapeutycznym danego leku. W taki sposób izolaty pasażowane były 14-krotnie. Eksperyment został również przeprowadzony na podłożu LB bez leków immunosupresyjnych. W ciągu trwania eksperymentu, trzy razy oznaczono krzywą wzrostu bakterii, bez i w obecności leków immunosupresyjnych: po pierwszym pasażu, po siódmym pasażu oraz po czternastym pasażu.

Krzywe wzrostu bakterii wyznaczano jako zależność gęstości optycznej (OD, ang. *optical density*) hodowli bakteryjnej od czasu hodowli. Pomiar OD przeprowadzano na spektrofotometrze Spectronic 20 Genesis przy długości fali 600 nm. Przed zaszczepieniem podłoża dokonywano pomiaru gęstości optycznej inokulum dla każdego z badanych szczepów po to, aby w kolejnych próbach kontrolować wielkość wsiewu. Pomiaru OD_{600nm} dokonywano w 0, 2, 4, 6, 24 i 48 godzinie hodowli. Jako próbę odniesienia zastosowano czystą pożywkę.

Do badania krzywej wzrostu wybrano 5 szczepów bakterii *K. pneumoniae*: dwa szczepy wytwarzające β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym – ESBL+ i trzy szczepy negatywne pod względem ESBL-, z czego jeden wykazujący pozytywny wynik w teście ciągliwości (Tabela 22).

Tabela 22. Charakterystyka szczepów wybranych do badania kinetyki wzrostu

Nr izolatu	Rodzaj próbki	ESBL	Fenotyp HM
1K	mocz	0	0
5K	mocz	1	0
13K	mocz	1	0
14K	mocz	0	0
36K	mocz	0	1

ESBL (1 – występowanie β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania, 0 - brak); Fenotyp HM (1 – obecność, 0 - brak)

5.2.7.2. Badanie ekspresji fimbrii typu 1 w różnych warunkach wzrostu *K. pneumoniae*

W niniejszej rozprawie doktorskiej, podjęto się oceny wpływu różnych warunków wzrostu na ekspresję fimbrii typu 1 wśród klinicznych izolatów *K. pneumoniae*. Do badania ekspresji fimbrii typu 1 wśród szczepów klinicznych *K. pneumoniae* wykorzystano dwa niezależne testy: test oparty o PCR-RFLP oraz test aglutynacji komórek drożdży.

Badanie zmienności fazowej fimbrii typu I z zastosowaniem PCR-RFLP

Test PCR-RFLP posłużył do określenia orientacji przełącznika fazowego *fim* bakterii *K. pneumoniae* w celu ustalenia zmienności fazowej fimbrii podczas hodowli bakterii w pożywce płynnej, na podłożu stałym oraz w obecności leków immunosupresyjnych.

A. Hodowla izolatów *K. pneumoniae*

W celu zbadania zmienności fazowej przełącznika *fim* bakterii *K. pneumoniae* w różnych warunkach wzrostu, trzy izolaty kliniczne *K. pneumoniae* (Tabela 22, numer 1K, 5K, 13K) każde z osobna hodowano na podłożu stałym LA oraz na pożywce płynnej LB w dwóch wariantach: statycznie i z wytrząsaniem (200 rpm). Hodowle były prowadzone w temperaturze 37°C. Porównano orientację przełącznika *fim* w fazie wykładniczej i stacjonarnej hodowli. W celu zbadania, czy przedłużony wzrost może zmienić położenie przełącznika *fim*, doświadczenie prowadzono również w hodowlach, które pasażowano czterokrotnie i w hodowlach 96 godzinnych.

W celu zbadania heterogeniczności ekspresji fimbrii typu 1 wśród szczepów klinicznych *K. pneumoniae*, wszystkie 61 szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów z grupy badanej oraz 36 szczepów *K. pneumoniae* z grupy kontrolnej hodowano na pożywce płynnej LB z wytrząsaniem (200 rpm). Hodowla była prowadzona w temperaturze 37°C przez 18-20 godzin. Warunki hodowli zostały dobrane na podstawie wyników doświadczenia wpływu różnych warunków wzrostu na ekspresję fimbrii typu 1.

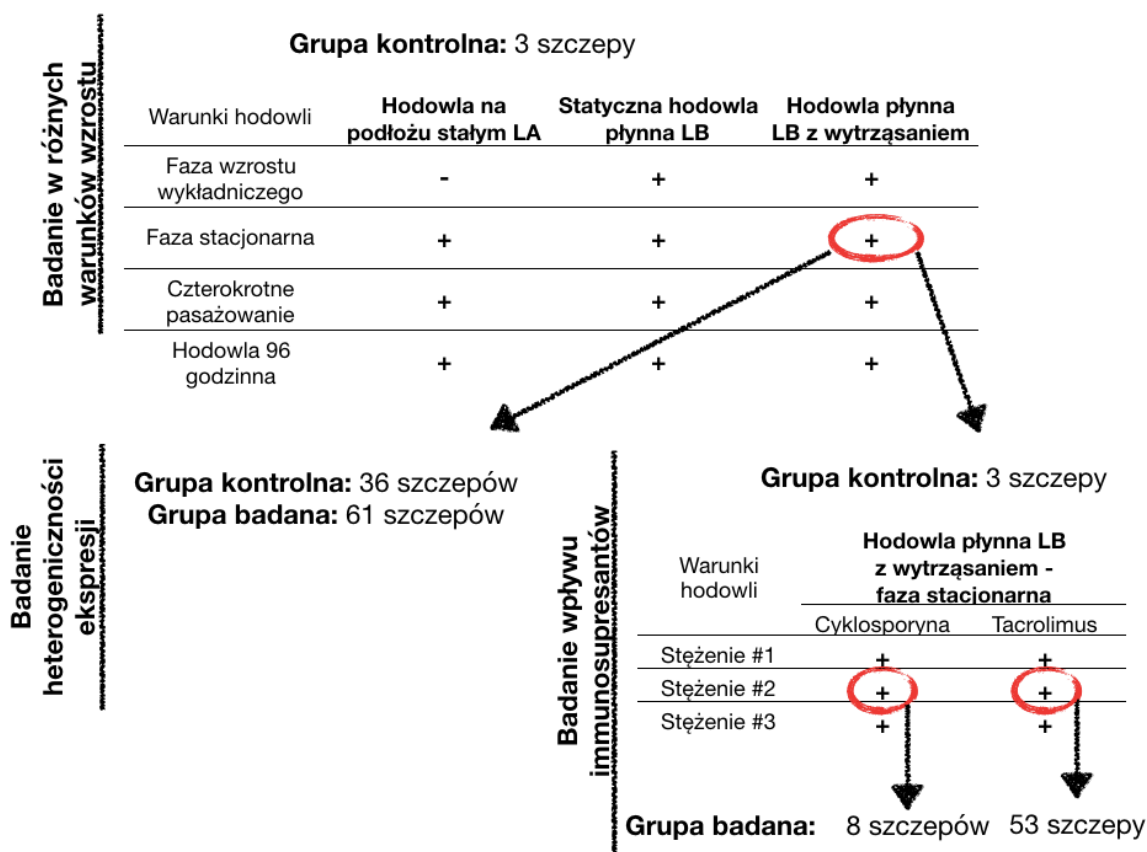
W celu zbadania zmienności fazowej przełącznika *fim* bakterii *K. pneumoniae* pod wpływem ekspozycji na leki immunosupresyjne (cyklosporyna i tacrolimus), trzy izolaty kliniczne *K. pneumoniae* z grupy kontrolnej (Tabela 22, numer 1K, 5K, 13K) posiano z osobna na pożywkę LB z dodatkiem leków immunosupresyjnych w stężeniach podanych w tabeli 23. Hodowle były prowadzone na pożywce płynnej LB z wytrząsaniem (200 rpm) w temperaturze 37°C przez 18-20 godzin. Warunki hodowli zostały dobrane na podstawie wyników doświadczenia wpływu różnych warunków wzrostu na ekspresję fimbrii typu 1.

Tabela 23. Stężenia leków immunosupresyjnych używane do badań zmienności fazowej przełącznika fim bakterii *K. pneumoniae*

Lek immunosupresyjny	Stężenie leku immunosupresyjnego [µg/l]			
	Kontrola	Stężenie #1	Stężenie #2	Stężenie #3
Cyklosporyna	0	100	200	600
Tacrolimus	0	5	10	30

Dodatkowo, w toku badań postanowiono sprawdzić wpływ ekspozycji wszystkich 61 izolatów *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów z grupy badanej na immunosupresanty. Każdy izolat pasażowano 1x na pożywkę LB z dodatkiem leku immunosupresyjnego. 8 szczepów wyizolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki przyjmujących cyklosporynę, przesiano na podłoża z dodatkiem cyklosporyny o stężeniu terapeutycznym (200 µg/l). 53 szczepy wyizolowane od pacjentów po przeszczepie nerki przyjmujących tacrolimus, przesiano na podłoża z dodatkiem tacrolimusu o stężeniu terapeutycznym (10 µg/l). Hodowla była prowadzona na pożywce płynnej LB z wytrząsaniem (200 rpm) w temperaturze 37°C przez 18-20 godzin. Warunki hodowli zostały dobrane na podstawie wyników doświadczenia wpływu różnych warunków wzrostu na ekspresję fimbrii typu 1.

Eksperymentalny przebieg pracy zaprezentowano na rysunku 7.



Rysunek 7. Eksperymentalny przebieg pracy w badaniu ekspresji genów fimbrii typu 1 w różnych warunkach wzrostu *K. pneumoniae*

B. Izolacja DNA

Izolację DNA dla wszystkich wariantów doświadczenia przeprowadzono za pomocą zestawu Extractme Genomic DNA (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk, Polska), zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. Elucję DNA przeprowadzono stosując 70 μ l buforu elucyjnego ogrzanego do temperatury 70°C. Pomiaru stężenia DNA wykonano za pomocą spektrofotometru NanoDrop100. Uzyskano stężenie DNA w zakresie od 10 do 100 ng/ μ l w zależności od próbki.

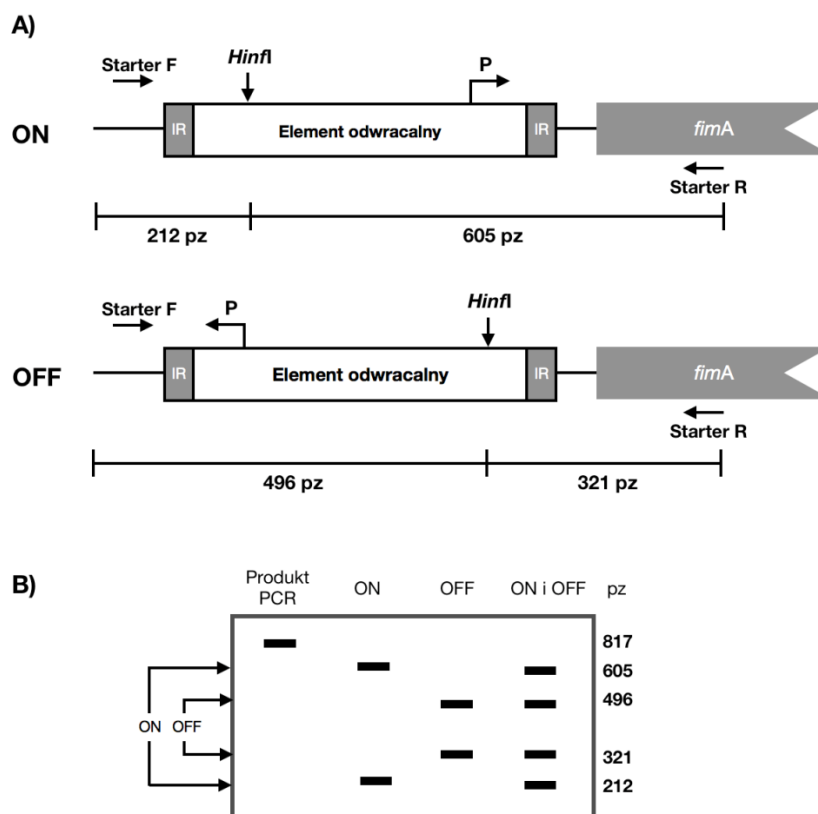
C. Test zmienności fazowej fimbrii

Ekspresja fimbrii typu 1 *K. pneumoniae* jest regulowana przez odwracalny element DNA (przełącznik fazowy) zawierający promotor (P) głównego genu kodującego podjednostkę fimbrialną, *fimA*. Orientację przełącznika fazy, określono przez amplifikację PCR regionu przełącznika, a następnie trawienie amplikonu za pomocą enzymu restrykcyjnego *HinI*. Do amplifikacji regionu o długości 817 pz zawierającego element odwracalny (przełącznik) zastosowano startery CAS168 i CAS169 (Tabela 12) [137]. W 0,2 ml probówkach przygotowywano mieszaninę reakcyjną. Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby a także profil temperaturowo-czasowy podano w tabeli 24. Każdorazowo przygotowywano również mieszaninę reakcyjną bez dodatku matrycy DNA, pełniącą rolę kontroli ujemnej.

Tabela 24. Skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo-czasowy w reakcji PCR w badaniu ekspresji fimbrii typu 1 z zastosowaniem metody PCR-RFLP

Skład mieszaniny reakcyjnej		Profil temperaturowo-czasowy			
Skład	Objętość [μ l]	Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Woda jałowa	11,9	Wstępna denaturacja	94	120	1
Bufor <i>TaqNova</i> H ₂ SO ₄ 10x	2,5	Denaturacja	94	15	30
MgCl ₂ [50 mM]	1	Przyłączenie starterów	52	60	
dNTPs [8 mM]	2,5	Elongacja	72	60	
Starter FORWARD [10 μ M]	3	Wydłużanie końcowe	72	420	1
Starter REVERSE [10 μ M]	3	Chłodzenie	10	∞	1
Polimeraza <i>Taq</i> 2 U/ μ l	0,6				
Matryca DNA	0,5				
Σ	25				

Produkty PCR trawiono enzymem restrykcyjnym *HinI* w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Ze względu na asymetryczną lokalizację miejsca cięcia enzymu *HinI* w elemencie odwracalnym, uzyskano charakterystyczne wzory restrykcyjne świadczące o tzw. orientacji przełącznika fazowego, oznaczające włączenie lub wyłączenie ekspresji fimbrii typu 1. Orientacja w pozycji ON, tzw. włączonej, jest wskazana przez fragmenty 605 i 212 pz, a orientacja w pozycji OFF, tzw. wyłączzonej, jest zaznaczona fragmentami 496 i 321 pz (Rysunek 8).



Rysunek 8. Charakterystyka przełącznika fazowego fimbrii typu 1 *K. pneumoniae*. (A) Schematyczne przedstawienie regionu przełącznika faz, w tym odwracalnego elementu DNA zawierającego promotor (P) głównego genu kodującego podjednostkę fimbrialną, *fimA*. Orientację zmiany fazy określono przez amplifikację PCR regionu przełącznika, a następnie trawienie produktu PCR za pomocą *Hin*I. (B) Teoretycznie oczekiwane wyniki po amplifikacji PCR regionu przełącznika. Ze względu na asymetryczną lokalizację miejsca cięcia *Hin*I w odwracalnym elemencie, różne fragmenty są uzyskiwane w zależności od orientacji przełącznika. W oparciu o [137]

Produkty trawienia restrykcyjnego identyfikowano stosując rozdzielanie elektroforetyczne w 1,2% żelu agarozowym. 5 µl mieszaniny poreakcyjnej wymieszanej z 2 µl buforu obciążającego rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny, w buforze 0,5xTBE w czasie 45 min przy napięciu 100 V. Żel analizowano w świetle UV z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli VersaDoc Imaging System Model 1000 oraz oprogramowania Quantity One wersja 4.3.1.

Test aglutynacji komórek drożdży - ocena właściwości adhezyjnych szczepów *K. pneumoniae*

Zdolność komórek bakteryjnych do wyrażania fenotypu wiążącego D-mannozę była badana na podstawie ich zdolności do aglutynacji świeżo przygotowanego roztworu komórek drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*). Test przeprowadzono dla 3 izolatów klinicznych *K. pneumoniae* (Tabela 22, numer 1K, 5K, 13K) hodowanych w różnych warunkach wzrostu (na podłożu stałym LA, na pożywce płynnej LB w dwóch wariantach: statycznie i z wytrząsaniem (200 rpm), w hodowlach pasażowych 4x oraz w hodowlach trwających 96 godzin) oraz dla 61 szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów z grupy badanej i 36 szczepów *K. pneumoniae* z grupy kontrolnej hodowanych przez noc w pożywce płynnej LB. Aglutynację badano przez zmieszanie 15 µl kultury bakterii z 15 µl zawiesiny drożdży (5%) i mierzono czas do wystąpienia aglutynacji. Testy przeprowadzono na szkiełkach mikroskopowych.

5.2.7.3. Analiza ekspresji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji w warunkach ekspozycji na różne stężenia leków immunosupresyjnych z zastosowaniem metody qRT-PCR

W prezentowanej rozprawie podjęto się sprawdzenia wpływu leków immunosupresyjnych na ekspresję genów kodujących wybrane czynniki wirulencji dla wybranych izolatów *K. pneumoniae*. Sprawdzano zarówno krótkotrwałą, jak i długotrwałą ekspozycję na działanie immunosupresantów. Do badań wybrano zróżnicowaną pulę 20 izolatów. O wyborze izolatów do badania zadecydowały wyniki lekowrażliwości, wykrycie ESBL, występowanie fenotypu hiperbakteryjnego oraz profil wirulencji. Do pomiaru ekspresji genów zastosowano metodę ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (qPCR, ang. *real-time PCR*), poprzedzoną techniką odwrotnej transkrypcji (RT, ang. *reverse transcription*).

Hodowla izolatów *K. pneumoniae*

W celu badania zmian poziomów ekspresji genów wskutek ekspozycji na leki immunosupresyjne (cyklosporyna i tacrolimus), 19 izolatów klinicznych *K. pneumoniae* oraz jeden izolat referencyjny przepasażowano 1x na pożywkę LB z dodatkiem lub bez leków immunosupresyjnych. Charakterystyka szczepów poddanych badaniu ekspresji genów została umieszczona w tabeli 25. Szczepy wyizolowane od pacjentów po przeszczepie nerki przyjmujących cyklosporynę, przesiano na podłoża bez i z dodatkiem cyklosporyny o stężeniach podanych w tabeli 26. Szczepy wyizolowane od pacjentów po przeszczepie nerki przyjmujących tacrolimus, przesiano na podłoża bez i z dodatkiem tacrolimusu o stężeniach podanych w tabeli 26, zaś szczepy wyizolowane od pacjentów z grupy kontrolnej oraz szczep referencyjny, przesiano na podłoża bez dodatku immunosupresantów. Hodowla była prowadzona w temperaturze 37°C.

Tabela 25. Charakterystyka szczepów w badaniu ekspresji genów

Nr izolatu	Grupa	Schemat immunosupresji
1K	Kontrolna	-
5K	Kontrolna	-
13K	Kontrolna	-
14K	Kontrolna	-
36K	Kontrolna	-
14B	Badana	Cyklosporyna
22B	Badana	Cyklosporyna
27B	Badana	Cyklosporyna
41B	Badana	Cyklosporyna
45B	Badana	Cyklosporyna
47B	Badana	Cyklosporyna
53B	Badana	Cyklosporyna
11B	Badana	Tacrolimus
25B	Badana	Tacrolimus
30B	Badana	Tacrolimus
33B	Badana	Tacrolimus
36B	Badana	Tacrolimus
51B	Badana	Tacrolimus
56B	Badana	Tacrolimus
1R	Szczep referencyjny	-

Tabela 26. Stężenia leków immunosupresyjnych używane do badania poziomu ekspresji genów

Lek immunosupresyjny	Stężenie badanego leku immunosupresyjnego [µg/l]		
	Kontrola	Stężenie #1	Stężenie #2
Cyklosporyna	0	200	600
Tacrolimus	0	10	30

Dodatkowo, w toku badań postanowiono sprawdzić wpływ długotrwałej ekspozycji izolatów *K. pneumoniae* na immunosupresanty. Do badania wybrano 10 izolatów: 5 szczepów wyizolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki przyjmujących cyklosporynę i 5 szczepów od pacjentów przyjmujących tacrolimus (Tabela 25; numery szczepów: 14B, 27B, 41B, 45B, 53B, 11B, 25B, 30B, 36B, 51B). Izolaty te pasażowano 14-krotnie na pożywkę LB z dodatkiem lub bez immunosupresantów w zależności od szczepu. Stężenia immunosupresantów stosowane w tym doświadczeniu wynosiły 200 µg/l i 10 µg/l, odpowiednio dla cyklosporyny i tacrolimusu. Hodowla była prowadzona w temperaturze 37°C.

Badanie poziomu ekspresji genów

A. Izolacja RNA

W ciągu trwania eksperymentu trzy razy izolowano RNA z badanych izolatów: po pierwszym przesianiu na pożywkę płynną LB „z” lub „bez” dodatku immunosupresantów (dla 20 izolatów), po siódmym przesianiu na pożywkę płynną LB „z” lub „bez” dodatku immunosupresantów (dla 10 spośród 20 izolatów) i po kolejnych siedmiu pasażach na pożywkę „z” lub „bez” dodatku immunosupresantów (ponownie z tych samych 10 izolatów). Izolację RNA połączoną z trawieniem genomowego DNA przeprowadzono zgodnie z protokołem zamieszczonym w zestawie *RNeasy Protect Bacteria Mini Kit* (Qiagen, nr kat. 74524) i *RNase-Free DNase Set* (Qiagen, nr kat. 79254). Następnie dokonano analizy ilościowej i jakościowej uzyskanych preparatów RNA z wykorzystaniem pomiaru spektrofotometrycznego i elektroforezy RNA w żelu agarozowym. Otrzymany wodny roztwór totalnego RNA przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

Stężenie RNA określano spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm i 230 nm wykorzystując NanoDrop ND-1000 i oprogramowanie ND-1000 v. 3.7.1. Do dalszych etapów badania ekspresji genów wykorzystywano tylko RNA o wskaźnikach A260/A280 i A260/A230 bliskich wartości 2,0.

Jakość uzyskanego całkowitego RNA sprawdzono również z wykorzystaniem techniki elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny, w buforze 1×TBE. W tym celu 1 µg RNA wymieszany z buforem obciążającym nanoszono na żel. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu elektrycznym 100 V przez 45 minut. Prążki RNA uwidoczniono w świetle UV z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli VersaDoc Imaging System Model 1000. Zdjęcie wykonano za pomocą oprogramowania Quantity One wersja 4.3.1.

B. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT-PCR)

Po wyizolowaniu RNA, konieczne jest jego przepisanie na komplementarny DNA (cDNA, ang. *complementary DNA*). Do tego celu, wykorzystano zestaw do odwrotnej transkrypcji *TransScriba* (A&A Biotechnology, Gdańsk). Reakcję prowadzono zgodnie z protokołem zawartym w zestawie. Reakcję prowadzono na lodzie pod komorą z laminarnym przepływem powietrza. W reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystano sześci nukleotydowe startery o losowych sekwencjach (ang. *random hexamers*). Każdorazowo reakcję przeprowadzano z 1 µg wyizolowanego RNA. Przygotowany wg zaleceń producenta cDNA, rozcieńczano pięciokrotnie. Otrzymane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz.

C. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)

Poziom ekspresji badanych genów wyznaczono za pomocą metody ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) wykorzystując system LightCycler 480 (Roche, Niemcy). W przeprowadzonych badaniach zastosowano system monitorowania z barwnikiem fluorescencyjnym SYBR Green. W celu potwierdzenia specyficzności uzyskanych produktów przeprowadzono analizę krzywej topnienia amplifikowanego fragmentu.

Wybór genu referencyjnego

Oznaczenie poziomu ekspresji badanych genów wiąże się z poprzedzającymi procesami, podczas których może dochodzić do utraty części materiału genetycznego, a same procesy mogą przebiegać z różną wydajnością. Aby zapobiec tego typu błędom przeprowadzono etap normalizacji poziomu ekspresji badanego genu względem poziomu ekspresji genu referencyjnego w badanej, pojedynczej próbce [202]. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano gen referencyjny *rpoB*, czynnik sigma polimerazy RNA (s70) (*rpoB*, ang. *RNA polymerase sigma factor RpoB*). Jest on jednym z częściej używanych genów referencyjnych o stałym, nieregulowanym poziomie ekspresji niezależnie od warunków eksperymentu (np. wpływu podawanych leków i innych substancji chemicznych).

Optymalizacja reakcji

Przeprowadzono optymalizację warunków reakcji qPCR wykorzystując cztery rozcieńczenia mieszaniny wszystkich próbek cDNA dla siedmiu par starterów użytych do amplifikacji fragmentów wybranych genów: *fimA*, *mrkA*, *entB*, *iroB*, *irp2*, *iucA*, *rpoB* (Tabela 27). Reakcję dla każdej analizowanej sekwencji optymalizowano pod względem doboru odpowiedniego stężenia starterów, odpowiedniej temperatury przyłączania starterów a także czasu elongacji. Specyfika używanych starterów determinuje temperaturę ich przyłączania, a długość powstającego przy ich użyciu amplikonu determinuje temperaturę topnienia produktu, jak i czas elongacji. Przy projektowaniu par starterów zwracano uwagę, by nie zawierały w swojej sekwencji miejsc z mogącymi wystąpić polimorfizmami pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*).

Tabela 27. Charakterystyka starterów użytych do reakcji qPCR

	Gen	Temperatura przyłączania starterów [°C]	Wielkość produktu PCR [pz]
Fimbrie typu 1	<i>fimA</i>	59	132
Fimbrie typu 3	<i>mrkA</i>	60	127
Enterobaktyna	<i>entB</i>	52	143
Salmochelina	<i>iroB</i>	50	150
Yersiniabaktyna	<i>irp2</i>	51	122
Aerobaktyna	<i>iucA</i>	50	138
RpoB	<i>rpoB</i>	51	132

Reakcje przeprowadzono w 96-dołkowych płytkach przeznaczonych do qPCR w objętości końcowej 10 µl, z wykorzystaniem zsyntetyzowanego cDNA, starterów specyficznych dla badanych genów (Tabela 12) i zoptymalizowanego zestawu SsoAdvanced SYBR Green (BioRad). Reakcje dla każdego genu, dla każdej próbki wykonywano w trzech powtórzeniach. Optymalne warunki określano na podstawie wyników analizy krzywej topnienia oraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji qPCR w 2,5% żelu agarozowym w buforze 1×TBE.

Po zakończonej reakcji qPCR całość mieszaniny (10 µl) mieszano z buforem obciążającym i nanoszono na żel agarozowy zawierający bromek etydyny. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu 100 V przez 45 minut. Żel analizowano w świetle UV z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli VersaDoc Imaging System Model 1000 oraz oprogramowania Quantity One wersja 4.3.1.

Zoptymalizowane warunki reakcji qPCR dla badania poziomu ekspresji genów zostały przedstawione w tabeli 28. Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji transkryptów wybranych genów w przeliczeniu na jedną próbę, przedstawiono w tabeli 29.

Tabela 28. Profil temperaturowo-czasowy w reakcji qPCR wykorzystywany do amplifikacji genów badanych

Etapy reakcji qPCR	Temperatura [°C]	Czas [s]	Skok [°C/s]
Denaturacja wstępna	95	30	4,4
Amplifikacja - 40 cykli			
Denaturacja właściwa	95	10	4,4
Przyłączanie starterów	50	15	2,2
W zależności od analizowanej sekwencji			
Wydłużanie	72	10	4,4
Wyznaczanie krzywej topnienia			
Denaturacja	95	10	4,4
Topnienie produktów PCR	50	60	2,2
	97	60	0,1
Wydłużanie	40	300	2,2

Opracowanie własne, na podstawie instrukcji SsoAdvanced SYBR Green (BioRad)

Tabela 29. Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby w reakcji qPCR

Odczynnik	Objętość [µl]
SsoAdvanced universal SYBR Green supermix 2x	5,0
Mieszanina starterów (100 mM)	0,5
Woda wolna od nukleaz	4,0
cDNA	0,5
Σ	10,0

Przygotowanie krzywych standardowych

Do określenia względnego poziomu ekspresji genów zastosowano metody oparte na tworzeniu krzywej standardowej dla każdej pary użytych starterów z osobna dla genów badanych, jak i genu referencyjnego. Krzywe standardowe wygenerowano na podstawie qPCR dla czterech dwukrotnych rozcieńczeń cDNA próby kalibratora. W przedstawionych badaniach jako kalibrator wykorzystano uśrednione wartości uzyskane dla izolatów z grupy kontrolnej. Wszystkie reakcje przeprowadzane były w osobnych studzienkach 96-dołkowej płytki w trzykrotnych powtórzeniach. W każdej z przeprowadzanych reakcji, do jednego wiersza studzienek zamiast matrycy cDNA dodawano kontrolę negatywną (brak cDNA w próbce). Wydajność reakcji dla każdej krzywej standardowej, oceniana jako przyrost produktu po każdym jej cyklu, została obliczona w oparciu o nachylenie krzywej standardowej wg wzoru.

$$E = 10^{[-1/\text{slope}]}$$

E - wydajność

slope - współczynnik kierunkowy krzywej standardowej

Analizę wyników przeprowadzono wykorzystując system LightCycler 480 (Roche, Niemcy) oraz program Excel 2010.

Właściwa reakcja qPCR

W celu wykonania reakcji wykorzystano zestaw SsoAdvanced SYBR Green (BioRad). Skład mieszaniny reakcyjnej w przeliczeniu na jedną próbę, a także warunki reakcji qPCR zostały uprzednio zoptymalizowane i zaprezentowane w tabelach 28 i 29. Wszystkie reakcje przeprowadzane były w osobnych studzienkach 96-dołkowej płytki z użyciem aparatu LightCycler 480 (Roche, Niemcy). W każdej prowadzonej reakcji stosowano kontrolę negatywną (brak cDNA) oraz próbę kalibracyjną w celu skorygowania rozbieżności powstających pomiędzy przeprowadzanymi z osobna reakcjami.

Każda próba badana cDNA była amplifikowana w oddzielnych reakcjach qPCR zarówno ze starterami dla analizowanych sekwencji genów badanych, jak i dla genu referencyjnego w trzech powtórzeniach. W pierwszym etapie wyznaczono efektywności powielania genu badanego i referencyjnego. Następnie obliczano średnią arytmetyczną z uzyskanych wyników cyklu progowego (C_t) dla każdego genu.

Analiza poziomu ekspresji genów

W prezentowanej rozprawie, znormalizowaną wartość względnego poziomu ekspresji poszczególnych genów w próbach badanych (średnia arytmetyczna z trzech reakcji) obliczono z wykorzystaniem metody komparatywnej (porównawczej). Jako gen referencyjny wykorzystano gen metabolizmu podstawowego *rpoB*, zaś jako kalibrator, uśrednione wartości uzyskane dla izolatów z grupy kontrolnej. W toku przeprowadzonych doświadczeń, sprawdzano różnice w poziomach ekspresji wybranych genów izolatów *K. pneumoniae* podzielonych na grupy:

- izolaty pobrane od pacjentów przyjmujących cyklosporynę w schemacie immunosupresji
- izolaty pobrane od pacjentów przyjmujących tacrolimus w schemacie immunosupresji

W trakcie analizy sprawdzano poziomy ekspresji badanych genów po hodowli na pożywce LB i porównywano je z poziomami ekspresji genów tych samych grup izolatów hodowanych na pożywkach z dodatkiem poszczególnych leków immunosupresyjnych.

Do analizy statystycznej otrzymanych wyników zastosowano nieparametryczny test porównujący grupy niezależne, U Manna Whitney'a. Test ten nie wymaga spełnienia założenia o równoliczności porównywanych grup. W przypadku dwóch próbek zebranych od jednego pacjenta w różnym czasie (dane zebrane przed i po eksperymencie) zastosowano nieparametryczny test Wilcoxon dla par obserwacji. W trakcie analizy statystycznej wyznaczano prawdopodobieństwo testowe (ang. *p-value*). Za poziom istotności przyjęto $\alpha = 0,05$. Jeśli wartość *p-value* jest niższa niż przyjęty poziom istotności statystycznej, można postępować tak, jakby hipoteza zerowa, mówiąca o braku różnic w poziomach ekspresji danych genów między grupami, została odrzucona. Do analizy wyników otrzymanych na podstawie niżej wymienionych metod, jak i wizualizacji tych wyników, opracowano własny skrypt w języku programowania R w środowisku R Studio.

Analiza poziomów ekspresji genów metodą komparatywną

Warunkiem stosowania metody komparatywnej, nazywanej również metodą porównawczą, jest zbliżona wartość efektywności reakcji powielania sekwencji genu badanego i genu referencyjnego.

Na podstawie krzywych standardowych z serii kolejnych rozcieńczeń matrycy dla genu badanego oraz genu referencyjnego, wyznaczane są cykle progowe reakcji amplifikacji tych genów zarówno w próbach badanych jak i próbie kalibracyjnej. Następnie, wyliczana jest różnica pomiędzy wartościami C_t reakcji przebiegającej na matrycy genu badanego i referencyjnego dla poszczególnych prób, zarówno badanych, jak i kalibratora:

$$\Delta C_t(\text{próba badana}) = C_t \text{ genu badanego} - C_t \text{ genu referencyjnego}$$

$$\Delta C_t(\text{kalibrator}) = C_t \text{ genu badanego} - C_t \text{ genu referencyjnego}$$

Następnie dla każdej próby należy obliczyć:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{próba badana}) - \Delta C_t(\text{kalibrator})$$

Znormalizowaną wartość względnego poziomu ekspresji genu badanego w próbie badanej względem kalibratora oblicza się wg wzoru:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Poziom badanego transkryptu w próbie badanej wyrażony jako wielokrotność kalibratora (R) równy 1 oznacza, że poziom ekspresji lub liczba kopii genu w próbie badanej i kalibratorze są jednakowe. Wartość parametru R większa od 1 wskazuje na wyższy poziom ekspresji genu w próbie badanej w porównaniu z kalibratorem, zaś mniejsza, na wyższy poziom ekspresji w próbie kalibracyjnej.

5.2.8. Sekwencjonowanie całego genomu szczepów *K. pneumoniae* o największej wirulencji i szczepów *K. pneumoniae* New Delhi, z wykorzystaniem wielkoskalowego sekwencjonowania genomów

Przeprowadzono dwa niezależne badania sekwencjonowania całogenomowego (WGS, ang. *Whole Genome Sequencing*) z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. *Next Generation Sequencing*). Sekwencjonowanie całych genomów dwóch wybranych na podstawie testów fenotypowych szczepów hiperwirulentnych *K. pneumoniae* (hvKp) przeprowadzono w celu omówienia molekularnych podstaw klinicznej identyfikacji i wirulencji zakażenia hvKp a także konwergencji szczepów opornych na antybiotyki i hiperwirulentnych, oraz zrozumienia molekularnych barier w nabywaniu plazmidów MDR przez szczepy hvKp. Przeprowadzono analizę porównawczą sekwencjonowanych szczepów z 32 międzynarodowymi izolatami *K. pneumoniae* pobranymi z bazy danych Patric (<https://patricbrc.org>) na podstawie czterech ostatnio opublikowanych prac, które uwzględniały izolaty *K. pneumoniae* o tym samym typie sekwencji. Sekwencjonowanie całych genomów wszystkich szczepów *K. pneumoniae* New Delhi z kolekcji, przeprowadzono w celu dokładnej charakterystyki transmisji i epidemii, umożliwiając porównanie izolatów klinicznych z dokładnością pojedynczej różnicy nukleotydowej. Badania przeprowadzono metodami analizy filogenetycznej; analiza genomu rdzenia i analiza polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP). Analizę filogenetyczną danych WGS porównano z analizą filogenetyczną metody typowania genetycznego PCR MP, aby sprawdzić, czy istnieje korelacja lub duże różnice między skutecznością, niezawodnością i rozdzielczością w obu metodach. Przeprowadzono analizę porównawczą sekwencjonowanych szczepów z 100 międzynarodowymi izolatami

K. pneumoniae pobranymi z bazy danych Patric. Wyniki sekwencjonowania zapewniają najbardziej kompleksową charakterystykę szczepów bakteryjnych.

Sekwencjonowanie zostało przeprowadzone w laboratorium analiz genomowych MicrobesNG (<https://microbesng.com>) przy Uniwersytecie w Birmingham (Wielka Brytania). Badane izolaty zostały przesłane w specjalnych probówkach z wyodrębnionym kodem kreskowym dla każdego szczepu. Ekstrakcja DNA, przygotowanie bibliotek z wykorzystaniem zestawu Nextera XT DNA (Illumina Inc., Cambridge, UK), a następnie zsekwencjonowanie próbek z wykorzystaniem sekwencjonatora genomowego Illumina MiSeq X10 (Illumina Inc.) zostało wykonane w laboratorium uniwersyteckim. Jako wynik sekwencjonowania całych genomów dla każdego izolatu otrzymano pliki w formacie FASTQ. Kompleksowa analiza bioinformatyczna danych sekwencjonowania została wykonana samodzielnie, według etapów przedstawionych w punkcie 5.2.10. Do analizy danych zastosowano zestaw ogólnodostępnych narzędzi bioinformatycznych oraz własne skrypty napisane w języku Python i Perl.

5.2.9. Analiza statystyczna danych klinicznych w odniesieniu do charakterystyki genetycznej

Wpływ zmiennych klinicznych i biologicznych (Tabela 7) na wystąpienie zakażeń układu moczowego o etiologii *K. pneumoniae* został oceniony z wykorzystaniem testu Mann-Whitney U i testu Fischera. Niezależne czynniki ryzyka wystąpienia nawracających zakażeń układu moczowego o etiologii *K. pneumoniae* zostały ocenione w modelu wieloczynnikowej regresji logistycznej. Różnice w częstościach występowania genów kodujących czynniki wirulencji zostały ocenione z wykorzystaniem testu Chi-kwadrat.

5.2.10. Analiza bioinformatyczna danych sekwencjonowania

Sekwencjonowanie izolatów i wstępne przetwarzanie danych

W wyniku sekwencjonowania całogenomowego dla każdego badanego izolatu otrzymano surowe dane w formacie FASTQ. Próbkę zostały zsekwencjonowane na platformie Illumina MiSeq X10 (Illumina Inc.) z odczytami sparowanymi (ang. *paired-end reads*) o 150 pz. Dało to średnio 27,773,714 odczytów na próbkę, co odpowiada średnio 100-krotnemu pokryciu na genom. Kontrola surowych odczytów sekwencji (tj. usuwanie adapterów sekwencjonowania), filtrowanie i przycinanie zgodnie z kryteriami jakości i długości przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Trimmomatic (wersja 0.36) [203].

Montaż i adnotacja genomu

Sekwencje całego genomu zostały zmontowane (połączone) *de novo* za pomocą oprogramowania SPAdes (wersja 3.9.0) [204]. Oprogramowanie Quast (wersja 5.0.2) [205] zostało wykorzystane do wygenerowania statystyk podsumowujących dla pojedynczego montażu, dzięki czemu możliwa była kontrola jakości uzyskanych danych. Odczyty sekwencji bakteryjnych zostały zebrane w pierwotne contigi, które zostały zdeponowane w bazie danych NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pod numerem dostępu BioProject PRJNA630564 oraz BioProject PRJNA688074 (Tabela 30). Złożone genomy zostały opatrzone adnotacjami za pomocą Prokka (wersja 1.11) [206] z punktem odcięcia 10-6, minimalnym rozmiarem contiga 200 bp i dodając opcje „addgenes” i „usegenus”. Adnotacja całego genomu jest procesem

identyfikowania interesujących cech w zestawie sekwencji genomowego DNA i znakowania ich przydatnymi informacjami. Dane wyjściowe Prokka wykorzystano jako dane wejściowe do scharakteryzowania pangenu za pomocą oprogramowania Roary (wersja 3.6.0) [207] z 95% identyfikacją blastp. Za pomocą narzędzia Roary zdefiniowano arkusz kalkulacyjny obecności i nieobecności genu (ang. *gene 'presence/absence'*) w całej kolekcji izolatów.

Tabela 30. Szczegóły zsekwencjonowanych genomów *Klebsiella pneumoniae*

Nr izolatu	Nazwa szczepu	BioSample	BioProject	WGS
50B	KP28872	SAMN14840028	PRJNA630564	JABFQQ000000000
49B	KP28873	SAMN14840029	PRJNA630564	JABFQR000000000
16K	ND32	SAMN17168599	PRJNA688074	JAEMGY000000000
3R	ND33	SAMN17168602	PRJNA688074	JAEMHB000000000
32K	ND96	SAMN17168597	PRJNA688074	JAEMGW000000000
33K	ND111	SAMN17168600	PRJNA688074	JAEMGZ000000000
5R	ND27	SAMN17168596	PRJNA688074	JAEMGV000000000
46B	ND24	SAMN17168601	PRJNA688074	JAEMHA000000000
4R	ND34	SAMN17168603	PRJNA688074	JAEMHC000000000
53B	ND88	SAMN17168598	PRJNA688074	JAEMGX000000000

Wyrównanie genomu / analiza filogenetyczna

MLST *in silico* przeprowadzono za pomocą niestandardowego narzędzia opartego na BLAST (<https://github.com/tseemann/mlst>) na zespołach genomu *de novo*. Wyrównanie genów rdzeniowych (ang. *core gene alignment*) przeprowadzono za pomocą własnego skryptu napisanego w języku Python, plików wyjściowych Prokka w formacie FFN oraz arkusza kalkulacyjnego obecności i nieobecności genu zdefiniowanego za pomocą narzędzia Roary. Za pomocą tego niestandardowego potoku uzyskano plik multi-FASTA dla każdego z genów docelowych, który następnie wyrównano gen po genie za pomocą narzędzia Muscle (wersja 3.8.31) [208] i połączono za pomocą niestandardowego skryptu napisanego w języku Python.

Drzewo filogenetyczne genomu rdzenia (ang. *core genome phylogenetic tree*) o maksymalnym prawdopodobieństwie zostało wyprowadzone z połączonych, wyrównanych genów podstawowych (rdzenia) przy użyciu modelu zastępczego GTR z czterema odrębnymi kategoriami gamma w RAxML (ang. *Randomized Axelerated Maximum Likelihood*) (wersja 8.2.12) [209]. Wizualizacji, manipulacji i adnotacji drzewa filogenetycznego dokonano za pomocą pakietu ggtree R (wersja 1.15.6) [210].

Identyfikacja polimorfizmów pojedynczego nukleotydu

Zidentyfikowany zestaw genów rdzeniowych obecny we wszystkich izolatach, zastosowano do analizy par SNP. Matrycę różnic par SNP uzyskano z wyrównania gen po genie dla wszystkich analizowanych genomów za pomocą Snp-dists (wersja 0.6.3) (<https://github.com/tseemann/snp-dists>). SNPs dla wyrównanych genów rdzeniowych zidentyfikowano przez dopasowanie danych sekwencji z każdego izolatu względem genomu referencyjnego (GenBank nr dostępu NC_007795) przy użyciu Snippy (wersja 3.1) (<https://github.com/tseemann/snippy>). Proces analizy wyglądał następująco: mapowanie sparowanych odczytów każdego szczepu do genomu referencyjnego, wywołanie wariantów i uzyskanie adnotacji wariantu oraz wpływu wariantów na przewidywanie genów za pomocą narzędzia SnpEff (wersja 4.3t) (<http://snpeff.sourceforge.net>).

Analiza obecności genów wirulencji, genów oporności i mobilnych elementów genetycznych

Do identyfikacji genów oporności wykorzystano ResFinder 3.2 [211]. Geny wirulencji zostały zidentyfikowane na podstawie bazy danych VFDB (ang. *The Virulence Factor Database*, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) [212]. Wykrywanie genów w badanych genomach przeprowadzono przy użyciu BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov>) z odcięciem 95% identyczności i długości.

Obecność integracyjnych elementów koniugacyjnych ICEKp1 i ICEKp2 badano przy użyciu markerów genowych, jak opisano wcześniej [213]. Do identyfikacji tych markerów w sekwencjach badanych izolatów zastosowano BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov>). Narzędzie Kaptive Web zostało użyte do identyfikacji typów locus polisacharydów powierzchniowych bakterii i oceny ich wariantów [157].

Analiza obecności plazmidów

W celu określenia obecności plazmidów w sekwencjach genomowych zastosowano narzędzie PlasmidFinder 2.0. [214]. Ponadto dokonano oceny contigów genomów jako plazmidowe lub chromosomalne z wykorzystaniem narzędzia RFPlasmid (<https://github.com/aldertzomer/RFPlasmid>).

Analiza statystyczna

Do wszystkich analiz statystycznych zastosowano oprogramowanie R (wersja 3.2.4). Testy proporcji przeprowadzono dokładnym testem Fishera, a porównania rozkładów testowano za pomocą testu U Manna-Whitneya. Do wizualizacji wyników użyto pakietu ggplot2 R (wersja 3.1.1) [215].

6. Rezultaty i dyskusja

6.1. Analiza kliniczna ZUM u pacjentów po przeszczepie nerki

Przebadano 54 pacjentów po przeszczepie nerki, u których wystąpiło zakażenie układu moczowego o etiologii *K. pneumoniae*. Spośród 61 odnotowanych epizodów ZUM, 32 odpowiedzialne były za bezobjawową bakteriurię (ABU) (53%), 10 epizodów wiązało się z zakażeniem dolnego odcinka dróg moczowych (zapalenie pęcherza moczowego) (16%), 19 przypadków to zakażenie górnego odcinka dróg moczowych (AGPN) (31%). U 6 pacjentów z AGPN doszło do wystąpienia urosepsy. U 22 pacjentów (41%) zdiagnozowano tylko jeden epizod ZUM *K. pneumoniae* po transplantacji nerki, pozostałych 32 pacjentów (59%) doświadczyło nawracających ZUM. Wielokrotne nawroty ZUM spowodowane przez *K. pneumoniae* stwierdzono u 19 pacjentów, podczas gdy u 13 pacjentów występowały nawroty zakażenia układu moczowego różnymi patogenami.

6.2. Oporność *K. pneumoniae* na antybiotyki β -laktamowe o rozszerzonym spektrum substratowym

W grupie 61 badanych szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych z przypadków ZUM od pacjentów po przeszczepie nerki, 45 (74%) wytwarzało β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ESBL). Zidentyfikowano również dwa szczepy (3,3%) wytwarzające karbapenemazę.

Zbadano dystrybucję szczepów ESBL+ zgodnie z kategorią ZUM [Met. 5.1.1.1] (Tabela 31). Oporność typu ESBL+ stwierdzono dla 75% izolatów pozyskanych od pacjentów z ABU, dla 70% izolatów odpowiedzialnych za zakażenia dolnego odcinka układu moczowego, dla 77% izolatów odpowiedzialnych za AGPN i 67% izolatów, które wywołały urosepsę. Szczepy wytwarzające karbapenemazę wyizolowano wyłącznie od pacjentów z bezobjawową bakteriurią.

W grupie kontrolnej, którą stanowiło 36 szczepów *K. pneumoniae*, wykryto również wysoki procent oporności na antybiotyki β -laktamowe typu ESBL (50%). Ponadto, trzy szczepy (8,3%) wytwarzały karbapenemazę.

Tabela 31. Występowanie β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ESBL) wśród szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych z przypadków ZUM u pacjentów z grupy badanej w zależności od kategorii/rodzaju ZUM

Kategoria ZUM*	Liczba izolatów <i>K. pneumoniae</i>	Wytwarzanie ESBL (%)	Rodzaj ZUM	Wytwarzanie ESBL (%)
I	32	24 (75)	Dolny	31 (74)
II	10	7 (70)		
III	13	10 (77)	Górny	14 (74)
IV	6	4 (67)		

*Kategoria ZUM: I - bezobjawowa bakteriuria (ABU), II - dolne ZUM, III - górne ZUM (AGPN), IV - urosepsa

Wyniki analizy oporności szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów z ZUM zostały przedstawione w formie plakatu podczas The 5th International Conference on Prevention & Infection Control w Genewie: „Extended-spectrum-beta-lactamase producing bacteria related urinary tract infection in renal transplant recipients.”

6.2.1.DYSKUSJA

Klebsiella pneumoniae jest dobrze znanym źródłem zakażeń szpitalnych u biorców narządów unaczynionych (SOT, ang. *solid-organ transplant*). Jest to również najczęstszy gatunek zdolny do wytwarzania β-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ESBL) [25,80]. Ze względu na oporność na wiele antybiotyków, leczenie zakażeń o etiologii *K. pneumoniae* ESBL+ może stanowić wyzwanie.

Wśród szczepów *K. pneumoniae*, badanych w rozprawie doktorskiej, ponad 70% wytwarzało β-laktamazy typu ESBL. O istotnym problemie zakażeń szczepami ESBL wśród pacjentów po transplantacji narządu donoszą liczne prace. Linares i wsp. przeanalizowali zakażenia *K. pneumoniae* u 1057 biorców narządów unaczynionych [80] i wyniki ich badań wykazały, że u 72% przypadków doszło do zakażenia układu moczowego, z czego 53% stanowiły szczepy z opornością typu ESBL. Szczepy *K. pneumoniae* wytwarzające ESBL występowały częściej u pacjentów po przeszczepieniu nerki ($p = 0,035$) i u tych, którzy wymagali dializy po przeszczepie ($p = 0,022$). W ciągu pierwszych 30 dni po wyizolowaniu *K. pneumoniae* od pacjentów z ZUM, wystąpiły cztery przypadki śmiertelne, z czego za trzy z nich były odpowiedzialne szczepy z opornością ESBL. Badania przeprowadzone przez Linares i wsp. oraz innych autorów wykazały, że mediana czasu wystąpienia zakażenia od momentu przeszczepienia narządu jest krótsza dla szczepów *K. pneumoniae* ESBL+ w porównaniu do szczepów ESBL- [25,80,216]. Istnienie tak wysokiego poziomu oporności wśród badanej puli szczepów, jest dobrze rozpoznany zagrożeniem szpitalnym. Dlatego u biorców nerki, będących pacjentami z grupy wysokiego ryzyka, należy odpowiednio interweniować.

Transfer oporności wśród szczepów *K. pneumoniae* stanowi ryzyko nie tylko dla środowiska szpitalnego, ale również coraz częściej izoluje się wielolekooporne bakterie *K. pneumoniae* w środowisku pozaszpitalnym [104]. Do szpitala ponownie trafiają pacjenci skolonizowani lub z zakażeniami układu moczowego, za które odpowiedzialne są *K. pneumoniae* ESBL+. W opublikowanej niedawno analizie wykazano, że to właśnie szczepy *K. pneumoniae* ESBL+ są najczęściej izolowane wśród nawrotowych ZUM u pacjentów po przeszczepieniu nerki [217]. Wczesne wykrycie ZUM oraz podjęcie odpowiedniego leczenia u pacjentów wysokiego ryzyka zapobiega rozwojowi powikłań, w tym tych prowadzących do utraty przeszczepu i śmierci biorców.

6.3. Występowanie genów kodujących czynniki wirulencji u szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów z ZUM

6.3.1.Porównanie występowania genów kodujących czynniki wirulencji między grupą badaną a grupą kontrolną

Geny kodujące adhezyny (*fimH-1*, *mrkD*, *kpn*, *ycfM*), siderofory (*irp-1*, *irp-2*, *fyuA*, *entB*, *iutA*, *iroN*), protektyny lub inwazyjny (*rmpA*, *magA*), toksyny (*hlyA*, *cnf-1*) oraz gen *uge* kodujący 4-epimerazę UDP-galakturonianu, identyfikowano z zastosowaniem opracowanych w rozprawie doktorskiej układów reakcji simplex i multiplex PCR [Met. 5.2.6]. Porównano częstość występowania genów wirulencji w 61 izolatach *K. pneumoniae* od 54 pacjentów po przeszczepie nerki (Tabela S2) i 36 izolatach *K. pneumoniae* od 36 pacjentów z ZUM, nie będących biorcami nerki (Tabela S3). Uzyskane wyniki wskazują na duże zróżnicowanie ocenianych szczepów pod względem obecności wybranych genów kodujących czynniki wirulencji (Tabela 32).

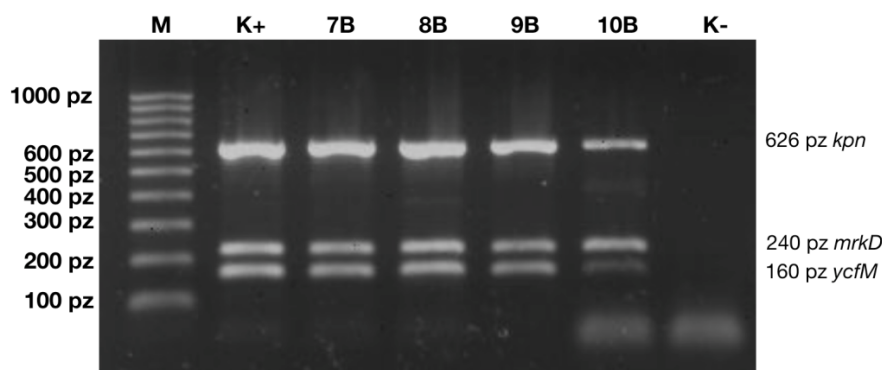
Tabela 32. Występowanie genów kodujących czynniki wirulencji u szczepów *K. pneumoniae* pochodzących od pacjentów hospitalizowanych z ZUM z grupy badanej i grupy kontrolnej

Geny związane z wirulencją		Liczba (%) szczepów grupy badanej (n=61)	Liczba (%) szczepów grupy kontrolnej (n=36)	p-value
Adhezyny	<i>fimH-1</i>	50 (82)	32 (88,9)	0,56
	<i>mrkD</i>	53 (86,9)	32 (88,9)	1,0
	<i>kpn</i>	46 (75,4)	31 (86,1)	0,3
	<i>ycfM</i>	42 (68,9)	24 (66,7)	0,83
Siderofory	<i>irp-1</i>	30 (49,2)	20 (55,6)	0,67
	<i>irp-2</i>	29 (47,5)	22 (47,5)	0,21
	<i>fyuA</i>	28 (45,9)	18 (50)	0,83
	<i>entB</i>	45 (73,8)	17 (47,2)	0,015
	<i>iutA</i>	17 (27,9)	21 (58,3)	0,005
	<i>iroN</i>	13 (21,3)	8 (22,2)	1,0
Inwazyjny	<i>rmpA</i>	2 (3,3)	1 (2,8)	0,65
	<i>magA</i>	0 (0)	0 (0)	N/A
Toksyny	<i>hlyA</i>	0 (0)	2 (5,6)	0,14
	<i>cnf-1</i>	3 (4,9)	5 (13,9)	0,14
	<i>uge</i>	49 (80,3)	27 (75)	0,61

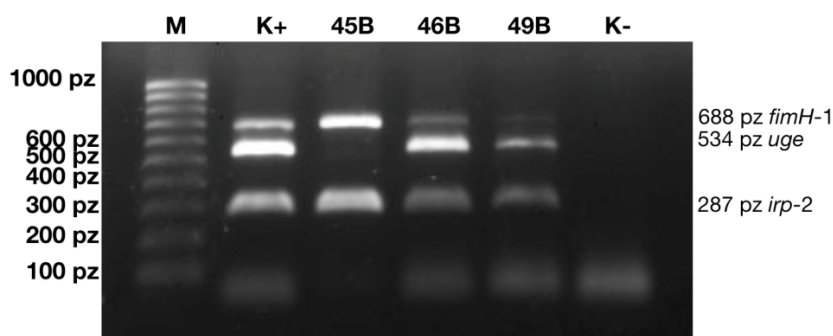
N/A - nie dotyczy (ang. *not applicable*)

Geny *mrkD*, *fimH-1* i *kpn*, kodujące adhezyny fimbrialne (fimbrie typu 3 i 1 oraz adhezynę FimH-like), są odpowiedzialne za przyleganie do komórek nabłonkowych i tworzenie biofilmu. Zwykle geny te wykrywane są w uropatogennych szczepach *K. pneumoniae* [131]. Dla izolatów pochodzących od pacjentów po przeszczepie nerki gen *mrkD* był najbardziej rozpowszechnionym genem wirulencji z częstością występowania równą 86,9%, drugim był gen *fimH-1* wykryty dla 82% szczepów. Wśród izolatów *K. pneumoniae* w grupie kontrolnej oba geny występowały z częstością równą 88,9%. Gen *kpn* wykryto w 75,4% i 86,1% izolatów odpowiednio w grupie badanej i grupie kontrolnej.

Gen *uge* kodujący lipoproteinę otoczkową oraz gen *ycfM* kodujący lipoproteinę błony zewnętrznej, sprzyjają infekcji poprzez oporność na fagocytozę i pośredniczą w wiązaniu z macierzą zewnątrzkomórkową. Potwierdzono obecność obu genów w izolatach *K. pneumoniae* zarówno od pacjentów z grupy badanej, jak i od pacjentów z grupy kontrolnej (Rysunek 10 i Rysunek 11). Gen *uge* wykryto w przypadku 80,3% i 75% izolatów odpowiednio z grupy badanej i kontrolnej. W pracy Regué i wsp. [193] sugerowano, że obecność funkcjonalnego genu *uge* jest niezbędna dla infekcji dróg moczowych (wirulencji bakterii). Mutacje w genie *uge* powodowały w eksperymencie na modelu szczurzym niezdolność do wywołania infekcji dróg moczowych. Gen *ycfM* wykryto w przypadku 68,9% i 66,7% izolatów odpowiednio z grupy badanej i kontrolnej. Gen ten jest indukowany w warunkach stresu komórkowego [218].

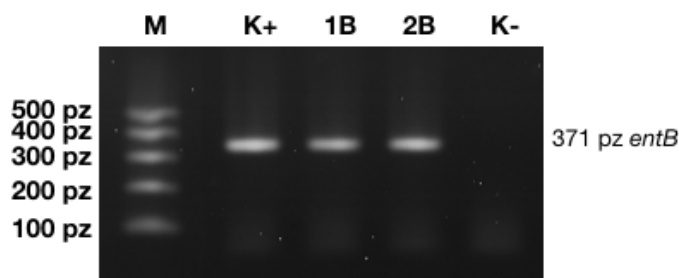


Rysunek 10. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji multiplex PCR dla genów *kpn*, *mrkD* i *ycfM* dla reprezentatywnych izolatów. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz); K+ - kontrola pozytywna; ścieżki opisane są numerami izolatów: 7-10 - produkty PCR o wielkości 626 pz, 240 pz, 160 pz charakterystyczne dla genów *kpn*, *mrkD* i *ycfM* dla izolatów o numerach 7-10, K- - kontrola negatywna

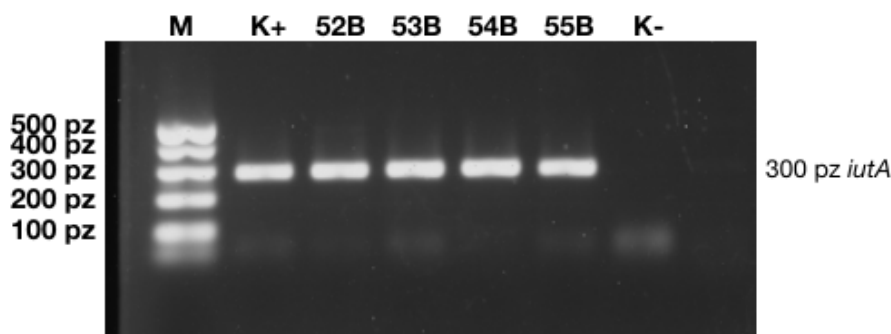


Rysunek 11. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji multiplex PCR uzyskanych dla genów *fimH-1*, *uge* i *irp-2* dla reprezentatywnych izolatów. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz); K+ - kontrola pozytywna; ścieżki opisane są numerami izolatów: 45 - produkty PCR o wielkości 688 pz, 287 pz charakterystyczne dla genów *fimH-1* i *irp-2*; 46, 49 - produkty PCR o wielkości 688 pz, 534 pz, 287 pz charakterystyczne dla genów *fimH-1*, *uge* i *irp-2*; K- - kontrola negatywna

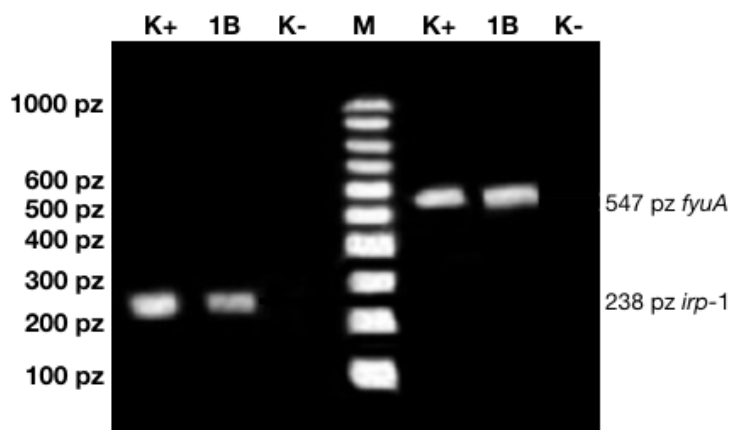
Siderofory to systemy wychwytu żelaza, które odpowiadają za dostarczanie komórkom bakteryjnym jonów żelaza z kompleksów białkowych gospodarza. Siderofory zwiększają patogenność bakterii, powodując niedobór żelaza u gospodarza, a zatem prowadząc do znacznego obniżenia humoralnych mechanizmów obrony immunologicznej gospodarza [134,148,151]. Jednoczynnikowa analiza wariancji wykazała, że gen biosyntezy enterobakteryjnej *entB*, statystycznie istotnie częściej występował u szczepów izolowanych od pacjentów z grupy badanej w porównaniu do szczepów izolowanych z grupy kontrolnej ($p = 0,015$) (Rysunek 12). W przeciwieństwie do genu *entB*, gen aerobakteryjny *iutA* statystycznie istotnie częściej występował w izolatach od pacjentów z grupy kontrolnej ($p = 0,005$) (Rysunek 13). Geny yersiniobakteryjne, niezbędne do tworzenia biofilmu w pęcherzu moczowym oraz pełniące funkcję ochronną przed wewnątrzkomórkową toksycznością miedzi [134,151] zostały wykryte w obu grupach badanych na poziomie 61,1%, 49,2%, 45,9% kolejno dla *irp-2*, *irp-1* i *fyuA* w grupie badanej oraz 47,5%, 55,6% i 50% w grupie kontrolnej (Rysunek 11 i Rysunek 14). W przypadku genu salmocheliny również nie wykazano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy grupą badaną (21,3%) a kontrolną (22,2%) (Rysunek 15).



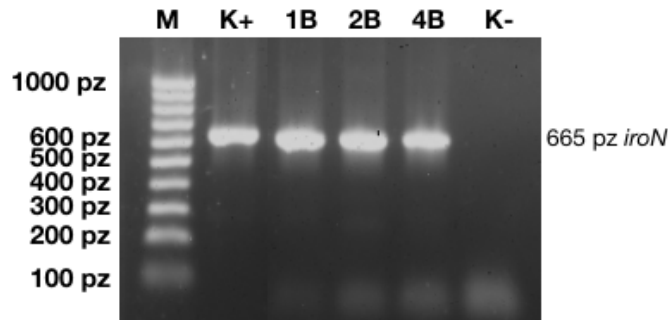
Rysunek 12. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji Simplex PCR uzyskanych dla genu *entB* dla reprezentatywnych izolatów. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500 pz); K+ - kontrola pozytywna; ścieżki opisane są numerami izolatów: 1, 2 - produkt PCR o wielkości 371 pz charakterystyczny dla genu *entB*; K- - kontrola negatywna



Rysunek 13. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji Simplex PCR dla genu *iutA* dla reprezentatywnych izolatów. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500 pz); K+ - kontrola pozytywna; ścieżki opisane są numerami izolatów: 52-55 - produkt PCR o wielkości 300 pz charakterystyczny dla genu *iutA*; K- - kontrola negatywna



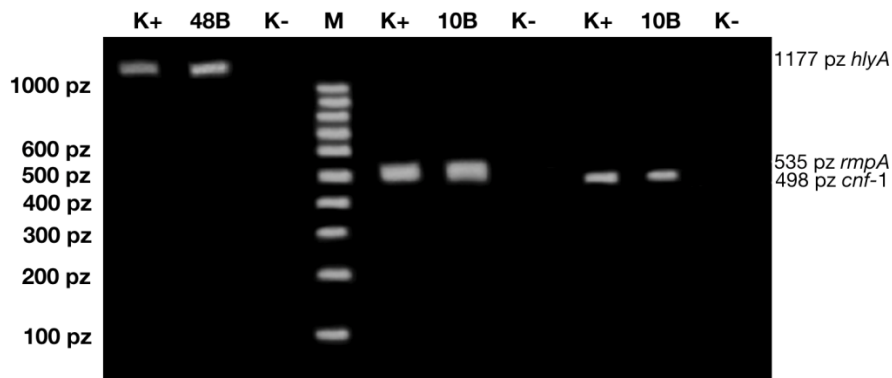
Rysunek 14. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji Simplex PCR dla genu *irp-1* i *fyuA* dla reprezentatywnego izolatu. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz); K+ - kontrola pozytywna; ścieżki opisane są numerem izolatu: 1 - produkt PCR o wielkości 238 pz charakterystyczny dla genu *irp-1* (po lewej stronie markera), produkt PCR o wielkości 547 pz charakterystyczny dla genu *fyuA* (po prawej stronie markera); K- - kontrola negatywna



Rysunek 15. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji Simplex PCR dla genu *iroN* dla reprezentatywnych izolatów. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz); K+ - kontrola pozytywna; ścieżki opisane są numerami izolatów: 1, 2, 4 - produkt PCR o wielkości 665 pz charakterystyczny dla genu *iroN*, K- - kontrola negatywna

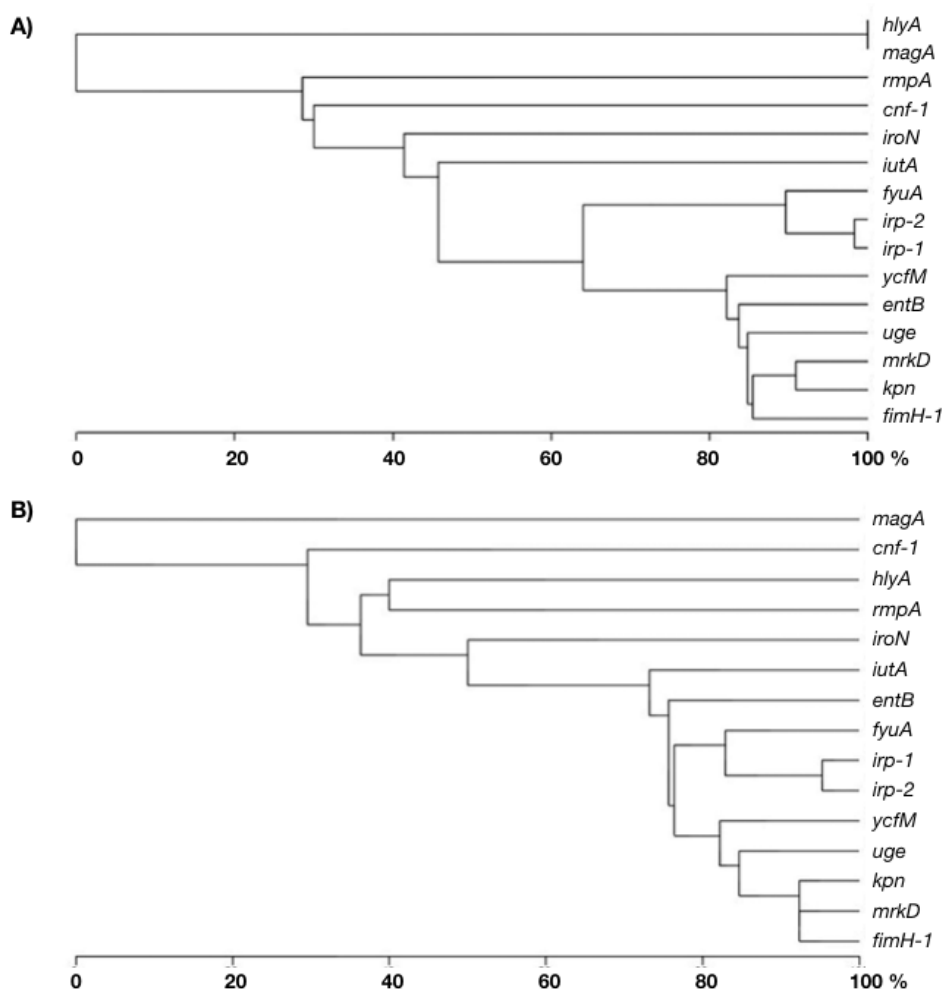
Cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący 1 (gen *cnf-1*) i hemolizyna (gen *hlyA*) są wysoce patogennymi czynnikami wirulencji, powszechnie wytwarzanymi przez pałeczki *E. coli* izolowanymi z przypadków bakteriemii i infekcji dróg moczowych [219]. Gen *hlyA* dla *K. pneumoniae* wykryto tylko w dwóch przypadkach z grupy kontrolnej (Rysunek 16). Gen *cnf-1* wykryto w 4,9% i 13,9% izolatów odpowiednio z grupy badanej i kontrolnej (Rysunek 16).

Geny *magA* i *rmpA* są związane z fenotypem hipermukoidalnym i dominują u pacjentów z chorobami inwazyjnymi, zwłaszcza ropniem wątroby [134]. Gen *rmpA* wykryto tylko w dwóch przypadkach z grupy badanej i jednym z grupy kontrolnej (Rysunek 16). Żaden z badanych izolatów nie wykazał obecności genu *magA* kodującego polisacharydową otoczkę.



Rysunek 16. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji Simplex PCR dla genu *hlyA*, *cnf-1* i *rmpA* dla reprezentatywnych izolatów. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz); K+ - kontrola pozytywna; ścieżki opisane są numerami izolatów: 48B - produkt PCR o wielkości 1177 pz charakterystyczny dla genu *hlyA*, 10B - produkt PCR o wielkości 535 pz charakterystyczny dla genu *rmpA*, produkt PCR o wielkości 498 pz charakterystyczny dla genu *cnf-1*; K- - kontrola negatywna

Jednowymiarowa analiza występowania czynników wirulencji *K. pneumoniae* w grupie badanej i kontrolnej wykazała znaczące różnice tylko w rozpowszechnieniu genu *entB* i genu *iutA*, stąd dodatkowo przeprowadzono analizę skupień dla współwystępowania czynników wirulencji w grupie badanej i kontrolnej (Rysunek 17). Geny *mrkD*, *kpn* i *fimH-1* były najczęściej identyfikowanym klastrem czynników wirulencji dla szczepów izolowanych zarówno od pacjentów z grupy badanej, jak i kontrolnej, z częstością występowania na poziomie 85–90% przypadków. Wskazuje to na rolę adhezyn w kolonizacji dróg moczowych niezależnie od statusu przeszczepienia nerki.



Rysunek 17. Współwystępowanie genów kodujących badane czynniki wirulencji wśród *K. pneumoniae* w grupie badanej (A) i kontrolnej (B) na podstawie analizy skupień (MVSP wersja 3.22.)

Tylko 45% izolatów z grupy badanej wykazywało skupienie różnych rodzajów sideroforów, tj. aerobaktyny, yersiniabaktyny i enterobaktyny. Ponadto wykazano współwystępowanie genu *entB* i *ycfM*. Lipoproteina błony zewnętrznej kodowana przez gen *ycfM* wspomaga adhezję i tworzenie biofilmu oraz udowodniono, że indukowana jest w warunkach stresu komórki [218]. Enterobaktyna kodowana przez gen *entB* oprócz pozyskiwania żelaza, również ułatwia tworzenie i dojrzewanie biofilmu. Współwystępowanie genów *entB* i *ycfM* może wskazywać na zdolność szczepów do tworzenia biofilmu w drogach moczowych. Współwystępowanie genu *entB* z różnymi genami kodującymi adhezyny: *uge*, *mrkD*, *kpn* i *fimH-1* potwierdzono w 83% szczepów z grupy badanej. Geny *hlyA* i *rmpA* były na ogół rzadkie. Jednak w grupie kontrolnej wskaźnik współwystępowania dla tych dwóch genów wynosił 40%, co wskazuje na wysoką patogenność tych szczepów.

Na podstawie zidentyfikowanych genów kodujących bakteryjne systemy pobierania żelaza, tj. enterobaktyna (*entB*), salmochelina (*iroN*), yersiniabaktyna (*irp-1*, *fyuA*), aerobaktyna (*iutA*), u badanych szczepów *K. pneumoniae* wyodrębniono 25 różnych wirulotypów w grupie badanej oraz 26 w grupie kontrolnej (Tabela 33). Analiza wykazała, że mniej niż 10% szczepów z grupy badanej miało wszystkie te geny, podczas gdy taki klaster był obecny w ponad 20% szczepów pochodzących z grupy kontrolnej (Tabela 33). Różnica ta nie była istotna statystycznie. Wirulotyp, składający się z czterech genów

kodujących siderofory: *entB*, *fyuA*, *irp-1*, *iutA* występował częściej w grupie kontrolnej z różnicą istotną statystycznie między grupami ($p < 0,05$). Wirulotyp *fyuA*, *iroN*, *irp-1*, *iutA* był obecny u 23% przypadków z grupy badanej, podczas gdy tylko 5,6% szczepów pochodzących z grupy kontrolnej należało do tego wirulotypu ($p < 0,05$).

Tabela 33. Wirulotypy szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów z ZUM z grupy badanej i kontrolnej

Współwystępowanie genów kodujących siderofory	Liczba (%) szczepów grupy badanej (n=61)	Liczba (%) szczepów grupy kontrolnej (n=36)	p-value
<i>entB fyuA iroN irp-1 iutA</i>	6 (9,8)	8 (22,2)	0,13
<i>entB fyuA iroN irp-1</i>	9 (14,8)	3 (8,3)	0,53
<i>entB fyuA iroN iutA</i>	1 (1,6)	3 (8,3)	0,14
<i>entB fyuA irp-1 iutA</i>	2 (3,3)	6 (16,7)	0,048
<i>entB iroN irp-1 iutA</i>	1 (1,6)	0 (0)	1,0
<i>fyuA iroN irp-1 iutA</i>	14 (23,0)	2 (5,6)	0,045
<i>entB fyuA irp-1</i>	13 (21,3)	3 (8,3)	0,16
<i>entB iroN iutA</i>	5 (8,2)	0 (0)	0,15
<i>entB irp-1 iutA</i>	1 (1,6)	1 (2,8)	1,0
<i>entB fyuA iroN</i>	0 (0)	2 (5,6)	0,14
<i>entB fyuA iutA</i>	0 (0)	1 (2,8)	0,37
<i>fyuA iroN irp-1</i>	1 (1,6)	1 (2,8)	1,0
<i>fyuA iroN iutA</i>	2 (3,3)	2 (5,6)	0,63
<i>fyuA irp-1 iutA</i>	5 (8,2)	3 (8,3)	1,0
<i>iroN irp-1 iutA</i>	1 (1,6)	1 (2,8)	1,0
<i>entB fyuA</i>	1 (1,6)	1 (2,8)	1,0
<i>entB iroN</i>	5 (8,2)	3 (8,3)	1,0
<i>entB irp-1</i>	2 (3,3)	2 (5,6)	0,63
<i>entB iutA</i>	1 (1,6)	1 (2,8)	1,0
<i>fyuA iroN</i>	1 (1,6)	1 (2,8)	1,0
<i>fyuA irp-1</i>	5 (8,2)	0 (0)	0,15
<i>iroN iutA</i>	13 (21,3)	3 (8,3)	0,16
<i>iroN irp-1</i>	0 (0)	1 (2,8)	0,37
<i>irp-1 iutA</i>	0 (0)	2 (5,6)	0,14
<i>entB</i>	14 (23,0)	2 (5,6)	0,045
<i>fyuA</i>	1 (1,6)	0 (0)	1,0
<i>iroN</i>	2 (3,3)	6 (16,7)	0,048
<i>irp-1</i>	1 (1,6)	3 (8,3)	0,14
<i>iutA</i>	9 (14,8)	3 (8,3)	0,53

6.3.2. Porównanie występowania genów kodujących czynniki wirulencji w zależności od rodzaju ZUM

Analiza występowania genów kodujących czynniki wirulencji wśród badanych szczepów w zależności od rodzaju ZUM: bezobjawowa bakteriuria (ABU), ZUM dolnego odcinka, ZUM górnego odcinka oraz urosepsa, wykazała, że gen *entB* dominował w szczepach izolowanych od pacjentów z grupy badanej (Tabela S2) w porównaniu do grupy kontrolnej (Tabela S3) tylko w przypadkach ABU. Gen *iroN* był znacznie bardziej powszechny wśród pacjentów z ZUM dolnego odcinka dróg moczowych z grupy badanej, podczas gdy gen *iutA* dominował w izolatach od pacjentów z ZUM górnego odcinka dróg moczowych z grupy kontrolnej.

Analiza jednoczynnikowa występowania genów kodujących czynniki wirulencji wśród szczepów z grupy badanej wykazała, że gen *kpn* dominował w przypadkach ABU w porównaniu z objawowymi ZUM, zaś gen *fyuA* występował częściej w górnych ZUM niż w przypadkach ABU. W analizie wieloczynnikowej występowania genów kodujących czynniki wirulencji wśród szczepów z grupy badanej nie znaleziono

żadnego związku między profilem czynników wirulencji a rodzajem ZUM tj. dolne ZUM vs. górne ZUM. Nie stwierdzono również istotnie statystycznej różnicy porównując całkowitą liczbę zidentyfikowanych genów kodujących czynniki wirulencji między izolatami z przypadków dolnego i górnego ZUM u pacjentów z grupy badanej.

Mediana liczby genów kodujących czynniki wirulencji wyniosła siedem w obu grupach ($p = 0,42$), przy czym dolny i górny kwartyl wyniósł trzy i osiem odpowiednio dla pacjentów z grupy badanej oraz sześć i dziewięć dla pacjentów z grupy kontrolnej. Nie stwierdzono istotnie statystycznej różnicy w całkowitej liczbie genów kodujących czynniki wirulencji w zależności od rodzaju ZUM.

6.3.3. Porównanie występowania genów kodujących czynniki wirulencji w szczepach *K. pneumoniae* izolowanych od pacjentów z różnymi schematami immunosupresji

Dalsza analiza wykazała, że występowanie genu *uge* było istotnie rzadsze wśród szczepów wyizolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki (Tabela 7, Tabela S2), którzy w schemacie leczenia immunosupresyjnego mieli everolimus niż u szczepów pochodzących od pacjentów po przeszczepie nerki nieotrzymujących inhibitorów mTOR (33,3% vs 82,8% $p < 0,05$). Częstość występowania genu *ycfM* kodującego lipoproteinę błony zewnętrznej u szczepów wyizolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki otrzymujących bazyliksymab była mniejsza niż u szczepów pochodzących od pacjentów po przeszczepie nerki leczonych protokołami nieindukcyjnymi (52,6% vs 76,2% $p = 0,08$). U pacjentów, którzy otrzymali tymoglobulinę do konwencjonalnego schematu immunosupresyjnego, gen *iutA* kodujący aerobaktynę był obecny u 75% szczepów, a gen *entB*, kodujący enterobaktynę u 25% szczepów w porównaniu odpowiednio z 24,6% ($p = 0,06$) i 77,2% ($p = 0,05$), w przypadku szczepów izolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki, którzy nie otrzymywali tymoglobuliny w schemacie leczenia. Wszystkie te różnice były niezależne od rodzaju ZUM.

Wyniki analizy występowania genów kodujących czynniki wirulencji u szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów z ZUM zostały opublikowane w *Journal of Medical Microbiology* w publikacji: Gołębiowska J., Krawczyk B., Wysocka M., Ewiak A., Komarnicka J., Bronk M., Rutkowski B., Dębska-Ślizień A. "Host and pathogen factors in *Klebsiella pneumoniae* upper urinary tract infections in renal transplant patients." *Journal of Medical Microbiology* (2019) 68, 382-394 a także przedstawione podczas 18th Congress of the European Society for Organ Transplantation w Barcelonie: „Host But Not Pathogen Factors Predispose To *Klebsiella Pneumoniae* Upper Urinary Tract Infections In Renal Transplant Patients.” oraz 53rd ERA- EDTA Congress w Wiedniu: „Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates causing urinary tract infections in renal transplant patients”.

6.3.4. DYSKUSJA

Drobnoustroje powodujące ZUM mają liczne czynniki wirulencji, umożliwiające przyleganie bakterii do komórek nabłonka dróg moczowych i ochronę przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza a co za tym idzie czynniki, które umożliwiają rozwój zakażenia. Na rozwój oraz przebieg ZUM może mieć wpływ rodzaj, a także współwystępowanie czynników wirulencji. Jak do tej pory, zakres badanych czynników wirulencji szczepów *K. pneumoniae* wywołujących ZUM u pacjentów po przeszczepie nerki był

ograniczony. W niniejszej rozprawie zbadano obecność genów kodujących czynniki wirulencji, które reprezentują każdą z czterech głównych klas, które zostały dobrze scharakteryzowane dla szczepów *K. pneumoniae*: fimbrie, siderofory, otoczki i lipopolisacharydy. W badaniu Calhau i wsp. [220] wykryto geny *fimH* i *uge*, kodujące kolejno fimbrie typu 1 i 4-epimerazę UDP galakturonianu, we wszystkich szczepach *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów hospitalizowanych w Oddziale Transplantacyjnym Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych. Obecność pozostałych wyżej wspomnianych genów kodujących czynniki wirulencji nie była do tej pory analizowana w populacji pacjentów po przeszczepie nerki.

Jak donoszą liczne badania naukowe, szczepy *K. pneumoniae* powodujące ZUM są zróżnicowane pod względem genetycznym, ich zdolności do kolonizacji komórek nabłonkowych pęcherza i nerek, a także zdolności do przetrwania wewnątrz tych komórek [104,130,221]. W prezentowanej rozprawie, szczepy *K. pneumoniae* izolowane od pacjentów po przeszczepie nerki wykazywały bardzo duże zróżnicowanie pod względem obecności wybranych genów kodujących czynniki wirulencji. Spośród genów *fimH-1*, *mrkD*, *kpn*, *ycfM*, *irp-1*, *irp-2*, *fyuA*, *entB*, *iutA*, *iron*, *rmpA*, *magA*, *hlyA*, *cnf-1* i *uge* najczęściej występującymi genami były *mrkD*, kodujący fimbrie typu 3, które umożliwiają kolonizację komórek nabłonka nerek i *fimH-1*, kodujący fimbrie typu 1, które warunkują adhezję do komórek nabłonka wyściełających dolny odcinek układu moczowego. Cięższa i krótsza struktura fimbrii typu 3 odgrywa ważną rolę w produkcji zwartej i chronionej środowiska komórek bakteryjnych, które uległy adhezji. W badaniach własnych, obecność genu *mrkD* wykazano u 86,9% badanych szczepów. Częste występowanie tego genu u *K. pneumoniae* pochodzących z ZUM zostało również potwierdzone przez El Fertasa-Aissani i wsp. [131]. Długie i sztywne włókna fimbrii typu 1 odgrywają szczególną rolę w inwazji komórek pęcherza moczowego przez *K. pneumoniae*, zapobiegając ich wypłukiwaniu z dróg moczowych poprzez nieregularny przepływ moczu. W przeprowadzonych badaniach w ramach rozprawy doktorskiej wykazano obecność genu *fimH-1* u 82% badanych szczepów. El Fertasa-Aissani i wsp. [131] stwierdzili obecność tego genu u 100% szczepów *K. pneumoniae* pochodzących z ZUM. Świadczy to o istotnej roli tych struktur komórkowych w kolonizacji dróg moczowych pacjentów. W prezentowanej rozprawie wykazano współwystępowanie obu genów u 72% szczepów badanych. W grupie kontrolnej obecność genów *mrkD* i *fimH-1* wykazano odpowiednio u 88,9% i 88,9%, z czego u 80,6% szczepów geny te występowały jednocześnie. Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w występowaniu obu genów między grupą badaną a kontrolną. Jednak mniejszy odsetek szczepów z genami *mrkD* i *fimH-1*, które pochodziły od pacjentów po przeszczepie nerki może wynikać z tego, że rola fimbrii typu 1 i 3 w procesie infekcji, w przypadku pacjentów poddanych immunosupresji jest mniej ważna, w porównaniu do mechanizmów obronnych dróg moczowych pacjenta. Mimo to, uważane są one za jedne z ważniejszych czynników wirulencji szczepów *K. pneumoniae* odpowiedzialnych za ZUM.

Wśród uropatogennych szczepów *K. pneumoniae* stwierdza się duże rozpowszechnienie genów warunkujących systemy pobierania i transportu jonów żelaza, w tym geny salmocheliny (*iro*), aerobaktyny (*iuc*, *iut*), yersiniabaktyny (*irp*). Zdolność pozyskiwania żelaza pozwala komórkom bakteryjnym przetrwać i namnażać się w organizmie gospodarza. Siderofory wraz z reakcją gospodarza mogą potencjalnie modulować dostępność żelaza [130]. W niniejszej rozprawie stwierdzono znaczące różnice w systemie pobierania żelaza między izolatami pobranymi od pacjentów po przeszczepie nerki i grupą

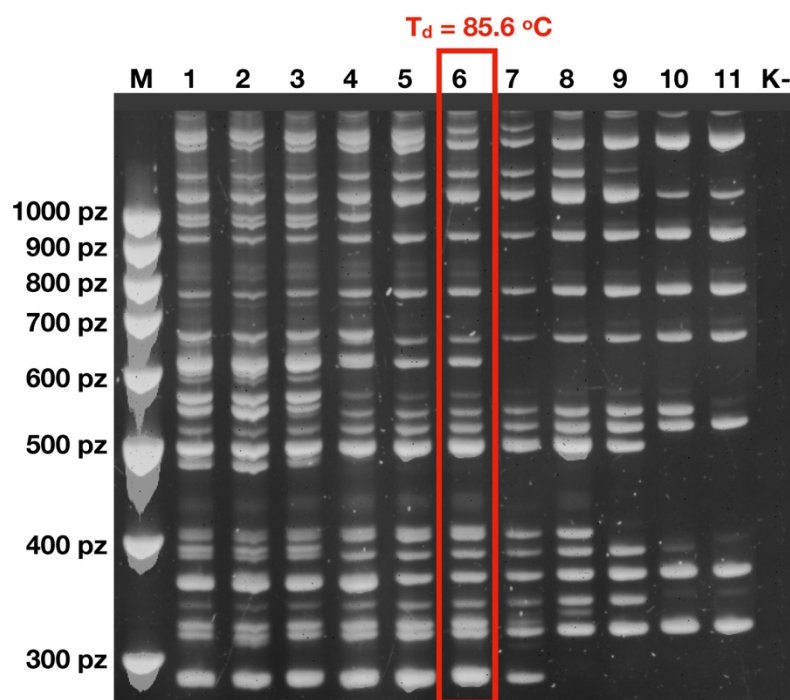
kontrolną. Być może jest to wynikiem zaburzeń gospodarki żelazowej u biorców nerek [222,223]. Gen biosyntezy enterobaktyzny *entB* był znacznie bardziej rozpowszechniony w szczepach izolowanych od pacjentów z RTx, podczas gdy gen aerobaktyzny *iutA* dominował w izolatach od pacjentów z grupy kontrolnej. Aerobaktyna była jedynym sideroforem, wskazującym na zwiększoną wirulencję hiperwirulentnej *K. pneumoniae* [130,159]. Z drugiej strony enterobaktyna ma większe powinowactwo do żelaza niż inne chelatory [130], a także jest jedynym sideroforem, który hamuje mieloperoksydazę (MPO), enzym bakteriobójczy uwalniany przez neutrofile gospodarza [224]. Z żelatynazą neutrofilii związana jest również lipokalina-2, zwana też siderokaliną czy NGAL (ang. *Neutrophil Gelatinase Associated Lipokalin*). Lipokalina-2 wiąże siderofory katecholowe – enterobaktynę i salmochelinę, natomiast nie wiąże żadnych sideroforów typu mieszanego, takich jak yersiniabaktyna i aerobaktyna [225]. Jednak enterobaktyna i salmochelina nie są funkcjonalnie równoważne. Różnorodność strukturalna i funkcjonalna sideroforów powoduje zmienioną wrażliwość na mechanizmy obronne gospodarza, np. lipokalina-2 wykazuje znacznie większe powinowactwo do enterobaktyny niż do jej glikozylowanej postaci salmocheliny [226]. Gen yersiniabaktyny (*irp2*) niezbędny do tworzenia biofilmu w pęcherzu moczowym oraz pełniący funkcję ochronną przed wewnątrzkomórkową toksycznością miedzi [111,194], został wykryty z około trzykrotnie wyższą częstością niż wcześniej zgłaszano dla przypadków ZUM o etiologii *K. pneumoniae* [194], tj. w 61,1% szczepów grupy badanej. Dotychczas wytwarzanie yersiniabaktyny obserwowano głównie w izolatach z krwi i z płuc, rzadko w izolatach z moczu i ran [131,227]. W niniejszej rozprawie, dla trzech przypadków urosepsy wykazano izolaty o tym samym genotypie, co sugerowało zakażenie szpitalne. Jednak tylko dwa izolaty były nosicielami genu *irp2*, co świadczy o zmienności genetycznej tych szczepów (utracie genu przez jeden z nich lub nabyciu nowych elementów genetycznych przez dwa pozostałe). Analiza wirulotypów wyznaczonych na podstawie genów kodujących siderofory ujawniła, że siderofory znacznie częściej występowały w szczepach izolowanych od pacjentów z grupy kontrolnej. Wyniki te wskazują, że wysoka wirulencja może nie być wymagana u biorców przeszczepu nerki z powodu braku konieczności rywalizacji z układem odpornościowym pacjenta, który został przyblokowany przez leki immunosupresyjne.

W prezentowanej rozprawie doktorskiej nie udało się znaleźć związku między obecnością jakichkolwiek badanych genów kodujących czynniki wirulencji a rozwojem górnego ZUM o etiologii *K. pneumoniae*. Jest to zgodne z obserwacją, że zakażenia szpitalne *K. pneumoniae* szczepami opornymi na wiele leków prawdopodobnie są bardziej zależne od czynników gospodarza, takich jak upośledzona odporność, niż od specyficznych czynników chorobotwórczych bakterii; w przeciwieństwie do zakażeń inwazyjnych nabytych w środowisku pozaszpitalnym [228]. Ale wykazano, że wybór protokołów leczenia immunosupresyjnego wydawał się wpływać na występowanie różnych genów kodujących czynniki wirulencji. Sugeruje to, że rodzaj lub siła zastosowanej immunosupresji może mieć wpływ na selekcję szczepów o określonym profilu czynników wirulencji. Od pacjentów z ZUM, którzy mieli w schemacie immunosupresji tacrolimus, izolowano szczepy o niższej wirulencji, stąd daleko idące podejrzenie, że ten inhibitor kalcyneuryny może pełnić funkcję ochronną przed inwazją wysoce zjadliwymi szczepami lub może zwiększać podatność na zakażenie szczepami o niskiej zjadliwości. W pracy Jarzembowskiego i wsp. [95] zaobserwowano zmiany w ekspresji genu PBP5 (Penicillin-binding protein PBP5) u *Enterococcus faecium* w zależności od zastosowanej immunosupresji. Ekspresja genu PBP5 mierzona

metodą Flow-FISH była wyższa dla enterokoków izolowanych od biorców przeszczepu nerki (RTx) niż u szczepów komensalnych. Dodatkowo, w przeciwieństwie do szczepów komensalnych w izolatach od pacjentów z RTx, ekspresja genu PBP5 była o 17,45% wyższa w biofilmach niż w komórkach planktonowych. Szczegółowe porównanie wykazało również, że cyklosporyna wydaje się promować wyższą ekspresję PBP5 w porównaniu z tacrolimusem. Stąd sugestia, że inhibitory kalcyneuryny mogą również mieć wpływ na ekspresję innych genów bakteryjnych. Badania tego typu nie były do tej pory przeprowadzane na bakteriiach Gram ujemnych i na genach kodujących określone czynniki wirulencji. Dlatego w prezentowanej rozprawie doktorskiej podjęto się zbadania ekspresji wybranych genów kodujących istotne czynniki wirulencji w warunkach immunosupresji w szczepach *K. pneumoniae* izolowanych od biorców nerki.

6.4. Analiza pokrewieństwa genetycznego szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki

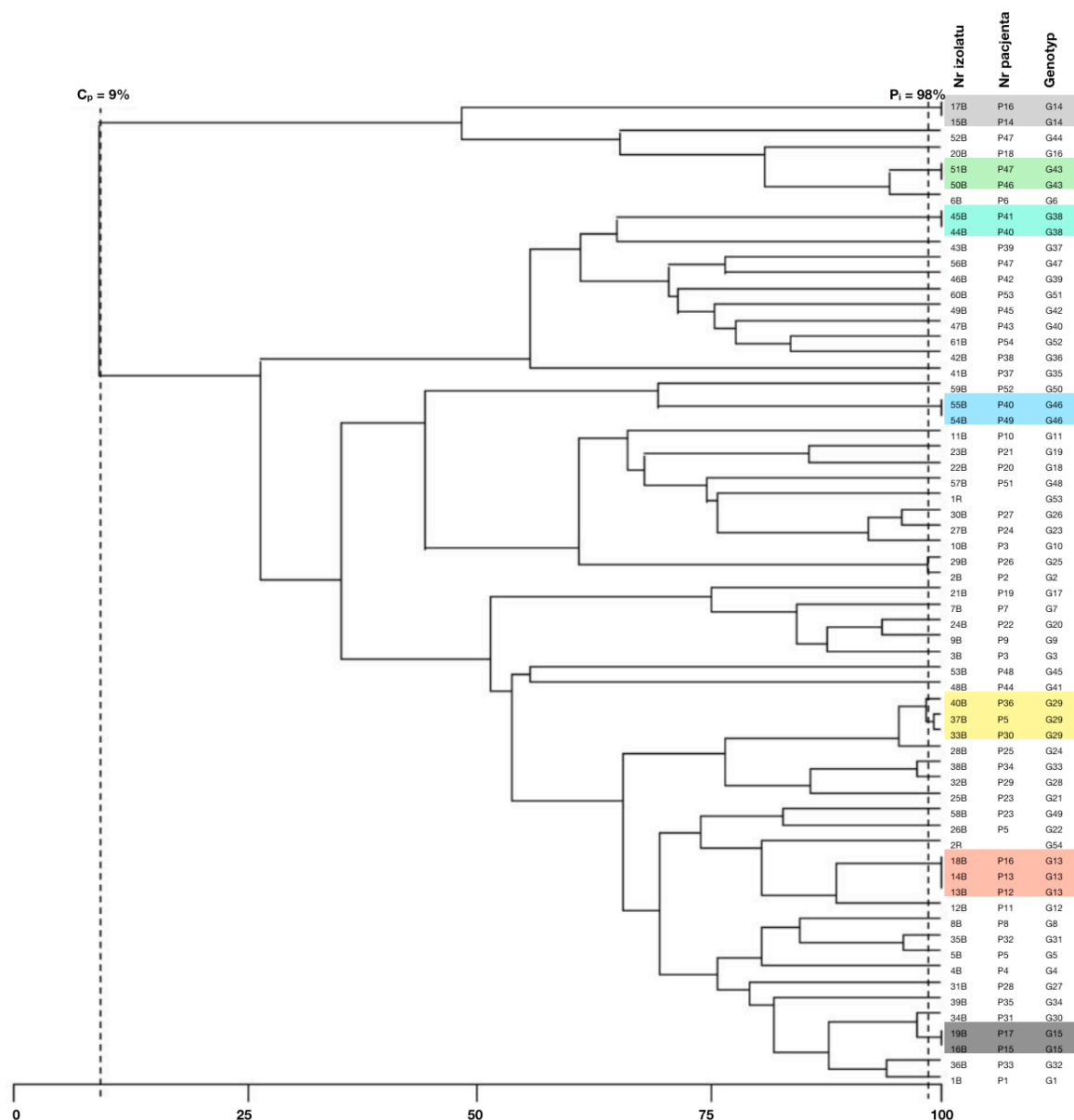
Celem zadania była szczegółowa analiza pokrewieństwa genetycznego szczepów *Klebsiella pneumoniae* izolowanych od pacjentów z grupy badanej. Do oceny pokrewieństwa badanych szczepów *K. pneumoniae* zastosowano metodę PCR MP (ang. *PCR Melting Profiles*) [Met. 5.2.5]. W pierwszym etapie eksperymentu dobrano temperaturę denaturacji tak, aby otrzymać optymalną liczbę prążków DNA, która pozwoli na różnicowanie szczepów. W tym celu przeprowadzono reakcję PCR dla wybranego szczepu (izolat numer 8B) w gradiencie temperatury denaturacji (Rysunek 18). Wybrano optymalną temperaturę denaturacji równą 85,6°C.



Rysunek 18. Optymalizacja temperatury denaturacji w cyklach reakcji PCR w typowaniu genetycznym techniką PCR MP przeprowadzona dla szczepu nr 8B. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w 6% żelu poliakrylamidowym wobec buforu 1xTBE. Ścieżki: M – wzorzec masy molekularnej DNA 100-1000 pz; 1-11 – gradient temperatury denaturacji 83,1 – 89 °C, patrz: Tabela 18; K- - kontrola negatywna

Następnie stosując wybraną temperaturę denaturacji, przeprowadzono typowanie genetyczne dla 61 szczepów *K. pneumoniae* izolowanych od 54 pacjentów z grupy badanej, szczepu referencyjnego ATCC 700603 i szczepu odnośnikowego *K. pneumoniae* KPC (z innego szpitala). Uzyskane produkty poddano elektroforezie w 6% żelu poliakryloamidowym. Na rysunku 19 przedstawiono uzyskany obraz elektroforetyczny.

Analiza pokrewieństwa genetycznego szczepów *K. pneumoniae* została przeprowadzona metodą porównawczą z uwzględnieniem współczynnika Dice'a, a klastry podobieństwa oszacowano przy użyciu metody UPGMA (Rysunek 20). Analiza PCR MP 61 szczepów *K. pneumoniae* izolowanych od 54 pacjentów po przeszczepie nerki, szczepu referencyjnego ATCC 700603 i szczepu odnośnikowego *K. pneumoniae* KPC (z innego szpitala) wykazała dużą różnorodność genetyczną z 54 genotypami. Wśród 61 izolatów klinicznych od pacjentów po przeszczepie nerki wyróżniono 52 różne genotypy G1-G52 (Tabela 34). U pięciu pacjentów (P3, P5, P16, P23, P47), od których przebadano więcej niż jeden izolat, każdy z nich wykazywał odrębny genotyp.



Rysunek 20. Porównanie podobieństwa genetycznego 61 szczepów *Klebsiella pneumoniae* izolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki z grupy badanej. 1R - szczep referencyjny *K. pneumoniae* ATCC 700603; 2R - szczep odnośnikowy *K. pneumoniae* KPC; P_i - poziom identyczności; C_p - całkowite podobieństwo. Szczepy posiadające ten sam genotyp (G) wyróżniono kolorem: G13 - czerwony, G14 - jasny szary, G15 - ciemny szary, G29 - żółty, G38 - turkusowy, G43 - zielony, G46 - niebieski

Tabela 34. Analiza pokrewieństwa genetycznego 61 szczepów *K. pneumoniae* izolowanych od 54 pacjentów po przeszczepie nerki z grupy badanej. Szczepy posiadające ten sam genotyp (G) wyróżniono kolorem: G13 – czerwony, G14 – jasny szary, G15 – ciemny szary, G29 – żółty, G38 – turkusowy, G43 – zielony, G46 – niebieski

Nr izolatu	Nr pacjenta*	Genotyp	Rodzaj materiału	Data pobrania (msc/rok)	ESBL	Rodzaj ZUM**
1B	P1	G1	mocz	03/2013	1	IV
2B	P2	G2	mocz	04/2013	1	I
3B	P3	G3	mocz	04/2013	0	II
4B	P4	G4	mocz	05/2013	1	II
5B	P5	G5	mocz	05/2013	1	I
6B	P6	G6	mocz	06/2013	1	III
7B	P7	G7	mocz	06/2013	1	II
8B	P8	G8	mocz	06/2013	1	II
9B	P9	G9	mocz	07/2013	1	IV
10B	P3	G10	mocz	07/2013	1	II
11B	P10	G11	mocz	08/2013	1	I
12B	P11	G12	mocz	08/2013	1	I
13B	P12	G13	mocz	09/2013	1	III
14B	P13	G13	mocz	09/2013	0	I
15B	P14	G14	mocz	09/2013	0	I
16B	P15	G15	mocz	10/2013	1	I
17B	P16	G14	mocz	10/2013	1	I
18B	P16	G13	mocz	10/2013	1	I
19B	P17	G15	mocz	10/2013	1	I
20B	P18	G16	mocz	11/2013	1	I
21B	P19	G17	mocz	11/2013	1	II
22B	P20	G18	mocz	11/2013	1	III
23B	P21	G19	mocz	01/2014	1	II
24B	P22	G20	mocz	01/2014	1	III
25B	P23	G21	mocz	02/2014	1	III
26B	P5	G22	mocz	02/2014	1	III
27B	P24	G23	mocz	02/2014	1	III
28B	P25	G24	mocz	02/2014	1	III
29B	P26	G25	mocz	02/2014	1	I
30B	P27	G26	mocz	03/2014	0	II
31B	P28	G27	mocz	05/2014	1	I
32B	P29	G28	mocz	07/2014	1	I
33B	P30	G29	mocz	08/2014	0	I
34B	P31	G30	mocz	08/2014	1	I
35B	P32	G31	mocz	09/2014	0	II
36B	P33	G32	mocz	09/2014	1	III
37B	P5	G29	mocz	09/2014	1	IV
38B	P34	G33	mocz	12/2014	1	I
39B	P35	G34	mocz	12/2014	0	III
40B	P36	G29	mocz	12/2014	1	I
41B	P37	G35	mocz	12/2014	1	I
42B	P38	G36	mocz	11/2017	0	IV
43B	P39	G37	mocz	12/2017	1	I
44B	P40	G38	mocz	12/2017	1	IV
45B	P41	G38	mocz	01/2018	1	III
46B	P42	G39	mocz	01/2018	NDM	I
47B	P43	G40	mocz	01/2018	0	I
48B	P44	G41	mocz	01/2018	0	I
49B	P45	G42	mocz	02/2018	0	I
50B	P46	G43	mocz	03/2018	1	I
51B	P47	G43	mocz	03/2018	1	I
52B	P47	G44	mocz	03/2018	1	I
53B	P48	G45	mocz	03/2018	NDM	I
54B	P49	G46	mocz	03/2018	1	I
55B	P50	G46	mocz	04/2018	1	I
56B	P47	G47	mocz	04/2018	0	III
57B	P51	G48	mocz	07/2018	0	IV
58B	P23	G49	mocz	07/2018	0	III
59B	P52	G50	mocz	07/2018	1	I

Nr izolatu	Nr pacjenta*	Genotyp	Rodzaj materiału	Data pobrania (msc/rok)	ESBL	Rodzaj ZUM**
60B	P53	G51	mocz	07/2018	1	I
61B	P54	G52	mocz	07/2018	1	II

*Pogrubioną czcionką wyróżniono rekordy dla pacjentów, u których przebadano więcej niż jeden izolat (P3, P5, P16, P23, P47);
 **I – bezobjawowa bakteriuria (ABU), II – dolne ZUM, III – górne ZUM, IV – urosepsa; ESBL – szczepy *K. pneumoniae* zdolne do wytwarzania β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (1 – występowanie β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, 0 - brak)

Za poziom identyczności (P_i) izolatów przyjęto 98%. Szczepy wykazujące zbieżność prążków równą co najmniej 98% zostały zaklasyfikowane jako posiadające ten sam genotyp (pochodzenie klonalne szczepów). U 16 pacjentów zidentyfikowano 7 blisko spokrewnionych genotypów. Szczepy o numerach 13B, 14B i 18B (pacjenci P12, P13 i P16) wykazywały ten sam genotyp G13, szczepy o numerach 15B i 17B (pacjenci P14 i P16) wykazywały ten sam genotyp G14, szczepy o numerach 16B i 19B (pacjenci P15 i P17) wykazywały ten sam genotyp G15, szczepy o numerach 33B, 37B i 40B (pacjenci P30, P5 i P36) wykazywały ten sam genotyp G29, szczepy o numerach 44B i 45B (pacjenci P40 i P41) wykazywały ten sam genotyp G38, szczepy o numerach 50B i 51B (pacjenci P46 i P47) wykazywały ten sam genotyp G43 oraz szczepy o numerach 54B i 55B (pacjenci P49 i P50) również wykazywały ten sam genotyp G46.

Dla potwierdzenia lub wykluczenia transmisji poziomej w warunkach szpitalnych, te same wzorce genotypowe *K. pneumoniae* zostały dodatkowo przetestowane w gradiencie temperatury denaturacji PCR MP. Ten sam rozkład prążków we wzorze elektroforetycznym dla skróconego gradientu temperatury denaturacji w cyklach reakcji PCR świadczy o tym samym genotypie. Analiza potwierdziła obecność zakażeń szpitalnych. Dwa szczepy o numerach 17B i 18B o różnych genotypach (G14 i G13) i różnych profilach czynników wirulencji zostały wyizolowane w tym samym czasie od tego samego pacjenta P16. Szczepy te wykazywały genotypy zgodne z genotypami trzech innych szczepów izolowanych miesiąc wcześniej od trzech różnych pacjentów (szczep numer 15B o genotypie G14 izolowany od pacjenta P14; szczepy o numerach 13B i 14B o genotypie G13 izolowane od pacjentów P12 i P13). Wszystkie opisane izolaty wykazujące blisko spokrewnione genotypy wytwarzały β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym.

Wyniki analizy pokrewieństwa genetycznego szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki zostały opublikowane w *Journal of Medical Microbiology* w publikacji: Gołębiowska J., Krawczyk B., Wysocka M., Ewiak A., Komarnicka J., Bronk M., Rutkowski B., Dębska-Śliżińska A. "Host and pathogen factors in *Klebsiella pneumoniae* upper urinary tract infections in renal transplant patients." *Journal of Medical Microbiology* (2019) 68, 382-394.

6.4.1.DYSKUSJA

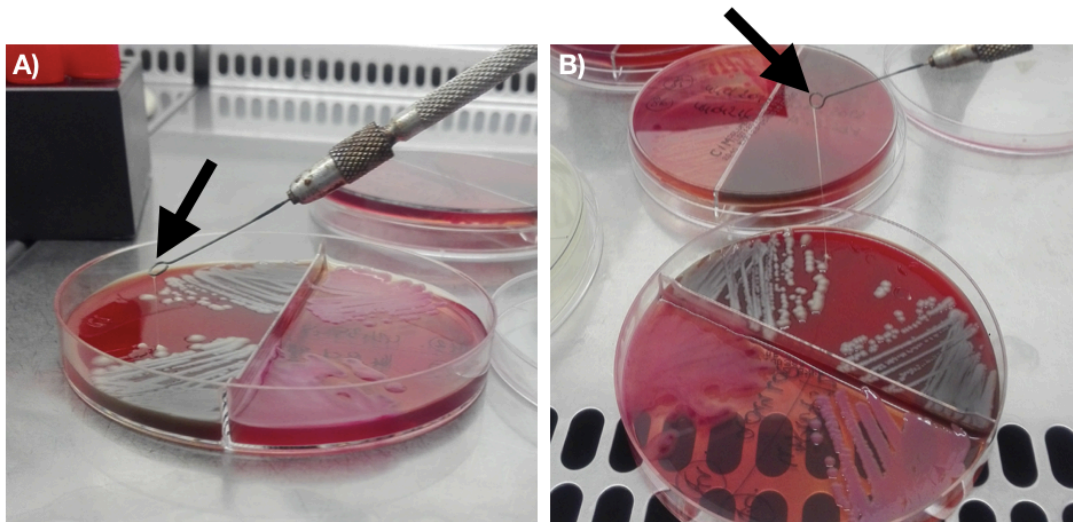
Przeanalizowano szczepy *Klebsiella pneumoniae* izolowane od pacjentów po przeszczepie nerki, hospitalizowanych w tym samym oddziale jednego szpitala. Głównym celem zadania było ustalenie czy szczepy izolowane od biorców nerki były szczepami środowiska pozaszpitalnego czy nabytymi w szpitalu. ZUM może być spowodowane tymi samymi bakteriami *K. pneumoniae*, którymi skolonizowany jest układ pokarmowy pacjenta. Mogą to być szczepy komensalne pacjenta lub szczepy pochodzenia szpitalnego. U pacjenta, który przebywa dłuższy czas w środowisku szpitalnym, dochodzi do wymiany komensalnej mikrobioty jelitowej na szpitalną. Niektóre badania donoszą, że szczepy ze środowiska

pozaszpitalnego są bardziej wirulentne niż wielolekoporne szczepy izolowane w szpitalu [229]. Holt i wsp. sugerują, że wirulencja nie jest zależna od tła genetycznego szczepu i nie jest definiowana przez typ sekwencji [104]. Dlatego w celu ustalenia pokrewieństwa szczepów *K. pneumoniae* izolowanych od pacjentów z grupy badanej nie wykorzystano metody MLST do identyfikacji poszczególnych typów sekwencji lub kompleksów klonalnych, ale zastosowano metodę PCR MP. PCR MP jest metodą o wysokim potencjale różnicującym, stąd może być przydatna w badaniach epidemicznych, poszukujących relacji pomiędzy szczepami izolowanymi z pojedynczej jednostki szpitalnej z krótkoterminowych epidemii, w celu określenia źródła, rezerwuaru i sposobu rozprzestrzeniania się infekcji [199].

Wyniki typowania genetycznego z zastosowaniem metody PCR MP wykazały dużą różnorodność genetyczną badanych szczepów. 45 unikalnych genotypów klinicznych szczepów *K. pneumoniae* może sugerować kolonizację dróg moczowych przez szczepy komensalne, np. z przewodu pokarmowego lub wstępującej infekcji pozaszpitalnej. Wymaga to jednak weryfikacji przez porównanie otrzymanych genotypów z genotypami izolatów z kału lub wymazów z odbytu, co nie było przedmiotem rozprawy. Analiza pokrewieństwa genetycznego szczepów potwierdziła 16 przypadków poziomej transmisji w warunkach szpitalnych. Izolaty wytwarzające ESBL od 16 pacjentów miały 7 blisko spokrewnionych genotypów wskazujących na zakażenia szpitalne. Dwóch pacjentów przeszło trzy niezależne epizody ZUM o etiologii *K. pneumoniae*. Każdy izolat miał inny genotyp i inny profil czynników wirulencji, co sugeruje ponowną infekcję zamiast nawrotu. Dystrybucja genotypów nie miała znaczących powiązań z heterogenicznym profilem czynników wirulencji. W ostatnim czasie Holt i wsp. wykazali dużą różnorodność genotypów *K. pneumoniae*, które są utrzymywane w warunkach szpitalnych dzięki presji selekcyjnej antybiotyków [104,150].

6.5. Analiza fenotypu hipermukoidalnego

Celem zadania było wykrycie szczepów *K. pneumoniae* posiadających zdolność do tworzenia fenotypu hipermukoidalnego (HM, ang. *hypermucoviscosity*) za pomocą testu ciągliwości (ang. *String Test*), zarówno wśród szczepów z grupy badanej, jak i grupy kontrolnej. Pozytywny wynik testu ciągliwości wskazujący na obecność fenotypu hipermukoidalnego otrzymano tylko w przypadku dwóch szczepów (3,3%) wyizolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki i jednym wyizolowanym od pacjenta z grupy kontrolnej (2,8%). Długość śluzowatego łańcucha w przypadku szczepów izolowanych z grupy badanej wyniosła 35 mm i 150 mm odpowiednio dla szczepu numer 49B i 50B (Rysunek 21. A, B). Szczep numer 18K wyizolowany z grupy kontrolnej tworzył lepki łańcuch o długości 15 mm.



Rysunek 21. Wyniki testu ciągliwości dla szczepów *K. pneumoniae* zdolnych do tworzenia fenotypu hiper mukoidalnego. A) Dla szczepu numer 49B wyizolowanego od pacjenta z grupy badanej, uzyskano kolonie, które rozciągały się na długość 35 mm przy użyciu pętli do inokulacji (czarna strzałka), co wskazuje na pozytywny wynik testu. B) Dla szczepu numer 50B wyizolowanego od pacjenta z grupy badanej, uzyskano kolonie, które rozciągały się na długość 150 mm przy użyciu pętli do inokulacji (czarna strzałka), co wskazuje na pozytywny wynik testu

W celu omówienia molekularnych podstaw klinicznej identyfikacji i wirulencji zakażenia szczepami *K. pneumoniae* wykazującymi fenotyp hiper mukoidalny wśród biorców nerki, a także konwergencji szczepów opornych na antybiotyki i hiperwirulentnych, przeprowadzono sekwencjonowanie całych genomów dwóch wybranych na podstawie testu fenotypowego szczepów *K. pneumoniae* o fenotypie hiper mukoidalnym wyizolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki (szczep numer 49B i 50B). Podsumowanie sekwencji genomów przedstawiono w tabeli S4 (szczep numer 49B, GenBank BioSample: SAMN14840029; szczep numer 50B, GenBank BioSample: SAMN14840028). Charakterystyka kliniczna pacjentów oraz charakterystyka mikrobiologiczna i genetyczna szczepów została przedstawiona w tabeli 35.

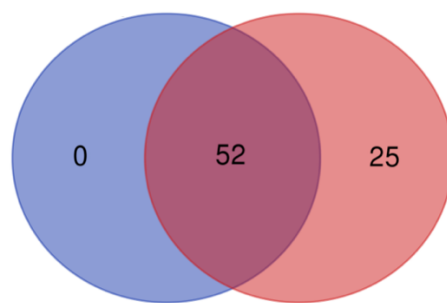
Tabela 35. Charakterystyka mikrobiologiczna i genetyczna izolatów HM *K. pneumoniae*. Charakterystyka obejmuje dane demograficzne i kliniczne pacjentów, terapię immunosupresyjną, profil oporności bakterii na antybiotyki, profil genów związanych z wirulencją szczepów, serotyp oraz typ sekwencyjny uzyskany w oparciu o metodę MLST dla izolatów klinicznych *K. pneumoniae* wykazujących fenotyp hiper mukoidalny

Charakterystyka kliniczna	Szczep nr 49B	Szczep nr 50B
Wiek	71	52
Płeć	M	M
Główna choroba podstawowa	PChN o nieznannej etiologii	Cukrzyca typu 1 z nefropatią cukrzycową
Rodzaj próbki	mocz	mocz
Rodzaj infekcji	ABU	ABU
Cewnik moczowy	-	-
Cukrzyca	PTDM	Cukrzyca typu 1
HD przed przeszczepem nerki	-	+
CAPD przed przeszczepem nerki	+	-
Nawracające ZUM w przeszłości	+	+
Upośledzenie przepływu moczu	Historia przeszczepu reimplantacji moczowodu z powodu refluksu pęcherzowo-moczowodowego, BPH, następnie przeprowadzono TURP	Zwężenie cewki moczowej, BPH, hiperrefleksja wypieracza – dwukrotnie przeprowadzono TURP
Protokół immunosupresji	tymoglobulina, glikokortykosteroidy, tacrolimus, MMF	bazyliksymab, glikokortykosteroidy, tacrolimus, MMF
Wynik kliniczny	ozdrowiały	trwający

Charakterystyka mikrobiologiczna	Szczep nr 49B	Szczep nr 50B
Profil antybiotykooporności	Amoksylicyna/kwas klawulanowy; Ampicylina; Ciprofloksacyna; Trimetoprym/Sulfametoksazol; Piperacylina/Tazobaktam*	Amoksylicyna/kwas klawulanowy; Ampicylina; Cefalotyna; Cefepim; Cefotaksym; Ceftazydim; Cefuroksym; Ciprofloksacyna; Piperacylina/Tazobaktam
ESBL	-	+
Długość w teście ciągliwości (mm)	35	150
Charakterystyka genetyczna		
ST	152	152
Geny oporności		
aminoglikozydy i fluorochinolony	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
aminoglikozydy	<i>aadA1, aadA16, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>aadA1, aadA16, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>
beta-laktamy	<i>bla_{OXA-1}, bla_{SHV-187}, bla_{TEM-1B}</i>	<i>bla_{CTX-M-15}, bla_{OXA-1}, bla_{SHV-187}, bla_{TEM-1B}</i>
fosfomycyna	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>
fenikol	<i>catA1, catB3</i>	<i>catA1, catB3</i>
chinolon	<i>oqxA, oqxB</i>	<i>oqxA, oqxB</i>
ryfampicyna	<i>ARR-3</i>	<i>ARR-3</i>
sulfonamidy	<i>sul1, sul2</i>	<i>sul1, sul2</i>
trimetoprim	<i>dfrA1, dfrA27</i>	<i>dfrA1, dfrA14, dfrA27</i>
Geny wirulencji		
<i>rmpA / rmpA2</i>	-	-
enterobaktyna	<i>entABCDEFGHI, fepABCDG, fes, ybdA</i>	<i>entABCDEFGHI, fepABCDG, fes, ybdA</i>
aalmochelina	<i>iroE</i>	<i>iroE</i>
yersiniabaktyna	-	<i>ybtAEPSTUX, irp1, irp2, fyuA</i>
adhezyny	<i>fimABCDEFGHIK, mrkABCDFHJ, epcEDCBAR</i>	<i>fimABCDEFGHIK, mrkABCDFHJ, epcEDCBAR</i>
Serotyp otoczki	KL149	KL149
Replikon plazmidu	IncFIB(K), IncFII(K)	IncFIB(K), IncFII(K)
ICEs	-	ICEKp1, ICEKp2

ABU – bezobjawowa bakteriuria; BPH – łagodny przerost prostaty; CAPD – ciągła ambulatoryjna dializa otrzewnowa; DM – cukrzyca; ent – enterobaktyna; ESBL – β-laktamaza o rozszerzonym spektrum działania; HD – hemodializa; hvKP – hiperwirulentne *Klebsiella pneumoniae*; ICEs - integracyjne elementy koniugacyjne; iro - salmochelina; M - mężczyzna; MMF - mykofenolan mofetylu; PChN – przewlekła choroba nerek; PTDM - cukrzyca po przeszczepie; ST - typ sekwencji; TURP - przezcewkowa resekcja prostaty; ZUM - zakażenie dróg moczowych; VAP - zapalenie płuc związane z respiratorem; *ybt* - yersiniabaktyna; *) średniowrażliwy

Na podstawie sekwencji genomów wykazano, że badane izolaty należą do typu sekwencyjnego ST152. Zidentyfikowano geny kodujące czynniki wirulencji i przypisano ich występowanie do plazmidu lub chromosomu (Tabela S5, S6). Szczep numer 49B wykazał obecność 52 genów kodujących czynniki wirulencji i wszystkie zostały znalezione w kontigach przypisanych do chromosomu (Tabela S6, Rysunek 22). Szczep numer 50B odznaczał się obecnością 52 genów wspólnych dla szczepu numer 49B oraz dodatkowymi 25 genami kodującymi czynniki wirulencji, z czego 4 z nich zostały przypisane do plazmidu (Tabela S6, Rysunek 22). Oba szczepy posiadały geny kodujące siderofory (enterobaktynę, salmochelinę), adhezyny, otoczki polisacharydowe, białka błony zewnętrznej oraz system sekrecji typu VI. Szczep numer 50B posiadał również geny kodujące siderofory (yersiniabaktynę), lipopolisacharyd, białko zawierające powtórzenie PaaR (KPHS_23120) oraz pokrewne białko odpornościowe (*tli1*).



Rysunek 22. Zależność genów kodujących czynniki wirulencji między hiper mukoidalnymi szczepami *K. pneumoniae* o numerze 49B (niebieski) i 50B (czerwony) przedstawiona za pomocą diagramu Venna

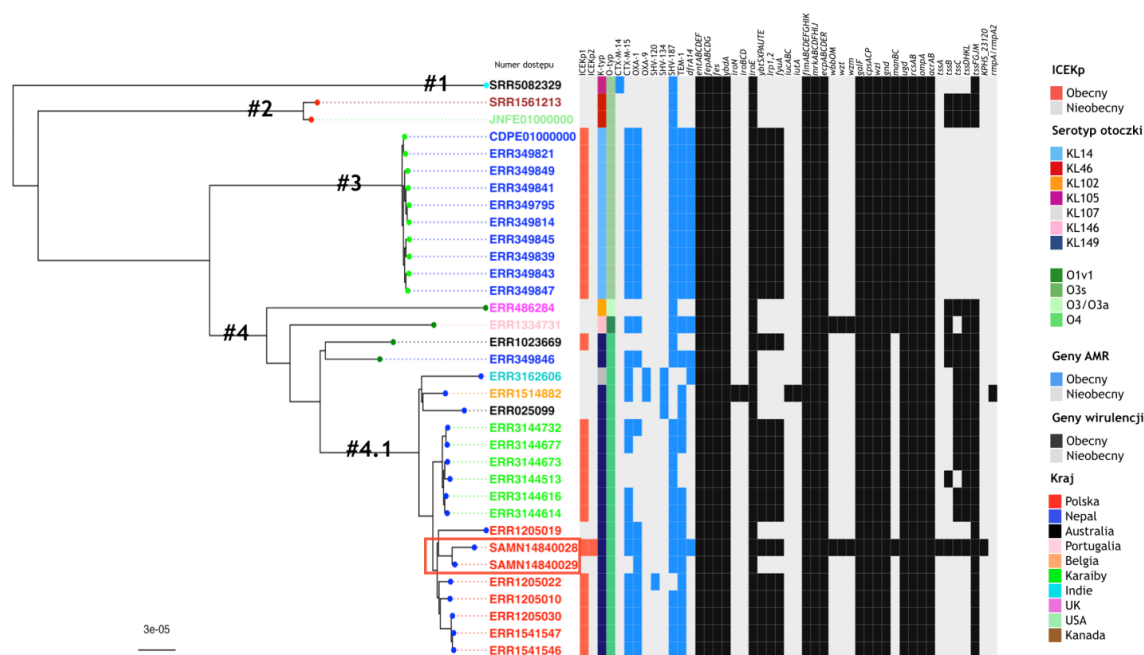
Zidentyfikowano również geny oporności dla obu izolatów (Tabela S7). Badane szczepy numer 49B i 50B charakteryzowały się opornością wielolekową, co zostało potwierdzone przez współwystępowanie kilku genów związanych z opornością na różne klasy środków przeciwdrobnoustrojowych: *aac(6')-Ib-cr*, *aadA1*, *aadA16*, *aph(3'')-Ib* i *aph(6)-Id* związanych z opornością na aminoglikozydy, *aac(6')-Ib-cr* warunkujący oporność na flurochinolony, *bla_{SHV-187}*, *bla_{TEM-1B}* i *bla_{OXA-1}* nadające oporność na antybiotyki β-laktamowe, *fosA* odpowiedzialny za oporność na fosfomicynę, *catA1* i *catB3* warunkujące oporność na fenikol, *oqxA* i *oqxB* nadające oporność na chinolony, *ARR-3* warunkujący oporność na ryfampicynę, geny *sul1* i *sul2* oraz *dfrA1*, *dfrA14* i *dfrA27* nadające oporność odpowiednio na sulfonamidy i trimetoprim. Geny *bla_{SHV-187}*, *fosA*, *oqxA* i *oqxB* znaleziono w kontigach ocenianych jako kontigi chromosomalne w obu przypadkach. Wszystkie pozostałe geny AMR znaleziono w kontigach ocenianych jako kontigi plazmidów. Ponadto wykryto gen *bla_{CTX-M-15}*, który wystąpił tylko w przypadku szczepu numer 50B.

Oba izolaty wykazują ten sam serotyp otoczkowy KL149 i mają te same replikony plazmidowe IncFIB i IncFII, ale wykazują inny skład genów chromosomalnych i plazmidowych. Szczep numer 50B dodatkowo zawiera mobilne elementy genetyczne, tj. integracyjne elementy koniugacyjne ICEKp1 i ICEKp2 zlokalizowane w kontigach chromosomowych, podczas gdy nie zidentyfikowano ICE w przypadku szczepu numer 49B.

Porównanie całych genomów wykazało, że dwa izolaty o typie sekwencyjnym ST152, pomimo różnic w genomie dodatkowym, były silnie powiązane. Nie stwierdzono polimorfizmów pojedynczo-nukleotydowych w genomie rdzeniowym (cgSNPs, ang. *core genome SNPs*), natomiast w całym genomie zidentyfikowano dziewięć SNP (wgSNPs, ang. *whole genome SNPs*) w porównaniu ze szczepem referencyjnym ST152 (TOP52_1721_U1).

W celu skonstruowania drzewa filogenetycznego rdzeni genomów, pobrano sekwencje całych genomów dla 32 izolatów o typie sekwencyjnym ST152 z czterech wcześniejszych badań [106,230-232]. Badane szczepy o numerze 49B (SAMN14840029) i 50B (SAMN14840028) skupiły się w klastrze sześciu innych genomów szczepów *K. pneumoniae* pochodzących z Polski [231] (Rysunek 23). Porównując różnice między badanymi szczepami o numerach 49B (SAMN14840029) i 50B (SAMN14840028), a pokrewnymi genomami okazało się, że szczep 49B utracił gen *dfrA14* i sąsiednią sekwencję insercyjną oraz utracił w innym kontigu gen *bla_{CTX-M-15}* z elementu ISEcp1-*bla_{CTX-M-15}* [233]. Występowanie ICEKp1 i ICEKp2 wśród 34 szczepów *K. pneumoniae* o typie sekwencyjnym ST152 wykazało, że podczas gdy, ICEKp1 był

obecny w wielu izolatach, to ICEKp2 był obecny tylko dla szczepu numer 50B. Spośród grupy 8 polskich genomów o typie sekwencyjnym ST152 znajdujących się w tym samym klastrze, dwa z nich nie miały elementów ICE (badany szczep numer 49B – SAMN14840029 oraz ERR1205019). Spośród 34 analizowanych szczepów, ICE nie występowały jednocześnie z plazmidem zawierającym geny kodujące czynnik mukoidalny *rmpA* i *rmpA2*, które kojarzone są ze zwiększoną wirulencją (Rysunek 23) [150,159].



Rysunek 23. Drzewo filogenetyczne oparte na połączonych genach rdzeniowych szczepów *K. pneumoniae* ST152. Drzewo genomów rdzeniowych zostało skonstruowane dla trzydziestu dwóch genomów ST152 pobranych z czterech wcześniejszych badań [106,230-232] wraz z dwoma genomami izolatów badanych w rozprawie doktorskiej (szczep numer 49B - SAMN14840029, szczep numer 50B - SAMN14840028; czerwona ramka). Numery klastrow (#1-4.1) oznaczono na drzewie filogenetycznym. Kolor węzła zewnętrznego powiązany z klastrem (cyjan - klastery nr 1, czerwony - klastery nr 2, jasnozielony - klastery nr 3, ciemnozielony - klastery nr 4, niebieski - klastery nr 4.1). Kraj pochodzenia izolatów pokazano w kolorze numeru dostępu genomu (czerwony - Polska, niebieski - Nepal, czarny - Australia, różowy - Portugalia, pomarańczowy - Belgia, zielony - Karaiby, cyjan - Indie, magenta - Wielka Brytania (UK), jasnozielony - Stany Zjednoczone Ameryki (USA), Kanada brązowy). W heatmapie pokazano profil obecności / nieobecności genotypu dla genów kodujących determinanty oporności (AMR) (niebieski - obecny, szary - nieobecny) i determinanty wirulencji (czarny - obecny, szary - nieobecny), a także obecność / nieobecność ICEKp (czerwony - obecny, szary - nieobecny), typ otoczki (niebieski - KL14, czerwony - KL46, pomarańczowy - KL102, magenta - KL105, szary - KL107, różowy - KL146, głęboki niebieski - KL149) i typ O (ciemnozielony - O1v1, khaki - O3s, jasnozielony - O3 / O3a, zielony - O4)

Wyniki analizy fenotypu hiper mukoidalnego szczepów *K. pneumoniae* zostały opublikowane w czasopiśmie *Genes* w publikacji: Wysocka M., Zamudio R., Oggioni M.R., Gołębiowska J., Dudziak A., Krawczyk B. “The new *Klebsiella pneumoniae* ST152 variants with hypermucoviscous phenotype isolated from renal transplant recipients with asymptomatic bacteriuria – genetic characteristics by WGS.” *Genes* (2020) 11(10), 1189.

6.5.1.DYSKUSJA

Hiperwirulentny szczep *K. pneumoniae* (hvKp) po raz pierwszy został opisany w połowie lat 80. w Azji Południowo-Wschodniej i uznano go za główną przyczynę wysoce inwazyjnej infekcji - ropnia wątroby. W ciągu dziesięcioleci hvKp rozprzestrzenił się na całym świecie powodując różne infekcje. W przeciwieństwie do klasycznych szczepów *K. pneumoniae* (cKp), hvKp może powodować zakażenia pozaszpitalne, często u młodych, zdrowych osób [133,134,159]. hvKp jest przenoszony w przewodzie

pokarmowym, co przyczynia się do jego rozprzestrzeniania w środowisku pozaszpitalnym i w placówkach opieki zdrowotnej. Genetyczne determinanty hiperwirulencji często znajdują się na dużych plazmidach wirulencji, jak również na ruchomych elementach genetycznych chromosomów, które można wykorzystać jako biomarkery do odróżnienia hvKp od izolatów klinicznych cKp. Dotychczas wyróżniono determinanty wirulencji hvKp obejmujące: cztery systemy pozyskiwania żelaza, otoczki K1 i K2, geny zwiększające produkcję otoczek oraz toksynę zwaną kolibaktyną. Dodatkowo, cechą wyróżniającą wiele hiperwirulentnych izolatów stał się fenotyp hiperbukoidalny (HM), który jest powszechnie uważany za zastępczy marker zwiększonej zjadliwości hiperwirulentnego wariantu *K. pneumoniae* (hvKP) [150,159]. Z wyjątkiem oporności na ampicylinę, większość szczepów hvKp rzadko jest oporna na powszechnie stosowane antybiotyki [234]. Jednak ostatnie badania wykazały, że szczepy hvKp nabyły oporność na β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ESBL) i karbapenemazy [235], co stanowi nowe wyzwanie w walce z tym już i tak niebezpiecznym drobnoustrojem.

W przedstawionych badaniach, za pomocą testu ciągłości, wykryto dwa szczepy *K. pneumoniae* wyizolowane od biorców nerki, które posiadały zdolność do tworzenia fenotypu hiperbukoidalnego. W literaturze istnieje tylko kilka doniesień o ZUM spowodowanym przez HMKp [236] i żadne z nich nie dotyczy grupy pacjentów z ABU. Istnieje wiele nierozstrzygniętych pytań dotyczących biochemicznej natury i wpływu fenotypu HM. W prezentowanej rozprawie przeanalizowano genomy, cechy mikrobiologiczne i kliniczne dwóch przypadków bezobjawowej bakteriurii u biorców przeszczepu nerki spowodowanej przez szczepy *K. pneumoniae* wykazujące fenotyp hiperbukoidalny.

Dopiero w ostatnich latach odnotowano przypadki występowania fenotypu HM w izolatach *K. pneumoniae* wyizolowanych z ZUM od osób starszych [236]. W badaniach własnych, szczep numer 50B wykazywał śluzowy fenotyp, objawiający się ciągłością kolonii do łańcucha o długości 150 mm, co przekracza najdłuższy dotychczas zanotowany wynik testu ciągłości (100 mm) dla szczepów izolowanych z ZUM [236]. Istnieje hipoteza, że fenotyp hiperbukoidalny w hiperwirulentnych szczepach *K. pneumoniae* może być odpowiedzialny za trudności w opróżnianiu cewnika i nawracające ZUM u pacjentów [237]. Szczep numer 50B badany w rozprawie posiada cechy nadające mu potencjał do wywoływania nawrotowych epizodów ZUM u pacjenta, od którego został on wyizolowany.

Dobrze znaną definicją szczepów hiperwirulentnych jest obecność typu otoczki K1, genów *rmpA/rmpA2*, genu *magA*, fenotypu HM oraz przynależność do typu sekwencyjnego ST23 [134,150,159]. Chociaż w kilku pracach wykazano, że fenotyp HM może wystąpić bez nadprodukcji otoczki [238,239]. Geny *rmpA* i *rmpA2* są zazwyczaj zlokalizowane odpowiednio w pobliżu *iro* i *iuc* na plazmidach wirulencji. Jednak geny *rmpA* i *iro* mogą być również kolokalizowane w integracyjnym elemencie koniugacyjnym ICEKp1, a geny *rmpA2* i *iuc* w niekanonicznych miejscach na plazmidach wirulencji [149]. Oba badane izolaty od pacjentów z ABU nie wykazywały obecności genów *rmpA/rmpA2* i *magA*, pomimo fenotypu HM.

Ponadto, oba szczepy HMKp zawierały podzbiór rdzeniowych genów wirulencji kodowanych na chromosomach, które mogą pomóc w ustaleniu zakażeń oportunistycznych u gospodarzy. Należą do nich *locus* rdzenia kodującego biosyntezę enterobaktyny sideroforu (Ent), *locus* rdzenia *fim* i *mrk* kodującego odpowiednio fimbrie typu 1 i typu 3, a także *loci* biosyntezy polisacharydu otoczkowego (antygen K)

i lipopolisacharydu (antygen O). Czynniki te biorą udział we wczesnych etapach infekcji i / lub unikaniu mechanizmów obronnych gospodarza [240]. Obecność sideroforów związanych z obecnością genów takich jak *ybtS*, *entB*, *irp2*, *fyuA* i *iutA* może ułatwiać bakteriom kolonizację oraz przetrwanie w organizmie pacjenta, prowadząc w efekcie do nasilenia zakażenia [104]. Wiele ostatnich badań donosi o wysokiej częstości występowania aerobakty w szczepach hvKp i sugeruje, że to ona jest krytycznym czynnikiem wirulencji w hvKp [239,241]. Również w ostatnich badaniach *in silico* wykazano, że yersiniabaktyna była najczęstszym sideroforem występującym w hiperwirulentnych/ hiper mukoidalnych wariantach *K. pneumoniae* [104]. Geny kodujące yersiniabaktynę (*ybtAEPSTUX*, *irp1*, *irp2*, *fyuA*) zostały wykryte w jednym z badanych w rozprawie izolatów (szczep numer 50B). W *K. pneumoniae* locus *ybt* jest zwykle mobilizowany przez integracyjny element koniugacyjny (ICEKp1), który integruje się z genem tRNA asparagianinu (Asn), ale czasami może być również mobilizowany przez plazmidy [149]. ICEKp1 jako element mobilny wydaje się być dość powszechny w szczepach klinicznych i środowiskowych, zarówno w klonach klasycznych, jak i hiperwirulentnych [149]. W roku 2019 Farzand i wsp. zidentyfikowali i scharakteryzowali w *K. pneumoniae* drugi integracyjny element koniugacyjny - ICEKp2 [213]. W kilku innych badaniach stwierdzono, że różne siderofory i geny kodujące fenotyp HM, znajdują się na tym samym plazmidzie wirulencji pLVPK, który nie jest często rozpowszechniony w klasycznych szczepach *K. pneumoniae* (cKp) [237,242,243]. W przedstawionej rozprawie, dwa hiper mukoidalne izolaty *K. pneumoniae* mają te same replikony plazmidów tj. IncFIB i IncFII, ale różnią się składem genowym w chromosomach i w plazmidach. Szczep o numerze 50 zawiera elementy koniugacyjne ICEKp1 i ICEKp2 wbudowane prawdopodobnie w chromosom bakteryjny. W przypadku szczepu o numerze 49B nie stwierdzono obecności ICEs (Tabela 35). Ponadto, szczep numer 50B zawiera cztery geny kodujące siderofory (*ybtETU* i *fyuA*), które najprawdopodobniej zlokalizowane są na plazmidach (Tabela S5, S6). Geny te, były nieobecne w przypadku szczepu o numerze 49B. Można zasugerować, że ruchome elementy genetyczne, takie jak integracyjne elementy koniugacyjne i plazmidy, mogą być potencjalnymi czynnikami odpowiedzialnymi za długość śluzowatego łańcucha w teście ciągłości obserwowanego w przypadku szczepu o numerze 50B.

Szczepy *K. pneumoniae* są bardzo zróżnicowane genetycznie, wykazują wysoką wirulencję lub wielolekooporność lub łączą obie te cechy. Badane izolaty charakteryzowały się opornością wielolekową, co zostało potwierdzone przez współwystępowanie kilku genów oporności. Geny oporności *bla_{SHV-187}*, *fosA*, *oqxA* i *oqxB* znaleziono w kontigach ocenianych jako kontigi chromosomalne w obu przypadkach. Wszystkie pozostałe geny oporności *aac(6')-Ib-cr*, *aadA1*, *aadA16*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{TEM-1B}*, *bla_{OXA-1}*, *catA1*, *catB3*, *ARR-3*, *sul1*, *sul2*, *dfrA1*, *dfrA14*, *dfrA27* znaleziono w kontigach ocenianych jako kontigi plazmidów. Ponadto odnotowano gen kodujący ESBL *bla_{CTX-M-15}*, który wystąpił tylko w przypadku szczepu numer 50B. Ten gen oporności związany z fenotypem ESBL jest jednym z najczęściej występujących na świecie [230].

Zazwyczaj szczepy wysoce odporne są związane ze szpitalnymi zakażeniami dróg moczowych, zapaleniem płuc lub bakteriamią, z kolei szczepy wysoce wirulentne są związane z przypadkami ropni wątroby nabytymi poza środowiskiem szpitalnym przez młode, zdrowe osoby, szczególnie w Azji Wschodniej. Jednak ostatnio coraz więcej publikacji donosi o zbieżności między wirulencją a opornością w szczepach *K. pneumoniae* powodujących objawowe infekcje z niekorzystnym skutkiem. W Europie

zgłoszono tylko kilka przypadków hvKp opornych na antybiotyki, a szczep hvKp wytwarzający ESBL zidentyfikowano tylko we Francji (n = 1) [244]. W prezentowanej rozprawie, jeden z badanych szczepów HMKp o numerze 50B wytwarzał β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania. Szczep ten, był wyizolowany od pacjenta, który przebywał w Polsce i nie podróżował do innych krajów. Pojawianie się szczepów ESBL-HMKp w środowisku szpitalnym jest niepokojące i stanowi wyzwanie dla personelu medycznego.

Holt i wsp. [104] wykazali, że szczepy o typie sekwencji ST23 i ST65 są dominujące wśród hiperwirulentnych szczepów *K. pneumoniae*. Do tej pory odnotowano tylko kilka przypadków ZUM wywołanych przez wysoce zjadliwe szczepy ST65, ST2836 i ST2888 w Azji Południowo-Wschodniej [236]. W przedstawionych w rozprawie doktorskiej badaniach, izolaty *K. pneumoniae* należały do typu sekwencyjnego ST152, który nie był wcześniej opisywany jako klon wysokiego ryzyka, nawet jeśli ostatnie badania wskazywały, że ST152 może rozprzestrzeniać się między pacjentami na tym samym lub różnych oddziałach, w obrębie i / lub między szpitalami [245]. W kolekcji genomów przeanalizowanych przez Davida i wsp. [231], ST152 jest drugim najczęściej występującym typem sekwencyjnym izolowanym w Polsce. Sześć izolatów pochodzących z tego badania [231] ściśle łączyło się z dwoma izolatami opisanymi w rozprawie. Co ciekawe, polski izolat ERR1205019, najbardziej podobny do dwóch izolatów opisanych w rozprawie, również wywodzi się z infekcji dróg moczowych i był ujemny na obecność yersiniabaktryny.

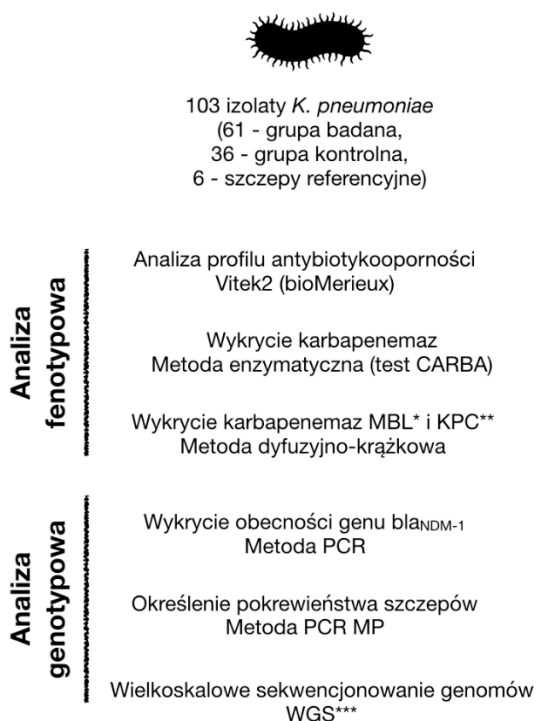
Odnotowano brak różnic w SNP genomów rdzeniowych i dziewięć zmian w genach oporności zlokalizowanych w plazmidzie i wyspach chromosomalnych genomów pomocniczych. Ta wysoka plastyczność genomu pomocniczego *K. pneumoniae* została również odnotowana przez Wyres i wsp. [106] i sugeruje zachowanie ostrożności podczas śledzenia potencjalnych epidemii szpitalnych na podstawie początkowych fenotypów w analizie mikrobiologicznej.

Chociaż fenotyp hiper mukoidalny jest głównie związany ze szczepami hvKp, nie znaleziono genów świadczących o wysokiej zjadliwości wśród badanych hiper mukoidalnych izolatów. Zauważono jednak, że istnieje różnica w liczności czynników wirulencji w porównaniu z innymi szczepami o typie sekwencyjnym ST152 wyizolowanymi w Polsce (Rysunek 23). Wysoka plastyczność genomu pomocniczego, który uczestniczy w HGT, ułatwia szybki import potencjalnych czynników wirulencji i może wskazywać na ewolucję tego klonu w kierunku zwiększonej zjadliwości i inwazyjności. U pacjentów po przeszczepie nerki, objawy ZUM mogą być maskowane z powodu zastosowanej immunosupresji i podawania antybiotyków w celach profilaktycznych. Istotnymi czynnikami ryzyka są również długoterminowa kolonizacja szpitalnymi szczepami *K. pneumoniae* lub nosicielstwo u pacjentów z obniżoną odpornością. Pojawienie się infekcji jest najczęstszą konsekwencją przerostu bakterii i braku kontroli immunologicznej pacjenta przyjmującego leki immunosupresyjne. Dla obu pacjentów odnotowano wcześniejsze epizody objawowego ZUM o etiologii *K. pneumoniae* ESBL+ i *E. coli*. Hipoteza, że fenotyp HM może korelować z trudnością opróżnienia cewnika, może wyjaśnić nawracające ZUM dla pacjenta, od którego wyizolowano szczep o numerze 50B. Środowisko jelita i tworzenie się biofilmu bakteryjnego w drogach moczowych może sprzyjać horyzontalnemu transferowi genów wirulencji i lekooporności od szczepów uropatogennych, jak również przyczyniać się do akumulacji mutacji [150]. Szczepy HMKp izolowane od pacjentów z ABU mogą konkurować o niszę i receptory z niebezpiecznymi szczepami uropatogennymi w moczu, jednocześnie nie wywołując w danym momencie objawów choroby. Jednak

kontakt szczepów HMKp z hiperwirulentnymi szczepami może doprowadzić do ich ewolucji i wzrostu ryzyka dla samego pacjenta, jak i środowiska szpitalnego.

6.6. Analiza pokrewieństwa genetycznego i lekooporności szczepów *K. pneumoniae* produkujących karbapenemazy NDM-1

W ostatnich latach na całym świecie nastąpił wzrost zakażeń wywołanych przez pałeczki *Klebsiella pneumoniae* wykazujące oporność na karbapenemy [172]. Również wśród zgromadzonej w ramach rozprawy puli szczepów, wykryto izolaty *K. pneumoniae* produkujące karbapenemazy, stąd jednym z zadań badawczych rozprawy doktorskiej była szczegółowa analiza fenotypowa i genotypowa tych szczepów oraz analiza pokrewieństwa genetycznego do celów epidemicznych. Badania przeprowadzono zgodnie ze schematem postępowania w ognisku epidemicznym [246]: od wykrycia obecności karbapenemaz metodą enzymatyczną (test β CARBA), poprzez analizę lekooporności, potwierdzenie obecności genu *bla*_{NDM-1} do określenia pokrewieństwa szczepów metodą PCR fingerprinting. Oceny wzajemnych relacji pomiędzy szczepami na poziomie genomu i ich kierunku ewolucji, dokonano w oparciu o sekwencjonowanie całego genomu metodą WGS. Przeprowadzono również analizę porównawczą zsekwencjonowanych szczepów z 101 międzynarodowymi izolatami *K. pneumoniae* pobranymi z bazy danych Patric (<https://patricbrc.org>), zapewniając najbardziej kompleksową charakterystykę szczepów bakteryjnych *Klebsiella pneumoniae* NDM-1. Schemat postępowania badawczego przedstawiono na rysunku 24.



Rysunek 24. Ogólny schemat analizy pokrewieństwa i lekooporności szczepów *K. pneumoniae* produkujących karbapenemazy NDM-1. *MBL (ang. Metallo- β -lactamase); **KPC (ang. *K. pneumoniae* carbapenemase); ***WGS (ang. Whole Genome Sequencing)



6.6.1. Wykrywanie karbapenemaz

Ze względu na pojawienie się w styczniu w 2018 r. pierwszego od 2016 r. szczepu *K. pneumoniae* opornego na karbapenemy (CPE, ang. *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*) u pacjenta hospitalizowanego w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego ze zdiagnozowanym ZUM po przeszczepie nerki, inni pacjenci przebywający od stycznia do kwietnia 2018 r. w tej samej klinice zostali poddani monitoringowi na obecność CPE *K. pneumoniae*.

W przedstawionej analizie pokrewieństwa i lekooporności szczepów *K. pneumoniae* produkujących karbapenemazy uwzględniono izolaty *K. pneumoniae* pochodzące z wymazów z odbytu z badań przesiewowych w kierunku nosicielstwa CPE od pacjentów z grupy badanej, jak i kontrolnej oraz izolaty *K. pneumoniae* pochodzące z moczu od pacjentów z obu grup, które dały pozytywny wynik w testach wykrycia karbapenemaz. Do badań włączono również szczep *K. pneumoniae* NDM wyizolowany w 2016 r. w tej samej klinice oraz jeden szczep *K. pneumoniae* z fenotypem NDM-1 wyizolowany z moczu pacjenta z ZUM pochodzącego z innej jednostki szpitalnej w tym samym roku co pozostałe szczepy. Grupę badanych pacjentów z przypisanymi do nich izolatami i typem próbki klinicznej, z której te izolaty pochodziły, zamieszczono w tabeli 36.

Tabela 36. Wyniki testów prowadzących do wykrycia karbapenemaz

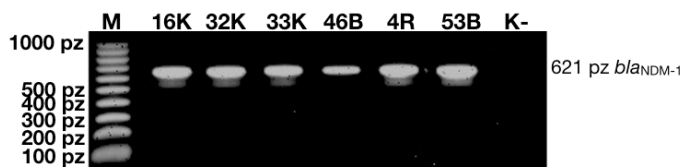
Numer izolatu wg kolekcji (Nazwa izolatu wg GenBank)	Numer pacjenta wg kolekcji*	Przeszczep nerki (0/1)**	Próba badana	Data izolacji (msc/rok)***	Test biochemiczny β CARBA	Testy fenotypowe w kierunku		Test genetyczny na obecność genu <i>bla</i> _{NDM-1}
						KPC	MBL	
16K (ND32)	P16	0	mocz	05/2016	+	-	+	+
46B (ND24)	P42	1	mocz	01/2018	+	-	+	+
3R (ND33)	P1R	0	kał	03/2018	+	-	+	+
4R (ND34)	P48	1	kał	03/2018	+	-	+	+
53B (ND88)	P48	1	mocz	03/2018	+	-	+	+
32K (ND96)	P30	0	mocz	04/2018	+	-	+	+
33K (ND111)	P31	0	mocz	04/2018	+	-	+	+
5R (ND27)	P2R	0	mocz	05/2018	+	-	+	+

*Dwa izolaty pochodzące od tego samego pacjenta oznaczono szarym kolorem; **Pacjenci z ZUM bez przeszczepu nerki zostali oznaczeni pomarańczowym kolorem (0), zaś pacjenci z ZUM po przeszczepie nerki kolorem turkusowym (1); ***Pacjenci zostali uszeregowani zgodnie z datą izolacji.

W celu wykrycia obecności karbapenemaz przeprowadzono test enzymatyczny β CARBA oraz testy fenotypowe w kierunku wykrycia karbapenemaz MBL (ang. *metallo- β -lactamase*) i KPC (ang. *K. pneumoniae carbapenemase*) za pomocą metody dyfuzyjno-krażkowej w Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Z zastosowaniem metody biochemicznej wykryto enzym hydrolizujący karbapenemy dla szczepów izolowanych z moczu pochodzących od 2 pacjentów z ZUM po przeszczepie nerki (2/54, 3,7%) z grupy badanej i 3 pacjentów z ZUM (3/34, 8,8%) z grupy kontrolnej, a także dla szczepów izolowanych z próbek kału od pacjenta z ZUM po przeszczepie nerki i od pacjenta z ZUM bez przeszczepionej nerki a przebywającego na tym samym oddziale. Potwierdzono również produkcję karbapenemazy dla szczepu wyizolowanego z moczu pacjenta z ZUM

hospitalizowanego w innym szpitalu (Tabela 36). Testy fenotypowe potwierdziły dla tych szczepów produkcję karbapenemaz typu MBL i brak wytwarzania karbapenemaz KPC. Testy fenotypowe zostały potwierdzone w ramach rozprawy doktorskiej poprzez wykrycie genu *bla_{NDM-1}* z zastosowaniem techniki PCR. W tabeli 36 zestawiono wyniki przeprowadzonych testów dla poszczególnych izolatów.

Na rysunku 25 przedstawiono wyniki amplifikacji genu *bla_{NDM-1}* (produkt o wielkości 621 pz) dla badanych szczepów *K. pneumoniae*.



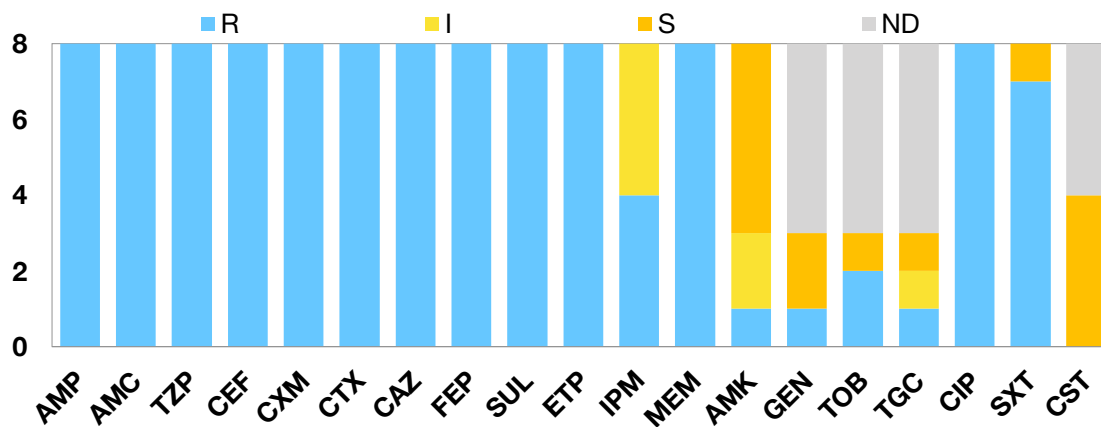
Rysunek 25. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji genu *bla_{NDM-1}* w żelu agarozowym (1,2%). M – marker wielkości 100-1000 (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk); 16K, 32K, 33K, 46B, 4R, 53B – numer badanego szczepu *Klebsiella pneumoniae*

6.6.2. Analiza lekooporności

Wszystkie szczepy *Klebsiella pneumoniae* wyizolowane z materiałów klinicznych opisane powyżej, miały określony profil oporności na antybiotyki. W tabeli 37 i na rysunku 26 przedstawiono odsetek wszystkich badanych szczepów *K. pneumoniae*, opornych i wrażliwych na poszczególne antybiotyki.

Tabela 37. Oporność szczepów *K. pneumoniae* izolowanych na Oddziale UCK w Gdańsku w opaciu o metody fenotypowe. S, wrażliwy (ang. susceptible); R, oporny (ang. resistance); I, średnio wrażliwy (ang. intermediate); ND- nie określono (ang. not determined); na czerwono szczepy od pacjentów z grupy badanej; na niebiesko szczepy od pacjentów z grupy kontrolnej. Numery szczepów jak w kolekcji

Klasa	Antybiotyk	Skrót	Szczep							
			16K	46B	3R	4R	53B	32K	33K	5R
Penicyliny	Ampicylina	AMP	R	R	R	R	R	R	R	R
Inhibitory β - laktamazy	Amoksycylina/kwas klawulanowy	AMC	R	R	R	R	R	R	R	R
	Piperacylina/Tazobaktam	TZP	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalosporyny I generacji	Cefalotyna	CEF	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalosporyny II generacji	Cefuroksym	CXM	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalosporyny III generacji	Cefotaksym	CTX	R	R	ND	R	R	R	R	R
	Ceftazydym	CAZ	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalosporyny IV generacji	Cefepim	FEP	R	R	R	R	R	R	R	R
Karbapenemy	Cefoperazone/Subactam	SUL	R	R	R	R	R	R	R	R
	Ertapenem	ETP	R	R	R	R	R	R	R	R
	Imipenem	IPM	I	R	R	I	I	R	I	R
Aminoglikozydy II generacji	Meropenem	MEM	R	R	R	R	R	R	R	R
	Amikacyna	AMK	I	R	S	S	I	S	S	S
	Gentamycyna	GEN	ND	S	S	ND	ND	ND	ND	ND
Tetracykliny	Tobramycyna	TOB	ND	R	S	ND	ND	ND	ND	ND
	Tigecyklina	TGC	ND	I	S	ND	ND	ND	ND	ND
Fluorochinolony	Ciprofloksacyna	CIP	R	R	R	R	R	R	R	R
Sulfonamidy i trimetoprym	Trimetoprym/Sulfametoksazol	SXT	S	R	R	R	R	R	R	R
Polimyksyny	Kolistyna	CST	ND	S	S	ND	S	ND	S	ND



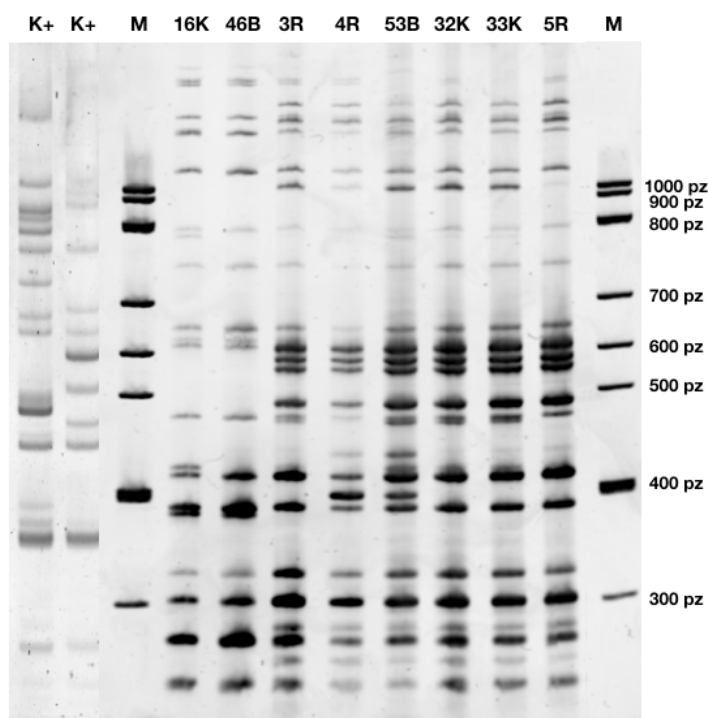
Rysunek 26. Odsetek lekowrażliwości szczepów *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających metalo- β -laktamazę NDM-1, wyizolowanych z materiałów klinicznych. S, wrażliwy (ang. susceptible); R, oporny (ang. resistance); I, średnio wrażliwy (ang. intermediate); ND, brak danych (ang. not determined)

Badane szczepy *K. pneumoniae* NDM-1 w większości wykazywały podobne schematy oporności. Wszystkie szczepy bakterii typu NDM-1 charakteryzowały się opornością na penicyliny, penicyliny z inhibitorami β -laktamaz, wszystkie generacje cefalosporyn, fluorochinolony, ertapenem, meropenem i cefoperazone/subactam. W przypadku pozostałych karbapenemów (imipenem) stopień oporności szczepów był zróżnicowany. Oporność na imipenem stwierdzono u 4 szczepów, również 4 szczepy charakteryzowały się średnią-wrażliwością na ten lek. Stwierdzono duże różnice we wrażliwości na aminoglikozydy. Wśród szczepów nie stwierdzono oporności na gentamycynę, a tylko 1 szczep był oporny a 2 szczepy były średnio-wrażliwe na amikacynę. Ponadto, jeden szczep NDM-1 wykazywał oporność na tobramycynę. Większość szczepów pozostawała oporna na trimetoprim/sulfametoksazol, z wyjątkiem szczepu numer 16K. W analizowanym materiale wykryto także jeden szczep średnio-wrażliwy na tigecyklinę. Wszystkie szczepy pozostawały wrażliwe na kolistynę.

W szczegółowej analizie oporności poszczególnych szczepów, szczep numer 46B wydawał się wykazywać nieco inny schemat oporności - jako jedyny oporny na amikacynę i tobramycynę oraz wykazujący średnią wrażliwość na tigecyklinę. Ponadto, wykazywał wrażliwość na gentamycynę i kolistynę. Szczep ten wywołał ognisko epidemiczne w 2018 roku. Szczepy o numerach 4R i 53B pochodziły od jednego pacjenta po przeszczepie nerki (P48), choć były izolowane w różnym czasie z różnego materiału klinicznego tj. z kału i z moczu. Najprawdopodobniej pacjent był nosicielem tego szczepu w układzie pokarmowym, a następnie doszło do zakażenia układu moczowego w wyniku transmisji tej bakterii z układu pokarmowego do dróg moczowych. Antybiogramy tych dwóch izolatów cechowały się prawie identycznym schematem oporności. Wyjątkiem była wrażliwość w stosunku do amikacyny dla izolatu z kału i średnio-wrażliwość dla izolatu z moczu. Szczep numer 5R wyizolowany od pacjenta hospitalizowanego w innym szpitalu wykazywał wrażliwość na amikacynę przy oporności na pozostałe badane antybiotyki. Antybiogram tego izolatu nie różnił się od antybiogramu izolatu numer 32K, pochodzącego z ogniska epidemicznego. Profil lekowrażliwości izolatów NDM-1 został pokazany na rysunku 26.

6.6.3. Analiza pokrewieństwa genetycznego badanych szczepów

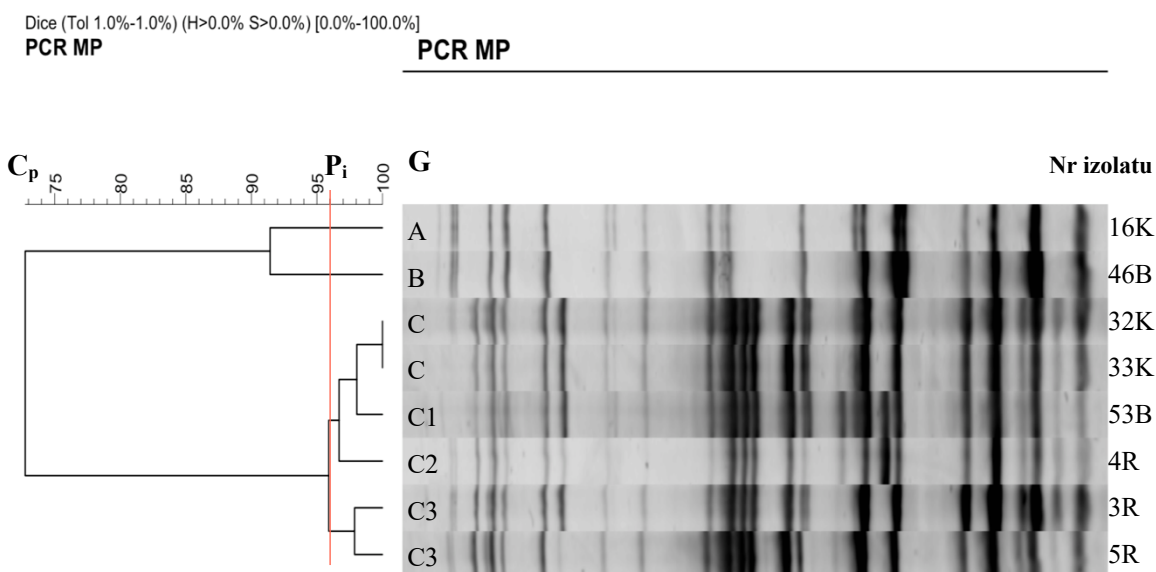
Do oceny pokrewieństwa genetycznego badanych szczepów *K. pneumoniae* zastosowano metodę PCR MP. W pierwszym etapie eksperymentu dobrano temperaturę denaturacji w cyklach tak, aby otrzymać optymalną liczbę prążków DNA we wzorze elektroforetycznym, która pozwoliłaby na różnicowanie szczepów. W tym celu przeprowadzono reakcję PCR dla dwóch potencjalnie różniących się szczepów (izolat numer 16K i 5R) w gradiencie temperatury denaturacji. Wybrano optymalną temperaturę denaturacji wynoszącą 86,9°C. Następnie stosując wybraną temperaturę denaturacji w cyklach reakcji PCR, przeprowadzono typowanie genetyczne dla wszystkich szczepów *K. pneumoniae* NDM-1. Uzyskane produkty poddano elektroforezie w 6% żelu poliakrylamidowym. Na rysunku 27 przedstawiono uzyskany obraz elektroforetyczny.



Rysunek 27. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR MP w żelu poliakrylamidowym 6% w buforze 1x TBE. M – marker wielkości DNA: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 pz; 16K, 46B, 3R, 4R, 53B, 32K, 33K, 5R – numer badanego izolatu *Klebsiella pneumoniae* wg kolekcji; K+ - szczepy kontrolne: szczep referencyjny *K. pneumoniae* ATCC 700603 i szczep kliniczny *K. pneumoniae* KPC

Analiza porównawcza profili elektroforetycznych badanych szczepów *K. pneumoniae* została przeprowadzona z wykorzystaniem współczynnika podobieństwa Dice'a oraz metody klasteryzacji UPGMA. Stopień podobieństwa genetycznego profili badanych szczepów przedstawiono w postaci dendrogramu na rysunku 28. Wszystkie badane izolaty (za wyjątkiem izolatu numer 16K i 46B) charakteryzowały się wysokim stopniem podobieństwa (ponad 95%), co dowodzi ich pochodzenia klonalnego. Szczepy o numerach 46B, 3R, 4R, 53B, 32K i 33K zostały wyizolowane z tego samego oddziału szpitalnego w krótkim okresie czasu (01/2018 – 04/2018). Za poziom identyczności (P_1) izolatów przyjęto 96%. Szczepy wykazujące zbieżność prążków równą co najmniej 96% zostały zaklasyfikowane jako posiadające ten sam genotyp. Wśród 8 szczepów *K. pneumoniae* NDM-1 wyróżniono 3 unikalne genotypy. Szczepy o numerach 16K i 46B charakteryzowały się dwoma unikalnymi genotypami, oznaczonymi

odpowiednio A i B. Szczepy o numerach 32K i 33K wykazywały ten sam genotyp C. Szczepy o numerach 53B i 4R pochodziły od jednego pacjenta po przeszczepie nerki i wykazywały podgenotyp C, odpowiednio C1 i C2. Szczep o numerze 3R (izolat z kału) pochodzący z ogniska epidemicznego w Gdańsku oraz szczep o numerze 5R (izolat z moczu) wyizolowany w szpitalu w innym mieście, charakteryzowały się wysokim stopniem podobieństwa (98%) i zostały oznaczone jako podgenotyp C3.



Rysunek 28. Analiza podobieństwa genetycznego szczepów *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających metalo-B-laktamazę NDM-1 z zastosowaniem metody typowania genetycznego PCR MP. Zastosowano enzym restrykcyjny *Hind*III oraz T_d 86,9°C. Dendrogram podobieństwa profili genetycznych badanych szczepów opracowano przy użyciu programu FPQuest Software wersja 4.5 (BIO-RAD) (Dice, UPGMA). C_p – całkowite podobieństwo równe 73%; P_i – poziom identyczności równy 96%. Unikalne genotypy (G) oznaczono literami A-C. Numery izolatów *K. pneumoniae* wg kolekcji (Tabela 37)

6.6.4. Cechy genomiczne izolatów *K. pneumoniae* NDM-1

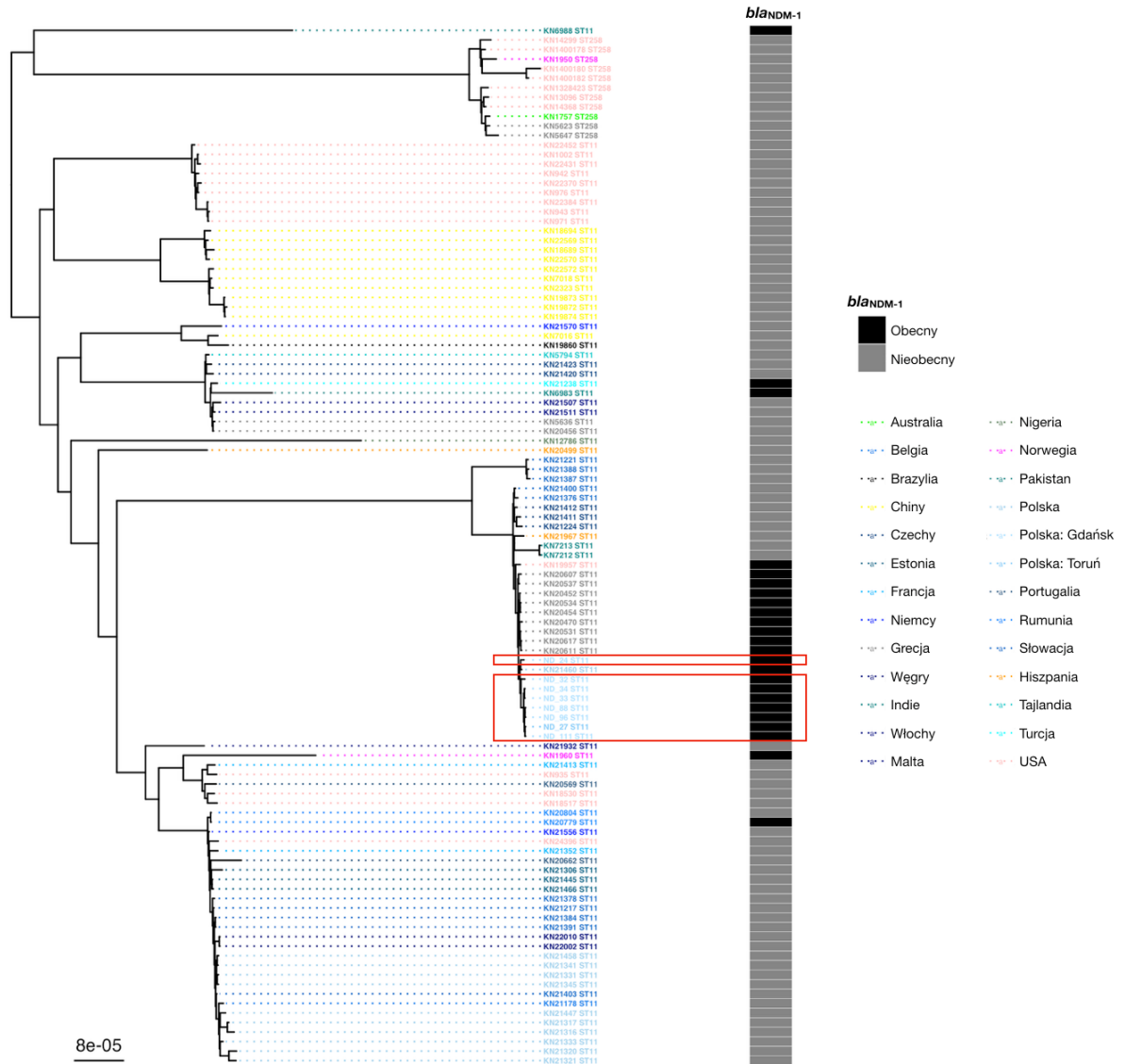
Osiem izolatów *K. pneumoniae* NDM-1 zidentyfikowanych wśród całej puli szczepów zgromadzonych w ramach rozprawy doktorskiej, poddano sekwencjonowaniu przy użyciu platformy Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). Odczyty złożono za pomocą SPAdes (wersja 3.9.0). Analizę klonalną i filogenetyczną przeprowadzono za pomocą metod MLST i SNP rdzeni genomów. Badano oporności, wirulomy, antygeny K / O i replikony plazmidów.

Do analizy włączono dodatkowo 90 losowo wybranych genomów międzynarodowych szczepów *K. pneumoniae* o typie sekwencyjnym ST11 oraz 11 losowo wybranych genomów szczepów *K. pneumoniae* o drugim co do częstości występowania w Polsce typie sekwencyjnym ST258, dostępnych w bazie Patric.

6.6.4.1. Analiza filogenetyczna

Osiem badanych izolatów zostało poddanych analizie filogenetycznej względem 101 wybranych szczepów *K. pneumoniae* (Rysunek 29). Analiza filogenetyczna z wykorzystaniem cgMLST (ang. *core genome multilocus sequence typing*) wykazała, że wszystkie badane w ramach rozprawy szczepy reprezentowały typ sekwencyjny ST11, wykazując wysoką jednorodność. Osiem badanych izolatów znalazło się w jednym kładzie z 22 izolatami pochodzącymi z różnych krajów na świecie, z których 11

miało gen *bla*_{NDM-1} (Tabela 38). Izolaty te zostały zebrane w latach 2013-2016 w Grecji (n = 9, wszystkie NDM-1), Słowacji (n = 5), Czechach (n = 3), Indiach (n = 2), Hiszpanii (n = 1), USA (n = 1, NDM-1) i Polsce (n = 1, NDM-1) (głównie w badaniu EuSCAPE, ang. *the European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae*). Pięć zdeponowanych w bazie sekwencji szczepów *K. pneumoniae* NDM-1 nie znalazło się w tym samym kładzie, co szczepy ujęte w rozprawie doktorskiej. Izolaty te, zostały zebrane w 2012-2013 w Pakistanie (n = 2), Turcji (n = 1), Norwegii (n = 1) i Rumunii (n = 1).



Rysunek 29. Drzewo filogenetyczne rdzenia genomu wygenerowane dla 109 izolatów *K. pneumoniae* (8 izolatów zsekwencjonowanych w ramach rozprawy (dodatkowo zaznaczone czerwoną ramką) i 101 z publicznej bazy danych Patric). Pochodzenie izolatów wyróżnia kolorystyka czcionek w drzewie (legenda na rysunku). Typ sekwencji (ST) jest wskazany dla każdego izolatu, po nazwie izolatu. Występowanie genu *bla*_{NDM-1} pokazano na heatmapie po prawej stronie (czarny - obecny, szary - nieobecny). Pasek skali pokazany w lewym dolnym rogu przedstawia średnią liczbę podstawień na miejsce

Tabela 38. Podstawowe dane epidemiologiczne na temat izolatów *K. pneumoniae* NDM-1 ujętych w badaniu cech genomicznych

Nr izolatu wg GenBank (Nr izolatu wg kolekcji)	Źródło pobrania	Rok	Kraj	Infekcja/Kolonizacja*	ST	bla _{NDM-1}
ND32 (16K)	mocz	2016	Polska	infekcja	11	+
ND111 (33K)	mocz	2018	Polska	kolonizacja/ABU	11	+
ND27 (5R)	mocz	2018	Polska	infekcja	11	+
ND96 (32K)	mocz	2018	Polska	infekcja	11	+
ND88 (53B)	mocz	2018	Polska	kolonizacja/ABU	11	+
ND24 (46B)	mocz	2018	Polska	kolonizacja/ABU	11	+
ND33 (3R)	odbyt	2018	Polska	kolonizacja	11	+
ND34 (4R)	odbyt	2018	Polska	kolonizacja	11	+
KN1960	mocz	2012	Norwegia	ND	11	+
KN20454	mocz	2013	Grecja	infekcja	11	+
KN20534	mocz	2013	Grecja	infekcja	11	+
KN20537	mocz	2013	Grecja	infekcja	11	+
KN20779	mocz	2013	Rumunia	infekcja	11	+
KN21238	mocz	2013	Turcja	infekcja	11	+
KN21460	mocz	2013	Polska	infekcja	11	+
KN6983	krew	2013	Pakistan	ND	11	+
KN6988	krew	2013	Pakistan	ND	11	+
KN20452	mocz	2014	Grecja	infekcja	11	+
KN20470	mocz	2014	Grecja	kolonizacja	11	+
KN20531	mocz	2014	Grecja	infekcja	11	+
KN20607	mocz	2014	Grecja	infekcja	11	+
KN20611	mocz	2014	Grecja	infekcja	11	+
KN20617	mocz	2014	Grecja	infekcja	11	+
KN19957	krew	2015	USA	infekcja	11	+

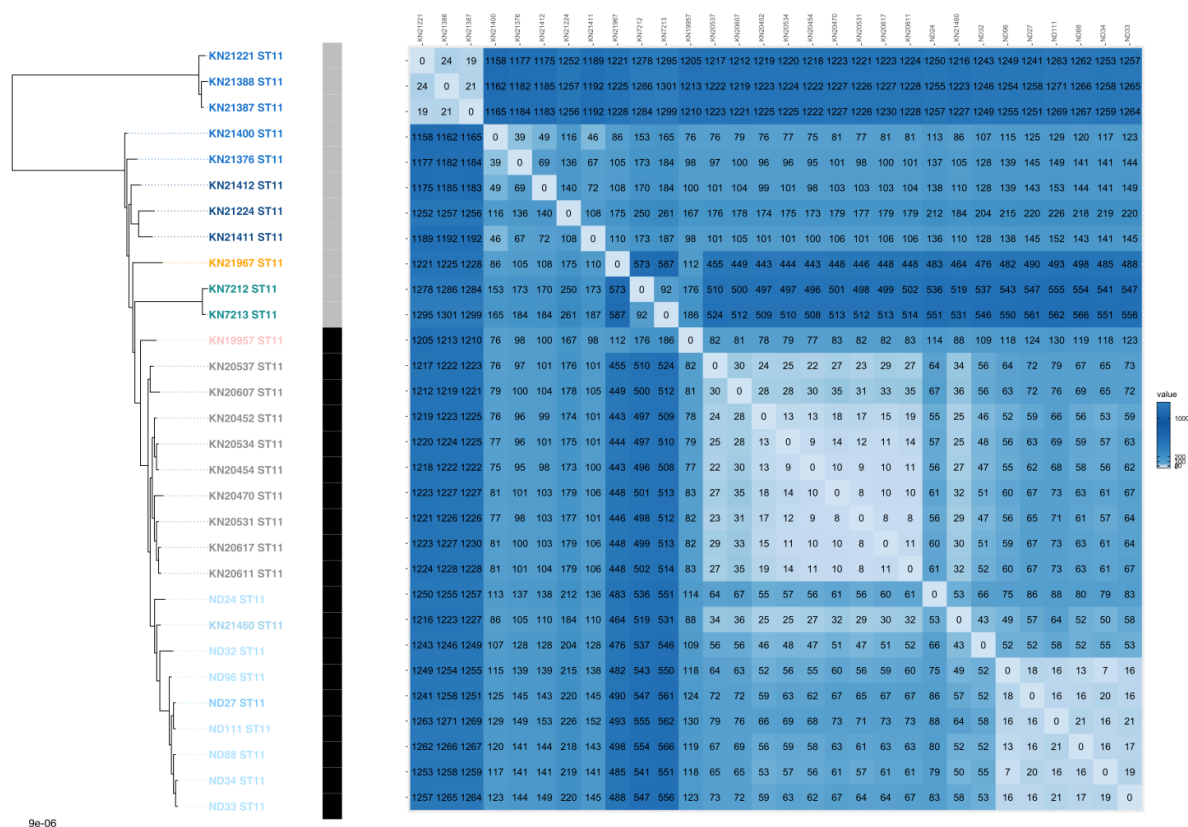
* ND - nie określono; ABU – bezobjawowa bakteriuria

Za zmienność genomu odpowiadają głównie polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*). SNP mogą występować zarówno w sekwencjach kodujących danego genu (cSNP, ang. *coding SNP*), niekodujących (intronach) oraz regulatorowych (rSNP, ang. *regulatory SNP*). Istotną cechą SNP jest zmienność występowania w różnych populacjach. Analiza cgSNP (ang. *core genome SNP*) w odniesieniu do szczepu referencyjnego (GenBank, numer dostępu: NTUH-K2004) ujawniła 7-88 SNP pomiędzy pojedynczymi polskimi izolatami będącymi przedmiotem rozprawy (Rysunek 30). Rozkład czasowy SNP pomiędzy pojedynczymi izolatami pochodzącymi z wybuchu epidemii odzwierciedlał stopniowe zmniejszanie liczby SNP pomiędzy kolejnymi izolatami epidemii, od 88 SNP pomiędzy izolatami ze stycznia 2018 r. a izolatami z kwietnia 2018 r., do 16 SNP pomiędzy dwoma izolatami z kwietnia 2018 r., ukazując proces dywersyfikacji populacji.

Izolaty zgromadzone w ramach rozprawy, wykazały najmniej różnic w porównaniu do szczepów pochodzących z Grecji; różniąc się od nich o 46-79 SNP. Izolat nr ND32 (16K), badany w ramach rozprawy i będący pierwszym izolatami na oddziale, wykazał najmniej różnic w porównaniu do szczepów pochodzących z Grecji, różniąc się od nich o 46-56 SNP. Analiza wykazała, że izolat nr ND27 (5R), wyizolowany w tym samym czasie (maj 2018 r.) co szczepy z ogniska, ale pochodzący z innego szpitala, różnił się od nich o 16-86 SNP. Podobnie jak w oparciu o analizę cgMLST, jeden polski izolat pobrany z publicznej bazy danych (nr KN21460, 2013 r.) wypadł najbliżej badanych izolatów, różniąc się od nich o 43-64 SNP oraz o 25-36 SNP od szczepów pochodzących z Grecji.

Rozkład SNP podzielił dokładnie izolaty w tym jednorodnym kładzie na polskie, greckie oraz izolaty z innych krajów (Rysunek 30). Podsumowując, chociaż pokrewne szczepy *K. pneumoniae* ST11

nałęczące do kladu podstawowego występowały globalnie (Rysunek 29), analizowany genotyp pojawił się głównie w Europie, zwłaszcza w jej środkowo-południowej części. W pracy wykazano międzynarodowy charakter linii, z udokumentowanym potencjałem epidemicznym w Polsce i w Grecji.



Rysunek 30. Drzewo filogenetyczne rdzenia genomu *K. pneumoniae* skonstruowane przy użyciu genów rdzeniowych genomów, które znalazły się w tym samym kładzie, co genomy zsekwencjonowane w ramach rozprawy. Pochodzenie izolatów wyróżnia kolorystyka czcionek w drzewie: jasno niebieski - Polska, szary – Grecja, różowy – USA, zielony – Indie, pomarańczowy – Hiszpania, ciemno niebieski - Czechy, niebieski - Słowacja. Typ sekwencji (ST) jest wskazany dla każdego izolatu, po nazwie izolatu. Występowanie genu *bla_{NDM-1}* pokazano na heatmapie po prawej stronie (czarny - obecny, szary - brak). Obok umieszczono macierz różnic w polimorfizmach pojedynczych nukleotydów (SNP). Pasek skali pokazany w lewym dolnym rogu przedstawia średnią liczbę podstawień na miejsce

6.6.4.2. Analiza plazmidów i rezystomy

Przedstawiona analiza genomiczna dostarczyła nowych danych na temat zawartości plazmidów w genotypie *K. pneumoniae* NDM-1, pochodzących od pacjentów hospitalizowanych w Polsce w odniesieniu do wybranych szczepów z innych regionów świata o tym samym typie sekwencyjnym. Podstawowe dane epidemiologiczne i rezystomy (nabyte zbiory genów oporności) izolatów *K. pneumoniae* NDM-1 ujętych w badaniu zostały zaprezentowane w tabeli 39, zaś dane o całej puli zgromadzonych szczepów *K. pneumoniae* w ramach tego badania w tabeli S8, umieszczonej w materiałach dodatkowych. Łącznie w 8 polskich izolatach *K. pneumoniae* NDM-1 wykryto 8 replikonów, podzielonych na 4 profile, które niosą od 1 do 6 replikonów każdy (Tabela 39). Przeważającym replikonem był IncFII/pKPX-1 obecny w 7 izolatach oraz replikony IncFIB(K) i IncFII(K) obecne w 6 tych samych izolatach (podobnie jak w przypadku najbliższych międzynarodowych krewnych; Rysunek 30). Łącznie, w 8 polskich i 16 innych międzynarodowych izolatach *K. pneumoniae* NDM-1 wykryto 24 replikony, które zostały podzielone na 17 profili, które zawierały od 1 do 6 replikonów każdy (Tabela 39), co pokazuje

zróżnicowanie bakterii *K. pneumoniae*. Przeważającymi replikonami były IncFIB(K) i IncFII(K), obecne odpowiednio w 19 i 18 izolatach, przy czym 18 izolatów posiadało oba.

W 8 polskich izolatach *K. pneumoniae* NDM-1 wykryto od 5 do 10 nabytych genów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (Tabela 39). Wszystkie badane izolaty wykazały obecność genów kodujących β -laktamazy, aminoglikozydy oraz trimetoprim. Obecność genów kodujących fenikole oraz sulfonamidy odnotowano dla 7 izolatów. Z 20 różnymi profilami genów, rezystomy 24 izolatów *K. pneumoniae* NDM-1 były głównym aspektem ich różnorodności, głównie z powodu wielu kombinacji ośmiu genów kodujących β -laktamazy i 12 genów kodujących enzymy modyfikujące aminoglikozydy (AME) (Tabela 39). Rezystomy zawierały od 3 do 17 nabytych genów, a przeciętny izolat miał ich 9,5. Większość genów była pochodzenia plazmidowego; jednakże jednoznaczne przypisanie genów do poszczególnych plazmidów mogłoby być możliwe tylko w przypadku izolatów z sekwencją o długim odczycie.

Tabela 39. Izolaty *K. pneumoniae* NDM-1 ujęte w badaniu: profile plazmidów i rezystomy

Nr izolatu wg GenBank (Nr izolatu wg kolekcji)	Profile replikonów plazmidów	Nabyte geny oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe										
		β-laktamy	aminoglikozydy	fluorochinolony	antymotylicy makrolidowe, linkozamido-we i streptograminy	fenikole	sulfonamidy	tetracyklina	trimetoprim			
ND32 (16K)	FII(pKPX1)	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>df</i> _{rA14}	
ND111 (33K)	FIB(K), FII(K), FII(pKPX1), HIIA(NDM-CIT), HIIIB(pNDM-CIT)	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	-	-	-	<i>catA1</i> , <i>catB4</i>	-	-	-	-	<i>df</i> _{rA1} , <i>df</i> _{rA14}	
ND27 (5R)	FIB(K), FII(K), FII(pKPX1), HIIA(NDM-CIT), HIIIB(pNDM-CIT)	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	-	-	-	<i>catA1</i>	-	-	-	-	<i>df</i> _{rA1} , <i>df</i> _{rA14}	
ND96 (32K)	FIB(K), FII(K), FII(pKPX1), HIIA(NDM-CIT), HIIIB(pNDM-CIT)	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	-	-	-	<i>catA1</i>	-	-	-	-	<i>df</i> _{rA1} , <i>df</i> _{rA14}	
ND88 (53B)	FIB(K), FII(K), FII(pKPX1), HIIA(NDM-CIT), HIIIB(pNDM-CIT), XI	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	-	-	-	<i>catA1</i> , <i>catB4</i>	-	-	-	-	<i>df</i> _{rA1} , <i>df</i> _{rA14}	
ND24 (46B)	FII(Yp), R	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>df</i> _{rA14}	
ND33 (3R)	FIB(K), FII(K), FII(pKPX1), HIIA(NDM-CIT), HIIIB(pNDM-CIT)	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	-	<i>catA1</i>	-	-	-	-	<i>df</i> _{rA1} , <i>df</i> _{rA14}	
ND34 (4R)	FIB(K), FII(K), FII(pKPX1), HIIA(NDM-CIT), HIIIB(pNDM-CIT), XI	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	-	-	-	<i>catA1</i>	-	-	-	-	<i>df</i> _{rA1} , <i>df</i> _{rA14}	
KN1960	C, FIB(K), FIB(pNDM-Mar), FII(K), HIIIB(pNDM-MAR), N	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	-	-	-	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>	<i>qnrS1</i>	<i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aph(6)-Ic</i>	-	-	<i>df</i> _{rA14}
KN20454	FIA(HII), FIB(K), FII(K), FII(pKPX1), R	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	-	-	-	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>	-	<i>aac(6)-Ib</i> , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Ic</i>	-	-	<i>df</i> _{rA14}
KN20534	FIA(HII), FIB(K), FII(pKPX1), R	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	-	-	-	-	-	<i>aac(6)-Ib</i>	-	-	<i>df</i> _{rA14}
KN20537	Col440II, FIA(HII), FIB(K), FII(K)	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1}	-	-	-	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>	-	<i>aac(6)-Ib</i> , <i>aac(3)-IIa</i>	-	-	<i>tet(A)</i>

Nr izolatu wg GenBank (Nr izolatu wg kolekcji)	Profile replikonów plazmidów	Nabyte geny oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe									
		β-laktamy	aminoglikozydy	fluorochinolony	antybiotyki makrolidowe, linkozamido-we i streptograminowe	fenikole	sulfonamidy	tetracyklina	trimetoprim		
KN20779	FII(Yp), M2, R	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> CTX-M-3, <i>bla</i> OXA-1, <i>bla</i> TEM-1	<i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>aac</i> (3)-IIId, <i>aadA2</i> , <i>armA</i>	<i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>qnrB4</i>	<i>mph</i> (A), <i>mph</i> (E), <i>msr</i> (E)	<i>catB3</i>	<i>sul1</i>	<i>tet</i> (A)	<i>df</i> r-A12		
KN21238	FIB(K)(pCAV1099-114), FIB(pQII), FII(pKPX1), HI2, HI2A	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> CTX-M-9	<i>aadA2</i>	-	-	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>df</i> r-A16		
KN21460	FIA(HII), FIB(K), FII(K), M1, R	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> TEM-1	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id	-	<i>mph</i> (A)	-	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (A)	<i>df</i> r-A14		
KN6983	Col4401, FIB(K), FII(K), FII(pKPX1), L	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> OXA-1-48	<i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>aac</i> (3)-IIa, <i>aph</i> (3')-Ia, <i>aadA2</i>	<i>aac</i> (6')-Ib-cr	<i>mph</i> (A)	-	<i>sul1</i>	-	<i>df</i> r-A12		
KN6988	Col4401, FIB(pKPHS1), FIB(pNDM-Mar), FIB(pQII), HIIb(pNDM-MAR)	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> OXA-1-10, <i>bla</i> TEM-1	<i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>aac</i> (3)-IIa, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (3')-VI, <i>aph</i> (6)-Id, <i>armA</i>	<i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>qnrS1</i>	<i>msr</i> (E)	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	<i>tet</i> (A)	<i>df</i> r-A1		
KN20452	FIA(HII), FIB(K), FIB(pQII), FII(K), FII(pKPX1), R	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> OXA-1, <i>bla</i> TEM-1	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>aac</i> (3)-IIa, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id	<i>aac</i> (6')-Ib-cr	<i>mph</i> (A)	-	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (A)	<i>df</i> r-A14		
KN20470	FIA(HII), FIB(K), FII(K), FII(pKPX1), R	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> OXA-1, <i>bla</i> TEM-1	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aac</i> (3)-IIa, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id	-	<i>mph</i> (A)	-	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (A)	<i>df</i> r-A14		
KN20531	FIA(HII), FIB(K), FII(K), FII(pKPX1)	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> OXA-1	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aac</i> (3)-IIa	-	-	-	-	<i>tet</i> (A)	<i>df</i> r-A14		
KN20607	Col(BSS12), FIA(HII), FIB(K), FII(K), R	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> OXA-1, <i>bla</i> TEM-1	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aac</i> (3)-IIa, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id	-	<i>mph</i> (A)	-	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (A)	<i>df</i> r-A14		
KN20611	FIA(HII), FIB(K), FII(K), FII(pKPX1), R	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> OXA-1, <i>bla</i> TEM-1	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>aac</i> (3)-IIa, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id	<i>aac</i> (6')-Ib-cr	<i>mph</i> (A)	-	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (A)	<i>df</i> r-A14		
KN20617	FIA(HII), FIB(K), FII(K), FII(pKPX1), R	<i>bla</i> NDM-1	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id	-	<i>mph</i> (A)	-	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (A)	<i>df</i> r-A14		
KN19957	FIA(HII), FIB(K), FII(K), FII(Yp), R	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> CTX-M-15	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aac</i> (3)-IIa	<i>qnrB9</i>	<i>mph</i> (A)	-	<i>sul1</i>	<i>tet</i> (A)	.		

6.6.4.3. Serotypy i wirulomy

Antygeny K i O polskich izolatów badanych w ramach rozprawy doktorskiej zidentyfikowano odpowiednio jako KL24 i O2 wariant 1 (O2v1). Pod względem antygeny K i O, szczepy te nie różniły się od dziewięciu szczepów pochodzących z Grecji, jednego z Polski i jednego z USA (Tabela 40), natomiast były różne od pozostałych szczepów międzynarodowych (Tabela 40). Różnorodność serotypów wszystkich analizowanych szczepów o typie sekwencyjnym ST11 była wysoka, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami [161]; jednakże wiedza na temat dystrybucji antygeny K / O w typie sekwencyjnym ST11 jest do tej pory niewielka.

Geny związane z wirulencją (Tabela 40) to chromosomalne operony *mrkABCDF* i *mrkHIJ*, odpowiedzialne za fimbrie typu 3 zaangażowane w adhezję i tworzenie biofilmu oraz chromosomalny operon *fimABCDEFGHIK*, odpowiedzialny za fimbrie typu 1, również zaangażowany w adhezję. Inna grupa zidentyfikowanych genów kodujących czynniki wirulencji obejmowała operon *ybtSXQPA-irp2-irp1-ybtUTE-fyuA*, odpowiedzialny za syntezę i sekrecję yersiniabaktyny, sideroforu nadreprezentowanego w hiperwirulentnych i inwazyjnych szczepach *K. pneumoniae*, gen *iroE* kodujący salmochelinę oraz geny *fepA*, *fes*, *entF*, *fepCGD*, *fepB*, *entCEBA* i *ybdA* odpowiedzialne za syntezę i sekrecję enterobaktyny. Te same geny kodujące czynniki wirulencji stwierdzono w badanych ośmiu izolatach, dziewięciu szczepach z Grecji oraz pojedynczych szczepach z Turcji, Norwegii, Rumunii i Polski. Wyjątek stanowiły dwa szczepy *K. pneumoniae* NDM-1 z Pakistanu i USA, które nie posiadały genów odpowiedzialnych za syntezę i sekrecję yersiniabaktyny.

Tabela 40. Serotypy, wirulomy i ICEKp izolatów *K. pneumoniae* NDM-1 ujętych w badaniu

Nr izolatu wg GenBank (Nr izolatu wg kolekcji)	Serotyp		Czynniki wirulencji												
	Typ otoczki	Antygen O	Fimbrie typu 3	Fimbrie typu 1	Wyspy wysokiej patogenności: Yersiniabaktyna	System IroA: gen struktury salmocheliny	System Fep-Ent: Enterobaktyna								
			<i>mrk</i> ABCDEF	<i>mrk</i> HJIJ	<i>fim</i> ABCDEFGHIK	<i>fyuA</i>	<i>irp1</i> / 2	<i>yb</i> SXQPAUTE	<i>iroE</i>	<i>fep</i> ACGDB	<i>fes</i>	<i>ybdA</i>	<i>ent</i> CEBA		
ND32 (16K)	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ND111 (33K)	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ND27 (5R)	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ND96 (32K)	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ND88 (53B)	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ND24 (46B)	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ND33 (3R)	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ND34 (4R)	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN1960	KL14	O3b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN20454	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN20534	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN20537	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN20779	KL105	O2v2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN21238	KL15	O4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN21460	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN6983	KL15	O4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN6988	KL103	O2v1	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
KN20452	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN20470	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN20531	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN20607	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN20611	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN20617	KL24	O2v1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KN19957	KL24	O2v1	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	

6.6.4.4. ICEKp

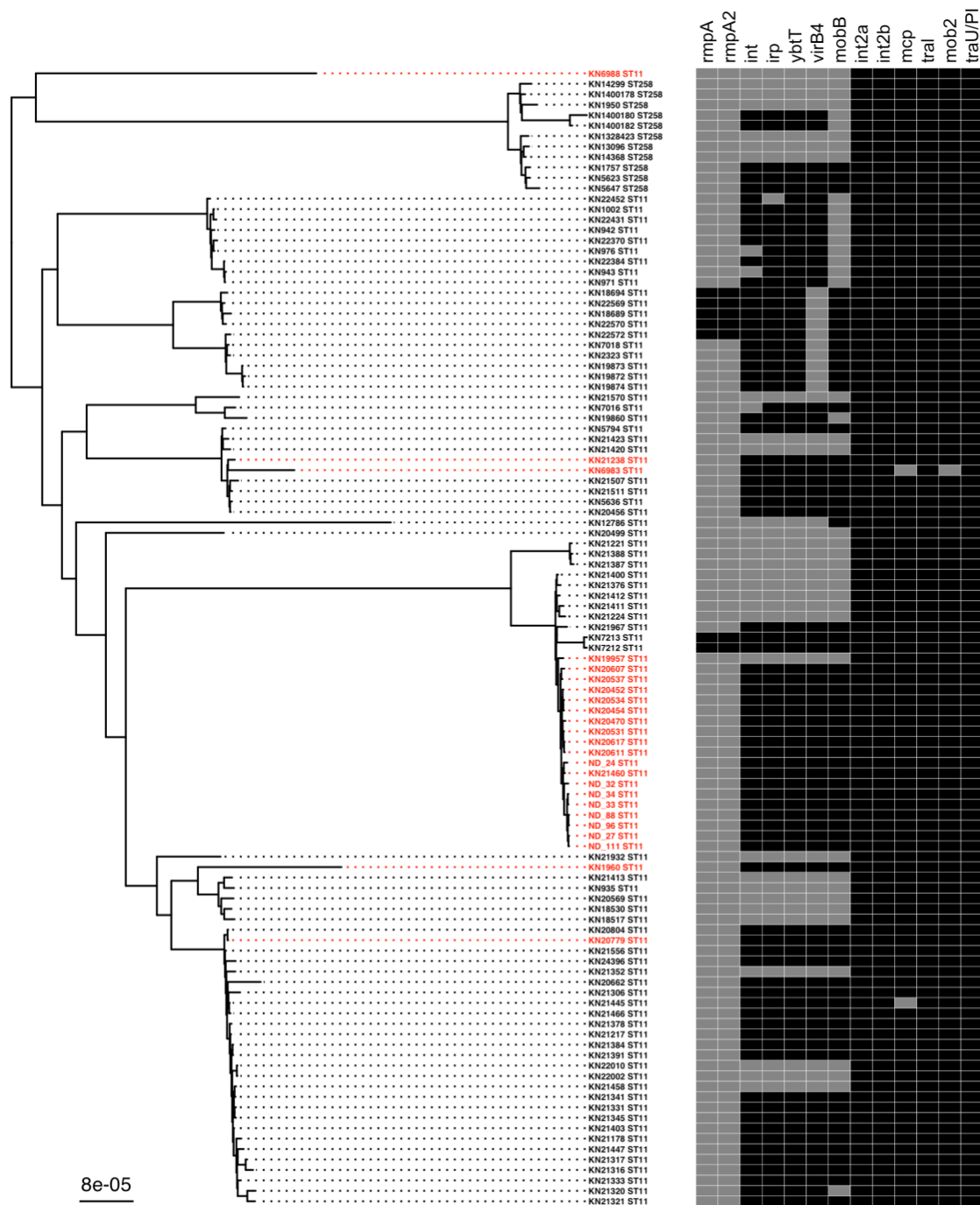
Określono częstość występowania integracyjnych elementów koniugacyjnych (ICEKp1 i ICEKp2) w izolatach klinicznych *K. pneumoniae*. ICE są powszechnie uznawane za przyczyniające się do rozprzestrzeniania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe i genów wirulencji wchodzących w skład wysp patogeniczności. ICEKp1 zidentyfikowano w 46 (45,5%) szczepach międzynarodowych i 8 (100%) szczepach badanych w ramach rozprawy. ICEKp2 był obecny w 99 spośród 101 genomów międzynarodowych i we wszystkich genomach zsekwencjonowanych w ramach rozprawy. Jego obecność nie była skorelowana z ICEKp1 (Tabela 41).

Tabela 41. Występowanie i współwystępowanie elementów koniugacyjnych ICEKp1 i ICEKp2 w genomach *K. pneumoniae*

Integracyjne elementy koniugacyjne	Genomy międzynarodowe (n = 101)	Genomy PL (n = 8)
ICEKp1	46	8
ICEKp2	99	8
ICEKp1+ ICEKp2	44	8

Wśród szczepów *K. pneumoniae* NDM-1 zidentyfikowano współwystępowanie w przypadku 21 (87,5%) szczepów, z czego 10 z 11 blisko spokrewnionych z badanymi w ramach rozprawy szczepami było nosicielami obu ICEKp. Obecność ICEKp2 korelowała z występowaniem ICEKp1 dla szczepów *K. pneumoniae* NDM-1. Dodatkowo, obecność w analizie genomów dwóch blisko spokrewnionych typów sekwencji, sugeruje stabilne dziedziczenie ICEKp2.

Wśród badanych szczepów *K. pneumoniae* NDM-1, ICEKp2 nie współwystępował z plazmidem niosącym geny *rmpA* i *rmpA2* kodujące tzw. czynnik śluzowy, które są związane z nadmierną ekspresją otoczek typu K1 lub K2 i zwiększoną wirulencją [132,152]. Natomiast siedem międzynarodowych szczepów *K. pneumoniae* posiadających plazmid z genami *rmpA* i *rmpA2* zawsze posiadało ICEKp2 oraz częściowy (n = 5) lub całkowity (n = 2) element ICEKp1 (Rysunek 31).



Rysunek 31. Występowanie integracyjnych elementów koniugacyjnych (ICEKp1 i ICEKp2) w izolatach klinicznych *K. pneumoniae*. Drzewo filogenetyczne rdzenia genomu wygenerowane dla 109 izolatów *K. pneumoniae* (8 izolatów zsekwenconowanych w ramach rozprawy i 101 z publicznej bazy danych). Kolor izolatu odpowiada obecności lub braku genu *bla*_{NDM-1} (czerwony – obecny, czarny – nieobecny). Typ sekwencji (ST) jest wskazany dla każdego izolatu, po nazwie izolatu. Występowanie i współwystępowanie ICEKp1 i ICEKp2 (genów markerowych) pokazano na heatmapie po prawej stronie (czarny - obecny, szary - nieobecny). Geny związane z wirulencją *rmpA* i *rmpA2* zostały również włączone do analizy w celu określenia ich korelacji z obecnością / brakiem ICEKp1 i ICEKp2. Pasek skali pokazany w lewym dolnym rogu przedstawia średnią liczbę podstawień na miejsce

6.6.5.DYSKUSJA

W ostatnich latach doszło do lawinowego wzrostu ilości zgłaszanych przypadków i ognisk epidemicznych wywoływanych przez szczepy *K. pneumoniae*, zarówno szczepy ESBL+, jak i szczepy produkujące karbapenemazy KPC oraz MBL. Zdolność utrzymywania się tych nowych wariantów

szczepów w rodzinie Enterobacteriaceae, tzw. CPE (ang. *carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*) w środowisku szpitalnym, a także zdolność rozprzestrzeniania się między pacjentami sprawiła, że szczepy *K. pneumoniae* stały się poważnym problemem szpitali zarówno w Polsce, jak i na świecie. Największym zagrożeniem epidemicznym w środowisku szpitalnym stały się szczepy *K. pneumoniae* produkujące nowy wariant metalo- β -laktamaz, szczepy *K. pneumoniae* NDM-1. Z powodów epidemicznych (bardzo szybkie rozprzestrzenianie się, trudna eradykacja), a także klinicznych (wielolekooporność, ograniczone opcje terapeutyczne) szczepy *K. pneumoniae* NDM-1 stanowią większy problem w środowisku szpitalnym niż szczepy ESBL. Przeżywalność szczepów *K. pneumoniae* NDM-1 na rękach wynosi do 120 minut, zaś w miejscach wilgotnych od kilku godzin do nawet dwóch lat [247]. Ponadto nosicielstwo szczepów *K. pneumoniae* NDM-1 w przewodzie pokarmowym występuje u 5-38% pacjentów i może się ono utrzymywać ponad dwa lata [248]. Najdłuższy okres nosicielstwa, wynoszący 40 miesięcy zaobserwowano w jednym z niemieckich szpitali, w którym wystąpiło ognisko epidemiczne bakterii *K. pneumoniae* produkującej karbapenemazę [249]. W większości opublikowanych prac dotyczących ognisk epidemicznych *K. pneumoniae* produkującej karbapenemazę, około 2/3 szczepów pochodzi z nosicielstwa w przewodzie pokarmowym, pozostałe są izolowane z objawowych zakażeń [247]. W opisanym w rozprawie ognisku epidemicznym wywołanym szczepami NDM-1 (01/2018-04/2018), pięć szczepów wyizolowano z przypadków bezobjawowej kolonizacji (asymptomatyczna bakteriuria), a tylko jeden izolat pochodził z objawowego ZUM. Szczep o numerze 1, wyizolowany od pacjenta w 2016 r. i szczep o numerze 8 pochodzący od pacjenta z innego szpitala były odpowiedzialne za objawowe zakażenia układu moczowego, ale nie stwierdzono dla nich pochodzenia epidemicznego. Prawdopodobnie pacjenci ci byli skolonizowani szczepami *K. pneumoniae* NDM-1, które w niekorzystnym dla nich momencie wywołały ZUM.

Szczepy *K. pneumoniae* NDM-1 stanowią niebezpieczeństwo zarówno ze względu na występowanie genu bla_{NDM-1} na plazmidzie, co sprzyja rozprzestrzenianiu się w środowisku, ale także ze względu na oporność na wszystkie β -laktamy, fluorochinolony, bardzo często aminoglikozydy oraz kotrimoksazol. Oporność na niektóre grupy antybiotyków jest wynikiem występowania genów oporności na plazmidzie w sąsiedztwie genu bla_{NDM-1} [182]. Opcje terapeutyczne w przypadku zakażeń szczepami NDM-1 są bardzo ograniczone, co wpływa na wzrost śmiertelności wśród pacjentów. Analiza lekooporności szczepów zaprezentowanych w rozprawie wykazała bardzo wysoki stopień oporności na wiele grup antybiotyków oraz różnice w stopniu oporności na różne karbapenemy. Szczepy wykazywały wrażliwość na amikacynę lub kolistynę lub sulfametoksazol, ale nie zaleca się monoterapii tymi lekami. Wskazane jest natomiast stosowanie terapii wielolekowej z karbapenemem, pod warunkiem wykonania antybiogramu z oznaczeniem MIC [182,246,250]. Wszystkie badane w pracy szczepy wykazywały oporność na penicyliny, inhibitory β -laktamaz, cefalosporyny oraz fluorochinolony. Szczepy charakteryzowały się zmienną wrażliwością w przypadku aminoglikozydów, sulfametoksazolu oraz tygecykliny. Obecność genu bla_{NDM-1} u wszystkich badanych szczepów potwierdzono metodą molekularną. Świadomość zagrożenia, jakie niosą szczepy NDM-1, skłoniła do wdrożenia do rutynowej diagnostyki metod wykrywających karbapenemazy oraz do prowadzenia badań przesiewowych [246]. W pracy Mączyńskiej i wsp. odnotowano zawodność metod fenotypowych, dla których nie wykryto obecności karbapenemazy NDM-1, pomimo obecności genu bla_{NDM-1} wykrytego metodą molekularną [251]. Najprawdopodobniej wynika to ze

zmniejszonej ekspresji genu na podłożach bez antybiotyku lub małej liczby kopii plazmidu zawierającego ten gen. Niestety, większość szpitalnych laboratoriów mikrobiologicznych nie ma możliwości potwierdzenia obecności karbapenemaz NDM-1 metodą genetyczną.

Analiza pokrewieństwa genetycznego metodą typowania genetycznego PCR MP, wykazała bardzo wysoki stopień podobieństwa ($P_i = 97\%$) pomiędzy czterema badanymi izolatami *K. pneumoniae* NDM-1 (nr 4R, 53B, 32K, 33K), co sugeruje ich pochodzenie klonalne. Prawdopodobnie są one szczepami epidemicznymi wywodzącymi się z jednego ogniska. Dwa izolaty o numerze 16K i 46B były niespokrewnione z ogniskiem epidemicznym. Szczep numer 16K (ND32) był wyizolowany od pacjenta hospitalizowanego uprzednio w Warszawie i przetransportowanego do kliniki w Gdańsku w 2016 roku (pacjent z ZUM, ale bez przeszczepu nerki). Szczep numer 46B (ND24) został wyizolowany od pacjenta po przeszczepieniu nerki w 2018 roku i najprawdopodobniej na jego wielooporność miała wpływ stosowana długotrwała antybiotykoterapia. Pacjent mógł być wcześniej nosicielem szczepu NDM-1 pochodzącego z innego źródła.

Porównanie wzorów pokrewieństwa genetycznego i lekooporności wykazało, że można uzyskać różne wzory antybiogramów dla szczepów pochodzących z tego samego klonu, i odwrotnie, bardzo podobne antybiogramy przy braku pokrewieństwa genetycznego. Jest to powszechne zjawisko, najprawdopodobniej wynikające z plazmidowego charakteru oporności szczepów *Klebsiella* NDM-1, które w łatwy sposób mogą przekazywać plazmid niosący gen NDM-1 innej bakterii, a także nabywać inne plazmidy noszące geny oporności [173,182]. Szczep numer 16K (ND32), pomimo braku podobieństwa genetycznego, charakteryzował się bardzo zbliżonym wzorem oporności jak szczep numer 53B (ND88). Szczepy genetycznie spokrewnione mogą charakteryzować się zmienną opornością na poszczególne antybiotyki co zostało potwierdzone w tej rozprawie. Dwa szczepy o numerach 3R (ND33) i 4R (ND34) pochodzące od tego samego pacjenta i należące do tego samego klonu, w zakresie oporności różniły się w stosunku do amikacyny. Bardziej oporny był szczep izolowany z dróg moczowych, co może wynikać z nabycia genów oporności już w trakcie terapii. Ze względu na współistnienie różnych mechanizmów oporności, a także różną ilość kopii plazmidów niosących gen NDM-1, analiza podobieństwa uzyskanych antybiogramów u pałeczek *Klebsiella* NDM-1 może nie odzwierciedlać pokrewieństwa genetycznego szczepów.

Od 2012 roku w Polsce zauważa się ekspansję szczepów *Klebsiella pneumoniae* o typie sekwencyjnym ST11, produkujących karbapenemazy NDM-1 [252]. Z wykorzystaniem sekwencjonowania i analizy MLST, potwierdzono przynależność badanych szczepów również do klonu ST11. Poprzednie polskie badania epidemiczne szczepów *K. pneumoniae* NDM-1 o typie sekwencyjnym ST11, wyizolowanych w latach 2012-14 oraz 2015-16, ujawniły powszechną obecność plazmidów podobnych do IncFII / pKPX-1 oraz wysoką prevalencję, ale także częste rearanżacje IncRs [252,253]. Przedstawiona tutaj analiza dostarczyła danych na temat zawartości plazmidów w genotypie epidemii wśród pacjentów z ZUM jednego oddziału szpitalnego Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Przeważającym replikonem był IncFII / pKPX-1. Badanie ujawniło cechy genomyczne linii *K. pneumoniae* ST11 NDM-1, której ekspansja w Polsce jest jednym z najbardziej spektakularnych, ostatnich zjawisk epidemiologii CPE w Europie. Potwierdzono klonalny typ ogniska epidemicznego. Bakterie te charakteryzowały się obecnością niewielu, ale bardzo ważnych

czynników wirulencji. Ponadto, wykazywały różne mechanizmy oporności, których różnorodność była spowodowana zmianami zawartości plazmidów i rearanżacjami. Badania filogenetyczne wykazały ich wysokie pokrewieństwo ze szczepami, które wywołały w przeszłości epidemię w Grecji [254] i rozprzestrzeniły się na inne kraje. W niniejszej rozprawie doktorskiej potwierdzono, że ta linia *K. pneumoniae* ST11 NDM-1 reprezentuje genotyp wysokiego ryzyka, a przedstawiona w rozprawie analiza dostarcza podstawowych danych do jej przyszłej identyfikacji i śledzenia.

Nabywanie i rozprzestrzenianie się genów związanych z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe i zjadliwością jest ułatwione dzięki pewnym typom ruchomych elementów genetycznych (MGE, ang. *mobile genetic element*), takich jak plazmidy, sekwencje insercyjne, transpozony, integrony i związane z nimi kasety genów, profagi, ICEs oraz wyspy genomowe [255]. MGE są zdolne do poziomego przenoszenia genów, a zatem są potencjalnymi czynnikami rozprzestrzeniania genów zjadliwości lub oporności na drobnoustroje. *K. pneumoniae* przenosi wiele MGE, z których dwa są związane z wirulencją: ICEKp1- chromosomalna wyspa o wielkości 62 kb zintegrowana z tRNA^{asn} oraz plazmid pLVPK. Elementy te występują częściej w izolatach odpowiedzialnych za choroby inwazyjne [256]. Dodatkowo, pLVPK ma wpływ na typ wytwarzanej otoczki [257]. ICEKp1 jest obecny w jednej trzeciej izolatów klinicznych i częściej jest wykrywany w szczepach inwazyjnych. Ponadto, ICEKp1 zapewnia różnorodność genetyczną i umożliwia rozprzestrzenianie się genów związanych z wirulencją. Częstość występowania ICEKp1 wśród badanych izolatów wynosiła 49,5%.

Co ciekawe, oprócz ICEKp1 analiza ujawniła powszechną obecność drugiego elementu integracyjnego - ICEKp2 [256,258]. ICEKp2, to chromosomalna wyspa zintegrowana z tRNA^{phe} o wielkości 56 kb. Farzand i wsp. wykazali w swoich badaniach ograniczenie dystrybucji ICEKp2 do izolatów w USA, Wielkiej Brytanii i Azji [213]. Ponadto częstość występowania elementu ICEKp1 była wyższa dla niektórych typów sekwencyjnych, na przykład w 100% znajdowano go w typach sekwencyjnych ST45, ST353 i ST105 w porównaniu z 36% w typie sekwencyjnym ST15, co może sugerować starsze pochodzenie i / lub większą mobilność ICEKp1 w porównaniu z ICEKp2. Z kolei ICEKp2 był ograniczony do blisko spokrewnionych typów sekwencyjnych *K. pneumoniae*. W przedstawionej w rozprawie analizie ICEKp2 nie był ograniczony do izolatów z wyżej wymienionych krajów i był pozytywnie skorelowany z badanymi typami sekwencji ST11 i ST258, które są blisko spokrewnione. Typy te są związane z epidemią szczepów niosących oporność na karbapenemy w Chinach i USA. ICEKp2 był obecny w izolatach zarówno z i bez ICEKp1.

Typ otoczki wpływa na efektywność poziomego transferu genów [259]. W szczególności szczepy wykazujące obecność śluzowych typów otoczek, takich jak K1 i K2, mają więcej genów pomocniczych oraz typy te, prawdopodobnie wskazują na bardziej efektywny poziomy transfer genów [133]. W przedstawionej analizie ICEKp2 występował we wszystkich szczepach o fenotypie śluzowym. Z kolei typy otoczek śluzowych nie były pozytywnie związane z elementem ICEKp1 (tylko 5 spośród 7 izolatów było nosicielami częściowego elementu ICEKp1) (Rysunek 31).

Podsumowując, obecność elementu ICEKp2 jest powszechna wśród izolatów klinicznych *K. pneumoniae* NDM-1 o typie sekwencyjnym ST11 (23 na 24 analizowane szczepy) i często współwystępuje z ICEKp1 (w 87,5% badanych przypadków). ICEKp2 jest powiązany głównie

z epidemiami w USA i rzadko jest kojarzony z izolatami z Polski. Obecność *mob2* z ICEKp2 zwiększa mobilizację współwystępującego ICEKp1, zwiększając zakres interakcji ułatwiających rozprzestrzenianie się wirulencji i oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe poprzez poziomy transfer genów [213,260]. Od 2016 roku w Polsce doszło do niekontrolowanego rozprzestrzeniania się szczepów *K. pneumoniae* NDM-1, a ich występowanie raportuje się we wszystkich województwach [252,253]. Wielooporność bakterii a także brak nowych skutecznych antybiotyków zmniejsza szansę powodzenia terapeutycznego w leczeniu zakażeń. Konieczna jest więc prewencja, a w szczególności badania przesiewowe i odcinanie dróg transmisji epidemicznych klonów poprzez higienę rąk i izolację pacjentów zakażonych oraz skolonizowanych. Niezbędne są także badania naukowe: wykrywanie, analiza i śledzenie rozprzestrzeniania się w różnych rejonach Polski epidemicznych klonów *K. pneumoniae* NDM-1.

6.7. Badanie ekspresji genów

6.7.1. Badanie ekspresji genów fimbrii typu 1 w różnych warunkach wzrostu *K. pneumoniae* z zastosowaniem metody PCR-RFLP

Fimbrie typu 1 odgrywają ważną rolę w adhezji do komórek pęcherza moczowego oraz biorą udział w tworzeniu biofilmu w pęcherzu moczowym. Ekspresja fimbrii typu 1 jest regulowana przez odwracalny element DNA zawarty w obrębie promotora głównego genu kodującego podjednostkę fimbrialną, *fimA*. Wykazano, że do regulowania ekspresji fimbrii typu 1, bakterie *K. pneumoniae* mogą wykorzystywać bodźce środowiskowe [137]. W celu oceny wpływu różnych warunków wzrostu na ekspresję genów fimbrii typu 1 przeprowadzono test oparty o PCR-RFLP służący do określenia orientacji przełącznika fazowego *fim* bakterii *K. pneumoniae*. Orientację przełącznika fazowego zbadano poprzez amplifikację PCR regionu przełącznika fazowego operonu *fim* o wielkości 817 pz i trawienie amplicjonu enzymem restrykcyjnym *HinfI*. Uzyskano charakterystyczne wzory restrykcyjne świadczące o tzw. orientacji przełącznika fazowego, oznaczające włączenie/ON (dwa produkty o długościach: 605 i 212 pz) lub wyłączenie/OFF (dwa produkty o długościach: 496 i 321 pz) ekspresji fimbrii typu 1.

Przeprowadzono badanie zmienności fazowej przełącznika *fim* dla szczepu *K. pneumoniae* o nr 1K podczas hodowli w różnych warunkach wzrostu (Tabela 42). Wykazano, że w hodowli na bulionie odżywczym (LB) z wytrząsaniem, tylko w fazie wzrostu logarytmicznego bakterie miały przełącznik fazowy w pozycji wyłączonej OFF. W tych samych warunkach hodowli, ale w późnej fazie stacjonarnej, stwierdzono występowanie mieszanej populacji bakterii z orientacją przełącznika fazowego w pozycji ON i OFF (Tabela 42). Mieszana populacja bakterii zawierała więc komórki bakterii, dla których możliwa była ekspresja genów zaangażowanych w syntezę fimbrii typu 1 i tworzenie biofilmu bakteryjnego. W kulturach hodowanych statycznie, zarówno na podłożu stałym, jak i w pożywce płynnej, wykryto jedynie orientację OFF i to zarówno dla próbek pobranych z hodowli z fazy wzrostu logarytmicznego, jak i z fazy stacjonarnej.

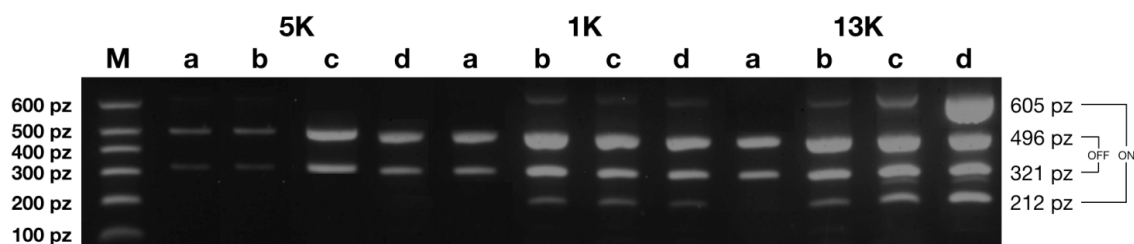
Tabela 42. Orientacja przełącznika *fim* dla szczepu *K. pneumoniae* o numerze 1K w różnych warunkach hodowli *in vitro*

Warunki hodowli	Orientacja przełącznika <i>fim</i>			
	Faza wzrostu wykładniczego	Faza stacjonarna	Czterokrotne pasażowanie	Hodowla 96 godzinna
Stacyczna hodowla płynna LB	OFF	OFF	OFF	OFF
Hodowla płynna LB z wytrząsaniem	OFF	ON-OFF	ON-OFF	ON-OFF
Hodowla na podłożu stałym LA	ND	OFF	OFF	OFF

OFF – orientacja przełącznika fazowego w pozycji wyłączonej, ON - orientacja przełącznika fazowego w pozycji włączonej, ND - brak danych

Wykazano, że przedłużony wzrost hodowli statycznych, zarówno zastosowanie czterokrotnych pasażów na nową pożywkę, jak i hodowla trwająca 96 godzin, nie zmienia położenia przełącznika, który pozostaje w orientacji OFF. W przeciwieństwie do hodowli z wytrząsaniem, dla której przełącznik fazowy występował w obu orientacjach (ON/OFF) w tych samych warunkach wzrostu bakterii.

Wykazano również, że zmiana orientacji przełącznika fazowego dla fimbrii typu 1 w różnych warunkach hodowli różniła się pomiędzy klinicznymi szczepami *K. pneumoniae* z grupy kontrolnej. Badaniu poddano trzy szczepy o numerach 1K, 5K i 13K. W szczepie o numerze 5K orientacja OFF była wykrywana w hodowli na bulionie odżywczym (LB) z wytrząsaniem w fazie późno-stacjonarnej, po czterokrotnym pasażowaniu oraz po wydłużonej 96 godzinnej hodowli (Rysunek 32). Dla szczepów o numerach 1K i 13K, orientacja przełącznika fazowego w warunkach hodowli na bulionie z wytrząsaniem była w pozycji OFF dla wykładniczej fazy wzrostu i w pozycji ON dla hodowli stacjonarnej, czterokrotnie pasażowanej oraz trwającej 96 godzin (Rysunek 32).



Rysunek 32. Orientacja przełącznika fazowego dla operonu *fim*, dla trzech wybranych szczepów *K. pneumoniae* (szczepy o numerach 1K, 5K i 13K) po hodowli w pożywce płynnej z wytrząsaniem (a) z wykładniczej fazy wzrostu bakterii, (b) z fazy późno-stacjonarnej, (c) po czterokrotnym pasażu, (d) trwającej 96 godzin. Orientacja wyłączona „OFF” odpowiada prążkom o wielkości 496 pb i 321 pb, zaś włączona „ON” prążkom o wielkości 605 pb i 212 pb. M - marker wielkości DNA

6.7.2. Badanie heterogeniczności w ekspresji genów fimbrii typu 1 szczepów klinicznych *K. pneumoniae* z zastosowaniem metody PCR-RFLP

Spośród 61 izolatów *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów z grupy badanej, 11 (18%) izolatów nie wytworzyło produktu PCR zawierającego element odwracalny o wielkości 817 pb. W przypadku 36 izolatów od pacjentów z grupy kontrolnej, 4 (11,1%) izolaty nie wytworzyły produktu PCR. Następnie oceniono zdolność komórek bakteryjnych do wyrażania fenotypu wiążącego D-mannozę na podstawie ich zdolności do aglutynacji komórek drożdży. Spośród 50 izolatów z grupy badanej, które dały pozytywny wynik reakcji PCR, 43 izolaty wykazały aglutynację komórek drożdży, wykazując w ten sposób prawdopodobną zdolność do ekspresji fimbrii typu 1. W przypadku 32 izolatów z grupy kontrolnej,

26 z nich wykazało aglutynację komórek drożdży. Orientację przełącznika fazowego dla 50 szczepów z grupy badanej i 32 szczepów z grupy kontrolnej określono poprzez trawienie enzymem restrykcyjnym *HinfI* uzyskanych produktów PCR. Wyniki dla szczepów klinicznych *K. pneumoniae* z grupy kontrolnej zostały zaprezentowane w tabeli 43. Z uwagi na dalszy schemat badań prowadzonych dla szczepów klinicznych *K. pneumoniae* z grupy badanej, wyniki dla tej grupy zostały zaprezentowane w tabeli 45.

Badanie heterogeniczności w ekspresji fimbrii typu 1 poprzez zmianę orientacji sekwencji w regionie przełącznika *fim* wśród szczepów klinicznych *K. pneumoniae* hodowanych w wybranych warunkach wzrostu, tj. na pożywce płynnej z wytrząsaniem wykazało, że 29 (47,5%) szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów z grupy badanej oraz 23 (63,9%) szczepów *K. pneumoniae* z grupy kontrolnej miało przełącznik fazowy w obu orientacjach. Przełącznik w orientacji wyłączonej/OFF zaobserwowano w przypadku 21 (34,4%) szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych od pacjentów z grupy badanej oraz 9 (25,0%) szczepów *K. pneumoniae* z grupy kontrolnej. W przypadku 5 z 6 izolatów z grupy kontrolnej niewykazujących aglutynacji komórek drożdży zaobserwowano przełącznik fazowy w orientacji wyłączonej/OFF, zaś dla 1 z tych 6 izolatów przełącznik ustawiony był w obu orientacjach. W przypadku 6 z 7 izolatów z grupy badanej niewykazujących aglutynacji komórek drożdży zaobserwowano przełącznik fazowy w orientacji wyłączonej/OFF, zaś dla 1 z tych 7 izolatów przełącznik w obu orientacjach.

Tabela 43. Wynik badania heterogeniczności w ekspresji genów fimbrii typu 1 szczepów klinicznych *K. pneumoniae* z grupy kontrolnej z zastosowaniem metody PCR-RFLP

Nr izolatu	ESBL	Obecność fimbrii typu 1 (PCR)	Obecność fimbrii typu 3 (PCR)	Wynik reakcji PCR w teście orientacji fimbrii	Agglutynacja komórek drożdży	Orientacja przełącznika <i>fim</i> po całonocnej statycznej hodowli w pożywce płynnej
1K	0	1	1	1	1	ON-OFF
2K	0	1	1	1	1	OFF
3K	1	0	1	0	0	-
4K	0	1	1	1	1	ON-OFF
5K	1	1	1	1	1	OFF
6K	0	1	1	1	1	ON-OFF
7K	1	1	1	1	1	OFF
8K	1	1	1	1	1	ON-OFF
9K	1	0	0	0	0	-
10K	1	1	1	1	1	ON-OFF
11K	0	1	1	1	1	ON-OFF
12K	1	1	1	1	1	ON-OFF
13K	1	1	0	1	1	ON-OFF
14K	0	1	1	1	0	OFF
15K	1	1	1	1	1	ON-OFF
16K	NDM	1	1	1	1	ON-OFF
17K	0	1	1	1	1	ON-OFF
18K	0	1	1	1	0	OFF
19K	1	1	1	1	1	ON-OFF
20K	0	1	1	1	0	OFF
21K	0	1	1	1	1	ON-OFF
22K	1	1	1	1	1	OFF
23K	1	1	1	1	1	ON-OFF
24K	1	1	1	1	0	OFF
25K	1	1	1	1	1	ON-OFF
26K	1	0	1	0	0	-
27K	1	1	1	1	1	ON-OFF
28K	0	0	1	0	0	-

Nr izolatu	ESBL	Obecność fimbrii typu 1 (PCR)	Obecność fimbrii typu 3 (PCR)	Wynik reakcji PCR w teście orientacji fimbrii	Aglutynacja komórek drożdży	Orientacja przełącznika <i>fim</i> po całonocnej statycznej hodowli w pożywce płynnej
29K	0	1	1	1	0	OFF
30K	0	1	1	1	1	ON-OFF
31K	1	1	1	1	1	ON-OFF
32K	NDM	1	1	1	1	ON-OFF
33K	NDM	1	1	1	1	ON-OFF
34K	1	1	1	1	1	ON-OFF
35K	0	1	0	1	0	ON-OFF
36K	0	1	0	1	1	ON-OFF

OFF – orientacja przełącznika fazowego w pozycji wyłączonej, ON - orientacja przełącznika fazowego w pozycji włączonej, 1 - wynik pozytywny, 0 - wynik negatywny

6.7.3. Badanie ekspresji fimbrii typu 1 szczepów *K. pneumoniae* wobec ekspozycji na leki immunosupresyjne z zastosowaniem testu przełącznika fazowego

Celem badania było sprawdzenie zmienności fazowej przełącznika *fim* bakterii *K. pneumoniae* pod wpływem ekspozycji na leki immunosupresyjne (cyklosporyna i tacrolimus) (Tabela 44). Wykazano, że zmiana fazy fimbrii typu 1 w hodowli płynnej w obecności leków immunosupresyjnych różniła się między klinicznymi szczepami *K. pneumoniae* z grupy kontrolnej. W przypadku dwóch szczepów o numerach 1K i 13K nie zaobserwowano różnic w pozycji przełącznika między hodowlą kontrolną bez leku i hodowlami w obecności leków immunosupresyjnych o różnych stężeniach. W szczepach tych, orientacja włączona/ON była wykrywalna również w hodowlach z dodatkiem leków immunosupresyjnych we wszystkich testowanych stężeniach. Wykazano, że obecność cyklosporyny w stężeniu terapeutycznym (200 µg/l) i wyższym (600 µg/l), wpłynęła na pojawienie się przełącznika fazowego w obu orientacjach w przypadku szczepu o numerze 5K.

Tabela 44. Orientacja przełącznika *fim* dla trzech wybranych szczepów *K. pneumoniae* po całonocnej hodowli w pożywce płynnej z wytrząsaniem w obecności leków immunosupresyjnych o różnych stężeniach

Warunki hodowli	Orientacja przełącznika <i>fim</i>		
	Szczep nr 5K	Szczep nr 1K	Szczep nr 13K
Kontrola	OFF	ON-OFF	ON-OFF
Cyklosporyna [100 µg/l]	OFF	ON-OFF	ON-OFF
Cyklosporyna [200 µg/l]	ON-OFF	ON-OFF	ON-OFF
Cyklosporyna [600 µg/l]	ON-OFF	ON-OFF	ON-OFF
Tacrolimus [5 µg/l]	OFF	ON-OFF	ON-OFF
Tacrolimus [10 µg/l]	OFF	ON-OFF	ON-OFF
Tacrolimus [30 µg/l]	OFF	ON-OFF	ON-OFF

OFF – orientacja przełącznika fazowego w pozycji wyłączonej, ON - orientacja przełącznika fazowego w pozycji włączonej

Spośród 61 izolatów *K. pneumoniae* pochodzących od pacjentów z grupy badanej, dla 50 z nich sprawdzono wpływ leków immunosupresyjnych na zmianę przełącznika fazowego fimbrii typu 1. Wpływ cyklosporyny na zmianę orientacji przełącznika fazowego badano dla 8 izolatów, które pozyskano od pacjentów po przeszczepie nerki przyjmujących cyklosporynę w schemacie immunosupresji. Wykazano, że obecność w hodowli cyklosporyny w stężeniu terapeutycznym (200 µg/l), wpłynęła na pojawienie się przełącznika fazowego w obu orientacjach w przypadku 3 szczepów (37,5%). Dla pozostałych 5 szczepów nie odnotowano zmiany przełącznika wskutek ekspozycji na cyklosporynę w stężeniu terapeutycznym. Wpływ tacrolimusu na zmianę orientacji przełącznika fazowego badano dla 42 izolatów, które pozyskano od pacjentów po przeszczepie nerki przyjmujących tacrolimus w schemacie immunosupresji. Wykazano, że

obecność w hodowli tacrolimusu w stężeniu terapeutycznym (10 µg/l), wpłynęła na pojawienie się przełącznika fazowego w obu orientacjach w przypadku 5 szczepów (11,9%). Dla pozostałych 37 szczepów nie odnotowano zmiany przełącznika wskutek ekspozycji na tacrolimus w stężeniu terapeutycznym.

Tabela 45. Wynik badania ekspresji fimbrii typu 1 dla szczepów klinicznych *K. pneumoniae* z grupy badanej hodowanych *in vitro* bez oraz w obecności leków immunosupresyjnych o stężeniu terapeutycznym z zastosowaniem metody PCR-RFLP

Nr izolatu	ESB L	Cs A	Ta c	Obecność fimbrii typu 1 (PCR)	Obecność fimbrii typu 3 (PCR)	Wynik reakcji PCR w teście orientacji i fimbrii	Aglutynacja komórek drożdży	Orientacja przełącznika a fim po calonocnej statycznej hodowli w pożywce płynnej	Orientacja przełącznika a fim po calonocnej statycznej hodowli z lekiem
1B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
2B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
3B	0	0	1	0	0	0	-	-	-
4B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
5B	1	0	1	1	0	1	+	ON-OFF	ON-OFF
6B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
7B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
8B	1	0	1	0	1	0	-	-	-
9B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
10B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
11B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
12B	1	0	1	0	1	0	-	-	-
13B	1	0	1	0	1	0	-	-	-
14B	0	1	0	1	1	1	-	OFF	OFF
15B	0	0	1	1	1	1	+	OFF	OFF
16B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
17B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
18B	1	0	1	0	1	0	-	-	-
19B	1	0	1	1	1	1	+	OFF	ON-OFF
20B	1	0	1	1	1	1	+	OFF	ON-OFF
21B	1	0	1	1	1	1	-	OFF	OFF
22B	1	1	0	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
23B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
24B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
25B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
26B	1	0	1	1	1	1	-	OFF	OFF
27B	1	1	0	1	1	1	+	OFF	OFF
28B	1	0	1	1	1	1	+	OFF	OFF
29B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
30B	0	0	1	1	1	1	+	OFF	OFF
31B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
32B	1	0	1	1	0	1	+	ON-OFF	ON-OFF
33B	0	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
34B	1	0	1	1	1	1	-	OFF	ON-OFF
35B	0	0	1	0	1	0	-	-	-
36B	1	0	1	1	1	1	+	OFF	OFF
37B	1	0	0	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
38B	1	0	1	0	1	0	-	-	-
39B	0	0	1	0	1	0	-	-	-
40B	1	0	1	0	1	0	-	-	-
41B	1	1	0	1	1	1	+	OFF	ON-OFF
42B	0	0	1	1	0	1	+	ON-OFF	ON-OFF
43B	1	0	1	1	1	1	-	OFF	ON-OFF
44B	1	0	1	1	0	1	+	ON-OFF	ON-OFF
45B	1	1	0	1	1	1	+	OFF	ON-OFF
46B	NDM	0	1	1	1	1	+	OFF	OFF
47B	0	1	0	1	1	1	+	OFF	OFF
48B	0	0	1	1	1	1	+	OFF	OFF

Nr izolatu	ESB L	Cs A	Ta c	Obecność fimbrii typu 1 (PCR)	Obecność fimbrii typu 3 (PCR)	Wynik reakcji PCR w teście orientacji i fimbrii	Aglutynacja komórek drożdży	Orientacja przełącznika a <i>fim</i> po całonocnej statycznej hodowli w pożywce płynnej	Orientacja przełącznika a <i>fim</i> po całonocnej statycznej hodowli z lekiem
49B	0	0	1	1	1	1	+	OFF	OFF
50B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
51B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
52B	1	0	1	0	1	0	-	-	-
53B	NDM	1	0	1	1	1	-	OFF	ON-OFF
54B	1	0	1	1	1	1	+	OFF	ON-OFF
55B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
56B	0	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
57B	0	1	0	1	0	1	+	ON-OFF	ON-OFF
58B	0	0	1	0	0	0	-	-	-
59B	1	0	1	1	1	1	+	ON-OFF	ON-OFF
60B	1	0	1	1	1	1	+	OFF	OFF
61B	1	0	1	1	0	1	-	ON-OFF	ON-OFF

OFF – orientacja przełącznika fazowego w pozycji wyłączzonej, ON - orientacja przełącznika fazowego w pozycji włączonej; 1 - wynik pozytywny, 0 - wynik negatywny

Część wyników badania ekspresji genów fimbrii typu 1 w różnych warunkach wzrostu szczepów *K. pneumoniae* została przedstawiona w formie plakatu podczas Konferencji Naukowej 90 lat Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, PTM wczoraj – dziś – jutro w Krakowie: “Wpływ leków immunosupresyjnych na ekspresję genu *fimA* dla szczepów *Klebsiella pneumoniae* izolowanych z dróg moczowych pacjentów po przeszczepie nerki.” oraz II Ogólnopolskiej Konferencji "Drobnoustroje w świecie człowieka - Drobnoustroje oportunistyczne" w Bydgoszczy: „Badanie ekspresji fimbrii typu 1 *Klebsiella pneumoniae* izolowanych od pacjentów po transplantacji nerki.”

6.7.4.DYSKUSJA

Mimo że *K. pneumoniae* jest uznawana za jeden z najważniejszych Gram-ujemnych patogenów oportunistycznych, szczegółowa wiedza na temat mechanizmu powodującego infekcje jest ograniczona. Wykazano, że otoczka i lipopolisacharyd chronią komórkę bakteryjną przed układem odpornościowym gospodarza. Chociaż zdolność bakterii do przylegania do struktur gospodarza jest ogólnie uważana za niezbędną w rozwoju infekcji bakteryjnych, wiedza na temat wpływu określonych czynników adhezji na zjadliwość *K. pneumoniae* jest niewielka.

Fimbrie typu 1 są szeroko rozpowszechnione wśród gatunków Enterobacteriaceae; jednakże większość badań ekspresji i funkcjonalności fimbrii typu 1 zostało przeprowadzonych dla *E. coli*. Chociaż klastry genów *fim* *E. coli* i *K. pneumoniae* są blisko spokrewnione, to nie są one identyczne, ze względu na odrębność serologiczną oraz fakt, że wykazano znaczące różnice w specyficzności wiązania cukru i zdolności wiązania się z komórkami nabłonkowymi [137,139,140].

Odwracalny element DNA pośredniczący w przełączaniu fazowym ekspresji fimbrii typu 1 został już zidentyfikowany i scharakteryzowany w kilku badaniach [137,141]. Jednak w tej rozprawie, przełącznik *fim* *K. pneumoniae* został zweryfikowany jako odwracalny poprzez porównanie orientacji przełącznika w hodowlach prowadzonych w różnych warunkach wzrostu i pod wpływem ekspozycji na różne leki

immunosupresyjne. Według mojej wiedzy jest to pierwsze badanie, w którym zbadano rolę fimbrii typu 1 w ZUM o etiologii *K. pneumoniae* izolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki.

Wykazano, że warunki wzrostu wpływają na ekspresję fimbrii typu 1 szczepów *K. pneumoniae* izolowanych z zakażeń układu moczowego i regulacja zmiany przełącznika jest niejednorodna. Trzy reprezentatywne szczepy z grupy kontrolnej wyhodowane w statycznej pożywce płynnej wykazały orientację przełącznika fazy w położeniu wyłączony/OFF, podczas gdy wzrost na pożywce z wytrząsaniem spowodował pojawienie się obu orientacji przełącznika fazy w przypadku dwóch szczepów. Zgodnie z dostępną literaturą, większość klinicznych izolatów *K. pneumoniae*, jak i *E. coli* obniża ekspresję fimbrii typu 1, gdy są one hodowane na podłożach stałych, zaś hodowla z wytrząsaniem promuje ekspresję fimbrii typu 1 *K. pneumoniae* [137,141,261]. Profil ekspresji fimbrii typu 1 dla reprezentatywnych szczepów *K. pneumoniae* hodowanych w płynnych pożywkach z wytrząsaniem był wyraźnie różny od profilu uprzednio opisanego dla *K. pneumoniae* [137,141]. W tych warunkach, dla jednego szczepu wykazano przełącznik w położeniu wyłączony/OFF, a dla dwóch szczepów widoczne były obie orientacje przełącznika (ON/OFF). Aby sprawdzić, czy jest to zjawisko specyficzne dla szczepu, wszystkie kliniczne izolaty *K. pneumoniae* izolowane z ZUM (zarówno z grupy badanej, jak i kontrolnej) poddano testowi w tych warunkach, tj. w hodowli płynnej z wytrząsaniem.

Regulacja ekspresji fimbrii typu 1 jest bardzo złożona i niewiele wiadomo na temat czynników regulujących ekspresję fimbrialną u *K. pneumoniae*. Według Schembri i wsp. można spodziewać się regulacji krzyżowej ze specyficznymi strukturami powierzchniowymi, jak fimbrie typu 3 i otoczki, co może skutkować odmiennym wzorcem ekspresji fimbrii typu 1 w porównaniu z *E. coli* i między klinicznymi szczepami *K. pneumoniae* [109]. Ponadto wykazano, że istnieje związek między pochodzeniem szczepu a specyficznymi wzorcami regulacji ekspresji fimbrii typu 1; generalnie szczepy uropatogenne są bardziej podatne na ekspresję fimbrii typu 1 niż szczepy izolowane z przewodu pokarmowego lub oddechowego [137,262]. Badania własne wykazały, że 47,5% izolatów *K. pneumoniae* izolowanych z ZUM z grupy badanej oraz 63,9% izolatów z grupy kontrolnej jest zdolna do ekspresji fimbrii typu 1. Szczepy, dla których wykryto orientację wyłączoną/OFF, charakteryzowały się między innymi pozytywnym wynikiem PCR na obecność genu kodującego fimbrie typu 3. Może to wskazywać na regulację krzyżową dwóch klastrów genów fimbrialnych. Na podstawie wyników sekwencjonowania dwóch wybranych szczepów [Met. 5.2.10.] ustalono, że dwa klastry genów fimbrialnych znajdują się w bliskiej odległości na chromosomie *K. pneumoniae*, przeplatane regionem, który koduje przypuszczalne geny regulatorowe. Kolejnym czynnikiem wpływającym na regulację ekspresji fimbrii typu 1 może być fakt wytwarzania przez większość uropatogennych szczepów *K. pneumoniae* polisacharydowych otoczek. W poprzednich badaniach [109,141] na wybranych izolatach *K. pneumoniae* izolowanych z ZUM stwierdzono, że ekspresja otoczki nie wpływa na odwrócenie promotora *fim* zlokalizowanego na przełączniku, jednak już sama obecność otoczki może maskować aktywność innych adhezyn zlokalizowanych na powierzchni komórki.

W prezentowanej rozprawie badano orientację przełącznika *fim*, również po to, aby ocenić, czy fimbrie typu 1 ulegały ekspresji pod wpływem ekspozycji na immunosupresanty. W wybranych warunkach hodowli i fazy wzrostu dla dwóch szczepów (numer 1K i 13K) nie wykazano różnic w orientacji przełącznika *fim* w odniesieniu do kontroli, z kolei dla jednego szczepu (numer 5K) wykazano, że obecność cyklosporyny w stężeniu terapeutycznym i wyższym, wpłynęła na regulację ekspresji fimbrii typu 1.

Aby sprawdzić, czy jest to zjawisko specyficzne dla szczepu, wszystkie kliniczne izolaty *K. pneumoniae* izolowane z ZUM od pacjentów po przeszczepie nerki poddano testowi w hodowli płynnej w obecności leków immunosupresyjnych w dawce terapeutycznej.

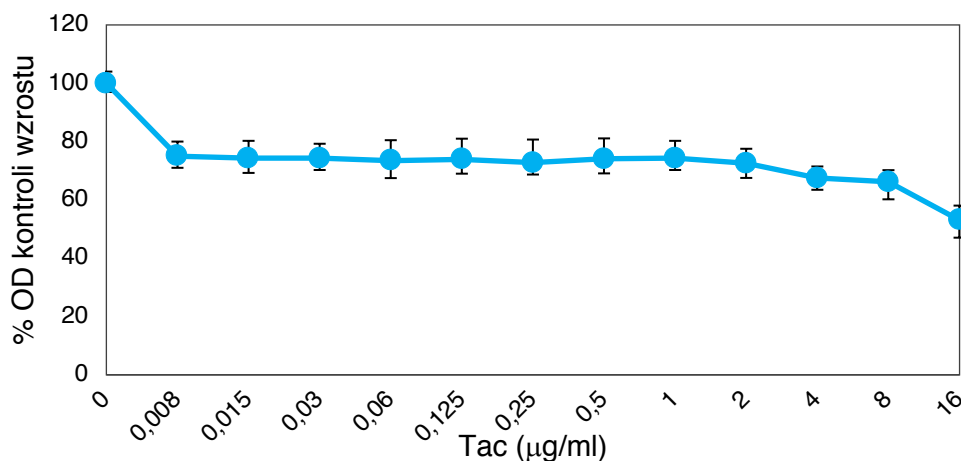
Ustalono, że obecność w hodowli cyklosporyny lub tacrolimusu w stężeniu terapeutycznym, ma wpływ na regulację ekspresji fimbrii typu 1. We wszystkich przypadkach izolatów z ZUM wykrywano wyłącznie zmianę orientacji przełącznika fazowego z pozycji wyłączonej/OFF na pozycję włączoną/ON, stąd jest prawdopodobne, że określone sygnały środowiskowe w drogach moczowych sprzyjają przestawieniu przełącznika do pozycji włączonej/ON. Autorzy sugerują [263,264], że istnieje odwrotny związek między ekspresją otoczki, która chroni bakterie przed fagocytozą a zdolnością do przylegania *K. pneumoniae* do powierzchni. Sugeruje się, że ekspresję fimbrii można regulować przez dodanie do środowiska substancji hamujących syntezę otoczki. Jako że otoczki również spełniają rolę w adhezji, ich brak może być zastąpiony przez wzmożoną ekspresję fimbrii typu 1. Drogi moczowe to miejsce, w którym przyczepność bakterii jest krytyczna, stąd niezbędne są struktury, które ułatwią komórkom adhezję. Jednak brak w tych miejscach fagocytów powoduje, że ekspresja genów kodujących otoczki może być na niskim poziomie, za to ekspresja fimbrii typu 1 będzie włączona. Ponieważ zaobserwowana w rozprawie zmiana fazy zachodziła w komórkach bakteryjnych izolowanych z ZUM w warunkach *in vitro*, można spekulować, że w drogach moczowych bakterie niefimbriowane będą w znacznej mierze eliminowane przez wydalenie z moczem.

Wykazano, że leki immunosupresyjne mogą być czynnikiem regulującym fenotypową ekspresję fimbrii typu 1 w izolatach *K. pneumoniae* pochodzących z ZUM od pacjentów po przeszczepie nerki, jednak ich rola może być zależna od szczepu.

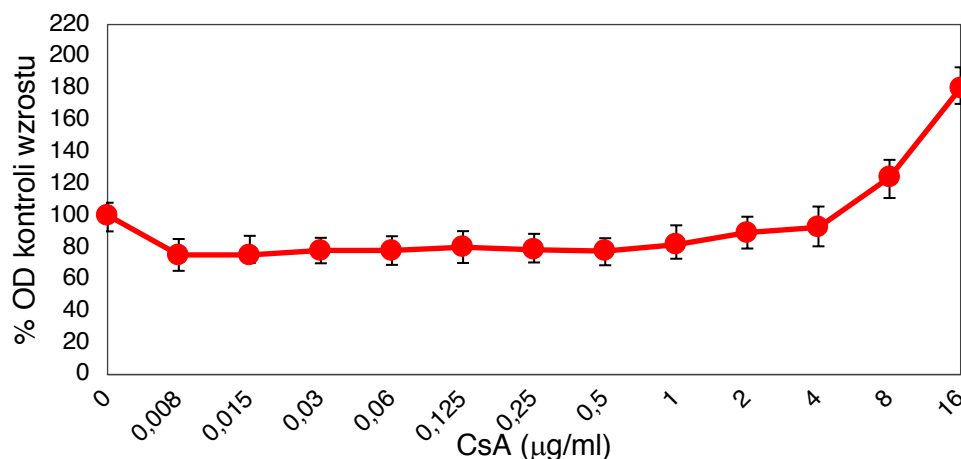
6.8. Badanie wpływu leków immunosupresyjnych na wzrost bakterii *K. pneumoniae* i ekspresję genów z zastosowaniem techniki qRT-PCR

6.8.1. Wrażliwość izolatów *K. pneumoniae* na leki immunosupresyjne

Badanie wrażliwości wszystkich izolatów *K. pneumoniae* z grupy kontrolnej na leki immunosupresyjne z zastosowaniem metody seryjnych rozcieńczeń nie wykazało wartości MIC wskazujących na oporność izolatów na badane związki: tacrolimus i cyklosporynę. Na poniższych rysunkach (Rysunek 33 i 34) przedstawiono średnie wartości gęstości optycznej (OD₆₀₀) dla hodowli komórkowych prowadzonych w obecności leków immunosupresyjnych w zakresie stężeń 0,008 - 16 µg/ml w odniesieniu do kontroli wzrostu, wyrażone w procentach.



Rysunek 33. Badanie lekowrażliwości izolatów *K. pneumoniae* na tacrolimus (Tac) metodą seryjnych rozcieńczeń (metoda płytkowa). Pokazano średnie wartości gęstości optycznej (OD_{600}) uzyskane dla wszystkich badanych szczepów, wyniki uśrednione z trzech powtórzeń oraz z trzech oddzielnych eksperymentów wraz z odchyleniem standardowym. Niebieska krzywa z okręgami reprezentuje procent spadku OD_{600} w porównaniu z OD_{600} kontroli wzrostu bakterii hodowanych bez leku. Każdy wiersz 96-dolkowej płytki titracyjnej zawierał studzienkę będącą kontrolą wzrostu oraz kontrolą pożywki. Dodatkowo sprawdzano wartości gęstości optycznej pożywki zawierającej odpowiednie stężenia leku z zakresu 0,008 - 16 µg/ml

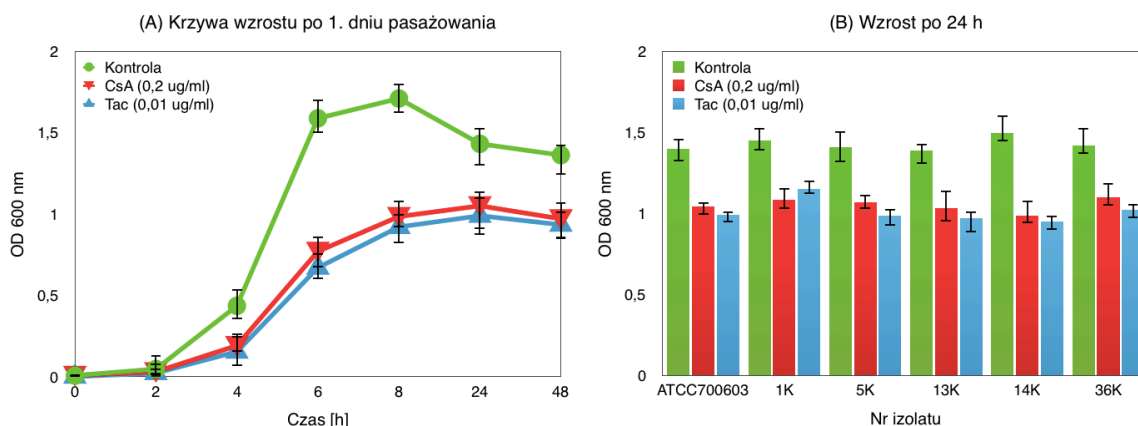


Rysunek 34. Badanie lekowrażliwości izolatów *K. pneumoniae* na cyklosporynę (CsA) metodą seryjnych rozcieńczeń (metoda płytkowa). Pokazano średnie wartości gęstości optycznej (OD_{600}) uzyskane dla wszystkich badanych szczepów, wyniki uśrednione z trzech powtórzeń oraz z trzech oddzielnych eksperymentów wraz z odchyleniem standardowym. Czerwona krzywa z okręgami reprezentuje procent zwiększenia OD_{600} w porównaniu z OD_{600} kontroli wzrostu bakterii hodowanych bez leku. Każdy wiersz 96-dolkowej płytki titracyjnej zawierał studzienkę będącą kontrolą wzrostu oraz kontrolą pożywki. Dodatkowo sprawdzano wartości gęstości optycznej pożywki zawierającej odpowiednie stężenia leku z zakresu 0,008 - 16 µg/ml

W oparciu o wyniki przedstawione na rysunkach 33 i 34 można stwierdzić, że wzrost drobnoustrojów nie został zahamowany dla żadnego z zakresu badanych stężeń leków immunosupresyjnych. Analiza wpływu tacrolimusu na bakterie *K. pneumoniae* wykazała, że dla najwyższych wartości stężeń leku w medium hodowlanym tj. 4, 8 i 16 µg/ml, bakterie osiągają odpowiednio 67%, 66% i 53% wzrostu w porównaniu do hodowli bez leku. Analiza wpływu cyklosporyny na bakterie *K. pneumoniae* wykazała, że dla najwyższych wartości stężeń leku w medium hodowlanym tj. 8 i 16 µg/ml, bakterie osiągają odpowiednio 124% i 180% wzrostu w porównaniu do hodowli bez leku. Dla stężeń terapeutycznych (cyklosporyna - 0,2 µg/ml, tacrolimus - 0,01 µg/ml) obydwu leków immunosupresyjnych zaobserwowano zmniejszenie wzrostu bakterii do 74% i 77% odpowiednio dla tacrolimusu i cyklosporyny, w porównaniu do hodowli kontrolnej bez leku.

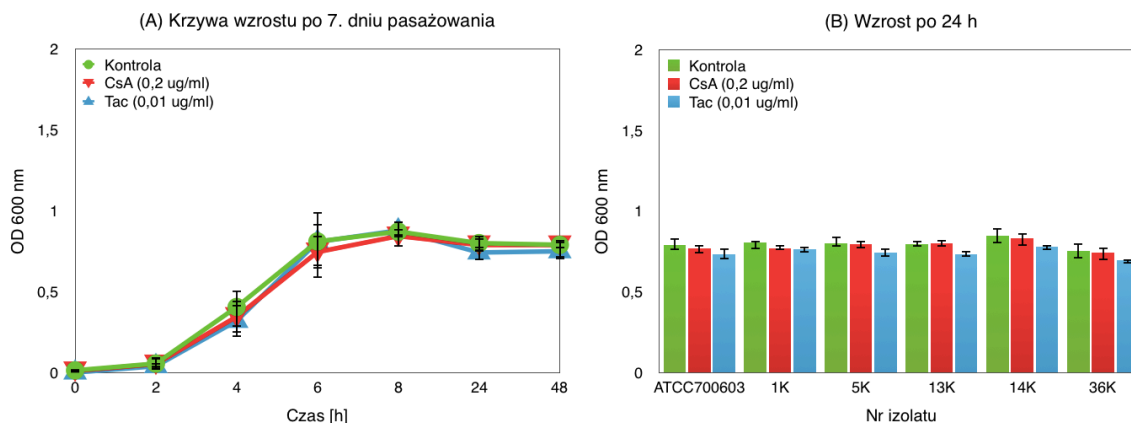
6.8.2. Wyznaczenie krzywych wzrostu bakterii w obecności leków immunosupresyjnych

Na poniższych rysunkach (Rysunek 35-37) przedstawiono krzywe wzrostu wyznaczone dla sześciu izolatów *K. pneumoniae* hodowanych bez oraz w obecności dwóch inhibitorów kalcyneuryny o stężeniu terapeutycznym: cyklosporyna (0,2 µg/ml), tacrolimus (0,01 µg/ml), w medium hodowlanym. Krzywe wzrostu oraz różnice we wzroście bakterii po 24 godzinach prowadzenia hodowli bez i w obecności leków zostały wyznaczone po pierwszym, siódmym oraz czternastym pasażu.



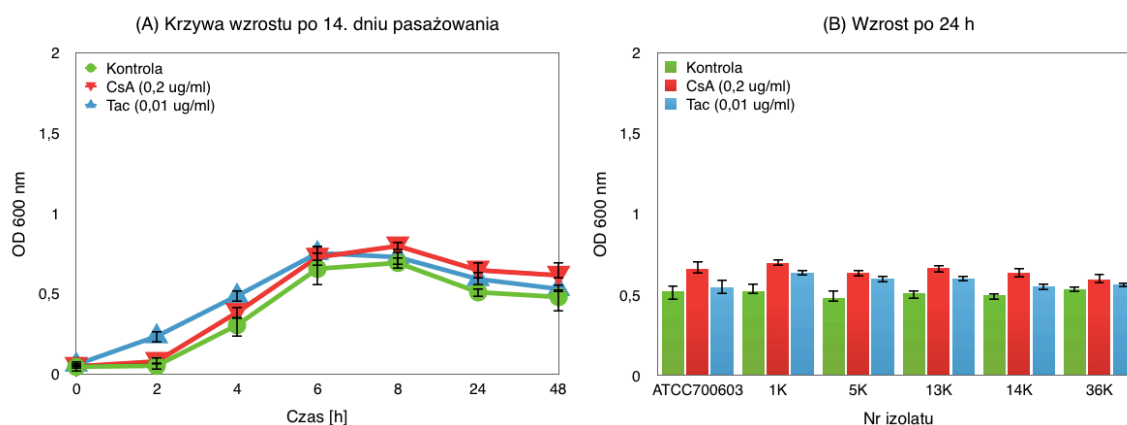
Rysunek 35. Badanie wpływu leków immunosupresyjnych na wzrost *K. pneumoniae* pasażowanych 1-krotnie na podłożach z dodatkiem leków. (A) Krzywa wzrostu prezentująca wartości gęstości optycznej hodowli bakteryjnej (OD_{600}) rejestrowane w czasie 0 oraz w 2, 4, 6, 8, 24, i 48 godzinie wzrostu dla izolatów *K. pneumoniae* hodowanych bez leku (kontrola - kolor zielony) oraz w obecności tacrolimusu (Tac - kolor niebieski) lub cyklosporyny (CsA - kolor czerwony). Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia z trzech powtórzeń dla pięciu badanych izolatów wraz z odchyleniem standardowym. (B) Wykres słupkowy prezentujący pomiar wzrostu (OD_{600}) po 24 godzinach od dodania leków immunosupresyjnych: kontrola - kolor zielony, Tac - kolor niebieski, CsA - kolor czerwony. Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia z trzech powtórzeń dla każdego z badanych izolatów (1K, 5K, 13K, 14K, 36K) oraz szczepu referencyjnego *K. pneumoniae* ATCC 700603 wraz z odchyleniem standardowym

Czasowe zależności krzywych wzrostu izolatów *K. pneumoniae* hodowanych jednokrotnie na podłożach z dodatkiem leków immunosupresyjnych o stężeniach terapeutycznych wykazały, że nie są one zbliżone do przebiegu krzywej dla hodowli bakterii bez działania leków. Krzywe wzrostu mają typowy sigmoidalny charakter i wskazują, że obecność immunosupresantów wywiera hamujący wpływ na wzrost hodowli bakteryjnych, który objawia się w postaci czasowych przesunięć krzywych wzrostu oraz różnic maksimum gęstości optycznej w stosunku do kontroli. Amplituda gęstości optycznej krzywej wzrostu hodowli kontrolnej jest niemal dwukrotnie wyższa od amplitudy zmian gęstości optycznej hodowli bakterii w obecności immunosupresantów po 6. godzinach prowadzenia hodowli. Różnica we wzroście bakterii po 24 godzinach prowadzenia hodowli bez i w obecności leków jest istotna statystycznie. Krzywe wzrostu dla tacrolimusu i cyklosporyny wykazują podobne zależności czasowe bez różnic istotnie statystycznych między lekami.



Rysunek 36. Badanie wpływu leków immunosupresyjnych na wzrost *K. pneumoniae* pasażowanych 7-krotnie na podłożach z dodatkiem leków. Opis jak w rysunku 35

Krzywe wzrostu przedstawione na rysunku 36 wykazują podobne zależności czasowe dla hodowli kontrolnych, jak i hodowli prowadzonych w obecności leków immunosupresyjnych. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie między hodowlami w żadnym punkcie czasowym (krzywe się pokrywają). Siedmiodniowa ekspozycja izolatów *K. pneumoniae* na działanie leków immunosupresyjnych wykazała, że krzywe wzrostu dla hodowli prowadzonych w obecności leków miały przebieg oraz maksimum gęstości optycznej porównywalny do hodowli pasażowanej 1-krotnie w obecności leków. Z kolei, 7-krotne pasażowanie izolatów bez obecności leków wpłynęło na zmianę przebiegu krzywej wzrostu w porównaniu do hodowli kontrolnej pasażowanej 1-krotnie. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie we wzroście bakterii po 24 godzinach prowadzenia hodowli bez i w obecności immunosupresantów.



Rysunek 37. Badanie wpływu leków immunosupresyjnych na wzrost *K. pneumoniae* pasażowanych 14-krotnie na podłożach z dodatkiem leków. Opis jak w rysunku 35

Czasowe zależności krzywych wzrostu po czternastu dniach ekspozycji na działanie immunosupresantów, przedstawione na rysunku 37, wykazały podobieństwo do przebiegu krzywej dla hodowli bakterii pasażowanej bez działania immunosupresantów, z tym, że wzrost bakterii na podłożach z dodatkiem leków immunosupresyjnych był wyższy w stosunku do hodowli kontrolnej. Czternastodniowa ekspozycja izolatów *K. pneumoniae* na działanie leków immunosupresyjnych wykazała, że krzywe wzrostu dla hodowli prowadzonych w obecności leków miały przebieg oraz maksimum gęstości optycznej porównywalny do hodowli pasażowanej 7-krotnie w obecności leków. Z kolei, 14-krotne pasażowanie izolatów bez obecności leków wpłynęło na zmianę przebiegu krzywej wzrostu w porównaniu do hodowli

kontrolnej pasażowanej 1-krotnie i statystycznie istotne zmniejszenie wzrostu w porównaniu do hodowli kontrolnej pasażowanej 1-krotnie, jak i 7-krotnie. Wykazano statystycznie istotne różnice we wzroście bakterii po 24 godzinach prowadzenia hodowli bez i w obecności immunosupresantów.

6.8.3.DYSKUSJA

Przeszczepianie nerek stanowi najlepszą, z punktu widzenia korzyści dla pacjenta, metodę leczenia nerkozastępczego. Sukces transplantacji zależy od terapii immunosupresyjnej, która zapobiega odrzucaniu przeszczepionego narządu. Zazwyczaj stosuje się schematy leczenia złożone z leków należących do różnych grup, najczęściej są to: inhibitory kalcyneuryny (CNI — cyklosporyna i tacrolimus), antymetabolity i steroidy. Podczas gdy w ostatnich latach osiągnięto poprawę krótkoterminowych wyników w transplantacji, utrzymanie długoterminowego przeżycia przeszczepu pozostaje nadal wyzwaniem. W większości przypadków podstawą leczenia długoterminowego jest jeden z wymienionych inhibitorów kalcyneuryny jako najskuteczniejszych leków zapobiegających odrzucaniu przeszczepionej nerki. W przeważającej liczbie ośrodków transplantacyjnych lekiem pierwszego wyboru jest tacrolimus, ponieważ opublikowane wyniki badań klinicznych i niedawno opublikowane rezultaty metaanalizy tych badań wskazują na jego lepszą skuteczność w porównaniu z cyklosporyną [265].

Inhibitory kalcyneuryny należą do leków o tak zwanym wąskim zakresie terapeutycznym (NTIDs, *narrow therapeutic index drugs*), a ich farmakokinetyka wykazuje znaczne różnice międzysobnicze, co powoduje ściśle określony zakres optymalnej ekspozycji na lek. Niedobór immunosupresji wiąże się z długofalowym ryzykiem, takim jak rozwój przeciwciał swoistych dla dawcy z wysokim prawdopodobieństwem pogorszenia czynności nerek i postępu do niewydolności przeszczepu. I odwrotnie, przedłużona nadmierna immunosupresja niesie ryzyko niepożądanych zdarzeń związanych z lekami. Mimo, iż nie stwierdzono działania bakteriobójczego inhibitorów kalcyneuryny, to w trakcie leczenia miejscowego tacrolimusem wykazano, że dochodzi do zmniejszenia kolonizacji skóry bakterią *Staphylococcus aureus* [266]. Sugeruje się, iż egzotoksyny wytwarzane przez *S. aureus* powodują zmniejszenie wrażliwości limfocytów T na kortykosteroidy, podczas gdy wrażliwość na inhibitory kalcyneuryny nie ulega zmianie [267].

W prezentowanej rozprawie przeanalizowano wpływ immunosupresji *in vitro* na komórki bakteryjne *Klebsiella pneumoniae*. W tym celu przeprowadzono badanie wrażliwości izolatów *K. pneumoniae* z grupy kontrolnej na leki immunosupresyjne metodą seryjnych rozcieńczeń w zakresie stężeń 0,008-16 µg/ml oraz wyznaczono krzywe wzrostu bakterii w obecności leków immunosupresyjnych o stężeniach terapeutycznych, odpowiednio 0,01 µg/ml i 0,2 µg/ml dla tacrolimusu i cyklosporyny. Sprawdzone wpływ krótkotrwałej, jak i długotrwałej ekspozycji izolatów na działanie immunosupresantów. Jest to innowacyjne podejście, które wiąże się z ideą że w środowisku gospodarza bakterie *K. pneumoniae* są narażone na długotrwałą ekspozycję na leki immunosupresyjne. Analiza wpływu leków immunosupresyjnych na wzrost bakterii i ekspresję genów bakteryjnych nabiera nowego znaczenia w świetle przypuszczalnych doniesień, wskazując na ich rolę w rozwoju ZUM.

Wyniki badań *in vitro* wykazały, że wrażliwość szczepów *K. pneumoniae* malała wraz ze wzrostem stężenia cyklosporyny. W przeciwieństwie do cyklosporyny, wraz ze wzrostem stężenia tacrolimusu, wrażliwość szczepów wzrastała. Dla stężeń terapeutycznych cyklosporyny, jak i tacrolimusu, odnotowano

spadek wzrostu hodowli (w porównaniu do hodowli kontrolnej bez leku), które utrzymywało się w szerokim zakresie stężeń (0,008 - 4 µg/ml). Wyniki dla stężeń terapeutycznych zostały potwierdzone na wykresach krzywych wzrostu. Monitorowanie stężeń leków we krwi jest obligatoryjne, ze względu na możliwość interakcji z innymi lekami. Interakcje te mogą powodować zwiększenie lub zmniejszenie stężenia leku lub zmianę jego działania farmakodynamicznego. Zaprezentowane w rozprawie wyniki sugerują monitorowanie stężenia leków immunosupresyjnych również ze względu na to, że wysokie dawki cyklosporyny mogą tworzyć sprzyjające warunki dla rozwoju bakterii, wymuszać ich adaptację do środowiska w odpowiedzi na warunki stresogenne.

Badanie krótkotrwałej ekspozycji izolatów *K. pneumoniae* na działanie immunosupresantów o stężeniach terapeutycznych potwierdziło wyniki badania wrażliwości, a zatem obecność immunosupresantów wpływała hamująco na wzrost hodowli bakteryjnych do 74% i 77% odpowiednio dla tacrolimusu i cyklosporyny. Z kolei długotrwała ekspozycja wykazała, że stała obecność leków immunosupresyjnych w środowisku życia drobnoustrojów może wywierać presję selekcyjną i adaptację bakterii, zwiększając tym samym szanse na przeżycie bakterii.

6.8.4. Badanie poziomów ekspresji genów izolatów *K. pneumoniae* metodą porównawczą z zastosowaniem qRT-PCR

W prezentowanej rozprawie podjęto się zbadania zmian w poziomie ekspresji wybranych genów kodujących istotne czynniki wirulencji wskutek ekspozycji na leki immunosupresyjne. Wszystkie wybrane izolaty hodowano na podłożach z dodatkiem cyklosporyny lub tacrolimusu w dwóch stężeniach - przedstawionych w tabeli 26 [Met. 5.2.7.3] i bez dodatku leków (kontrola). Po pierwszym pasażu wyizolowano RNA, przeprowadzono syntezę cDNA i amplifikację PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) w celu określenia zmian w poziomach ekspresji genów kodujących adhezyny (*fimA* i *mrkA*) oraz siderofory (*entB*, *irp2*, *iroB* i *iucA*) badanych izolatów. Wybrane do badania geny kodują czynniki wirulencji, które ułatwiają bakterii przetrwanie w środowisku gospodarza i wywołanie ZUM o etiologii *K. pneumoniae*. W poniższych podrozdziałach przedstawiono wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych badanych genów. Do obliczeń wykorzystano metodę komparatywną. Jako gen referencyjny wykorzystano gen metabolizmu podstawowego *rpoB*, zaś jako kalibrator, uśrednione wartości uzyskane dla izolatów z grupy kontrolnej.

*6.8.4.1. Analiza poziomów ekspresji genów izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu bez dodatku leku immunosupresyjnego*

W prezentowanym podrozdziale przedstawiono wyniki względnych poziomów ekspresji wybranych genów *K. pneumoniae*. Szczepy były hodowane na podłożu bez leku immunosupresyjnego. Uśrednione wyniki zostały zestawione w tabeli 46. Badane izolaty podzielono na dwie grupy w zależności od ich pochodzenia: 1. wyizolowane od pacjentów przyjmujących cyklosporynę w schemacie immunosupresji, 2. wyizolowane od pacjentów przyjmujących tacrolimus w schemacie immunosupresji.

Tabela 46. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów dla izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu bez dodatku leków immunosupresyjnych. Izolaty podzielono na dwie grupy: izolowane od pacjentów przyjmujących cyklosporynę (kolor czerwony) lub tacrolimus (kolor niebieski)

Pochodzenie izolatów	Względny poziom ekspresji genów					
	<i>fimA</i>	<i>mrkA</i>	<i>entB</i>	<i>irp2</i>	<i>iroB</i>	<i>iucA</i>
Izolaty od pacjentów przyjmujących cyklosporynę, hodowane na podłożu bez leku	1,46	1,10	1,26	1,04	1,02	1,02
Izolaty od pacjentów przyjmujących tacrolimus, hodowane na podłożu bez leku	1,11	1,04	0,80	0,91	1,00	-

Średni poziom ekspresji badanych genów *fimA*, *mrkA*, *entB*, *irp2* i *iroB* jest wyższy w grupie izolatów pobranych od pacjentów przyjmujących cyklosporynę w schemacie immunosupresji niż w grupie izolatów pobranych od pacjentów przyjmujących tacrolimus. Poziom ekspresji badanego genu *iucA* był możliwy do wyznaczenia tylko dla grupy izolatów pobranych od pacjentów przyjmujących cyklosporynę w schemacie immunosupresji. Uzyskane wartości posłużyły także do porównania zmian poziomów ekspresji po pasażach na podłożach z dodatkiem określonych stężeń badanych leków immunosupresyjnych.

Analiza statystyczna wykonana testem U Manna-Whitney'a wykazała, że różnice w poziomach ekspresji genów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu bez dodatku leków immunosupresyjnych pomiędzy grupą izolatów pobranych od pacjentów przyjmujących cyklosporynę a izolatami pobranymi od pacjentów przyjmujących tacrolimus w schemacie immunosupresji są statystycznie istotne tylko dla badanego genu *fimA* ($p = 0.025$).

Podczas analizy statystycznej zaobserwowano również, że poziom ekspresji badanych genów izolatów *K. pneumoniae* ESBL+ był wyższy niż w grupie izolatów ESBL- (Tabela 47). Liczebność próby uniemożliwia jednak zastosowanie testów statystycznych.

Tabela 47. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów dla izolatów *K. pneumoniae* pobranych od pacjentów przyjmujących cyklosporynę (kolor czerwony) lub tacrolimus (kolor niebieski) w schemacie immunosupresji hodowanych na podłożu bez dodatku leków immunosupresyjnych. Izolaty podzielono na dwie grupy: ESBL+ (tło czerwone lub niebieskie) lub ESBL- (tło białe)

Pochodzenie izolatów	ESBL	Względny poziom ekspresji genów					
		<i>fimA</i>	<i>mrkA</i>	<i>entB</i>	<i>irp2</i>	<i>iroB</i>	<i>iucA</i>
Izolaty od pacjentów przyjmujących cyklosporynę, hodowane na podłożu bez leku	+	1,55	1,19	1,46	1,04	-	1,10
	-	1,21	0,87	0,78	-	1,02	0,99
Izolaty od pacjentów przyjmujących tacrolimus, hodowane na podłożu bez leku	+	1,24	1,17	0,99	1,03	1,22	-
	-	0,94	0,86	0,43	0,73	0,89	-

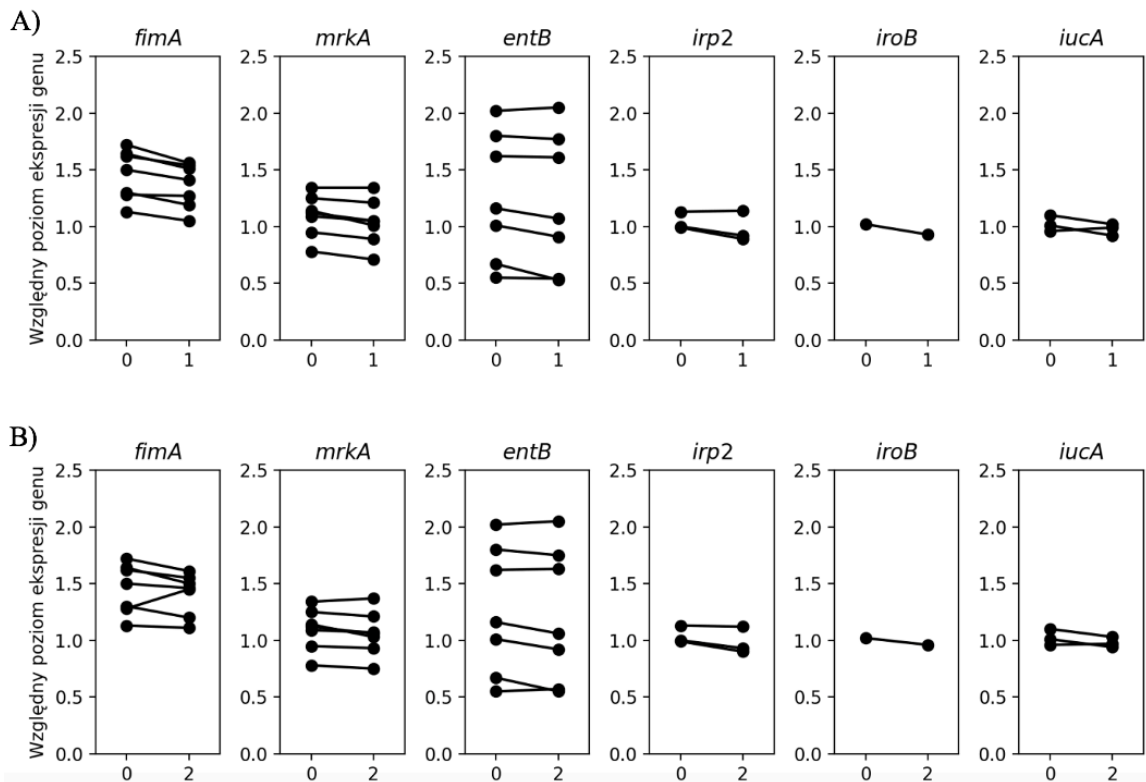
6.8.4.2. Analiza zmian poziomów ekspresji genów izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu z lekiem immunosupresyjnym

W prezentowanym podrozdziale przedstawiono wyniki względnych poziomów ekspresji wybranych genów izolatów *K. pneumoniae*, które były hodowane na podłożu z dodatkiem leku immunosupresyjnego w dwóch stężeniach w stosunku do wyników dla tych samych izolatów hodowanych na podłożu bez leku. W tabeli 48 przedstawiono wyniki oznaczania poziomów ekspresji genów dla izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu bez dodatku leku immunosupresyjnego oraz na podłożach zawierających dwa różne stężenia (niższe i wyższe) cyklosporyny - 200 µg/l i 600 µg/l lub tacrolimusu - 10 µg/l i 30 µg/l.

Tabela 48. Poziom ekspresji badanych genów po hodowli na podłożu z dodatkiem cyklosporyny (kolor czerwony) lub tacrolimusu (kolor niebieski). Izolaty hodowane na podłożu bez dodatku leku immunosupresyjnego opisano dodatkowo numerem 0 po kropce np. 14.0. Izolaty hodowane na podłożach zawierających dwa różne stężenia leku immunosupresyjnego opisano dodatkowo numerem 1 po kropce dla niższego stężenia np. 14.1 i numerem 2 po kropce dla wyższego stężenia np. 14.2.

Poziom ekspresji badanych genów wyznaczony względem genu referencyjnego <i>rpoB</i>						
Nr próbki	<i>fimA</i>	<i>mrkA</i>	<i>entB</i>	<i>irp2</i>	<i>iroB</i>	<i>iucA</i>
14.0	1,13	0,78	1,01	-	1,02	1,01
14.1	1,05	0,71	0,91	-	0,93	0,92
14.2	1,11	0,75	0,92	-	0,96	0,94
47.0	1,3	0,95	0,55	-	-	0,96
47.1	1,19	0,89	0,54	-	-	0,99
47.2	1,2	0,93	0,57	-	-	0,97
22.0	1,72	1,34	0,67	-	-	-
22.1	1,56	1,34	0,53	-	-	-
22.2	1,61	1,37	0,55	-	-	-
27.0	1,5	1,12	1,8	0,99	-	-
27.1	1,41	1,05	1,77	0,89	-	-
27.2	1,46	1,06	1,75	0,90	-	-
41.0	1,28	1,25	2,02	-	-	-
41.1	1,27	1,21	2,05	-	-	-
41.2	1,45	1,21	2,05	-	-	-
45.0	1,64	1,09	1,62	1,13	-	1,1
45.1	1,51	1,05	1,61	1,14	-	1,02
45.2	1,5	1,07	1,63	1,12	-	1,03
53.0	1,62	1,14	1,16	1	-	-
53.1	1,54	1,01	1,07	0,92	-	-
53.2	1,55	1,03	1,06	0,93	-	-
30.0	0,9	0,81	0,7	0,58	0,79	-
30.1	0,83	0,78	0,75	0,6	0,72	-
30.2	0,85	0,74	0,78	0,64	0,73	-
56.0	1,01	0,77	-	0,88	0,99	-
56.1	1,01	0,69	-	0,77	0,97	-
56.2	1,08	0,66	-	0,81	0,97	-
33.0	0,91	0,99	0,15	-	-	-
33.1	0,94	0,91	0,13	-	-	-
33.2	0,92	0,93	0,12	-	-	-
36.0	1,13	1,33	1,22	1,04	1,22	-
36.1	1,09	1,32	1,19	1,01	1,27	-
36.2	1,11	1,28	1,21	1,04	1,28	-
51.0	1,29	1,1	1,25	-	-	-
51.1	1,06	1,07	0,95	-	-	-
51.2	1,08	1,07	1,11	-	-	-
11.0	1,21	1,11	1,04	1,2	-	-
11.1	1,01	1,03	0,95	1,03	-	-
11.2	1,04	1,05	0,87	1,03	-	-
25.0	1,33	1,14	0,45	0,85	-	-
25.1	1,3	1,07	0,44	0,78	-	-
25.2	1,29	1,1	0,46	0,79	-	-

Na rysunku 38 przedstawiono wyniki oznaczania poziomów ekspresji genów *fimA*, *mrkA*, *entB*, *irp2*, *iroB* i *iucA* dla każdego z izolatów *K. pneumoniae* pobranych od pacjentów przyjmujących cyklosporynę w schemacie immunosupresji hodowanych na podłożu bez dodatku leku immunosupresyjnego oraz na podłożu zawierającym niższe (Rysunek 38.A) oraz wyższe stężenie cyklosporyny (Rysunek 38.B).

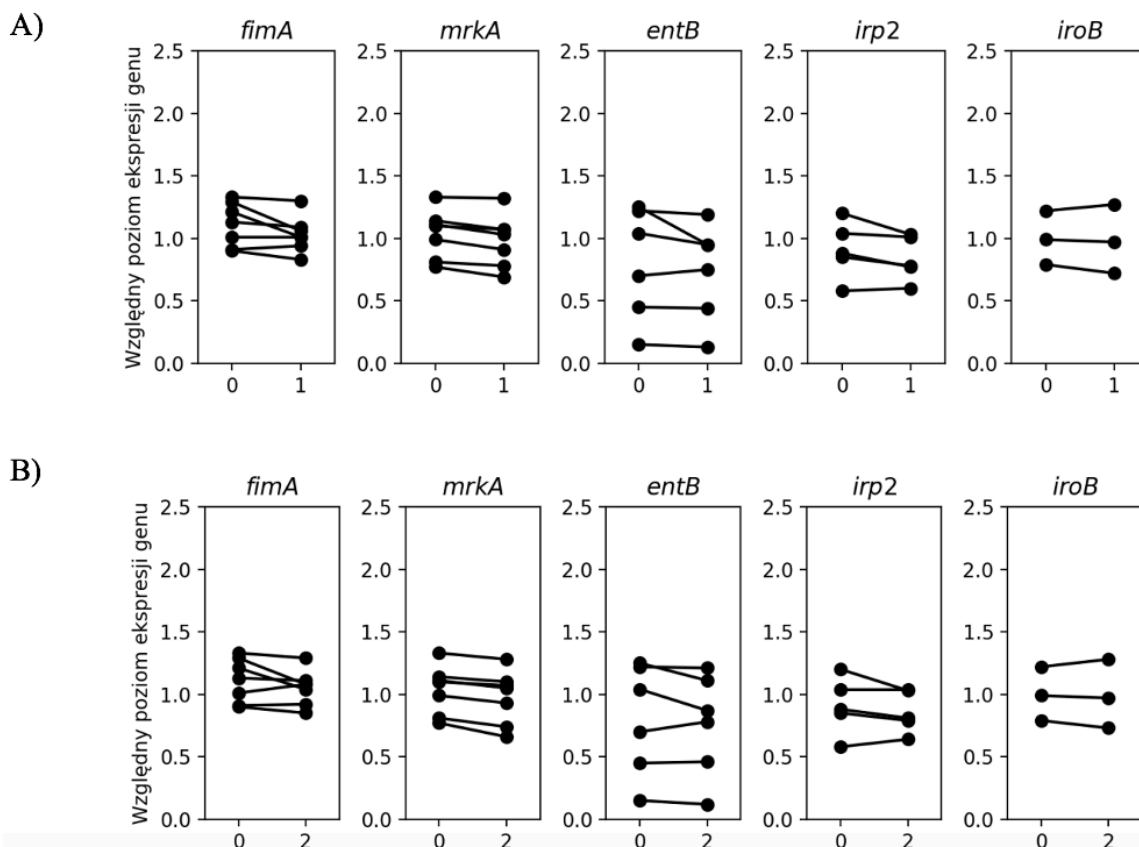


Rysunek 38. Zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów *fimA*, *mrkA*, *entB*, *irp2*, *iroB* oraz *iucA* po hodowli na podłożu z dodatkiem cyklosporyny. A) Zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów na podłożu bez dodatku cyklosporyny (0) względem hodowli na podłożu zawierającym niższe stężenie cyklosporyny (1). B) Zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów na podłożu bez dodatku cyklosporyny (0) względem hodowli na podłożu zawierającym wyższe stężenie cyklosporyny (2)

Zaobserwowano, że cyklosporyna wpłynęła na spadek ekspresji genu *fimA* u 7 (100%) izolatów, genu *mrkA* u 7 (100%) izolatów, genu *entB* u 6 (86%) izolatów, genu *irp2* u 2 (66,6%) izolatów, genu *iroB* u 1 (100%) izolatu i genu *iucA* u 2 (66,6%) izolatów, w przypadku niższego stężenia leku. W przypadku wyższego stężenia leku zaobserwowano spadek ekspresji genów *fimA* i *mrkA* u 6 (86%) izolatów, genu *entB* u 4 (57%) izolatów, genu *irp2* u 3 (100%) izolatów, genu *iroB* u 1 (100%) izolatu oraz genu *iucA* u 2 (66,6%) izolatów. Dodatkowo, lek cyklosporyna spowodował wzrost poziomu ekspresji genu *entB* u 1 (14%) izolatu, genów *irp2* i *iucA* u 1 (33%) izolatu, w przypadku niższego stężenia leku. W przypadku wyższego stężenia leku zaobserwowano wzrost ekspresji genów *fimA* i *mrkA* w przypadku 1 (14%) izolatu, genu *entB* u 3 (43%) izolatów, genu *iucA* u 1 (33%) izolatu.

Analiza statystyczna wykonana testem Wilcozona wykazała, że różnice w poziomach ekspresji genów *fimA* i *mrkA* izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożach z dodatkiem niższego stężenia cyklosporyny są statystycznie istotne.

Na rysunku 39 przedstawiono wyniki oznaczania poziomów ekspresji genów *fimA*, *mrkA*, *entB*, *irp2* i *iroB* dla każdego z izolatów *K. pneumoniae* pobranych od pacjentów przyjmujących tacrolimus w schemacie immunosupresji hodowanych na podłożu bez dodatku leku immunosupresyjnego oraz na podłożu zawierającym niższe stężenie tacrolimusu (Rysunek 39.A) oraz wyższe stężenie tacrolimusu (Rysunek 39.B).



Rysunek 39. Zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów *fimA*, *mrkA*, *entB*, *irp2* oraz *iroB* po hodowli na podłożu z dodatkiem tacrolimusu. A) Zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów na podłożu bez dodatku tacrolimusu (0) względem hodowli na podłożu zawierającym niższe stężenie tacrolimusu (1). B) Zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów na podłożu bez dodatku tacrolimusu (0) względem hodowli na podłożu zawierającym wyższe stężenie tacrolimusu (2).

Lek tacrolimus w niższym stężeniu spowodował spadek poziomu ekspresji genu *fimA* w przypadku 6 (86%) izolatów, genu *mrkA* u 7 (100%) izolatów, genu *entB* u 5 (83%) izolatów, genu *irp2* u 4 (80%) izolatów, genu *iroB* u 2 (66,6%) izolatów. Przy wyższym stężeniu zaobserwowano spadek poziomu ekspresji genu *fimA* w przypadku 5 (71%) izolatów, genu *mrkA* u 7 (100%) izolatów, genu *entB* u 4 (66,7%) izolatów, genu *irp2* u 4 (80%) izolatów, genu *iroB* u 2 (66,6%) izolatów. Lek tacrolimus spowodował wzrost poziomu ekspresji genu *fimA* u 1 (14%), *entB* u 1 (17%), *irp2* u 1 (20%), *iroB* u 1 (33%) izolatu, w przypadku niższego stężenia. W przypadku wyższego stężenia, tacrolimus wpłynął na wzrost poziomu ekspresji genu *fimA* u 2 (28%), *entB* u 2 (33%), *irp2* u 1 (20%), *iroB* u 1 (33%) izolatu.

Analiza statystyczna wykonana testem Wilcoxon wykazała, że różnice w poziomach ekspresji genu *mrkA* izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożach z dodatkiem niższego, jak i wyższego stężenia tacrolimusu są statystycznie istotne.

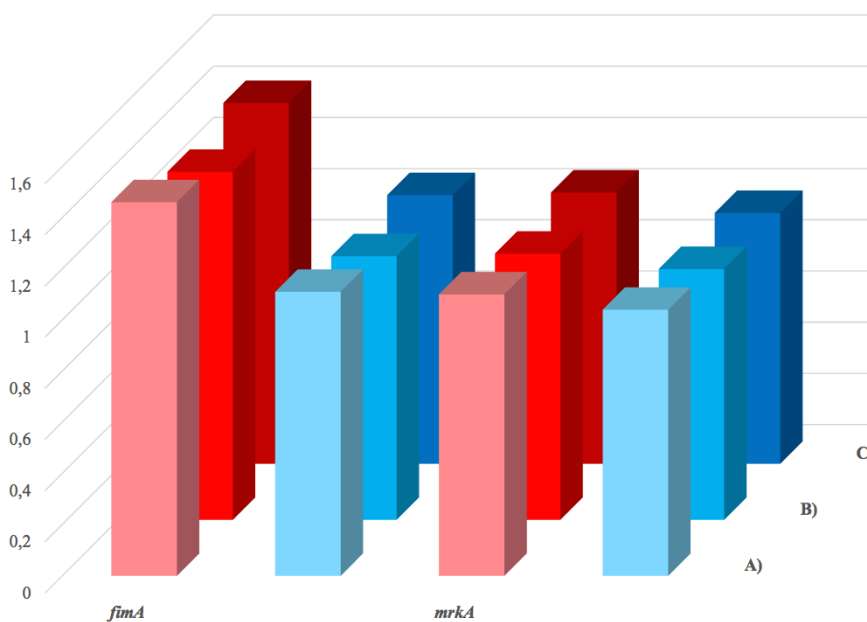
6.8.4.3. Analiza zmian w poziomach ekspresji genów izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu z lekiem immunosupresyjnym – porównanie między lekami

W prezentowanym podrozdziale przedstawiono porównanie względnych poziomów ekspresji wybranych genów izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu z dodatkiem cyklosporyny w dwóch stężeniach, ze względnymi poziomami ekspresji tych genów dla izolatów hodowanych na podłożu z dodatkiem tacrolimusu, również w dwóch stężeniach. W tabeli 49 przedstawiono uśrednione wyniki

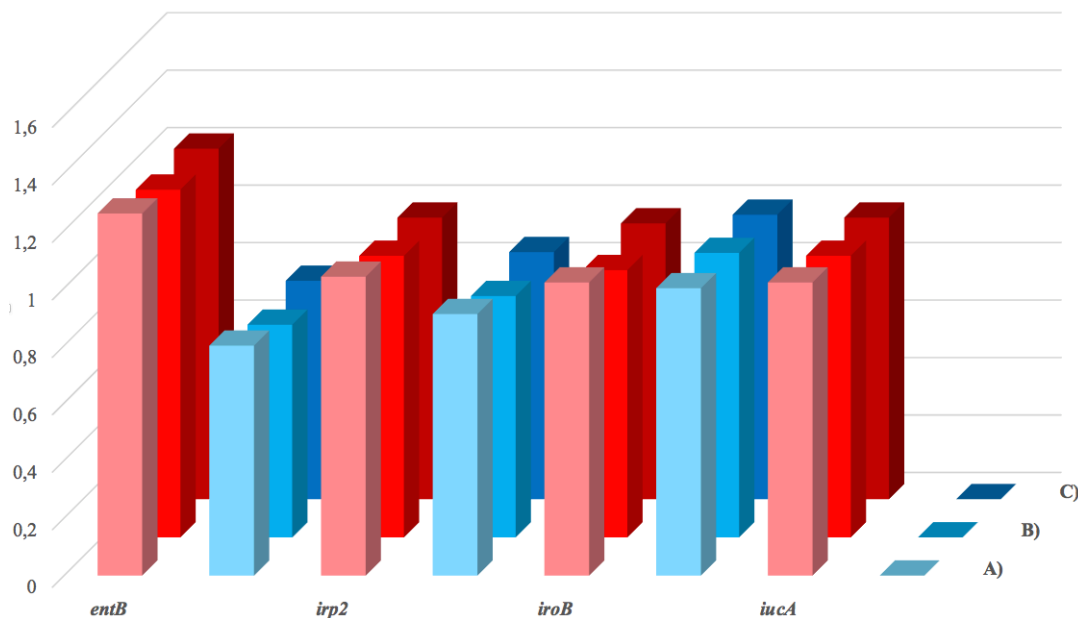
poziomów ekspresji poszczególnych genów, z podziałem szczepów na dwie grupy (w zależności od pochodzenia szczepu od pacjentów przyjmujących cyklosporynę lub tacrolimus w schemacie immunosupresji) i dwa stężenia leków. Otrzymane wyniki zostały również zaprezentowane na rysunkach 40 i 41.

Tabela 49. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów dla izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu bez dodatku leku i na podłożach z dodatkiem leku immunosupresyjnego. Izolaty podzielono na dwie grupy: izolaty pobrane od pacjentów przyjmujących cyklosporynę hodowane na podłożach z dodatkiem cyklosporyny (kolor czerwony) lub przyjmujących tacrolimus hodowane na podłożach z dodatkiem tacrolimusu (kolor niebieski)

Warunki hodowli	Względny poziom ekspresji genów					
	<i>fimA</i>	<i>mrkA</i>	<i>entB</i>	<i>irp2</i>	<i>iroB</i>	<i>iucA</i>
Izolaty hodowane na podłożu bez leku	1,46	1,10	1,26	1,04	1,02	1,02
Izolaty hodowane na podłożu z cyklosporyną o stężeniu 200 µg/l	1,36	1,04	1,21	0,98	0,93	0,98
Izolaty hodowane na podłożu z cyklosporyną o stężeniu 600 µg/l	1,41	1,06	1,22	0,98	0,96	0,98
Izolaty hodowane na podłożu bez leku	1,11	1,04	0,80	0,91	1,00	-
Izolaty hodowane na podłożu z tacrolimusem o stężeniu 10 µg/l	1,03	0,98	0,74	0,84	0,99	-
Izolaty hodowane na podłożu z tacrolimusem o stężeniu 30 µg/l	1,05	0,98	0,76	0,86	0,99	-



Rysunek 40. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji genów kodujących adhezyny (*fimA* i *mrkA*) dla szczepów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu bez dodatku leku i na podłożach z dodatkiem leku immunosupresyjnego w dwóch stężeniach. Izolaty pobrane od pacjentów przyjmujących cyklosporynę oznaczono kolorem czerwonym, zaś od pacjentów przyjmujących tacrolimus kolorem niebieskim. A) Porównanie wyników dla szczepów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu bez dodatku leków. B) Porównanie wyników dla szczepów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu z dodatkiem niższych stężeń leków immunosupresyjnych. C) Porównanie wyników dla szczepów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu z dodatkiem wyższych stężeń leków immunosupresyjnych



Rysunek 41. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji genów kodujących siderofory (*entB*, *irp2*, *iroB* i *iucA*) dla szczepów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu bez dodatku leku i na podłożach z dodatkiem leku immunosupresyjnego w dwóch stężeniach. Izolaty pobrane od pacjentów przyjmujących cyklosporynę oznaczono kolorem czerwonym, zaś od pacjentów przyjmujących tacrolimus kolorem niebieskim. A) Porównanie wyników dla szczepów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu bez dodatku leków. B) Porównanie wyników dla szczepów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu z dodatkiem niższych stężeń leków immunosupresyjnych. C) Porównanie wyników dla szczepów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu z dodatkiem wyższych stężeń leków immunosupresyjnych

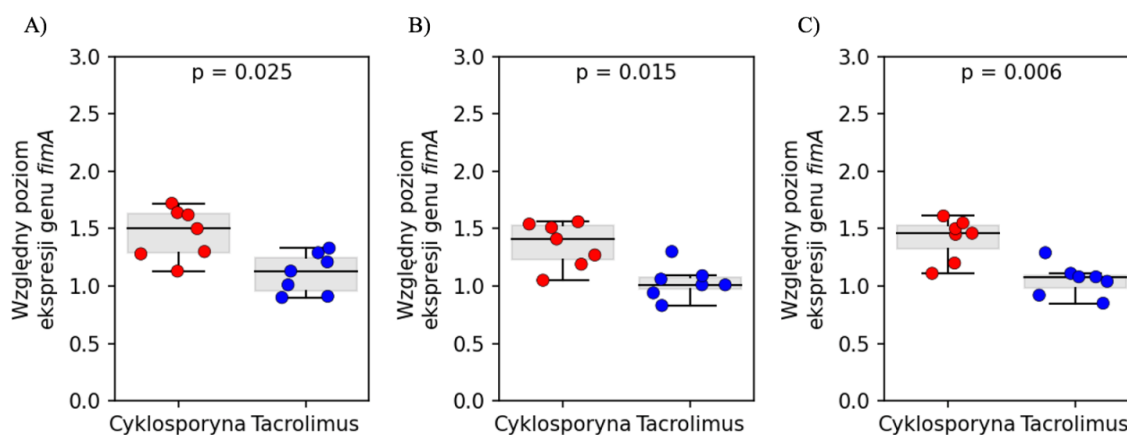
Uśredniony poziom ekspresji badanych genów *fimA*, *mrkA*, *entB*, *irp2*, *iroB* i *iucA* *K. pneumoniae* pobranych od pacjentów przyjmujących cyklosporynę był niższy po hodowli na podłożu z dodatkiem niskiego stężenia cyklosporyny w stosunku do hodowli na podłożu bez leku. W wyniku hodowli izolatów na podłożu z wyższym stężeniem leku, poziom ekspresji wszystkich badanych genów również uległ obniżeniu w stosunku do hodowli izolatów na podłożu bez leku. Uśredniony poziom ekspresji wszystkich badanych genów wzrósł lub pozostał bez zmian po hodowli na podłożu z dodatkiem wyższego stężenia cyklosporyny w stosunku do hodowli izolatów na podłożu z dodatkiem niższego stężenia cyklosporyny.

Średnie wartości poziomów ekspresji wszystkich badanych genów *fimA*, *mrkA*, *entB*, *irp2* i *iroB* izolatów *K. pneumoniae* pobranych od pacjentów przyjmujących tacrolimus były niższe po hodowli na podłożu z dodatkiem niższego, jak i wyższego stężenia tacrolimusu w stosunku do hodowli na podłożu bez leku. W wyniku hodowli izolatów na podłożu z wyższym stężeniem leku, poziom ekspresji wszystkich badanych genów wzrósł lub pozostał bez zmian w stosunku do hodowli izolatów na podłożu z dodatkiem niższego stężenia tacrolimusu.

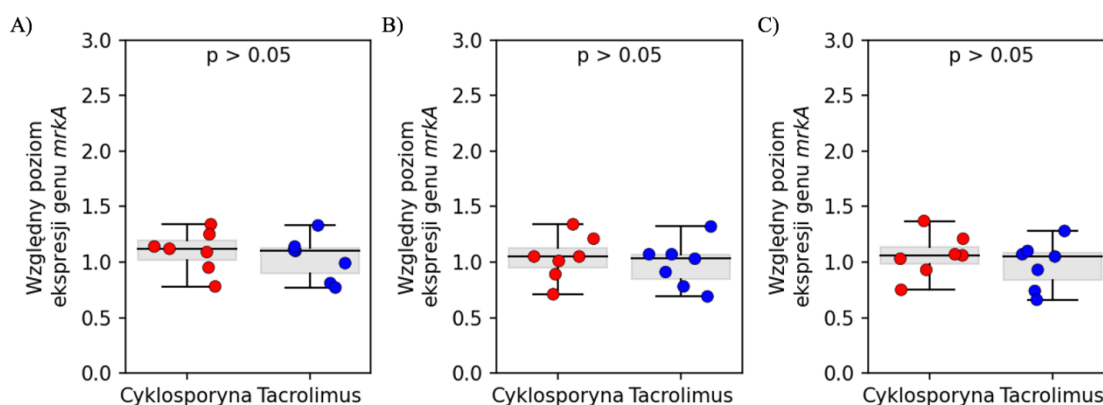
W przypadku genów *fimA*, *mrkA*, *entB* i *irp2* średni poziom ekspresji badanych genów izolatów pobranych od pacjentów przyjmujących cyklosporynę był wyższy po hodowli na podłożu bez dodatku leku, jak i na podłożach z dodatkiem leku w obu stężeniach w porównaniu do izolatów pobranych od pacjentów przyjmujących tacrolimus hodowanych na podłożu bez leku i z dodatkiem leku w obu stężeniach. Natomiast średni poziom ekspresji genu *iroB* dla grupy izolatów pobranych od pacjentów przyjmujących cyklosporynę był niższy po hodowli izolatów na podłożu bez dodatku leku oraz na podłożach z dodatkiem cyklosporyny

w obu stężeniach w porównaniu do izolatów pobranych od pacjentów przyjmujących tacrolimus hodowanych na podłożu bez i z dodatkiem tacrolimusu w obu stężeniach. Porównanie średnich wartości poziomów ekspresji badanego genu *iucA* między grupami nie jest możliwe ze względu na niewystępowanie tego genu wśród izolatów pobranych od pacjentów przyjmujących tacrolimus.

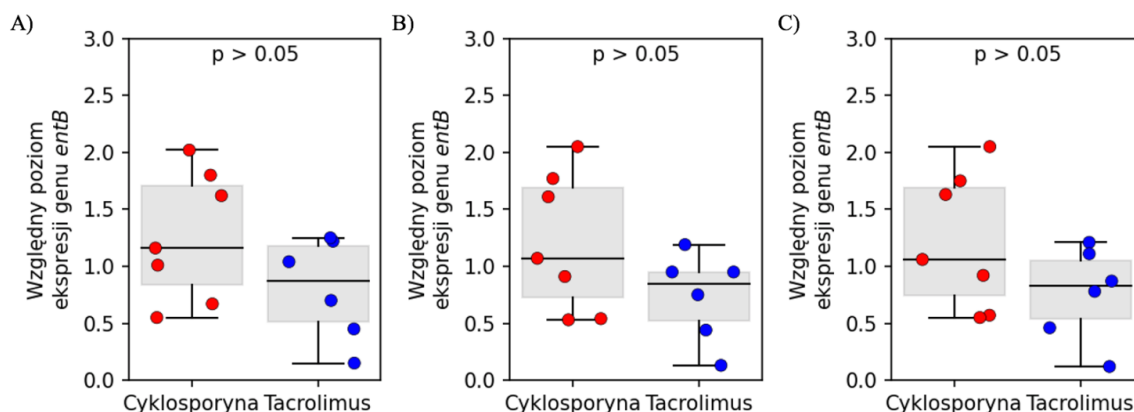
Dla przedstawionych powyżej wyników średnich wartości poziomów ekspresji badanych genów *fimA*, *mrkA* i *entB* została przeprowadzona analiza statystyczna testem U Manna-Whitney'a. Wynik istotny statystycznie zanotowano dla izolatów hodowanych na podłożu bez leku, na podłożu z niższym oraz z wyższym stężeniem leku, gdzie zaobserwowano niższy poziom ekspresji genu *fimA* dla izolatów pobranych od pacjentów przyjmujących tacrolimus.



Rysunek 42. Porównanie względnych poziomów ekspresji badanego genu *fimA*, dla izolatów *K. pneumoniae* pobranych od pacjentów przyjmujących w schemacie immunosupresji cyklosporynę lub tacrolimus. A) Porównanie wyników dla izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu bez dodatku leków. B) Porównanie wyników dla izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu z dodatkiem niższych stężeń leków immunosupresyjnych (cyklosporyna - 200 $\mu\text{g/l}$, tacrolimus - 10 $\mu\text{g/l}$). C) Porównanie wyników dla izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu z dodatkiem wyższych stężeń leków immunosupresyjnych (cyklosporyna - 600 $\mu\text{g/l}$, tacrolimus - 30 $\mu\text{g/l}$)



Rysunek 43. Porównanie względnych poziomów ekspresji badanego genu *mrkA*, dla izolatów *K. pneumoniae* pobranych od pacjentów przyjmujących w schemacie immunosupresji cyklosporynę lub tacrolimus. A) Porównanie wyników dla izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu bez dodatku leków. B) Porównanie wyników dla izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu z dodatkiem niższych stężeń leków immunosupresyjnych (cyklosporyna - 200 $\mu\text{g/l}$, tacrolimus - 10 $\mu\text{g/l}$). C) Porównanie wyników dla izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu z dodatkiem wyższych stężeń leków immunosupresyjnych (cyklosporyna - 600 $\mu\text{g/l}$, tacrolimus - 30 $\mu\text{g/l}$)



Rysunek 44. Porównanie względnych poziomów ekspresji badanego genu *entB*, dla izolatów *K. pneumoniae* pobranych od pacjentów przyjmujących w schemacie immunosupresji cyklosporynę lub tacrolimus. A) Porównanie wyników dla izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu bez dodatku leków. B) Porównanie wyników dla izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu z dodatkiem niższych stężeń leków immunosupresyjnych (cyklosporyna - 200 µg/l, tacrolimus - 10 µg/l). C) Porównanie wyników dla izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu z dodatkiem wyższych stężeń leków immunosupresyjnych (cyklosporyna - 600 µg/l, tacrolimus - 30 µg/l)

6.8.5. Wpływ długotrwałej ekspozycji izolatów *K. pneumoniae* na działanie leków immunosupresyjnych

Badanie wpływu długotrwałej ekspozycji *K. pneumoniae* na immunosupresanty przeprowadzono dla dziesięciu wybranych izolatów scharakteryzowanych w tabeli 25: 14B, 27B, 41B, 45B, 53B, 11B, 25B, 30B, 36B, 51B [Met. 5.2.7.3]. Wszystkie izolaty pochodzące od pacjentów przyjmujących cyklosporynę lub tacrolimus w schemacie immunosupresji pasażowano na podłożach z dodatkiem cyklosporyny lub odpowiednio tacrolimusu w dwóch stężeniach i bez dodatku leku (jako kontrolę). Izolaty pasażowano 14-krotnie na wybranych podłożach i wyznaczano wartości krzywej wzrostu. Wyniki zostały omówione w podrozdziale 6.8.5.1. Po 7- oraz 14-krotnych pasażach dla wszystkich wybranych izolatów określano zmiany w poziomie ekspresji genów.

6.8.5.1. Analiza zmian poziomów ekspresji genów pasażowanych izolatów *K. pneumoniae* metodą komparatywną

Wszystkie izolaty hodowano na podłożach z dodatkiem cyklosporyny lub tacrolimusu w stężeniach terapeutycznych, odpowiednio 200 µg/l i 10 µg/l oraz bez dodatku leków (kontrola). Po pierwszym pasażu wyizolowano RNA, przeprowadzono syntezę cDNA i reakcję real-time PCR w celu określenia zmian w poziomach ekspresji genów *fimA*, *mrkA*, *entB*, *irp2*, *iroB* i *iucA* badanych izolatów.

Do badań wybrano dziesięć izolatów. W toku badań sprawdzano poziom ekspresji genów kodujących adhezyny (*fimA* i *mrkA*) oraz siderofory (*entB*, *irp2*, *iroB* i *iucA*) przed pasażami oraz po 7- i 14-krotnym pasażu na podłożach z dodatkiem leków. Wyniki dla hodowli z dodatkiem cyklosporyny zostały przedstawione w tabeli 50, zaś dla hodowli z dodatkiem tacrolimusu w tabeli 51.

Tabela 50. Poziom ekspresji genów *K. pneumoniae* dla 14-krotnie pasażowanych izolatów na podłoża bez i z dodatkiem cyklosporyny (7-krotny pasaż – jasno szare tło; 14-krotny pasaż – ciemno szare tło). Izolaty hodowane na podłożu bez dodatku leku immunosupresyjnego opisano dodatkowo numerem 0 po kropce np. 14.0. Izolaty hodowane na podłożach z dodatkiem leku immunosupresyjnego o stężeniu 200 µg/l opisano dodatkowo numerem 1 po kropce np. 14.1. 7-krotny pasaż oznaczono dodatkowo numerem 7 po kropce, np. 14.0.7, a 14-krotny pasaż oznaczono dodatkowo numerem 14 po kropce np. 14.0.14.

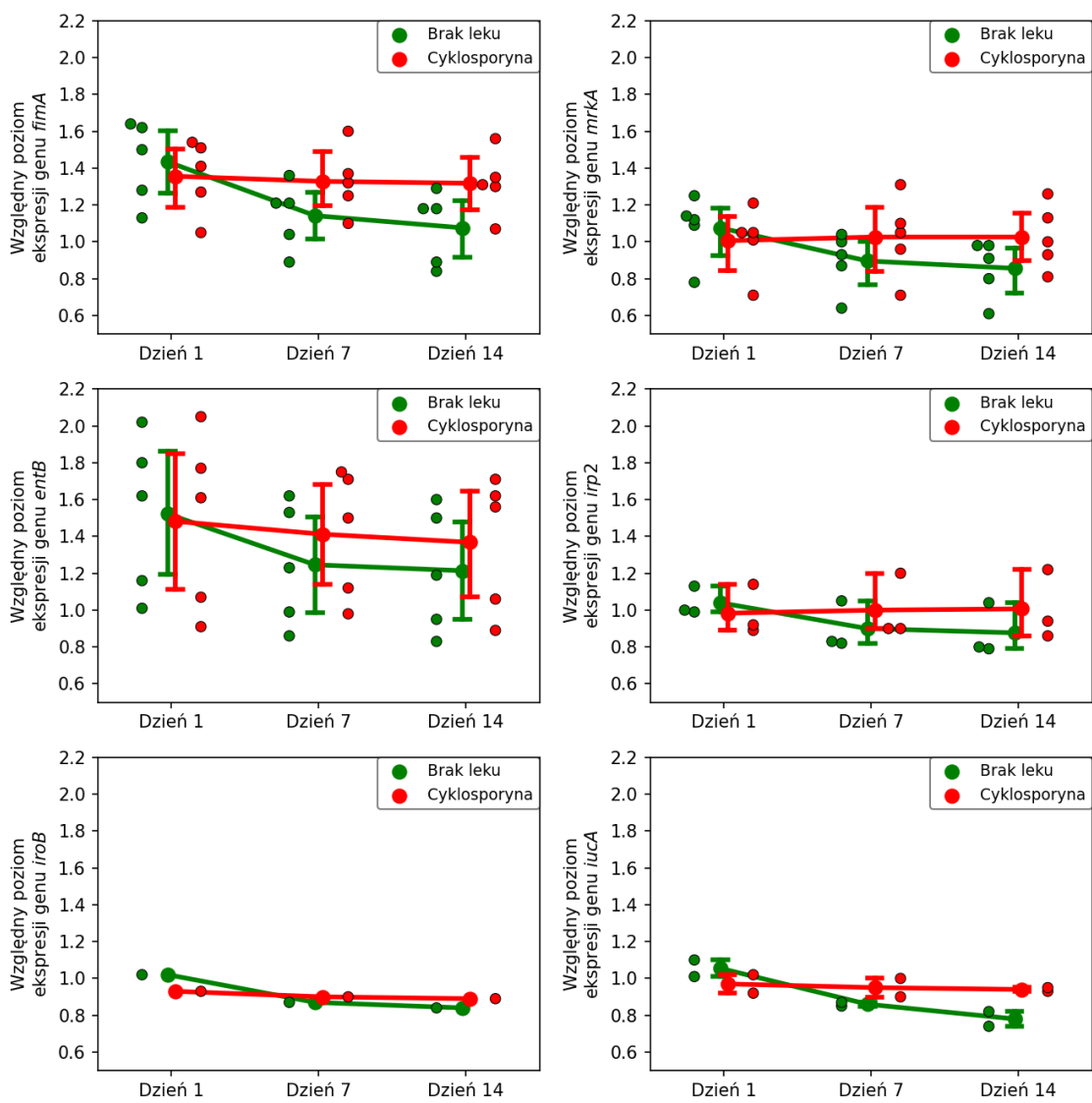
Nr próbki	Poziom ekspresji badanych genów wyznaczony względem genu referencyjnego <i>rpoB</i>					
	<i>fimA</i>	<i>mrkA</i>	<i>entB</i>	<i>irp2</i>	<i>iroB</i>	<i>iucA</i>
14.0	1,13	0,78	1,01	-	1,02	1,01

Nr próbki	Poziom ekspresji badanych genów wyznaczony względem genu referencyjnego <i>rpoB</i>					
	<i>fimA</i>	<i>mrkA</i>	<i>entB</i>	<i>irp2</i>	<i>iroB</i>	<i>iucA</i>
14.1	1,05	0,71	0,91	-	0,93	0,92
14.0.7	0,89	0,64	0,86	-	0,87	0,85
14.1.7	1,1	0,71	0,98	-	0,9	0,9
14.0.14	0,84	0,61	0,83	-	0,84	0,82
14.1.14	1,07	0,81	0,89	-	0,89	0,95
27.0	1,5	1,12	1,8	0,99	-	-
27.1	1,41	1,05	1,77	0,89	-	-
27.0.7	1,04	0,93	1,62	0,82	-	-
27.1.7	1,37	1,05	1,75	0,9	-	-
27.0.14	0,89	0,91	1,6	0,79	-	-
27.1.14	1,35	1	1,71	0,86	-	-
41.0	1,28	1,25	2,02	-	-	-
41.1	1,27	1,21	2,05	-	-	-
41.0.7	1,21	1,04	1,53	-	-	-
41.1.7	1,25	1,31	1,71	-	-	-
41.0.14	1,18	0,98	1,5	-	-	-
41.1.14	1,31	1,26	1,62	-	-	-
45.0	1,64	1,09	1,62	1,13	-	1,1
45.1	1,51	1,05	1,61	1,14	-	1,02
45.0.7	1,36	1	1,23	1,05	-	0,87
45.1.7	1,6	1,1	1,5	1,2	-	1
45.0.14	1,29	0,98	1,19	1,04	-	0,74
45.1.14	1,56	1,13	1,56	1,22	-	0,93
53.0	1,62	1,14	1,16	1	-	-
53.1	1,54	1,01	1,07	0,92	-	-
53.0.7	1,21	0,87	0,99	0,83	-	-
53.1.7	1,32	0,96	1,12	0,9	-	-
53.0.14	1,18	0,8	0,95	0,8	-	-
53.1.14	1,3	0,93	1,06	0,94	-	-

Uśredniony poziom ekspresji genów *fimA*, *iroB* i *iucA*, po 7- i 14-krotnym pasażowaniu izolatów na podłożach z dodatkiem cyklosporyny pozostaje bez zmian w stosunku do stanu po pierwszym pasażu na podłożu z dodatkiem cyklosporyny. Uśredniony poziom ekspresji genu *entB* po 7- i 14-krotnym pasażowaniu jest niższy niż po pierwszym pasażu na podłożu z dodatkiem cyklosporyny. Uśredniony poziom ekspresji genów *mrkA* i *irp2* wskutek pasażu na podłożu z cyklosporyną wzrasta zarówno po 7-krotnym, jak i 14-krotnym pasażowaniu.

Po 7- i 14-krotnym pasażowaniu izolatów na podłożach z dodatkiem cyklosporyny uśredniony poziom ekspresji wszystkich badanych genów jest wyższy w stosunku do uśrednionego poziomu ekspresji genów izolatów hodowanych na podłożu bez dodatku leku w odpowiednich punktach czasowych. Przy pasażach pojedynczych izolatów trudno jest zaobserwować jakieś zależności.

Dla przedstawionych poniżej wyników średnich wartości poziomów ekspresji badanych genów pomiędzy próbkami po hodowli na podłożu bez leku i z dodatkiem cyklosporyny w każdym punkcie czasowym została przeprowadzona analiza statystyczna testem U Manna-Whitney'a. Nie odnotowano wyników statystycznie istotnych. Analiza statystyczna wykonana testem Wilcozona wykazała, że różnice w poziomach ekspresji badanych genów izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu bez dodatku leku, jak i z dodatkiem leku nie są statystycznie istotne pomiędzy badanymi punktami czasowymi, tj. różnica pomiędzy dniem 1 a 7 oraz dniem 1 a 14.



Rysunek 45. Wpływ długotrwałej ekspozycji izolatów *K. pneumoniae* na działanie cyklosporyny – zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów *fimA*, *mrkA*, *entB*, *irp2*, *iroB* i *iucA* po hodowli na podłożu bez leku (kolor zielony) lub z dodatkiem cyklosporyny (kolor czerwony) po 1-krotnym pasażowaniu izolatów (Dzień 1), po 7-krotnym pasażowaniu (Dzień 7) oraz po 14-krotnym pasażowaniu (Dzień 14)

Tabela 51. Zmiany poziomów ekspresji genów izolatów *K. pneumoniae* 14-krotnie pasażowanych na podłożach bez i z dodatkiem tacrolimusu (7-krotny pasaż – jasno szare tło; 14-krotny pasaż – ciemno szare tło). Izolaty hodowane na podłożu bez dodatku leku immunosupresyjnego opisano dodatkowo numerem 0 po kropce np. 30.0. Izolaty hodowane na podłożach z dodatkiem leku immunosupresyjnego o stężeniu 10 µg/l opisano dodatkowo numerem 1 po kropce np. 30.1. 7-krotny pasaż oznaczono dodatkowo numerem 7 po kropce, np. 30.0.7, a 14-krotny pasaż oznaczono dodatkowo numerem 14 po kropce np. 30.0.14.

Nr próbeki	Poziom ekspresji badanych genów wyznaczony względem genu referencyjnego <i>rpoB</i>					
	<i>fimA</i>	<i>mrkA</i>	<i>entB</i>	<i>irp2</i>	<i>iroB</i>	<i>iucA</i>
30.0	0,9	0,81	0,7	0,58	0,79	-
30.1	0,83	0,78	0,75	0,6	0,72	-
30.0.7	0,73	0,66	0,59	0,81	0,67	-
30.1.7	0,87	0,75	0,72	0,9	0,7	-
30.0.14	0,7	0,59	0,54	0,77	0,62	-
30.1.14	0,85	0,72	0,8	0,91	0,65	-
36.0	1,13	1,33	1,22	1,04	1,22	-
36.1	1,09	1,32	1,19	1,01	1,27	-

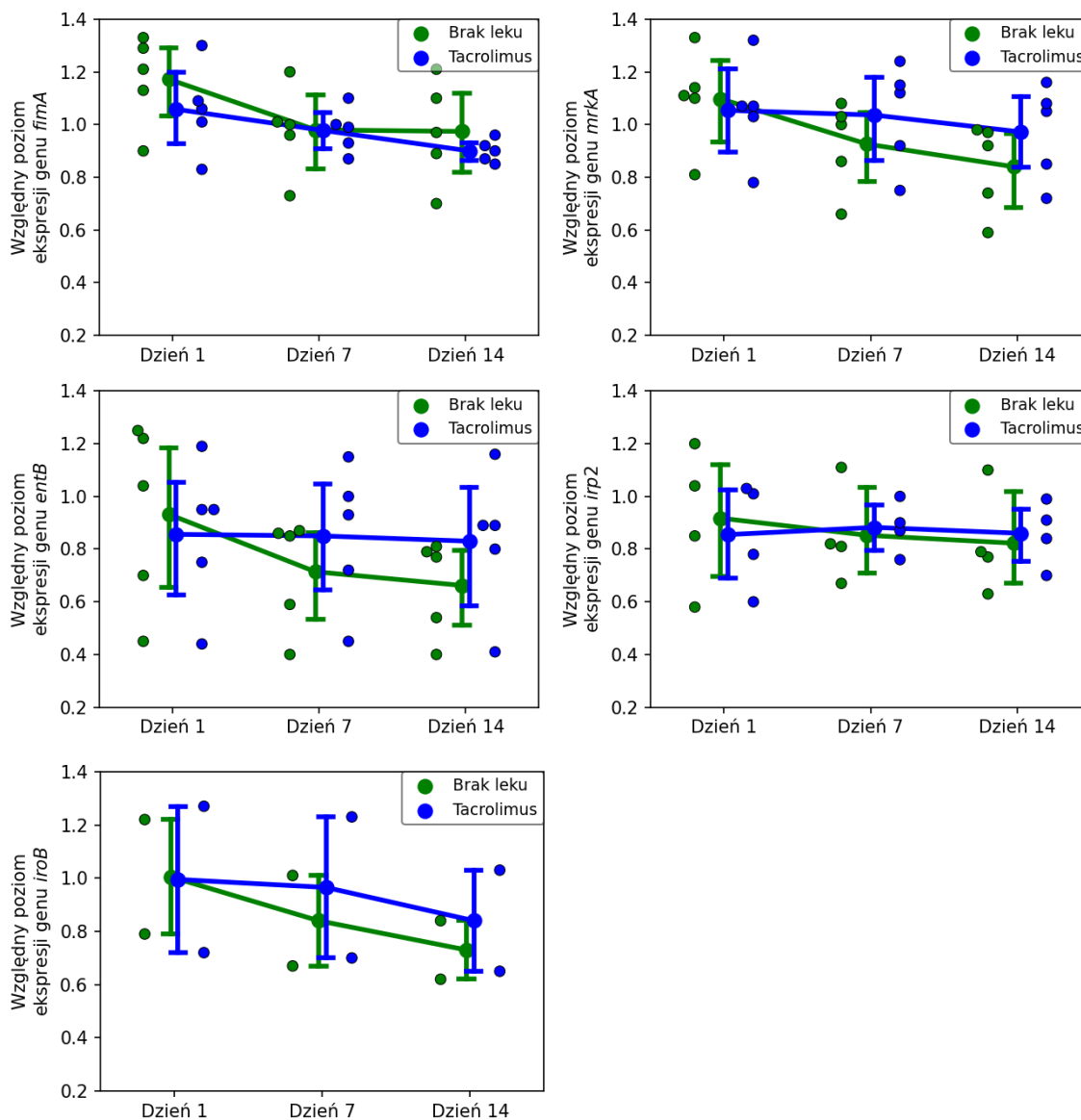
Nr próbki	Poziom ekspresji badanych genów wyznaczony względem genu referencyjnego <i>rpoB</i>					
	<i>fimA</i>	<i>mrkA</i>	<i>entB</i>	<i>irp2</i>	<i>iroB</i>	<i>iucA</i>
36.0.7	1,01	1,08	0,87	0,82	1,01	-
36.1.7	0,93	1,24	1,15	0,87	1,23	-
36.0.14	0,97	0,92	0,77	0,79	0,84	-
36.1.14	0,87	1,16	1,16	0,84	1,03	-
51.0	1,29	1,1	1,25	-	-	-
51.1	1,06	1,07	0,95	-	-	-
51.0.7	1,2	1	0,85	-	-	-
51.1.7	1	1,15	1	-	-	-
51.0.14	1,21	0,97	0,79	-	-	-
51.1.14	0,96	1,08	0,89	-	-	-
11.0	1,21	1,11	1,04	1,2	-	-
11.1	1,01	1,03	0,95	1,03	-	-
11.0.7	0,96	0,86	0,86	1,11	-	-
11.1.7	0,99	0,92	0,93	1	-	-
11.0.14	1,1	0,74	0,81	1,1	-	-
11.1.14	0,9	0,85	0,89	0,99	-	-
25.0	1,33	1,14	0,45	0,85	-	-
25.1	1,3	1,07	0,44	0,78	-	-
25.0.7	1	1,03	0,4	0,67	-	-
25.1.7	1,1	1,12	0,45	0,76	-	-
25.0.14	0,89	0,98	0,4	0,63	-	-
25.1.14	0,92	1,05	0,41	0,7	-	-

Uśredniony poziom ekspresji genu *fimA* po 7- i 14-krotnym pasażowaniu izolatów na podłożach z dodatkiem tacrolimusu jest niższy niż po pierwszym pasażu na podłożu z dodatkiem tego leku. W przypadku badania ekspresji genów *mrkA* i *iroB* nie zaobserwowano istotnych zmian po 7-krotnym pasażowaniu na podłożach z dodatkiem tacrolimusu, natomiast po 14-krotnym pasażowaniu uśredniony poziom ekspresji tych genów maleje. Uśredniony poziom ekspresji genów *entB* i *irp2* wskutek pasażu na podłożu z dodatkiem tacrolimusu nieznacznie wzrasta po 7-krotnych pasażach, a przy 14-krotnym pasażowaniu maleje.

Po 7-krotnym pasażowaniu izolatów na podłożach z dodatkiem tacrolimusu uśredniony poziom ekspresji genów *mrkA*, *entB*, *irp2* i *iroB* jest wyższy w stosunku do uśrednionego poziomu ekspresji tych genów izolatów hodowanych na podłożu bez dodatku leku. Dla izolatów 7-krotnie pasażowanych na podłożach z dodatkiem leku uśredniony poziom ekspresji genu *fimA* jest równy uśrednionemu poziomowi ekspresji genu dla izolatów pasażowanych na podłożu bez dodatku leku. Po 14-krotnym pasażowaniu izolatów na podłożach z dodatkiem tacrolimusu uśredniony poziom ekspresji badanych genów *mrkA*, *entB*, *irp2* i *iroB* jest wyższy w stosunku do uśrednionego poziomu ekspresji tych genów izolatów hodowanych na podłożu bez dodatku leku. Uśredniony poziom ekspresji genu *fimA* po 14-krotnym pasażowaniu izolatów na podłożach z dodatkiem tacrolimusu jest niższy w stosunku do uśrednionego poziomu ekspresji genu izolatów hodowanych na podłożu bez dodatku leku. Przy pasażach pojedynczych izolatów trudno jest zaobserwować jakieś zależności.

Dla przedstawionych poniżej wyników średnich wartości poziomów ekspresji badanych genów pomiędzy próbkami po hodowli na podłożu bez leku i z dodatkiem tacrolimusu w każdym punkcie czasowym została przeprowadzona analiza statystyczna testem U Manna-Whitney'a. Nie odnotowano wyników

statystycznie istotnych. Analiza statystyczna wykonana testem Wilcozona wykazała, że różnice w poziomach ekspresji badanych genów izolatów *K. pneumoniae* hodowanych na podłożu bez dodatku leku, jak i z dodatkiem leku nie są statystycznie istotne pomiędzy badanymi punktami czasowymi, tj. różnica pomiędzy dniem 1 a 7 oraz dniem 1 a 14.



Rysunek 46. Wpływ długotrwałej ekspozycji izolatów *K. pneumoniae* na działanie tacrolimusu – zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów *fimA*, *mrkA*, *entB*, *irp2* i *iroB* po hodowli na podłożu bez leku (kolor zielony) lub z dodatkiem tacrolimusu (kolor niebieski) po 1-krotnym pasażowaniu izolatów (Dzień 1), po 7-krotnym pasażowaniu (Dzień 7) oraz po 14-krotnym pasażowaniu (Dzień 14)

6.8.6. DYSKUSJA

W niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto się zbadania ekspresji wybranych genów kodujących istotne czynniki wirulencji w warunkach immunosupresji w szczepach *K. pneumoniae* izolowanych od biorców nerki. Do tej pory, badania prowadzone na bakteriiach *Enterococcus* sp. wykazały, że bakterie te wytwarzając mechanizm oporności na antybiotyki β -laktamowe, aby uniknąć śmiertelnego działania leków, zwykle tracą zdolność do adhezji do komórek nabłonka gospodarza [95]. Aby zminimalizować ten efekt,

bakterie regulują ekspresję genów oporności w zależności od warunków środowiskowych. Jarzębowski i wsp. wykazali, że w przypadku szczepów *Enterococcus faecalis*, rodzaj inhibitora kalcyneuryny stosowany w terapii ma bezpośredni wpływ na ekspresję bakteryjnego genu PBP5 (penicillin binding protein 5) [95]. Odkrycia te, skłoniły mnie do poszukiwania odpowiedzi, czy ZUM u pacjentów po przeszczepieniu nerki ma związek z podwyższoną/obniżoną ekspresją genów wirulencji *K. pneumoniae* w środowisku leków immunosupresyjnych. Niewiele jest wiadomo na temat patomechanizmu występowania ZUM o etiologii *K. pneumoniae*, a tym bardziej w grupie pacjentów po przeszczepieniu nerki. Zaprezentowane wyniki badań dostarczają nowych danych związanych z ekspresją adhezyn fimbrialnych oraz genów zaangażowanych w pobieranie żelaza niezbędnego do życia bakteriom w środowisku immunosupresantów.

Inhibitory kalcyneuryny, tacrolimus i cyklosporyna są podstawą podtrzymującej immunosupresji u biorców przeszczepu nerki. Zgodnie z KDIGO Clinical Practice Guidelines [91] dotyczących opieki nad biorcami przeszczepów nerki, tacrolimus jest sugerowany jako inhibitor kalcyneuryny pierwszego rzutu. W porównaniu z cyklosporyną, tacrolimus zmniejsza ryzyko ostrego odrzucenia i poprawia przeżywalność przeszczepu w pierwszym roku przeszczepu. Jednak nie ma wyraźnych korzyści ze stosowania tacrolimusu pod względem śmiertelności pacjentów, występowania nowotworów złośliwych, infekcji, opóźnionego początku czynności przeszczepu lub ciśnienia krwi. Oba leki mają również odmienne profile skutków ubocznych, na przykład z mniejszą częstością występowania cukrzycy o nowym początku po przeszczepieniu u pacjentów leczonych cyklosporyną [268]. Oba leki są metabolizowane w wątrobie, a ponadto w ścianie jelita. Leki te są wydalane głównie w postaci metabolitów z kałem, a mniej niż 1% zastosowanej dawki leku wydalany jest w postaci niezmięnionej z kałem i moczem [92,93]. Ze względu na możliwość metabolizowania leków immunosupresyjnych w ścianie jelita, bakterie *K. pneumoniae* powodujące ZUM u pacjentów po przeszczepie nerki mogą mieć z nimi kontakt również w układzie pokarmowym. Układ moczowy może zostać skolonizowany przez szczepy jelitowe. W prezentowanej rozprawie wyróżniono dwie grupy pacjentów po przeszczepieniu nerki w zależności od zastosowanego inhibitora kalcyneuryny: pacjenci przyjmujący cyklosporynę w schemacie immunosupresji oraz pacjenci przyjmujący tacrolimus w schemacie immunosupresji.

W prezentowanej rozprawie zbadano wpływ krótkotrwałej i długotrwałej ekspozycji izolatów *K. pneumoniae* na działanie leków immunosupresyjnych. Wpływ krótkotrwałej ekspozycji izolatów na działanie leków zbadano dla dwóch stężeń: stężenia terapeutycznego (cyklosporyna – 200 µg/l, tacrolimus – 10 µg/l) i stężenia wyższego (cyklosporyna – 600 µg/l, tacrolimus – 30 µg/l), często stosowanego w pierwszych dniach po przeszczepieniu nerki. Wykazano, że w obecności cyklosporyny w stężeniu terapeutycznym ekspresja genów *fimA* i *mrkA* uległa obniżeniu. Natomiast w obecności tacrolimusu w stężeniu terapeutycznym, jak i wyższym obniżeniu uległa tylko ekspresja genu *mrkA*. Porównując wpływ badanych leków między sobą, wynik istotny statystycznie otrzymano dla jednego badanego genu, wykazując, że w obecności cyklosporyny ekspresja *fimA* była wyższa niż pod wpływem działania tacrolimusu zarówno w przypadku niższych, jak i wyższych stężeń leków. Ponadto, ekspresja badanego genu *mrkA* była wyższa w obecności cyklosporyny niż pod wpływem działania tacrolimusu. Otrzymane wyniki mogą świadczyć o tym, że leki immunosupresyjne, zwłaszcza cyklosporyna, mogą być modyfikatorem syntezy struktur komórkowych np. fimbrii typu 1, które sprzyjają początkowym etapom adhezji do komórek

nabłonkowych układu moczowego. Adhezja bakterii do powierzchni błony śluzowej żywiciela jest ogólnie uważana za zasadniczy krok w rozwoju infekcji. Typ zastosowanej immunosupresji może mieć wpływ na rozwój infekcji dróg moczowych.

Wykazano, że szczepy uropatogenne częściej wykazują ekspresję fimbrii typu 1 niż szczepy izolowane z przewodu pokarmowego lub układu oddechowego [137,262]. Jednak nadal niewiele wiadomo na temat czynników regulujących ekspresję fimbrii u *K. pneumoniae*. Staje się coraz bardziej jasne, że regulacja genetyczna genów fimbrii kodujących podjednostki składane przez szlak chaperone-usher podlega złożonemu systemowi regulacyjnemu obejmującemu różne rodziny białek wiążących DNA [138]. Inne badania wykazały, że fimbrie typu 3 pośredniczą w przyleganiu do lini komórek śródbłonka i nabłonka pęcherza moczowego *in vitro* i odgrywają istotną rolę w tworzeniu biofilmu *in vitro* [136,141,269]. System fimbrii typu 3, typ fimbrii powszechnie obserwowany jako wytwarzany przez bakterie związane z zakażeniami nabytymi w szpitalu, jest również prawdopodobnie regulowany przez produkty wielu genów. Identyfikacja czynników regulatorowych ułatwiłaby zrozumienie biogenezy fimbrii i ich roli w interakcji z komórkami gospodarza. Utrzymanie ekspresji fimbrii typu 3 w obecności inhibitorów kalcyneuryny może sprzyjać tworzeniu biofilmów na cewnikach i w drogach moczowych pacjentów. Z uwagi na wyższą ekspresję genu *mrkA* w warunkach stosowania cyklosporyny, należałoby rozważyć zastąpienie jej innym lekiem immunosupresyjnym.

Podczas gdy struktura chemiczna sideroforów jest niezwykle zmienna, funkcja sideroforów została wąsko zdefiniowana jako chelatowanie i dostarczanie żelaza do bakterii w celu proliferacji. Synteza nabytych sideroforów przyczynia się do zjadliwości *K. pneumoniae* poprzez wiele mechanizmów [130]. Siderofory wiążą żelazo i kompleksy żelaza, następnie są rozpoznawane przez pokrewne receptory błony zewnętrznej. *K. pneumoniae* produkuje siderofory: aerobaktynę, enterobaktynę, salmochelinę i yersyniabaktynę. Przykładem intensywnej rywalizacji między bakteriami a żywicielem o żelazo jest fakt, że gospodarz wytwarza specyficzne białka, które wiążą siderofory i zapobiegają ponownemu wychwytowi kompleksów żelazo-siderofor przez bakterie. W ramach wrodzonej odpowiedzi immunologicznej neutrofile wytwarzają lipokalinę-2 (Lcn2), cząsteczkę wiążącą z różnym powinowactwem siderofory katecholowe (enterobaktynę (Ent) i salmochelinę (Iro)) [224-226]. Lcn2 wykazuje znacznie większe powinowactwo do Ent niż Iro. Inne siderofory, yersyniabaktyna (Ybt) i aerobaktyna (Iuc) nie podlegają wiązaniu Lcn2. Iro jest glikozylowaną pochodną Ent, podczas gdy Ybt i Iuc posiadają całkowicie odmienną strukturę od Ent. Zdolność salmocheliny do przeciwdziałania wiązaniu Lcn2 jest ważna dla wzrostu bakterii i wykazano, że koreluje ze zwiększoną wirulencją w mysim modelu posocznicy [270]. Odkrycie białka gospodarza – lipokaliny-2, zdolnej do specyficznego sekwestrowania enterobaktyny, ale nie jej glikozylowanej pochodnej salmocheliny, wskazało, że różnorodność w strukturze może być mechanizmem unikania odporności, który zapewnia funkcjonalną redundancję podczas infekcji. Istnieje jednak coraz więcej dowodów na to, że siderofory specjalizują się w swoich funkcjach związanych z pozyskiwaniem żelaza, mogą zaburzać homeostazę żelaza u gospodarzy, a nawet wiązać inne jony metali (np. Cu^{2+} , Zn^{2+}) w celu wspierania sprawności bakterii. Połączenie sideroforów wytwarzanych przez patogen może umożliwić współzawodnictwo międzybakteryjne, modulować szlaki komórkowe gospodarza i określić bakteryjną „niszę replikacyjną” podczas infekcji. W niniejszej rozprawie porównując wpływ badanych leków między sobą, nie otrzymano wyników istotnych statystycznie w przypadku badania poziomów ekspresji

sideroforów. Jednak można zauważyć, że ekspresja badanych genów *entB* i *irp2* była wyższa w obecności cyklosporyny niż pod wpływem działania tacrolimusu. Z kolei ekspresja genu *iroB* była nieznacznie niższa w obecności cyklosporyny niż pod wpływem działania tacrolimusu. W przypadku badania długotrwałej ekspozycji izolatów na działanie immunosupresantów, nie odnotowano znaczących różnic między badanymi lekami. Odnotowano wyższy poziom ekspresji sideroforów (*entB*, *irp2*, *iroB*) dla izolatów pasażowanych na podłożach z dodatkiem cyklosporyny, jak i tacrolimusu, w stosunku do izolatów hodowanych na podłożach bez dodatku leków w odpowiednich punktach czasowych. W niniejszej rozprawie wykazano, że obecność cyklosporyny, która wpłynęła na wzrost poziomu ekspresji genu kodującego enterobaktynę i yersiniabaktynę, może niekorzystnie regulować poziom żelaza Fe³⁺ w komórkach gospodarza. Brak istotnie statystycznych zmian w ekspresji sideroforów może mieć związek ze stałym poziomem żelaza w środowisku a nie zastosowanymi lekami.

ZUM może wystąpić w dowolnym momencie po przeszczepieniu nerki, jednak najwyższą częstość odnotowuje się w ciągu pierwszych 3-6 miesięcy. Dodatkowo, ZUM występujące w ciągu pierwszych miesięcy po przeszczepie zwiększa ryzyko ostrego odrzucenia komórkowego a także ryzyko innych powikłań [10,25]. Dlatego przeprowadzono badanie wpływu długotrwałej ekspozycji izolatów *K. pneumoniae* na działanie leków immunosupresyjnych w stężeniach terapeutycznych (cyklosporyna – 200 µg/l, tacrolimus – 10 µg/l). Wyniki długoterminowego wpływu leków immunosupresyjnych na komórki bakteryjne wykazały, że w obecności leków ekspresja genów była wyższa niż w przypadku hodowli pasażowanych bez leków. Ponadto, w obecności cyklosporyny ekspresja genów utrzymywała się mniej więcej na stałym poziomie, z kolei pod wpływem działania tacrolimusu obserwowany był niewielki spadek ekspresji (wyniki nie są statystycznie istotne). Niestety, interpretacja powyższych obserwacji pozostaje spekulacją. Z drugiej strony podwyższona ekspresja genów w środowisku długotrwałej ekspozycji na działanie immunosupresantów sugeruje, że cyklosporyna i tacrolimus mogą nie tylko wpływać na ekspresję genów bakterii, ale mogą również wpływać na właściwości komórek rosnących w planktonie oraz na wzrost w postaci biofilmu. Dlatego koniecznym wydaje się przeprowadzenie dodatkowych badań, w tym badania biofilmu.

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że rodzaj inhibitora kalcyneuryny nie jest bez znaczenia na rozwój zakażenia ZUM o etiologii *K. pneumoniae*. Zmiany w poziomie ekspresji bakteryjnych genów kodujących czynniki wirulencji w zależności od zastosowanego leku immunosupresyjnego (cyklosporyna lub tacrolimus) oraz od ich dawki mogą mieć odzwierciedlenie w obrazie klinicznym pacjenta. Należy jednak pamiętać, że wyniki badań uzyskano w układzie *in vitro* i wykazano, że wyższa ekspresja genów kodujących wybrane czynniki wirulencji pod wpływem działania cyklosporyny jest wynikiem bezpośredniego wpływu immunosupresanta na komórki bakteryjne, a nie wynikiem immunomodulacji u pacjenta będącego gospodarzem.

Podsumowując, wykazano różnice w profilu ekspresji czynników wirulencji odpowiedzialnych za ZUM o etiologii *K. pneumoniae* izolowanych od pacjentów po przeszczepieniu nerki i zasugerowano, że terapia może być bardziej skuteczna, jeśli jako środek immunosupresyjny zostanie wybrany tacrolimus, a nie cyklosporyna. Jednak nadal potrzebne są dalsze badania, aby przeanalizować inne aspekty wpływu cyklosporyny na komórki bakteryjne.



7. Podsumowanie i wnioski końcowe

Rozprawa doktorska porusza istotne problemy związane z infekcjami i zakażeniami szpitalnymi pacjentów po przeszczepieniu nerki, za które odpowiedzialne są bakterie *Klebsiella pneumoniae*. Są one drugim, po *Escherichia coli* najczęstszym czynnikiem etiologicznym odpowiedzialnym za ZUM, które może prowadzić do dysfunkcji przeszczepionej nerki. Pomimo że *K. pneumoniae* jest uznawana za jeden z najważniejszych Gram-ujemnych patogenów oportunistycznych, szczegółowa wiedza na temat patogenezы jest ograniczona. Drobnoustroje te wywołują najczęściej zakażenia szpitalne, ale coraz częściej obserwuje się infekcje poza środowiskiem szpitalnym, za które odpowiedzialne są tzw. szczepy środowiskowe. Poza stanem infekcji czynnej obserwuje się również bezobjawową kolonizację dróg moczowych pacjenta, nazywaną bezobjawową bakteriurią (ABU) oraz nosicielstwo szczepów w przewodzie pokarmowym. Przewód pokarmowy pacjenta wielokrotnie hospitalizowanego może być skolonizowany szczepami szpitalnymi, które mogą doprowadzić w konsekwencji do zakażeń układu moczowego, z drugiej strony pacjent może być nosicielem różnych szczepów *K. pneumoniae*, zarówno tych komensalnych, jak i patogennych, nie związanych ze środowiskiem szpitalnym. Zarówno jedna, jak i druga grupa pacjentów stanowi ryzyko ekspozycji na zakażenie wśród pacjentów z niedoborem odporności, którymi są biorcy nerek, poddawani leczeniu immunosupresyjnemu. W przypadku pacjentów po transplantacji nerki obserwuje się różne przyczyny ZUM, od tych spowodowanych kolonizacją i infekcją szczepami szpitalnymi, po infekcje, za które odpowiedzialne są szczepy endogenne pacjenta.

Problem szczepów wielolekoopornych *K. pneumoniae* u biorców nerki

W rozprawie doktorskiej przebadano łącznie 61 izolatów *K. pneumoniae* od biorców nerki oraz 36 izolatów od pacjentów z ZUM nie będących biorcami nerki. Spośród wszystkich odnotowanych epizodów ZUM wśród pacjentów po przeszczepieniu nerki, 53% epizodów wiązało się z ABU, u pozostałych pacjentów odnotowano objawowe ZUM. Środowisko szpitalne oraz przedłużona antybiotykoterapia pacjentów poddawanych immunosupresji, odpowiedzialne są za zakażenia/infekcje szczepami wielolekoopornymi. Wśród badanych w rozprawie szczepów izolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki, 74% stanowiły szczepy ESBL+. Ponadto, zidentyfikowano nowe zagrożenie epidemiczne w środowisku szpitalnym - szczepy *K. pneumoniae* produkujące nowy wariant metalo- β -laktamaz, szczepy *K. pneumoniae* NDM-1, które stanowiły 3,3% szczepów izolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki. Szczepy ESBL+, jak i NDM-1 zostały wykryte również w grupie kontrolnej (odpowiednio 50% i 8,3%), co świadczy o tym, że pacjenci z chorobami układu moczowego bez względu na rodzaj stosowanego leczenia mogą mieć problemy z terapią przeciwdrobnoustrojową.

- a. Szczepy *K. pneumoniae* NDM-1 charakteryzowały się obecnością niewielu, ale bardzo ważnych dla wirulencji genów kodujących fimbrie typu 1 i 3, yersiniabaktynę, salmochelinę czy eneterobaktynę oraz wykazywały różne mechanizmy oporności.
- b. Wykazano brak statystycznie istotnych różnic w zestawie genów, które odpowiadają za wirulencję bakterii *K. pneumoniae* NDM-1 odpowiedzialnych za ZUM u biorców nerki oraz grupy kontrolnej.

- c. Potwierdzono, zauważalną od 2012 roku w Polsce, ekspansję szczepów *Klebsiella pneumoniae* o typie sekwencyjnym ST11, produkujących karbapenemazy NDM-1.
- d. Poprzez samodzielną analizę bioinformatyczną zsekwencjonowanych w ramach rozprawy genomów metodą WGS, wykazano międzynarodowy charakter linii, z udokumentowanym potencjałem epidemicznym w Polsce i w Grecji.
- e. Koniecznym wydaje się zwrócenie szczególnej uwagi na transmisję epidemicznych klonów NDM, poprzez okresowe badania pacjentów zarówno tych z ZUM, jak i ABU oraz pacjentów przyjmowanych do szpitala, którzy bardzo często są skolonizowani wieloopornymi szczepami.
- f. Przeprowadzona w rozprawie analiza dostarcza nowych danych dotyczących śledzenia rozprzestrzeniania się *K. pneumoniae* NDM-1 w jednym z polskich szpitali.
- g. Rekomenduje się wdrożenie do rutynowej diagnostyki metod molekularnych wykrywających karbapenemazy.

Wirulencja *K. pneumoniae* jako czynniki ryzyka ZUM

Genom *K. pneumoniae* jest wyjątkowo plastyczny i poza rdzeniem zakonserwowanym ewolucyjnie posiada liczne elementy genetyczne, które tworzą tzw. genom pomocniczy odpowiadający za adaptację bakterii do niszy replikatywnej. Szczepy *K. pneumoniae* izolowane od pacjentów po przeszczepie nerki z różnym schematem immunosupresji wykazywały bardzo duże zróżnicowanie pod względem obecności wybranych genów kodujących czynniki wirulencji. Analiza jednoczynnikowa występowania genów kodujących czynniki wirulencji wśród szczepów od pacjentów po przeszczepie nerki wykazała, że gen *kpn* kodujący adhezynę FimH-like, dominował w przypadku pacjentów z ABU w porównaniu z objawowymi ZUM, zaś gen *fyuA* kodujący yersiniabaktynę występował częściej w izolatach pozyskanych z górnych odcinków ZUM niż w przypadkach ABU. Obecność genu *kpn* może zastępować ekspresję fimbrii typu 1, ułatwiając tym samym kolonizację bakterii w przypadkach ABU. Wykazano również, że wybór schematów leczenia immunosupresyjnego wydawał się wpływać na występowanie różnych genów kodujących czynniki wirulencji. Geny *uge*, *ycfM* i *entB* występowały rzadziej wśród szczepów wyizolowanych od pacjentów przyjmujących odpowiednio everolimus, bazyliksymab, tymoglobulinę. Z kolei gen *iutA* występował częściej wśród szczepów wyizolowanych od pacjentów przyjmujących tymoglobulinę. Ponadto szczepy izolowane od pacjentów przyjmujących tacrolimus wykazywały niższą wirulencję. Wykazano różnice w profilu czynników wirulencji uczestniczących w ZUM szczepów *K. pneumoniae* izolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki oraz grupy kontrolnej.

Wśród badanych w rozprawie doktorskiej szczepów wykryto dwa szczepy *K. pneumoniae* wyizolowane od pacjentów po przeszczepie nerki z ABU, które posiadały zdolność do tworzenia fenotypu hipermukoidalnego bez obecności genów *rmpA/rmpA2* i *magA*, kodujących typowe dla tego fenotypu czynniki wirulencji. Szczepy wykazały obecność genów kodujących wiele czynników wirulencji, jak i wielolekooporność pomimo, że nie były związane z objawowymi zakażeniami dróg moczowych.

- a. Gen *entB* odpowiedzialny za biosyntezę sideroforu - enterobaktynę był znacznie bardziej rozpowszechniony w szczepach izolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki (73,8%

vs 47,2% $p = 0,015$), podczas gdy gen aerobaktyzny *iutA* dominował w izolatach od pacjentów z grupy kontrolnej (27,9% vs 58,3% $p = 0,005$). Również w przypadku pacjentów z ABU, gen *entB* dominował w szczepach izolowanych od pacjentów z grupy badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (71,9% vs 35,3% $p = 0,017$). U pacjentów z grupy kontrolnej, bez leczenia immunosupresyjnego, większe szanse na przetrwanie mają te szczepy, które wytworzyły inne grupy sideroforów niż enterobaktyna. Enterobaktyna jest sekwestrowana przez lipokalinę-2, stąd bakterie muszą pominąć ten system obronny gospodarza.

- b. W przypadku pacjentów z ZUM dolnego odcinka dróg moczowych, gen *iroN* kodujący salmochelinę był znacznie bardziej powszechny wśród szczepów izolowanych od pacjentów z grupy badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (40% vs 0% $p = 0,029$).
- c. W przypadku pacjentów z grupy badanej, gen *kpn* dominował w przypadkach ABU w porównaniu z objawowymi ZUM, zaś gen *fyuA* występował częściej w górnych ZUM niż w przypadkach ABU.
- d. Wśród szczepów z grupy badanej nie znaleziono związku między profilem czynników wirulencji a rodzajem ZUM tj. dolne ZUM vs. górne ZUM. Nie stwierdzono również istotnie statystycznej różnicy porównując całkowitą liczbę zidentyfikowanych genów kodujących czynniki wirulencji między izolatami z przypadków dolnego i górnego ZUM u pacjentów z grupy badanej.
- e. Uzyskane wyniki wskazują na duże zróżnicowanie ocenianych szczepów *K. pneumoniae* pod względem obecności wybranych genów kodujących czynniki wirulencji.
- f. Najczęściej identyfikowanym klastrem czynników wirulencji dla szczepów izolowanych zarówno od pacjentów z grupy badanej, jak i kontrolnej, były geny kodujące adhezyny, co wskazuje na rolę adhezyn w kolonizacji dróg moczowych niezależnie od statusu przeszczepienia nerki.
- g. Zsekwencjonowano szczepy hipermukoidalne z zastosowaniem metody WGS. Wykazano, że należą one do typu sekwencyjnego ST152. Wykazano wyższą zjadliwość szczepów ST152 wyizolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki i wykazujących fenotyp hipermukoidalny w porównaniu z innymi izolatami typu ST152 w Polsce.

Analiza epidemiologiczna

Typowanie genetyczne jest pomocne w epidemiologii molekularnej do oznaczenia pochodzenia klonalnego szczepów bakterii. Szczegółowa analiza pokrewieństwa genetycznego szczepów wyizolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki wykazała dużą różnorodność genotypów *K. pneumoniae*, które są utrzymywane w warunkach szpitalnych.

- a. Dystrybucja genotypów nie miała znaczących powiązań z heterogenicznym profilem czynników wirulencji ani profilem antybiotykoodporności.

- b. Duża różnorodność genotypów może być wynikiem nosicielstwa szczepów przez hospitalizowanych pacjentów i utrzymywania ich w środowisku szpitalnym dzięki presji selekcyjnej.

Wpływ leków immunosupresyjnych na ekspresję genów bakteryjnych

Wykazano, że warunki wzrostu bakterii wpływają na ekspresję fimbrii typu 1 szczepów *K. pneumoniae* izolowanych z przypadków ZUM.

- a. Populacja *K.pneumoniae* jest heterogenna pod względem zmiany przełącznika fazowego dla fimbrii typu 1.
- b. Wykazano różnice w profilu ekspresji czynników wirulencji odpowiedzialnych za ZUM o etiologii *K. pneumoniae* izolowanych od chorych po przeszczepie nerki w zależności od ekspozycji na dany lek immunosupresyjny.
- c. Ustalono, że obecność w hodowli cyklosporyny lub tacrolimusu w stężeniu terapeutycznym, może być czynnikiem regulującym fenotypową ekspresję fimbrii typu 1 w izolatach *K. pneumoniae* pochodzących z ZUM od pacjentów po przeszczepie nerki.
- d. Określone sygnały środowiskowe w drogach moczowych mogą sprzyjać ekspresji fimbrii typu 1.
- e. Długotrwała ekspozycja wykazała, że stała obecność leków immunosupresyjnych w środowisku życia drobnoustrojów może wywierać presję selekcyjną zwiększającą szanse przeżycia szczepów.
- f. Cyklosporyna może być modulatorem syntezy struktur komórkowych, które sprzyjają początkowym etapom adhezji do komórek nabłonkowych układu moczowego.
- g. Typ zastosowanej immunosupresji może mieć wpływ na rozwój infekcji dróg moczowych.

8. Perspektywy

Wyniki badań własnych przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej stanowią istotne informacje na temat problemu zakażeń układu moczowego *K. pneumoniae* wśród biorców nerki. Problemy te związane są z wirulencją i antybiotykoopornością szczepów *K. pneumoniae* oraz wpływem leków immunosupresyjnych na ekspresję genów mających istotny wpływ na adhezję bakterii do komórek układu moczowego oraz genów uczestniczących w pobieraniu żelaza przez bakterie. Tematyka badawcza jest pionierska w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej a poruszane problemy nowością również w świecie nauki. Ze względu na ich ograniczony charakter (pula 61 izolatów) trudno jednak traktować wyniki badań jako odzwierciedlające ogólny stan w Polsce dotyczący izolatów *K. pneumoniae* wśród tej grupy chorych. Stanowią one przyczynek do dalszych badań w tym kierunku.

Patrząc przez pryzmat uzyskanych wyników, ważne wydaje się być przeprowadzenie badań w większej ilości ośrodków zdrowia – idealnym byłoby wprowadzenie obowiązkowych badań molekularnych wszystkich izolowanych od pacjentów izolatów *K. pneumoniae* oraz prowadzenia statystyk określających procent szczepów wielolekoopornych. Umożliwiłyby to rzetelne odzwierciedlenie obecnego problemu zakażeń układu moczowego o tej etiologii oraz monitorowanie ewentualnych tendencji zwykłych. W związku z wyizolowaniem w trakcie badań własnych izolatów *K. pneumoniae* pochodzących od pacjentów z bezobjawową bakteriurią, a wykazujących fenotyp hipermukoidalny, koniecznym wydaje się również poszerzenie badań o większą pulę pacjentów po przeszczepie nerki, którzy nie wykazują objawów zakażenia. Niezwykle istotne wydaje się wyselekcjonowanie chorych najbardziej narażonych na zakażenia układu moczowego poprzez wskazanie czynników predysponujących.

W świetle przedstawionych informacji istotne wydaje się również porównanie wpływu rodzaju inhibitora kalcyneuryny na ekspresję bakteryjnych genów kodujących czynniki wirulencji pomiędzy komórkami rosnącymi w planktonie a komórkami tworzącymi biofilm oraz ocenienie czy rodzaj inhibitora kalcyneuryny zmienia właściwości biofilmu. Ponadto, potrzebne są dalsze badania ekspresji genów kodujących siderofory w warunkach obecności różnych stężeń żelaza, ponieważ obecność żelaza we krwi jest istotnym wskaźnikiem stanu zapalnego pacjenta.

W sytuacji zakażenia układu moczowego, zwłaszcza szczepami wieloopornymi w populacji pacjentów, u których wybór antybiotyku jest ograniczony upośledzoną funkcją nerek i możliwością wystąpienia interakcji z innymi lekami, ustalenie optymalnej profilaktyki antybiotykowej jest bardzo trudne, jednak sugerowałabym określenie skuteczności antybiotyków w przypadku zastosowania w schemacie immunosupresji cyklosporyny lub tacrolimusu. Modyfikacja leczenia immunosupresyjnego poprzez zamianę stosowanego inhibitora kalcyneuryny może okazać się wartościową opcją terapeutyczną.

9. Bibliografia

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med.* 1999;341(23):1725-1730. doi:10.1056/NEJM199912023412303
2. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2005;67(6):2089-2100. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00365.x
3. Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Waiting time on dialysis as the strongest modifiable risk factor for renal transplant outcomes: a paired donor kidney analysis. *Transplantation.* 2002;74(10):1377-1381. doi:10.1097/00007890-200211270-00005
4. Furian L, Rigotti P. Transplantation: Optimizing outcomes in elderly kidney transplant recipients. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(7):382-384. doi:10.1038/nrneph.2013.105
5. Centrum Organizacyjno- Koordynacyjne ds. Transplantacji Poltransplant. Poltransplant Biuletyn Informacyjny. 2020;1(29). ISSN 1428-0825.
6. Levison ME, Kaye D. Treatment of complicated urinary tract infections with an emphasis on drug-resistant gram-negative uropathogens. *Curr Infect Dis Rep.* 2013;15(2):109-115. doi:10.1007/s11908-013-0315-7
7. Avery RK, Michaels MG; AST Infectious Diseases Community of Practice. Strategies for safe living following solid organ transplantation-Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant.* 2019;33(9):e13519. doi:10.1111/ctr.13519
8. Green M. Introduction: Infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13 Suppl 4:3-8. doi:10.1111/ajt.12093
9. Via Medica Sp. z o.o. Gazeta AMG 2017(12) ISSN 1506-9745.
10. Säemann M, Hörl WH. Urinary tract infection in renal transplant recipients. *Eur J Clin Invest.* 2008;38 Suppl 2:58-65. doi:10.1111/j.1365-2362.2008.02014.x
11. Newsletter Transplant. International Figures on donation and transplantation 2019. EDQM. 2017.22 <https://www.edqm.eu/en/news/just-released-newsletter-transplant-2019>
12. Al Midani A, Elands S, Collier S, Harber M, Shendi AM. Impact of Urinary Tract Infections in Kidney Transplant Recipients: A 4-Year Single-Center Experience. *Transplant Proc.* 2018;50(10):3351-3355. doi:10.1016/j.transproceed.2018.08.022
13. Karuthu S, Blumberg EA. Common infections in kidney transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(12):2058-2070. doi:10.2215/CJN.04410512
14. Ko KS, Cho DO, Ahn JH, et al. Infections after renal transplantation. *Transplant Proc.* 1994;26(4):2072-2074.
15. Durlik M. Zakażenia u chorych po przeszczepieniu narządu. http://klinikamedycynytransplantacyjnej.wum.edu.pl/system/files/zakazenia_u_choryc_h_po_przeszczepieniu_narzadu_m_durlik.pdf
16. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(5):269-284. doi:10.1038/nrmicro3432
17. Wu SW, Liu KS, Lin CK, et al. Community-acquired urinary tract infection in kidney transplantation: risk factors for bacteremia and recurrent infection. *J Formos Med Assoc.* 2013;112(3):138-143. doi:10.1016/j.jfma.2012.01.010
18. Silva C, Afonso N, Macário F, Alves R, Mota A. Recurrent urinary tract infections in kidney transplant recipients. *Transplant Proc.* 2013;45(3):1092-1095. doi:10.1016/j.transproceed.2013.02.019
19. Dupont PJ, Psimenou E, Lord R, Buscombe JR, Hilson AJ, Sweny P. Late recurrent urinary tract infections may produce renal allograft scarring even in the absence of symptoms or vesicoureteric reflux. *Transplantation.* 2007;84(3):351-355. doi:10.1097/01.tp.0000275377.09660.fa
20. Bonkat G, Rieken M, Siegel FP, et al. Microbial ureteral stent colonization in renal transplant recipients: frequency and influence on the short-time functional outcome. *Transpl Infect Dis.* 2012;14(1):57-63. doi:10.1111/j.1399-3062.2011.00671.x
21. Karakayali H, Emiroğlu R, Arslan G, Bilgin N, Haberal M. Major infectious complications after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2001;33(1-2):1816-1817. doi:10.1016/s0041-1345(00)02694-4
22. López-Medrano F, García-Bravo M, Morales JM, et al. Urinary tract infection due to *Corynebacterium urealyticum* in kidney transplant recipients: an underdiagnosed etiology for obstructive uropathy and graft dysfunction-results of a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2008;46(6):825-830. doi:10.1086/528713
23. Giral M, Pascuariello G, Karam G, et al. Acute graft pyelonephritis and long-term kidney allograft outcome. *Kidney Int.* 2002;61(5):1880-1886. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00323.x
24. Lim JH, Cho JH, Lee JH, et al. Risk factors for recurrent urinary tract infection in kidney transplant recipients. *Transplant Proc.* 2013;45(4):1584-1589. doi:10.1016/j.transproceed.2012.12.011
25. Vidal E, Torre-Cisneros J, Blanes M, et al. Bacterial urinary tract infection after solid organ transplantation in the RESITRA cohort. *Transpl Infect Dis.* 2012;14(6):595-603. doi:10.1111/j.1399-3062.2012.00744.x

26. Kiros T, Asrat D, Ayenew Z, Tsige E. Bacterial urinary tract infection among adult renal transplant recipients at St. Paul's hospital millennium medical college, Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Nephrol.* 2019;20(1):289. Published 2019 Jul 31. doi:10.1186/s12882-019-1485-9
27. Giullian JA, Cavanaugh K, Schaefer H. Lower risk of urinary tract infection with low-dose trimethoprim/sulfamethoxazole compared to dapsone prophylaxis in older renal transplant patients on a rapid steroid-withdrawal immunosuppression regimen. *Clin Transplant.* 2010;24(5):636-642. doi:10.1111/j.1399-0012.2009.01129.x
28. Kamath NS, John GT, Neelakantan N, Kirubakaran MG, Jacob CK. Acute graft pyelonephritis following renal transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2006;8(3):140-147. doi:10.1111/j.1399-3062.2006.00148.x
29. Fiorante S, Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, et al. Acute graft pyelonephritis in renal transplant recipients: incidence, risk factors and long-term outcome. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(3):1065-1073. doi:10.1093/ndt/gfq531
30. Singh R, Bemelman FJ, Hodiament CJ, Idu MM, Ten Berge IJ, Geerlings SE. The impact of trimethoprim-sulfamethoxazole as *Pneumocystis jirovecii* pneumonia prophylaxis on the occurrence of asymptomatic bacteriuria and urinary tract infections among renal allograft recipients: a retrospective before-after study. *BMC Infect Dis.* 2016;16:90. Published 2016 Feb 25. doi:10.1186/s12879-016-1432-3
31. Lee JR, Bang H, Dadhania D, et al. Independent risk factors for urinary tract infection and for subsequent bacteremia or acute cellular rejection: a single-center report of 1166 kidney allograft recipients. *Transplantation.* 2013;96(8):732-738. doi:10.1097/TP.0b013e3182a04997
32. Sui W, Lipsky MJ, Matulay JT, et al. Timing and Predictors of Early Urologic and Infectious Complications After Renal Transplant: An Analysis of a New York Statewide Database. *Exp Clin Transplant.* 2018;16(6):665-670. doi:10.6002/ect.2016.0357
33. Alangaden GJ, Thyagarajan R, Gruber SA, et al. Infectious complications after kidney transplantation: current epidemiology and associated risk factors. *Clin Transplant.* 2006;20(4):401-409. doi:10.1111/j.1399-0012.2006.00519.x
34. Cepeda PA, Balderramo DC, De Arteaga J, Douthat WG, Massari PU. Infección urinaria temprana en trasplante renal. Factores de riesgo y efecto en la sobrevida del injerto [Early urinary tract infection in kidney transplantation. Risk factors and impact on graft survival]. *Medicina (B Aires).* 2005;65(5):409-14. Spanish. PMID: 16296636.
35. Valera B, Gentil MA, Cabello V, Fijo J, Cordero E, Cisneros JM. Epidemiology of urinary infections in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2006;38(8):2414-2415. doi:10.1016/j.transproceed.2006.08.018
36. Ooms L, IJzermans J, Voor In 't Holt A, Betjes M, Vos M, Terkivatan T. Urinary Tract Infections After Kidney Transplantation: A Risk Factor Analysis of 417 Patients. *Ann Transplant.* 2017;22:402-408. Published 2017 Jun 30. doi:10.12659/aot.903249
37. Olenski S, Scuderri C, Choo A, et al. Urinary tract infections in renal transplant recipients at a quaternary care centre in Australia. *BMC Nephrol.* 2019;20(1):479. Published 2019 Dec 27. doi:10.1186/s12882-019-1666-6
38. Farr A, Györi G, Mühlbacher F, Husslein P, Böhmig GA, Margreiter M. Gender has no influence on VUR rates after renal transplantation. *Transpl Int.* 2014;27(11):1152-1158. doi:10.1111/tri.12397
39. Naik AS, Dharnidharka VR, Schnitzler MA, et al. Clinical and economic consequences of first-year urinary tract infections, sepsis, and pneumonia in contemporary kidney transplantation practice. *Transpl Int.* 2016;29(2):241-252. doi:10.1111/tri.12711
40. Wojciechowski D, Chandran S. Effect of ciprofloxacin combined with sulfamethoxazole-trimethoprim prophylaxis on the incidence of urinary tract infections after kidney transplantation. *Transplantation.* 2013;96(4):400-405. doi:10.1097/TP.0b013e3182962cab
41. Iqbal T, Naqvi R, Akhter SF. Frequency of urinary tract infection in renal transplant recipients and effect on graft function. *J Pak Med Assoc.* 2010;60(10):826-829.
42. Adamska Z, Karczewski M, Cichańska L, et al. Bacterial Infections in Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2015;47(6):1808-1812. doi:10.1016/j.transproceed.2015.03.046
43. Ariza-Heredia EJ, Beam EN, Lesnick TG, Cosio FG, Kremers WK, Razonable RR. Impact of urinary tract infection on allograft function after kidney transplantation. *Clin Transplant.* 2014;28(6):683-690. doi:10.1111/ctr.12366
44. Camargo LF, Esteves AB, Ulisses LR, Rivelli GG, Mazzali M. Urinary tract infection in renal transplant recipients: incidence, risk factors, and impact on graft function. *Transplant Proc.* 2014;46(6):1757-1759. doi:10.1016/j.transproceed.2014.05.006
45. Khosravi AD, Abasi Montazeri E, Ghorbani A, Parhizgari N. Bacterial urinary tract infection in renal transplant recipients and their antibiotic resistance pattern: A four-year study. *Iran J Microbiol.* 2014;6(2):74-78.
46. Sorto R, Irizar SS, Delgadillo G, Alberú J, Correa-Rotter R, Morales-Buenrostro LE. Risk factors for urinary tract infections during the first year after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2010;42(1):280-281. doi:10.1016/j.transproceed.2009.11.029

47. Rivera-Sanchez R, Delgado-Ochoa D, Flores-Paz RR, et al. Prospective study of urinary tract infection surveillance after kidney transplantation. *BMC Infect Dis.* 2010;10:245. Published 2010 Aug 19. doi:10.1186/1471-2334-10-245
48. Memikoğlu KO, Keven K, Sengül S, Soypaçacı Z, Ertürk S, Erbay B. Urinary tract infections following renal transplantation: a single-center experience. *Transplant Proc.* 2007;39(10):3131-3134. doi:10.1016/j.transproceed.2007.10.005
49. Pourmand G, Salem S, Mehra A, Taherimahmoudi M, Ebrahimi R, Pourmand MR. Infectious complications after kidney transplantation: a single-center experience. *Transpl Infect Dis.* 2007;9(4):302-309. doi:10.1111/j.1399-3062.2007.00229.x
50. Chuang P, Parikh CR, Langone A. Urinary tract infections after renal transplantation: a retrospective review at two US transplant centers. *Clin Transplant.* 2005;19(2):230-235. doi:10.1111/j.1399-0012.2005.00327.x
51. Abbott KC, Swanson SJ, Richter ER, et al. Late urinary tract infection after renal transplantation in the United States. *Am J Kidney Dis.* 2004;44(2):353-362. doi:10.1053/j.ajkd.2004.04.040
52. Dantas SR, Kuboyama RH, Mazzali M, Moretti ML. Nosocomial infections in renal transplant patients: risk factors and treatment implications associated with urinary tract and surgical site infections. *J Hosp Infect.* 2006;63(2):117-123. doi:10.1016/j.jhin.2005.10.018
53. Safdar N, Slattery WR, Knasinski V, et al. Predictors and outcomes of candiduria in renal transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2005;40(10):1413-1421. doi:10.1086/429620
54. Barbouch S, Cherif M, Ounissi M, et al. Urinary tract infections following renal transplantation: a single-center experience. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2012;23(6):1311-1314. doi:10.4103/1319-2442.103586
55. Gołębowska J, Dębska-Słizień A, Komarnicka J, Samet A, Rutkowski B. Urinary tract infections in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2011;43(8):2985-2990. doi:10.1016/j.transproceed.2011.07.010
56. Papatotiriou M, Savvidaki E, Kalliakmani P, et al. Predisposing factors to the development of urinary tract infections in renal transplant recipients and the impact on the long-term graft function. *Ren Fail.* 2011;33(4):405-410. doi:10.3109/0886022X.2011.568137
57. Charfeddine K, Kharrat M, Yaich S, Jarraya F, Mkawar K, Hachicha J. Infection in kidney transplant recipients in Tunisia. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2002;13(2):195-8. PMID: 17660663.
58. Pellé G, Vimont S, Levy PP, et al. Acute pyelonephritis represents a risk factor impairing long-term kidney graft function. *Am J Transplant.* 2007;7(4):899-907. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01700.x
59. Müller V, Becker G, Delfs M, Albrecht KH, Philipp T, Heemann U. Do urinary tract infections trigger chronic kidney transplant rejection in man?. *J Urol.* 1998;159(6):1826-1829.
60. Veroux M, Giuffrida G, Corona D, et al. Infective complications in renal allograft recipients: epidemiology and outcome. *Transplant Proc.* 2008;40(6):1873-1876. doi:10.1016/j.transproceed.2008.05.065
61. Fishman JA. Opportunistic infections--coming to the limits of immunosuppression?. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(10):a015669. Published 2013 Oct 1. doi:10.1101/cshperspect.a015669
62. Nicolle LE, Bradley S, Colgan R, et al. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults [published correction appears in *Clin Infect Dis.* 2005 May 15;40(10):1556]. *Clin Infect Dis.* 2005;40(5):643-654. doi:10.1086/427507
63. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Copenhagen 2018. ISBN 978-94-92671-01-1
64. Fishman JA, Issa NC. Infection in organ transplantation: risk factors and evolving patterns of infection. *Infect Dis Clin North Am.* 2010;24(2):273-283. doi:10.1016/j.idc.2010.01.005
65. Parasuraman R, Julian K; AST Infectious Diseases Community of Practice. Urinary tract infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13 Suppl 4:327-336. doi:10.1111/ajt.12124
66. Goldman JD, Julian K. Urinary tract infections in solid organ transplant recipients: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant.* 2019;33(9):e13507. doi:10.1111/ctr.13507
67. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of Uropathogenic Escherichia coli Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Int J Nephrol.* 2012;2012:681473. doi:10.1155/2012/681473
68. Barber AE, Norton JP, Spivak AM, Mulvey MA. Urinary tract infections: current and emerging management strategies. *Clin Infect Dis.* 2013;57(5):719-724. doi:10.1093/cid/cit284
69. Rosen DA, Pinkner JS, Jones JM, Walker JN, Clegg S, Hultgren SJ. Utilization of an intracellular bacterial community pathway in Klebsiella pneumoniae urinary tract infection and the effects of FimK on type 1 pilus expression. *Infect Immun.* 2008;76(7):3337-3345. doi:10.1128/IAI.00090-08
70. Prograf. Revised May 2009; http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/050708s027,050709s021lbl.pdf.
71. Trzeciak S, Sharer R, Piper D, et al. Infections and severe sepsis in solid-organ transplant patients admitted from a university-based ED. *Am J Emerg Med.* 2004;22(7):530-533. doi:10.1016/j.ajem.2004.09.010
72. Liapis H, Wang H.L. (eds), Pathology of Solid Organ Transplantation, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011. doi:10.1007/978-3-540-79343-4_3

73. Gołębiowska J, Dębska-Ślizień A, Rutkowski B. Zakażenia układu moczowego u pacjentów po transplantacji nerki. *Forum Nefrologiczne*. 2011;4(2):110-118.
74. Muñoz P. Management of urinary tract infections and lymphocele in renal transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2001;33 Suppl 1:S53-S57. doi:10.1086/320905
75. Lansang MC, Ma L, Schold JD, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. The relationship between diabetes and infectious hospitalizations in renal transplant recipients. *Diabetes Care*. 2006;29(7):1659-1660. doi:10.2337/dc05-2412
76. Fayek SA, Keenan J, Haririan A, et al. Ureteral stents are associated with reduced risk of ureteral complications after kidney transplantation: a large single center experience. *Transplantation*. 2012;93(3):304-308. doi:10.1097/TP.0b013e31823ec081
77. Mathe Z, Treckmann JW, Heuer M, et al. Stented ureterovesical anastomosis in renal transplantation: does it influence the rate of urinary tract infections?. *Eur J Med Res*. 2010;15(7):297-302. doi:10.1186/2047-783x-15-7-297
78. Gołębiowska J, Tarasewicz A, Dębska-Ślizień A, Rutkowski B. Klebsiella spp urinary tract infections during first year after renal transplantation. *Transplant Proc*. 2014;46(8):2748-2751. doi:10.1016/j.transproceed.2014.09.074
79. Linares L, Cervera C, Cofán F, et al. Epidemiology and outcomes of multiple antibiotic-resistant bacterial infection in renal transplantation. *Transplant Proc*. 2007;39(7):2222-2224. doi:10.1016/j.transproceed.2007.06.061
80. Linares L, Cervera C, Hoyo I, et al. Klebsiella pneumoniae infection in solid organ transplant recipients: epidemiology and antibiotic resistance. *Transplant Proc*. 2010;42(8):2941-2943. doi:10.1016/j.transproceed.2010.07.080
81. Anastasopoulos NA, Duni A, Peschos D, Agnantis N, Dounousi E. The Spectrum of Infectious Diseases in Kidney Transplantation: A Review of the Classification, Pathogens and Clinical Manifestations. *In Vivo*. 2015;29(4):415-422.
82. Shin DH, Kim EJ, Lee S, Kim SJ, Oh J. Early-Onset Graft Pyelonephritis Is Predictive of Long-Term Outcome of Renal Allografts. *Tohoku J Exp Med*. 2015;236(3):175-183. doi:10.1620/tjem.236.175
83. Al-Hasan MN, Razonable RR, Kremers WK, Baddour LM. Impact of Gram-negative bloodstream infection on long-term allograft survival after kidney transplantation. *Transplantation*. 2011;91(11):1206-1210. doi:10.1097/TP.0b013e3182180535
84. Agreda Castañeda F, Lorente D, Trilla Herrera E, et al. Extensive emphysematous pyelonephritis in a renal allograft: case report and review of literature. *Transpl Infect Dis*. 2014;16(4):642-647. doi:10.1111/tid.12246
85. Narcisse D, Agarwal M, Hancock M, Wells D, Sands C. A rare case of emphysematous pyelonephritis in a renal transplant patient. *Ther Adv Infect Dis*. 2016;3(6):141-144. doi:10.1177/2049936116678122
86. Valera B, Gentil MA, Cabello V, Fijo J, Cordero E, Cisneros JM. Epidemiology of urinary infections in renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 2006;38(8):2414-2415. doi:10.1016/j.transproceed.2006.08.018
87. Gołębiowska JE, Dębska-Ślizień A, Rutkowski B. Urinary tract infections during the first year after renal transplantation: one center's experience and a review of the literature. *Clin Transplant*. 2014;28(11):1263-1270. doi:10.1111/ctr.12465
88. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo-β-Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(2):e00115-18. Published 2019 Jan 30. doi:10.1128/CMR.00115-18
89. Wilkowski P, Ciszek M, Dobrzaniecka K, et al. Successful Treatment of Urinary Tract Infection in Kidney Transplant Recipients Caused by Multiresistant Klebsiella pneumoniae Producing New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM-1) With Strains Genotyping. *Transplant Proc*. 2016;48(5):1576-1579. doi:10.1016/j.transproceed.2016.01.060
90. Karczewski M, Tomczak H, Piechocka-Idasiak I, Cichanska L, Adamska Z, Stronka M. Is multiresistant Klebsiella pneumoniae New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) a new threat for kidney transplant recipients?. *Transplant Proc*. 2014;46(7):2409-2410. doi:10.1016/j.transproceed.2014.06.050
91. KDIGO Clinical Practice Guideline for Care of Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2009;9, Suppl 3.
92. Yang X, Feng P, Yin Y, et al. Cyclosporine Biosynthesis in *Tolypocladium inflatum* Benefits Fungal Adaptation to the Environment. *mBio* 2018;9(5):e01211-18. doi:10.1128/mBio.01211-18
93. Hong JC, Kahan BD. (2001) The potential role of immunosuppressive macrocyclic lactones. In: Schuurman HJ., Feutren G., Bach JF. (eds) Modern Immunosuppressives. Milestones in Drug Therapy MDT. Birkhäuser, Basel.
94. Abboudi H, Macphee IA. Individualized immunosuppression in transplant patients: potential role of pharmacogenetics. *Pharmgenomics Pers Med*. 2012;5:63-72. doi:10.2147/PGPM.S21743
95. Jarzembowski T, Daca A, Witkowski J, Rutkowski B, Gołębiowska J, Dębska-Ślizień A. Changes of PBP5 gene expression in enterococcal isolates from renal transplantation recipients. *Biomed Res Int*. 2013;2013:687156. doi:10.1155/2013/687156

96. Lofaro D, Vogelzang JL, van Stralen KJ, Jager KJ, Groothoff JW. Infection-related hospitalizations over 30 years of follow-up in patients starting renal replacement therapy at pediatric age. *Pediatr Nephrol*. 2016;31(2):315-323. doi:10.1007/s00467-015-3209-0
97. Friedlander C. Über die scizomyceten bei der acuten fibrosen pneumonie. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 1882;87:319-324.
98. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(4):589-603.
99. Brisse S, Fevre C, Passet V, et al. Virulent clones of Klebsiella pneumoniae: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One*. 2009;4(3):e4982. doi:10.1371/journal.pone.0004982
100. Jonasson J, Olofsson M, Monstein HJ. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments. *APMIS*. 2002;110(3):263-272. doi:10.1034/j.1600-0463.2002.100309.x
101. de Melo ME, Cabral AB, Maciel MA, da Silveira VM, de Souza Lopes AC. Phylogenetic groups among Klebsiella pneumoniae isolates from Brazil: relationship with antimicrobial resistance and origin. *Curr Microbiol*. 2011;62(5):1596-1601. doi:10.1007/s00284-011-9903-7
102. Brisse S, van Himbergen T, Kusters K, Verhoef J. Development of a rapid identification method for Klebsiella pneumoniae phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(10):942-945. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.00973.x
103. Brisse S, Passet V, Grimont PAD. Description of Klebsiella quasipneumoniae sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae subsp. nov. and Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae subsp. nov., and demonstration that Klebsiella singaporensis is a junior heterotypic synonym of Klebsiella variicola. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64(Pt 9):3146-3152. doi:10.1099/ijs.0.062737-0
104. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in Klebsiella pneumoniae, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(27):E3574-E3581. doi:10.1073/pnas.1501049112
105. Passet V, Brisse S. Description of Klebsiella grimontii sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018;68(1):377-381. doi:10.1099/ijsem.0.002517
106. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of Klebsiella pneumoniae. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(6):344-359. doi:10.1038/s41579-019-0315-1
107. Long SW, Linson SE, Ojeda Saavedra M, et al. Whole-Genome Sequencing of a Human Clinical Isolate of the Novel Species *Klebsiella quasivariicola* sp. nov. *Genome Announc*. 2017;5(42):e01057-17. Published 2017 Oct 19. doi:10.1128/genomeA.01057-17
108. Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of Klebsiella pneumoniae Infection in Intensive Care Patients. *Clin Infect Dis*. 2017;65(2):208-215. doi:10.1093/cid/cix270
109. Schembri MA, Blom J, Krogfelt KA, Klemm P. Capsule and fimbria interaction in Klebsiella pneumoniae. *Infect Immun*. 2005;73(8):4626-4633. doi:10.1128/IAI.73.8.4626-4633.2005
110. Bachman MA, Lenio S, Schmidt L, Oyler JE, Weiser JN. Interaction of lipocalin 2, transferrin, and siderophores determines the replicative niche of Klebsiella pneumoniae during pneumonia. *mBio*. 2012;3(6):e00224-11. Published 2012 Nov 20. doi:10.1128/mBio.00224-11
111. Lam MMC, Wick RR, Wyres KL et al. Frequent emergence of pathogenic lineages of *Klebsiella pneumoniae* via mobilisation of yersiniabactin and colibactin. *bioRxiv*. 2017 p.098178. doi:10.1101/098178
112. Kawai T. Hypermucoviscosity: an extremely sticky phenotype of Klebsiella pneumoniae associated with emerging destructive tissue abscess syndrome. *Clin Infect Dis*. 2006;42(10):1359-1361. doi:10.1086/503429
113. Chen L et al. 2017. Notes from the Field: Pan-Resistant New Delhi Metallo-Beta- Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae — Washoe County, Nevada, 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 66(1), pp.33–33.
114. Elemam A, Rahimian J, Mandell W. Infection with panresistant Klebsiella pneumoniae: a report of 2 cases and a brief review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2009;49(2):271-274. doi:10.1086/600042
115. Sanchez GV, Master RN, Clark RB, et al. Klebsiella pneumoniae antimicrobial drug resistance, United States, 1998-2010. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(1):133-136. doi:10.3201/eid1901.120310
116. Decker BK, Lau AF, Dekker JP, et al. Healthcare personnel intestinal colonization with multidrug-resistant organisms. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(1):82.e1-82.e4. doi:10.1016/j.cmi.2017.05.010
117. Davis TJ, Matsen JM. Prevalence and characteristics of Klebsiella species: relation to association with a hospital environment. *J Infect Dis*. 1974;130(4):402-405. doi:10.1093/infdis/130.4.402
118. Aumeran C, Poincloux L, Souweine B, et al. Multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae outbreak after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Endoscopy*. 2010;42(11):895-899. doi:10.1055/s-0030-1255647

119. Heinz E, Ejaz H, Bartholdson Scott J, et al. Resistance mechanisms and population structure of highly drug resistant Klebsiella in Pakistan during the introduction of the carbapenemase NDM-1. *Sci Rep*. 2019;9(1):2392. Published 2019 Feb 20. doi:10.1038/s41598-019-38943-7
120. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing Klebsiella pneumoniae in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):818-820. doi:10.1128/AAC.00987-08
121. Baraniak A, Grabowska A, Izdebski R, et al. Molecular characteristics of KPC-producing Enterobacteriaceae at the early stage of their dissemination in Poland, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(12):5493-5499. doi:10.1128/AAC.05118-11
122. Farida H, Severin JA, Gasem MH, et al. Nasopharyngeal carriage of Klebsiella pneumoniae and other Gram-negative bacilli in pneumonia-prone age groups in Semarang, Indonesia. *J Clin Microbiol*. 2013;51(5):1614-1616. doi:10.1128/JCM.00589-13
123. Conlan S, Kong HH, Segre JA. Species-level analysis of DNA sequence data from the NIH Human Microbiome Project. *PLoS One*. 2012;7(10):e47075. doi:10.1371/journal.pone.0047075
124. Wolf B, Rey LC, Moreira LB, et al. Carriage of gram-negative bacilli in young Brazilian children with community-acquired pneumonia. *Int J Infect Dis*. 2001;5(3):155-159. doi:10.1016/s1201-9712(01)90091-8
125. Dao TT, Liebenthal D, Tran TK, et al. Klebsiella pneumoniae oropharyngeal carriage in rural and urban Vietnam and the effect of alcohol consumption. *PLoS One*. 2014;9(3):e91999. Published 2014 Mar 25. doi:10.1371/journal.pone.0091999
126. Fouts DE, Tyler HL, DeBoy RT, et al. Complete genome sequence of the N2-fixing broad host range endophyte Klebsiella pneumoniae 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genet*. 2008;4(7):e1000141. Published 2008 Jul 25. doi:10.1371/journal.pgen.1000141
127. Wu KM, Li LH, Yan JJ, et al. Genome sequencing and comparative analysis of Klebsiella pneumoniae NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J Bacteriol*. 2009;191(14):4492-4501. doi:10.1128/JB.00315-09
128. Medini D, Donati C, Tettelin H, Massignani V, Rappuoli R. The microbial pan-genome. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(6):589-594. doi:10.1016/j.gde.2005.09.006
129. Martin RM, Cao J, Wu W, et al. Identification of Pathogenicity-Associated Loci in Klebsiella pneumoniae from Hospitalized Patients. *mSystems*. 2018;3(3):e00015-18. Published 2018 Jun 26. doi:10.1128/mSystems.00015-18
130. Paczosa MK, Meccas J. Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):629-661. Published 2016 Jun 15. doi:10.1128/MMBR.00078-15
131. El Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of Klebsiella pneumoniae strains isolated from different clinical specimens. *Pathol Biol (Paris)*. 2013;61(5):209-216. doi:10.1016/j.patbio.2012.10.004
132. Walker KA, Miner TA, Palacios M, et al. A Klebsiella pneumoniae Regulatory Mutant Has Reduced Capsule Expression but Retains Hypermucoviscosity. *mBio*. 2019;10(2):e00089-19. Published 2019 Mar 26. doi:10.1128/mBio.00089-19
133. Lam MMC, Wyres KL, Duchêne S, et al. Population genomics of hypervirulent Klebsiella pneumoniae clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. *Nat Commun*. 2018;9(1):2703. Published 2018 Jul 13. doi:10.1038/s41467-018-05114-7
134. Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent Klebsiella pneumoniae - clinical and molecular perspectives. *J Intern Med*. 2020;287(3):283-300. doi:10.1111/joim.13007
135. Chmielewska SJ, Fiedoruk K, Daniluk T, Ściepek M, Kaczmarzyk D, Leszczyńska K. Znaczenie uropatogennych szczepów Escherichia coli (UPEC) w etiopatogenezie zakażeń układu moczowego. *Post Mikrobiol*. 2016;55(1):45-56.
136. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a conserved chromosomal region encoding Klebsiella pneumoniae type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infect Immun*. 2009;77(11):5016-5024. doi:10.1128/IAI.00585-09
137. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Characterization of Klebsiella pneumoniae type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect Immun*. 2008;76(9):4055-4065. doi:10.1128/IAI.00494-08
138. Gato E, Vázquez-Ucha JC, Rumbo-Feal S, et al. Kpi, a chaperone-usher pili system associated with the worldwide-disseminated high-risk clone Klebsiella pneumoniae ST-15. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(29):17249-17259. doi:10.1073/pnas.1921393117
139. Klemm P. Two regulatory fim genes, fimB and fimE, control the phase variation of type 1 fimbriae in Escherichia coli. *EMBO J*. 1986;5(6):1389-1393.
140. Rosen DA, Pinkner JS, Walker JN, Elam JS, Jones JM, Hultgren SJ. Molecular variations in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. *Infect Immun*. 2008;76(7):3346-3356. doi:10.1128/IAI.00340-08

141. Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol.* 2010;10:179. Published 2010 Jun 23. doi:10.1186/1471-2180-10-179
142. Ramirez P, Bassi GL, Torres A. Measures to prevent nosocomial infections during mechanical ventilation. *Curr Opin Crit Care.* 2012;18(1):86-92. doi:10.1097/MCC.0b013e32834ef3ff
143. Sebghati TA, Korhonen TK, Hornick DB, Clegg S. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infect Immun.* 1998;66(6):2887-2894. doi:10.1128/IAI.66.6.2887-2894.1998
144. Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z, et al. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence.* 2013;4(2):129-138. doi:10.4161/viru.22974
145. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-193. doi:10.1128/cmr.15.2.167-193.2002
146. Holden VI, Bachman MA. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics.* 2015;7(6):986-995. doi:10.1039/c4mt00333k
147. van Swelm RPL, Wetzels JFM, Swinkels DW. The multifaceted role of iron in renal health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16(2):77-98. doi:10.1038/s41581-019-0197-5
148. Chen T, Dong G, Zhang S, et al. Effects of iron on the growth, biofilm formation and virulence of *Klebsiella pneumoniae* causing liver abscess. *BMC Microbiol.* 2020;20(1):36. Published 2020 Feb 18. doi:10.1186/s12866-020-01727-5
149. Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microb Genom.* 2018;4(9):e000196. doi:10.1099/mgen.0.000196
150. Wyres KL, Wick RR, Judd LM, et al. Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Genet.* 2019;15(4):e1008114. Published 2019 Apr 15. doi:10.1371/journal.pgen.1008114
151. Lam MMC, Wyres KL, Judd LM, et al. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Genome Med.* 2018;10(1):77. Published 2018 Oct 29. doi:10.1186/s13073-018-0587-5
152. Chen YT, Chang HY, Lai YC, Pan CC, Tsai SF, Peng HL. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene.* 2004;337:189-198. doi:10.1016/j.gene.2004.05.008
153. Follador R, Heinz E, Wyres KL, et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb Genom.* 2016;2(8):e000073. Published 2016 Aug 25. doi:10.1099/mgen.0.000073
154. Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, et al. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microb Genom.* 2016;2(12):e000102. Published 2016 Dec 12. doi:10.1099/mgen.0.000102
155. Merino S, Altarriba M, Izquierdo L, Nogueras MM, Regué M, Tomás JM. Cloning and sequencing of the *Klebsiella pneumoniae* O5 wb gene cluster and its role in pathogenesis. *Infect Immun.* 2000;68(5):2435-2440. doi:10.1128/iai.68.5.2435-2440.2000
156. Clarke BR, Ovchinnikova OG, Kelly SD, et al. Molecular basis for the structural diversity in serogroup O2-antigen polysaccharides in *Klebsiella pneumoniae*. *J Biol Chem.* 2018;293(13):4666-4679. doi:10.1074/jbc.RA117.000646
157. Wick RR, Heinz E, Holt KE, Wyres KL. Kaptive Web: User-Friendly Capsule and Lipopolysaccharide Serotype Prediction for *Klebsiella* Genomes. *J Clin Microbiol.* 2018;56(6):e00197-18. Published 2018 May 25. doi:10.1128/JCM.00197-18
158. Pan YJ, Lin TL, Chen CT, et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci Rep.* 2015;5:15573. Published 2015 Oct 23. doi:10.1038/srep15573
159. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(3):e00001-19. Published 2019 May 15. doi:10.1128/CMR.00001-19
160. Lee IR, Molton JS, Wyres KL, et al. Differential host susceptibility and bacterial virulence factors driving *Klebsiella* liver abscess in an ethnically diverse population. *Sci Rep.* 2016;6:29316. Published 2016 Jul 13. doi:10.1038/srep29316
161. Wyres KL, Gorrie C, Edwards DJ, et al. Extensive Capsule Locus Variation and Large-Scale Genomic Recombination within the *Klebsiella pneumoniae* Clonal Group 258. *Genome Biol Evol.* 2015;7(5):1267-1279. Published 2015 Apr 10. doi:10.1093/gbe/evv062
162. Wysocka M, Zamudio R, Oggioni MR, Gołębowska J, Dudziak A, Krawczyk B. The new *Klebsiella pneumoniae* ST152 variants with hypermucoviscous phenotype isolated from renal transplant recipients with asymptomatic bacteriuria – genetic characteristics by WGS. *Genes* 2020;11(10):1189.
163. Kocsis B, Szabó D. Antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. In: Mendez-Vilas, A., ed., *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education, Spain: Formatex Research Center*, 2013:251–257.
164. Kraśnicki K, Wolski Z, Mikucka A, Gospodarek E. Wrażliwość pałeczek Gram-ujemnych na leki przeciwbakteryjne w oddziałach urologii. *Przeł. Urol.* 2007;3:43.

165. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
166. Giani T, Conte V, Mandalà S, et al. Cross-infection of solid organ transplant recipients by a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate producing the OXA-48 carbapenemase, likely derived from a multiorgan donor. *J Clin Microbiol.* 2014;52(7):2702-2705. doi:10.1128/JCM.00511-14
167. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(1):42-51. doi:10.1038/nrmicro3380
168. Roy Chowdhury P, Ingold A, Vanegas N, et al. Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3140-3149. doi:10.1128/AAC.01529-10
169. Tsafnat G, Copt J, Partridge SR. RAC: Repository of Antibiotic resistance Cassettes. *Database (Oxford).* 2011;2011:bar054. Published 2011 Dec 2. doi:10.1093/database/bar054
170. Conlan S, Park M, Deming C, et al. Plasmid Dynamics in KPC-Positive *Klebsiella pneumoniae* during Long-Term Patient Colonization. *mBio.* 2016;7(3):e00742-16. Published 2016 Jun 28. doi:10.1128/mBio.00742-16
171. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs.* 2004;64(2):159-204. doi:10.2165/00003495-200464020-00004
172. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. *Trends Microbiol.* 2016;24(12):944-956. doi:10.1016/j.tim.2016.09.007
173. Nikonorow E, Baraniak A, Gniadkowski M. Oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na antybiotyki β -laktamowe wynikająca z wytwarzania β -laktamaz. *Post Mikrobiol.* 2013;52(3):261-271.
174. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 1983;11(6):315-317. doi:10.1007/BF01641355
175. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289(1036):321-331. doi:10.1098/rstb.1980.0049
176. Baraniak A, Izdebski R, Herda M, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(10):4565-4567. doi:10.1128/AAC.00436-09
177. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(1):147-151. doi:10.1128/aac.35.1.147
178. Sękowska A, Gospodarek E, Kruszyńska E et al. Izolacja pierwszego w Polsce szczepu *Klebsiella pneumoniae* wytwarzającego metalo- β -laktamazy. *Anestezjologia Intensywna Terapia* 2010;XLII(1):27-30.
179. Yong D, Giske CG, Toleman M et al. A novel subgroup metallo-beta-lactamase (MBL), NDM-1 emerges in *Klebsiella pneumoniae* (KPN) from India. 48th Annual ICAAC/IDSA 46th Annual Meeting, Washington DC 2008:C1-105.
180. Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, Santos O'Connor F, Giesecke J; European NDM-1 Survey Participants. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe. *Euro Surveill.* 2010;15(46):19716. Published 2010 Nov 18. doi:10.2807/ese.15.46.19716-en
181. Bogaerts P, Rezende de Castro R, Roisin S, et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(6):1552-1553. doi:10.1093/jac/dks041
182. Deshpande P, Rodrigues C, Shetty A, Kapadia F, Hedge A, Soman R. New Delhi Metallo-beta lactamase (NDM-1) in *Enterobacteriaceae*: treatment options with carbapenems compromised. *J Assoc Physicians India.* 2010;58:147-149.
183. Heinz E, Ejaz H, Bartholdson Scott J, et al. Resistance mechanisms and population structure of highly drug resistant *Klebsiella* in Pakistan during the introduction of the carbapenemase NDM-1. *Sci Rep.* 2019;9(1):2392. Published 2019 Feb 20. doi:10.1038/s41598-019-38943-7
184. Fiett J, Baraniak A, Izdebski R, et al. The first NDM metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolate in Poland: evolution of IncFII-type plasmids carrying the bla(NDM-1) gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):1203-1207. doi:10.1128/AAC.01197-13
185. Żabicka D, Literacka E, Gniadkowski M, Hryniewicz W. Raport Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów. Występowanie *Enterobacteriaceae* (głównie *Klebsiella pneumoniae*), wytwarzających karbapenemazę New Delhi (NDM) na terenie Polski w okresie I–III kwartał 2017 roku. KORLD (on-line) 2017; http://www.korld.edu.pl/pdf/Raport_NDM_18-12-2017_strona.pdf
186. Izdebski R, Sitkiewicz M, Urbanowicz P, Krawczyk M, Brisse S, Gniadkowski M. Genomic background of the *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 outbreak in Poland, 2012-18. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(11):3156-3162. doi:10.1093/jac/dkaa339
187. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791-1798. doi:10.3201/eid1710.110655
188. Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, de Kraker ME, et al. Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing *Enterobacteriaceae* in the Netherlands, 2009 to 2011. *Euro Surveill.* 2014;19(9):20723. Published 2014 Mar 6. doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.9.20723

189. Robert J, Pantel A, Mérens A et al. Incidence rates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011-12. *J Antimicrob Chemother* 2014;69(10):2706-2712.
190. Izdebski R, Baraniak A, Zabicka D, et al. Enterobacteriaceae producing OXA-48-like carbapenemases in Poland, 2013-January 2017. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(3):620-625. doi:10.1093/jac/dkx457
191. Stoesser N, Batty EM, Eyre DW, et al. Predicting antimicrobial susceptibilities for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates using whole genomic sequence data. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(10):2234-2244. doi:10.1093/jac/dkt180
192. Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol*. 2011;49(2):718-721. doi:10.1128/JCM.01773-10
193. Regué M, Hita B, Piqué N, et al. A gene, *uge*, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infect Immun*. 2004;72(1):54-61. doi:10.1128/iai.72.1.54-61.2004
194. Schubert S, Cuenca S, Fischer D, Heesemann J. High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in enterobacteriaceae isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. *J Infect Dis*. 2000;182(4):1268-1271. doi:10.1086/315831
195. Sahly H, Navon-Venezia S, Roesler L, et al. Extended-spectrum beta-lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(9):3029-3034. doi:10.1128/AAC.00010-08
196. Mamlouk K, Boutiba-Ben Boubaker I, Gautier V, et al. Emergence and outbreaks of CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in a Tunisian hospital. *J Clin Microbiol*. 2006;44(11):4049-4056. doi:10.1128/JCM.01076-06
197. Cortés G, Borrell N, de Astorza B, Gómez C, Sauleda J, Albertí S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect Immun*. 2002;70(5):2583-2590. doi:10.1128/iai.70.5.2583-2590.2002
198. Krawczyk B, Samet A, Leibner J, Śledzińska A, Kur J. Evaluation of a PCR Melting Profile Technique for Bacterial Strain Differentiation. *J of Clinical Microbiology*. 2006;44(7):2327-2332.
199. Searle LJ, Méric G, Porcelli I, Sheppard SK, Lucchini S. Variation in siderophore biosynthetic gene distribution and production across environmental and faecal populations of *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2015;10(3):e0117906. doi:10.1371/journal.pone.0117906
200. Andersson P, Tong SY, Bell JM, Turnidge JD, Giffard PM. Minim typing--a rapid and low cost MLST based typing tool for *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One*. 2012;7(3):e33530. doi:10.1371/journal.pone.0033530
201. EUCAST by the ESCMID, March 2003 E. Dis 5.1
202. Romanowski T, Markiewicz A, Bednarz N, Bielawski KP. Geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne w ilościowym oznaczaniu ekspresji genów metoda real-time PCR [Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2007;61:500-510. Published 2007 Sep 28.
203. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
204. Nurk S, Bankevich A, Antipov D, et al. Assembling genomes and mini-metagenomes from highly chimeric reads. In: Deng M, Jiang R, Sun F, Zhang X, Eds.; Research in Computational Molecular Biology. RECOMB 2013. Lecture Notes in Computer Science; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013; Volume 7821, pp. 158-170.
205. Mikheenko A, Prjibelski A, Saveliev V, Antipov D, Gurevich A. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics*. 2018;34(13):i142-i150. doi:10.1093/bioinformatics/bty266
206. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068-2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153
207. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*. 2015;31(22):3691-3693. doi:10.1093/bioinformatics/btv421
208. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(5):1792-1797. Published 2004 Mar 19. doi:10.1093/nar/gkh340
209. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014;30(9):1312-1313. doi:10.1093/bioinformatics/btu033
210. Yu G, Smith DK, Zhu H, Guan Y, Lam T. ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods Ecol Evol*. 2017;8(1):28-36.
211. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(11):2640-2644. doi:10.1093/jac/dks261
212. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1501-1510. doi:10.1128/JCM.03617-13
213. Farzand R, Rajakumar K, Zamudio R, Oggioni MR, Barer MR, O'Hare HM. ICEKp2: description of an integrative and conjugative element in *Klebsiella pneumoniae*, co-occurring and interacting with ICEKp1. *Sci Rep*. 2019;9(1):13892. Published 2019 Sep 25. doi:10.1038/s41598-019-50456-x

214. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3895-3903. doi:10.1128/AAC.02412-14
215. Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
216. Espinar MJ, Miranda IM, Costa-de-Oliveira S, Rocha R, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. Urinary Tract Infections in Kidney Transplant Patients Due to *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*-Producing Extended-Spectrum β -Lactamases: Risk Factors and Molecular Epidemiology. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134737. Published 2015 Aug 3. doi:10.1371/journal.pone.0134737
217. Pilmis B, Scemla A, Join-Lambert O, et al. ESBL-producing enterobacteriaceae-related urinary tract infections in kidney transplant recipients: incidence and risk factors for recurrence. *Infect Dis (Lond).* 2015;47(10):714-718. doi:10.3109/23744235.2015.1051107
218. Zhang XS, García-Contreras R, Wood TK. YcfR (BhsA) influences *Escherichia coli* biofilm formation through stress response and surface hydrophobicity. *J Bacteriol.* 2007;189(8):3051-3062. doi:10.1128/JB.01832-06
219. Krawczyk B, Śledzińska A, Szemiako K, Samet A, Nowicki B, Kur J. Characterisation of *Escherichia coli* isolates from the blood of haematological adult patients with bacteraemia: translocation from gut to blood requires the cooperation of multiple virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(6):1135-1143. doi:10.1007/s10096-015-2331-z
220. Calhau V, Boaventura L, Ribeiro G, Mendonça N, da Silva GJ. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolated from renal transplanted patients: virulence markers, extended-spectrum β -lactamases, and genetic relatedness. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;79(3):393-395. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.031
221. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:4. Published 2018 Jan 22. doi:10.3389/fcimb.2018.00004
222. Chan W, G Ward D, McClean A, et al. The role of hepcidin-25 in kidney transplantation. *Transplantation.* 2013;95(11):1390-1395. doi:10.1097/TP.0b013e31828d8489
223. Zumbrennen-Bullough K, Babitt JL. The iron cycle in chronic kidney disease (CKD): from genetics and experimental models to CKD patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(2):263-273. doi:10.1093/ndt/gft443
224. Singh V, Yeoh BS, Xiao X, et al. Interplay between enterobactin, myeloperoxidase and lipocalin 2 regulates *E. coli* survival in the inflamed gut. *Nat Commun.* 2015;6:7113. Published 2015 May 12. doi:10.1038/ncomms8113
225. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell.* 2002;10(5):1033-1043. doi:10.1016/s1097-2765(02)00708-6
226. Bachman MA, Lenio S, Schmidt L, Oyler JE, Weiser JN. Interaction of lipocalin 2, transferrin, and siderophores determines the replicative niche of *Klebsiella pneumoniae* during pneumonia. *mBio.* 2012;3(6):e00224-11. Published 2012 Nov 20. doi:10.1128/mBio.00224-11
227. Lawlor MS, O'connor C, Miller VL. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infect Immun.* 2007;75(3):1463-1472. doi:10.1128/IAI.00372-06
228. Bodro M, Sanclemente G, Lipperheide I, et al. Impact of antibiotic resistance on the development of recurrent and relapsing symptomatic urinary tract infection in kidney recipients. *Am J Transplant.* 2015;15(4):1021-1027. doi:10.1111/ajt.13075
229. Surleac M, Czobor Barbu I, Paraschiv S, et al. Whole genome sequencing snapshot of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals and receiving wastewater treatment plants in Southern Romania. *PLoS One.* 2020;15(1):e0228079. Published 2020 Jan 30. doi:10.1371/journal.pone.0228079
230. Wyres KL, Hawkey J, Hetland MAK, et al. Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(3):577-581. doi:10.1093/jac/dky492
231. David S, Reuter S, Harris SR, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol.* 2019;4(11):1919-1929. doi:10.1038/s41564-019-0492-8
232. Heinz E, Brindle R, Morgan-McCalla A, Peters K, Thomson NR. Caribbean multi-centre study of *Klebsiella pneumoniae*: whole-genome sequencing, antimicrobial resistance and virulence factors. *Microb Genom.* 2019;5(5):e000266. doi:10.1099/mgen.0.000266
233. Gangoue-Pieboji J, Miriagou V, Vourli S, Tzelepi E, Ngassam P, Tzouveleki LS. Emergence of CTX-M-15-producing enterobacteria in Cameroon and characterization of a blaCTX-M-15-carrying element. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):441-443. doi:10.1128/AAC.49.1.441-443.2005
234. Zhang Y, Zhao C, Wang Q, et al. High Prevalence of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Infection in China: Geographic Distribution, Clinical Characteristics, and Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(10):6115-6120. Published 2016 Sep 23. doi:10.1128/AAC.01127-16

235. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol.* 2016;7:895. Published 2016 Jun 13. doi:10.3389/fmicb.2016.00895
236. Liu Z, Gu Y, Li X, et al. Identification and Characterization of NDM-1-producing Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* in China. *Ann Lab Med.* 2019;39(2):167-175. doi:10.3343/alm.2019.39.2.167
237. Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence.* 2013;4(2):107-118. doi:10.4161/viru.22718
238. Wyres KL, Nguyen TNT, Lam MMC, et al. Genomic surveillance for hypervirulence and multi-drug resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* from South and Southeast Asia. *Genome Med.* 2020;12(1):11. Published 2020 Jan 16. doi:10.1186/s13073-019-0706-y
239. Russo TA, Olson R, Macdonald U, et al. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 2014;82(6):2356-2367. doi:10.1128/IAI.01667-13
240. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev.* 2019;43(2):123-144. doi:10.1093/femsre/fuy043
241. Liu C, Guo J. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2019;18(1):4. Published 2019 Jan 21. doi:10.1186/s12941-018-0302-9
242. Chen YT, Chang HY, Lai YC, Pan CC, Tsai SF, Peng HL. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene.* 2004;337:189-198. doi:10.1016/j.gene.2004.05.008
243. Harada S, Aoki K, Ishii Y, et al. Emergence of IMP-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* carrying a pLVPK-like virulence plasmid. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;53(6):873-875. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.05.007
244. Surgers L, Boyd A, Girard PM, Arlet G, Decré D. ESBL-Producing Strain of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K2, France. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(9):1687-1688. doi:10.3201/eid2209.160681
245. Founou RC, Founou LL, Allam M, Ismail A, Essack SY. Whole Genome Sequencing of Extended Spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Hospitalized Patients in KwaZulu-Natal, South Africa. *Sci Rep.* 2019;9(1):6266. Published 2019 Apr 18. doi:10.1038/s41598-019-42672-2
246. Żabicka D, Baraniak A, Literacka E, Gniadkowski M, Hryniewicz W. Wykrywanie karbapenemaz – zalecenia 2017. KORLD (on-line) 2017; http://www.korld.edu.pl/pdf/Wykrywanie_karbapenemaz-zalecenia_2017_strona.pdf
247. Dulny G, Marchel H, Wróblewska M. Występowanie szczepów pałeczek *Enterobacteriaceae* wytwarzających karbapenemazy w Szpitalu Uniwersyteckim. *Forum Zakażeń* 2016;7(3):127–133.
248. Gaynes R, Edwards JR; National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 2005;41(6):848-854. doi:10.1086/432803
249. Lübbert C, Lippmann N, Busch T, et al. Long-term carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing K pneumoniae after a large single-center outbreak in Germany. *Am J Infect Control.* 2014;42(4):376-380. doi:10.1016/j.ajic.2013.12.001
250. Morrill HJ, Pogue JM, Kaye KS, LaPlante KL. Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. *Open Forum Infect Dis.* 2015;2(2):ofv050. Published 2015 May 5. doi:10.1093/ofid/ofv050
251. Mączyńska B, Lichacz P, Oleksy M, Junka A. Analiza pokrewieństwa i lekooporności szczepów *Klebsiella* produkujących karbapenemazy NDM-1, izolowanych w szpitalach Dolnego Śląska. *Forum Zakażeń* 2018;9(5):257-271.
252. Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, et al. NDM-producing *Enterobacteriaceae* in Poland, 2012-14: inter-regional outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 and sporadic cases. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(1):85-91. doi:10.1093/jac/dkv282
253. Baraniak A, Machulska M, Żabicka D, et al. Towards endemicity: large-scale expansion of the NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 lineage in Poland, 2015-16. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(11):3199-3204. doi:10.1093/jac/dkz315
254. Politi L, Gartzonika K, Spanakis N, et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece: evidence of a widespread clonal outbreak. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(8):2197-2202. doi:10.1093/jac/dkz176
255. Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):820-855. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x
256. Liu P, Li P, Jiang X, et al. Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286, a multidrug-resistant strain isolated from human sputum. *J Bacteriol.* 2012;194(7):1841-1842. doi:10.1128/JB.00043-12

257. Cheng HY, Chen YS, Wu CY, Chang HY, Lai YC, Peng HL. RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Bacteriol.* 2010;192(12):3144-3158. doi:10.1128/JB.00031-10
258. Liu M, Li X, Xie Y, et al. ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D660-D665. doi:10.1093/nar/gky1123
259. Rendueles O, de Sousa JAM, Bernheim A, Touchon M, Rocha EPC. Genetic exchanges are more frequent in bacteria encoding capsules. *PLoS Genet.* 2018;14(12):e1007862. Published 2018 Dec 21. doi:10.1371/journal.pgen.1007862
260. Carpenter MR, Rozovsky S, Boyd EF. Pathogenicity Island Cross Talk Mediated by Recombination Directionality Factors Facilitates Excision from the Chromosome. *J Bacteriol.* 2015;198(5):766-776. Published 2015 Dec 14. doi:10.1128/JB.00704-15
261. Hultgren SJ, Schwan WR, Schaeffer AJ, Duncan JL. Regulation of production of type 1 pili among urinary tract isolates of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1986;54(3):613-620. doi:10.1128/IAI.54.3.613-620.1986
262. Young TM, Bray AS, Nagpal RK, Caudell DL, Yadav H, Zafar MA. Animal Model To Study *Klebsiella pneumoniae* Gastrointestinal Colonization and Host-to-Host Transmission. *Infect Immun.* 2020;88(11):e00071-20. Published 2020 Oct 19. doi:10.1128/IAI.00071-20
263. Sahly H, Podschun R, Oelschlaeger TA, et al. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 2000;68(12):6744-6749. doi:10.1128/iai.68.12.6744-6749.2000
264. Struve C, Krogfelt KA. Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;218(1):149-154. doi:10.1111/j.1574-6968.2003.tb11511.x
265. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ.* 2005;331(7520):810. doi:10.1136/bmj.38569.471007.AE
266. Gupta AK, Adamiak A, Chow M. Tacrolimus: a review of its use for the management of dermatoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2002;16(2):100-114. doi:10.1046/j.1468-3083.2002.00380.x
267. Narbutt J, Pełka M, Zalewska A, Sysa-Jędrzejowska A. The usefulness of tacrolimus in the topical treatment of autoimmune bullous diseases. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii.* 2005;22(3):129-132.
268. Kang ES, Magkos F, Kim BS, et al. Variants of the adiponectin and adiponectin receptor-1 genes and posttransplantation diabetes mellitus in renal allograft recipients [published correction appears in *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Mar;98(3):1294]. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(1):E129-E135. doi:10.1210/jc.2011-1796
269. Murphy CN, Mortensen MS, Krogfelt KA, Clegg S. Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. *Infect Immun.* 2013;81(8):3009-3017. doi:10.1128/IAI.00348-13
270. Fischbach MA, Lin H, Zhou L, et al. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(44):16502-16507. doi:10.1073/pnas.0604636103

10. Wykaz Rysunków

- Rysunek 1. Przeszczepianie narządów w Polsce w latach 1966-2019. Opracowanie własne na podstawie [5]. *łącznie przeszczepienia: nerki - trzustki, trzustki i wysp trzustkowych..... 10
- Rysunek 2. Odsetek ZUM i nawracających ZUM w badaniach przeszczepu nerki. A) Badanie dotyczące wyłącznie nawracających ZUM. B) Nawracające ZUM zdefiniowano jako mające co najmniej jeden epizod ZUM. C) Dane dla nawracających ZUM dotyczą pacjentów z > 3 ZUM w okresie badania, który mógł wynosić > 1 rok. D) Odsetek pacjentów, u których rozwinęło się ZUM, które następnie rozwinęło nawracające ZUM. E) Nawracające infekcje zdefiniowano jako ZUM z dwoma lub więcej epizodami w okresie obserwacji trwającym 12 miesięcy. F) Badanie koncentrowało się wyłącznie na AGPN. G) Nie zdefiniowano kryteriów dla nawracającego ZUM. Opracowanie własne na podstawie [17-59]..... 14
- Rysunek 3. Pozycja taksonomiczna *Klebsiella pneumoniae*. Drzewo oparte na całym genomie, wykazujące filogenetyczne relacje między *K. pneumoniae*, jego bliskimi krewnymi w kompleksie gatunków *K. pneumoniae* (czerwone gałęzie), innymi wybranymi członkami rodzaju *Klebsiella* (szare gałęzie) i wybranymi członkami rodziny Enterobacteriaceae (czarne gałęzie). Drzewo wyprowadzono z porównania profili k-mer obejmujących sekwencje całych genomów przy użyciu mashtree. Pasek skali to szacowana średnia dywergencja nukleotydów. Opracowanie własne na podstawie sekwencji genomów zgromadzonych w materiałach dodatkowych przez Wyres i wsp. [106].... 21
- Rysunek 4. Czynniki wirulencji szczepów *Klebsiella pneumoniae*. Istnieją cztery dobrze scharakteryzowane grupy czynników wirulencji patogennych szczepów *K. pneumoniae*: otoczki, lipopolisacharyd (LPS), fimbrie (typu 1 i typu 3) i siderofory. Otoczka jest pozakomórkowym polisacharydem, który otacza komórkę bakterii. Klasyczne szczepy *K. pneumoniae* wytwarzają otoczkę, jednego z serotypów od K1 do K79; serotypy K1 i K2 związane są ze zwiększoną patogennością. LPS to integralna część błony zewnętrznej komórki, która jest wytwarzana zarówno przez klasyczne szczepy *K. pneumoniae*, jak i hiperwirulentne, i może należeć do jednego z serotypów O-antygeny oznaczonego od 1 do 9. Szczepy *K. pneumoniae* tworzą związane z błoną struktury adhezyjne, fimbrie typu 1 i typu 3 oraz wydzielają siderofory wychwytyjące żelazo. Spośród sideroforów, enterobaktyna jest wytwarzana przez prawie wszystkie szczepy, a yersiniabaktyna jest wytwarzana przez około połowę klasycznych i prawie wszystkie szczepy hiperwirulentne. Salmochelina i aerobaktyna rzadko są wytwarzane przez klasyczne szczepy, zazwyczaj są wydzielane przez szczepy HV, przy czym poziom ekspresji aerobaktyny jest najsilniejszy spośród sideroforów. Opracowanie własne na podstawie [130]..... 25
- Rysunek 5. Organizacja genetyczna klastra genów fimbrii typu 1 (fim). Na podstawie [137]..... 26
- Rysunek 6. Grupy badawcze obejmujące chorych Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. RTx – pacjenci po przeszczepieniu nerki; Tac - tacrolimus; MMF - mykofenolan mofetylu; MPS - mykofenolan sodu; CsA - cyklosporyna; ZUM - zakażenie układu moczowego..... 36
- Rysunek 7. Eksperymentalny przepływ pracy w badaniu ekspresji genów fimbrii typu 1 w różnych warunkach wzrostu *K. pneumoniae*..... 55
- Rysunek 8. Charakterystyka przełącznika fazowego fimbrii typu 1 *K. pneumoniae*. (A) Schematyczne przedstawienie regionu przełącznika faz, w tym odwracalnego elementu DNA zawierającego promotor (P) głównego genu kodującego podjednostkę fimbrialną, fimA. Orientację zmiany fazy określono przez amplifikację PCR regionu przełącznika, a następnie trawienie produktu PCR za pomocą Hinfl. (B) Teoretycznie oczekiwane wyniki po amplifikacji PCR regionu przełącznika. Ze względu na asymetryczną lokalizację miejsca cięcia Hinfl w odwracalnym elemencie, różne fragmenty są uzyskiwane w zależności od orientacji przełącznika. W oparciu o [137]..... 57
- Rysunek 9. Ogólny schemat doświadczenia. Opracowanie własne..... 67
- Rysunek 10. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji multiplex PCR dla genów *kpn*, *mrkD* i *yefM* dla reprezentatywnych izolatów. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz); K+ - kontrola pozytywna; ścieżki opisane są numerami izolatów: 7-10 - produkty PCR o wielkości 626 pz, 240 pz, 160 pz charakterystyczne dla genów *kpn*, *mrkD* i *yefM* dla izolatów o numerach 7-10, K- - kontrola negatywna..... 71
- Rysunek 11. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji multiplex PCR uzyskanych dla genów *fimH-1*, *uge* i *irp-2* dla reprezentatywnych izolatów. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz); K+ - kontrola pozytywna; ścieżki opisane są numerami izolatów: 45 - produkty PCR o wielkości 688 pz, 287 pz charakterystyczne dla genów *fimH-1* i *irp-2*; 46, 49 - produkty PCR o wielkości 688 pz, 534 pz, 287 pz charakterystyczne dla genów *fimH-1*, *uge* i *irp-2*; K- - kontrola negatywna. 71
- Rysunek 12. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji Simplex PCR uzyskanych dla genu *entB* dla reprezentatywnych izolatów. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500 pz); K+ - kontrola pozytywna; ścieżki opisane są numerami izolatów: 1, 2 - produkt PCR o wielkości 371 pz charakterystyczny dla genu *entB*; K- - kontrola negatywna..... 72
- Rysunek 13. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji Simplex PCR dla genu *iutA* dla reprezentatywnych izolatów. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500 pz); K+ - kontrola pozytywna; ścieżki opisane są numerami izolatów: 52-55 - produkt PCR o wielkości 300 pz charakterystyczny dla genu *iutA*; K- - kontrola negatywna..... 72
- Rysunek 14. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji Simplex PCR dla genu *irp-1* i *fyuA* dla reprezentatywnego izolatu. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz); K+ - kontrola pozytywna; ścieżki opisane są numerem izolatu: 1 - produkt PCR o wielkości

- 238 pz charakterystyczny dla genu *irp-1* (po lewej stronie markera), produkt PCR o wielkości 547 pz charakterystyczny dla genu *fyuA* (po prawej stronie markera); K- - kontrola negatywna 72
- Rysunek 15. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji Simplex PCR dla genu *iroN* dla reprezentatywnych izolatów. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz); K+ - kontrola pozytywna; ścieżki opisane są numerami izolatów: 1, 2, 4 - produkt PCR o wielkości 665 pz charakterystyczny dla genu *iroN*, K- - kontrola negatywna 73
- Rysunek 16. Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji Simplex PCR dla genu *hlyA*, *cnf-1* i *rmpA* dla reprezentatywnych izolatów. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz); K+ - kontrola pozytywna; ścieżki opisane są numerami izolatów: 48B - produkt PCR o wielkości 1177 pz charakterystyczny dla genu *hlyA*, 10B - produkt PCR o wielkości 535 pz charakterystyczny dla genu *rmpA*, produkt PCR o wielkości 498 pz charakterystyczny dla genu *cnf-1*; K- - kontrola negatywna..... 73
- Rysunek 17. Współwystępowanie genów kodujących badane czynniki wirulencji wśród *K. pneumoniae* w grupie badanej (A) i kontrolnej (B) na podstawie analizy skupień (MVSP wersja 3.22.) 74
- Rysunek 18. Optymalizacja temperatury denaturacji w cyklach reakcji PCR w typowaniu genetycznym techniką PCR MP przeprowadzona dla szczepu nr 8B. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w 6% żelu poliakrylamidowym wobec buforu 1xTBE. Ścieżki: M – wzorzec masy molekularnej DNA 100-1000 pz; 1-11 – gradient temperatury denaturacji 83,1 – 89 °C, patrz: Tabela 18; K- - kontrola negatywna 79
- Rysunek 19. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR MP w żelu poliakrylamidowym. Ścieżki: M - wzorzec masy molekularnej DNA (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz); ścieżki opisane są numerami izolatów 1-61; K- - kontrola negatywna; KPC - szczep odnośnikowy *K. pneumoniae* KPC; ATCC - szczep referencyjny *K. pneumoniae* ATCC 700603..... 81
- Rysunek 20. Porównanie podobieństwa genetycznego 61 szczepów *Klebsiella pneumoniae* izolowanych od pacjentów po przeszczepie nerki z grupy badanej. 1R - szczep referencyjny *K. pneumoniae* ATCC 700603; 2R - szczep odnośnikowy *K. pneumoniae* KPC; P_i – poziom identyczności; C_p – całkowite podobieństwo. Szczepy posiadające ten sam genotyp (G) wyróżniono kolorem: G13 – czerwony, G14 – jasny szary, G15 – ciemny szary, G29 – żółty, G38 – turkusowy, G43 – zielony, G46 – niebieski..... 82
- Rysunek 21. Wyniki testu ciągliwości dla szczepów *K. pneumoniae* zdolnych do tworzenia fenotypu hiperbakteryoidalnego. A) Dla szczepu numer 49B wyizolowanego od pacjenta z grupy badanej, uzyskano kolonie, które rozciągały się na długość 35 mm przy użyciu pętli do inokulacji (czarna strzałka), co wskazuje na pozytywny wynik testu. B) Dla szczepu numer 50B wyizolowanego od pacjenta z grupy badanej, uzyskano kolonie, które rozciągały się na długość 150 mm przy użyciu pętli do inokulacji (czarna strzałka), co wskazuje na pozytywny wynik testu 86
- Rysunek 22. Zależność genów kodujących czynniki wirulencji między hiperbakteryoidalnymi szczepami *K. pneumoniae* o numerze 49B (niebieski) i 50B (czerwony) przedstawiona za pomocą diagramu Venna 88
- Rysunek 23. Drzewo filogenetyczne oparte na połączonych genach rdzeniowych szczepów *K. pneumoniae* ST152. Drzewo genomów rdzeniowych zostało skonstruowane dla trzydziestu dwóch genomów ST152 pobranych z czterech wcześniejszych badań [106,230-232] wraz z dwoma genomami izolatów badanych w rozprawie doktorskiej (szczep numer 49B - SAMN14840029, szczep numer 50B - SAMN14840028; czerwona ramka). Numery klastrow (#1-4.1) oznaczono na drzewie filogenetycznym. Kolor węzła zewnętrznego powiązany z klastrem (cyjan - klastrow nr 1, czerwony - klastrow nr 2, jasnozielony - klastrow nr 3, ciemnozielony - klastrow nr 4, niebieski - klastrow nr 4.1). Kraj pochodzenia izolatów pokazano w kolorze numeru dostępu genomu (czerwony - Polska, niebieski - Nepal, czarny - Australia, różowy - Portugalia, pomarańczowy - Belgia, zielony - Karaiby, cyjan - Indie, magenta - Wielka Brytania (UK), jasnozielony - Stany Zjednoczone Ameryki (USA), Kanada brązowy). W heatmapie pokazano profil obecności / nieobecności genotypu dla genów kodujących determinanty oporności (AMR) (niebieski - obecny, szary - nieobecny) i determinanty wirulencji (czarny - obecny, szary - nieobecny), a także obecność / nieobecność ICEKp (czerwony - obecny, szary - nieobecny), typ otoczki (niebieski - KL14, czerwony - KL46, pomarańczowy - KL102, magenta - KL105, szary - KL107, różowy - KL146, głęboki niebieski - KL149) i typ O (ciemnozielony - O1v1, khaki - O3s, jasnozielony - O3 / O3a, zielony - O4) 89
- Rysunek 24. Ogólny schemat analizy pokrewieństwa i lekooporności szczepów *K. pneumoniae* produkujących karbapenemazy NDM-1. *MBL (ang. Metallo-β-lactamase); **KPC (ang. *K. pneumoniae* carbapenemase); ***WGS (ang. Whole Genome Sequencing) 93
- Rysunek 25. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji genu *bla_{NDM-1}* w żelu agarozowym (1,2%). M – marker wielkości 100-1000 (Blirt S.A. o. DNA Gdańsk); 16K, 32K, 33K, 46B, 4R, 53B – numer badanego szczepu *Klebsiella pneumoniae* 95
- Rysunek 26. Odsetek lekowrażliwości szczepów *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających metalo-β-laktamazę NDM-1, wyizolowanych z materiałów klinicznych. S, wrażliwy (ang. susceptible); R, oporny (ang. resistance); I, średnio wrażliwy (ang. intermediate); ND, brak danych (ang. not determined) 96
- Rysunek 27. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR MP w żelu poliakrylamidowym 6% w buforze 1x TBE. M – marker wielkości DNA: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 pz; 16K, 46B, 3R, 4R, 53B, 32K, 33K, 5R – numer badanego izolatu *Klebsiella pneumoniae* wg kolekcji; K+ - szczepy kontrolne: szczep referencyjny *K. pneumoniae* ATCC 700603 i szczep kliniczny *K. pneumoniae* KPC..... 97
- Rysunek 28. Analiza podobieństwa genetycznego szczepów *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających metalo-β-laktamazę NDM-1 z zastosowaniem metody typowania genetycznego PCR MP. Zastosowano enzym restrykcyjny HindIII oraz T_d 86,9°C. Dendrogram podobieństwa profili genetycznych badanych szczepów opracowano przy użyciu programu FPQuest Software wersja 4.5 (BIO-RAD) (Dice, UPGMA). C_p – całkowite podobieństwo równe 73%; P_i –

poziom identyczności równy 96%. Unikalne genotypy (G) oznaczono literami A-C. Numery izolatów <i>K. pneumoniae</i> wg kolekcji (Tabela 37).....	98
Rysunek 29. Drzewo filogenetyczne rdzenia genomu wygenerowane dla 109 izolatów <i>K. pneumoniae</i> (8 izolatów zsekwencjonowanych w ramach rozprawy (dodatkowo zaznaczone czerwoną ramką) i 101 z publicznej bazy danych Patric). Pochodzenie izolatów wyróżnia kolorystyka czcionek w drzewie (legenda na rysunku). Typ sekwencji (ST) jest wskazany dla każdego izolatu, po nazwie izolatu. Występowanie genu bla _{NDM-1} pokazano na heatmapie po prawej stronie (czarny - obecny, szary - nieobecny). Pasek skali pokazany w lewym dolnym rogu przedstawia średnią liczbę podstawień na miejsce.....	99
Rysunek 30. Drzewo filogenetyczne rdzenia genomu <i>K. pneumoniae</i> skonstruowane przy użyciu genów rdzeniowych genomów, które znalazły się w tym samym kładzie, co genomy zsekwencjonowane w ramach rozprawy. Pochodzenie izolatów wyróżnia kolorystyka czcionek w drzewie: jasno niebieski - Polska, szary – Grecja, różowy – USA, zielony – Indie, pomarańczowy – Hiszpania, ciemno niebieski - Czechy, niebieski - Słowacja. Typ sekwencji (ST) jest wskazany dla każdego izolatu, po nazwie izolatu. Występowanie genu bla _{NDM-1} pokazano na heatmapie po prawej stronie (czarny - obecny, szary - brak). Obok umieszczono macierz różnic w polimorfizmach pojedynczych nukleotydów (SNP). Pasek skali pokazany w lewym dolnym rogu przedstawia średnią liczbę podstawień na miejsce.....	101
Rysunek 31. Występowanie integracyjnych elementów koniugacyjnych (ICEKp1 i ICEKp2) w izolatach klinicznych <i>K. pneumoniae</i> . Drzewo filogenetyczne rdzenia genomu wygenerowane dla 109 izolatów <i>K. pneumoniae</i> (8 izolatów zsekwencjonowanych w ramach rozprawy i 101 z publicznej bazy danych). Kolor izolatu odpowiada obecności lub braku genu bla _{NDM-1} (czerwony – obecny, czarny – nieobecny). Typ sekwencji (ST) jest wskazany dla każdego izolatu, po nazwie izolatu. Występowanie i współwystępowanie ICEKp1 i ICEKp2 (genów markerowych) pokazano na heatmapie po prawej stronie (czarny - obecny, szary - nieobecny). Geny związane z wirulencją rmpA i rmpA2 zostały również włączone do analizy w celu określenia ich korelacji z obecnością / brakiem ICEKp1 i ICEKp2. Pasek skali pokazany w lewym dolnym rogu przedstawia średnią liczbę podstawień na miejsce.....	108
Rysunek 32. Orientacja przełącznika fazowego dla operonu fim, dla trzech wybranych szczepów <i>K. pneumoniae</i> (szczepy o numerach 1K, 5K i 13K) po hodowli w pożywce płynnej z wytrząsaniem (a) z wykładniczej fazy wzrostu bakterii, (b) z fazy późno-stacjonarnej, (c) po czterokrotnym pasażu, (d) trwającej 96 godzin. Orientacja wyłączona „OFF” odpowiada prążkom o wielkości 496 pz i 321 pz, zaś włączona „ON” prążkom o wielkości 605 pz i 212 pz. M - marker wielkości DNA.....	113
Rysunek 33. Badanie lekowrażliwości izolatów <i>K. pneumoniae</i> na tacrolimus (Tac) metodą seryjnych rozcieńczeń (metoda płytkowa). Pokazano średnie wartości gęstości optycznej (OD ₆₀₀) uzyskane dla wszystkich badanych szczepów, wyniki uśrednione z trzech powtórzeń oraz z trzech oddzielnych eksperymentów wraz z odchyleniem standardowym. Niebieska krzywa z okręgami reprezentuje procent spadku OD ₆₀₀ w porównaniu z OD ₆₀₀ kontroli wzrostu bakterii hodowanych bez leku. Każdy wiersz 96-dołkowej płytki titracyjnej zawierał studzienkę będącą kontrolą wzrostu oraz kontrolą pożywki. Dodatkowo sprawdzano wartości gęstości optycznej pożywki zawierającej odpowiednie stężenia leku z zakresu 0,008 - 16 µg/ml.....	120
Rysunek 34. Badanie lekowrażliwości izolatów <i>K. pneumoniae</i> na cyklosporynę (CsA) metodą seryjnych rozcieńczeń (metoda płytkowa). Pokazano średnie wartości gęstości optycznej (OD ₆₀₀) uzyskane dla wszystkich badanych szczepów, wyniki uśrednione z trzech powtórzeń oraz z trzech oddzielnych eksperymentów wraz z odchyleniem standardowym. Czerwona krzywa z okręgami reprezentuje procent zwiększenia OD ₆₀₀ w porównaniu z OD ₆₀₀ kontroli wzrostu bakterii hodowanych bez leku. Każdy wiersz 96-dołkowej płytki titracyjnej zawierał studzienkę będącą kontrolą wzrostu oraz kontrolą pożywki. Dodatkowo sprawdzano wartości gęstości optycznej pożywki zawierającej odpowiednie stężenia leku z zakresu 0,008 - 16 µg/ml.....	120
Rysunek 35. Badanie wpływu leków immunosupresyjnych na wzrost <i>K. pneumoniae</i> pasażowanych 1-krotnie na podłożach z dodatkiem leków. (A) Krzywa wzrostu prezentująca wartości gęstości optycznej hodowli bakterieryjnej (OD ₆₀₀) rejestrowane w czasie 0 oraz w 2, 4, 6, 8, 24, i 48 godzinie wzrostu dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych bez leku (kontrola -kolor zielony) oraz w obecności tacrolimusu (Tac – kolor niebieski) lub cyklosporyny (CsA – kolor czerwony). Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia z trzech powtórzeń dla pięciu badanych izolatów wraz z odchyleniem standardowym. (B) Wykres słupkowy prezentujący pomiar wzrostu (OD ₆₀₀) po 24 godzinach od dodania leków immunosupresyjnych: kontrola – kolor zielony, Tac – kolor niebieski, CsA – kolor czerwony. Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia z trzech powtórzeń dla każdego z badanych izolatów (1K, 5K, 13K, 14K, 36K) oraz szczepu referencyjnego <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 wraz z odchyleniem standardowym.....	121
Rysunek 36. Badanie wpływu leków immunosupresyjnych na wzrost <i>K. pneumoniae</i> pasażowanych 7-krotnie na podłożach z dodatkiem leków. Opis jak w rysunku 35.....	122
Rysunek 37. Badanie wpływu leków immunosupresyjnych na wzrost <i>K. pneumoniae</i> pasażowanych 14-krotnie na podłożach z dodatkiem leków. Opis jak w rysunku 35.....	122
Rysunek 38. Zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów <i>fimA</i> , <i>mrkA</i> , <i>entB</i> , <i>irp2</i> , <i>iroB</i> oraz <i>iucA</i> po hodowli na podłożu z dodatkiem cyklosporyny. A) Zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów na podłożu bez dodatku cyklosporyny (0) względem hodowli na podłożu zawierającym niższe stężenie cyklosporyny (1). B) Zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów na podłożu bez dodatku cyklosporyny (0) względem hodowli na podłożu zawierającym wyższe stężenie cyklosporyny (2).....	127
Rysunek 39. Zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów <i>fimA</i> , <i>mrkA</i> , <i>entB</i> , <i>irp2</i> oraz <i>iroB</i> po hodowli na podłożu z dodatkiem tacrolimusu. A) Zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów na podłożu bez dodatku tacrolimusu (0) względem hodowli na podłożu zawierającym niższe stężenie tacrolimusu (1). B) Zmiany	

względnych poziomów ekspresji badanych genów na podłożu bez dodatku tacrolimusu (0) względem hodowli na podłożu zawierającym wyższe stężenie tacrolimusu (2)	128
Rysunek 40. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji genów kodujących adhezyny (<i>fimA</i> i <i>mrkA</i>) dla szczepów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu bez dodatku leku i na podłożach z dodatkiem leku immunosupresyjnego w dwóch stężeniach. Izolaty pobrane od pacjentów przyjmujących cyklosporynę oznaczono kolorem czerwonym, zaś od pacjentów przyjmujących tacrolimus kolorem niebieskim. A) Porównanie wyników dla szczepów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu bez dodatku leków. B) Porównanie wyników dla szczepów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu z dodatkiem niższych stężeń leków immunosupresyjnych. C) Porównanie wyników dla szczepów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu z dodatkiem wyższych stężeń leków immunosupresyjnych	129
Rysunek 41. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji genów kodujących siderofory (<i>entB</i> , <i>irp2</i> , <i>iroB</i> i <i>iucA</i>) dla szczepów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu bez dodatku leku i na podłożach z dodatkiem leku immunosupresyjnego w dwóch stężeniach. Izolaty pobrane od pacjentów przyjmujących cyklosporynę oznaczono kolorem niebieskim. A) Porównanie wyników dla szczepów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu bez dodatku leków. B) Porównanie wyników dla szczepów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu z dodatkiem niższych stężeń leków immunosupresyjnych. C) Porównanie wyników dla szczepów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu z dodatkiem wyższych stężeń leków immunosupresyjnych	130
Rysunek 42. Porównanie względnych poziomów ekspresji badanego genu <i>fimA</i> , dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> pobranych od pacjentów przyjmujących w schemacie immunosupresji cyklosporynę lub tacrolimus. A) Porównanie wyników dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu bez dodatku leków. B) Porównanie wyników dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu z dodatkiem niższych stężeń leków immunosupresyjnych (cyklosporyna - 200 µg/l, tacrolimus - 10 µg/l). C) Porównanie wyników dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu z dodatkiem wyższych stężeń leków immunosupresyjnych (cyklosporyna - 600 µg/l, tacrolimus - 30 µg/l)	131
Rysunek 43. Porównanie względnych poziomów ekspresji badanego genu <i>mrkA</i> , dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> pobranych od pacjentów przyjmujących w schemacie immunosupresji cyklosporynę lub tacrolimus. A) Porównanie wyników dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu bez dodatku leków. B) Porównanie wyników dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu z dodatkiem niższych stężeń leków immunosupresyjnych (cyklosporyna - 200 µg/l, tacrolimus - 10 µg/l). C) Porównanie wyników dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu z dodatkiem wyższych stężeń leków immunosupresyjnych (cyklosporyna - 600 µg/l, tacrolimus - 30 µg/l)	131
Rysunek 44. Porównanie względnych poziomów ekspresji badanego genu <i>entB</i> , dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> pobranych od pacjentów przyjmujących w schemacie immunosupresji cyklosporynę lub tacrolimus. A) Porównanie wyników dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu bez dodatku leków. B) Porównanie wyników dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu z dodatkiem niższych stężeń leków immunosupresyjnych (cyklosporyna - 200 µg/l, tacrolimus - 10 µg/l). C) Porównanie wyników dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu z dodatkiem wyższych stężeń leków immunosupresyjnych (cyklosporyna - 600 µg/l, tacrolimus - 30 µg/l)	132
Rysunek 45. Wpływ długotrwałej ekspozycji izolatów <i>K. pneumoniae</i> na działanie cyklosporyny – zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów <i>fimA</i> , <i>mrkA</i> , <i>entB</i> , <i>irp2</i> , <i>iroB</i> i <i>iucA</i> po hodowli na podłożu bez leku (kolor zielony) lub z dodatkiem cyklosporyny (kolor czerwony) po 1-krotnym pasażowaniu izolatów (Dzień 1), po 7-krotnym pasażowaniu (Dzień 7) oraz po 14-krotnym pasażowaniu (Dzień 14)	134
Rysunek 46. Wpływ długotrwałej ekspozycji izolatów <i>K. pneumoniae</i> na działanie tacrolimusu – zmiany względnych poziomów ekspresji badanych genów <i>fimA</i> , <i>mrkA</i> , <i>entB</i> , <i>irp2</i> i <i>iroB</i> po hodowli na podłożu bez leku (kolor zielony) lub z dodatkiem tacrolimusu (kolor niebieski) po 1-krotnym pasażowaniu izolatów (Dzień 1), po 7-krotnym pasażowaniu (Dzień 7) oraz po 14-krotnym pasażowaniu (Dzień 14)	136

11. Wykaz Tabel

Tabela 1. Kryteria diagnostyczne dla ZUM u pacjentów po przeszczepie nerki [30,64-66].....	12
Tabela 2. Czynniki ryzyka ZUM u pacjentów po przeszczepie nerki. Opracowanie własne na podstawie [23,33,52,58,72-75].....	15
Tabela 3. Powiązania między ZUM, śmiertelnością i utratą przeszczepu.....	17
Tabela 4. Domniemane determinanty hiperwirulencji. W oparciu o [150].....	30
Tabela 5. Genetyczne determinanty oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe w genomach <i>K. pneumoniae</i> . W oparciu o [172].....	32
Tabela 6. Klasyfikacja ZUM. Opracowanie na podstawie [78,87].....	37
Tabela 7. Kolekcja szczepów <i>K. pneumoniae</i> wyizolowanych od pacjentów z grupy badanej.....	38
Tabela 8. Kolekcja szczepów <i>K. pneumoniae</i> wyizolowanych od pacjentów z grupy kontrolnej.....	41
Tabela 9. Szczepy referencyjne i dodatkowe szczepy kliniczne wykorzystane w pracy.....	41
Tabela 10. Bufory wykorzystane w pracy.....	42
Tabela 11. Enzymy wykorzystane w pracy.....	42
Tabela 12. Oligonukleotydy wykorzystane w pracy.....	43
Tabela 13. Markery wielkości DNA.....	44
Tabela 14. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy w reakcji PCR wykrywania obecności genu <i>bla_{NDM-1}</i>	48
Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji trawienia restrykcyjnego w metodzie PCR MP.....	49
Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji ligacji w metodzie PCR MP.....	49
Tabela 17. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy w reakcji PCR.....	49
Tabela 18. Gradient temperatury denaturacji w reakcji PCR.....	50
Tabela 19. Charakterystyka wybranych czynników wirulencji i produktów PCR.....	51
Tabela 20. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy w reakcji simplex PCR.....	51
Tabela 21. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy w reakcji multiplex PCR.....	52
Tabela 22. Charakterystyka szczepów wybranych do badania kinetyki wzrostu.....	54
Tabela 23. Stężenia leków immunosupresyjnych używane do badań zmienności fazowej przełącznika fim bakterii <i>K. pneumoniae</i>	55
Tabela 24. Skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo-czasowy w reakcji PCR w badaniu ekspresji fimbrii typu 1 z zastosowaniem metody PCR-RFLP.....	56
Tabela 25. Charakterystyka szczepów w badaniu ekspresji genów.....	58
Tabela 26. Stężenia leków immunosupresyjnych używane do badania poziomu ekspresji genów.....	58
Tabela 27. Charakterystyka starterów użytych do reakcji qPCR.....	60
Tabela 28. Profil temperaturowo-czasowy w reakcji qPCR wykorzystywany do amplifikacji genów badanych.....	61
Tabela 29. Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby w reakcji qPCR.....	61
Tabela 30. Szczegóły zsekwencjonowanych genomów <i>Klebsiella pneumoniae</i>	65
Tabela 31. Występowanie β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ESBL) wśród szczepów <i>K. pneumoniae</i> wyizolowanych z przypadków ZUM u pacjentów z grupy badanej w zależności od kategorii/rodzaju ZUM.....	68
Tabela 32. Występowanie genów kodujących czynniki wirulencji u szczepów <i>K. pneumoniae</i> pochodzących od pacjentów hospitalizowanych z ZUM z grupy badanej i grupy kontrolnej.....	70
Tabela 33. Wirulotypy szczepów <i>K. pneumoniae</i> wyizolowanych od pacjentów z ZUM z grupy badanej i kontrolnej.....	75
Tabela 34. Analiza pokrewieństwa genetycznego 61 szczepów <i>K. pneumoniae</i> izolowanych od 54 pacjentów po przeszczepie nerki z grupy badanej. Szczepy posiadające ten sam genotyp (G) wyróżniono kolorem: G13 – czerwony, G14 – jasny szary, G15 – ciemny szary, G29 – żółty, G38 – turkusowy, G43 – zielony, G46 – niebieski.....	83
Tabela 35. Charakterystyka mikrobiologiczna i genetyczna izolatów HM <i>K. pneumoniae</i> . Charakterystyka obejmuje dane demograficzne i kliniczne pacjentów, terapię immunosupresyjną, profil oporności bakterii na antybiotyki, profil genów związanych z wirulencją szczepów, serotyp oraz typ sekwencyjny uzyskany w oparciu o metodę MLST dla izolatów klinicznych <i>K. pneumoniae</i> wykazujących fenotyp hiper mukoidalny.....	86
Tabela 36. Wyniki testów prowadzących do wykrycia karbapenemaz.....	94
Tabela 37. Oporność szczepów <i>K. pneumoniae</i> izolowanych na Oddziale UCK w Gdańsku w oparciu o metody fenotypowe. S, wrażliwy (ang. susceptible); R, oporny (ang. resistance); I, średnio wrażliwy (ang. intermediate); ND, nie określono (ang. not determined); na czerwono szczepy od pacjentów z grupy badanej; na niebiesko szczepy od pacjentów z grupy kontrolnej. Numery szczepów jak w kolekcji.....	95
Tabela 38. Podstawowe dane epidemiologiczne na temat izolatów <i>K. pneumoniae</i> NDM-1 ujętych w badaniu cech genomicznych.....	100

Tabela 39. Izolaty <i>K. pneumoniae</i> NDM-1 ujęte w badaniu: profile plazmidów i rezystomy	103
Tabela 40. Serotypy, wirulomy i ICEKp izolatów <i>K. pneumoniae</i> NDM-1 ujętych w badaniu	106
Tabela 41. Występowanie i współwystępowanie elementów koniugacyjnych ICEKp1 i ICEKp2 w genomach <i>K. pneumoniae</i>	107
Tabela 42. Orientacja przełącznika fim dla szczepu <i>K. pneumoniae</i> o numerze 1K w różnych warunkach hodowli in vitro	113
Tabela 43. Wynik badania heterogeniczności w ekspresji genów fimbrii typu 1 szczepów klinicznych <i>K. pneumoniae</i> z grupy kontrolnej z zastosowaniem metody PCR-RFLP	114
Tabela 44. Orientacja przełącznika fim dla trzech wybranych szczepów <i>K. pneumoniae</i> po całonocnej hodowli w pożywce płynnej z wytrząsaniem w obecności leków immunosupresyjnych o różnych stężeniach.....	115
Tabela 45. Wynik badania ekspresji fimbrii typu 1 dla szczepów klinicznych <i>K. pneumoniae</i> z grupy badanej hodowanych in vitro bez oraz w obecności leków immunosupresyjnych o stężeniu terapeutycznym z zastosowaniem metody PCR-RFLP	116
Tabela 46. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu bez dodatku leków immunosupresyjnych. Izolaty podzielono na dwie grupy: izolowane od pacjentów przyjmujących cyklosporynę (kolor czerwony) lub tacrolimus (kolor niebieski).....	125
Tabela 47. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> pobranych od pacjentów przyjmujących cyklosporynę (kolor czerwony) lub tacrolimus (kolor niebieski) w schemacie immunosupresji hodowanych na podłożu bez dodatku leków immunosupresyjnych. Izolaty podzielono na dwie grupy: ESBL+ (tło czerwone lub niebieskie) lub ESBL- (tło białe)	125
Tabela 48. Poziom ekspresji badanych genów po hodowli na podłożu z dodatkiem cyklosporyny (kolor czerwony) lub tacrolimusu (kolor niebieski). Izolaty hodowane na podłożu bez dodatku leku immunosupresyjnego opisano dodatkowo numerem 0 po kropce np. 14.0. Izolaty hodowane na podłożach zawierających dwa różne stężenia leku immunosupresyjnego opisano dodatkowo numerem 1 po kropce dla niższego stężenia np. 14.1 i numerem 2 po kropce dla wyższego stężenia np. 14.2.	126
Tabela 49. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów dla izolatów <i>K. pneumoniae</i> hodowanych na podłożu bez dodatku leku i na podłożach z dodatkiem leku immunosupresyjnego. Izolaty podzielono na dwie grupy: izolaty pobrane od pacjentów przyjmujących cyklosporynę hodowane na podłożach z dodatkiem cyklosporyny (kolor czerwony) lub przyjmujących tacrolimus hodowane na podłożach z dodatkiem tacrolimusu (kolor niebieski).....	129
Tabela 50. Poziom ekspresji genów <i>K. pneumoniae</i> dla 14-krotnie pasażowanych izolatów na podłoża bez i z dodatkiem cyklosporyny (7-krotny pasaż – jasno szare tło; 14-krotny pasaż – ciemno szare tło). Izolaty hodowane na podłożu bez dodatku leku immunosupresyjnego opisano dodatkowo numerem 0 po kropce np.14.0. Izolaty hodowane na podłożach z dodatkiem leku immunosupresyjnego o stężeniu 200 µg/l opisano dodatkowo numerem 1 po kropce np. 14.1. 7-krotny pasaż oznaczono dodatkowo numerem 7 po kropce, np. 14.0.7, a 14-krotny pasaż oznaczono dodatkowo numerem 14 po kropce np. 14.0.14.....	132
Tabela 51. Zmiany poziomów ekspresji genów izolatów <i>K. pneumoniae</i> 14-krotnie pasażowanych na podłożach bez i z dodatkiem tacrolimusu (7-krotny pasaż – jasno szare tło; 14-krotny pasaż – ciemno szare tło). Izolaty hodowane na podłożu bez dodatku leku immunosupresyjnego opisano dodatkowo numerem 0 po kropce np. 30.0. Izolaty hodowane na podłożach z dodatkiem leku immunosupresyjnego o stężeniu 10 µg/l opisano dodatkowo numerem 1 po kropce np. 30.1. 7-krotny pasaż oznaczono dodatkowo numerem 7 po kropce, np. 30.0.7, a 14-krotny pasaż oznaczono dodatkowo numerem 14 po kropce np. 30.0.14.....	134
Tabela S 1.Odsetek ZUM i nawracających ZUM w badaniach przeszczepu nerki	167
Tabela S 2. Występowania genów kodujących czynniki wirulencji w 61 izolatach <i>K. pneumoniae</i> od 54 pacjentów z ZUM po przeszczepie nerki	169
Tabela S 3. Występowania genów kodujących czynniki wirulencji w 36 izolatach <i>K. pneumoniae</i> od 36 pacjentów z ZUM, nie będących po przeszczepie nerki	171
Tabela S 4. Podsumowanie sekwencji genomów szczepów zsekwencjonowanych w ramach rozprawy doktorskiej .	172
Tabela S 5. Przewidywanie kontigów plazmidów i chromosomów przy użyciu RFplasmid.....	174
Tabela S 6. Wirulomy izolatów <i>Klebsiella pneumoniae</i> o numerach 49K i 50K wykryte przy użyciu baz danych Institut Pasteur MLST.....	182
Tabela S 7. Geny oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe wykryte za pomocą ResFinder 3.1 z izolatów <i>K. pneumoniae</i> numer 49K i 50K	185
Tabela S 8. Profile replikonów plazmidów i rezystomy genomów <i>K. pneumoniae</i> pochodzących z bazy Patric, ujętych w badaniu szczepów <i>K. pneumoniae</i> produkujących karbapenemazy NDM-1	186

12. Wykaz dorobku naukowego

Publikacje naukowe:

- **Wysocka M.**, Zamudio R., Oggioni M.R., Gołębiwska J., Dudziak A., Krawczyk B. The new *Klebsiella pneumoniae* ST152 variants with hypermucoviscous phenotype isolated from renal transplant recipients with asymptomatic bacteriuria – genetic characteristics by WGS. *Genes* (2020) 11(10), 1189.
- Monteiro T.,* **Wysocka M.**,* Tellez E., Monteiro O., Spencer L., Veiga E., Monteiro S., de Pina C., Gonçalves D., de Pina S., Correia L., Moreno J., Conceição T., Aires De Sousa M., de Lencastre H., Gray L.J., Pareek M., Jenkins D.R., Beleza S., Oggioni M.R., Araujo I.I. A five-year retrospective study shows increasing rates of antimicrobial drug resistance in Cabo Verde for both *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (2020) 22, 483-487. *) równy wkład.
- Krawczyk B., **Wysocka M.**, Kotłowski R., Bronk M., Michalik M., A Samet A. Linezolid-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from one hospital in Poland -commensals or hospital-adapted pathogens? *PLoS ONE* (2020) 15(5): e0233504.
- Krawczyk B., Michalik M., Fordon M., **Wysocka M.**, Samet A., Nowicki B. *Escherichia coli* Strains with Virulent Factors Typical for Uropathogens were Isolated from Sinuses from Patients with Chronic Rhinosinusitis—Case Report. *Pathogens* (2020) 9(5), 318.
- Gołębiwska J., Krawczyk B., **Wysocka M.**, Ewiak A., Komarnicka J., Bronk M., Rutkowski B., Dębska-Ślizień A. Host and pathogen factors in *Klebsiella pneumoniae* upper urinary tract infections in renal transplant patients. *Journal of Medical Microbiology* (2019) 68, 382-394.
- Siebert A., **Wysocka M.**, Krawczyk B., Cholewiński G., Rachoń J. Synthesis and antimicrobial activity of amino acid and peptide derivatives of mycophenolic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry* (2018), 143, 646-655.
- Śpibida M., Krawczyk B., Zalewska-Piątek B., Piątek R., **Wysocka M.**, Olszewski M. Fusion of DNA-binding domain of *Pyrococcus furiosus* ligase with TaqStoffel DNA polymerase as a useful tool in PCR with difficult targets. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2018), 102(2), 713-721.

Stáže naukowe:

- 3-miesięczny zagraniczny staż naukowo-badawczy w ramach projektu „Zintegrowany Program Rozwoju Politechniki Gdańskiej” POWR.03.05.00-00.Z044/17. Miejsce odbywania stażu: The Digital Experimental Cancer Medicine Team at the University of Manchester, Wielka Brytania. Tytuł stażu: “Kidney disease as a factor in in-hospital death of patients with COVID-19”. 2020.
- Miesięczny zagraniczny staż naukowy w ramach projektu pn. „Międzynarodowa wymiana stypendialna doktorantów i kadry akademickiej”, nr projektu POWR. 03.03.00-IP.08-00-P13/18. Miejsce odbywania stażu: University of Leicester, Department of Genetics and Genome Biology, Wielka Brytania. Tytuł stażu: “Microbial phylogenetic genome analysis”. 2020.

- 12-miesięczny zagraniczny staż naukowy w ramach programu Erasmus+. Miejsce odbywania stażu: University of Leicester, Department of Genetics and Genome Biology, Wielka Brytania. Tytuł stażu: "Epidemiology of nosocomial infection and resistant organisms". 2018-2019.

Uczestnictwo w grantach badawczych:

- Tytuł projektu: Charakterystyka metabolomiczna i genetyczna szczepów *E. coli* wywołujących urosepsę. OPUS-15; Nr umowy: UMO-2018/29/B/NZ7/02489. Źródło finansowania: NCN. 2019-2020.

- Tytuł projektu: Określenie czynników wpływających na właściwości biofilmu *Klebsiella pneumoniae* u chorych po przeszczepieniu nerki. Źródło finansowania: Polskie Towarzystwo Transplantacyjne. 2015.

- Tytuł projektu: Establishing a multidisciplinary network for antimicrobial drug resistance surveillance in Cabo Verde. Nr umowy: GCRFNG\100338. Źródło finansowania: Global Challenges Research Fund Networking Grants. 2018-2019.

Skrypt:

- Krawczyk B. (RED.), Kotłowski R., Śpibida M., **Wysocka M.**, Wybrane zagadnienia z mikrobiologii klinicznej i środowiskowej. Teoria i ćwiczenia laboratoryjne. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej; 2019.

Uczestnictwo w konferencjach:

- Wystąpienie ustne: "Reducing Population Meticillin Resistant *Staphylococcus aureus* Acquisition Through Hospital-Based Topical Disinfection – An Interrupted Time Series Analysis Approach" na międzynarodowej konferencji IFIC - IPAC Canada 2019 Conjoint Conference, Quebec, Kanada, 26-29.05.2019 r.

- **Wysocka M.**, Krawczyk B., Gołębiowska J. "Induction of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing urinary tract infections in renal transplant patients", The 11th Oegmbt Annual Meeting - Inside the World of Biomolecules, Salzburg (Austria), 16-18.09.2019 r. Abstrakt w materiałach konferencyjnych.

- **Wysocka M.**, Krawczyk B., Gołębiowska J., Oggioni M., Fordon M. "Extended-spectrum-beta-lactamase producing bacteria related urinary tract infection in renal transplant recipients", The 5th International Conference on Prevention & Infection Control, Geneva (Szwajcaria), 10-13.09.2019 r. Abstrakt w Journal of Antimicrobial Resistance and Infection Control 2019, 8(suppl 1):148, p46.

- Fordon M., **Wysocka M.**, Krawczyk B. „Genotyping of clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* New Delhi using the LM-PCR/Shifter method”, IV Ogólnopolska Mikrobiologiczna Konferencja Naukowa MICROBS, Nałęczów, 13-14.06.2019 r. Abstrakt w materiałach konferencyjnych.

- Fordon M., **Wysocka M.**, Krawczyk B. „Charakterystyka genetyczna szczepów *Klebsiella pneumoniae* New Delhi = Genetic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* New Delhi strains”, IV Ogólnopolska

Mikrobiologiczna Konferencja Naukowa MICROBS, Nałęczów, 13-14.06.2019 r. Abstrakt w materiałach konferencyjnych.

- Krawczyk B., Samet A., **Wysocka M.**, Bronk M., Kozak-Michalowska I. "Clinical and epidemiological aspects of LRVREF - resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from haematological patients in one hospital" IFIC 2018, Kraków, 25-27.04.2018 r.

- Gołębiwska J., Krawczyk B., **Wysocka M.**, Ewiak A., Komarnicka J., Bronk M., Rutkowski B., Dębska-Ślizień A. Host But Not Pathogen Factors Predispose To *Klebsiella Pneumoniae* Upper Urinary Tract Infections In Renal Transplant Patients. TRANSPLANT INTERNATIONAL [ISSN: 0934-0874]. 18th Congress of the European Society for Organ Transplantation. 24.09.- 27.09.2017. Barcelona, Spain. Special Issue: Abstracts BOS509 eISSN: 1432-2277.

- Krawczyk B., **Wysocka M.**, Olech H., Gołębiwska J. "Wpływ leków immunosupresyjnych na ekspresję genu *fimA* dla szczepów *Klebsiella pneumoniae* izolowanych z dróg moczowych pacjentów po przeszczepie nerki", Konferencja Naukowa 90 lat Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, PTM wczoraj - dziś - jutro, Kraków, 22-23.09.2017 r.

- **Wysocka M.**, Olech H. Krawczyk B. "Zastosowanie monoazydki propidyny (PMA) do rozróżniania komórek żywych i martwych za pomocą qPCR", Ogólnopolska Konferencja Biotechnologów i Mikrobiologów BIOMILLENIUM 2017 „Trendy i rozwiązania w biotechnologii i mikrobiologii”, Gdańsk, 6-8.09.2017 r.

- Siebert A., **Wysocka M.**, Cholewiński G., Krawczyk B., Rachoń J. "Synthesis and microbiological research of peptide analogues of mycophe- nolic acid", 24th Polish Peptide Symposium, Jastrzębia Góra, 03-07.09.2017 r.

- **Wysocka M.**, Krawczyk B., Gołębiwska J. "Rola fimbrii typu 1 w tworzeniu biofilmu *Klebsiella pneumoniae*" XXVIII Zjazd Polskiego To- warzystwa Mikrobiologów "Mikrobiologia - nowe wyzwania, nowe możliwo- ci", Bydgoszcz, 25-27.09.2016 r.

- Krawczyk B., Bednarska N., **Wysocka M.**, Bronk M., Komarnicka J. "Charakterystyka genetyczna szczepów *Enterococcus faecium* opornych na linezolid (LRVREF)" XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów "Mikrobiologia - nowe wyzwania, nowe możliwości", Bydgoszcz, 25-27.09.2016 r.

- Gołębiwska J., Krawczyk B., **Wojtaś M.**, Rutkowski B., Tarasewicz A., Dębska-Ślizień A. "Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates causing urinary tract infections in renal transplant patients" 53rd ERA- EDTA Congress, Vienna, Austria, 21-24.05.2016 r. Abstrakt w Nephrology Dialysis Transplantation 2016, 31 (17) SP693.

- **Wojtaś M.**, Krawczyk B., Gołębiwska J. "Badanie ekspresji fimbrii typu 1 *Klebsiella pneumoniae* izolowanych od pacjentów po transplantacji nerki" II Ogólnopolska Konferencja "Drobnoustroje w świecie człowieka - Drobnoustroje oportunistyczne", Bydgoszcz, 20-21.05.2016 r.

- Gołębiwska J., Krawczyk B., **Wojtaś M.**, Rutkowski B., Tarasewicz A., Dębska-Ślizień A. "Kliniczna i mikrobiologiczna charakterystyka epizodów zakażeń układu moczowego o etiologii *Klebsiella*

pneumoniae u chorych po przeszczepieniu nerki" XII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego Przeszłość, teraźniejszość i przyszłość transplantologii, Warszawa, 22-23.01.2016 r.

- **Wojtaś M.**, Krawczyk B., Gołębiowska J. "Zaprojektowanie i optymalizacja złożonej reakcji PCR (ang. *Multiplex PCR*) do określenia profilu wirulencji szczepów *Klebsiella pneumoniae*" I Konferencja Doktorantów Pomorza BioMed Session 2015, Gdańsk, 12.12.2015 r.

Uczestnictwo w warsztatach:

- „Analiza proteomiczna z wykorzystaniem spektrometrii mas”, Laboratorium Spektrometrii Mas, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny, 6-17.05.2019 r.

- The Interdisciplinary Workshop “Theory and practice in optimising antibiotic use in hospitals internationally”; University of Leicester; 4-5.10.2018 r.

- The 5th Midlands Molecular Microbiology Meeting (M4); University of Warwick; 13-14.09.2018 r.

- „Zastosowanie mikroskopii konfokalnej w badaniach mikrobiologicznych, biotechnologicznych, mykologicznych i parazytologicznych”, Uniwersytet Łódzki, luty 2017 r.

Stypendia i nagrody:

- Naukowe stypendium zadaniowe na realizację zadań badawczych dla doktorantów w ramach Zintegrowanego Rozwoju Politechniki Gdańskiej POWR.03.05.00-00-Z044/17 – 2020-2021

- Stypendium naukowe w ramach programu stypendialnego Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej, Program PROM – Międzynarodowa wymiana stypendialna doktorantów i kadry akademickiej, nr umowy o dofinansowanie PPI/PRO/2018/1/00009/U/00 – udział w wyjeździe zagranicznym w celu przeprowadzenia badań naukowych, 2020

- Stypendium - 3-miesięczny zagraniczny staż naukowo-badawczy w ramach Zintegrowanego Rozwoju Politechniki Gdańskiej POWR.03.05.00-00-Z044/17 – 2020

- Naukowe stypendium zadaniowe na realizację zadań badawczych dla doktorantów w ramach Zintegrowanego Rozwoju Politechniki Gdańskiej POWR.03.05.00-00-Z044/17 – 2019-2020

- Stypendium naukowe w ramach programu stypendialnego Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej, Program PROM – Międzynarodowa wymiana stypendialna doktorantów i kadry akademickiej, nr umowy o dofinansowanie PPI/PRO/2018/1/00009/U/00 – udział w międzynarodowej konferencji naukowej, 2019

- Stypendium z funduszu własnego Rektora Politechniki Gdańskiej dla najlepszych doktorantów – 2018/2019

13. Materiały dodatkowe

Tabela S.1. Odsetek ZUM i nawracających ZUM w badaniach przeszczepu nerki

ZUM [%]	Nawracające ZUM [%]	Okres badania [lata]	Liczba pacjentów	Liczba pacjentów z ZUM	Kobiety [%]	Średnia wieku [lata]	Follow-up [miesiące]	Lokalizacja	Referencje
-	36	2001-2011	99	-	69	53.3	54	Tajwan	[17]a
-	72	2010-2011	154	-	48	51.3	12	Portugalia	[18]a
-	18	1976-1994	307	-	87.5	46	180	Wielka Brytania	[19]a
4	-	2008-2010	78	3	44	56	24	Szwajcaria	[20]
7	-	1985-1999	954	68	24	32.8	-	Turcja	[21]
10	-	-	163	16	62.5	44.8	26	Hiszpania	[22]
13^g	32 ^c	1987-1999	1387	180	30	44	>12	Francja	[23]
15	46	2000-2010	344	50	72	41.1	36	Korea	[24]
15	15	2003-2005	2174	150	33 ^b	50 ^b	24	Hiszpania	[25]h
15	-	2017-2018	74	11	54.5	41.6	12	Etiopia	[26]
16	-	2005-2007	158	25	31	47	6	USA	[27]
17^g	23 ^c	1994-2004	1022	169	19	34	>6	Indie	[28]
18	-	2002-2004	189	34	40	49.7	36	Hiszpania	[29]
20	-	2005-2007	343	69	44	52	12	Holandia	[30]
21	-	2005-2010	1166	247	39	53	60	USA	[31]
23	-	2005-2013	9038	2100	39	51	24	USA	[32]
24	52	2001-2004	127	31	40	47.1	20	USA	[33]h
24	-	1997-2000	226	55	-	-	48	Hiszpania	[34]
25	50	2003-2005	161	41	58.5	34	12	Hiszpania	[35]
28	-	2012-2013	417	115	37	55	12	Holandia	[36]
28	-	2011-2016	72	20	85	52	24	Australia	[37]
31	4	2001-2007	598	185	35	54	12	Austria	[38]f
32	-	2000-2011	60702	19213	40	-	54	USA	[39]
33	-	2009-2010	236	77	39	52	12	USA	[40]
33	12	2008	200	66	20	31	12	Pakistan	[41]
34	-	2013-2014	120	41	38	47.2	1	Polaska	[42]
34	14	2007-2009	301	101	41	56.7	10	USA	[43]
34	44	2010	105	36	36	47.9	12	Brazylia	[44]h
34	-	2009-2012	1165	391	34.8	38.5	60	Iran	[45]
36	-	2003-2007	176	63	46	37	12	Meksyk	[46]
37	37	1999-2001	52	19	42	11-47	1	Meksyk	[47]h
41	36	1999-2006	136	56	35	31	38	Turcja	[48]

ZUM [%]	Nawracające ZUM [%]	Okres badania [lata]	Liczba pacjentów	Liczba pacjentów z ZUM	Kobiety [%]	Średnia wieku [lata]	Follow-up [miesiące]	Lokalizacja	Referencje
42	-	2002-2004	142	59	35	41		Iran	[49]
43	64 ^c	1996-2002	500	213	34	44	42	USA	[50]
43	-	1996-2000	28924	12508	40	45.4	36	USA	[51]
45	12	2000-2001	163	73	40	38	24	Brazylia	[52]h
50	-	1994-2001	384	192	77	47	96	USA	[53]
54	-	1986-2009	393	221	36.7	32.8	>92	Arabia Saudyjska	[54]
55	51	2009	89	49	42	48	12	Polska	[55]
61	47	1998-2008	122	74	38	43.8	68	Grecja	[56]d
72	-	1994-1998	18	13	27.8	28	>6	Tunezja	[57]
75	-	2000-2005	172	133	32	46.5	22	Francja	[58]
80 ^f	-	1972-1991	576	464	45	37.8	>60	Niemcy	[59]

^a Badanie dotyczące wyłącznie nawracających ZUM.

^b Dla całej kohorty, w której pacjenci po przeszczepieniu nerki byli podgrupą.

^c Nawracające ZUM zdefiniowano jako mające co najmniej jeden epizod ZUM.

^d Dane dla nawracających ZUM dotyczą pacjentów z > 3 ZUM w okresie badania, który mógł wynosić > 1 rok.

^e Odstępek pacjentów, u których rozwinęło się ZUM, które następnie rozwinęło nawracające ZUM.

^f Nawracające infekcje zdefiniowano jako ZUM z dwoma lub więcej epizodami w okresie obserwacji trwającym 12 miesięcy.

^g Badanie koncentrowało się wyłącznie na AGPN.

^h Nie zdefiniowano kryteriów dla nawracającego ZUM

Tabela S.2. Występowania genów kodujących czynniki wirulencji w 61 izolatach *K. pneumoniae* od 54 pacjentów z ZUM po przeszczepie nerki

Nr izolatu	Nr pacjenta	Rodzaj materiału	Data pobrania (msc/rok)	ESBL	Rodzaj ZUM**	Nawracające ZUM	CsA	Tac	<i>fimH-1</i>	<i>uge</i>	<i>kpn</i>	<i>mrkD</i>	<i>ycfM</i>	<i>rmpA</i>	<i>magA</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf-1</i>	<i>irp-1</i>	<i>irp-2</i>	<i>fyuA</i>	<i>entB</i>	<i>iutA</i>	<i>iroN</i>	
1B	P1	mocz	03/2013	1	IV	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	
2B	P2	mocz	04/2013	1	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
3B	P3	mocz	04/2013	0	II	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
4B	P4	mocz	05/2013	1	II	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
5B	P5	mocz	05/2013	1	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
6B	P6	mocz	06/2013	1	III	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
7B	P7	mocz	06/2013	1	II	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
8B	P8	mocz	06/2013	1	II	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
9B	P9	mocz	07/2013	1	IV	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
10B	P3	mocz	07/2013	1	II	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
11B	P10	mocz	08/2013	1	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
12B	P11	mocz	08/2013	1	I	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
13B	P12	mocz	09/2013	1	III	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
14B	P13	mocz	09/2013	0	I	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
15B	P14	mocz	09/2013	0	I	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
16B	P15	mocz	10/2013	1	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
17B	P16	mocz	10/2013	1	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
18B	P16	mocz	10/2013	1	I	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
19B	P17	mocz	10/2013	1	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
20B	P18	mocz	11/2013	1	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
21B	P19	mocz	11/2013	1	II	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
22B	P20	mocz	11/2013	1	III	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
23B	P21	mocz	01/2014	1	II	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
24B	P22	mocz	01/2014	1	III	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
25B	P23	mocz	02/2014	1	III	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
26B	P5	mocz	02/2014	1	III	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
27B	P24	mocz	02/2014	1	III	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
28B	P25	mocz	02/2014	1	III	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
29B	P26	mocz	02/2014	1	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
30B	P27	mocz	03/2014	0	II	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
31B	P28	mocz	05/2014	1	I	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
32B	P29	mocz	07/2014	1	I	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0

Nr izolatu	Nr pacjenta	Rodzaj materiału	Data pobrania (msc/rok)	ESBL	Rodzaj ZUM**	Nawracające ZUM	CsA	Tac	<i>fimH-1</i>	<i>uge</i>	<i>kpn</i>	<i>mrkD</i>	<i>ycfM</i>	<i>rmpA</i>	<i>magA</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf-1</i>	<i>irp-1</i>	<i>irp-2</i>	<i>fyuA</i>	<i>entB</i>	<i>iutA</i>	<i>iroN</i>
33B	P30	mocz	08/2014	0	I	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
34B	P31	mocz	08/2014	1	I	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
35B	P32	mocz	09/2014	0	II	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
36B	P33	mocz	09/2014	1	III	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
37B	P5	mocz	09/2014	1	IV	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
38B	P34	mocz	12/2014	1	I	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0
39B	P35	mocz	12/2014	0	III	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
40B	P36	mocz	12/2014	1	I	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
41B	P37	mocz	12/2014	1	I	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
42B	P38	mocz	11/2017	0	IV	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
43B	P39	mocz	12/2017	1	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44B	P40	mocz	12/2017	1	IV	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
45B	P41	mocz	01/2018	1	III	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
46B	P42	mocz	01/2018	NDM	I	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
47B	P43	mocz	01/2018	0	I	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
48B	P44	mocz	01/2018	0	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49B	P45	mocz	02/2018	0	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
50B	P46	mocz	03/2018	1	I	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
51B	P47	mocz	03/2018	1	I	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
52B	P47	mocz	03/2018	1	I	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
53B	P48	mocz	03/2018	NDM	I	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
54B	P49	mocz	03/2018	1	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
55B	P50	mocz	04/2018	1	I	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
56B	P47	mocz	04/2018	0	III	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
57B	P51	mocz	07/2018	0	IV	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58B	P23	mocz	07/2018	0	III	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59B	P52	mocz	07/2018	1	I	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60B	P53	mocz	07/2018	1	I	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61B	P54	mocz	07/2018	1	II	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0

Tabela S.3. Występowania genów kodujących czynniki wirulencji w 36 izolatach *K. pneumoniae* od 36 pacjentów z ZUM, nie będących po przeszczepie nerki

Nr izolatu	Nr pacjenta	Rodzaj materiału	Data pobrania (msc/rok)	ESBL	<i>fimH-1</i>	<i>uge</i>	<i>kpn</i>	<i>mrkD</i>	<i>ycfM</i>	<i>rmpA</i>	<i>magA</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf-1</i>	<i>irp-1</i>	<i>irp-2</i>	<i>fyuA</i>	<i>entB</i>	<i>intA</i>	<i>iroN</i>	
1K	P1	mocz	07/2013	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
2K	P2	mocz	08/2013	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
3K	P3	mocz	08/2013	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
4K	P4	mocz	09/2013	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5K	P5	mocz	11/2013	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
6K	P6	mocz	12/2013	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
7K	P7	mocz	01/2014	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8K	P8	mocz	02/2014	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
9K	P9	mocz	03/2014	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
10K	P10	mocz	07/2014	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
11K	P11	mocz	08/2014	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12K	P12	mocz	09/2014	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
13K	P13	mocz	09/2014	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14K	P14	mocz	01/2015	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15K	P15	mocz	06/2015	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16K	P16	mocz	05/2016	NDM	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0
17K	P17	mocz	12/2017	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
18K	P18	mocz	12/2017	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
19K	P19	mocz	12/2017	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
20K	P20	mocz	01/2018	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
21K	P21	mocz	01/2018	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
22K	P22	mocz	01/2018	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
23K	P23	mocz	01/2018	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
24K	P24	mocz	02/2018	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0
25K	P22	mocz	02/2018	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
26K	P25	mocz	03/2018	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0
27K	P26	mocz	03/2018	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
28K	P27	mocz	03/2018	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
29K	P28	mocz	03/2018	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
30K	P29	mocz	03/2018	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
31K	P25	mocz	03/2018	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
32K	P30	mocz	04/2018	NDM	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
33K	P31	mocz	04/2018	NDM	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
34K	P32	mocz	04/2018	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
35K	P33	mocz	06/2018	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0
36K	P34	mocz	07/2018	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0

Tabela S.4. Podsumowanie sekwencji genomów szczepów zsekwencjonowanych w ramach rozprawy doktorskiej

tonB	<i>tonB</i> (56)	<i>tonB</i> (56)	<i>tonB</i> (4)	<i>tonB</i> (4)	<i>tonB</i> (4)
rpoB	<i>rpoB</i> (4)	<i>rpoB</i> (4)	<i>rpoB</i> (1)	<i>rpoB</i> (1)	<i>rpoB</i> (1)
phoE	<i>phoE</i> (1)	<i>phoE</i> (1)	<i>phoE</i> (1)	<i>phoE</i> (1)	<i>phoE</i> (1)
pgi	<i>pgi</i> (1)	<i>pgi</i> (1)	<i>pgi</i> (1)	<i>pgi</i> (1)	<i>pgi</i> (1)
mdh	<i>mdh</i> (2)	<i>mdh</i> (2)	<i>mdh</i> (1)	<i>mdh</i> (1)	<i>mdh</i> (1)
infB	<i>infB</i> (3)	<i>infB</i> (3)	<i>infB</i> (3)	<i>infB</i> (3)	<i>infB</i> (3)
gapA	<i>gapA</i> (2)	<i>gapA</i> (2)	<i>gapA</i> (3)	<i>gapA</i> (3)	<i>gapA</i> (3)
max_len	251	251	251	251	251
avg_len	188.2	210	224.9	231.1	221.9
min_len	36	36	36	36	36
sum_len	197093943	111070198	162,044,155	150,425,106	143,147,694
num_seqs	1047139	528831	720,384	651,043	645,02
# N's per 100 kbp	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
L75	30	27	18	17	20
L50	15	14	9	9	10
N75	71673	84334	101300	100790	99546
N50	126807	139101	239522	239630	239522
GC (%)	56.85	57.45	56.84	56.81	56.72
Total length	5928480	5377974	5966290	5959156	6006090
Largest contig	389262	355714	483179	804016	483261
contigs	365	116	138	113	136
Typ otoczki	KL149	KL149	KL24	KL24	KL24
ST	152	152	11	11	11
Material	Mocz	Mocz	Mocz	Mocz	Mocz
Rok	2018	2018	2018	2018	2018
Szpital	UCK Gdansk	UCK Gdansk	Torun	UCK Gdansk	UCK Gdansk
Kraj	Polska	Polska	Polska	Polska	Polska
Genome accession	JABFQQ00000000	JABFQR00000000	JAEMGV0000000000	JAEMGW0000000000	JAEMGX0000000000
BioProject	PRJNA630564	PRJNA630564	PRJNA688074	PRJNA688074	PRJNA688074
BioSample	SAMN14840028	SAMN14840029	SAMN17168596	SAMN17168597	SAMN17168598
Nazwa genomu	KP28872 (50B)	KP28873 (49B)	ND27	ND96	ND88

<i>tonB</i>	<i>tonB(4)</i>	<i>tonB(4)</i>	<i>tonB(4)</i>	<i>tonB(4)</i>	<i>tonB(4)</i>
<i>rpoB</i>	<i>rpoB(1)</i>	<i>rpoB(1)</i>	<i>rpoB(1)</i>	<i>rpoB(1)</i>	<i>rpoB(1)</i>
<i>phoE</i>	<i>phoE(1)</i>	<i>phoE(1)</i>	<i>phoE(1)</i>	<i>phoE(1)</i>	<i>phoE(1)</i>
<i>pgi</i>	<i>pgi(1)</i>	<i>pgi(1)</i>	<i>pgi(1)</i>	<i>pgi(1)</i>	<i>pgi(1)</i>
<i>mdh</i>	<i>mdh(1)</i>	<i>mdh(1)</i>	<i>mdh(1)</i>	<i>mdh(1)</i>	<i>mdh(1)</i>
<i>infB</i>	<i>infB(3)</i>	<i>infB(3)</i>	<i>infB(3)</i>	<i>infB(3)</i>	<i>infB(3)</i>
<i>gapA</i>	<i>gapA(3)</i>	<i>gapA(3)</i>	<i>gapA(3)</i>	<i>gapA(3)</i>	<i>gapA(3)</i>
max_len	251	251	251	251	251
avg_len	222.7	218.4	237.6	233.9	232.5
min_len	36	36	36	36	36
sum_len	116,651,684	142,164,105	168,737,035	187,207,483	121,940,935
num_seqs	523,802	651,012	710,264	800,507	524,443
# N's per 100 kbp	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
L75	17	17	16	16	17
L50	9	8	8	9	9
N75	101300	101300	142128	153777	129570
N50	203937	241563	258257	248278	258283
GC (%)	57.37	56.82	57.30	56.82	56.73
Total length	5441546	5953882	5537205	5956422	5999106
Largest contig	483251	804016	507788	491481	491539
contigs	98	103	95	112	117
Typ otoczki	KL24	KL24	KL24	KL24	KL24
ST	11	11	11	11	11
Material	Mocz	Mocz	Mocz	Wymaz z kału	Wymaz z kału
Rok	2016	2018	2018	2018	2018
Szpital	UCK Gdansk	UCK Gdansk	UCK Gdansk	UCK Gdansk	UCK Gdansk
Kraj	Polska	Polska	Polska	Polska	Polska
Genome accession	JAEMGY000000000	JAEMGZ000000000	JAEMHA000000000	JAEMHB000000000	JAEMHC000000000
BioProject	PRJNA688074	PRJNA688074	PRJNA688074	PRJNA688074	PRJNA688074
BioSample	SAMN17168599	SAMN17168600	SAMN17168601	SAMN17168602	SAMN17168603
Nazwa genomu	ND32	ND111	ND24	ND33	ND34

Tabela S 5. Przewidywanie kontigów plazmidów i chromosomów przy użyciu RFplasmid

Nazwa genomu	Contigs	Przydział	Votes chromosomal	Votes plasmid	ContigID
KP28872	1	chromosomal	0.995	0.005	NODE_1_length_389262_cov_34.9217
KP28872	10	chromosomal	0.999	0.001	NODE_10_length_174404_cov_36.9282
KP28872	100	chromosomal	0.716	0.284	NODE_100_length_4052_cov_5.69484
KP28872	101	chromosomal	0.639	0.361	NODE_101_length_3975_cov_4.62083
KP28872	102	chromosomal	0.746	0.254	NODE_102_length_3897_cov_4.10759
KP28872	103	chromosomal	0.794	0.206	NODE_103_length_3894_cov_3.53707
KP28872	104	chromosomal	0.777	0.223	NODE_104_length_3892_cov_4.82752
KP28872	105	plasmid	0.122	0.878	NODE_105_length_3827_cov_23.512
KP28872	106	chromosomal	0.726	0.274	NODE_106_length_3826_cov_4.44732
KP28872	107	chromosomal	0.758	0.242	NODE_107_length_3823_cov_4.34357
KP28872	108	chromosomal	0.855	0.145	NODE_108_length_3823_cov_32.9909
KP28872	109	chromosomal	0.518	0.482	NODE_109_length_3816_cov_3.89917
KP28872	11	chromosomal	0.999	0.001	NODE_11_length_148322_cov_40.0058
KP28872	110	chromosomal	0.77	0.23	NODE_110_length_3772_cov_4.08444
KP28872	111	chromosomal	0.788	0.212	NODE_111_length_3762_cov_3.86893
KP28872	112	chromosomal	0.908	0.092	NODE_112_length_3761_cov_3.86781
KP28872	113	chromosomal	0.873	0.127	NODE_113_length_3694_cov_3.98341
KP28872	114	chromosomal	0.821	0.179	NODE_114_length_3667_cov_3.87103
KP28872	115	chromosomal	0.652	0.348	NODE_115_length_3648_cov_3.23775
KP28872	116	plasmid	0.229	0.771	NODE_116_length_3602_cov_15.9452
KP28872	117	chromosomal	0.661	0.339	NODE_117_length_3443_cov_4.41949
KP28872	118	chromosomal	0.845	0.155	NODE_118_length_3429_cov_3.51193
KP28872	119	chromosomal	0.861	0.139	NODE_119_length_3407_cov_5.23363
KP28872	12	chromosomal	0.996	0.004	NODE_12_length_144887_cov_40.7587
KP28872	120	chromosomal	0.879	0.121	NODE_120_length_3354_cov_3.80867
KP28872	121	chromosomal	0.781	0.219	NODE_121_length_3301_cov_29.5639
KP28872	122	chromosomal	0.879	0.121	NODE_122_length_3202_cov_3.75136
KP28872	123	chromosomal	0.788	0.212	NODE_123_length_3187_cov_3.33987
KP28872	124	chromosomal	0.801	0.199	NODE_124_length_3183_cov_4.47778
KP28872	125	chromosomal	0.682	0.318	NODE_125_length_3140_cov_31.1877
KP28872	126	chromosomal	0.823	0.177	NODE_126_length_3118_cov_4.14765
KP28872	127	chromosomal	0.84	0.16	NODE_127_length_3086_cov_5.01263
KP28872	128	chromosomal	0.753	0.247	NODE_128_length_3080_cov_3.30037
KP28872	129	chromosomal	0.798	0.202	NODE_129_length_3047_cov_8.93199
KP28872	13	chromosomal	0.991	0.009	NODE_13_length_143779_cov_35.9103
KP28872	130	chromosomal	0.613	0.387	NODE_130_length_3021_cov_4.33356
KP28872	131	chromosomal	0.762	0.238	NODE_131_length_2996_cov_4.62727
KP28872	132	chromosomal	0.81	0.19	NODE_132_length_2995_cov_4.00754
KP28872	133	plasmid	0.282	0.718	NODE_133_length_2976_cov_15.4984
KP28872	134	chromosomal	0.981	0.019	NODE_134_length_2976_cov_371.22
KP28872	135	chromosomal	0.543	0.457	NODE_135_length_2938_cov_2.94932
KP28872	136	chromosomal	0.847	0.153	NODE_136_length_2886_cov_4.50338
KP28872	137	chromosomal	0.788	0.212	NODE_137_length_2875_cov_4.63331
KP28872	138	chromosomal	0.755	0.245	NODE_138_length_2786_cov_4.811
KP28872	139	plasmid	0.392	0.608	NODE_139_length_2762_cov_11.4629
KP28872	14	chromosomal	0.881	0.119	NODE_14_length_131869_cov_35.6086
KP28872	140	chromosomal	0.64	0.36	NODE_140_length_2760_cov_3.99627
KP28872	141	chromosomal	0.671	0.329	NODE_141_length_2757_cov_4.50075
KP28872	142	chromosomal	0.729	0.271	NODE_142_length_2738_cov_3.75272
KP28872	143	chromosomal	0.736	0.264	NODE_143_length_2713_cov_5.15175
KP28872	144	chromosomal	0.874	0.126	NODE_144_length_2653_cov_5.18944
KP28872	145	chromosomal	0.778	0.222	NODE_145_length_2600_cov_5.03409
KP28872	146	chromosomal	0.645	0.355	NODE_146_length_2565_cov_9.01768
KP28872	147	chromosomal	0.648	0.352	NODE_147_length_2558_cov_4.57678
KP28872	148	plasmid	0.476	0.524	NODE_148_length_2511_cov_4.68817
KP28872	149	chromosomal	0.763	0.237	NODE_149_length_2500_cov_3.35988
KP28872	15	chromosomal	0.982	0.018	NODE_15_length_126807_cov_40.3171
KP28872	150	chromosomal	0.795	0.205	NODE_150_length_2491_cov_41.534
KP28872	151	chromosomal	0.681	0.319	NODE_151_length_2472_cov_3.78455
KP28872	152	chromosomal	0.657	0.343	NODE_152_length_2446_cov_3.46729
KP28872	153	chromosomal	0.64	0.36	NODE_153_length_2440_cov_26.7253
KP28872	154	chromosomal	0.861	0.139	NODE_154_length_2407_cov_5.09056
KP28872	155	chromosomal	0.676	0.324	NODE_155_length_2394_cov_4.42943
KP28872	156	chromosomal	0.756	0.244	NODE_156_length_2392_cov_3.29028

KP28872	157	chromosomal	0.803	0.197	NODE_157_length_2370_cov_2.93371
KP28872	158	chromosomal	0.6	0.4	NODE_158_length_2365_cov_2.15472
KP28872	159	chromosomal	0.685	0.315	NODE_159_length_2358_cov_3.56291
KP28872	16	chromosomal	0.993	0.007	NODE_16_length_119949_cov_35.035
KP28872	160	chromosomal	0.512	0.488	NODE_160_length_2349_cov_3.65097
KP28872	161	chromosomal	0.813	0.187	NODE_161_length_2337_cov_3.27168
KP28872	162	chromosomal	0.83	0.17	NODE_162_length_2316_cov_3.28495
KP28872	163	chromosomal	0.778	0.222	NODE_163_length_2283_cov_4.06754
KP28872	164	chromosomal	0.652	0.348	NODE_164_length_2281_cov_2.73775
KP28872	165	chromosomal	0.823	0.177	NODE_165_length_2277_cov_3.22182
KP28872	166	chromosomal	0.852	0.148	NODE_166_length_2265_cov_3.73537
KP28872	167	plasmid	0.491	0.509	NODE_167_length_2263_cov_26.2928
KP28872	168	chromosomal	0.844	0.156	NODE_168_length_2241_cov_2.79529
KP28872	169	chromosomal	0.846	0.154	NODE_169_length_2191_cov_4.85525
KP28872	17	chromosomal	0.969	0.031	NODE_17_length_119920_cov_34.307
KP28872	170	plasmid	0.466	0.534	NODE_170_length_2180_cov_17.4926
KP28872	171	plasmid	0.37	0.63	NODE_171_length_2179_cov_3.29876
KP28872	172	chromosomal	0.565	0.435	NODE_172_length_2177_cov_3.57143
KP28872	173	chromosomal	0.832	0.168	NODE_173_length_2158_cov_5.97501
KP28872	174	chromosomal	0.662	0.338	NODE_174_length_2032_cov_3.43478
KP28872	175	chromosomal	0.712	0.288	NODE_175_length_2023_cov_3.20195
KP28872	176	chromosomal	0.761	0.239	NODE_176_length_2015_cov_4.20691
KP28872	177	chromosomal	0.841	0.159	NODE_177_length_1974_cov_4.07696
KP28872	178	chromosomal	0.733	0.267	NODE_178_length_1946_cov_3.71803
KP28872	179	chromosomal	0.729	0.271	NODE_179_length_1928_cov_5.37709
KP28872	18	chromosomal	0.996	0.004	NODE_18_length_105981_cov_40.6289
KP28872	180	chromosomal	0.79	0.21	NODE_180_length_1924_cov_3.79101
KP28872	181	chromosomal	0.731	0.269	NODE_181_length_1922_cov_2.92195
KP28872	182	chromosomal	0.663	0.337	NODE_182_length_1913_cov_261.973
KP28872	183	chromosomal	0.981	0.019	NODE_183_length_1888_cov_67.3407
KP28872	184	chromosomal	0.753	0.247	NODE_184_length_1881_cov_4.66463
KP28872	185	chromosomal	0.799	0.201	NODE_185_length_1874_cov_4.55259
KP28872	186	chromosomal	0.806	0.194	NODE_186_length_1868_cov_4.31156
KP28872	187	chromosomal	0.578	0.422	NODE_187_length_1859_cov_2.77385
KP28872	188	chromosomal	0.675	0.325	NODE_188_length_1805_cov_3.48611
KP28872	189	plasmid	0.15	0.85	NODE_189_length_1787_cov_15.7918
KP28872	19	chromosomal	0.629	0.371	NODE_19_length_104776_cov_30.0928
KP28872	190	chromosomal	0.82	0.18	NODE_190_length_1780_cov_4.36524
KP28872	191	chromosomal	0.798	0.202	NODE_191_length_1773_cov_8.90212
KP28872	192	chromosomal	0.789	0.211	NODE_192_length_1763_cov_4.26572
KP28872	193	chromosomal	0.823	0.177	NODE_193_length_1737_cov_3.98253
KP28872	194	chromosomal	0.982	0.018	NODE_194_length_1725_cov_369.802
KP28872	195	chromosomal	0.775	0.225	NODE_195_length_1686_cov_3.3729
KP28872	196	chromosomal	0.55	0.45	NODE_196_length_1685_cov_3.58022
KP28872	197	chromosomal	0.787	0.213	NODE_197_length_1652_cov_3.65016
KP28872	198	chromosomal	0.89	0.11	NODE_198_length_1646_cov_2.79732
KP28872	199	plasmid	0.291	0.709	NODE_199_length_1632_cov_11.409
KP28872	2	chromosomal	0.998	0.002	NODE_2_length_292640_cov_38.7891
KP28872	20	chromosomal	0.996	0.004	NODE_20_length_100509_cov_41.0535
KP28872	200	chromosomal	0.622	0.378	NODE_200_length_1611_cov_4.04563
KP28872	201	chromosomal	0.827	0.173	NODE_201_length_1607_cov_9.9366
KP28872	202	chromosomal	0.837	0.163	NODE_202_length_1590_cov_3.67878
KP28872	203	plasmid	0.269	0.731	NODE_203_length_1574_cov_29.3273
KP28872	204	chromosomal	0.748	0.252	NODE_204_length_1532_cov_5.47216
KP28872	205	chromosomal	0.816	0.184	NODE_205_length_1511_cov_3.16109
KP28872	206	chromosomal	0.585	0.415	NODE_206_length_1511_cov_14.9331
KP28872	207	chromosomal	0.745	0.255	NODE_207_length_1471_cov_8.04806
KP28872	208	chromosomal	0.999	0.001	NODE_208_length_1445_cov_136.04
KP28872	209	chromosomal	0.515	0.485	NODE_209_length_1436_cov_3.52024
KP28872	21	chromosomal	0.986	0.014	NODE_21_length_99297_cov_39.5594
KP28872	210	chromosomal	0.72	0.28	NODE_210_length_1423_cov_3.57727
KP28872	211	chromosomal	0.569	0.431	NODE_211_length_1412_cov_2.54757
KP28872	212	chromosomal	0.693	0.307	NODE_212_length_1386_cov_4.0466
KP28872	213	chromosomal	0.692	0.308	NODE_213_length_1381_cov_3.67331
KP28872	214	chromosomal	0.769	0.231	NODE_214_length_1367_cov_3.39535
KP28872	215	plasmid	0.013	0.987	NODE_215_length_1363_cov_29.1042
KP28872	216	chromosomal	0.833	0.167	NODE_216_length_1361_cov_4.12695
KP28872	217	chromosomal	0.754	0.246	NODE_217_length_1342_cov_3.56285

KP28872	218	chromosomal	0.606	0.394	NODE_218_length_1341_cov_2.1606
KP28872	219	chromosomal	0.746	0.254	NODE_219_length_1335_cov_2.39587
KP28872	22	chromosomal	0.998	0.002	NODE_22_length_95737_cov_39.6323
KP28872	220	chromosomal	0.68	0.32	NODE_220_length_1324_cov_2.73857
KP28872	221	chromosomal	0.587	0.413	NODE_221_length_1310_cov_2.41687
KP28872	222	chromosomal	0.613	0.387	NODE_222_length_1305_cov_2.53502
KP28872	223	chromosomal	0.708	0.292	NODE_223_length_1284_cov_3.29577
KP28872	224	chromosomal	0.843	0.157	NODE_224_length_1279_cov_4.26373
KP28872	225	chromosomal	0.685	0.315	NODE_225_length_1270_cov_5.8575
KP28872	226	chromosomal	0.568	0.432	NODE_226_length_1249_cov_3.25597
KP28872	227	chromosomal	0.804	0.196	NODE_227_length_1243_cov_80.3465
KP28872	228	chromosomal	0.769	0.231	NODE_228_length_1241_cov_2.4854
KP28872	229	chromosomal	0.61	0.39	NODE_229_length_1221_cov_5.3243
KP28872	23	chromosomal	0.999	0.001	NODE_23_length_94236_cov_39.0218
KP28872	230	plasmid	0.088	0.912	NODE_230_length_1221_cov_406.885
KP28872	231	chromosomal	0.628	0.372	NODE_231_length_1200_cov_3.58949
KP28872	232	chromosomal	0.759	0.241	NODE_232_length_1198_cov_2.60125
KP28872	233	plasmid	0.357	0.643	NODE_233_length_1196_cov_278.592
KP28872	234	chromosomal	0.605	0.395	NODE_234_length_1195_cov_6.4186
KP28872	235	chromosomal	0.738	0.262	NODE_235_length_1189_cov_4.45234
KP28872	236	chromosomal	0.663	0.337	NODE_236_length_1187_cov_4.05135
KP28872	237	chromosomal	0.805	0.195	NODE_237_length_1187_cov_2.82252
KP28872	238	chromosomal	0.506	0.494	NODE_238_length_1169_cov_7.61813
KP28872	239	chromosomal	0.733	0.267	NODE_239_length_1169_cov_4.38004
KP28872	24	chromosomal	0.991	0.009	NODE_24_length_88599_cov_38.1272
KP28872	240	chromosomal	0.819	0.181	NODE_240_length_1158_cov_2.57909
KP28872	241	chromosomal	0.782	0.218	NODE_241_length_1136_cov_3.55902
KP28872	242	chromosomal	0.65	0.35	NODE_242_length_1134_cov_4.17408
KP28872	243	chromosomal	0.592	0.408	NODE_243_length_1132_cov_2.16019
KP28872	244	chromosomal	0.671	0.329	NODE_244_length_1123_cov_3.30688
KP28872	245	chromosomal	0.614	0.386	NODE_245_length_1118_cov_2.95485
KP28872	246	chromosomal	0.848	0.152	NODE_246_length_1096_cov_52.2149
KP28872	247	chromosomal	0.718	0.282	NODE_247_length_1088_cov_3.27102
KP28872	248	chromosomal	0.711	0.289	NODE_248_length_1086_cov_4.74133
KP28872	249	chromosomal	0.605	0.395	NODE_249_length_1083_cov_2.47515
KP28872	25	chromosomal	1	0	NODE_25_length_86606_cov_39.0921
KP28872	250	chromosomal	0.713	0.287	NODE_250_length_1047_cov_2.72474
KP28872	251	chromosomal	0.63	0.37	NODE_251_length_1024_cov_4.00211
KP28872	252	chromosomal	0.996	0.004	NODE_252_length_1013_cov_85.2179
KP28872	253	chromosomal	0.746	0.254	NODE_253_length_1002_cov_3.30919
KP28872	254	chromosomal	0.717	0.283	NODE_254_length_1001_cov_2.14394
KP28872	255	chromosomal	0.723	0.277	NODE_255_length_993_cov_5.41157
KP28872	256	chromosomal	0.744	0.256	NODE_256_length_992_cov_1.70383
KP28872	257	chromosomal	0.702	0.298	NODE_257_length_984_cov_3.56009
KP28872	258	chromosomal	0.656	0.344	NODE_258_length_971_cov_2.56376
KP28872	259	chromosomal	0.723	0.277	NODE_259_length_936_cov_2.4156
KP28872	26	chromosomal	0.98	0.02	NODE_26_length_85140_cov_41.6301
KP28872	260	chromosomal	0.664	0.336	NODE_260_length_932_cov_2.53567
KP28872	261	chromosomal	0.792	0.208	NODE_261_length_930_cov_4.11723
KP28872	262	chromosomal	0.76	0.24	NODE_262_length_927_cov_6.07294
KP28872	263	chromosomal	0.62	0.38	NODE_263_length_915_cov_2.45107
KP28872	264	chromosomal	0.6	0.4	NODE_264_length_904_cov_2.3821
KP28872	265	chromosomal	0.626	0.374	NODE_265_length_900_cov_1.78493
KP28872	266	chromosomal	0.701	0.299	NODE_266_length_894_cov_5.80416
KP28872	267	chromosomal	0.777	0.223	NODE_267_length_890_cov_7.55474
KP28872	268	chromosomal	0.745	0.255	NODE_268_length_885_cov_5.6349
KP28872	269	chromosomal	0.594	0.406	NODE_269_length_885_cov_2.22772
KP28872	27	chromosomal	0.966	0.034	NODE_27_length_84436_cov_34.0821
KP28872	270	chromosomal	0.714	0.286	NODE_270_length_848_cov_2.89883
KP28872	271	chromosomal	0.596	0.404	NODE_271_length_821_cov_1.82661
KP28872	272	chromosomal	0.687	0.313	NODE_272_length_820_cov_4.68102
KP28872	273	plasmid	0	1	NODE_273_length_820_cov_145.094
KP28872	274	chromosomal	0.691	0.309	NODE_274_length_818_cov_3.00405
KP28872	275	chromosomal	0.621	0.379	NODE_275_length_798_cov_2.01664
KP28872	276	chromosomal	0.707	0.293	NODE_276_length_791_cov_4.34734
KP28872	277	chromosomal	0.591	0.409	NODE_277_length_775_cov_2.47421
KP28872	278	chromosomal	0.948	0.052	NODE_278_length_757_cov_141.529
KP28872	279	chromosomal	0.64	0.36	NODE_279_length_754_cov_1.9099

KP28872	28	chromosomal	0.959	0.041	NODE_28_length_77896_cov_39.5339
KP28872	280	chromosomal	0.705	0.295	NODE_280_length_744_cov_4.69565
KP28872	281	chromosomal	0.724	0.276	NODE_281_length_741_cov_2.61145
KP28872	282	chromosomal	0.567	0.433	NODE_282_length_740_cov_2.03017
KP28872	283	chromosomal	0.652	0.348	NODE_283_length_727_cov_31.3
KP28872	284	chromosomal	0.719	0.281	NODE_284_length_715_cov_3.05172
KP28872	285	chromosomal	0.571	0.429	NODE_285_length_715_cov_2.26019
KP28872	286	chromosomal	0.722	0.278	NODE_286_length_708_cov_3.27575
KP28872	287	chromosomal	0.586	0.414	NODE_287_length_700_cov_2.76244
KP28872	288	plasmid	0.5	0.5	NODE_288_length_683_cov_0.942244
KP28872	289	chromosomal	0.708	0.292	NODE_289_length_682_cov_1.20661
KP28872	29	chromosomal	0.981	0.019	NODE_29_length_76370_cov_41.0225
KP28872	290	chromosomal	0.68	0.32	NODE_290_length_669_cov_1.36824
KP28872	291	chromosomal	0.647	0.353	NODE_291_length_669_cov_40.9949
KP28872	292	chromosomal	0.629	0.371	NODE_292_length_668_cov_2.16244
KP28872	293	chromosomal	0.639	0.361	NODE_293_length_666_cov_2.71986
KP28872	294	chromosomal	0.621	0.379	NODE_294_length_664_cov_2.30153
KP28872	295	chromosomal	0.601	0.399	NODE_295_length_664_cov_1.65247
KP28872	296	chromosomal	0.552	0.448	NODE_296_length_643_cov_3.37809
KP28872	297	chromosomal	0.73	0.27	NODE_297_length_632_cov_2.66486
KP28872	298	chromosomal	0.599	0.401	NODE_298_length_625_cov_2.48723
KP28872	299	chromosomal	0.514	0.486	NODE_299_length_621_cov_4.38051
KP28872	3	chromosomal	1	0	NODE_3_length_260172_cov_39.2366
KP28872	30	chromosomal	0.962	0.038	NODE_30_length_71673_cov_98.3973
KP28872	300	chromosomal	0.508	0.492	NODE_300_length_619_cov_2.56458
KP28872	301	chromosomal	0.861	0.139	NODE_301_length_610_cov_78.94
KP28872	302	chromosomal	0.599	0.401	NODE_302_length_609_cov_2.67857
KP28872	303	chromosomal	0.557	0.443	NODE_303_length_609_cov_2.17857
KP28872	304	plasmid	0.474	0.526	NODE_304_length_607_cov_48.9057
KP28872	305	chromosomal	0.639	0.361	NODE_305_length_585_cov_3.99016
KP28872	306	chromosomal	0.756	0.244	NODE_306_length_558_cov_3.24948
KP28872	307	chromosomal	0.765	0.235	NODE_307_length_528_cov_1.62749
KP28872	308	chromosomal	0.617	0.383	NODE_308_length_518_cov_1.26077
KP28872	309	chromosomal	0.66	0.34	NODE_309_length_508_cov_2.96752
KP28872	31	chromosomal	0.959	0.041	NODE_31_length_62746_cov_96.3854
KP28872	310	chromosomal	0.66	0.34	NODE_310_length_506_cov_2.04895
KP28872	311	chromosomal	0.671	0.329	NODE_311_length_505_cov_3.07944
KP28872	312	plasmid	0.099	0.901	NODE_312_length_491_cov_90.2609
KP28872	313	chromosomal	0.576	0.424	NODE_313_length_488_cov_3.29197
KP28872	314	chromosomal	0.663	0.337	NODE_314_length_479_cov_24.3333
KP28872	315	chromosomal	0.611	0.389	NODE_315_length_462_cov_1.29091
KP28872	316	chromosomal	0.668	0.332	NODE_316_length_454_cov_1.76127
KP28872	317	chromosomal	0.688	0.312	NODE_317_length_447_cov_3.09459
KP28872	318	chromosomal	0.559	0.441	NODE_318_length_445_cov_1.20924
KP28872	319	chromosomal	0.606	0.394	NODE_319_length_436_cov_2.8468
KP28872	32	chromosomal	0.987	0.013	NODE_32_length_58974_cov_37.9615
KP28872	320	chromosomal	0.623	0.377	NODE_320_length_436_cov_2.14485
KP28872	321	chromosomal	0.625	0.375	NODE_321_length_428_cov_1.66382
KP28872	322	chromosomal	0.617	0.383	NODE_322_length_427_cov_2.62571
KP28872	323	chromosomal	0.682	0.318	NODE_323_length_422_cov_2.51304
KP28872	324	chromosomal	0.715	0.285	NODE_324_length_418_cov_4.22287
KP28872	325	chromosomal	0.574	0.426	NODE_325_length_405_cov_3.60671
KP28872	326	chromosomal	0.661	0.339	NODE_326_length_395_cov_0.981132
KP28872	327	chromosomal	0.679	0.321	NODE_327_length_394_cov_0.974763
KP28872	328	chromosomal	0.65	0.35	NODE_328_length_386_cov_30.9256
KP28872	329	chromosomal	0.564	0.436	NODE_329_length_385_cov_0.987013
KP28872	33	chromosomal	0.907	0.093	NODE_33_length_50217_cov_28.9361
KP28872	330	chromosomal	0.642	0.358	NODE_330_length_381_cov_1.06908
KP28872	331	chromosomal	0.712	0.288	NODE_331_length_380_cov_0.953795
KP28872	332	chromosomal	0.677	0.323	NODE_332_length_380_cov_2.28383
KP28872	333	chromosomal	0.642	0.358	NODE_333_length_377_cov_0.986667
KP28872	334	chromosomal	0.658	0.342	NODE_334_length_374_cov_1.6431
KP28872	335	chromosomal	0.618	0.382	NODE_335_length_374_cov_3.61616
KP28872	336	chromosomal	0.642	0.358	NODE_336_length_373_cov_1.01351
KP28872	337	chromosomal	0.687	0.313	NODE_337_length_373_cov_3.30405
KP28872	338	chromosomal	0.668	0.332	NODE_338_length_368_cov_1.51546
KP28872	339	chromosomal	0.682	0.318	NODE_339_length_368_cov_1.34708
KP28872	34	plasmid	0.038	0.962	NODE_34_length_45797_cov_21.1749

KP28872	340	chromosomal	0.597	0.403	NODE_340_length_367_cov_0.975862
KP28872	341	chromosomal	0.559	0.441	NODE_341_length_366_cov_2.06574
KP28872	342	chromosomal	0.613	0.387	NODE_342_length_360_cov_1.08127
KP28872	343	chromosomal	0.659	0.341	NODE_343_length_359_cov_2.20922
KP28872	344	chromosomal	0.597	0.403	NODE_344_length_358_cov_1.13167
KP28872	345	chromosomal	0.644	0.356	NODE_345_length_358_cov_1.32028
KP28872	346	chromosomal	0.695	0.305	NODE_346_length_357_cov_1.81071
KP28872	347	chromosomal	0.597	0.403	NODE_347_length_357_cov_0.985714
KP28872	348	chromosomal	0.677	0.323	NODE_348_length_356_cov_2.17921
KP28872	349	chromosomal	0.686	0.314	NODE_349_length_352_cov_2.09455
KP28872	35	plasmid	0.019	0.981	NODE_35_length_42433_cov_19.7452
KP28872	350	chromosomal	0.659	0.341	NODE_350_length_351_cov_2.08394
KP28872	351	chromosomal	0.613	0.387	NODE_351_length_350_cov_1.85348
KP28872	352	chromosomal	0.622	0.378	NODE_352_length_348_cov_0.9631
KP28872	353	chromosomal	0.634	0.366	NODE_353_length_346_cov_3.5948
KP28872	354	chromosomal	0.622	0.378	NODE_354_length_345_cov_1.08209
KP28872	355	chromosomal	0.578	0.422	NODE_355_length_344_cov_1.01873
KP28872	356	chromosomal	0.678	0.322	NODE_356_length_343_cov_2.13534
KP28872	357	chromosomal	0.623	0.377	NODE_357_length_338_cov_1.2069
KP28872	358	chromosomal	0.842	0.158	NODE_358_length_338_cov_145.402
KP28872	359	chromosomal	0.682	0.318	NODE_359_length_336_cov_1.0888
KP28872	36	chromosomal	0.975	0.025	NODE_36_length_40905_cov_37.1967
KP28872	360	plasmid	0.294	0.706	NODE_360_length_332_cov_27.4275
KP28872	361	chromosomal	0.689	0.311	NODE_361_length_303_cov_40.4027
KP28872	362	chromosomal	0.585	0.415	NODE_362_length_217_cov_38.4714
KP28872	363	chromosomal	0.724	0.276	NODE_363_length_207_cov_92.3923
KP28872	364	chromosomal	0.715	0.285	NODE_364_length_202_cov_48.192
KP28872	365	chromosomal	0.744	0.256	NODE_365_length_201_cov_32.6452
KP28872	366	chromosomal	0.653	0.347	NODE_366_length_197_cov_56.5833
KP28872	367	chromosomal	0.582	0.418	NODE_367_length_188_cov_72.2973
KP28872	368	chromosomal	0.641	0.359	NODE_368_length_188_cov_49.2793
KP28872	369	chromosomal	0.578	0.422	NODE_369_length_186_cov_34.8257
KP28872	37	plasmid	0.133	0.867	NODE_37_length_37136_cov_21.0137
KP28872	370	chromosomal	0.71	0.29	NODE_370_length_182_cov_99.4476
KP28872	371	chromosomal	0.615	0.385	NODE_371_length_177_cov_66.07
KP28872	372	chromosomal	0.637	0.363	NODE_372_length_176_cov_26.3131
KP28872	373	chromosomal	0.617	0.383	NODE_373_length_157_cov_42.575
KP28872	374	chromosomal	0.716	0.284	NODE_374_length_156_cov_107.114
KP28872	375	chromosomal	0.71	0.29	NODE_375_length_156_cov_177.709
KP28872	376	chromosomal	0.588	0.412	NODE_376_length_152_cov_40.2933
KP28872	377	chromosomal	0.608	0.392	NODE_377_length_152_cov_24
KP28872	378	chromosomal	0.62	0.38	NODE_378_length_142_cov_84.4154
KP28872	379	chromosomal	0.602	0.398	NODE_379_length_121_cov_173.364
KP28872	38	chromosomal	0.997	0.003	NODE_38_length_34549_cov_40.0918
KP28872	380	chromosomal	0.751	0.249	NODE_380_length_120_cov_1.62791
KP28872	381	chromosomal	0.751	0.249	NODE_381_length_120_cov_30.3721
KP28872	382	chromosomal	0.668	0.332	NODE_382_length_109_cov_42.2812
KP28872	383	chromosomal	0.615	0.385	NODE_383_length_101_cov_117.625
KP28872	384	chromosomal	0.632	0.368	NODE_384_length_96_cov_105.368
KP28872	385	chromosomal	0.649	0.351	NODE_385_length_89_cov_32.6667
KP28872	386	chromosomal	0.627	0.373	NODE_386_length_87_cov_41.3
KP28872	387	chromosomal	0.675	0.325	NODE_387_length_85_cov_39
KP28872	388	chromosomal	0.772	0.228	NODE_388_length_85_cov_329.5
KP28872	389	chromosomal	0.66	0.34	NODE_389_length_79_cov_181.5
KP28872	39	chromosomal	0.77	0.23	NODE_39_length_34472_cov_31.157
KP28872	390	chromosomal	0.847	0.153	NODE_390_length_78_cov_76
KP28872	391	chromosomal	0.583	0.417	NODE_391_length_78_cov_121
KP28872	4	chromosomal	1	0	NODE_4_length_230310_cov_35.9925
KP28872	40	chromosomal	0.909	0.091	NODE_40_length_33913_cov_38.9698
KP28872	41	chromosomal	0.646	0.354	NODE_41_length_31841_cov_27.2008
KP28872	42	chromosomal	0.932	0.068	NODE_42_length_29764_cov_38.9923
KP28872	43	chromosomal	0.944	0.056	NODE_43_length_28468_cov_34.8087
KP28872	44	chromosomal	0.994	0.006	NODE_44_length_26346_cov_38.1109
KP28872	45	chromosomal	0.771	0.229	NODE_45_length_23398_cov_27.2035
KP28872	46	chromosomal	0.665	0.335	NODE_46_length_23195_cov_39.9896
KP28872	47	chromosomal	0.574	0.426	NODE_47_length_22463_cov_32.9732
KP28872	48	chromosomal	0.952	0.048	NODE_48_length_20303_cov_42.5318
KP28872	49	chromosomal	0.906	0.094	NODE_49_length_19579_cov_39.8777

KP28872	5	chromosomal	0.995	0.005	NODE_5_length_228449_cov_35.4333
KP28872	50	chromosomal	0.547	0.453	NODE_50_length_19359_cov_4.40763
KP28872	51	chromosomal	0.867	0.133	NODE_51_length_19046_cov_43.0785
KP28872	52	plasmid	0.009	0.991	NODE_52_length_16943_cov_14.2677
KP28872	53	chromosomal	0.77	0.23	NODE_53_length_15431_cov_4.48815
KP28872	54	plasmid	0.436	0.564	NODE_54_length_14967_cov_35.5692
KP28872	55	chromosomal	0.831	0.169	NODE_55_length_14763_cov_38.155
KP28872	56	chromosomal	0.901	0.099	NODE_56_length_13828_cov_37.5022
KP28872	57	chromosomal	0.895	0.105	NODE_57_length_13789_cov_32.8689
KP28872	58	plasmid	0.103	0.897	NODE_58_length_13687_cov_13.536
KP28872	59	plasmid	0.081	0.919	NODE_59_length_11614_cov_21.6892
KP28872	6	chromosomal	0.998	0.002	NODE_6_length_203863_cov_36.4848
KP28872	60	chromosomal	0.864	0.136	NODE_60_length_10594_cov_4.70533
KP28872	61	chromosomal	0.728	0.272	NODE_61_length_10396_cov_4.66276
KP28872	62	plasmid	0.43	0.57	NODE_62_length_10267_cov_4.3949
KP28872	63	chromosomal	0.911	0.089	NODE_63_length_9588_cov_33.8295
KP28872	64	chromosomal	0.724	0.276	NODE_64_length_8827_cov_4.46914
KP28872	65	chromosomal	0.737	0.263	NODE_65_length_8825_cov_4.01235
KP28872	66	chromosomal	0.83	0.17	NODE_66_length_8614_cov_4.06958
KP28872	67	chromosomal	0.722	0.278	NODE_67_length_7982_cov_37.0061
KP28872	68	chromosomal	0.857	0.143	NODE_68_length_7826_cov_34.0514
KP28872	69	chromosomal	0.832	0.168	NODE_69_length_7821_cov_4.72314
KP28872	7	chromosomal	0.996	0.004	NODE_7_length_203049_cov_34.8131
KP28872	70	plasmid	0.202	0.798	NODE_70_length_7688_cov_20.5504
KP28872	71	plasmid	0.443	0.557	NODE_71_length_7445_cov_3.36767
KP28872	72	chromosomal	0.882	0.118	NODE_72_length_7312_cov_4.60705
KP28872	73	chromosomal	0.691	0.309	NODE_73_length_6967_cov_5.51466
KP28872	74	plasmid	0.052	0.948	NODE_74_length_6916_cov_24.628
KP28872	75	chromosomal	0.673	0.327	NODE_75_length_6686_cov_6.00999
KP28872	76	plasmid	0.042	0.958	NODE_76_length_6551_cov_10.9166
KP28872	77	plasmid	0.239	0.761	NODE_77_length_6167_cov_22.7044
KP28872	78	chromosomal	0.591	0.409	NODE_78_length_5964_cov_25.4296
KP28872	79	plasmid	0.224	0.776	NODE_79_length_5859_cov_25.647
KP28872	8	chromosomal	0.993	0.007	NODE_8_length_190620_cov_41.9811
KP28872	80	chromosomal	0.88	0.12	NODE_80_length_5449_cov_4.15004
KP28872	81	chromosomal	0.815	0.185	NODE_81_length_5391_cov_3.85566
KP28872	82	chromosomal	0.893	0.107	NODE_82_length_5263_cov_4.15947
KP28872	83	chromosomal	0.898	0.102	NODE_83_length_5250_cov_4.607
KP28872	84	plasmid	0.037	0.963	NODE_84_length_5212_cov_29.0715
KP28872	85	plasmid	0.324	0.676	NODE_85_length_5208_cov_3.69577
KP28872	86	chromosomal	0.925	0.075	NODE_86_length_5160_cov_4.06532
KP28872	87	chromosomal	0.753	0.247	NODE_87_length_4901_cov_4.31219
KP28872	88	plasmid	0.36	0.64	NODE_88_length_4782_cov_3.88842
KP28872	89	plasmid	0.14	0.86	NODE_89_length_4667_cov_12.5203
KP28872	9	chromosomal	0.996	0.004	NODE_9_length_177480_cov_42.0453
KP28872	90	chromosomal	0.636	0.364	NODE_90_length_4654_cov_3.92659
KP28872	91	chromosomal	0.605	0.395	NODE_91_length_4635_cov_4.72159
KP28872	92	chromosomal	0.85	0.15	NODE_92_length_4621_cov_5.67826
KP28872	93	plasmid	0.475	0.525	NODE_93_length_4506_cov_19.8607
KP28872	94	chromosomal	0.722	0.278	NODE_94_length_4482_cov_3.9807
KP28872	95	chromosomal	0.763	0.237	NODE_95_length_4393_cov_4.24351
KP28872	96	chromosomal	0.747	0.253	NODE_96_length_4307_cov_26.1305
KP28872	97	chromosomal	0.844	0.156	NODE_97_length_4213_cov_4.23042
KP28872	98	chromosomal	0.811	0.189	NODE_98_length_4107_cov_3.78983
KP28872	99	chromosomal	0.814	0.186	NODE_99_length_4104_cov_3.77204
KP28873	1	chromosomal	1	0	NODE_1_length_355714_cov_24.3492
KP28873	10	chromosomal	0.99	0.01	NODE_10_length_159341_cov_22.3163
KP28873	100	chromosomal	0.606	0.394	NODE_100_length_557_cov_19.8833
KP28873	101	chromosomal	0.663	0.337	NODE_101_length_479_cov_18.2313
KP28873	102	chromosomal	0.888	0.112	NODE_102_length_447_cov_80.5811
KP28873	103	chromosomal	0.609	0.391	NODE_103_length_433_cov_34.0197
KP28873	104	chromosomal	0.65	0.35	NODE_104_length_386_cov_23.89
KP28873	105	chromosomal	0.673	0.327	NODE_105_length_365_cov_19.0278
KP28873	106	chromosomal	0.876	0.124	NODE_106_length_338_cov_100.479
KP28873	107	chromosomal	0.586	0.414	NODE_107_length_333_cov_51.2734
KP28873	108	chromosomal	0.688	0.312	NODE_108_length_301_cov_28.8348
KP28873	109	plasmid	0.497	0.503	NODE_109_length_291_cov_13.3178
KP28873	11	chromosomal	0.988	0.012	NODE_11_length_156887_cov_20.8155

KP28873	110	plasmid	0.275	0.725	NODE_110_length_277_cov_12.07
KP28873	111	chromosomal	0.709	0.291	NODE_111_length_269_cov_22.9531
KP28873	112	chromosomal	0.768	0.232	NODE_112_length_251_cov_41.092
KP28873	113	chromosomal	0.645	0.355	NODE_113_length_241_cov_20.1159
KP28873	114	chromosomal	0.764	0.236	NODE_114_length_215_cov_25.7609
KP28873	115	chromosomal	0.724	0.276	NODE_115_length_207_cov_20.0692
KP28873	116	chromosomal	0.634	0.366	NODE_116_length_205_cov_22.1172
KP28873	117	chromosomal	0.622	0.378	NODE_117_length_195_cov_33.1102
KP28873	118	chromosomal	0.585	0.415	NODE_118_length_195_cov_81.0513
KP28873	119	chromosomal	0.627	0.373	NODE_119_length_193_cov_17.3276
KP28873	12	chromosomal	0.999	0.001	NODE_12_length_148201_cov_25.4964
KP28873	120	chromosomal	0.553	0.447	NODE_120_length_188_cov_20.027
KP28873	121	chromosomal	0.62	0.38	NODE_121_length_185_cov_26.4722
KP28873	122	chromosomal	0.625	0.375	NODE_122_length_183_cov_28.2547
KP28873	123	chromosomal	0.586	0.414	NODE_123_length_179_cov_42.1667
KP28873	124	chromosomal	0.654	0.346	NODE_124_length_169_cov_26.4457
KP28873	125	plasmid	0.48	0.52	NODE_125_length_153_cov_10.6711
KP28873	126	chromosomal	0.568	0.432	NODE_126_length_150_cov_18.7123
KP28873	127	chromosomal	0.62	0.38	NODE_127_length_133_cov_37.6
KP28873	128	chromosomal	0.607	0.393	NODE_128_length_128_cov_50.6471
KP28873	129	chromosomal	0.735	0.265	NODE_129_length_120_cov_24.8372
KP28873	13	chromosomal	0.996	0.004	NODE_13_length_144891_cov_25.4965
KP28873	130	plasmid	0.242	0.758	NODE_130_length_118_cov_14.1951
KP28873	131	plasmid	0.253	0.747	NODE_131_length_114_cov_13.7568
KP28873	132	chromosomal	0.619	0.381	NODE_132_length_107_cov_36.9333
KP28873	133	chromosomal	0.618	0.382	NODE_133_length_104_cov_29.8889
KP28873	134	chromosomal	0.615	0.385	NODE_134_length_101_cov_88.7083
KP28873	135	chromosomal	0.586	0.414	NODE_135_length_96_cov_17.5263
KP28873	136	plasmid	0.371	0.629	NODE_136_length_95_cov_25.8889
KP28873	137	chromosomal	0.636	0.364	NODE_137_length_94_cov_20.4706
KP28873	138	plasmid	0.198	0.802	NODE_138_length_92_cov_13.6
KP28873	139	chromosomal	0.649	0.351	NODE_139_length_89_cov_25.75
KP28873	14	chromosomal	0.99	0.01	NODE_14_length_139101_cov_22.6223
KP28873	140	chromosomal	0.623	0.377	NODE_140_length_88_cov_54.2727
KP28873	141	chromosomal	0.772	0.228	NODE_141_length_85_cov_77.75
KP28873	142	plasmid	0.239	0.761	NODE_142_length_81_cov_12
KP28873	143	chromosomal	0.657	0.343	NODE_143_length_81_cov_68.75
KP28873	144	chromosomal	0.573	0.427	NODE_144_length_79_cov_48
KP28873	145	chromosomal	0.744	0.256	NODE_145_length_79_cov_46
KP28873	146	chromosomal	0.833	0.167	NODE_146_length_78_cov_19
KP28873	147	chromosomal	0.583	0.417	NODE_147_length_78_cov_72
KP28873	15	chromosomal	0.982	0.018	NODE_15_length_126807_cov_24.1097
KP28873	16	chromosomal	0.962	0.038	NODE_16_length_126338_cov_20.7626
KP28873	17	chromosomal	0.992	0.008	NODE_17_length_108526_cov_21.4616
KP28873	18	chromosomal	0.996	0.004	NODE_18_length_105981_cov_24.7089
KP28873	19	chromosomal	0.629	0.371	NODE_19_length_104776_cov_21.3949
KP28873	2	chromosomal	0.998	0.002	NODE_2_length_292612_cov_23.6881
KP28873	20	chromosomal	0.996	0.004	NODE_20_length_100509_cov_26.3039
KP28873	21	chromosomal	0.986	0.014	NODE_21_length_99297_cov_25.1373
KP28873	22	chromosomal	0.999	0.001	NODE_22_length_94236_cov_25.7175
KP28873	23	chromosomal	0.975	0.025	NODE_23_length_90092_cov_24.1148
KP28873	24	chromosomal	0.991	0.009	NODE_24_length_88599_cov_25.2866
KP28873	25	chromosomal	1	0	NODE_25_length_86605_cov_24.9395
KP28873	26	chromosomal	0.981	0.019	NODE_26_length_85248_cov_25.2298
KP28873	27	chromosomal	0.965	0.035	NODE_27_length_84334_cov_20.8779
KP28873	28	chromosomal	0.981	0.019	NODE_28_length_76440_cov_26.1857
KP28873	29	chromosomal	0.752	0.248	NODE_29_length_72276_cov_23.3432
KP28873	3	chromosomal	0.984	0.016	NODE_3_length_232248_cov_20.9202
KP28873	30	chromosomal	0.962	0.038	NODE_30_length_71671_cov_23.8972
KP28873	31	chromosomal	0.944	0.056	NODE_31_length_68754_cov_21.9329
KP28873	32	plasmid	0.012	0.988	NODE_32_length_63961_cov_15.848
KP28873	33	chromosomal	0.959	0.041	NODE_33_length_62746_cov_23.7741
KP28873	34	chromosomal	0.987	0.013	NODE_34_length_58972_cov_23.2093
KP28873	35	chromosomal	0.95	0.05	NODE_35_length_58461_cov_23.7086
KP28873	36	chromosomal	0.96	0.04	NODE_36_length_49594_cov_23.9551
KP28873	37	plasmid	0.019	0.981	NODE_37_length_42433_cov_13.9087
KP28873	38	chromosomal	0.874	0.126	NODE_38_length_40271_cov_21.0941
KP28873	39	plasmid	0.133	0.867	NODE_39_length_37143_cov_14.4745

KP28873	4	chromosomal	1	0	NODE_4_length_230166_cov_22.0558
KP28873	40	chromosomal	0.997	0.003	NODE_40_length_34549_cov_26.4556
KP28873	41	chromosomal	0.77	0.23	NODE_41_length_34470_cov_22.0205
KP28873	42	chromosomal	0.909	0.091	NODE_42_length_33910_cov_22.6375
KP28873	43	chromosomal	0.645	0.355	NODE_43_length_32801_cov_22.1719
KP28873	44	chromosomal	0.934	0.066	NODE_44_length_29764_cov_24.4033
KP28873	45	chromosomal	0.944	0.056	NODE_45_length_28468_cov_23.9624
KP28873	46	chromosomal	0.994	0.006	NODE_46_length_26346_cov_26.3913
KP28873	47	chromosomal	0.898	0.102	NODE_47_length_26159_cov_21.7188
KP28873	48	chromosomal	0.768	0.232	NODE_48_length_24358_cov_20.5077
KP28873	49	chromosomal	0.665	0.335	NODE_49_length_23195_cov_25.9969
KP28873	5	chromosomal	0.996	0.004	NODE_5_length_210342_cov_20.2479
KP28873	50	chromosomal	0.593	0.407	NODE_50_length_23028_cov_24.0916
KP28873	51	chromosomal	0.951	0.049	NODE_51_length_20303_cov_26.2921
KP28873	52	chromosomal	0.887	0.113	NODE_52_length_19654_cov_24.193
KP28873	53	chromosomal	0.867	0.133	NODE_53_length_19046_cov_23.7692
KP28873	54	plasmid	0.436	0.564	NODE_54_length_14967_cov_22.6888
KP28873	55	chromosomal	0.895	0.105	NODE_55_length_13789_cov_20.5869
KP28873	56	plasmid	0.081	0.919	NODE_56_length_11614_cov_14.9374
KP28873	57	plasmid	0.107	0.893	NODE_57_length_8499_cov_12.848
KP28873	58	chromosomal	0.853	0.147	NODE_58_length_7896_cov_23.201
KP28873	59	plasmid	0.136	0.864	NODE_59_length_7362_cov_14.3065
KP28873	6	chromosomal	0.999	0.001	NODE_6_length_203642_cov_23.1249
KP28873	60	chromosomal	0.892	0.108	NODE_60_length_7357_cov_25.5636
KP28873	61	plasmid	0.079	0.921	NODE_61_length_7303_cov_11.0559
KP28873	62	plasmid	0.13	0.87	NODE_62_length_6896_cov_15.4263
KP28873	63	plasmid	0.026	0.974	NODE_63_length_6424_cov_15.2625
KP28873	64	plasmid	0.239	0.761	NODE_64_length_6167_cov_19.0051
KP28873	65	plasmid	0.037	0.963	NODE_65_length_5212_cov_21.6952
KP28873	66	chromosomal	0.839	0.161	NODE_66_length_4731_cov_20.3616
KP28873	67	plasmid	0.14	0.86	NODE_67_length_4667_cov_12.3839
KP28873	68	plasmid	0.099	0.901	NODE_68_length_4510_cov_10.5267
KP28873	69	plasmid	0.481	0.519	NODE_69_length_4504_cov_14.6869
KP28873	7	chromosomal	0.994	0.006	NODE_7_length_190612_cov_25.6666
KP28873	70	plasmid	0.129	0.871	NODE_70_length_3827_cov_34.1757
KP28873	71	chromosomal	0.855	0.145	NODE_71_length_3823_cov_25.3526
KP28873	72	chromosomal	0.781	0.219	NODE_72_length_3299_cov_23.4863
KP28873	73	chromosomal	0.976	0.024	NODE_73_length_3231_cov_240.086
KP28873	74	plasmid	0.26	0.74	NODE_74_length_2909_cov_16.2479
KP28873	75	plasmid	0.397	0.603	NODE_75_length_2751_cov_13.0079
KP28873	76	plasmid	0.198	0.802	NODE_76_length_2615_cov_14.184
KP28873	77	chromosomal	0.645	0.355	NODE_77_length_2565_cov_10.3593
KP28873	78	chromosomal	0.64	0.36	NODE_78_length_2438_cov_23.4312
KP28873	79	plasmid	0.491	0.509	NODE_79_length_2263_cov_16.6102
KP28873	8	chromosomal	0.997	0.003	NODE_8_length_177371_cov_24.7878
KP28873	80	plasmid	0.139	0.861	NODE_80_length_1915_cov_135.554
KP28873	81	plasmid	0.197	0.803	NODE_81_length_1912_cov_15.3292
KP28873	82	chromosomal	0.983	0.017	NODE_82_length_1888_cov_42.6052
KP28873	83	chromosomal	0.984	0.016	NODE_83_length_1711_cov_237.209
KP28873	84	plasmid	0.291	0.709	NODE_84_length_1632_cov_10.2695
KP28873	85	chromosomal	0.761	0.239	NODE_85_length_1531_cov_39.2221
KP28873	86	chromosomal	0.999	0.001	NODE_86_length_1445_cov_95.0972
KP28873	87	plasmid	0.016	0.984	NODE_87_length_1356_cov_25.154
KP28873	88	plasmid	0.088	0.912	NODE_88_length_1221_cov_260.223
KP28873	89	plasmid	0.357	0.643	NODE_89_length_1196_cov_199.941
KP28873	9	chromosomal	0.998	0.002	NODE_9_length_174527_cov_22.6858
KP28873	90	chromosomal	0.794	0.206	NODE_90_length_1173_cov_45.0465
KP28873	91	chromosomal	0.506	0.494	NODE_91_length_1169_cov_9.91484
KP28873	92	chromosomal	0.848	0.152	NODE_92_length_1096_cov_31.4779
KP28873	93	plasmid	0.131	0.869	NODE_93_length_909_cov_14.929
KP28873	94	plasmid	0.231	0.769	NODE_94_length_1060_cov_45.5117
KP28873	95	chromosomal	0.996	0.004	NODE_95_length_1013_cov_53.4893
KP28873	96	plasmid	0	1	NODE_96_length_820_cov_102.855
KP28873	97	chromosomal	0.647	0.353	NODE_97_length_669_cov_27.049
KP28873	98	chromosomal	0.657	0.343	NODE_98_length_661_cov_11.1404
KP28873	99	plasmid	0.473	0.527	NODE_99_length_607_cov_38.2604

Tabela S.6. Wirulomy izolatów *Klebsiella pneumoniae* o numerach 49K i 50K wykryte przy użyciu baz danych Institut Pasteur MLST

Virulence category	Virulence system	Nazwa genu	ContigID	Pident	Length	Mismatch	Capopen	Qstart	Qend	Sstart	Send	Evalue	Bitscore	Coverage	Prediction		
Iron acquisition: Siderophore based uptake systems	Fep-Ent System: Enterobactin synthesis	entA	NODE_15_length_126807_cov_40.3171	99,746	786	2	0	1	786	81996	81211	0.0	1441	100	chromosomal		
		entB	NODE_15_length_126807_cov_40.3171	99,531	852	4	0	1	852	82817	81966	0.0	1552	100	chromosomal		
		entC	NODE_15_length_126807_cov_40.3171	99,495	1188	6	0	1	1188	85635	84448	0.0	2161	100	chromosomal		
		entD	NODE_15_length_126807_cov_40.3171	99,683	630	2	0	1	630	99007	99636	0.0	1153	100	chromosomal		
		entE	NODE_15_length_126807_cov_40.3171	98,632	1608	22	0	1	1608	84438	82831	0.0	2848	100	chromosomal		
		entF	NODE_15_length_126807_cov_40.3171	99,304	3882	27	0	1	3882	95002	91121	0.0	7020	100	chromosomal		
		fepA	NODE_15_length_126807_cov_40.3171	99,192	2229	18	0	1	2229	96712	98940	0.0	4017	100	chromosomal		
		fepB	NODE_15_length_126807_cov_40.3171	99,583	960	4	0	1	960	88812	86771	0.0	1751	100	chromosomal		
		fepC	NODE_15_length_126807_cov_40.3171	99,245	795	6	0	1	795	90262	91056	0.0	1435	100	chromosomal		
		fepD	NODE_15_length_126807_cov_40.3171	99,702	1008	3	0	1	1008	88269	89276	0.0	1845	100	chromosomal		
		fepG	NODE_15_length_126807_cov_40.3171	98,892	993	11	0	1	993	89273	90265	0.0	1773	100	chromosomal		
		fes	NODE_15_length_126807_cov_40.3171	98,925	1209	13	0	1	1209	96452	95244	0.0	2161	100	chromosomal		
		IroA System: Salmochelin synthesis		ybDA	NODE_15_length_126807_cov_40.3171	99,114	1242	11	0	1	1242	88156	86915	0.0	2233	100	chromosomal
iroE	NODE_1_length_389262_cov_34.9217			99,145	936	8	0	1	936	303138	304093	0.0	1685	100	chromosomal		
High-pathogenicity island: Yersiniabactin synthesis		ybTA	NODE_50_length_19359_cov_4.40763	99,583	960	4	0	1	960	16122	15163	0.0	1751	100	chromosomal		
		ybTE	NODE_62_length_10267_cov_4.3949	99,747	1578	4	0	1	1578	7644	6067	0.0	2892	100	plasmid		
		ybTP	NODE_50_length_19359_cov_4.40763	99,723	1803	5	0	1	1803	16289	18091	0.0	3302	100	chromosomal		
		ybTS	NODE_130_length_3021_cov_4.33356	97,360	1212	32	0	1	1212	1810	3021	0.0	2061	93	chromosomal		
		ybTf	NODE_62_length_10267_cov_4.3949	99,627	804	3	0	1	804	8451	7648	0.0	1469	100	plasmid		
		ybTU	NODE_62_length_10267_cov_4.3949	99,311	1161	8	0	1	1161	9608	8448	0.0	2100	100	plasmid		
		ybTX	NODE_130_length_3021_cov_4.33356	97,792	1404	31	0	1	1404	379	2422	0.0	2422	100	chromosomal		
		irp1	NODE_50_length_19359_cov_4.40763	99,715	8777	25	0	1	8777	8777	1	0.0	16070	92	chromosomal		
		irp2	NODE_50_length_19359_cov_4.40763	99,722	6108	17	0	1	6108	14972	8865	0.0	11186	100	chromosomal		
		fyuA	NODE_62_length_10267_cov_4.3949	99,753	2022	5	0	1	2022	5936	3915	0.0	3707	100	plasmid		
		Fimbriae Type 1 fimbriae		fimA	NODE_9_length_177480_cov_42.0453	99,454	549	3	0	1	549	65635	65087	0.0	998	100	chromosomal
				fimB	NODE_9_length_177480_cov_42.0453	99,340	606	4	0	1	606	67795	67190	0.0	1098	100	chromosomal
				fimC	NODE_9_length_177480_cov_42.0453	99,862	726	1	0	1	726	64451	63726	0.0	1336	100	chromosomal
fimD	NODE_9_length_177480_cov_42.0453			99,622	2646	10	0	1	2646	63677	61032	0.0	4831	100	chromosomal		
fimE	NODE_9_length_177480_cov_42.0453			98,686	609	8	0	1	609	66724	66116	0.0	1081	100	chromosomal		
fimF	NODE_9_length_177480_cov_42.0453			99,058	531	5	0	1	531	61024	60494	0.0	953	100	chromosomal		
fimG	NODE_9_length_177480_cov_42.0453			99,601	501	2	0	1	501	60481	59981	0.0	915	100	chromosomal		
fimH	NODE_9_length_177480_cov_42.0453			99,230	909	7	0	1	909	59966	59058	0.0	1640	100	chromosomal		
fimI	NODE_9_length_177480_cov_42.0453			99,371	636	4	0	1	636	65115	64480	0.0	1153	100	chromosomal		
fimK	NODE_9_length_177480_cov_42.0453			98,873	1242	14	0	1	1242	58890	57649	0.0	2217	100	chromosomal		
mrkA	NODE_9_length_177480_cov_42.0453			99,836	609	1	0	1	609	72460	73068	0.0	1120	100	chromosomal		
mrkB	NODE_9_length_177480_cov_42.0453			99,858	702	1	0	1	702	73164	73865	0.0	1291	100	chromosomal		
mrkC	NODE_9_length_177480_cov_42.0453			99,759	2487	6	0	1	2487	73877	76363	0.0	4560	100	chromosomal		

Virulence category	Virulence system	Virulence gene	Nazwa genu	ContigID	Pident	Length	Mismatch	Gapopen	Qstart	Qend	Start	Send	Evalue	Bitscore	Coverage	Prediction
E. coli Common Pilus		mrkD	KP28872	NODE_9_length_177480_cov_42.0453	99.900	996	1	0	1	996	76354	77349	0.0	1834	100	chromosomal
		mrkE	KP28872	NODE_9_length_177480_cov_42.0453	99.843	636	1	0	1	636	77963	77998	0.0	1170	100	chromosomal
		mrkH	KP28872	NODE_9_length_177480_cov_42.0453	99.719	711	2	0	1	711	80193	79483	0.0	1303	100	chromosomal
		mrkI	KP28872	NODE_9_length_177480_cov_42.0453	99.487	585	3	0	1	585	79477	78983	0.0	1064	100	chromosomal
		mrkJ	KP28872	NODE_9_length_177480_cov_42.0453	99.861	717	1	0	1	717	78749	78033	0.0	1319	100	chromosomal
		ecpE (yagV)	KP28872	NODE_2_length_292640_cov_38.7891	85.695	755	106	2	3	756	281878	281125	0.0	795	99	chromosomal
		ecpD (yagW)	KP28872	NODE_2_length_292640_cov_38.7891	88.936	1645	180	2	1	1644	283447	281804	0.0	2028	100	chromosomal
		ecpC (yagX)	KP28872	NODE_2_length_292640_cov_38.7891	87.540	2528	311	4	1	2526	285962	283437	0.0	2920	100	chromosomal
		ecpB (yagY)	KP28872	NODE_2_length_292640_cov_38.7891	87.892	669	81	0	1	669	286656	285988	0.0	787	100	chromosomal
		ecpA (yagZ)	KP28872	NODE_2_length_292640_cov_38.7891	90.068	584	58	0	1	584	287302	286719	0.0	758	99	chromosomal
Lipopolysaccharide	Ooantigen: <i>ub</i> cluster	ecpR (yagK)	KP28872	NODE_102_length_3897_cov_4.10759	86.403	581	79	0	11	591	287957	287377	0.0	636	98	chromosomal
		wzm	KP28872	NODE_102_length_3897_cov_4.10759	99.227	776	6	0	5	780	3897	3122	0.0	1400	99	chromosomal
		wzt	KP28872	NODE_102_length_3897_cov_4.10759	99.055	741	7	0	1	741	3122	2382	0.0	1330	100	chromosomal
		wbbM	KP28872	NODE_102_length_3897_cov_4.10759	99.314	1896	13	0	1	1896	2366	471	0.0	3430	100	chromosomal
Capsule polysaccharide		wbbO	KP28872	NODE_210_length_1423_cov_3.57727	99.214	1018	8	0	1	1018	1095	78	0.0	1836	90	chromosomal
		galF	KP28872	NODE_14_length_131869_cov_35.6086	98.885	897	10	0	1	897	38178	39074	0.0	1602	100	chromosomal
		cpsACP	KP28872	NODE_14_length_131869_cov_35.6086	94.436	629	35	0	1	629	39467	40095	0.0	968	99	chromosomal
		wzi	KP28872	NODE_14_length_131869_cov_35.6086	87.574	1521	183	3	1	1515	40975	42495	0.0	1757	100	chromosomal
		grd	KP28872	NODE_14_length_131869_cov_35.6086	95.665	1407	61	0	1	1407	5541	56847	0.0	2261	100	chromosomal
		manC	KP28872	NODE_124_length_3183_cov_4.47778	98.093	1416	27	0	1	1416	435	1850	0.0	2466	100	chromosomal
		manB	KP28872	NODE_124_length_3183_cov_4.47778	98.551	1311	19	0	1	1311	1873	3183	0.0	2316	96	chromosomal
		ugd	KP28872	NODE_14_length_131869_cov_35.6086	96.829	1167	37	0	1	1167	60702	61868	0.0	1951	100	chromosomal
		resA	KP28872	NODE_5_length_228449_cov_35.4333	100.000	624	0	0	1	624	11111	10488	0.0	1153	100	chromosomal
		resB	KP28872	NODE_6_length_203863_cov_36.4848	99.693	651	2	0	1	651	124328	123678	0.0	1192	100	chromosomal
Outer membrane proteins	Outer membrane protein A	ompA	KP28872	NODE_4_length_230310_cov_35.9925	84.220	1071	139	10	1	1041	13380	134880	0.0	1014	100	chromosomal
	Efflux pump	acrA	KP28872	NODE_2_length_292640_cov_38.7891	99.414	1194	7	0	1	1194	128013	129206	0.0	2167	100	chromosomal
Type VI secretion system (T6SS)	Type VI secretion system (T6SS)	acrB	KP28872	NODE_2_length_292640_cov_38.7891	99.809	3147	6	0	1	3147	129229	132375	0.0	5779	100	chromosomal
		tsaJ (scIN)	KP28872	NODE_7_length_203049_cov_34.8131	99.816	543	1	0	1	543	197069	196527	0.0	998	100	chromosomal
		tsaF	KP28872	NODE_7_length_203049_cov_34.8131	99.373	1755	11	0	1	1755	199850	198096	0.0	3181	100	chromosomal
		tsaG	KP28872	NODE_7_length_203049_cov_34.8131	99.448	1086	6	0	1	1086	198132	197047	0.0	1973	100	chromosomal
		tsaK (vasE)	KP28872	NODE_33_length_50217_cov_28.9361	100.000	1344	0	0	1	1344	8133	6790	0.0	2483	100	chromosomal
		tsaB (vipA)	KP28872	NODE_33_length_50217_cov_28.9361	99.797	492	1	0	1	492	10221	9730	0.0	904	100	chromosomal
		tsaC (vipB)	KP28872	NODE_33_length_50217_cov_28.9361	100.000	1545	0	0	1	1545	9687	8143	0.0	2854	100	chromosomal
		tsaH (doLU)	KP28872	NODE_33_length_50217_cov_28.9361	100.000	690	0	0	1	690	6793	6104	0.0	1275	100	chromosomal
		tsaI (cpV)	KP28872	NODE_33_length_50217_cov_28.9361	100.000	2655	0	0	1	2655	3640	986	0.0	4903	100	chromosomal
		tsaM (lcmF)	KP28872	NODE_125_length_3140_cov_31.1877	97.528	3034	75	0	391	3424	3140	107	0.0	5188	89	chromosomal
Paar repeat-containing protein	Paar repeat-containing protein	tsaA (impA)	KP28872	NODE_193_length_1737_cov_3.98253	100.000	380	0	0	29	408	1737	1358	0.0	702	93	chromosomal
		tsaD (hcp)	KP28872	NODE_33_length_50217_cov_28.9361	100.000	492	0	0	1	492	4396	3905	0.0	909	100	chromosomal
		KPHS_23120	case_1	NODE_111_length_3762_cov_3.86893	100.000	258	0	0	1	258	1844	1587	2.45e-135	477	100	chromosomal
		flhI	KP28872	NODE_143_length_2713_cov_5.15175	92.697	534	33	4	1	531	643	113	0.0	765	100	chromosomal
Iron acquisition	Fep-Ent System: Enterobactin synthesis	entA	KP28873	NODE_15_length_126807_cov_24.1097	99.746	786	2	0	1	786	81996	81211	0.0	1441	100	chromosomal
	Siderophore based uptake systems	entB	KP28873	NODE_15_length_126807_cov_24.1097	99.531	852	4	0	1	852	82817	81966	0.0	1552	100	chromosomal
		entC	KP28873	NODE_15_length_126807_cov_24.1097	99.495	1188	6	0	1	1188	85635	84448	0.0	2161	100	chromosomal

Virulence category	Virulence system	Virulence gene	Nazwa genu	ContigID	Pident	Length	Mismatch	Gapopen	Qstart	Qend	Start	Send	Evalue	Bitscore	Coverage	Prediction	
Fep-Ent System: Enterobactin receptor	entD		KP28873	NODE_15_length_126807_cov_24.1097	99.683	630	2	0	1	630	99007	99636	0.0	1153	100	chromosomal	
	entE		KP28873	NODE_15_length_126807_cov_24.1097	98.632	1608	22	0	1	1608	84438	82831	0.0	2848	100	chromosomal	
	entF		KP28873	NODE_15_length_126807_cov_24.1097	99.304	3882	27	0	1	3882	95002	91121	0.0	7020	100	chromosomal	
	fepA		KP28873	NODE_15_length_126807_cov_24.1097	99.192	2229	18	0	1	2229	96712	98940	0.0	4017	100	chromosomal	
	fepB		KP28873	NODE_15_length_126807_cov_24.1097	99.583	960	4	0	1	960	85812	86771	0.0	1751	100	chromosomal	
	fepC		KP28873	NODE_15_length_126807_cov_24.1097	99.245	795	6	0	1	795	90262	91056	0.0	1435	100	chromosomal	
	fepD		KP28873	NODE_15_length_126807_cov_24.1097	99.702	1008	3	0	1	1008	88269	89276	0.0	1845	100	chromosomal	
	fepE		KP28873	NODE_15_length_126807_cov_24.1097	98.892	993	11	0	1	993	89273	90265	0.0	1773	100	chromosomal	
	fes		KP28873	NODE_15_length_126807_cov_24.1097	98.925	1209	13	0	1	1209	96452	95244	0.0	2161	100	chromosomal	
	ybdA		KP28873	NODE_15_length_126807_cov_24.1097	99.114	1242	11	0	1	1242	88156	86915	0.0	2233	100	chromosomal	
	iroE		KP28873	NODE_3_length_232248_cov_20.9202	99.145	936	8	0	1	936	86105	85170	0.0	1685	100	chromosomal	
	IroA System: Salmochelin synthesis	fimA		KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.454	549	3	0	1	549	65635	65087	0.0	998	100	chromosomal
		fimB		KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.340	606	4	0	1	606	67995	67190	0.0	1098	100	chromosomal
fimC			KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.862	726	1	0	1	726	64451	63726	0.0	1336	100	chromosomal	
fimD			KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.622	2646	10	0	1	2646	63677	61032	0.0	4831	100	chromosomal	
fimE			KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	98.686	609	8	0	1	609	66724	66116	0.0	1081	100	chromosomal	
fimF			KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.058	531	5	0	1	531	61024	60494	0.0	953	100	chromosomal	
fimG			KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.401	501	3	0	1	501	60481	59981	0.0	909	100	chromosomal	
fimH			KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.230	909	7	0	1	909	59966	59058	0.0	1640	100	chromosomal	
fimI			KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.371	636	4	0	1	636	65115	64480	0.0	1153	100	chromosomal	
fimK			KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	98.873	1242	14	0	1	1242	58890	57649	0.0	2217	100	chromosomal	
mrkA			KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.836	609	1	0	1	609	72460	73068	0.0	1120	100	chromosomal	
mrkB			KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.858	702	1	0	1	702	73164	73865	0.0	1291	100	chromosomal	
mrkC			KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.759	2487	6	0	1	2487	73877	76363	0.0	4560	100	chromosomal	
mrkD		KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.900	996	1	0	1	996	76354	77349	0.0	1834	100	chromosomal		
mrkE		KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.843	636	1	0	1	636	77363	77998	0.0	1170	100	chromosomal		
mrkH		KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.719	711	2	0	1	711	80193	79483	0.0	1303	100	chromosomal		
mrkI		KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.487	585	3	0	1	585	79477	78993	0.0	1064	100	chromosomal		
mrkJ		KP28873	NODE_8_length_173371_cov_24.7878	99.861	717	1	0	1	717	78749	78033	0.0	1319	100	chromosomal		
ecpE (yagV)		KP28873	NODE_2_length_292612_cov_23.6881	85.695	755	106	2	3	756	281738	280985	0.0	795	99	chromosomal		
ecpD (yagW)		KP28873	NODE_2_length_292612_cov_23.6881	88.936	1645	180	2	1	1644	283307	281664	0.0	2028	100	chromosomal		
ecpC (yagX)		KP28873	NODE_2_length_292612_cov_23.6881	87.540	2528	311	4	1	2526	285822	283297	0.0	2920	100	chromosomal		
ecpB (yagY)		KP28873	NODE_2_length_292612_cov_23.6881	87.892	669	81	0	1	669	286516	285848	0.0	787	100	chromosomal		
ecpA (yagZ)		KP28873	NODE_2_length_292612_cov_23.6881	90.068	584	58	0	1	584	287162	286579	0.0	758	99	chromosomal		
ecpR (yagG)		KP28873	NODE_2_length_292612_cov_23.6881	86.403	581	79	0	1	591	287817	287237	0.0	636	98	chromosomal		
gafI		KP28873	NODE_29_length_22276_cov_23.3432	98.885	897	1	0	1	897	34325	33429	0.0	1602	100	chromosomal		
cpsACP		KP28873	NODE_29_length_22276_cov_23.3432	94.436	629	35	0	1	629	33036	32408	0.0	968	99	chromosomal		
wzi		KP28873	NODE_29_length_22276_cov_23.3432	87.574	1521	183	3	1	1515	31528	30008	0.0	1757	100	chromosomal		
gnd		KP28873	NODE_29_length_22276_cov_23.3432	95.665	1407	61	0	1	1407	17062	15656	0.0	2261	100	chromosomal		
ugd		KP28873	NODE_29_length_22276_cov_23.3432	96.829	1167	37	0	1	1167	11801	10635	0.0	1951	100	chromosomal		
resA		KP28873	NODE_31_length_68754_cov_21.9329	100.000	624	0	0	1	624	57644	58267	0.0	1153	100	chromosomal		
resB		KP28873	NODE_6_length_206642_cov_23.1249	99.693	651	2	0	1	651	124107	123457	0.0	1192	100	chromosomal		

Virulence category	Virulence system	Virulence gene	Nazwa genu	ContigID	Pident	Length	Mismatch	Gapopen	Qstart	Qend	Start	Send	Evalue	Bitscore	Coverage	Prediction	
Outer membrane proteins	Outer membrane protein A Efflux pump	ompA	KP28873	NODE_4_length_230166_cov_22.0558	84.220	1071	139	10	1	1041	96357	95287	0.0	101.4	100	chromosomal	
		acrA	KP28873	NODE_2_length_292612_cov_23.6881	99.414	1194	7	0	1	1194	127873	129066	0.0	2167	100	chromosomal	
Type VI secretion system (T6SS)	Type VI secretion system (T6SS)	acrB	KP28873	NODE_2_length_292612_cov_23.6881	99.809	3147	6	0	1	3147	129089	132235	0.0	5779	100	chromosomal	
		tsxM (lcmF)	KP28873	NODE_5_length_210342_cov_20.2479	97.403	3080	80	0	345	3424	4185	7264	0.0	5245	90	chromosomal	
		tsxJ (scn)	KP28873	NODE_5_length_210342_cov_20.2479	99.816	543	1	0	0	1	543	13274	13816	0.0	998	100	chromosomal
		tsxF	KP28873	NODE_5_length_210342_cov_20.2479	99.373	1755	11	0	1	1755	10493	12347	0.0	3181	100	chromosomal	
		tsxG	KP28873	NODE_5_length_210342_cov_20.2479	99.448	1086	6	0	1	1086	12211	13296	0.0	1973	100	chromosomal	

Tabela S.7. Geny oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe wykryte za pomocą ResFinder 3.1 z izolatów *K. pneumoniae* numer 49K i 50K

Nazwa genu	Database	Resistance gene	Identify	Query / Template length	ContigID	Position in contig	Predicted phenotype	Accession number	Prediction
KP28872	aminoglycoside and fluoroquinolone	aac(6)-Ib-cr	100	600 / 600	NODE_133_length_2976_cov_15.4984	2264..2863	Fluoroquinolone and aminoglycoside resistance	DQ303918	plasmid
KP28872	aminoglycoside	aadA1	100	792 / 792	NODE_84_length_5212_cov_29.0715	1825..2616	Aminoglycoside resistance	JX185132	plasmid
KP28872	aminoglycoside	aadA16	99.65	846 / 846	NODE_133_length_2976_cov_15.4984	83..928	Aminoglycoside resistance	EU675686	plasmid
KP28872	aminoglycoside	aph(3'')-Ib	100	804 / 804	NODE_52_length_16943_cov_14.2677	9480..10283	Aminoglycoside resistance Alternate name: aph(3'')-Ib	AF321551	plasmid
KP28872	aminoglycoside	aph(6)-Id	100	837 / 837	NODE_52_length_16943_cov_14.2677	10283..11119	Aminoglycoside resistance Alternate name: aph(6)-Id	M28829	plasmid
KP28872	beta-lactam (ESBL)	blaCTX-M-15	100	876 / 876	NODE_52_length_16943_cov_14.2677	15522..16397	Beta-lactam resistance Alternate name: LOE-1	AY044436	plasmid
KP28872	beta-lactam	blaOXA-1	100	831 / 831	NODE_199_length_1632_cov_11.409	657..1487	Beta-lactam resistance	HQ170510	plasmid
KP28872	beta-lactam	blaSHV-187	99.88	867 / 867	NODE_1_length_389262_cov_34.9217	381172..382038	Beta-lactam resistance	LN515533	chromosomal
KP28872	beta-lactam	blaTEM-1B	100	861 / 861	NODE_52_length_16943_cov_14.2677	11840..12700	Beta-lactam resistance Alternate name: RblaTEM-1	AY458016	plasmid
KP28872	fosfomycin	fosA	99.29	420 / 420	NODE_3_length_260172_cov_39.2366	14164..14583	Fosfomycin resistance	ACW001000079	chromosomal
KP28872	phenicol	catA1	99.85	660 / 660	NODE_189_length_1787_cov_15.7918	428..1087	Phenicol resistance	V00622	plasmid
KP28872	phenicol	catB3	100	442 / 633	NODE_199_length_1632_cov_11.409	78..519	Phenicol resistance	AJ009818	plasmid
KP28872	quinolone	oqxA	100	1176 / 1176	NODE_31_length_62746_cov_96.3854	3669..4844	Quinolone resistance	EU3770913	chromosomal
KP28872	quinolone	oqxB	99.27	3153 / 3153	NODE_31_length_62746_cov_96.3854	4868..8020	Quinolone resistance	EU3770913	chromosomal
KP28872	rifampicin	ARR-3	100	453 / 453	NODE_133_length_2976_cov_15.4984	1715..2167	Rifampicin resistance	JF806499	plasmid
KP28872	sulphonamide	sulI	100	840 / 840	NODE_84_length_5212_cov_29.0715	481..1320	Sulphonamide resistance	U12338	plasmid
KP28872	sulphonamide	sul2	100	816 / 816	NODE_52_length_16943_cov_14.2677	8604..9419	Sulphonamide resistance	AY034138	plasmid
KP28872	trimethoprim	dfrA1	99.79	474 / 474	NODE_84_length_5212_cov_29.0715	2709..3182	Trimethoprim resistance	AF203818	plasmid
KP28872	trimethoprim	dfrA14	100	474 / 474	NODE_76_length_6551_cov_10.9166	5988..6461	Trimethoprim resistance	KF921535	plasmid
KP28872	trimethoprim	dfrA27	100	474 / 474	NODE_133_length_2976_cov_15.4984	1109..1582	Trimethoprim resistance	F1459817	plasmid
KP28873	aminoglycoside and fluoroquinolone	aac(6)-Ib-cr	100	600 / 600	NODE_74_length_2909_cov_16.2479	2264..2863	Fluoroquinolone and aminoglycoside resistance	DQ303918	plasmid
KP28873	aminoglycoside	aadA1	100	792 / 792	NODE_65_length_5212_cov_21.6952	1825..2616	Aminoglycoside resistance	JX185132	plasmid
KP28873	aminoglycoside	aadA16	99.65	846 / 846	NODE_74_length_2909_cov_16.2479	83..928	Aminoglycoside resistance	EU675686	plasmid
KP28873	aminoglycoside	aph(3'')-Ib	100	804 / 804	NODE_61_length_7303_cov_11.0559	5119..5922	Aminoglycoside resistance Alternate name: aph(3'')-Ib	AF321551	plasmid
KP28873	aminoglycoside	aph(6)-Id	100	837 / 837	NODE_61_length_7303_cov_11.0559	4283..5119	Aminoglycoside resistance Alternate name: aph(6)-Id	M28829	plasmid

Nazwa genu	Database	Resistance gene	Identity	Query / Template length	ContigID	Position in contig	Predicted phenotype	Accession number	Prediction
KP28873	beta-lactam	blaOXA-1	100	831 / 831	NODE_84_length_1632_cov_10.2095	657..1487	Beta-lactam resistance	HQ170510	plasmid
KP28873	beta-lactam	blaSHV-187	99.88	867 / 867	NODE_3_length_232248_cov_20.9202	7225..8091	Beta-lactam resistance	LN515533	chromosomal
KP28873	beta-lactam	blaTEM-1B	100	861 / 861	NODE_61_length_7303_cov_11.0559	2702..3562	Beta-lactam resistance A lernate name: RblaTEM-1	AY458016	plasmid
KP28873	fosfomicyn	fosA	99.29	420 / 420	NODE_1_length_355714_cov_24.3492	14164..14583	Fosfomicyn resistance	ACW001000079	chromosomal
KP28873	phenicol	catA1	99.85	660 / 660	NODE_81_length_1912_cov_15.3292	546..1205	Phenicol resistance	V00622	plasmid
KP28873	phenicol	catB3	100	442 / 633	NODE_84_length_1632_cov_10.2095	78..319	Phenicol resistance	AJ009818	plasmid
KP28873	quinolone	qnrA	100	1176 / 1176	NODE_33_length_62746_cov_23.7741	3669..4844	Quinolone resistance	EU370913	chromosomal
KP28873	quinolone	qnrB	99.27	3153 / 3153	NODE_33_length_62746_cov_23.7741	4868..8020	Quinolone resistance	EU370913	chromosomal
KP28873	riřampicyn	ARR-3	100	453 / 453	NODE_74_length_2909_cov_16.2479	1715..2167	Riřampicyn resistance	JF806499	plasmid
KP28873	sulphonamide	sulI	100	840 / 840	NODE_65_length_5212_cov_21.6952	481..1320	Sulphonamide resistance	U12338	plasmid
KP28873	sulphonamide	sul2	100	816 / 816	NODE_61_length_7303_cov_11.0559	5983..6798	Sulphonamide resistance	AY034138	plasmid
KP28873	trimethoprim	dhfrA1	99.79	474 / 474	NODE_65_length_5212_cov_21.6952	2709..3182	Trimethoprim resistance	AF203818	plasmid
KP28873	trimethoprim	dhfrA27	100	474 / 474	NODE_74_length_2909_cov_16.2479	1109..1582	Trimethoprim resistance	F4459817	plasmid

Tabela S.8. Profile replikonów plazmidów i rezystencyjny genomów *K. pneumoniae* pochodzących z bazy Patric, ujętych w badaniu szczepów *K. pneumoniae* produkujących karbapenemazy NDM-1

Nr izolatu wg GenBank	Material	Rok	Kraj	ST	Profile replikonów plazmidów	aminoglikozydy		Nabyte geny oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe	fenikole	sulfonamidy	tetracyklina	trimetoprim
						β-laktamy	fluorchinolony					
KN2323	mocz	2011	Chiny	11	blaKPC-2	-	aadA2	-	catA2	-	-	-
KN7016	krew	2011	Chiny	11	blaCTX-M-55	-	-	qnrB4, qnrS1	-	catA2	-	-
KN7018	mocz	2011	Chiny	11	blaKPC-2, blaCTX-M-65, blaTEM-1	aac(6)-Ib-cr, aadA16, aadA2	-	aac(6)-Ib-cr	catA2	catA2	catA2	catA2
KN21570	mocz	2012	Niemcy	11	blaCTX-M-15, blaOXA-48	aac(3)-IIa, aph(3)-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-Id, aadA16, aadA2	-	qnrS1	catA2	catA2	catA2	catA2
KN20456	mocz	2013	Grecja	11	blaCTX-M-15, blaOXA-1, 48	aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(3)-Ia, aadA2	-	-	catA1	catA1	catA1	catA1
KN21217	mocz	2013	Słowacja	11	blaTEM-1	aac(6)-Ib, aac(3)-IIa, aadA2	-	qnrB4	catA1	catA1	catA1	catA1
KN21224	mocz	2013	Czechy	11	blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1	aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(6)-Id	-	-	-	catA1	catA1	catA1
KN21306	mocz	2013	Estonia	11	blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1	aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA2	-	-	-	catA1	catA1	catA1
KN21320	mocz	2013	Polska	11	blaCTX-M-15, blaOXA-1, 9, blaTEM-1	aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA2	-	-	-	catA1	catA1	catA1
KN21341	mocz	2013	Polska	11	blaCTX-M-15, blaOXA-1	aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA2	-	-	-	catA1	catA1	catA1
KN21352	mocz	2013	Francja	11	blaOXA-1	aac(6)-Ib-cr, aph(3)-Ia, aadA2	-	-	-	catA1, catB3	catA1	catA1
KN21378	mocz	2013	Słowacja	11	blaCTX-M-15, blaOXA-1, 9, blaTEM-1	aac(6)-Ib, aac(3)-IIa	-	-	-	-	-	-
KN21400	mocz	2013	Słowacja	11	blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1	aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(3)-Ib, aph(6)-Id, aadA2	-	-	-	catA1	catA1	catA1

Nr izolatu wg GenBank	Material	Rok	Kraj	ST	Profil replikonów plazmidów	β-laktamy	aminoglikozydy	Nabyte geny oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe fluorochinolony	fenikole	sulfonamidy	tetracyklina	trimetoprim
KN21403	miez	2013	Słowacja	I1	FIB(K), FII(K), FIA(HI), R	blaCTX-M-15, blaOXA-1-9, blaTEM-1	aac(6)-Ib-cr, aadA2	aac(6)-Ib-cr, qnrB4	catA1	sul1	-	dfp-A12, dfp-A14
KN21411	miez	2013	Czechy	I1	Col4401, FIB(K)	blaCTX-M-15, blaTEM-1	aac(6)-Ib-cr	aac(6)-Ib-cr	catA1	-	tet(D)	-
KN21412	miez	2013	Czechy	I1	FIB(K), R	blaCTX-M-15, blaOXA-1	aadA2	aac(6)-Ib-cr, aac(3)-Ila, aph(3)-Ib, aph(6)-Ia, aadA2	catA1	sul1	-	dfp-A12
KN21420	miez	2013	Czechy	I1	FIB(K), FII(K)	blaOXA-1	aac(6)-Ib-cr	aac(6)-Ib-cr, qnrB4	catA1, catB3	sul1	-	-
KN21445	miez	2013	Estonia	I1	FIB(K), FII(K), R	blaOXA-1	aac(6)-Ib-cr, aph(3)-Ia, aadA2	aac(6)-Ib-cr, qnrB4	catA1, catB3	sul1	-	dfp-A12
KN21447	miez	2013	Polska	I1	FIA(HI), R	blaCTX-M-15, blaOXA-1-9, blaTEM-1	aac(6)-Ib, aac(3)-Ila, aadA2	aac(6)-Ib-cr, qnrB4	catA1	sul1	-	dfp-A12, dfp-A14
KN21466	miez	2013	Estonia	I1	FIB(K), FII(K), MI, R	blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1	aac(6)-Ib-cr, aadA2	aac(6)-Ib-cr	catA1, catB3	sul1	-	dfp-A12
KN21507	miez	2013	Malta	I1	Col4401, FIB(K), L, N	blaCTX-M-15, blaOXA-1-48	aac(6)-Ib-cr, aac(3)-Ila, aph(3)-Ia, aadA2	aac(6)-Ib-cr	catA1	-	-	dfp-A12, dfp-A14
KN21511	miez	2013	Malta	I1	Col4401, FIB(K), FII(K), L, N	blaOXA-1-48	aac(6)-Ib-cr, aac(3)-Ila, aph(3)-Ia	aac(6)-Ib-cr	catA1	-	-	dfp-A14
KN21932	miez	2013	Włochy	I1	Col(BSS12), ColRNAL, FIB(K), FII(K), R	blaTEM-1	aac(3)-Ila, aph(4)-Ia, aadA2	-	catA1	sul3	tet(A)	-
KN21967	miez	2013	Hiszpania	I1	FIB(K), FII(K), R	blaCTX-M-15, blaOXA-1-48	aac(6)-Ib-cr, aac(3)-Ila, aph(3)-Ia, aadA2	aac(6)-Ib-cr, qnrB1	catA1	sul1	-	dfp-A12
KN22010	miez	2013	Węgry	I1	FIA(HI), FIB(K), FII(K), R	blaCTX-M-15, blaOXA-9, blaTEM-1	aac(6)-Ib, aac(3)-Ila, aadA2	aac(6)-Ib-cr, qnrB4	catA1	sul1	-	dfp-A12
KN22370	miez	2013	USA	I1	ColRNAL, FIB(K), FII(K)	blaKPC-2, blaCTX-M-15, blaOXA-9, blaTEM-1	aph(3)-Ia, aadA2	-	catA1	sul1, sul3	-	dfp-A12
KN22384	miez	2013	USA	I1	ColRNAL, FIB(K), FII(K), R	blaKPC-2, blaCTX-M-15, blaOXA-9, blaTEM-1	aph(3)-Ia, aadA2	-	catA1	sul1, sul3	-	dfp-A12
KN22431	miez	2013	USA	I1	ColRNAL, FIB(K), FIB(pOH), FII(K), R, X3	blaKPC-2, blaCTX-M-15, blaOXA-9, blaTEM-1	aac(3)-Ila, aph(3)-Ia, aph(4)-Ia, aadA2	-	catA1	sul1, sul3	-	dfp-A12
KN22452	miez	2013	USA	I1	ColRNAL, FIB(K), MI, R	blaOXA-2	ant(2)-Ia	-	-	sul1	-	-
KN5636	kal	2013	Grecja	I1	Col4401, C, FIB(K), FII(K), L	blaCTX-M-15, blaOXA-1-48, blaTEM-1	aac(6)-Ib-cr, aac(3)-Ila, ant(2)-Ia, aph(3)-Ib, aph(3)-Ia, aph(6)-Ia, aadA2	aac(6)-Ib-cr	catA1	sul2	tet(A), tet(C)	dfp-A12
KN942	miez	2013	USA	I1	ColRNAL, FIB(K), FII(K), R, XI	blaKPC-2, blaCTX-M-15, blaOXA-9, blaTEM-1	aph(3)-Ia, aadA2	-	catA1	sul1, sul2, sul3	-	dfp-A12
KN976	miez	2013	USA	I1	ColRNAL, FIB(K), FII(K), R, XI	blaKPC-2, blaCTX-M-15, blaOXA-9, blaTEM-1	aph(3)-Ia, aadA2	-	catA1	sul1, sul2, sul3	-	dfp-A12
KN20499	miez	2014	Hiszpania	I1	FIB(K), N, R	blaOXA-9, blaTEM-1	aac(6)-Ib-cr, aadA16, aph(3)-Ib, aph(6)-Ia, aadA2	aac(6)-Ib-cr, qnrB19, qnrB6, qnrB4	catB3	sul1	-	dfp-A27
KN20569	miez	2014	Portugalia	I1	ColRNAL, R, XI	blaCTX-M-1, blaOXA-1	aac(6)-Ib-cr, aph(3)-Ia	aac(6)-Ib-cr, qnrB4	catB3	sul1	-	-
KN20662	miez	2014	Portugalia	I1	R	blaOXA-1	aac(6)-Ib-cr, aph(3)-Ia	aac(6)-Ib-cr, qnrB4	catB3	sul1	tet(A)	-
KN20804	miez	2014	Rumunia	I1	R	blaOXA-1	aac(6)-Ib-cr, aadA2	aac(6)-Ib-cr, qnrB4	catB3	sul1	tet(A)	-
KN21778	miez	2014	Belgia	I1	FIB(K), FII(K), FIA(HI), L, R	blaCTX-M-15, blaOXA-48-9, blaTEM-1	aac(6)-Ib, aac(3)-Ila, aadA2	-	catA1	sul1	-	dfp-A12
KN21221	miez	2014	Swacja	I1	ColRNAL, FIB(K), FII(K), R, C	blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1	aac(6)-Ib-cr, aac(3)-Ila, aph(3)-Ib, aph(6)-Ia	aac(6)-Ib-cr	catA1	sul2	tet(D)	-
KN21316	discharge from the lower respiratory tract	2014	Polska	I1	FIB(K), FII(K), FIA(HI), R	blaCTX-M-15, blaOXA-1-9, blaTEM-1	aac(3)-Ila, aadA2	aac(6)-Ib-cr, qnrB1	catA1	sul1	-	dfp-A12, dfp-A14
KN21317	miez	2014	Polska	I1	FIB(K), FII(K), FIA(HI), R	blaCTX-M-15, blaOXA-1-9, blaTEM-1	aac(6)-Ib, aac(3)-Ila, aadA2	-	catA1	sul1	-	dfp-A12, dfp-A14

Nr izolatu wg GenBank	Material	Rok	Kraj	ST	Profil replikonów plazmidów	β-laktamy	aminoglikozydy	Nabyte geny oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe	fenikole	sulfonamidy	tetracyklina	trimetoprim
								antybiotyki fluorochinolony				
								makrolidowe, linkozamidowe i streptograminy				
KN21321	moesz	2014	Polska	II	FIB(K), FII(K), FIA(HI), R	blaCTX-M-15, blaOXA-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA2, qnrB4</i>	<i>aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA2</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12, dfpA14</i>
KN21331	Wymaz z dotychczas oddzielonych	2014	Polska	II	FIB(K), FII(K), FIA(HI), R	blaCTX-M-15, blaOXA-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA2</i>	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12, dfpA14</i>
KN21333	moesz	2014	Polska	II	FIB(K), FII(K), FIA(HI), R, M2	blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA2</i>	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN21345	moesz	2014	Polska	II	FIB(K), FII(K), FIA(HI), R	blaCTX-M-15, blaOXA-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA2</i>	<i>aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA2</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN21376	moesz	2014	Słowacja	II	FIB(K), FII(K), R	blaOXA-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aadA2</i>	<i>aac(6)-Ib-cr, aadA2</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN21384	moesz	2014	Słowacja	II	Co1440, FIB(K), FII(K), FIA(HI), R	blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA2</i>	<i>aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA2</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12, dfpA14</i>
KN21387	moesz	2014	Słowacja	II	FIB(K), FII(K), R	blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aph(3)-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	-	<i>sul2</i>	<i>tet(D)</i>	-
KN21388	moesz	2014	Słowacja	II	FIB(K), FII(K), R	blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(3)-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	<i>catA1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(D)</i>	-
KN21391	moesz	2014	Słowacja	II	FIB(K), FII(K), FIA(HI), R	blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA2</i>	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12, dfpA14</i>
KN21413	moesz	2014	Francja	II	FIB(K), FII, M2, R	blaCTX-M-3, blaOXA-1, blaTEM-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aph(3)-Ib, aph(3)-Ia, aph(6)-Id</i>	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB4</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	-
KN21423	moesz	2014	Czechy	II	FIB(K), FII(K), R	blaOXA-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aph(3)-Ia</i>	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB4</i>	<i>catA1, catB3</i>	<i>sul1</i>	-	-
KN21458	moesz	2014	Polska	II	FIB(K), FII(K)	-	<i>aadA2</i>	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB4</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN21556	Wymaz z rany	2014	Niemcy	II	FIB(K), FII(K), R	blaOXA-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aph(3)-Ia, aadA2</i>	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB4</i>	<i>catA1, catB3</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN22002	moesz	2014	Węgry	II	FIA(HI), FIB(K), FII(K), R	blaCTX-M-15, blaOXA-9, blaTEM-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA2</i>	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB4</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN22572	krew	2014	Chiny	II	CoIRNAI, FII(pHN7A8), FII(B(pNDM-MAR)), I-(Gamma), R, repB	blaKPC-2, blaCTX-M-14b, blaTEM-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aadA16</i>	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	<i>catA2</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA27</i>
KN24396	moesz	2014	USA	II	CoIRNAI, FII(pHN7A8), FII(B(pNDM-MAR)), I-(Gamma), R, repB	blaKPC-3, blaTEM-1	<i>aadA2</i>	<i>qnrS1</i>	-	<i>sul1</i>	-	-
KN1002	moesz	2014	USA	II	CoIRNAI, FIB(K), FIB(pOH), R	blaKPC-2, blaCTX-M-15, blaOXA-9, blaTEM-1	<i>aph(3)-Ia, aadA2</i>	-	<i>catA1, sul3</i>	<i>sul1, sul3</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN12786	moesz	2015	Nigeria	II	CoIKP3, FIB(K), FIB(pNDM-MAR), R, X3	blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aph(3)-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB2, qnrS1</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfpA15</i>
KN19860	krew	2015	Brazylia	II	CoIRNAI, FIB(K), FII(K), N	blaKPC-2, blaCTX-M-2, blaOXA-2, blaTEM-1	<i>aac(3)-IIa, aadA2</i>	-	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN19872	kal	2015	Chiny	II	FIB(K), FIB(pKPHS1), FII(pHN7A8), R	blaKPC-2, blaCTX-M-14 blaTEM-1	-	<i>qnrS1</i>	-	<i>sul1</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfpA1</i>
KN22569	krew	2015	Chiny	II	CoIRNAI, FII(pHN7A8), FII(B(pNDM-MAR)), R, repB	blaKPC-2, blaCTX-M-147	<i>aadA2</i>	-	-	-	-	-
KN22570	krew	2015	Chiny	II	CoIRNAI, FII(pHN7A8), FII(B(pNDM-MAR)), repB	blaKPC-2, blaCTX-M-65, blaTEM-1	<i>aadA2</i>	-	-	-	-	-
KN5794	moesz	2015	Tajlandia	II	Co8282, FIB(K), FII(K), I-(Gamma), R	blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA17</i>	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB4</i>	<i>catA1, catB3</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN935	Wymaz z rany	2015	USA	II	FIA(HI), FIB(K), FII(K), M1, R	blaCTX-M-15, blaOXA-1	<i>aac(6)-Ib-cr, aac(3)-IIa, ant(2'')-Ia, aadA2</i>	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrS1</i>	-	<i>sul1</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfpA12, dfpA14</i>
KN943	moesz	2015	USA	II	CoIRNAI, FIB(K), FII(K), R	blaKPC-2, blaCTX-M-15, blaOXA-9, blaTEM-1	<i>aph(3)-Ia, aadA2</i>	-	<i>npph(A)</i>	<i>sul1, sul3</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN971	Wymaz z rany	2015	USA	II	CoIRNAI, FIB(K), FII(K), R	blaKPC-2, blaCTX-M-15, blaOXA-9, blaTEM-1	<i>aph(3)-Ia, aadA2</i>	-	<i>npph(A)</i>	<i>sul1, sul3</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN19874	kal	2016	Chiny	II	FIB(K), FIB(pKPHS1), FII(pHN7A8), R	blaKPC-2, blaCTX-M-65 blaTEM-1	-	<i>qnrS1</i>	-	<i>sul1</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfpA1</i>

Nr izolatu wg GenBank	Material	Rok	Kraj	ST	Profil replikonów plazmidów	β-laktamy	aminoglikozydy	Nabyte geny oporności na środki przeciwbiochemiczne	antybiotyki fluorochinolony	fenikole	sulfonamidy	tetracyklina	trimetoprim
KN7212	mezz	2016	Indie	11	ColKP3, FIB(pQII), FII(K), H11B(pNDM-MAR), R, repB	blaCTX-M-15, blaOXA-232, blaTEM-1	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>qnrB1</i>	-	-	<i>sul2</i>	-	-
KN7213	krewn	2016	Indie	11	ColKP3, FIB(pQII), FII(K), H11B(pNDM-MAR), R, repB	blaCTX-M-15, blaOXA-232, blaTEM-1	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>qnrB1</i>	-	-	<i>sul2</i>	-	-
KN18517	mezz	2017	USA	11	C, R	blaOXA-10	<i>aadA2</i>	-	-	-	<i>sul2</i>	-	-
KN18530	krewn	2017	USA	11	ColRNAI, FII(pHN7A8), H11B(pNDM-MAR), R, repB	blaKPC-2, blaCTX-M-65, blaTEM-1	<i>aadA2</i>	<i>qnrS1</i>	-	-	<i>catA2, sul2</i>	<i>tet(D)</i>	<i>dfpA14</i>
KN18689	kat	2017	Chiny	11	ColRNAI, FII(pHN7A8), N, R, repB	blaKPC-2, blaCTX-M-3, blaTEM-1	<i>aadA2, armA</i>	-	<i>mph(E), msr(E)</i>	<i>catB8</i>	-	-	<i>dfpA12</i>
KN18694	kat	2017	Chiny	11	FIB(K), FIB(pKPHS1), FII(pHN7A8), R	blaKPC-2, blaCTX-M-90, blaTEM-1	-	<i>qnrS1</i>	-	-	<i>sul1</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfpA1</i>
KN19873	kat	2017	Chiny	11	FIB(K), FIB(pKPHS1), FII(pHN7A8), R	blaKPC-2, blaCTX-M-90, blaTEM-1	-	<i>qnrS1</i>	-	-	<i>sul1</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfpA1</i>
KN1950	mezz	2010	Norwegia	258	ColRNAI, FIB(K), FII(K), FII(Yp), I2(Delta)	blaKPC-3, blaOXA-9	<i>aph(3'')-Ia, aadA2</i>	-	<i>mph(A)</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN13284	mezz	2012	USA	258	ColRNAI, FIB(K), FII(K), R, X3	blaKPC-2,	<i>aac(6)-Ib, aac(3)-IIa, aph(4)-Ia, aadA2</i>	-	<i>mph(A)</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1, sul3</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN5647	mezz	2012	Grecja	258	ColRNAI, FIB(K), FIB(pQII), FII(K), C, X3	blaKPC-2, blaOXA-10, 9	<i>aac(6)-Ib, ant(2'')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(3'')-Ia, aph(6)-Id, aadA2</i>	-	<i>mph(A)</i>	<i>catA1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A), tet(G)</i>	<i>dfpA12, dfpA14, dfpA23</i>
KN13096	mezz	2013	USA	258	ColRNAI, FIB(K), FIB(pQII), FII(K)	blaKPC-2, blaOXA-9	<i>aac(6)-Ib</i>	-	<i>mph(A)</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN14299	mezz	2013	USA	258	ColRNAI, X3	blaTEM-1	<i>aac(6)-Ib</i>	-	-	-	-	-	-
KN14368	mezz	2013	USA	258	ColRNAI, FIB(K), FIB(pQII), FII(K), X3	blaKPC-2, blaOXA-9	<i>aac(6)-Ib, aph(3'')-Ia</i>	-	<i>mph(A)</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN1757	mezz	2014	Australia	258	ColRNAI, FIB(K), FII(K), FIB(pQII), X3	blaKPC-2, blaOXA-9	<i>aac(6)-Ib, aph(3'')-Ia, aadA2</i>	-	<i>mph(A)</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN5623	kat	2014	Grecja	258	ColRNAI, FIB(K), FII(K), MI, X3	blaKPC-2,	<i>aac(6)-Ib, aph(3'')-Ia, aadA2</i>	-	<i>mph(A)</i>	-	<i>sul1</i>	-	<i>dfpA12</i>
KN14001	mezz	ND	USA	258	ColRNAI, FIB(K), FII(K), FII(Yp), X3	blaKPC-3, blaOXA-9, blaTEM-1	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, aadA2</i>	-	<i>mph(A)</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1, sul2</i>	-	<i>dfpA12, dfpA14</i>
KN14001	mezz	ND	USA	258	ColRNAI, FIA(pBK30683), FIB(K), X3	blaKPC-3, blaOXA-9	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	-	<i>mph(A)</i>	-	<i>sul2</i>	-	<i>dfpA14</i>
KN14001	mezz	ND	USA	258	FIA(pBK30683), FIB(K), X3	blaKPC-3,	<i>aph(3'')-Ia</i>	-	<i>mph(A)</i>	-	-	-	<i>dfpA14</i>