

Wybrane zagadnienia z zakresu mikrobiologii

Redakcja:
Alicja Danielewska
Monika Maciąg

Lublin 2019

**Wydawnictwo Naukowe TYGIEL składa serdecznie podziękowania
dla zespołu Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje
oraz merytoryczne wskazówki dla Autorów.**

Recenzentami niniejszej monografii byli:

- prof. dr hab. n. farm. Anna Malm
- dr hab. Magdalena Krauze
- dr hab. Aneta Nowakiewicz
- dr hab. inż. Grażyna Żukowska
- dr Justyna Bohacz
- dr Bożena Futoma-Kołocho
- dr Agnieszka Graczyk-Jarzynka
- dr Monika Jach
- dr Magdalena Karaś
- dr Aneta Kondrzycka-Dąda
- dr Agnieszka Kuźniar
- dr Monika Osińska-Jaroszuk
- dr Elżbieta Rusinek-Prystupa
- dr Dawid Stefaniuk

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:
Alicja Danielewska
Monika Maciąg

Projekt okładki:
Marcin Szklarczyk

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ISBN 978-83-65932-84-6

Wydawca:
Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.
ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin
www.wydawnictwo-tygiel.pl



Charakterystyka oporności *Klebsiella pneumoniae* New Delhi na karbapenemy

1. Wprowadzenie

Bakterie z gatunku *Klebsiella pneumoniae* to Gram-ujemne, nieurzęsione, nieruchliwe oraz względnie beztlenowe pałeczki, należące do rodziny *Enterobacteriaceae*. Ich naturalnym środowiskiem występowania są wody powierzchniowe, gleba, a także nosogardziel i przewód pokarmowy ssaków. Ze względu na przyczynianie się do powstawania między innymi zapalenia płuc, zakażenia układu moczowego, ropnia wątroby, a także bakteremii prowadzącej często do sepsy są one uznawane za niezwykle niebezpieczne patogeny oportunistyczne. *K. pneumoniae* odpowiedzialna jest za wywołanie wielu infekcji szpitalnych, szczególnie u osób z obniżoną odpornością [1, 2].

Nadużywanie przez dziesiątki lat antybiotyków wywarło wielką presję selekcyjną na te bakterie, co przyczyniło się do zwiększania się liczby coraz to nowych szczepów wielolekoopornych. Zjadliwość *K. pneumoniae*, wynikająca z obecności wielu czynników wirulencji oraz zdolności do tworzenia biofilmu dodatkowo sprzyja jej rozprzestrzenianiu się.

Bakterie *K. pneumoniae* New Delhi, posiadające gen oporności na karbapenemy (*bla_{NDM}*) zostały po raz pierwszy wyizolowane w 2008 roku w Szwecji od pacjenta wcześniej hospitalizowanego w Indiach [3]. Mikroorganizmy te szybko rozprzestrzeniają się po całym świecie, a od 2011 roku występują również w Polsce. Stanowią one wysokie ryzyko epidemiologiczne dlatego badania mające na celu ułatwienie różnicowania genetycznego tych szczepów oraz ich charakterystykę są niezwykle istotne [4].

Celem pracy było przedstawienie informacji na temat oporności szczepów *K. pneumoniae* New Delhi na karbapenemy oraz problemu ich rozprzestrzeniania się.

2. Oporność *Klebsiella pneumoniae* na karbapenemy

Oporność szczepów *K. pneumoniae* New Delhi na karbapenemy wynika z obecności genu *bla_{NDM}*, kodującego enzym metalo- β -laktamazę New Delhi, określaną w skrócie jako NDM (ang. *New Delhi metallo- β -lactamase*). Należy on do grupy metalo- β -laktamaz (MBL) zdolnych do hydrolizy prawie wszystkich antybiotyków β -laktamowych. Głównymi nosicielami genu *bla_{NDM}* są bakterie z gatunku *K. pneumoniae* oraz *Escherichia coli*, przy czym najbardziej rozpowszechnione są pewne typy sekwencji (ST, ang. *sequence type*). Są to odpowiednio ST11, ST14, ST15 lub ST147 dla *K. pneumoniae* oraz ST167, ST410 lub ST617 w przypadku *E. coli*.

¹ magda.fordon@gmail.com, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska.

² beata.krawczyk@pg.edu.pl, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska.

Szczepy NDM-pozytywne zostały zidentyfikowane na całym świecie, z największą częstością występowania na subkontynencie indyjskim, na Bliskim Wschodzie i na Bałkanach. Większość plazmidów niosących gen *bla_{NDM}* posiada konkretne typy replikonów, takie jak IncX3, IncFII lub IncC [4].

3. Metallo-β-laktamaza New Delhi

Enzymy zwane β-laktamazami podzielone są na klasy A, B, C oraz D ze względu na różnice w ich sekwencji aminokwasowej [5, 6]. Enzymy z klasy A, C i D posiadają w miejscu aktywnym resztę seryny, natomiast enzymy klasy B zawierają w nim jeden lub dwa jony cynku, skąd pochodzi ich nazwa – metallo-β-laktamazy (MBL).

MBL są podzielone na trzy podklasy (B1, B2 i B3). Enzymy podklasy B1 i B3 posiadają dwa jony cynku w miejscu aktywnym i wykazują szeroki zakres substratów, do których należą penicyliny, cefalosporyny oraz karbapenemy. Enzymy podklasy B2 mają z kolei tylko jeden aktywny jon cynku, podczas gdy wiązanie drugiego jonu cynku hamuje ich aktywność katalityczną. Wykazują one wąski zakres substratów, obejmujący karbapenemy, ale nie penicyliny i cefalosporyny [7, 8].

Istnieje kilka MBL należących do podklasy B2, w tym CphA z *Aeromonas hydrophila*, Sfh-1 z *Serratia fonticola* oraz ImiS z *Aeromonas veronii*. Zidentyfikowano również kilka MBL należących do podklasy B3, takich jak L1 z *Stenotrophomonas maltophilia*, AIM-1 z *Pseudomonas aeruginosa* i GOB-1 z *Elizabethkingia meningoseptica*. Jednak większość zidentyfikowanych do tej pory MBL należy do podklasy B1 [9]. Trzy najczęściej występujące w izolatach klinicznych MBL, tj. IMP (imipenemaza), VIM oraz NDM należą do podklasy B1. Geny kodujące IMP, VIM i NDM są w dużej mierze zlokalizowane na plazmidach, przez co mogą być przenoszone między szczepami bakteryjnymi na drodze transferu wertykalnego i horyzontalnego. Ma to szczególne znaczenie w rozprzestrzenianiu się tego typu oporności, zwłaszcza w środowisku szpitalnym. Sekwencja aminokwasowa enzymów NDM znacznie różni się od pozostałych MBL podklasy B1 – ich zgodność wynosi zaledwie około 34%. Z tego powodu wprowadzono dalszy podział podklasy B1 na dwie pod-podklasy (B1a i B1b), w wyniku czego NDM zaklasyfikowano do pod-podklasy B1b, a pozostałe – do B1a.

Jony cynku odgrywają kluczową rolę w działaniu wszystkich NDM. Interakcja między enzymem a substratem jest możliwa dzięki związanym w miejscu aktywnym jonom cynku. Jony te aktywują również cząsteczkę wody, z której na skutek oderwania protonu powstaje aktywny jon wodorotlenkowy. Jon ten poprzez atak nukleofilowy na atom węgla grupy karbonylowej prowadzi do hydrolizy pierścienia β-laktamu [10, 11].

Warto zwrócić uwagę na lokalizację NDM w komórce, która różni się od lokalizacji wszystkich innych MBL. NDM jest lipoproteiną, która zakotwiczona jest w zewnętrznej błonie bakterii Gram-ujemnych, co umożliwia sekwencja aminokwasowa (LSGC) ulegająca lipidacji, znajdująca się w sekwencji sygnałowej NDM [12, 13]. Wszystkie inne MBL są rozpuszczalnymi białkami periplazmatycznymi. Zakotwiczenie w błonie znacznie zwiększa stabilność NDM, nawet w warunkach niedoboru cynku, który powstaje w wyniku uwalniania białka chelatującego (kalprotektyny) przez gospodarza w miejscu zakażenia. Wynikające z tego niedobory cynku mogą zakłócać działanie MBL, takich jak NDM. Zakotwiczenie ich w błonie



ułatwia także wydzielanie tego enzymu w pęcherzykach błony zewnętrznej (OMV). Pęcherzyki zawierające NDM mogą chronić sąsiednie populacje bakterii przed działaniem związków β -laktamowych, a mogą przenosić zarówno NDM, jak i bla_{NDM} [13-15]. Jest to przyczyną szybkiego rozprzestrzeniania się zarówno bakterii *Klebsiella pneumoniae* New Delhi, jak i plazmidów niosących gen bla_{NDM} wśród coraz większej liczby mikroorganizmów.

3.1. Warianty NDM

Enzymy NDM składają się z 270 aminokwasów i zawierają dwa jony cynku w miejscu aktywnym, w którym zachodzi hydroliza antybiotyków β -laktamowych. Drugorzędową strukturę tych enzymów tworzy 9 α -helis, 17 β -kartek oraz 3 β -zakręty.

Obecnie znane są 24 warianty enzymu NDM, które powstały w wyniku różnych substytucji w obrębie sekwencji aminokwasowej. Podstawienie M154L jest najpowszechniejsze i jest obserwowane w aż 10 z 24 różnych wariantów NDM. Warianty NDM zwykle zawierają od 1 do 5 podstawień aminokwasów w porównaniu z NDM-1. NDM-18 jest wyjątkiem, ponieważ od sekwencji NDM-1 różni się jedynie obecnością tandemowego powtórzenia 5 aminokwasów (QRFGD, w pozycjach od 44 do 48 w NDM-1). Miejsce aktywne jest silnie zakonserwowane we wszystkich wariantach NDM, na co wskazuje brak substytucji aminokwasowych w jego obrębie. Jednakże niektóre warianty różnią się między sobą aktywnością wobec β -laktamów. Przykładowo, warianty zawierające substytucję V88L (NDM-5, -17, -20 i -21) wykazują zwiększoną aktywność karbapenemazy [16-19]. Wartość MIC (ang. *minimal inhibitory concentration*) ertapenemu wobec szczepów produkujących NDM-5 lub NDM-20 okazała się być 4- lub 8-krotnie wyższa niż w przypadku szczepów produkujących NDM-1 [16, 18]. Wykazano również, że NDM-17 i NDM-21 mają taką samą aktywność karbapenemazy jak NDM -5 [17, 19]. Sugeruje to, że substytucje mogą mieć znaczący wpływ na aktywność enzymu, mimo że nie znajdują się w obrębie miejsca aktywnego, jednak dokładny mechanizm działania zwiększonej aktywności karbapenemazy nie jest znany. Warianty zawierające mutację V88L mają również inne podstawienia, ale nie wykazano żadnej różnicy w wartościach MIC karbapenemów między szczepami wytwarzającymi NDM-5 lub NDM-17 (warianty zawierające V88L) a szczepem produkującym NDM-1 [20]. Stwierdzono również, że substytucje M154L (NDM-4) oraz D130G (NDM-14) także powodują zwiększoną aktywność enzymatyczną. Co ciekawe NDM-8, który zawiera zarówno M154L, jak i D130G, nie wykazuje zwiększonej aktywności karbapenemazy. Warto zauważyć, że pożywki zazwyczaj używane w eksperymentach, takie jak bulion Mueller-Hinton (MH) i LB, są bogate w cynk. Jednakże, w warunkach niedoboru cynku, podstawienia M154L (NDM-4), A233V (NDM-6) oraz E152K (NDM-9) w enzymach NDM zwiększają oporność na cefotaksym poprzez poprawę ich powinowactwa do cynku (M154L) lub ogólną poprawę stabilności tych enzymów (A233V i E152K). Podstawienia D95N (NDM-3) i D130G (NDM-14) zwiększają również oporność na cefotaksym w warunkach głodu cynkowego, jednak mechanizmy nie są znane [21, 22]. Substytucje R264H (NDM-16), M154V (NDM-11) i P28A (NDM-2) nie mają znaczącego wpływu na działanie NDM w warunkach limitujących dostępność jonów cynku. Stwierdzono zatem, że stres spowodowany niedoborem cynku jest głównym czynnikiem

napędzającym ewolucję enzymów NDM [22]. Niestety, wartość MIC karbapenemów przeciwko szczepom wytwarzającym różne warianty NDM nie została określona w warunkach ograniczonego stężenia cynku. Aktywność karbapenemazy nowych wariantów NDM musi być scharakteryzowana za pomocą znormalizowanego testu w warunkach zarówno bogatych w cynk, jak i ograniczających cynk, aby w pełni wyjaśnić fenotypowe znaczenie pojawiania się i ewolucji nowych substytucji.

3.2. Plazmidy niosące gen *bla_{NDM}*

Chociaż obecność genu *bla_{NDM}* została stwierdzona na chromosomach bakteryjnych, zdecydowanie częściej występują one na plazmidach, które odgrywają istotną rolę w ich rozpowszechnianiu. Doniesiono, że *bla_{NDM}* jest przenoszony na plazmidach z różnymi typami replikonów. Łącznie wykryto aż 355 plazmidów niosących gen *bla_{NDM}*, których sekwencje są całkowicie poznane. Wśród rodziny *Enterobacteriaceae* występuje 20 typów replikonów plazmidów niosących *bla_{NDM}*, w tym IncC, IncB/O/K/Z, IncFIA, IncFIB, IncFIC, IncFIII, IncHI1, IncHI2, IncHI3, IncN, IncN2, IncL/M, IncP, IncR, IncT, IncX1, IncX3, IncX4, IncY oraz ColE10 [23]. Wskazuje to na wielokrotne przejęcie genu *bla_{NDM}* przez różne plazmidy, co oznacza, że w transferze horyzontalnym *bla_{NDM}* pośredniczy wiele plazmidów.

IncX3 wydaje się być najczęstszym rodzajem plazmidu przenoszącego *bla_{NDM}*. Plazmidy te charakteryzują się wąskim zakresem gospodarzy i jak dotąd były wykrywane wyłącznie w rodzinie *Enterobacteriaceae*.

4. Epidemiologia szczepów *Klebsiella pneumoniae* New Delhi

Po początkowym odkryciu NDM-1 w szczepie wyizolowanym od pacjenta w Szwecji wcześniej hospitalizowanego w New Delhi w 2008 roku [3], kolejne badania ujawniły powszechne występowanie *bla_{NDM-1}* na półwyspie indyjskim, w tym w Indiach, Pakistanie i Bangladeszu [23]. Od tego czasu wykazano, że szczepy NDM-pozytywne są obecne na całym świecie, co potwierdzają wyniki badań epidemiologicznych prowadzonych przez większość krajów.

Światowy program nadzoru SMART zebrał aż 103 960 izolatów z rodziny *Enterobacteriaceae* w 55 krajach w latach 2008-2014 i wykazał, że 290 szczepów (0,28% wszystkich szczepów) było dodatnich pod względem obecności NDM, co sugeruje stosunkowo niską częstość występowania. W programie SMART częstość występowania szczepów pozytywnych pod względem NDM znacznie się różniła w poszczególnych krajach: do 5,01% w Zjednoczonych Emiratach Arabskich, 6,15% w Egipcie, 6,22% w Indiach i 6,26% w Serbii [24]. Potwierdza to obserwację, że szczepy NDM-pozytywne występują częściej w Azji Południowej, na Bałkanach, w Afryce Północnej i na Bliskim Wschodzie. Wysoki wskaźnik występowania szczepów NDM-pozytywnych na Bliskim Wschodzie najprawdopodobniej wynika z częstych migracji ludności na subkontynent indyjski. INFORM jest kolejnym międzynarodowym badaniem, w którym zebrano 38 266 izolatów z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz 8010 szczepów *P. aeruginosa* z 40 krajów w latach 2012-2014. Proporcje szczepów dodatnich pod względem NDM wynosiły 0,19% (72/38 266) u rodziny *Enterobacteriaceae* oraz 0,04% (3/8,010) u szczepów *P. aeruginosa*, co potwierdza niską częstość występowania szczepów NDM-pozytywnych, ujawnioną

w projekcie SMART. Niestety, częstość występowania szczepów NDM-dodatnich w poszczególnych krajach nie została podana w tym badaniu [25]. Poza globalnymi programami nadzoru SMART i INFORM, istnieje bardzo niewiele odpowiednio zaprojektowanych badań na dużą skalę, które miałyby na celu określenie prawdziwego rozpowszechnienia genu *bla_{NDM}* u danego gatunku lub rodzaju bakterii. W wyniku badań przeprowadzonych w Pakistanie stwierdzono, że 18,5% hospitalizowanych pacjentów w dwóch szpitalach wojskowych jest nosicielami NDM-dodatnich szczepów z rodziny *Enterobacteriaceae* [26]. W Chinach przeprowadzono badanie 1162 klinicznych izolatów *Enterobacteriaceae* i *Acinetobacter* spp. różnego pochodzenia, które doniosły, że 3,9% z nich było NDM-pozytywne. Odsetek szczepów NDM-dodatnich wśród rodziny *Enterobacteriaceae* nie został obliczony, ponieważ dokładna liczba izolatów *Enterobacteriaceae* poddawana analizie nie została podana [27]. Aby dokładnie kontrolować zmiany w częstości występowania szczepów pozytywnych pod względem NDM niezbędne są dalsze badania na dużą skalę, w szczególności na szczepach wyizolowanych po 2014 r.

Według globalnego programu nadzoru SMART *bla_{NDM}* jest trzecim najczęściej występującym genem kodującym karbapenemazy i stanowi 19,42% dodatnich wyników obecności karbapenemazy. Częściej występującymi genami są *bla_{KPC}* (53,18%) oraz warianty genu *bla_{OXA-48}* (20,09%) [24]. W Chinach, które nie zostały włączone do programu SMART, 31% z przebadanych 1105 szczepów *Enterobacteriaceae* opornych na karbapenemy było dodatnich pod względem NDM [28]. Badanie EuSCAPE w Europie ujawniło, że 7,7% opornych na karbapenemy *Klebsiella pneumoniae* oraz 10,3% szczepów *E. coli* opornych na karbapenemy było dodatnich pod względem NDM [29].

Oprócz próbek klinicznych genu *bla_{NDM}* wykryto również w ściekach szpitalnych w kilku krajach, w tym w Chinach [30, 31], Indiach [32] i Libanie [33]. Niektóre szczepy NDM-dodatnie odzyskane ze ścieków szpitalnych należą do rodziny *Enterobacteriaceae* [32, 33], co może odzwierciedlać jelitowe przenoszenie szczepów NDM-dodatnich wśród populacji w warunkach szpitalnych. Jednakże, szczepy różnych gatunków *Acinetobacter* dodatnich pod względem obecności NDM zostały również wyizolowane ze ścieków szpitalnych [30, 31]. Na podstawie tego można stwierdzić, że ścieki mogą być rezerwuarem szczepów będących nosicielami genu *bla_{NDM}*. Powiązania między ściekami szpitalnymi a rozprzestrzenianiem się *bla_{NDM}* nie zostały jeszcze potwierdzone i wymagają dalszych badań. Niemniej jednak ścieki szpitalne powinny być odpowiednio oczyszczane zgodnie z istniejącymi wytycznymi i przepisami [34].

5. Rozprzestrzenianie się szczepów NDM-pozytywnych a turystyka

Gwałtowne rozprzestrzenianie się szczepów NDM-pozytywnych od jego początkowego pojawienia się w Indiach na wszystkie kontynenty jest w znacznym stopniu związane z globalnym rozwojem turystyki. Pierwsze odkrycia genu *bla_{NDM-1}* w Indiach, Pakistanie i Wielkiej Brytanii wykazały, że prawie wszystkie przypadki ich izolacji w Wielkiej Brytanii były związane z wcześniejszymi podróżami pacjentów na subkontynent indyjski [23]. Po pierwszym raporcie częstość występowania przypadków NDM gwałtownie wzrosła, przy czym kraje w regionie śródziemnomorskim w Europie

odnotowały największy wzrost [35]. Szczegółowe badanie pierwszych zgłoszonych przypadków NDM w Europie wykazało, że 57% wszystkich przypadków było związanych z wcześniejszą hospitalizacją na subkontynencie indyjskim lub na Bałkanach [36]. Pierwsze doniesienie o epidemii w Europie miało miejsce we Włoszech w 2011 roku. Gen bla_{NDM-1} wykryto zarówno w szczepach klinicznych *Klebsiella pneumoniae*, jak i *Escherichia coli* wyizolowanych od pacjentów w szpitalu w Bolonii, przy czym pierwszy szczep pochodził od pacjenta wcześniej hospitalizowanego w New Delhi w Indiach [37]. Ten nagły wybuch epidemii sprawił, że Włochy do roku 2017 osiągnęły jeden z najwyższych wskaźników występowania szczepów NDM-pozytywnych w Europie [29]. Do 2014 r. Grecja zgłaszała utrzymujące się przypadki zakażeń szpitalnych wywołanych przez szczepy *K. pneumoniae* typu 11 (ST11) niosące gen bla_{NDM-1} [38], uważane za nabyte po raz pierwszy przez podróże do regionu wschodnich Bałkanów. Międzynarodowe podróże były również przyczyną przemieszczania się szczepów NDM-pozytywnych do Ameryki Północnej, co doprowadziło do pojawienia się przenoszącego bla_{NDM-1} *P. aeruginosa* ST654 [39], jak również przypadków przenoszenia tego genu przez *E. coli* i *K. pneumoniae* [40]. Bezpośrednie podróże z Indii, a następnie Iranu, były również związane z pierwszymi przypadkami izolacji szczepów NDM-pozytywnych w Stanach Zjednoczonych [41-43].

Międzynarodowe podróże są ważnym czynnikiem predysponującym do kolonizacji przewodu pokarmowego przez szczepy NDM-pozytywne, zwłaszcza w przypadku hospitalizacji w tamtejszych placówkach ochrony zdrowia. Przeprowadzono szereg wysokiej jakości badań, które pokazują, że podróż do regionów endemicznych, takich jak Indie i Azja Południowo-Wschodnia, prowadzi do znacznego poziomu kolonizacji jelit przez bakterie niosące geny β -laktamazy o rozszerzonym spektrum (ESBL) [44-46]. Jednak do tej pory przeprowadzono tylko jedno badanie oceniające ryzyko bezobjawowej kolonizacji przez bakterie przenoszące bla_{NDM-1} podczas podróży [47].

6. Podsumowanie

Bakterie *Klebsiella pneumoniae* New Delhi stanowią ważną grupę patogenów odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne. Ze względu na bogaty profil czynników wirulencji występujący powszechnie u bakterii z gatunku *Klebsiella pneumoniae*, a także ich zdolność do formowania biofilmu są one szczególnie niebezpieczne u osób z obniżoną odpornością. Gen kodujący metalo- β -laktamazę – enzym warunkujący oporność na karbapenemy (bla_{NDM}) oraz zjawisko horyzontalnego transferu genów czyni te szczepy wyjątkowo niebezpiecznymi w aspekcie epidemiologicznym i klinicznym.

Szczepy NDM-pozytywne cały czas rozprzestrzeniają się na całym świecie pomimo usilnych starań i pozostają ogromnym wyzwaniem dla współczesnej medycyny, przez co są znaczącym zagrożeniem dla zdrowia publicznego. Szerokie rozpowszechnienie genów bla_{NDM} jest w dużej mierze zależne od niosących go plazmidów, zwłaszcza typu IncX3. Bakterie NDM-pozytywne nieustannie ewoluują, aby wytworzyć nowe warianty metalo- β -laktamaz, dzięki czemu niektóre z nich wykazują zwiększoną aktywność karbapenemazy.

Żadne leczenie ukierunkowane na NDM nie zostało obecnie zatwierdzone do stosowania klinicznego, chociaż wiele nowych czynników o różnych mechanizmach działania jest w trakcie badań lub jest w trakcie opracowywania.

Ostateczny sukces walki z NDM oprócz opracowania skutecznych środków przeciwdrobnoustrojowych opiera się również na kontroli zakażeń oraz zwiększenia środków ostrożności w placówkach opieki zdrowotnej, w celu ograniczenia rozprzestrzeniania się tych szczepów oraz występowania epidemii.

Literatura

1. El Fertas-Aissani R., et al., *Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of Klebsiella pneumoniae strains isolated from different clinical specimens*, Pathologie Biologie, 61(5), 2013, s. 209-216.
2. Highsmith A.K., Jarvis W.R., *Klebsiella pneumoniae: selected virulence factors that contribute to pathogenicity*, Infection Control & Hospital Epidemiology, 6(2), 1985, s.75-77.
3. Yong D., Toleman M.A., Giske C.G., Cho H.S., Sundman K., Lee K., Walsh T.R., *Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India*, Antimicrobial agents and chemotherapy, 53(12), 2009, s. 5046-5054.
4. Wu W., Feng Y., Tang G., Qiao F., McNally A., Zong Z., *NDM metallo- β -lactamases and their bacterial producers in health care settings*, Clinical microbiology reviews, 32(2), 2019.
5. Bush K., *The ABCD's of β -lactamase nomenclature*, Journal of Infection and Chemotherapy, 19(4), 2013, s. 549-559.
6. Ambler R.P., et al., *A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases*, Biochemical Journal, 276, 1991, s. 269-272.
7. Palzkill T., *Metallo- β -lactamase structure and function*, Ann N Y Acad Sci, 1277(1), 2003, s. 91-104.
8. Bush K., Jacoby G.A., *Updated functional classification of β -lactamases*, Antimicrob Agents Chemother, 54(3), 2010, s. 969-976.
9. Mojica M.F., Bonomo R.A., Fast W., *B1-metallo- β -lactamases: where do we stand?*, Curr Drug Targets, 17(9), 2016, s. 1029-1050.
10. Kim Y., Cunningham M.A., Mire J., Tesar C., Sacchettini J., Joachimiak A., *NDM-1, the ultimate promiscuous enzyme: substrate recognition and catalytic mechanism*, FASEB Journal, 27(5), 2013, s. 1917-1927.
11. Zhang H., Hao Q., *Crystal structure of NDM-1 reveals a common β -lactam hydrolysis mechanism*, FASEB Journal, 25(8), 2011, s. 2574-2582.
12. King D., Strynadka N., *Crystal structure of New Delhi metallo- β - lactamase reveals molecular basis for antibiotic resistance*, Protein Science, 20(9), 2011, s. 1484-1491.
13. Gonzalez L.J., Bahr G., Nakashige T.G., Nolan E.M., Bonomo R.A., Vila A.J., *Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo- β -lactamase*, Nature Chemical Biology, 12(7), 2016, s. 516-522.
14. Crowder M.W., Spencer J., Vila A.J., *Metallo- β -lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria*, Accounts of chemical research, 39(10), 2006, s. 721-728.
15. Bahr G., Vitor-Horen L., Bethel C.R., Bonomo R.A., Gonzalez L.J., Vila A.J., *Clinical evolution of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) optimizes resistance under Zn(II) deprivation*, Antimicrobial Agents Chemotherapy, 62(1), 2018, s. 9-17.
16. Hornsey M., Phee L., Wareham D.W., *A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant Escherichia coli ST648 isolate recovered from*

- a patient in the United Kingdom, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 55(12), 2011, s. 5952-5954.
17. Liu Z., Wang Y., Walsh T.R., Liu D., Shen Z., Zhang R., Yin W., Yao H., Li J., Shen J., *Plasmid-mediated novel bla_{NDM-17} gene encoding a carbapenemase with enhanced activity in a sequence type 48 Escherichia coli strain*, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 61(5), 2017, s. 3-16.
 18. Liu Z., Li J., Wang X., Liu D., Ke Y., Wang Y., Shen J., *Novel variant of New Delhi metallo-β-lactamase, NDM-20, in Escherichia coli*, *Front Microbiology*, 9, 2018, s. 248.
 19. Liu L., Feng Y., McNally A., Zong Z., *bla_{NDM-21}, a new variant of bla_{NDM} in an Escherichia coli clinical isolate carrying bla_{CTX-M-55} and rmtB*, *J Antimicrobial Chemotherapy*, 73(9), 2018, s. 2336-2339.
 20. Cheng Z., Thomas P.W., Ju L., Bergstrom A., Mason K., Clayton D., Miller C., Bethel C.R., VanPelt J., Tierney D.L., Page R.C., Bonomo R.A., Fast W., Crowder M.W., *Evolution of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM) in the clinic: effects of NDM mutations on stability, zinc affinity, and mono – zinc activity*, *Journal of Biological Chemistry*, 293(32), 2018, s. 12606-12618.
 21. Nordmann P., Boulanger AE, Poirel L., *NDM-4 metallo-β-lactamase with increased carbapenemase activity from Escherichia coli*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 2012, s. 2184-2186.
 22. Bahr G., Vitor-Horen L., Bethel C.R., Bonomo R.A., Gonzalez L.J., Vila A.J., *Clinical evolution of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM) optimizes resistance under Zn(II) deprivation*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(1), 2018, s. 9-17.
 23. Kumarasamy K.K., Toleman M.A., Walsh T.R., Bagaria J., Butt F., Balakrishnan R., Chaudhary U., Doumith M., Giske C.G., Irfan S., Krishnan P., Kumar A.V., Maharjan S., Mushtaq S., Noorie T., Paterson D.L., Pearson A., Perry C., Pike R., Rao B., Ray U., Sarma J.B., Sharma M., Sheridan E., Thirunarayan M.A., Turton J., Upadhyay S., Warner M., Welfare W., Livermore D.M., Woodford N., *Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study*, *Lancet Infectious Diseases*, 10(9), 2010, s. 597-602.
 24. Karlowsky J.A., Lob S.H., Kazmierczak K.M., Badal R.E., Young K., Motyl M.R., Sahn D.F., *In vitro activity of imipenem against carbapenemase – positive Enterobacteriaceae isolates collected by the SMART global surveillance program from 2008 to 2014*, *Journal of Clinical Microbiology*, 55(6), 2017, s. 1638-1649.
 25. Kazmierczak K.M., Rabine S., Hackel M., McLaughlin R.E., Biedenbach D.J., Bouchillon S.K., Sahn D.F., Bradford P.A., *Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo-β-lactamase – producing Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(2), 2016, s. 1067-1078.
 26. Perry J.D., Naqvi S.H., Mirza I.A., Alizai S.A., Hussain A., Ghirardi S., Orega S., Wilkinson K., Woodford N., Zhang J., Livermore D.M., Abbasi S.A., Raza M.W., *Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(10), 2011, s. 2288-2294.
 27. Hu X., Xu X., Wang X., Xue W., Zhou H., Zhang L., Ma Q., Zhao R., Li G., Li P., Zhang C., Shi Y., Wang J., Jia L., Hao R., Wang L., Zou D., Liu X., Qiu S., Song H., Sun Y., *Diversity of New Delhi metallo-β-lactamase-producing bacteria in China*, *International Journal of Infectious Diseases*, 55, 2017, s. 92-95.
 28. Zhang R., Liu L., Zhou H., Chan E.W., Li J., Fang Y., Li Y., Liao K., Chen S., *Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) strains in China*, *EBioMedicine*, 19, 2017, s. 98-106.

29. Grundmann H., et al., *Occurrence of carbapenemase – producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in the European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study*, The Lancet Infectious Diseases, 17(2), 2017, s. 153-163.
30. Zong Z., Zhang X., *bla_{NDM-1}-carrying Acinetobacter johnsonii detected in hospital sewage*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 68(5), 2013, s. 1007-1010.
31. Zhang C., et al., *Higher isolation of NDM-1 producing Acinetobacter baumannii from the sewage of the hospitals in Beijing*, PLoS One, 8(6), 2014, s. 57.
32. Khan A.U., Parvez S., *Detection of bla_{NDM-4} in Escherichia coli from hospital sewage*, Journal of Medical Microbiology, 63(10), 2014, s. 1404-1406.
33. Daoud Z., Farah J., Sokhn E.S., El Kfoury K., Dahdouh E., Masri K., Afif C., Abdel-Massih R.M., Matar G.M., *Multidrug-resistant Enterobacteriaceae in Lebanese hospital wastewater: implication in the One Health Concept*, Microbial Drug Resistance, 24(2), 2018, s.166-174.
34. Carraro E., Bonetta S., Bonetta S., *Hospital wastewater: existing regulations and current trends in management*, Springer, Cham, 2017.
35. Canton R., et al., *Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe*, Clinical Microbiology and Infection, 18(5), 2012, s. 413-431.
36. Struelens M.J., Monnet D.L., Magiorakos A.P., O'Connor F.S., Giesecke J., *New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae: emergence and response in Europe*, Eurosurveillance, 2010.
37. Gaibani P., Ambretti S., Berlingeri A., Cordovana M., Farruggia P., Panico M., Landini M.P., Sambri V., *Outbreak of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in northern Italy, July to August 2011*, Eurosurveillance, 16(47), 2011, s. 20-27.
38. Voulgari E., Gartzonika C., Vrioni G., Politi L., Priavali E., Levidiotou-Stefanou S., Tsakris A., *The Balkan region: NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 69(8), 2014, s. 2091-2097.
39. Mataseje L.F., Peirano G., Church D.L., Conly J., Mulvey M., Pitout J.D., *Colistin-nonsusceptible Pseudomonas aeruginosa sequence type 654 with bla_{NDM-1} arrives in North America*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 60(3), 2016, s.1794-1800.
40. Peirano G., Ahmed-Bentley J., Fuller J., Rubin J.E., Pitout J.D., *Travel – related carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Alberta, Canada: the first 3 years*, Journal of Clinical Microbiology, 52(5), 2014, s. 1575-1581.
41. Doi Y., O'Hara J.A., Lando J.F., Querry A.M., Townsend B.M., Pasculle A.W., Muto C.A., *Co-production of NDM-1 and OXA-232 by Klebsiella pneumoniae*, Emerging Infectious Diseases, 20(1), 2014, s. 163-165.
42. Lee C.-S., Vasoo S., Hu F., Patel R., Doi Y., *Klebsiella pneumoniae ST147 coproducing NDM-7 carbapenemase and RmtF 16S rRNA methyltransferase in Minnesota*, Journal of Clinical Microbiology, 52(11), 2014, s. 4109-4110.
43. Li J.-J., Munoz-Price L.S., Spychala C.N., DePascale D., Doi Y., *New Delhi metallo-β-lactamase-1-producing Klebsiella pneumoniae*, Emerging Infectious Diseases, 22(4), 2016, s. 744-746.
44. McNulty C.A.M., Lecky D.M., Xu-McCrae L., Nakiboneka-Ssenabulya D., Chung K.T., Nichols T., Thomas H.L., Thomas M., Alvarez-Buylla A., Turner K., Shabir S., Manzoor S., Smith S., Crocker L., Hawkey P.M., *CTX-M ESBL-producing Enterobacteriaceae: estimated prevalence in adults in England in 2014*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 73(5), 2018, s. 1368-1388.



45. Arcilla M.S., et al., *Import and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae by international travellers (COMBAT study): a prospective, multicentre cohort study*, The Lancet Infectious Diseases, 17(1), 2017, s. 78-85.
46. Kantele A., Laaveri T., Mero S., Vilkkumäki K., Pakkanen S.H., Ollgren J., Antikainen J., Kirveskari J., *Antimicrobials increase travelers' risk of colonization by extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae*, Clinical Infectious Diseases, 60(6), 2015, s. 837-846.
47. Ruppe E., Armand-Lefevre L., Estellat C., El-Mniai A., Boussadia Y., Consigny P.H., Girard P.M., Vittecoq D., Bouchaud O., Pialoux G., Esposito-Farese M., Coignard B., Lucet J.C., Andremont A., Matheron S., *Acquisition of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by healthy travellers to India, France, February 2012 to March 2013*, Eurosurveillance, 19(14), 2014.

Charakterystyka oporności *Klebsiella pneumoniae* New Delhi na karbapenemy

Streszczenie

Bakterie *Klebsiella pneumoniae* New Delhi, posiadające gen oporności na karbapenemy (bla_{NDM}) zostały po raz pierwszy wyizolowane w 2008 roku w Szwecji od pacjenta wcześniej hospitalizowanego w Indiach. Bakterie te szybko rozprzestrzeniają się po całym świecie, a od 2011 roku występują również w Polsce. Stanowią one wysokie ryzyko epidemiologiczne, ponieważ gen oporności na karbapenemy przekazywany jest pomiędzy bakteriami poprzez horyzontalny transfer genów, a międzynarodowe podróże dodatkowo sprzyjają migracji szczepów NDM-pozytywnych. Badania mające na celu ułatwienie różnicowania genetycznego tych szczepów oraz ich charakterystykę są zatem niezwykle istotne. Praca miała na celu charakterystykę oporności szczepów *Klebsiella pneumoniae* New Delhi na karbapenemy, z uwzględnieniem budowy, funkcjonowania oraz różnych wariantów enzymu za nią odpowiedzialnego.

Słowa kluczowe: *Klebsiella pneumoniae*, NDM (New Delhi metallo- β -lactamase), bla_{NDM} , metallo- β -laktamazy

Characterization of carbapeneme resistance in *Klebsiella pneumoniae* New Delhi

Abstract

Klebsiella pneumoniae New Delhi bacteria, which have the carbapeneme resistance gene (bla_{NDM}) were first isolated in 2008 in Sweden from a patient previously hospitalized in India. These bacteria are rapidly spreading all over the world, and since 2011 they also occur in Poland. They represent a high epidemiological risk because the carbapenem resistance gene is passed between bacteria through horizontal gene transfer, and international travel additionally promotes the migration of NDM-positive strains. Therefore studies aimed at facilitating the genetic differentiation of these strains and their characteristics are extremely important. The aim of this study was the characterization of the nature of *Klebsiella pneumoniae* New Delhi resistance against carbapenems, including structure, function and different variants of the enzyme responsible for it.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, NDM (New Delhi metallo- β -lactamase), bla_{NDM} , metallo- β -lactamases

