

Streszczenie pracy doktorskiej

Magdalena Anna Rzczkowska

„Genetyczne uwarunkowania plazmidowo-kodowanych enzymatycznych mechanizmów oporności na antybiotyki β -laktamowe u *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Proteus mirabilis*”

Promotor: dr hab. Rafał Gierczyński, prof. nadzw. NIZP-PZH

Promotor pomocniczy: dr hab. Katarzyna Piekarska, adiunkt NIZP-PZH

Pałeczki *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Proteus mirabilis* stanowią istotny czynnik etiologiczny zakażeń szpitalnych. Znaczącym problemem w terapii zakażeń wywoływanych przez te drobnoustroje jest ich narastająca oporność na antybiotyki z grupy β -laktamów. Jednym z najistotniejszych mechanizmów oporności na antybiotyki β -laktamowe jest wytwarzanie β -laktamaz. Szczególnie istotne są te enzymy, których wytwarzanie warunkowane jest przez geny znajdujące się w ruchomych elementach genetycznych, takich jak plazmidy. Od wielu lat notuje się wzrost częstości występowania izolatów wytwarzających β -laktamazy typu ESBL, KPC, NDM i OXA. Ponadto, wzrosło także znaczenie cefalosporynaz typu AmpC, zwłaszcza tych, których wytwarzanie warunkowane jest przez geny zlokalizowane w plazmidach – pAmpC (ang. *plasmid-mediated AmpC β -lactamase*).

W Polsce, nabyty mechanizm AmpC został dotychczas poddany szczegółowym analizom u *P. mirabilis*. Brak jest natomiast szczegółowych badań dotyczących charakterystyki tego mechanizmu oporności u *E. coli* i *K. pneumoniae*. W związku z powyższym, celem badań była charakterystyka genetycznego uwarunkowania wytwarzania β -laktamaz typu AmpC kodowanych plazmidowo u izolatów *K. pneumoniae*, *E. coli* oraz *P. mirabilis* wyizolowanych z materiału klinicznego. Dodatkowym celem podjętych badań była analiza sekwencji nukleotydowych uzyskanych metodą sekwencjonowania pełnogenomowego wybranego izolatu *Escherichia coli* o potwierdzonej zdolności wytwarzania pAmpC oraz próba określenia genetycznego sąsiedztwa plazmidowego genu *ampC*.

Materiał do badań stanowiło 166 izolatów, w tym 105 izolatów *Klebsiella pneumoniae*, 45 *Escherichia coli* oraz 16 *Proteus mirabilis*. Szczepy wyodrębniono z materiału klinicznego od osób chorych w trzech szpitalach zlokalizowanych w Warszawie i okolicach. Izolaty kolekcjonowano w okresie 1.03-31.08.2010 roku oraz od 01.11.2013 roku do 31.01.2014 roku. Spośród 166 badanych izolatów, metodą dyfuzyjno-krażkową w podłożu agarowym, wyodrębniono 38 opornych na cefoksytynę u których, metodami fenotypowymi, potwierdzano zdolność wytwarzania β -laktamaz typu AmpC. Na podstawie uzyskanych wyników wyodrębniono 21 izolatów, w tym 10 izolatów *K. pneumoniae*, 5 *E. coli* i 6 *P. mirabilis* do dalszych szczegółowych badań fenotypowych i molekularnych. W tym rozdziale przedstawiono streszczenie głównych wyników badań oraz przedstawiono główne wnioski z przeprowadzonych badań.

Oznaczenie najmniejszego stężenia antybiotyku hamującego wzrost (MIC) badanych izolatów, pozwoliło na wyodrębnienie dwóch profili oporności. Pierwszy typ oporności posiadały izolaty wykazujące oporność na wszystkie badane antybiotyki β -laktamowe tj.: cefoksytynę, cefotaksym, ceftazydym, ceftriakson i cefepim. Drugim typem oporności charakteryzowały się izolaty odporne na cefoksytynę, cefotaksym, ceftazydym i ceftriakson.

Analiza profili *Xba*I-PFGE przeprowadzona u izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających pAmpC wykazała, że ich podobieństwo mieściło się w zakresie od 51,2% do 97%. Podobieństwo profili *Xba*I-PFGE badanych izolatów *E. coli* mieściło się w zakresie od 59,5% do 100%. Analiza profili *Sfi*I-PFGE badanych izolatów *P. mirabilis* wykazała, iż wykazują one podobieństwo w zakresie od 52,3% do 100%.

Wyniki reakcji PCR, sekwencjonowania metodą Sangera i analiza uzyskanych sekwencji nukleotydowych wykazała, że najczęściej wykrywanymi genami pAmpC były te należące do rodziny CMY (n=16). U pozostałych izolatów zidentyfikowano geny należące do rodziny DHA (n=5).

Analiza profili plazmidowych wykazała obecność plazmidów u wszystkich izolatów *K. pneumoniae* (n=10), *E. coli* (n=5) oraz u 5 spośród 6 izolatów *P. mirabilis*. Wielkość uzyskanych plazmidów mieściła się w zakresie od <2,1 kpz do >90 kpz. Wyniki analizy hybrydyzacji typu „Southern blot” wykazały iż u *K. pneumoniae* geny *bla*_{DHA} zlokalizowane były w plazmidach, o wielkościach ok. 54 kpz lub ok. 90 kpz. Wyniki typowania replikonowego plazmidów, u izolatów *K. pneumoniae* posiadających geny *bla*_{DHA}, wykazały obecność replikonów typu R i FIIK. U izolatów *K. pneumoniae* posiadających geny *bla*_{CMY} stwierdzono, iż były one zlokalizowane w plazmidach o wielkości ok. 7,2 kpz. U *K. pneumoniae* posiadających geny *bla*_{CMY} zastosowaną metodą badawczą

nie zidentyfikowano replikonów plazmidowych. Ponadto, stwierdzono, że plazmidy zawierające geny *bla_{DHA}* i *bla_{CMY}* u badanych izolatów nie są zdolne do koniugacyjnego transferu oraz nie ulegają transformacji na drodze elektroporacji. U izolatów *E. coli*, wyniki hybrydyzacji typu „Southern blot” wykazały iż geny *bla_{CMY}* zlokalizowane były w plazmidach o wielkościach ok. 54 kpz lub ok. 90 kpz. Wyniki typowania replikonowego plazmidów wykazały obecność replikonów typu FIBA, FIB, FII, K, I1 γ oraz X1. W przypadku izolatów *E. coli*, w wyniku przeprowadzonego procesu koniugacji *in vitro* uzyskano transkoniuganty. Analiza profili plazmidowych badanych izolatów oraz uzyskanych transkoniugantów wskazała iż, transferowi koniugacyjnemu uległy plazmidy o wielkości ok. 54 lub ok. 90 kpz. Oznaczenie wartości MIC wybranych antybiotyków β -laktamów u otrzymanych transkoniugantów wykazało, że na drodze koniugacji *in vitro* przenoszona zostaje oporność na cefoksytynę, cefotakasym, ceftazydym i ceftriakson. U 5 spośród 6 badanych izolatów *P. mirabilis* wykryto obecność plazmidów, które należały do typu replikonowego FII, A/C lub P. W wyniku reakcji hybrydyzacji typu „Southern blot” nie stwierdzono hybrydyzacji sondy *bla_{CMY}* do plazmidowego DNA. Uzyskany wynik sugeruje inną niż plazmidowa lokalizację nabytych genów *bla_{CMY}* u izolatów *P. mirabilis*.

Metodą PCR zidentyfikowano obecność integronu klasy 1 u 14 izolatów (66,6%), tj. *K. pneumoniae* (n=5), *E. coli* (n=3), *P. mirabilis* (n=6). W wyniku amplifikacji PCR otrzymano podobne bądź różne wielkości amplikonów, co może świadczyć o różnej liczbie kaset genowych, obecności innych mobilnych elementów genetycznych lub genów wbudowanych w integron.

Analiza sekwencji nukleotydowych rejonu promotorowego chromosomalnych genów *ampC* badanych izolatów *E. coli* pozwoliła na wyróżnienie 3 wariantów promotora genów *ampC*. Wariant 1 i wariant 2 charakteryzowały się obecnością mutacji w rejonie promotorowym. Wariant 3 promotora genu *ampC* był charakterystycznego dla dzikiego promotora i atenuatora *E. coli* K-12.

Dane uzyskane w wyniku sekwencjonowania metodą Sanger i sekwencjonowania pełnogenomowego DNA izolatu *Escherichia coli* nr 158 pozwoliły na analizę bliskiego sąsiedztwa genetycznego genu *bla_{CMY-42}*. Analiza wyników wskazuje na obecność, powyżej genu *bla_{CMY-42}*, sekwencji powtórzonych DR (AATCA) oraz alternatywnych sekwencji powtórzonych IRR (ACGTGGAATTTAGG) charakterystycznych dla sekwencji insercyjnej *ISEcp1*. Ponadto, w sąsiedztwie genetycznym genów *bla_{CMY-42}* zidentyfikowano obecność sekwencji TSD (TTTGAAG). Obecność sekwencji TSD może sugerować obecność sekwencji *IS1* w sąsiedztwie *ISEcp1* bądź inkorporowanej w *ISEcp1* poprzez mechanizm transpozycji.

Poniżej genu *bla_{CMY-42}* zidentyfikowano geny: *blc*, *sugE* i *finQ*. Według danych piśmiennictwa, obecność genów *bla_{CMY}*, *blc* i *sugE* w bliskim sąsiedztwie genetycznym sekwencji *ISEcp1* wskazuje, iż mogły one ulec transferowi z chromosomalnego DNA *C. freundii*.

Podsumowując, w prezentowanej pracy określono występowanie i szczegółowo scharakteryzowano mechanizm oporności typu pAmpC u pałeczek *K. pneumoniae*, *E. coli* i *P. mirabilis* wyosobnionych z materiału klinicznego. Stwierdzono m.in., że oporność typu pAmpC może występować zarówno wśród izolatów wykazujących zróżnicowane profile PFGE jak i wśród izolatów o wysokim stopniu podobieństwa profili PFGE. Stwierdzono również, że za mobilizację genów pAmpC odpowiadać mogą ruchome elementy genetyczne takie jak plazmidy czy sekwencje insercyjne. W przypadku izolatów *P. mirabilis*, uzyskane wyniki najprawdopodobniej wskazują na inną niż plazmidowa lokalizację determinat AmpC. Jest to zgodne z obserwacjami innych autorów według których, u izolatów *P. mirabilis*, nabyte od *Citrobacter freundii* geny *ampC*, zostały wbudowane w chromosomalne DNA. Potwierdzenie chromosomalnej lokalizacji genów *bla_{CMY}* u *P. mirabilis* dostarczyłoby ewentualne dalsze badania. Ponadto, u niektórych izolatów zidentyfikowano obecność integronu klasy 1. Dokładnej oceny jego środowiska genetycznego, w przyszłych badaniach, dostarczyłoby sekwencjonowanie i analiza uzyskanych sekwencji nukleotydowych. Wykazano, że oporność typu pAmpC u *E. coli* może być przekazywana do innych bakterii na drodze horyzontalnego transferu, co sprzyja łatwemu rozpowszechnianiu w środowisku izolatów lekoopornych. Określono obecność replikonów plazmidowych u badanych izolatów. Rozstrzygających informacji na temat przynależności plazmidów niosących geny pAmpC do grupy niezgodności dostarczyłoby, na przykład, typowanie replikonowe plazmidów otrzymanych transkoniugantów. Stwierdzono trzy warianty promotora chromosomalnych genów *ampC* u *E. coli*. Nie stwierdzono tzw. mutacji „znaczących”, które mogłyby skutkować znacznie podwyższonym poziomem ich ekspresji. Wskazuje to, iż najprawdopodobniej dominującym czynnikiem wpływającym na obserwowany poziom oporności typu AmpC u *E. coli*, może być obecność genów pAmpC. Jednakże, odpowiedzi na pytanie w jaki sposób obecne mutacje wpływają na poziom *ampC* u badanych izolatów dostarczyłoby dalsze badania. Analiza bliskiego sąsiedztwa genetycznego genu *bla_{CMY-42}* w przypadku *E. coli* (nr 158), wskazała obecność sekwencji insercyjnych, które mogą odpowiadać za mobilizację genu *bla_{CMY}*. Dokładniejszych danych dotyczących środowiska genetycznego, dostarczyłaby wnikliwa analiza danych otrzymanych w wyniku sekwencjonowania pełnogenomowego DNA. Ponadto, w bliskim sąsiedztwie genetycznym

sekwencji insercyjnych i *bla_{CMY-42}* u *E. coli*, stwierdzono obecność genów *blc* i *sugE* co wskazuje, iż mogły one ulec transferowi na większym elemencie genetycznym (np. transpozonie) z chromosomalnego DNA *C. freundii*. Istnieje możliwość, że geny *bla_{CMY}* wraz z otaczającymi genami uległy transferowi z genomu *Proteus mirabilis*, u którego pierwotnie w Polsce, stwierdzono występowanie genów *bla_{CMY}* z przylegającymi genami pochodzącymi z *C. freundii*. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga jednak dalszych wnikliwych analiz.

SUMMARY

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* are important pathogens causing nosocomial infections. A significant problem in the treatment of infections caused by these microorganisms is their increasing resistance to the β -lactams. One of the most important mechanisms of GNB resistance to β -lactams is production of enzymes named β -lactamases that hydrolyze β -lactams. Of particular importance are those enzymes which are encoded by genes found on mobile genetic elements such as plasmids. For years, increasing occurrence of a variety β -lactamases (including ESBL, KPC, NDM and OXA) was observed. Furthermore, the occurrence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases (pAmpCs) has been increasingly reported in recent years.

In Poland, acquired AmpC mechanism has been analyzed in details in *P. mirabilis*. However, there are no details data on acquired AmpC in *E. coli* and *K. pneumoniae*. Therefore, the aim of the presented PhD-thesis was to characterize the genetic determinants of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among clinical isolates of *K. pneumoniae*, *E. coli* and *P. mirabilis*. An additional goal of the study was to analyze the nucleotide sequences obtained from whole-genome sequencing (WGS) of selected *Escherichia coli* isolate with pAmpC and to determine the genetic environment of the *ampC* gene.

The material for the presented studies constituted 166 isolates, including 105 isolates of *Klebsiella pneumoniae*, 45 *Escherichia coli* and 16 *Proteus mirabilis*. The strains were isolated from the clinical material from in-patients of three hospitals in Warsaw and the city suburbs. Isolates were collected in two stages. The first stage took place in 2010 (from 01.03 to 31.08) and the second stage was conducted from 01.11.2013 to 31.01.2014. In the disk diffusion method 38 isolates resistant to cefoxitin were identified among the total of 166 isolates tested. In the cefoxitin resistant isolates, AmpC β -lactamases production was confirmed by the phenotypic testes and finally, 21 isolates, including 10 isolates of *K. pneumoniae*, 5 *E. coli* and 6 *P. mirabilis* were selected for further phenotypic and molecular examinations.

Determination of MICs against a range of antibiotics showed two resistance profiles in tested isolates. The first type of resistance was characterized by isolates showing resistance to all β -lactam antibiotics tested: cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone and cefepime. The second type was characterized by resistance to cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime and ceftriaxone.

The analysis of *Xba*I-PFGE profiles carried out in the tested *K. pneumoniae* isolates showed that their similarity ranged from 51,2% to 97%. The similarity of the *Xba*I-PFGE profiles of the tested *E. coli* isolates ranged from 59,5% to 100%. The analysis of *Sfi*I-PFGE profiles of *P. mirabilis* showed their similarity range from 52,3% to 100%.

The PCR tests followed by DNA Sanger's sequencing and analysis of the obtained nucleotide sequences showed that predominating pAmpC genes belonged to the CMY family (n=16). The remaining isolates (n=5) were found to carry genes belonging to the DHA family.

Analysis of plasmid profiles of the tested isolates showed the presence of plasmids in all *K. pneumoniae* (n=10), 5 *E. coli* isolates and in 5 of 6 *P. mirabilis* tested isolates. The size of the obtained plasmids ranged from <2,1 kb to >90 kb. The results of the Southern blot hybridization showed that the *bla*_{DHA} genes were located in plasmids with size of approx. 90 kb or approx. 54 kb. R and FIIK plasmid replicons were detected in *K. pneumoniae* possessing *bla*_{DHA} genes. The Southern blot hybridization showed that in *K. pneumoniae* isolates *bla*_{CMY} genes were located on plasmids with sizes approx. 7,2 kb. In these isolates, the plasmid replicons could not be determined using the most popular method. Furthermore, plasmids containing the *bla*_{DHA} and *bla*_{CMY} genes in *K. pneumoniae* were none-conjugative and could not be transferred by electroporation. In *E. coli* isolates, Southern blot hybridization showed that *bla*_{CMY} genes were located on approx. 54 kb or approx. 90 kb plasmids. In addition, the following plasmid replicons: FIBA, FIB, FII, K, I1 γ and X1 were found. Moreover, transconjugants of *E. coli* tested isolates were obtained. Analysis of plasmid profiles of tested isolates and their transconjugants indicated transfer of 54 kb or 90 kb plasmids. MIC values of selected β -lactam antibiotics in the obtained transconjugants showed transfer of resistance to ceftazidime, cefotaxime, ceftazidime and ceftriaxone. In 5 out of 6 *P. mirabilis* tested isolates, approx. 90 kb plasmids were detected. FII, A/C or P plasmid replicons were found. The *bla*_{CMY} probe has not hybridized to the plasmid DNA, most likely indicating a different than the plasmid localization of the acquired *bla*_{CMY} genes in *P. mirabilis* tested isolates.

The presence of class 1 integron was detected by PCR in 14 isolates (66,6%): *K. pneumoniae* (n=5), *E. coli* (n=3) and *P. mirabilis* (n=6). The PCR products were of a various size. This may indicate a different number of gene cassettes, the presence of other mobile genetic elements, or the presence of other genes in class 1 integrons. Analysis of the nucleotide sequences of the promoter region of the chromosomal *ampC* gene of the *E. coli* tested isolates allowed to distinguish 3 variants of the *ampC* gene promoter. Variant 1 and

variant 2 was characterized by the presence of mutation in promoter region. Variant 3 of the *ampC* gene promoter was characteristic for the wild *E. coli* K-12 promoter and attenuator.

The data from Sanger's sequencing and whole genome sequencing of the *E. coli* isolate no. 158 allowed analysis of the genetic environment of the *bla*_{CMY-42} gene. The repeat sequence of DR (AATCA) and the alternate IRR repeat sequences (ACGTGGAATTTAGG) characteristic for the *ISEcp1* insertion sequence were detected upstream of the *bla*_{CMY-42}. In addition, the presence of the TSD sequence (TTTGAAG) was identified in the genetic neighborhood of the *bla*_{CMY-42} gene. The presence of TSD may suggest the presence of *IS1* in the vicinity of *ISEcp1* or incorporated *ISEcp1* through the transposition. Downstream of the *bla*_{CMY-42} gene, *blc*, *sugE* and *finQ* genes were identified. According to the literature, the presence of the *bla*_{CMY-42}, *blc* and *sugE* genes in close genetic vicinity of the *ISEcp1* insertion sequence indicates that they could have been transferred from the *C. freundii* chromosomal DNA.

In conclusion, the presented Ph.D. thesis report occurrence and detailed characteristics of pAmpC resistance mechanism in *K. pneumoniae*, *E. coli* and *P. mirabilis* collected in Poland from clinical material. Among others it was found, the AmpC resistance occurs in isolates showing various PFGE profiles as well as in those indistinguishable by the PFGE. Mobilization of pAmpC genes in the tested isolates depends on mobile genetic elements such as plasmids and insertion sequences. In *P. mirabilis* most likely AmpC determinants map outside the plasmids. This is consistent with the results reported by other authors for *P. mirabilis*, where the *ampC* genes acquired from *Citrobacter freundii* were built into chromosomal DNA. Confirmation of the chromosomal location of *bla*_{CMY} genes in the tested *P. mirabilis* isolates will need further research. In addition, in some isolates, the presence of a class 1 integron was detected. Future studies, including sequencing and analysis of the nucleotide sequences could provide information about genetic environment of integrons. In tested *E. coli* isolates pAmpC resistance could be transferred by horizontal transfer. This finding should make us aware of easy spread of drug-resistance in *E. coli*. Furthermore, the presence of a variety of plasmid replicons was detected. Final information about the *incompatibility* group of plasmids harboring the pAmpC genes in tested isolates would provide, for example, replicon typing of the plasmids obtained from transconjugants. Three variants of the chromosomal *ampC* gene promoter were found in *E. coli*, no mutations considered to be key in the hyper-expression of *ampC* were found. This may indicate that the main factor of AmpC resistance in the tested *E. coli* isolates is the presence of pAmpC genes. However, the answer how mutations occurring in chromosomal *ampC* promoter affect

level of expression require further studies. The analysis of the close genetic vicinity of the *bla*_{CMY-42} gene, in the *E. coli* isolate no. 158, indicated the presence of insertion sequences that may be responsible for the mobilization of the *bla*_{CMY} gene. In future detailed analysis, whole-genome sequencing DNA would provide more information about genetic environment. In addition, in vicinity of *bla*_{CMY-42} and insertion sequences, the *blc* and *sugE* genes were found. Most probably, both genes were transferred from chromosomal DNA of *C. freundii* on a large genetic element (eg transposon) and incorporated into the *E. coli* genome. Hypothetically the *bla*_{CMY} and the surrounding genes, were transferred from the *P. mirabilis* genome. The explanation of this phenomenon requires further analysis.