**Uniwersytet Medyczny w Białymstoku**

**Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej**



**Mgr Sylwia Joanna Chmielewska**

ROZPRAWA DOKTORSKA

**ANALIZA GENETYCZNYCH MARKERÓW WIRULENCJI I PROFILI LEKOOPORNOŚCI PATOGENNYCH SZCZEPÓW *ESCHERICHIA COLI* IZOLOWANYCH OD PACJENTÓW AMBULATORYJNYCH
Z ZAKAŻENIEM UKŁADU MOCZOWEGO**

**PROMOTOR**

dr hab. n. med. Katarzyna Leszczyńska

**Zakład Mikrobiologii**

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

**Kierownik Zakładu Mikrobiologii:**

dr hab. n. med. Katarzyna Leszczyńska

Białystok, 2016

# STRESZCZENIE

Zakażenia układu moczowego (ZUM) to jedne z najczęstszych infekcji bakteryjnych występujących zarówno wśród dzieci jak i osób dorosłych, charakteryzujące się różnym stopniem nasilenia, począwszy od niepowikłanych infekcji pęcherza moczowego do skomplikowanych i nawracających zakażeń górnych dróg moczowych o wysokim ryzyku powikłań i bakteriemii. W Polsce, podobnie jak i na całym świecie, zakażenia układu moczowego są jedną z częstszych przyczyn wizyt pacjentów ambulatoryjnych u lekarzy rodzinnych jak i wypisywania leków przeciwbakteryjnych, co stanowi poważny problem medyczny i/lub społeczny. Szacuje się, że w ponad 80% przypadków ZUM czynnikiem etiologicznym są uropatogenne szczepy *Escherichia coli* (UPEC) niezwykle zróżnicowane pod względem prezentowanych czynników wirulencji i lekooporności. Presja selekcyjna związana z nadużywaniem antybiotyków stymuluje powstawanie nowych klonów *E. coli* z różnymi kombinacjami genów czynników wirulencji, co prowadzi do rozprzestrzeniania się
w środowisku szczepów o większej zjadliwości i ekspansywności.

W związku z powyższym celem niniejszej pracy doktorskiej było: 1/ wyizolowanie
i identyfikacja gatunku *E. coli* z próbek moczu pacjentów ambulatoryjnych z bakteriurią znamienną; 2/ określenie profili lekooporności patogennych pałeczek UPEC; 3/ określenie potencjału wirulentnego szczepów *E. coli* tj. występowania genów kodujących czynniki wirulencji jak i zdolności do tworzenia biofilmu 4/ analiza zależności między wirulotypem
a profilem lekooporności badanych izolatów UPEC.

W latach 2013-2015 poddano analizie bakteriologicznej łącznie 974 próbki moczu, pochodzące od pacjentów ambulatoryjnych województwa podlaskiego. Bakteriurę znamienną określono na podstawie metody ilościowej Hoepricha. Identyfikację bakterii przeprowadzono w oparciu o standardowe metody mikrobiologiczne oraz na podstawie cech biochemicznych drobnoustrojów (Testy API, BioMerieux) oraz profilu białkowego wykorzystując Spektrometr Masowy MALDI-TOF i oprogramowanie Bruker Biotyper (Microflex LT MALDI-TOF BRUKER). Przynależność *E. coli* do grup filogenetycznych (A, B1, B2, D) określona została metodą multiplex-PCR (T100 ThermalCycler, Bio-Rad) na podstawie obecności genów markerowych - *chuA* i *yjaA* oraz fragmentu DNA TspE4.C2. Ponadto, ocenę częstości występowania genów kodujących następujące czynniki wirulencji tj. adhezyny (*fimH, papC, sfaDE, afaBC*),system wychwytu żelaza(*iroN, irp2*),toksyny(*hlyA, cnf1, vat*)i tzw. inne czynniki wirulencji(*traT, agn43, usp*)przeprowadzonow oparciu o metodę multiplex-PCR. Lekowrażliwość pałeczek (metoda dyfuzyjno-krążkowa) jak i mechanizmy oporności określono uwzględniając kryteria EUCAST i CLSI. Zdolność izolatów *E. coli* do tworzenia biofilmu oceniono za pomocą laserowego mikroskopu konfokalnego (LEXT OLS4000, OLYMPUS). W analizie statystycznej wykorzystano test Chi-kwadrat niezależności i test U Manna-Whitneya (p<0,05).

W przeważającej większości (83,3%) badane szczepy *E. coli* reprezentowały grupę filogenetyczną B2 i D. Analiza lekooporności szczepów *E. coli* wykazała, że 34,5% izolatów było opornych na trimetoprim/sulfametoksazol, 25,7% na amoksycylinę z kwasem klawulanowym, 26,6% na kwas nalidyksowy i 15,0% na ciprofloksacynę. Wirulotyp najczęściej występujący (23,9%) u uropatogennych szczepów *E. coli* obejmował geny adhezyn (***fimH+****,* ***papC+****,* ***sfaDE+***), systemu wychwytu żelaza (***irp*2*+****,* ***iroN+***), toksyn (***vat+****,* ***hlyA+****,* ***cnf1+***) i innych czynników wirulencji (***usp+****,* ***agn43+***)*.*

 Wykazano istotnie statystycznie częstsze występowanie następujących genów czynników wirulencji tj. *papC, sfaDE, iroN, irp2, hlyA, cnf1, vat, traT, agn43* i *usp* wśród szczepów *E. coli* sklasyfikowanych do grupy filogenetycznej B2. Stwierdzono również istotną statystycznie zależność pomiędzy opornością badanych pałeczek *E. coli* a niewystępowaniem i/lub liczbą genów czynników wirulencji (p<0,05).

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji niniejszej pracy wykazały zmniejszony potencjał wirulenty szczepów *E. coli* opornych na pewne grupy antybiotyków/chemioterapeutyków, dlatego też wskazana jest kontynuacja badań. Ponadto, w przypadku pacjentów z ZUM narażonych na działanie antybiotyków otrzymane wyniki mogą być pomocne w opracowaniu nowych opcji terapeutycznych i diagnostycznych ZUM.

# ABSTRACT

Urinary tract infections (UTI) are one of the most common bacterial infections both in children and adults, ranging from minor bladder infections to severe and recurrent infections of the upper urinary tract at high risk of complications and bacteremia. In Poland as well as globally UTIs are the frequent cause of general practitioner consultations. Moreover, UTIs are considered to be one of the most prevalent and significant causes of prescription of antimicrobial drugs. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) are responsible for up to 80% of human UTIs. Moreover, UPEC strains possess diverse virulence factors and antimicrobial resistance profiles. The selective pressure associated with misuse of antibiotics can lead to development and selection of resistant bacteria and dissemination of new clones of *E. coli* with greater virulence and expansiveness.

The primary aims of this PhD thesis were: 1/ to isolate and identify of uropathogenic *E. coli* strains from patients with community-acquired UTIs with significant bacteriuria; 2/ to determine their antibiotic resistance patterns; 3/ to assess virulence potential of *E. coli* strains by detection of virulence genes and their ability to biofilm formation; 4/ and, on this basis, to study a relationship between virulence and antibiotic resistance among the uropathogenic
*E. coli* strains.

During the period 2013-2015, total of 974 urine samples were collected from outpatients with UTIs (Podlasie region). The significant bacteriuria was determined by quantitative culture (Hoeprich method). Identification of *E. coli* isolates was performed using standard microbiological methods, including biochemical tests (API tests; BioMerieux), and confirmed by MALDI-TOF MS technique with Bruker Biotyper system (Microflex LT MALDI-TOF; BRUKER). In addition, all *E. coli* strains were assigned to phylogenetic groups (A, B1, B2, D) by targeting marker (*chuA*, *yjaA,* TspE4.C2) using multiplex PCR approach (T100 ThermalCycler; Bio-Rad). Multiplex PCR was also used to detect virulence genes encoding for pili (*fimH, papC, sfaDE, afaBC*), iron acquisition systems (*iroN, irp2*)toxins(*hlyA, cnf1, vat*)and *traT, agn43, usp*.Evaluation of antibiotic resistance profiles was performed with the standard disc diffusion method according to EUCAST and CLSI criteria. Finally, biofilm formation by *E. coli* strains was studied using the confocal microscope LEXT OLS4000 (OLYMPUS). The data were analyzed using Chi-square test of independence and Mann-Whitney U test (p<0,05).

Overall, 113 *E. coli* strains were examined, that represented mainly (83.3%) phylogenetic groups B2 and D. Additionally, 34.5% of the *E. coli* strains were resistant to trimethorpim/sulfamethoxazole, 25.7% to amoxicillin with clavulanic acid, 26.6% to nalidixic acid, and 15.0% to ciprofloxacin. The most prevalent pattern of virulence genes including genes encoding for pili (***fimH+, papC+, sfaDE+***), iron acquisition systems (***irp*2*+, iroN+***) toxins(**v*at+, hlyA+, cnf1+***) and other virulence factors (***usp+, agn43+***)was represented by 23.9% of UPEC strains.The statistically significant correlation (p<0.05) between the presence of virulence genes (*papC, sfaDE, iroN, irp2, hlyA, cnf1, vat, traT, agn43, usp*)and the B2 phylogenetic group was observed. Furthermore, the *E. coli* isolates resistant to different groups of antibiotic had a reduced virulence potential, i.e. lack of the virulence factors genes or/and the number of these genes (p<0,05).

In conclusion, these findings indicate, that uropathogenic *E. coli* strains resistant to various groups of antibiotic may be less virulent and deserve further investigation. Furthermore, this observation could be valuable in management of effective UTI therapy and diagnostic options e.g. for patients with UTIs who are frequently exposed to antibiotics, resistance provide a greater fitness advantage for *E. coli* than a virulence potential.