UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ



mgr Piotr Majewski

ROZPRAWA DOKTORSKA p.t.

**„Molekularne podstawy oporności na karbapenemy wśród klinicznych szczepów *Enterobacter cloacae*”**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Elżbieta Anna Tryniszewska

Promotor pomocniczy: dr n. med. Piotr Wieczorek

ZAKŁAD DIAGNOSTYKI MIKROBIOLOGICZNEJ I IMMUNOLOGII INFEKCYJNEJ

Białystok 2016

STRESZCZENIE

Narastająca oporność bakterii na antybiotyki stanowi jeden z najistotniejszych problemów współczesnej medycyny. Tendencja do kumulowania mechanizmów oporności na różne grupy leków przeciwbakteryjnych wśród wielolekoopornych bakterii Gram-ujemnych, znacząco ogranicza możliwości prowadzenia skutecznej terapii chorób infekcyjnych przede wszystkim wśród pacjentów hospitalizowanych. Jedną z ostatnich grup leków przeciwbakteryjnych zachowujących aktywność wobec wielolekoopornych patogenów, są karbapenemy, antybiotyki o wysokiej aktywności bakteriobójczej oraz szerokim spektrum działania określane często mianem „leków ostatniej szansy”. Coraz częściej jednak, izoluje się patogeny wytwarzające zróżnicowane mechanizmy oporności, obejmujące swym spektrum również antybiotyki z grupy karbapenemów, co znacząco ogranicza dostępne opcje terapeutyczne lub przyczynia się do ich całkowitego braku. Wśród mikroorganizmów zdolnych do kumulowania wielu mechanizmów oporności, coraz większe znaczenie odgrywa oportunistyczny patogen *Enterobacter cloacae.*

Celem niniejszej pracy była fenotypowa oraz molekularna analiza podstaw rozwoju oporności na karbapenemy wśród 65 klinicznych szczepów *Enterobacter cloacae*. Wśród analizowanej subpopulacji 44 szczepy charakteryzowały się opornością na co najmniej jedną substancję z grupy karbapenemów, podczas gdy grupę kontrolną stanowiło 21 szczepów *Enterobacter cloacae* wrażliwych na karbapenemy.

W grupie szczepów opornych na karbapenemy (grupa „R”) zidentyfikowano trzy odrębne mechanizmy mogące warunkować fenotyp oporności na karbapenemy. Mechanizmem unikatowym w skali przeprowadzonego badania, zidentyfikowanym w przypadku dwóch szczepów *Enterobacter cloacae* opornych na karbapenemy(5%) była zdolność do produkcji nabytej karbapenemazy OXA-48.

Oprócz produkcji nabytej karbapenemazy, obserwowano współwystępowanie dwóch odrębnych mechanizmów oporności związanych z antybiotykami β-laktamowymi – konstytutywnej nadprodukcji cefalosporynazy AmpC oraz zmian w profilu genów kodujących białka porynowe. Pierwszy ze współwystępujących mechanizmów był charakterystyczny dla większości szczepów *Enterobacter cloacae* z grupy „R” (97,7%). Modyfikacje w profilu genów kodujących białka porynowe występowały w przypadku większości szczepów z grupy „R”. Relatywny spadek poziomu ekspresji genu *ompF*, kodującego białko porynowe najbardziej istotne dla wydajnego transportu antybiotyków β-laktamowych do przestrzeni peryplazmatycznej występował u większości szczepów grupy „R” (53,4%). Drugim zjawiskiem odnotowanym w grupie szczepów opornych na karbapenemy była polaryzacja balansu produkowanych białek błony zewnętrznej w kierunku białka OmpC z wąskim, bardziej restrykcyjnym kanałem transbłonowym (79,1%). W grupie szczepów *Enterobacter cloacae* wrażliwych na karbapenemy dominował genotyp balansu porynowego, w przypadku którego przepuszczalność błony zewnętrznej była determinowana przez białko OmpF (33,3%). Drugą pod względem liczności grupę szczepów wrażliwych na karbapenemy, stanowiły patogeny o niezmienionej przepuszczalności błony zewnętrznej (28,6%).

Pokrewieństwo genetyczne badanych szczepów *Enterobacter cloacae* zostało zbadane z wykorzystaniem analizy sekwencji nukleotydowej genów metabolizmu podstawowego w schemacie MLST oraz metody maksymalnej parsymonii w analizie filogenetycznej. Przeprowadzone analizy pozwoliły na opisanie pięciu unikatowych alleli genów metabolizmu podstawowego oraz pięciu nowych typów sekwencyjnych. Grupa szczepów wrażliwych na karbapenemy charakteryzowała się wysokim stopniem zróżnicowania typów sekwencyjnych, wśród których nie udało się wyszczególnić grupy dominującej. Wśród szczepów *Enterobacter cloacae* z grupy „R” zdecydowanie dominuje typ sekwencyjny ST-89 (88,6%; n=39) co sugeruje klonalne rozprzestrzenianie opornych szczepów *Enterobacter cloacae* wśród pacjentów Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego oraz Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku.

Rozpowszechnienie mikroorganizmów opornych na większość lub wszystkie obecnie dostępne leki przeciwbakteryjne, pozwala sądzić że wkrótce możliwości terapeutyczne w chorobach infekcyjnych mogą być podobne do tych występujących jeszcze przed wprowadzeniem pierwszego leku przeciwbakteryjnego do leczenia.

SUMMARY

The growing incidence of drug resistance in bacteria is an emerging challenge in modern medicine. Enormous propensity of Gram-negative bacteria to accumulate various mechanisms of drug-resistance poses an especially high danger in the hospital environment. The utility of carbapenems, which are considered “last-line” agents in therapy of infections caused by multidrug-resistant pathogens, is being diminished by the growing incidence of various resistance mechanisms in bacteria. *Enterobacter cloacae* have lately begun to emerge as an important pathogen prone to exhibiting multiple drug resistance mechanisms and represents particularly high risk in the healthcare setting.

This study aimed to investigate the molecular basis of carbapenem-resistance in 65 *Enterobacter cloacae* clinical strains. Among analyzed subpopulation, 44 strains exhibited resistance to at least one carbapenem agent, while the control group consisted of 21 carbapenem-susceptible clinical *Enterobacter cloacae* strains.

Three distinct mechanisms of resistance to carbapenems have been reported in examined carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* subpopulation. The ability to produce acquired OXA-48 carbapenemase was the unique mechanism of resistance noted for only two carbapenem-resistant strains (5%). Apart from the production of acquired carbapenemase, coexistence of two distinct mechanisms of resistance to β-lactam antimicrobials has been reported – constitutive AmpC cephalosporinase overproduction coupled with outer membrane permeability defects. Cephalosporinase overproduction was common in carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* strains (97,7%).

Alterations in porin encoding genes expression was present in most carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* strains. Relative decrease of *ompF* gene expression havs been reported in 53,4% carbapenem-resistant strains. Downregulated *ompF* gene encodes protein with extensive transmembrane channel crucial for efficient β-lactam penetration into periplasm. The polarization of outer membrane protein balance was the another phenomenon described in carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* subpopulation. Outer membrane permeability in most carbapenem-resistant strains (79,1%) was established by OmpC protein recently reported to possess restrictive transmembrane channel. OmpF porin was responsible for outer membrane permeability in most of carbapenem-susceptible *Enterobacter cloacae* strains (33,3%). The second largest group of carbapenem-susceptible strains consisted of pathogens with relatively unchanged outer membrane permeability (28,6%).

Genetic relatedness among examined *Enterobacter cloacae* subpopulation was analyzed with use of multilocus-sequence typing scheme and phylogenetic maximum parsimony method. Performed nucleotide sequence analyses allowed to describe five unique alleles of housekeeping genes and five novel sequence types. Subpopulation of carbapenem-susceptible *Enterobacter cloacae* strains showed relatively high degree of sequence diversity without any predominant type. Sequence type 89 (ST-89) clearly dominates among carbapenem-resistant strains (88,6%) suggesting clonal spread of resistant strains among patients of University Hospital and University Children’s Hospital of Bialystok.

The growing prevalence of pathogens resistant to most or even all currently available antimicrobial agents heralds potential risk of future “post-antibiotic era”. Available therapeutic options in infectious diseases may be similar to those before introduction of the first antimicrobial agent into therapy.