

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej



mgr Anna Sieńko

ROZPRAWA DOKTORSKA pt.:

**„Genetyczne podstawy lekooporności i wirulencji klinicznych szczepów
Enterococcus faecalis i *Enterococcus faecium*.”**

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

ZAKŁAD DIAGNOSTYKI MIKROBIOLOGICZNEJ I IMMUNOLOGII INFEKCYJNEJ

Białystok 2017

7. STRESZCZENIE

Gram-dodatnie ziarniaki z rodzaju *Enterococcus* stały się w ostatnich latach jednymi z najważniejszych oportunistycznych patogenów powodujących poważne zakażenia o niezwykle ograniczonych możliwościach terapeutycznych. Z klinicznego punktu widzenia najważniejszymi gatunkami są *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*. Bakterie te cechują się znaczną zjadliwością, wysoką naturalną opornością oraz zdolnością do nabywania oporności, co wynika z plastyczności ich genomu i ogromnych możliwości adaptacyjnych, jak również ciągłej presji selekcyjnej, jakiej poddawane są w środowisku szpitalnym.

Głównym celem niniejszej pracy była fenotypowa oraz molekularna analiza wybranych mechanizmów oporności i wirulencji u klinicznych szczepów *E. faecalis* i *E. faecium*. Istotą badań było również porównanie badanych izolatów w zależności od gatunku (*E. faecalis* / *E. faecium*) i źródła izolacji (zakażenie / kolonizacja).

Materiał do badań stanowiło 75 szczepów *Enterococcus*: 45 izolatów *E. faecalis* (w tym 30 z zakażeń i 15 z kolonizacji) oraz 30 *E. faecium* (20 z zakażeń i 10 z kolonizacji), wyizolowanych z materiałów klinicznych od pacjentów USK i UDSK w Białymstoku. Wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) wyznaczono metodą dyfuzji antybiotyków z pasków nasączonych gradientem leku. Zdolność do hemolizy, produkcji biofilmu i β -laktamazy została określona metodami fenotypowymi. Z badanych szczepów wyizolowano materiał genomowy oraz plazmidowy, a następnie techniką PCR dokonano detekcji wybranych genów kodujących enzymy modyfikujące aminoglikozydy (AMEs), genów oporności na glikopeptydy i genów wirulencji, a uzyskane produkty poddano reakcjom sekwencjonowania. Ocenę pokrewieństwa i klonalnego rozprzestrzeniania się badanych szczepów przeprowadzono metodą MLST (Multi Locus Sequence Typing).

Analiza lekooporności wykazała, że antybiotykami o najwyższej aktywności wobec wszystkich badanych szczepów były linezolid i tigeceklina (100% szczepów wrażliwych). Dodatkowo, wysoką aktywność wobec szczepów *E. faecalis* zaobserwowano w przypadku ampicyliny i wankomycyny, a wobec szczepów *E. faecium* dla chinupristyny-dalfopristiny (>95% szczepów wrażliwych). Izolaty *E. faecium* cechowały się istotnie statystycznie wyższą opornością na β -laktamy, streptomycynę (HLSR), netylmicynę, kanamycynę oraz trimetoprim-sulfametoksazol w porównaniu do *E. faecalis* ($p < 0,05$). Najczęściej występującymi wariantami genów AMEs warunkującymi występowanie oporności wysokiego

stopnia na gentamicynę były *aph(3')-IIIa* i *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, a na streptomycynę – *ant(6')-Ia*. Geny te występowały istotnie statystycznie częściej u szczepów *E. faecium* niż u *E. faecalis* ($p < 0,05$).

Analiza wirulencji pozwoliła stwierdzić, że większość szczepów *E. faecalis* nie miało właściwości hemolitycznych (91,2%) i nie tworzyło biofilmu (88,9%), zaś 86,7% szczepów *E. faecium* posiadało obie te zdolności. Geny kodujące substancję agregującą (*asa*), żelatynazę (*gelE*), adhezynę zapalenia wsierdzia (*efaA*) oraz geny operonu cytolizyny (*cylA*, *cylLs*, *cylLl*, *cylM*, *cylB*) występowały istotnie statystycznie częściej u szczepów *E. faecalis*, a geny białka powierzchniowego (*esp*), białko wiążące kolagen (*ace*) i hialuronidazę (*hyl*) – u izolatów *E. faecium* ($p < 0,05$).

Ocena profili lekooporności i wirulencji oraz pokrewieństwa genetycznego wykazała, że szczepy *E. faecalis* cechowały się większą liczbą i zróżnicowaniem profili lekooporności i wirulencji oraz heterogenicznością struktury populacji (14 różnych typów sekwencyjnych ST należących do 12 kompleksów klonalnych CC) w porównaniu do izolatów *E. faecium*, wśród których wykryto jedynie 5 różnych ST należących do jednego kompleksu CC17. Sugeruje to klonalne szerzenie się szczepów *E. faecium* wśród pacjentów USK i UDSK.

Na podstawie niniejszej pracy wykazano, że badana populacja szczepów *Enterococcus* wykazuje niepokojąco wysokie poziomy oporności na antybiotyki i jest znacznym rezerwuarem genów oporności i wirulencji, co znacznie ogranicza możliwości terapeutyczne. Ponadto, geny te wykryto w materiale plazmidowym, czyli na ruchomych elementach genomu bakteryjnego, co świadczy o możliwości szybkiego ich rozprzestrzeniania się w środowisku szpitalnym. Narastająca oporność na antybiotyki szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* uwydatnia konieczność ciągłego aktywnego monitorowania ich lekowrażliwości, zjadliwości oraz genetycznego pokrewieństwa.

8. SUMMARY

Gram-positive cocci of the genus *Enterococcus* have in recent years become one of the most important opportunistic pathogen that lead to serious infections with limited therapeutic options. From the clinical point of view the most important species are *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. These bacteria are characterized by large virulence, high natural resistance and the ability to acquire resistance due to the plasticity of their genome and their

enormous adaptability, as well as the continuous selective pressure that they undergo in the hospital environment.

The main aim of this study was phenotypic and molecular analysis of selected mechanisms of resistance and virulence among *E. faecalis* and *E. faecium* clinical strains. The second goal was the comparison of tested isolates depending on the species (*E. faecalis* / *E. faecium*) and the source of isolation (infection / colonization).

A total of 75 strains of *Enterococcus* were investigated, including 45 *E. faecalis* isolates (30 from infections and 15 from colonization) and 30 *E. faecium* (20 and 10, respectively). Strains were isolated from clinical materials from patients of USK and UDSK in Białystok. Minimum inhibitory concentrations (MIC) were examined by the diffusion of antibiotics from strips impregnated with a gradient of drugs. The abilities to hemolyse, produce biofilm and β -lactamase were determined by phenotypic methods. In the next step, the isolation of genomic and plasmid DNA was performed and PCR method and DNA sequencing were used for detection of selected genes encoding the aminoglycoside modifying enzymes (AMEs), glycopeptide resistance genes and virulence genes. Assessment of the genetic relatedness and clonal spread of tested strains was carried out by MLST (Multi Locus Sequence Typing).

The analysis of the resistance revealed that linezolid and tigecycline had the highest activity towards all tested isolates (100% susceptible strains). In addition, high activity against *E. faecalis* strains was observed for ampicillin and vancomycin, and against *E. faecium* strains – for quinupristin-dalfopristin (> 95% susceptible strains). *E. faecium* isolates were characterized by a significantly higher resistance to β -lactams, streptomycin (HLSR) netilmicin, kanamycin, and trimethoprim-sulfamethoxazole compared to *E. faecalis* ($p < 0.05$). The most frequent variants of genes encoding AMEs which determine the occurrence of high level gentamicin resistance were *aph(3')-IIIa* and *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, to streptomycin – *ant(6')-Ia*. These genes were detected more frequently in *E. faecium* than in *E. faecalis* strains ($p < 0,001$).

Analysis of virulence has shown that most of *E. faecalis* strains had no hemolytic properties (91.2%) and did not create biofilm (88.9%), whereas 86.7% of *E. faecium* strains had this two abilities. Genes encoding aggregation substance (*asa*), gelatinase (*gelE*), endocarditis antigen (*efaA*) and the cytolysin operon genes (*cylA*, *cylLs*, *cylLI*, *cylM*, *cylB*)

occurred significantly more often among *E. faecalis* strains, while genes encoding surface protein (*esp*), collagen adhesin (*ace*) and hyaluronidase (*hyl*) – among *E. faecium* isolates ($p < 0,05$).

Evaluation of the antibiotic resistance and virulence profiles and genetic relatedness showed that *E. faecalis* strains were characterized by a greater number and variety of these profiles and had more heterogeneous population structure (14 different sequence types ST belonging to 12 clonal complexes CC) compared to *E. faecium* isolates, among which only 5 different STs belonging to one clone CC17 was detected. This suggests the clonal spread of *E. faecium* strains among patients of USK and UDSK.

This study showed that the tested population of *Enterococcus* exhibits the alarmingly high levels of resistance and is a major reservoir of resistance and virulence genes, which significantly reduces the therapeutic options. Moreover, these genes were detected in plasmid material, which means that they are on mobile genetic elements, indicating the possibility of the rapid spread of these genes in a hospital environment. The increasing resistance among *E. faecalis* and *E. faecium* strains emphasizes the necessity to continuous active monitoring of their susceptibility, virulence and genetic relatedness.