

4. Streszczenie w języku polskim

Słowa kluczowe

Acinetobacter baumannii, karbapenemazy, efflux, pompy błonowe, wielolekooporność, karbapenemy, sekwencje insercyjne, TGS, PFGE, MLST

Jednym z najczęściej izolowanych patogenów wielolekoopornych wywołujących zakażenia szpitalne jest Gram-ujemna pałeczka niefermentująca *Acinetobacter baumannii*. Niepokojącym zjawiskiem jest obserwowana na świecie narastająca oporność izolatów *A. baumannii* na karbapenemy, tzw. leki „ostatniej szansy”. Za dominujący mechanizm odpowiedzialny za oporność na karbapenemy szczepów *A. baumannii* uznaje się karbapenemazy z rodziny CHDL. Ponadto obecność sekwencji insercyjnych (IS) bezpośrednio przed genami *bla_{CHDL}* powoduje iż, IS jako silne promotory *bla_{CHDL}* przyczyniają się do oporności szczepu na karbapenemy. Coraz więcej uwagi poświęca się zjawisku aktywnego usuwania związków z komórki bakteryjnej przez pompy błonowe. U *A. baumannii* za usuwanie z komórek karbapenemów odpowiada przede wszystkim system AdeABC należący do rodziny pomp RND. Jest on kodowany chromosomalnie przez operon *adeABC*, którego ekspresja jest regulowana przez dwuskładnikowy system regulatorowy AdeRS.

Celem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej było określenie udziału w oporności na karbapenemy dwóch ważnych mechanizmów, tj. karbapenemaz i pomp błonowych MDR. Przewód doktorski składa się z cyklu 3 publikacji: jednej przeglądowej, w której dokonano analizy piśmiennictwa pod kątem mechanizmów oporności na leki u szczepów *A. baumannii*, oraz dwóch prac oryginalnych. W części doświadczalnej materiał do badań stanowiło 61 niewrażliwych na imipenem izolatów klinicznych *A. baumannii* wyizolowanych od chorych z jednego wieloprofilowego warszawskiego szpitala, w latach 2010-2014. Zostały one wyselekcjonowane z puli 195 izolatów w przeprowadzonych badaniach wstępnych. W pracy dokonano charakterystyki puli 61 izolatów pod kątem ich podobieństwa genetycznego (metodą PFGE oraz dla wybranych izolatów metodą MLST) oraz wrażliwości na związki przeciwbakteryjne. Zasadnicze badania koncentrowały się na analizie 61 izolatów pod kątem: (I) obecności genów kodujących enzymy CHDL razem z sekwencjami insercyjnymi oraz fenotypowej aktywności karbapenemaz, oraz (II) obecności genów kodujących pompy MDR usuwające karbapenemy oraz badanie ich fenotypowej aktywności z wykorzystaniem inhibitorów EPI. Dla wybranych izolatów

określono poziom ekspresji genów kodujących system pomp AdeABC i jego dwuskładnikowy system regulatorowy AdeRS metodą RT-qPCR. Ponadto genomy tych izolatów poddano sekwencjonowaniu w celu określenia występowania mutacji w w/w genach.

Uzyskane wyniki wykazały, że dominującym mechanizmem oporności na karbapenemy u 61 badanych izolatów *A. baumannii* były karbapenemazy CHDL; wszystkie izolaty posiadały co najmniej jeden z enzymów CHDL, a 97% (59/61) poza naturalną karbapenemazą OXA-51, także jeden z nabytych enzymów, z czego u największej liczby izolatów wykryto enzym OXA-24. Sekwencję insercyjną IS*Aba1* wykryto u wszystkich izolatów *bla*_{OXA-23-like}-dodatnich, a IS*Aba3* u wszystkich *bla*_{OXA-58-like}-dodatnich. Ponadto, fenotypową aktywność karbapenemaz w teście CarbAcineto NP wykazano dla 46/61 izolatów. Geny *adeB* oraz *abeM* kodujące białka transporterów w systemie AdeABC i AbeM, wykryto u 61 izolatów. Fenotypowe badanie aktywności systemów pomp MDR wykazało u 14 izolatów spadki wartości MIC karbapenemów w obecności inhibitorów EPI - PAβN i CCCP.

Dalsze badania molekularne przeprowadzono na 15 izolatach niosących różne geny *bla*_{CHDL} i wykazujących różny wpływ obecności EPI na wartości MIC karbapenemów. Wykazano, że niezależnie od aktywności fenotypowej systemów pomp MDR, u wszystkich szczepów zaobserwowano nadekspresję genu *adeB*. Wyniki sekwencjonowania wykazały zmiany aminokwasowe w sekwencji regulatorowej AdeRS u wszystkich 15 badanych izolatów. Co istotne, trzy izolaty wyróżniały się zdecydowanie wyższymi wartościami ekspresji genu *adeB* względem szczepu referencyjnego, a także jednocześnie jako jedyne posiadały insercję w obrębie sekwencji regulatorowej *adeRS*. Uzyskane wyniki sekwencjonowania metodą TGS genomu jednego z izolatów - AB 96 wykazały, że pomiędzy genami *adeR* i *adeA* obecny jest fragment wyspy oporności *AbaR25* o długości 13,5 pb. W wyniku tej insercji gen *adeR* został uszkodzony razem z fragmentem sekwencji nukleotydowej niezbędnej do przyłączenia się białka AdeR, a kontrolę nad ekspresją genu *adeB* najprawdopodobniej przejął silny promotor tj. sekwencja IS*Aba1*, zlokalizowana bezpośrednio przed genem *adeA*.

Podsumowując, u badanych szczepów *A. baumannii* karbapenemazy stanowiły powszechny mechanizm oporności na karbapenemy. Ponadto wyniki wysokiej ekspresji operonu *adeABC* i spadki wartości MIC meropenemu w obecności EPI wskazują, że system pomp AdeABC ma również istotne znaczenie w obniżeniu wrażliwości izolatu na karbapenemy. Generalny wniosek płynący z badań przeprowadzonych w niniejszej

pracy doktorskiej stanowi stwierdzenie, że oporność na karbapenemy u *A. baumannii* może być wynikiem udziału jednocześnie dwóch mechanizmów zarówno nabytych karbapenemaz jak i nadekspresji operonu pomp błonowych *adeABC*.

Alicja Sibayishle

