

2. Streszczenie w języku polskim

Słowa kluczowe: *Stenotrophomonas maltophilia*, systemy pomp RND, pompy MDR, lekooporność, fluorochinolony, PFGE, MLST, regulatory pomp błonowych

Stenotrophomonas maltophilia jest jedną z Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących, coraz częściej odpowiadającą na świecie za zakażenia szpitalne, głównie zapalenia płuc. Zakażenia *S. maltophilia* stanowią bardzo poważny problem terapeutyczny z uwagi na występowanie naturalnej oporności tych szczepów na szereg grup związków przeciwbakteryjnych. Obecność błonowych pomp oporności wielolekowej (MDR, ang. multi-drug resistance) jest jednym z istotnych mechanizmów oporności *S. maltophilia*.

Badania przedstawione w ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono na grupie 94 izolatów *S. maltophilia* pochodzących od dorosłych pacjentów z jednego wieloprofilowego warszawskiego szpitala (n=79 izolatów) oraz od pacjentów pozaszpitalnych (n=15). Wszystkie izolaty zostały pobrane w okresie: styczeń 2010 – październik 2013, z różnych materiałów klinicznych, przy czym 27 pochodziło z próbek krwi. Ich przynależność do gatunku *S. maltophilia* potwierdzono przy użyciu systemu Vitek-2. Wykonano analizę podobieństwa genetycznego puli 94 izolatów z zastosowaniem metody elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE, ang. pulsed field gel electrophoresis), która wykazała bardzo dużą różnorodność genetyczną. Ponadto, w badaniu PFGE wyodrębniono dwie grupy izolatów, które charakteryzowały się 100% podobieństwem: grupa pierwsza A1 PT obejmująca 9 izolatów, a druga grupa A3 PT obejmująca 6 izolatów. Izolaty grup A1 PT oraz A3 PT pochodziły z próbek krwi od szpitalnych pacjentów i były wyizolowane na przestrzeni lat 2010-2013. Najprawdopodobniej doszło do zakażenia pacjentów szczepami bytującymi w środowisku szpitalnym. Dla 3 wybranych szczepów pochodzących z próbek krwi wykonano także typowanie MLST (ang. multi-locus sequence typing). Dziewięć sekwencji, dotyczących 7 genów metabolizmu podstawowego określonych w MLST, zostało zareportowanych po raz pierwszy. Wszystkie trzy szczepy reprezentowały dwa nowe profile ST, dwa szczepy należały do ST498 i jeden do ST499. Zarówno nowe sekwencje genów metabolizmu podstawowego, jak i nowe typy ST zostały zdeponowane w międzynarodowej bazie danych MLST.

Dla całej puli 94 izolatów została także wykonana analiza lekowrażliwości z uwzględnieniem związków przeciwbakteryjnych powszechnie stosowanych w terapii zakażeń *S. maltophilia*. Wykazano, iż wszystkie izolaty są wrażliwe na

trimetoprim/sulfametoksazol oraz minocyklinę. W przypadku lewofloksacyny, wykryto ponad 7% (7/94) izolatów opornych, a 39% (37/94) należało do kategorii wrażliwości „wrażliwy, zwiększona ekspozycja”. Dla 13 z 94 badanych izolatów *S. maltophilia* stwierdzono 4-krotny spadek wartości MIC lewofloksacyny w obecności inhibitora pomp błonowych (CCCP, PAβN lub rezerpiny), z czego dla 10 izolatów spadek uzyskano przy zastosowaniu CCCP. Ponadto, dla 7 izolatów spadek wartości MIC lewofloksacyny został uzyskany po dodaniu PAβN, a tylko dla jednego izolatu po dodaniu rezerpiny.

Dla każdego z 94 izolatów przeprowadzono również badanie obecności genów kodujących wybrane białka systemów pomp z rodzin RND oraz ABC przy zastosowaniu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. polymerase chain reaction). Systemy SmeDEF, SmeMN, SmeGH i MacABCsm były obecne u wszystkich 94 izolatów, system SmeVWX oraz pompa SmrA u 93/94 izolatów, system SmeOP u 90/94, system SmeYZ u 89/94, system smeIJK u 86/94, a system SmeABC u 72/94 izolatów.

W niniejszej pracy doktorskiej oceniano także metodą real-time RT-qPCR (ang. real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) poziom ekspresji wybranych genów kodujących następujące systemy pomp, dla których lewofloksacyna została opisana jako jeden z substratów: SmeDEF, SmeABC, SmeVWX, SmeGH oraz SmeIJK. Szczep 41/2011, jako jedyny z 6 badanych, wykazał wysoką nadekspresję genu *smeV* o wartości 60,81 w odniesieniu do szczepu referencyjnego. Pięć z sześciu badanych izolatów wykazało nadekspresję genu *smeD*, która mieściła się w zakresie 3,47 – 21,40 w odniesieniu do szczepu referencyjnego. Nadekspresja *smeD* nie korelowała z poziomem oporności izolatów na lewofloksacynę. Dla 3 izolatów o zwiększonej ekspresji *smeDEF*, określono sekwencję genu regulatorowego systemu SmeDEF - *smeT*. U wszystkich trzech izolatów wykazano liczne mutacje w genie *smeT* w porównaniu do szczepu 67/2013, ale jedynie dla izolatu 35/2011, zmiany nukleotydowe prowadziły do zmiany w sekwencji aminokwasowej: Arg123Lys, Asp182Glu, Asp204Glu. Dla szczepu 41/2011, określono sekwencję genu regulatorowego systemu SmeVWX – *smeRv*. Wykazano liczne mutacje nukleotydowe *smeRv* w odniesieniu do szczepu referencyjnego 67/2013, ale jedynie jedna mutacja skutkowała zmianą w sekwencji aminokwasowej: Gly266Ser.

Uzyskane w pracy wyniki wskazują, iż system pomp SmeVWX jest mechanizmem odpowiadającym za oporność na lewofloksacynę. Wysoka nadekspresja operonu *smeUIVWU2X* może być przyczyną oporności szczepów klinicznych *S. maltophilia* także na inne leki będące substratami tego systemu pomp błonowych, co może pociągać za sobą implikacje terapeutyczne.