

mgr Weronika M. Ilczyszyn

Zakład Mikrobiologii WBBiB UJ

Promotor: Prof. dr hab. Jacek Międzobrodzki

Promotor pomocniczy: dr Artur J. Sabat

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Genetic diversity of human and animal-associated *Staphylococcus aureus* isolates based on *spa* typing and DNA microarray analysis.

Zróżnicowanie genetyczne ludzkich i zwierzęcych izolatów *Staphylococcus aureus* na podstawie typowania *spa* oraz analizy mikromacierzy DNA.

Gatunek bakterii *Staphylococcus aureus*, znany pod polską nazwą gronkowiec złocisty, jest składnikiem mikroflory prawidłowej ludzi i zwierząt oraz oportunistycznym patogenem. Ze względu na powszechną kolonizację i nosicielstwo bakterie *S. aureus* stanowią ważny czynnik etiologiczny zakażeń szpitalnych o lokalnym lub systemowym przebiegu. Również u zwierząt gronkowce powodują szereg zakażeń skutkujących wysokimi stratami ekonomicznymi. Celem przedstawionej pracy było dogłębne zbadanie zróżnicowania genetycznego kolekcji liczącej 337 izolatów *S. aureus* zgromadzonych w latach 2008–2014, głównie na terenie Polski. Kolekcja obejmowała 178 ludzkich, 144 zwierzęcych, 11 środowiskowych izolatów oraz 4 szczepy referencyjne.

W pracy zastosowano dwie molekularne metody oceny pokrewieństwa: typowanie *spa* oraz analizę mikromacierzy DNA. Typowanie *spa* (ang. *spa* typing) polegało na amplifikacji drogą PCR (ang. *polymerase chain reaction*), sekwencjonowaniu oraz analizie krótkich sekwencji repetytywnych polimorficznego regionu X genu kodującego białko A (*spa*). Mikromacierze DNA oraz zestaw StaphyType 2.0 (Alere Technologies) pozwoliły na jednoczesną detekcję 330 markerów *S. aureus*, odpowiadających ponad 180 genom i ich formom allelicznym, takich jak toksyny, hemolizyny, proteazy, białka adhezyjne, składniki ściany komórkowej czy enzymy gronkowcowe. Dodatkowo system StaphyType pozwolił na automatyczne dopasowanie izolatów do znanych kompleksów klonalnych (ang. clonal complex, CC) lub/i linii epidemicznych. Analizie statystycznej (test Fisher'a) poddano różnice w występowaniu wybranych genów wirulencji i oporności w podgrupach wydzielonych w oparciu o obecność genu *mecA* warunkującego oporność na metycylinę i prawie wszystkie antybiotyki β -laktamowe (ang. methicillin resistant *S. aureus*, MRSA vs ang. methicillin susceptible *S. aureus*, MSSA) oraz pochodzenie izolatów (human-associated vs animal-associated).

Na drodze typowania *spa*, wśród wszystkich analizowanych izolatów zidentyfikowano łącznie 100 typów *spa*, w tym 11 nowych. Najbardziej licznymi typami *spa* były t091, t053, t003, t14395 i t015. Analiza BURP (ang. based upon repeat pattern) w programie Ridom StaphType pozwoliła na przyporządkowanie szczepów do 12 spokrewnionych kompleksów

spa (*spa* clonal complexes, *spa*-CCs) oraz 48 singletonów. Podczas analizy mikromacierzy DNA, w analizowanej kolekcji zidentyfikowano 66 izolatów niosących kasetę SCC*mec* zawierającą gen *mecA*, który warunkuje oporność gronkowców na metycylinę i prawie wszystkie antybiotyki β -laktamowe. Najczęściej występującymi kasetami SCC*mec* były typy II i IV. Spośród 29 zidentyfikowanych CC/ST, 9 dominowało a najbardziej licznymi z nich były CC5, CC45, CC15 i CC7. Wśród izolatów zaklasyfikowanych jako MRSA, typy *spa*, *spa*-CCs oraz CCs: t003, t015, t2642, *spa*-CC 002, *spa*-CC 015, *spa*-CC 2393, *spa*-CC 2642 oraz CC5, CC45 występowały znamienne statystycznie częściej w porównaniu z MSSA. Z kolei wśród izolatów, u których nie wykazano obecności genu *mecA*, istotnie statystycznie przeważały genotypy *spa* t052, t084, t14395, *spa*-CC 012, *spa*-CC 024, *spa*-CC 084, *spa*-CC 14395 oraz CC8, CC9, CC15, CC30 oraz CC97. Podczas porównania w odniesieniu do gospodarza, wykazano iż następujące genotypy: *spa* t091, t015, t2642, *spa*-CC 012, *spa*-CC 015, *spa*-CC 024, *spa*-CC 091, CC7, CC8, CC30, CC45 oraz linia klonalna Berlin EMRSA występowały znamienne częściej w podgrupie izolatów pochodzących od ludzi, natomiast *spa* t053, t14395, t002, t010, t150, *spa*-CC 053, *spa*-CC 14395, *spa*-CC 521, *spa*-CC 8646 oraz CC5, CC9 i CC97 wśród izolatów zwierzęcych. Wśród izolatów ludzkich znacząco częściej wykazano obecność genów warunkujących oporność na antybiotyki m.in. *mecA*, *blaZ/R/I* i *erm(A)*, jednakże w obrębie całej kolekcji zawartość determinant antybiotykooporności była stosunkowo niska. Wielolekowa oporność charakteryzowała również częściej izolaty zaklasyfikowane jako MRSA. Spośród najważniejszych markerów wirulencji geny kodujące enterotoksyny gronkowcowe (*sea*, *sed*, *sej*, *ser*, klaster *egc*) oraz czynniki zaburzające odpowiedź immunologiczną (*scn*, *sak*, *chp*) występowały dużo częściej w grupie MRSA, natomiast toksyna szoku toksycznego 1 (TSST-1, *tstI*) oraz proteazy serynowe (*splA*, *splB*, *splE*) wśród izolatów MSSA. Porównując kolekcję w odniesieniu do gospodarza, izolaty ludzkie charakteryzowały się m.in. znacząco wyższym odsetkiem występowania globalnego regulatora ekspresji typu I lub III (*agr I*, *agr III*), otoczki polisacharydowej typu 8 (*cap 8*), TSST-1 (*tstI*), proteiny serynowej E (*splE*) oraz czynników zaburzających odpowiedź immunologiczną (*scn*, *sak*, *chp*). Z kolei wśród izolatów zwierzęcych istotnie częściej występował system *agr* typu II i IV (*agr II*, *agr IV*), otoczka typu 5 (*cap 5*), enterotoksyna A (*sea*) oraz proteiny serynowe A i B (*splA*, *splB*).

W analizowanej kolekcji zaobserwowano zarówno duże zróżnicowanie jak i istnienie dominujących genotypów *S. aureus*. Izolaty zaklasyfikowane jako MRSA cechowała wysoka klonalność, natomiast izolaty MSSA wykazywały duże zróżnicowanie genetyczne. Również w stosunku do nosicieli, szczepy zwierzęce były dużo bardziej zróżnicowane w porównaniu do izolatów ludzkich. Zaobserwowane w niniejszej pracy częstości genotypów oraz zawartości determinant antybiotykooporności wskazują na istnienie różnic pomiędzy izolatami ludzkimi a zwierzęcymi, aczkolwiek zwierzęta domowe i hodowlane wykazują podatność na infekcje epidemicznymi szczepami MRSA. Wyniki otrzymane w zrealizowanym projekcie badawczym mają dużą wartość, gdyż wnoszą poważny wkład w badaniach nad zróżnicowaniem genetycznym gronkowców oraz poznawaniu mechanizmów zakażeń oportunistycznych u ludzi i zwierząt.