

Streszczenie pracy doktorskiej mgr Edyty Golińskiej

Promotor: prof. dr hab. Magdalena Strus

Temat pracy doktorskiej: „*Virulence factors of selected Gram-positive cocci causing invasive infections, especially in peri-labor women and newborns with low birth weight*”

(„*Czynniki wirulencji wybranych ziarenkowców Gram-dodatnich wywołujących zakażenia inwazyjne, głównie u kobiet w połogu i u noworodków z niską masą urodzeniową*”) – cykl publikacji

Wprowadzenie: Ziarenkowce Gram-dodatnie są opisywane jako wiodąca grupa stanowiąca najczęstsze czynniki etiologiczne zakażeń u ludzi. Są one odpowiedzialne za szeroki wachlarz infekcji o różnym stopniu ciężkości. Niektóre z nich, choć występują stosunkowo rzadko, mają charakter inwazyjny tzn. rozwijają się w fizjologicznie jałowych narządach organizmu i, pomimo leczenia, obarczone są wysoką śmiertelnością. Ponadto wśród szczepów inwazyjnych występują wysoce zjadliwe klony o globalnym zakresie, często odporne na wiele antybiotyków, co powoduje, że bakterie te są przedmiotem intensywnych badań prowadzonych przez lekarzy, mikrobiologów, a także epidemiologów.

Cel pracy:

1. Poznanie mechanizmów wirulencji zwiększających ryzyko nabycia i ciężkiego przebiegu zakażeń wywołanych przez niektóre szczepy *S. pyogenes* oraz gronkowce koagulazo-ujemne.
2. Określenie zależności pomiędzy obecnością w genomie genów wirulencji a chorobotwórczością badanych ziarenkowców Gram-dodatnich
3. Sprawdzenie zależności pomiędzy obecnością genów odpowiedzialnych za adherencję a siłą adherencji badanych szczepów do wybranych ludzkich linii komórkowych
4. Określenie czy przynależność do pewnych emm-typów wpływa na wirulencję szczepów *S.pyogenes*
5. Potwierdzenie hipotezy, że obecność określonych czynników zjadliwości pozwala na translokację gronkowców koagulazo-ujemnych z przewodu pokarmowego do krwi

Materiały: Szczepy *Streptococcus pyogenes* izolowano od pacjentów, u których doszło do rozwinięcia się klinicznych objawów inwazyjnych zakażeń GAS, takich jak: zakażenia ran i skóry, martwiczego zapalenia powięzi, sepsy i gorączki połogowej. Grupę kontrolną stanowiły paciorkowce wyizolowane z nieinwazyjnych zakażenia ran i skóry, infekcji górnych dróg oddechowych oraz z przypadków zakażeń dróg rodnych od kobiet. Szczepy gronkowców koagulazo-ujemnych wyizolowano z krwi, kału i cewników naczyniowych noworodków z niską masą urodzeniową, u których potwierdzona została sepsa.

Metodyka: W celu przeprowadzenia szczegółowej charakterystyki molekularnej czynników wirulencji badanych szczepów, wykorzystane zostały metody molekularne tj. PCR oraz multiplex PCR. Jako standardową technikę typowania molekularnego dla CoNS zastosowano elektroforezę w polu pulsacyjnym (PFGE). Przeprowadzono również badania nad adherencją szczepów *S.pyogenes* do linii ludzkiego endometrium HEC 1B, a szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych do linii Caco-2. Dodatkowo badano zdolność szczepów CoNS do produkcji biofilmu.

Wyniki: Szczepy ziarenkowców Gram-dodatnich pochodzące z zakażeń inwazyjnych wykazywały mniejszą zdolność do adherencji do komórek tkanek ludzkich, oraz brak obecności genów odpowiedzialnych za adherencję. Wykazano, że większość badanych szczepów *S.pyogenes* wykazuje ekspresję dwóch typów genów emm (1 i 28). Stwierdzono istotnie większą częstość występowania perR w szczepach z gorączki połogowej, chociaż różnice w częstościach kodowania genów dla różnych superantygenów, pomiędzy porównywanymi grupami szczepów GAS, były nieznaczne. Izolaty CoNS o identycznych profilach PFGE w porównaniu z tymi o nieidentycznych profilach różniły się wzorcem genów wirulencji, ale częściej wykazywały obecność IS256, co jest związane z większą zjadliwością.

Wnioski: Badane szczepy ziarenkowców Gram-dodatnich pochodzących z zakażeń inwazyjnych wykazywały zwiększoną zdolność do inwazji i przeżycia w tkankach, zaś mniejszą zdolność do kolonizacji powierzchni tkanek. Nie potwierdzono funkcjonującej powszechnie hipotezy o większej zjadliwości szczepów spowodowanej obecnością licznych genów wirulencji. Wykazano, iż przechwytywanie jonów żelaza przez paciorkowce grupy A, może wpływać na ich większą patogenność. Udowodniono, że gronkowce koagulazo-ujemne kolonizujące jelito wczesniaków z niską masą urodzeniową mają zdolności do translokacji i wywoływania sepsy.

Summary

Introduction: Gram-positive cocci are described as the leading infectious agents in humans. They are responsible for a wide range of diseases about different degree of the heaviness. Some of them, although they relatively rarely appear, have invasive character i.e. are developing in physiologically barren organs and, in spite of the treatment, are burdened with the high mortality. Moreover highly virulent clones are appearing among invasive strains about the global scope, often resistant to a lot of antibiotics. That causes, these bacteria are an object of intensive researches conducted by doctors, microbiologists, as well as epidemiologists.

Aim of the studies:

1. Understanding the mechanisms of virulence increasing the risk of acquiring and severe course of infections caused by certain strains of *S.pyogenes* and coagulase-negative staphylococci.
2. Determination of the relationship between the presence of virulence genes in the genome and the pathogenicity of the studied gram-positive cocci
3. Checking the relationship between the presence of genes responsible for adherence and the strength of adherence of the tested strains to selected human cell lines
4. Determining whether belonging to certain emm-types affects the virulence of *S.pyogenes* strains
5. Confirmation of the hypothesis that the presence of specific virulence factors allows coagulase-negative staphylococci to translocate from the gastrointestinal tract into the blood.

Materials: Streptococcus pyogenes strains were isolated from patients who developed clinical symptoms of invasive GAS infections, such as wound and skin infections, necrotizing fasciitis, sepsis and puerperal fever. The control group consisted of streptococci isolated from non-invasive wound and skin infections, upper respiratory tract infections and cases of female genital tract infections. Coagulase-negative staphylococci strains were isolated from the blood, faeces and vascular catheters of low birth weight newborns in whom sepsis was confirmed

Methodology: In order to evaluate the presence of the virulence factors of studied strains, molecular methods were used (PCR and multiplex PCR). Pulsed field electrophoresis (PFGE) was used as the standard molecular typing technique for CoNS. Studies on the adherence of *S.pyogenes*

strains to the HEC 1B human endometrial line and coagulase negative staphylococci strains to the Caco-2 line were also determined.

Results: Gram-positive cocci strains from invasive infections showed a lower adherence to human tissue cells and the absence of genes responsible for adherence. It was shown that most of the studied strains of *S.pyogenes* express two types of emm genes (1 and 28). A significantly higher frequency of *perR* was found in the puerperal fever strains, although the differences in the frequency of gene coding for different superantigens between the compared groups of GAS strains were insignificant. CoNS isolates with identical PFGE profiles differed in the pattern of virulence genes as compared to those with non-identical profiles, but more frequently showed the presence of IS256, which is associated with higher virulence.

Conclusions: The studied strains of gram-positive cocci originating from invasive infections showed an increased ability to invade and survive in tissues, and a lower ability to colonize the tissue surface. The commonly functioning hypothesis of greater virulence of strains caused by the presence of numerous virulence genes has not been confirmed. It has been shown that the binding of iron ions by group A streptococci may increase their pathogenicity. Coagulase-negative staphylococci that colonize the intestines of premature infants with low birth weight have been shown to have the ability to translocate and induce sepsis.