



Gdański Uniwersytet Medyczny

Izabela Błażewicz

**Analiza czynników zjadliwości i oporności na antybiotyki
szczepów *Staphylococcus aureus* kolonizujących chorych
z atopowym zapaleniem skóry.**

**ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK
MEDYCZNYCH**

Gdańsk 2016

Wydano za zgodą
Dziekana Wydziału Lekarskiego

Pracę wykonano w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii, Katedrze
Mikrobiologii i Katedrze Chemii Nieorganicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:

Dr hab. n.med. Wioletta Barańska-Rybak

SPIS TREŚCI

<u>SPIS TREŚCI</u>	3
<u>WYKAZ SKRÓTÓW</u>	4
<u>WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY</u>	6
<u>WPROWADZENIE</u>	7
<u>CELE PRACY</u>	8
<u>METODYKA I MATERIAŁ BADAŃ</u>	9
<u>OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH</u>	
<u>W SKŁAD ROZPRAWY</u>	10
<u>STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM</u>	15
<u>WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA</u>	22
<u>PODZIĘKOWANIA</u>	24
<u>PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY</u>	25

WYKAZ SKRÓTÓW

AD- *atopic dermatitis*

AMPs- *antimicrobial peptides* / peptydy przeciwdrobnoustrojowe

AZS- atopowe zapalenie skóry

CA-MRSA- *community-associated (acquired) MRSA*/ pozaszpitalne szczepy MRSA

ChromID MRSA/ ChromID *S.aureus- chromogenic medium for the selective isolation of staphylococci and the direct identification of S. aureus and MRSA*/ chromogenne podłoże do selektywnej izolacji gronkowców i bezpośredniej identyfikacji gronkowca złocistego i MRSA

ETA, ETB- Exfoliative Toxin A and B/ eksfoliatyna A i B

HA-MRSA- *health care-associated (acquired) MRSA*/ szpitalne szczepy MRSA

HBD - *human beta-defensin* / ludzka beta-defensyna

IgE-*immunoglobulin E*/ immunoglobulina E

IL- *interleukin* / interleukina

IFN- γ -*Interferon-gamma*/ Interferon gamma

LL- 37 - ludzka katelicydyna – peptyd przeciwdrobnoustrojowy złożony z 37 aminokwasów

MIC- *minimum inhibitory concentration*/ minimalne stężenie hamujące

MRSA- *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* / Gronkowiec złocisty oporny na metycylinę

MSSA-*methicillin- susceptible Staphylococcus aureus* / Gronkowiec złocisty wrażliwy na metycylinę

PCR- *Polymerase chain reaction* / reakcja łańcuchowa polimerazy

PVL- *Panton-Valentine leukocidine* / leukocydyna Pantona- Valentina

SCC*mec- Staphylococcal chromosomal cassette mec* / chromosomalna kasetta gronkowcowa *mec*

SEA-D - *Staphylococcal Enterotoxins A-D*/ gronkowcowe enterotoksyny A-D

S. aureus- Staphylococcus aureus

TNF- α - *tumor necrosis factor - α* / czynnik martwicy nowotworu- α

TSST-1 - *Toxic Shock Syndrome Toxin-1*/Toksyna Wstrząsu Septycznego 1

Th- *T helper cells*/komórki T pomocnicze

WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

1. **Izabela Błażewicz**, Wioletta Barańska-Rybak, Roman Nowicki.

Pozaszpitalne zakażenia szczepami gronkowca złocistego opornego na metycylinę – ewolucja szczepów czy działanie jatrogenne? Przegł Dermatol 2014, 101, 181–186.

DOI: 10.5114/dr.2014.43807.

Punktacja ministerstwa 12,000; Index Copernicus 8,12

2. **Izabela Błażewicz**, Maciej Jaśkiewicz, Lidia Piechowicz, Wojciech Kamysz, Roman Nowicki, Wioletta Barańska-Rybak. **Rola peptydów przeciwdrobnoustrojowych w wybranych dermatozach.** Przegł Dermatol 2016, 103, 227–232.

DOI: 10.5114/dr.2016.60628.

Punktacja ministerstwa 12,000; Index Copernicus 8,12

3. **Izabela Błażewicz**, Maciej Jaśkiewicz, Marta Bauer, Lidia Piechowicz, Wojciech Kamysz, Roman Nowicki, Wioletta Barańska-Rybak. **Decolonization of Staphylococcus aureus in patients with atopic dermatitis - reason for increasing resistance to antibiotics?** Postepy Dermatol Alergol.

Impact factor 1,342; Punktacja ministerstwa 15,000; Index Copernicus 16,61

DOI: 10.5114/pdia.2016.62140.

4. **Izabela Błażewicz**, Maciej Jaśkiewicz, Lidia Piechowicz, Damian Neubauer, Wojciech Kamysz, Roman Nowicki, Wioletta Barańska-Rybak. **Activity of antimicrobial peptides and conventional antibiotics against superantigen positive Staphylococcus aureus isolated from the patients with atopic dermatitis.** Postepy Dermatol Alergol.

Impact factor 1,342; Punktacja ministerstwa 15,000; Index Copernicus 16,61

DOI: 10.5114/pdia.2016.62141.

Łączny współczynnik oddziaływania (Impact Factor) prezentowanych prac: 2,684

WPROWADZENIE

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) jest wiodącą przyczyną zakażeń bakteryjnych wśród populacji ludzkiej na całym świecie. W sprzyjających warunkach posiada unikalną zdolność wywoływania szerokiego spectrum schorzeń, począwszy od zakażeń skóry i tkanek miękkich, infekcji pokarmowych, wstrząsu toksycznego, poprzez sepsę, zapalenia wsierdza, kości, martwicze zapalenia powięzi oraz zapalenia płuc. Obecność *S. aureus* jest stwierdzana na skórze chorych z atopowym zapaleniem skóry (AZS), z czego 75-100% w obrębie zmian skórnych, a 30-50% w obrębie skóry niezmienionej [1]. Nasilonej kolonizacji bakteryjnej skóry w AZS mogą sprzyjać zarówno zaburzenia odporności humoralnej jak i komórkowej [2]. *S. aureus* stymuluje reakcje zapalne zarówno poprzez bezpośrednie działanie prozapalne, jak również na skutek oddziaływania szeregu czynników (np. białek ściany komórkowej oraz egzotoksyn). Enterotoksyny gronkowcowe wykazują działanie superantygenowe prowadząc do oligoklonalnej aktywacji limfocytów T. Na przestrzeni ostatnich lat zaobserwowano dynamiczną ewolucję gatunku *S. aureus* w kierunku rozwinięcia wysoce patogennych i opornych na antybiotyki szczepów. Stanowi to istotny problem w aspekcie aktualnych możliwości terapeutycznych [3]. Szczególnie alarmujące jest wzrastanie w warunkach ambulatoryjnych infekcji wywoływanych przez oporne na metycylinę szczepy *S. aureus* (MRSA) [4]. W aspekcie narastania oporności na powszechnie stosowane antybiotyki ciekawą alternatywą wydają się być peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs). Ludzki organizm wyposażony jest w ponad 100 AMPs będących integralnym składnikiem odporności wrodzonej. Wykazują one aktywność przeciwbakteryjną, a ich mechanizm działania związany jest z destabilizacją i dezintegracją błon komórkowych drobnoustrojów. Brak konkretnego celu molekularnego w komórce bakteryjnej pozwala domniemywać iż ryzyko rozwoju szczepów opornych na tą grupę związków będzie minimalne, stąd też AMPs stały się przedmiotem intensywnych badań naukowych.

CELE PRACY

1. Analiza epidemiologiczna szczepów *S. aureus* i MRSA (CA-MRSA, HA-MRSA) kolonizujących chorych z atopowym zapaleniem skóry.
2. Analiza szczepów *S. aureus* pod kątem wrażliwości na antybiotyki konwencjonalne (ampicylina, ciprofloksacyna, daptomycyna, erytromycyna, kwas fusydowy, linezolid, linkomycyna, mupirocyna, tetracyklina, wankomycyna) oraz wybrane peptydy przeciwdrobnoustrojowe (CAMEL, Citropina 1.1, LL 37, Temporyna A).
3. Określenie potencjału chorobotwórczego szczepów *S. aureus* poprzez oznaczenie genów toksyn gronkowcowych.

METODYKA I MATERIAŁ BADAŃ

W okresie od 08.2014 – 08.2015 od 100 pacjentów z rozpoznaniem atopowego zapalenia skóry hospitalizowanych w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego lub będącego pod opieką Przyklinicznej Poradni Alergicznych Chorób Skóry Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz od 50 zdrowych osób pobrano wymazy ze skóry (zgięcie łokciowe) i z przedsionka nosa celem wyizolowania szczepów *S. aureus*. Grupę kontrolną stanowili pacjenci bez osobniczego lub rodzinnego wywiadu w kierunku chorób dermatologicznych lub alergicznych, którzy zgłosili się do Przyklinicznej Poradni Dermatologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego celem dermatoskopowej oceny znamion barwnikowych. Identyfikacji szczepów dokonano przy zastosowaniu dwudzielnego podłoża do przesiewowego badania w kierunku kolonizacji MRSA-chromID MRSA/ chromID *S.aureus*. Oznaczono stężenia hamującego wzrost (MIC) badanych szczepów metodą seryjnych rozcieńczeń na 96-dołkowych polistyrenowych płytkach mikrotitracyjnych w bulionie Mueller Hinton II dla antybiotyków konwencjonalnych (ampicylina, ciprofloksacyna, erytromycyna, kwas fusydowy, linezolid, linkomycyna, mupirocyna, tetracyklina, wankomycyna) oraz wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (CAMEL, Citropina 1.1, Daptomycyna, LL 37, Temporyna A). Peptydy zostały zsyntezowane w laboratorium Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej, Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Metodę multiplex PCR zastosowano w celu oznaczenia genów toksyn gronkowcowych odpowiedzialnych za produkcję eksfoliatyny A (*eta*), i B (*etb*), toksyny wstrząsu toksycznego TSST-1 (*tst*), enterotoksyn: A, B, C, D (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*) oraz leukocydyny Panton-Valentina (*lukS-PV/lukF-PV*).

Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną (numer zgody NKBBN / 242-477 / 2014).

OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

Na rozprawę doktorską składają się 4 prace.

Praca pogładowa „*Pozaszpitalne zakażenia szczepami gronkowca złocistego opornego na metycylinę – ewolucja szczepów czy działanie jatrogenne?*”, opublikowana w Przeglądzie Dermatologicznym, stanowi przegląd dotychczasowej wiedzy na temat mechanizmów powstawania antybiotykooporności szczepów *S. aureus* oraz przedstawia charakterystykę szczepów szpitalnych i pozaszpitalnych MRSA. Gronkowiec złocisty oporny na metycylinę został po raz pierwszy opisany w 1961 roku [5]. Szczep MRSA rozprzestrzenił się w krótkim czasie na całym świecie i jest obecnie powszechnie izolowany w większości szpitali i placówek opieki zdrowotnej krajów uprzemysłowionych. Infekcje wywołane przez MRSA tradycyjnie omawiane są w kontekście zakażeń wewnątrzszpitalnych i dotyczą w głównej mierze chorych po zabiegach chirurgicznych, dializowanych, przebywających na oddziałach intensywnej terapii. Szczepy *S. aureus* oporne na metycylinę izolowane od pacjentów szpitalnych (HA-MRSA) są z definicji wielooporne, najczęściej niewrażliwe na tetracykliny, aminoglikozydy, makrolidy, linkozamidy, fluorochinolony, chloramfenikol, kwas fusydowy, rifampicynę. Opisano szczepy oporne na wankomycynę, linezolid i daptomycynę. Pod koniec lat 90 ubiegłego wieku wyizolowano również nowe szczepy bakterii u osób bez wcześniejszego kontaktu ze służbą zdrowia - pozaszpitalne szczepy MRSA (CA-MRSA). W pracy przedstawiono również doniesienia na temat spektrum chorób wywoływanych przez szczepy CA-MRSA. Do najczęstszych należą zakażenia skóry i tkanek miękkich, stanowiące około 90% przypadków. Wśród nich przeważają ropnie i zapalenie tkanki podskórnej [6]. Pozaszpitalne szczepy MRSA są oporne nie tylko na antybiotyki β -laktamowe, lecz także na tetracykliny i niekiedy makrolidy. Wiąże się to z obecnością genów warunkujących zwiększoną zjadliwość tej populacji gronkowca złocistego. Do unikalnych cech szczepów CA-MRSA należą dwa elementy genetyczne: kompleks genów kasety chromosomalnej *mec* (*SCCmec*) zawierający gen oporności na metycylinę i gen wirulencji kodujący toksynę zabijania leukocytów – leukocydynę Pantona-Valentina [7]. W drugiej części pracy zwrócono uwagę na wątpliwą rolę dekolonizacji w eliminacji pozaszpitalnych szczepów gronkowca złocistego. Podkreślono, że donosowe stosowanie mupirocyny nie zmniejszyło kolonizacji błony śluzowej nosa i częstości występowania zakażeń wywołanych przez CA-MRSA [8]. Ponadto jej długotrwałe stosowanie powodowało powstawanie szczepów opornych [9]. Przedstawiono również przegląd piśmiennictwa dotyczący skuteczności antybiotyków

stosowanych w przypadku infekcji CA-MRSA oraz wskazania do ich stosowania. Omówiono szereg nowych związków terapeutycznych, będących w fazie badań klinicznych i obserwacyjnych, do których należą: glikopeptydy (telawancyna, dalbawancyna i oritawancyna), β -laktamy nowej generacji należące do V grupy cefalosporyn (ceftarolina i ceftobiprol), przeciwciała przeciwko toksynom gronkowcowym (PVL, α -hemolizynom).

W pracy poglądowej pod tytułem „*Rola peptydów przeciwdrobnoustrojowych w wybranych dermatozach*”, opublikowanej w Przeglądzie Dermatologicznym, przedstawiono budowę, mechanizm działania, podział i rolę peptydów drobnoustrojowych w patogenezie licznych chorób skóry, m.in. atopowego zapalenia skóry, łuszczycy, trądziku różowatego. Zwrócono uwagę, iż w skórze chorych na AZS stwierdza się zwiększoną liczbę limfocytów Th2, co prowadzi do wzmożonej ekspresji uwalnianych przez nie cytokin: IL-4, IL-10 oraz IL-13, i niskich poziomów cytokin prozapalnych (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) [10]. U pacjentów z łuszczycą wykazano zwiększoną produkcję limfocytów Th1 i neutrofilów [11]. Stwierdzono, że IL-4 i IL-13 hamują indukcję AMPs, głównie HBD-2 i HBD-3 w keratynocytach [12]. Dodatkowo brak stymulatorów wydzielania AMPs – IL-1 β oraz IL-22 – prowadzi do zmniejszonej ekspresji AMPs w skórze chorych na AZS i to zarówno HBD 2 i 3, jak i LL 37 [13]. Pacjenci z AZS mają ponadto obniżoną ekspresję dermicydyny, co przyczynia się do zwiększonej podatności na infekcje skóry. Podkreślono, iż narastanie oporności bakterii na konwencjonalne antybiotyki stanowi poważny problem współczesnej medycyny i skłania do poszukiwania nowych metod terapeutycznych wykorzystujących możliwości obronne ludzkiego organizmu. Zaprojektowano szereg syntetycznych analogów AMPs, opracowano optymalne metody pozyskiwania oraz oczyszczania tych związków, przebadano także ich aktywność przeciwdrobnoustrojową. Aby wdrożenie peptydów do leczenia było możliwe, konieczne jest kontynuowanie i rozszerzenie badań. Rozpatrując je jako potencjalne związki do stosowania w dermatologii, należy przeprowadzić badania aktywności mikrobiologicznej względem szczepów izolowanych od pacjentów z ropnymi chorobami skóry czy badania pod kątem nosicielstwa. Niezbędna jest również ocena zjawiska narastania oporności bakterii na AMPs w celu oszacowania ich wartości jako nowych antybiotyków. Krótkie lipopeptydy mogą znaleźć zastosowanie w terapii chorób o etiologii gronkowcowej z uwagi na wysoką aktywność i stosunkowo niski koszt syntezy. Do leczenia infekcji skóry i tkanek miękkich stosuje się nowy antybiotyk należący do grupy lipopeptydów – daptomycynę, która

charakteryzuje się wysoką aktywnością w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, w tym *S. aureus*. [14].

W pracy oryginalnej pod tytułem „*Decolonization of Staphylococcus aureus in patients with atopic dermatitis - reason for increasing resistance to antibiotics?*”, przyjętej do druku w czasopiśmie *Advances in Dermatology and Allergology*, przedstawiono analizę epidemiologiczną szczepów *S. aureus* kolonizujących chorych z AZS. W Polsce brak jest danych epidemiologicznych dotyczących kolonizacji szczepów *S. aureus* i MRSA u pacjentów z AZS. W grupie badanej stwierdzono odpowiednio: 75% (wymaz ze skóry) i 73% (wymaz z nosa) szczepów gronkowca złocistego wrażliwych na metycylinę (MSSA). MRSA zidentyfikowano w 11% izolatów. W kolejnym etapie pracy przedstawiono analizę antybiotyko-wrażliwości szczepów dla następujących antybiotyków: ampicylina, ciprofloksacyna, daptomycyna, erytromycyna, kwas fusydowy, linezolid, linkomycyna, mupirocyna, tetracyklina, wankomycyna. Odnotowano stosunkowo duży odsetek szczepów opornych na mupirocynę (17,5%) i kwas fusydowy (15,5%) - antybiotyki miejscowe szeroko stosowane w celu dekolonizacji *S. aureus* u pacjentów z AZS. W pracy przedstawiono również mechanizmy powstawania oporności na mupirocynę i kwas fusydowy. Liczne badania dotyczące efektu leczenia przeciwbakteryjnego w aspekcie nosicielstwa *S. aureus* w AZS i nasilenia stanu zapalnego dały sprzeczne wyniki. Przytoczone zostały wyniki prac eksperymentalnych, w których realizowano zarówno badania otwarte jak i badania z podwójną ślepą, kontrolowane placebo. Dotyczyły one stosowania miejscowego oraz doustnych antybiotyków które wykazywały zmniejszenie gęstości kolonizacji i częściowe zmniejszenie stanu zapalnego [15, 16]. Niektóre badania dowiodły braku poprawy u chorych z AZS leczonych doustnymi antybiotykami [17, 18]. We wspomnianych pracach, niezależnie od proponowanej metody leczenia do rekolonizacji *S. aureus* dochodziło po 4-8 tygodniach [19]. W końcowych wnioskach podkreślono, że miejscowe stosowanie antybiotyków nie powinno być zalecane u pacjentów z AZS celem dekolonizacji przede wszystkim z powodu ryzyka rozwoju szczepów opornych.

W pracy oryginalnej pod tytułem „*Activity of antimicrobial peptides and conventional antibiotics against superantigen positive Staphylococcus aureus isolated from the patients*”

with atopic dermatitis”, przyjętej do druku w czasopiśmie *Advances in Dermatology and Allergology*, podjęto próbę analizy szczepów gronkowcowych pod kątem obecności genów dla poszczególnych toksyn gronkowcowych. Aby zbadać możliwości chorobotwórcze szczepów MRSA i dokonać analizy porównawczej w stosunku do szczepów MSSA, zbadano obecność genów następujących toksyn gronkowcowych, takich jak: eksfoliatyna A (*eta*) i eksfoliatyna B (*etb*), toksyny wstrząsu toksycznego TSST-1(*tst*), enterotoksyny A, B, C, D (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*) oraz geny leukocydyny Panton-Valentine (luks-PV/lukF-PV). Badania występowania genów toksyn przeprowadzone metodą multiplex PCR wykazało, że u szczepów MRSA występowały inne geny toksyn niż wśród gronkowców MSSA, z wyjątkiem genu eksfoliatyny A, PVL i genu enterotoksyny B, który wykrywano w obu grupach szczepów. Wśród gronkowców MRSA znamienne częściej wykrywano geny eksfoliatyny B oraz PVL.

Znaczącą rolę w patogenezie zakażeń gronkowcowych mają toksyny o charakterze superantygenów, do których należą enterotoksyny, toksyna wstrząsu toksycznego i eksfoliatyny, a także leukocydyna Pantona-Valentine. Superantygeny gronkowcowe mają zdolność penetracji naskórka i skóry właściwej, reagują z różnymi komórkami układu immunologicznego skóry stymulując procesy zapalne, indukują reakcję zapalną w miejscu aplikacji na skórze oraz stymulują produkcję IgE skierowanych przeciwko poszczególnym superantygenom. Większość szczepów izolowanych od chorych z AZS wydziela toksyny pełniące funkcję superantygenów, co potwierdzono również w prezentowanej pracy (69% badanych szczepów wydzielało superantygeny). Badając wrażliwość szczepów *S. aureus* w stosunku do AMPs nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy wydzielającymi i nie wydzielającymi superantygenów. Odmienną sytuację zaobserwowano podczas oznaczania wrażliwości na klasyczne antybiotyki. Szczepy *S. aureus* wydzielające superantygeny wykazywały wyższe wartości MIC dla antybiotyków takich jak erytromycyna, kwas fusydowy i mupirocyna.

W pracy przedstawiono również wyniki badań dotyczące antybiotyku należącego do grupy liopeptydów-daptomycyny. Badania aktywności mikrobiologicznej naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych potwierdzają ich wysoką aktywność względem szerokiego spektrum drobnoustrojów, w tym szczepów opornych na konwencjonalne antybiotyki takich jak MRSA. Mechanizm działania większości peptydów przeciwdrobnoustrojowych opiera się na permeabilizacji błony drobnoustrojów. Niebywałymi zaletami wynikającymi z

mechanizmu działania AMPs są ich aktywność bakteriobójcza oraz niskie ryzyko wytworzenia przez bakterie oporności na te związki. Daptomycyna znalazła szerokie zastosowanie w leczeniu infekcji skóry i tkanek miękkich. Charakteryzuje się wysoką aktywnością w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, w tym *S. aureus*. W prezentowanej pracy podjęto próbę oceny wrażliwości szczepów *S. aureus* na powyższy antybiotyk. Odnotowano 54.72% szczepów niewrażliwych na daptomycynę, mimo braku wcześniejszej terapii powyższym lekiem. W pracy przedstawiono mechanizmy oporności na daptomycynę, oraz szereg doniesień literaturowych podkreślających niezwykle szybko narastającą oporność na ten lek.

STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is the leading cause of bacterial infections of the human population worldwide. Under favorable conditions, has the unique ability to generate a broad spectrum of diseases, ranging from skin and soft tissue infections, toxic shock syndrome, sepsis, endocarditis, osteitis, necrotizing fasciitis and pneumonia. Vast majority of patients (75 to 100%) with atopic dermatitis (AD) present skin colonization by *S. aureus* within lesions and 30-50% of them within unaffected skin. Bacterial colonization of the skin in AD is supported by both abnormal humoral and cell-mediated immunity [2]. *S. aureus* stimulates the inflammatory response both via direct pro-inflammatory effects and interactions with a variety of factors (eg. cell wall proteins and exotoxins). Staphylococcal enterotoxins exhibit superantigen activity resulting in oligoclonal T cell activation. Over the past few decades, there has been a dynamic evolution of the *S. aureus* species resulting in the development of highly pathogenic and antibiotic-resistant strains. It constitutes a significant problem in the aspect of current therapeutic options [3]. Particularly alarming is an increase of infections caused by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in an outpatient conditions [4]. In the aspect of increasing resistance to commonly used antibiotics, antimicrobial peptides (AMPs) appear to be a promising alternative to conventional antibacterial drugs. The human body is equipped with more than 100 AMPs, being the integral component of innate immunity. They exhibit antimicrobial activity and their mechanism of action is related to the destabilization and disintegration of microorganisms cell membranes. The lack of specific molecular targets in a bacterial cell can presume that the risk of resistance development might be limited. Therefore AMPs have become the subject of intense research.

OBJECTIVES

1. The epidemiological analysis of *S. aureus* and MRSA (CA-MRSA and HA-MRSA) strains colonizing patients with atopic dermatitis.
2. The analysis of the susceptibility profile of *S. aureus* strains to the conventional antibiotics (ampicillin, ciprofloxacin, daptomycin, erythromycin, fusidic acid, linezolid, lincomycin, mupirocin, tetracycline, vancomycin) and selected antimicrobial peptides (CAMEL, Citropin 1.1, LL 37 and Temporin A).
3. The analysis of pathogenic potential of *S. aureus* strains by staphylococcal toxin genes characterization.

METHODS AND MATERIALS

Patients were enrolled in our study during hospitalization in the Department of Dermatology, Venereology and Allergology in Gdańsk and their visits in the Outpatient Clinic from August 2014 to August 2015. Skin and nasal swabs were collected from 100 patients with AD and from 50 individuals (control group) in order to investigate the presence of *S. aureus*. The control group consisted of patients without personal or family history of skin or allergic diseases that visited Dermatological Outpatient Clinic for the dermatoscopy evaluation of moles. Preliminary identification and detection of *S. aureus* and MRSA strains was conducted using ChromID MRSA/ChromID *S. aureus* biplate (bioMérieux) for the simultaneous detection of *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth microdilution method in Mueller Hinton II broth on polypropylene 96-well plates for conventional antibiotics (ampicillin, ciprofloxacin, daptomycin, erythromycin, fusidic acid, linezolid, lincomycin, mupirocin, tetracycline, vancomycin) and selected antimicrobial peptides (CAMEL, Citropina 1.1, LL 37, Temporin A). Peptides were synthesized in the Laboratory of the Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University in Gdańsk. The multiplex PCR was used for determination of staphylococcal toxins genes responsible for the production of exfoliative toxin A (*eta*) and B (*etb*), toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*), enterotoxins A, B, C, D (*sea-sed*) and Panton Valentine leukocidine (*lukS-PV/lukF-PV*).

The study was approved by the local Research Ethics Board (approval number NKBBN/242-477/2014).

REVIEW OF THE PUBLICATIONS

The dissertation consist of 4 articles.

The review paper "Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – evolution of the strains or iatrogenic effects?", published in the Dermatology Review, provides an overview of current knowledge on mechanisms of *S. aureus* strains resistance, and presents the characteristics of community-associated MRSA (CA-MRSA) and health care-associated MRSA (HA-MRSA). *S. aureus* resistant to methicillin was first described in 1961 [5]. The strain of MRSA has spread quickly around the world, and is now commonly isolated in most hospitals and health care facilities in industrialized countries. Infections caused by MRSA are traditionally discussed in the context of hospital infections and are related primarily to patients after surgery, dialysis, hospitalized in intensive care units. Health care-associated MRSA strains are, by definition, multi-resistant, mostly to tetracyclines, aminoglycosides, macrolides, lincosamides, quinolones, chloramphenicol, fusidic acid, rifampicin. Strains resistant to vancomycin, linezolid and daptomycin were described. In the late 90s of the last century new strains of bacteria in patients without prior contact with the health service - community-acquired MRSA- were isolated. This paper also presents reports about the spectrum of diseases caused by CA-MRSA strains. The most common are skin and soft tissue infections, representing about 90% of cases. Among them dominate abscesses and cellulitis [6]. CA-MRSA strains are resistant not only to β -lactam antibiotics, but also tetracycline and macrolides. This is related to the presence of genes responsible for the increased virulence of *Staphylococcus aureus* population. The unique features of CA-MRSA strains include two genetic elements: a complex of a chromosomal gene cassette *mec* (*SCCmec*) including methicillin resistance gene and the gene encoding the virulence of toxin killing leukocytes - Panton-Valentine leukocidine [7]. In the second part of the review the questionable role of decolonization in the elimination of community-acquired strains of *Staphylococcus aureus* was highlighted. It was emphasized, that the use of intranasal mupirocin did not reduce colonization and the prevalence of infections caused by CA-MRSA [8]. Moreover, its long-term use resulted in the emergence of resistant strains [9]. The overview of the literature regarding the efficacy of antibiotics used in the case of CA-MRSA infections and the indications for their use were presented. A number of new therapeutic compounds, which are in clinical trials and observational studies, including glycopeptides (telavancin, dalbavancin and oritavancin), new generation β -lactams belonging to the group V

of cephalosporin (ceftarolin and ceftobiprol), antibodies against staphylococcal toxins (PVL, α -hemolizins) were discussed.

In the review paper entitled "The role of antimicrobial peptides in selected dermatoses" published in the *Dermatology Review*, the structure, mechanism of action, division and role of antimicrobial peptides in the pathogenesis of many skin diseases, including atopic dermatitis, psoriasis and rosacea, were presented. It was noted that in the skin of AD patients there is an increased number of Th2 cells, which leads to increased expression of cytokines: IL-4, IL-10 and IL-13 and low level of proinflammatory cytokines (TNF- α , IFN γ , IL-1 β) [10]. In patients with psoriasis increased production of Th1 cells and neutrophils was demonstrated [11]. It was reported that IL-4 and IL-13 inhibit induction of AMPs, mainly HBD-2 and HBD-3 in keratinocytes [12]. In addition, the lack of secretion of AMPs stimulators-IL-1 β and IL-22 - leads to decreased expression of AMPs, both HBD 2 ,3 and LL 37 in the skin of AD patients [13]. Patients with AD have decreased dermicidin expression, which contributes to increased susceptibility to skin infections. It was emphasized that the increase of bacterial resistance to conventional antibiotics is a serious problem of medicine and it encourages to the search for new therapeutic options. A series of synthetic analogs of AMPs were designed, optimal methods of obtaining and purifying these compounds were developed and their antimicrobial activity were tested. To implement the peptides to the treatment, it is necessary to continue and extend the research. Considering them as potential compounds for use in dermatology, microbial activity studies should be performed, related to the strains isolated from patients with purulent skin diseases or tested for carrier. The evaluation of increasing resistance of bacteria to AMPs is necessary to estimate their value as new antibiotics. Short lipopeptides may be useful in the treatment of staphylococcal diseases due to its high activity and relatively low cost of synthesis. New antibiotic belonging to the lipopeptides group – daptomycin- characterized by high activity against Gram-positive bacteria including *S. aureus*, is used to treat skin and soft tissue infections [14].

In the original paper titled "Decolonization of *Staphylococcus aureus* in patients with atopic dermatitis - reason for increasing resistance to antibiotics?", accepted for publication in the *Advances in Dermatology and Allergology*, an epidemiological analysis of *S. aureus* strains colonized patients with AD was presented. There are no prevalence data for *S. aureus* and MRSA colonization among AD patients in Poland. *S. aureus* strains were isolated from the majority of our patients, either from the skin (75%) or the anterior nares (73%). In the present

study of the 100 nasal swabs, 11% were positive for MRSA. In the next part of paper, an analysis of susceptibility profile for the following antibiotics: ampicillin, ciprofloxacin, daptomycin, erythromycin, fusidic acid, linezolid, lincomycin, mupirocin, tetracycline, vancomycin, was reported. There has been a relatively high percentage of mupirocin (17.5%) and fusidic acid (15.5%) resistant strains - topical antibiotics widely used for the decolonization of *S. aureus* in patients with AD. The mechanisms of resistance to mupirocin and fusidic acid was also described in the paper. Several studies concerning the effect of antimicrobial treatment on the *S. aureus* colonization and the severity of inflammation gave conflicting results. The results of experimental work, which was carried out in both open or double-blind placebo-controlled trials, were cited. Topical or systemic antibiotics were able to reduce colonization density and led to a partial improvement of skin lesions [15, 16]. On the other hand, treatment with oral antibiotics did not lead to a significant improvement of AD in some studies [17,18]. In the mentioned papers, regardless of the proposed treatment method benefits last no longer than 4-8 weeks [19]. In the final conclusions it was emphasizes that the use of topical antibiotics should not be recommended for decolonization in patients with AD, because of the risk of resistance development.

In the original paper entitled "Activity of antimicrobial peptides and conventional antibiotics against superantigen positive *Staphylococcus aureus* isolated from the patients with atopic dermatitis," accepted for publication in the *Advances in Dermatology and Allergology*, an attempt was made to analyze the staphylococcal strains for the presence of staphylococcal toxins genes. To assess the pathogenic potential of MRSA strains and to make a comparative analysis in relation to the MSSA strains, the presence of staphylococcal toxins genes responsible for the production of exfoliative toxins A (ETA) and B (ETB), toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), enterotoxins A, B, C, D (SEA-SED) and Panton Valentine leukocidine (PVL) was assessed. MRSA strains secreted other toxin compared to MSSA, except of the gene of exfoliative toxin A, PVL and enterotoxin B, which was detected in both groups of strains. Among the MRSA, genes of exfoliative toxins A and PVL was significantly more frequently detected. A significant role in the pathogenesis of staphylococcal infections have toxins that possess properties of superantigens, which include enterotoxins, toxic shock syndrome toxins, exfoliative toxins and Panton-Valentine leukocidine. Staphylococcal superantigens have the ability to penetrate the epidermis and dermis, react with various cells of the immune system, stimulate skin inflammation, induce an inflammatory reaction at the

application site and to stimulate the production of IgE directed against each superantigen. Most of the strains isolated from patients with AD secrete toxins which act as superantigens, this was also confirmed in this paper (69% of the tested strains secrete superantigens). Considering susceptibility to antimicrobial peptides, no significant differences between strains producing tested superantigens and nonproducing strains was noticed. The opposite situation was noticed in susceptibility to conventional antibiotics. *S. aureus* strains that secrete superantigens showed higher MIC values for antibiotics such as erythromycin, fusidic acid and mupirocin.

The paper presents also the results of susceptibility profile of daptomycin- antibiotic belonging to the lipopeptides group. Studies of microbiological activity of antimicrobial peptides have confirmed the high activity against a broad spectrum of microorganisms, including MRSA strains resistant to conventional antibiotics. The mechanism of action of most AMPs is based on permeabilization of their membranes. The great advantage of an AMPs mechanism of action is their bactericidal activity and low risk of resistance development. Daptomycin is widely used in the treatment of skin and soft tissue infections. It is characterized by high activity against Gram-positive bacteria, including *S. aureus*. In the study attempt was made to assess the sensitivity profile of isolated strains to above mentioned antibiotic. 54.8% of isolates were non-susceptible to daptomycin, despite the absence of daptomycin therapy. The paper also describes the resistance mechanism and presents a series of literature reports emphasizing the extremely fast growing non-susceptibility to the drug.

WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA

1. Petry v, Bessa GR, Poziomczyck CS, et al.
Bacterial skin colonization and infections in patients with atopic dermatitis.
An Bras Dermatol. 2012;87(5):729-34.
2. Elliott S, Hanifin J. Delayed cutaneous hypersensitivity and lymphocyte transformation: dissociation in atopic dermatitis. Arch Dermatol 1979; 115: 36-39.
3. Duckworth GJ, Oppenheim BA. Enterotoxin production in epidemic Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 1986; 1: 565-6.
4. DeLeo FR, Diep BA, Otto M. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. Infect Dis Clin North Am. 2009; 23 (1): 17-34.
5. Jevons MP. "Celbenin" – resistant staphylococci. Br Med J 1961, 1, 124-125.
6. Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. N Engl J Med 2005, 352, 1436-1444.
7. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother 2002, 46, 1147-1152.
8. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis 2003, 9, 978-984.
9. Pérez-Fontán M, Rosales M, Rodríguez-Carmona A, et al. Mupirocin resistance after longterm use for *Staphylococcus aureus* colonization in patients undergoing chronic peritoneal dialysis. Am J Kidney Dis 2002, 39, 337-341.
10. Nomura I, Goleva E, Howell MD, et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. J Immunol 2003, 171, 3262-3269.
11. Giustizieri ML, Mascia F, Frezzolini A, et al. Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. J Allergy Clin Immunol 2001, 107, 871-877.
12. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. N Engl J Med 2002, 347, 1151-1160.

13. Wolk K, Kunz S, Witte E, et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004, 21, 241-254.
14. Dawgul M, Barańska-Rybak W, Greber K et al. Aktywność mikrobiologiczna krótkich lipopeptydów wobec klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus*. *Alergia, Astma, Immunol.* 2011; 16(1): 31-36.
15. Luber H, Amornsiripanitch S, Lucky A. Mupirocin and the eradication of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis. *Arch Dermatol.* 1988; 124(6): 853-854.
16. White M, Noble W. Consequences of colonization and infection by *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol.* 1986;11(1): 34-40.
17. Boguniewicz M, Sampson H, Leung B, et al. Effects of cefuroxim axetil on *S. aureus* colonization and superantigen production in atopic dermatitis. *J Allergy and Clin Immunol.* 2001; 108(4): 651-652.
18. Ewing C, Ashcroft C, Gibbs A, et al. Flucloxacillin in the treatment of atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 1998;138(6): 1022-1029.
19. Breuer K, Häussler S, Kapp A, et al. *Staphylococcus aureus*: colonizing features and influence of an antibacterial treatment in adults with atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2002;147(1): 55-61.

PODZIĘKOWANIA

Pragnę serdecznie podziękować

Mojemu Promotorowi, Pani dr hab. n. med. Wioletcie Barańskiej-Rybak, za merytoryczną opiekę nad moją pracą naukową, za pomoc, a przede wszystkim za inspirację, motywację do pracy i nieocenione wskazówki, bez których ta praca nie mogłaby powstać.

Kierownikowi Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed, Panu Prof. dr hab. n. med. Romanowi Nowickiemu i Zespołowi Kliniki, za tworzenie optymalnych warunków do pracy naukowej, okazane wsparcie i słowa zachęty.

Kierownikowi Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej GUMed, Panu dr hab. n. farm. Wojciechowi Kamyszowi, prof. nadzw. GUMed oraz Zespołowi Katedry za zapoznanie mnie z tajnikami syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz metod oznaczania antybiotykowrażliwości, a także za cenne uwagi przekazane w trakcie realizacji pracy.

Kierownikowi Katedry Mikrobiologii GUMed, Pani dr hab. n. med. Lidii Piechowicz, za zapoznanie mnie z metodami wykrywania genów toksyn gronkowcowych, za niezwykle życzliwość i bardzo cenne wskazówki niezbędne w trakcie realizacji pracy.

Moim Rodzicom i Siostrze, za wsparcie i wiarę w moje możliwości.

Moim Przyjaciółom i Bliskim, za pomoc przy powstawaniu pracy.

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY