

Analiza zmienności genetycznej toksynotwórczych szczepów *Clostridioides difficile* w Klinice Nowotworów Układu Chłonnego na przestrzeni 10 lat.

STRESZCZENIE

Clostridioides difficile (*C. difficile*) uznawany jest za główny czynnik etiologiczny biegunek szpitalnych. Z powodu niekontrolowanego stosowania antybiotyków oraz zwiększającej się liczby pacjentów z grup ryzyka (podeszły wiek, immunosupresja, przewlekłe choroby leczone szpitalnie) liczba zakażeń *C. difficile* znacząco wzrosła w ciągu ostatnich dziesięciu lat. I dlatego w strategii zapobiegania tym zakażeniom coraz większego znaczenia nabiera identyfikacja osób o zwiększonym ryzyku wystąpienia infekcji oraz poszukiwanie potencjalnych źródeł zakażenia. W tym kontekście analiza pokrewieństwa filogenetycznego między poszczególnymi izolatami nabiera szczególnego znaczenia. W diagnostyce epidemiologicznej coraz powszechniej stosuje się techniki całogenomowego sekwencjonowania, które dostarczają precyzyjnych danych do poszukiwania pokrewieństwa genetycznego między szczepami bakteryjnymi. Umożliwiają one rozróżnienie infekcji nawrotowej od nowego zakażenia poprzez analizę zmienności genetycznej, jak również mapowanie transmisji zakażenia.

Celem tej pracy była ocena zmienności genetycznej toksynotwórczych szczepów *C. difficile*, izolowanych od pacjentów hospitalizowanych w Klinice Nowotworów Układu Chłonnego Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie na przestrzeni 10 lat z użyciem całogenomowego sekwencjonowania.

W latach 2008-2018 przebadano łącznie 2077 próbek kału w kierunku obecności toksyn A i B *C. difficile*, które pochodziły od pacjentów hospitalizowanych w Klinice Nowotworów Układu Chłonnego. Wynik dodatni uzyskano w 618 przypadkach. Liczba badań próbek kału na obecność toksyny A i B wahała się między 122 a 251 rocznie, ze średnim odsetkiem dodatnich wyników równym 48,8% w latach 2008-2010, 30,3% - w latach 2011-2014 i 10,5% - w latach 2015-2018.

Spośród 285 izolatów uzyskanych z hodowli *C. difficile* w latach 2008-2018, do sekwencjonowania całogenomowego wybrano 140 izolatów; 104 izolaty uzyskano z kału 46 pacjentów (19 kobiet i 27 mężczyzn ze średnią wieku 47 lat), którzy przebyli co najmniej jedno zakażenie nawrotowe i 36 izolatów uzyskano z kału 17 kobiet i 19 mężczyzn (średnia wieku 55 lat) z pojedynczym zakażeniem *C. difficile*. U wszystkich pacjentów zdiagnozowano chłoniaka.

Genotypowanie metodą MLST (Multilocus Sequence Typing), opartą na porównywaniu sekwencji 7 genów metabolizmu podstawowego, pozwoliło zidentyfikować 23 typy sekwencyjne (ST) oraz dwa wcześniej nieopisane szczepy, które można było przypisać do jednej z 6 filogenetycznych gałęzi. Najczęstszymi typami sekwencyjnymi były ST1 i ST42, które stanowiły 31,4% i 30,1%

wszystkich izolatów. Podczas gdy częstotliwość występowania ST1 była stosunkowo równomierna w całym okresie obserwacji, typ ST42 występował tylko w latach 2009-2011.

Badanie wrażliwości wyizolowanych szczepów *C. difficile* na wybrane leki przeciwdrobnoustrojowe wykazało, że odpowiednio 100% i 72,9% izolatów było opornych na ciprofloksacynę oraz moksifloksacynę. Często stwierdzano także oporność na erytromycynę oraz klindamycynę (odpowiednio 72,9% i 42,9% badanych szczepów), natomiast nie wykryto żadnego szczepu opornego na wankomycynę i metronidazol. Wszystkie przebadane szczepy należące do typu ST1 oraz ST42 były oporne na ciprofloksacynę, erytromycynę i moksifloksacynę, podczas gdy oporność na klindamycynę dotyczyła 56,8% szczepów ST1 oraz 30,2% ST42.

Wysokie odsetki wyników dodatnich na obecność toksyny A i B w kale pacjentów badanych w latach 2008-2010 (48,8%) mogły wskazywać na epidemiczne występowanie zakażeń w Klinice Nowotworów Układu Chłonnego powiązanych z brakiem skutecznych metod nadzoru epidemicznego. Dominującym typem toksynotwórczości był typ $tcdA^+tcdB^+cdtA/cdtB^+$ stwierdzony w 122 (87%) szczepach, natomiast 9 izolatów (należących do ST9, 35, 37 i 45 oraz dotychczas nieopisanego ST) charakteryzowało się typem toksynotwórczości $tcdA^+tcdB^+cdtA/cdtB^-$. Spośród trzech izolatów ST3, dwa były toksynotwórcze ($tcdA^+tcdB^+cdtA/cdtB^+$), a jeden nietoksynotwórczy ($tcdA^-tcdB^-cdtA/cdtB^-$).

Analiza pokrewieństwa genetycznego wykazała wysoki stopień podobieństwa między izolatami *C. difficile*, co sugeruje wewnątrzszpitalne źródła zakażenia, w tym transmisję między chorymi oraz prawdopodobnie skontaminowane środowisko szpitalne.

Słowa kluczowe: *Clostridioides difficile*, sekwencjonowanie całogenomowe, typ sekwencyjny (ST)