

Streszczenie

Stale rosnąca liczba wielolekoopornych szczepów *K. pneumoniae* utrudnia lub wręcz uniemożliwia proces leczniczy. Dlatego poszukuje się alternatywnych metod terapeutycznych, w tym wykorzystuje się terapię fagową. Liczne badania pokazują, że leczenie z wykorzystaniem fagów jest skuteczne, jednakże nie są do końca poznane skutki selekcji populacji bakterii opornych na te wirusy. Głównym mechanizmem ucieczki przed infekcją fagową jest blokowanie adsorpcji fagów poprzez modyfikację lub utratę receptora na powierzchni komórki bakteryjnej. Jednakże każda zmiana w tych strukturach może wpływać na potencjał infekcyjny samej bakterii jako patogenu. Dlatego też w niniejszej pracy postawiono hipotezę, zgodnie z którą oporne na fagi klonów bakteryjne wyselekcjonowane po infekcji fagowej, są mniej wirulentne i bardziej wrażliwe na mechanizmy obronne układu immunologicznego gospodarza.

Aby potwierdzić postawioną hipotezę oceniono powstawanie zmian fenotypowych i genotypowych u klonów izolowanych po infekcji fagowej z 5 szczepów klinicznych *K. pneumoniae* (Kp486, Kp77, Kp271, Kp767 i Kp700603). Do badań wykorzystano pięć fagów (KP36, KP34, KP32, KP27 i KP15) należących do różnych grup taksonomicznych, różnej morfologii wirionu oraz rozpoznających różne receptory. Fagi stosowano jako pojedyncze preparaty lub koktajle. Przy charakterystyce uzyskanych klonów bakteryjnych badano następujące cechy fenotypowe: profil wrażliwości na kolekcję fagów, zmiany morfotypu kolonii (forma mukoidalna), długość łańcucha swoistego LPS, zdolność do tworzenia biofilmu, wrażliwość na antybiotyki, podatność na bakteriobójczą aktywność surowicy oraz potencjał patogenności bakterii *in vivo* na modelu *G. mellonella*. Ocena genotypowa obejmowała pełne sekwencjonowanie genomowe, w celu określenia podstaw genetycznych i korelacji z obserwowanymi zmianami fenotypowymi.

Presja fagów rozpoznających otoczki (KP34 i KP36) lub białka (miowirusy KP15 i KP27) wpływała na modyfikacje w strukturach powierzchniowych gospodarza co skutkowało opornością krzyżową na fagi wykorzystujące ten sam receptor. Jednakże zdarzało się, iż bakterie pozostawały wrażliwe na jeden z dwóch wirusów co może wynikać z różnic w mechanizmie adsorpcji danego faga. Oporność na infekcję fagami zależnymi od otoczki przejawiała się jako utrata receptora (m.in. mutacje w genach *wzc* i *wbaP* odpowiedzialnych za syntezę tej struktury) lub maskowanie (obecność fenotypu mukoidalnego). Ten drugi typ oporności występował także przy oporności na miowirusy.

16.06. 2023
Sonia P. Edele

Uwrażliwienie na miowirusy może wynikać z oporności związanej ze zmianą receptora, czyli utratą otoczki oraz odsłonięciem innych receptorów, na przykład Omp czy fimbrii. Wzmoczoną produkcję biofilmu zaobserwowano tylko w przypadku presji selekcyjnej fagów rozpoznających otoczki.

Spadek zjadliwości uzyskanych klonów bakteryjnych badano w dwóch aspektach-uwrażliwieniu klonów na układ dopełniacza i przeżyciu zainfekowanych larw *G. mellonella*. W obu badaniach miowirusy oraz podowirus KP34 wpływały na zmniejszenie wirulencji klonów bakteryjnych. Infekcja fagiem KP36 u Kp77 związana była z delecją fragmentu sekwencji plazmidowej zawierającej geny kodujące oporność na kilka grup antybiotyków, w tym produkcji beta-laktamazy typu ESBL co skutkowało uwrażliwieniem na antybiotyki.

Chociaż terapia z wykorzystaniem tych wirusów bakteryjnych jest obiecującą alternatywą dla antybiotyków to konieczne są szczegółowe badania nad zmianami w biologii bakterii, które mogą skutkować zmianami w zjadliwości, a co za tym idzie w charakterystyce przebiegu zakażenia bakteryjnego, które ten patogen wywołuje. Wszystkie te czynniki będą wpływać na efektywność terapii z zastosowaniem fagów.

16.06.2023
Szymon Eche

Abstract

The number of multidrug-resistant strains of *K. pneumoniae* constantly grows. That makes the therapeutic process difficult or even impossible. Therefore, alternative therapeutic methods are considered, including phage therapy. Numerous studies show that the phage therapy is effective. However, the consequences of phage-resistant bacterial populations selection are not fully elucidated. The major mechanism for escaping phage infection is blocking phage adsorption by modifying or losing the receptor located on the surface of the bacterial cell. However, any change in these structures may affect the infective potential of the bacterium as a pathogenic being. Therefore, in this work, we hypothesized that phage-resistant bacterial clones selected after phage infection are less virulent and more sensitive to the defense mechanisms of the host's immune system.

To confirm the hypothesis, the formation of phenotypic and genotypic changes in clones isolated after phage infection from 5 clinical strains of *K. pneumoniae* (Kp486, Kp77, Kp271, Kp767, and Kp700603) were assessed. In this study, five phages (KP36, KP34, KP32, KP27, and KP15) belonging to various taxonomic groups, possessed other virion morphology and recognized different receptors were used. Single preparations of phages or phage cocktails were applied. With the characterization of the obtained bacterial clones the following phenotypic characteristics were investigated: sensitivity profile to phage collections, changes in colony morphotype (muroid form), LPS-specific chain length, biofilm-forming ability, susceptibility to serum bactericidal activity and bacterial pathogenic potential *in vivo* in *G. mellonella* model. The genotypic evaluation included whole genomic sequencing to determine the genetic basis and the correlations with the observed phenotypic changes.

The pressure of phages recognizing capsules (KP34 and KP36) or proteins (myoviruses KP15 and KP27) caused modifications in the surface structures of the host. That resulted in cross-resistance to phages recognizing the same receptor. However, some clones remained sensitive to one of the two viruses. That phenomenon may exist due to differences in the adsorption mechanism of a given phage. Resistance to infection with capsule-dependent phages manifested as loss of the receptor (including mutations in the genes *wzc* and *wbaP* responsible for the synthesis of this structure) or receptor masking (presence of the muroid phenotype). This second type of resistance was also present with resistance to myoviruses.

The sensitization to myoviruses may result from resistance associated with receptor change, (loss of the capsule) and thus exposure to other receptors, for example, Omp

16.06.2023
A. Smirnova E. Golov

or fimbriae. Increased production of biofilm occurred only under the pressure of phages recognizing the capsule.

The decrease in the virulence of the obtained bacterial clones was studied in two aspects – clones sensitization to the serum complement and survival rate of infected *G. mellonella* larvae. In both analyses, myoviruses, and podovirus KP34 reduced the virulence of bacterial clones.

Phage KP36 pressure on the population of Kp77 was associated with a plasmid sequence deletion containing genes encoding resistance to several groups of antibiotics, including the production of ESBL-type beta-lactamase. This resulted in sensitization to antibiotics.

Although phage therapy is a promising alternative to antibiotics, it is necessary to conduct detailed research to check possible changes in bacterial biology. That may result in alternate bacterial virulence and characteristics of the bacterial infection that this pathogen causes. All these factors will affect the effectiveness of phage therapy.

16.06. 2023
Samartha Acharya